

**UNIVERSIDAD RICARDO PALMA**  
**ESCUELA DE POSGRADO**

**MAESTRÍA EN SISTEMAS DE GESTIÓN DE LA  
CALIDAD E INOCUIDAD EN LA INDUSTRIA  
ALIMENTARIA**



Tesis para optar el Grado Académico de Maestro en Sistemas de Gestión  
de la Calidad e Inocuidad en la Industria Alimentaria

Uso de modelamiento estocástico para estimar la probabilidad de  
contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de  
electrolitos

Autor: Bach. Ramos Guerrero, Félix Giovanni

Asesor: Dr. Silva Jaimes, Marcial Ibo

LIMA – PERÚ

2021

Miembros del Jurado Examinador para la evaluación de la sustentación de la tesis,  
que está integrado por:

Dr. Tomás Agurto Sáenz

(Presidente)

Mg. Juan Carlos Ramos Gorbeña

(Miembro)

Mg. Yuri Moisés Torres Kam

(Miembro)

Dr. Marcial Ibo Silva Jaimes

(Asesor)

(Representante de la Escuela de Posgrado - EPG)

## **DEDICATORIA**

A Dios, a mi madre Rosa Amelia Guerrero Carreño, a mi esposa Magaly Elizabeth Valencia Ramírez y a mis hijos Joaquín y Leonardo. A todos ellos por su entrega, amor y paciencia en todo este tiempo que dediqué a la realización de esta tesis.

Muchísimas gracias, los amo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A cada una de las personas que hicieron posible la realización de esta tesis.

A mi familia, por su amor, paciencia y por permitir tomar un tiempo de ellos y dedicarlo al desarrollo de esta tesis. Los amo infinitamente y siempre le agradezco a Dios por haberme brindado una familia tan maravillosa.

A mi asesor, el Dr. Marcial Silva, por ser un gran amigo, por su gran ayuda y por impulsarme a seguir y finalizar este proyecto.

Al Dr. Marcelo Signorini, quién con su paciencia y tiempo pudo ayudarme a desarrollar todos los cálculos estadísticos y el modelamiento estocástico. Un agradecimiento especial para él.

Finalmente, a la empresa SELVA INDUSTRIAL S.A., quién me permitió desarrollar la investigación en la línea de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.

# ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO .....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	x
RESUMEN .....	xi
ABSTRACT.....	xii
INTRODUCCIÓN .....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	4
1.1. Descripción del problema.....	5
1.2. Formulación del problema.....	6
1.2.1. Problema general .....	6
1.2.2. Problemas específicos .....	6
1.3. Importancia y justificación del estudio .....	7
1.4. Delimitación del estudio.....	8
1.5. Objetivos de la investigación.....	8
1.5.1. Objetivo general .....	8
1.5.2. Objetivos específicos .....	8
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO .....	9
2.1. Marco histórico.....	10
2.2. Investigaciones relacionadas con el tema.....	12
2.3. Estructura teórica y científica que sustenta el estudio .....	14
2.3.1. Bebidas con adición de electrolitos .....	14
2.3.2. Deterioro fúngico en alimentos y bebidas.....	17
2.3.3. Modelamiento matemático del deterioro fúngico.....	19
2.3.4. Modelamiento estocástico .....	22
2.3.5. Distribuciones estadísticas de probabilidad (DEP).....	23
2.3.6. Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (ECRM) .....	24
2.4. Definición de términos básicos.....	26
2.5. Fundamentos teóricos que sustentan las hipótesis.....	26
2.6. Hipótesis.....	28
2.6.1. Hipótesis general .....	28

2.6.2. Hipótesis específicas .....	28
2.7. Variables.....	28
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO .....	29
3.1. Enfoque, tipo, método y diseño de la investigación .....	30
3.1.1. Enfoque de la investigación .....	30
3.1.2. Tipo de investigación.....	30
3.1.3. Método de investigación .....	30
3.1.4. Diseño de investigación .....	30
3.2. Población y muestra.....	31
3.2.1. Población.....	31
3.2.2. Muestra.....	31
3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos .....	31
3.3.1. Método para el muestreo microbiológico ambiental .....	31
3.3.2. Metodología para el análisis microbiológico .....	31
3.3.3. Determinación de la velocidad de sedimentación ( $V_s$ ) .....	32
3.3.4. Cálculo del área de exposición (A).....	32
3.3.5. Determinación del tiempo de exposición.....	32
3.3.6. Software @RISK 8.2 .....	33
3.4. Descripción de procedimientos de análisis .....	33
3.4.1. Procedimiento experimental.....	33
3.4.2. Diseño experimental .....	34
3.4.3. Pruebas estadísticas.....	35
CAPÍTULO IV: RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS .....	36
4.1. Resultados .....	37
4.1.1. Niveles de contaminación fúngica en ambientes de proceso .....	37
4.1.2. Velocidades de sedimentación .....	40
4.1.3. Áreas de exposición relacionadas al empaque primario .....	40
4.1.4. Tiempos de exposición.....	41
4.1.5. Pruebas de normalidad para las cargas fúngicas ambientales .....	41
4.1.6. Análisis comparativo de la carga fúngica ambiental entre estaciones del año .....	44
4.1.7. Análisis comparativo de la carga fúngica ambiental entre zonas de muestreo .....	48

4.1.8. Distribuciones estadísticas de probabilidad (DEP) determinadas para cada set de datos microbiológicos .....	51
4.1.9. Estimación de la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas con adición de electrolitos .....	54
4.1.10. Determinación de las variables con mayor relevancia sobre la contaminación fúngica en bebidas con adición de electrolitos.....	55
4.1.11. Modelo estocástico desarrollado para la industria de bebidas con adición de electrolitos .....	57
4.2. Análisis de resultados.....	59
<b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES .....</b>	<b>66</b>
Conclusiones .....	67
Recomendaciones .....	68
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>69</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>86</b>
Anexo 1. Declaración de autenticidad .....	87
Anexo 2. Autorización de consentimiento para realizar la investigación.....	88
Anexo 3. Matriz de consistencia .....	89
Anexo 4. Matriz de operacionalización .....	91
Anexo 5. Modelo lineal generalizado .....	92

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Principales mohos relacionados al deterioro de bebidas no alcohólicas tratadas térmicamente .....	18
<b>Tabla 2.</b> Estudios sobre la influencia del estado fisiológico de las esporas fúngicas en jugos de frutas .....	21
<b>Tabla 3.</b> Principales distribuciones estadísticas de probabilidad aplicables a variables continuas en ciencia de alimentos .....	23
<b>Tabla 4.</b> Principales distribuciones estadísticas de probabilidad aplicables a variables discretas en ciencia de alimentos .....	24
<b>Tabla 5.</b> Carga ambiental de mohos en la zona de enjuagado de botellas por estaciones del año .....	37
<b>Tabla 6.</b> Carga ambiental de mohos en la zona de llenado por estaciones del año ....	38
<b>Tabla 7.</b> Carga ambiental de mohos en la zona de tapado por estaciones del año .....	38
<b>Tabla 8.</b> Resumen estadístico de los conteos microbiológicos ambientales obtenidos en cada área de proceso .....	39
<b>Tabla 9.</b> Velocidades de sedimentación calculadas a partir del tamaño de esporas fúngicas ambientales .....	40
<b>Tabla 10.</b> Áreas de exposición calculadas en base a las dimensiones del empaque primario (botellas PET) .....	41
<b>Tabla 11.</b> Valores de tiempo de exposición entre el proceso de llenado y tapado de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.....	41
<b>Tabla 12.</b> Estadísticos de la carga fúngica ambiental del área de enjuagado de botellas por estación del año .....	45
<b>Tabla 13.</b> Comparaciones estadísticas de la carga fúngica ambiental del área de enjuagado de botellas entre estaciones del año .....	45
<b>Tabla 14.</b> Estadísticos de la carga fúngica ambiental del área de llenado por estación del año .....	46
<b>Tabla 15.</b> Comparaciones estadísticas de la carga fúngica ambiental del área de llenado entre estaciones del año .....	47
<b>Tabla 16.</b> Estadísticos de la carga fúngica ambiental del área de tapado por estación del año .....	47
<b>Tabla 17.</b> Comparaciones estadísticas de la carga fúngica ambiental del área de tapado entre estaciones del año .....	48
<b>Tabla 18.</b> Estadísticos de la carga fúngica ambiental por área de proceso en el periodo de verano .....	49
<b>Tabla 19.</b> Comparaciones estadísticas de la carga fúngica ambiental proveniente de las áreas de proceso durante la estación de verano .....	49



<b>Tabla 20.</b> Estadísticos de la carga fúngica ambiental por área de proceso en el periodo de invierno .....	50
<b>Tabla 21.</b> Comparaciones estadísticas de la carga fúngica ambiental proveniente de las áreas de proceso durante la estación de invierno .....	50
<b>Tabla 22.</b> Medida de la bondad de ajuste de las cargas fúngicas ambientales a la distribución estadística de probabilidad .....	53
<b>Tabla 23.</b> Inputs probabilísticos del modelo de evaluación de riesgo en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – PET 500 ml.....	57
<b>Tabla 24.</b> Inputs probabilísticos del modelo de evaluación de riesgo en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – PET 750 ml.....	57
<b>Tabla 25.</b> Output del modelo de evaluación de riesgo en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.....	58
<b>Tabla 26.</b> Matriz de consistencia .....	89
<b>Tabla 27.</b> Matriz de operacionalización.....	91

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Proceso industrial de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – Llenado en caliente.....	16
<b>Figura 2.</b> Principales factores ambientales que impactan sobre la estabilidad microbiológica de las bebidas durante su producción a nivel industrial .....	18
<b>Figura 3.</b> Esquema de diseño experimental.....	34
<b>Figura 4.</b> Pruebas de normalidad para cargas fúngicas ambientales obtenidas en las 4 estaciones del año - Zona de enjuagado de botellas.....	42
<b>Figura 5.</b> Pruebas de normalidad para cargas fúngicas ambientales obtenidas en las 4 estaciones del año – Zona de llenado .....	43
<b>Figura 6.</b> Pruebas de normalidad para cargas fúngicas ambientales obtenidas en las 4 estaciones del año – Zona de tapado .....	44
<b>Figura 7.</b> Distribución estadística de probabilidad para las cargas microbiológicas anuales del área de enjuagado de botellas .....	51
<b>Figura 8.</b> Distribución estadística de probabilidad para las cargas microbiológicas anuales del área de llenado .....	52
<b>Figura 9.</b> Distribución estadística de probabilidad para las cargas microbiológicas anuales del área de tapado .....	53
<b>Figura 10.</b> Modelamiento estocástico de la contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – Formato: PET 500 ml.....	54
<b>Figura 11.</b> Modelamiento estocástico de la contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – Formato: PET 750 ml.....	55
<b>Figura 12.</b> Análisis de correlación sobre la contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – Formato: PET 500 ml.....	56
<b>Figura 13.</b> Análisis de correlación sobre la contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – Formato: PET 750 ml.....	56

## RESUMEN

El modelamiento predictivo de tipo estocástico representa una herramienta de soporte para la gestión de la calidad e inocuidad en la industria de bebidas. El deterioro microbiológico puede ser cuantificado a través de este tipo de modelamiento, permitiendo tomar acciones sobre los diversos factores que impactan directamente en la contaminación final del producto. El objetivo de esta investigación fue obtener un modelo matemático que permita estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos. El modelo tuvo como “entradas” la concentración de mohos en el ambiente de proceso (UFC/m<sup>3</sup>), la velocidad de sedimentación (m/s), el área (m<sup>2</sup>) y el tiempo de exposición (s), los cuales fueron enfrentados a distribuciones estadísticas de probabilidad y a la simulación de Monte Carlo usando el software @RISK 8.2, para obtener como “salida” el nivel de contaminación fúngica en la bebida final (UFC/producto). A través de simulaciones usando el modelo estocástico desarrollado se pudo estimar que en el 5% de un lote de producción hay una probabilidad que 67/100 000 bebidas envasadas en botellas PET de 500 ml con tapa 33 mm presenten contaminación con al menos 1 espora fúngica, mientras que esta probabilidad aumenta a 85/100 000 bebidas si se usan como empaques primarios botellas PET de 750 ml con tapa 38 mm. Basados en el coeficiente de correlación de Spearman se determinó que el factor con mayor influencia sobre la contaminación final de la bebida fue la concentración de mohos en el ambiente de proceso.

Palabras clave: Bebidas no alcohólicas, funciones de probabilidad, microorganismos de la alteración, micología predictiva.

## ABSTRACT

Stochastic predictive modeling represents a support tool for quality and safety management in the beverage industry. Microbiological spoilage can be quantified through this type of modeling, allowing to take action on the several factors that directly impact in the final contamination of product. The objective of this research was to obtain a mathematical model that allows estimating the probability of fungal contamination in non-carbonated beverages with addition of electrolytes. The model had as “inputs” the concentration of molds in the process environment (CFU/m<sup>3</sup>), sedimentation velocity (m/s), exposed product area (m<sup>2</sup>) and exposure time (s), which were fitting to statistical probability distributions and to Monte Carlo simulation using @RISK 8.2 software, in order to obtain as “output” the level of fungal contamination in the final drink (CFU/product). Through simulations using the developed stochastic model, it was possible to estimate that in 5% of production batch there is a probability that 67/100 000 drinks packed in PET bottles of 500 ml with 33 mm cap present contamination with at least 1 fungal spore, while this probability increases to 85/100 000 drinks if PET bottles of 750 ml with 38 mm cap are used as primary packaging. Based on the Spearman correlation coefficient, it was determined that the factor with the greatest influence on the final contamination of the drink was the concentration of molds in the process environment.

Key words: Non-alcoholic beverages, predictive mycology, probability functions, spoilage microorganisms.

## INTRODUCCIÓN

El deterioro de alimentos representa un problema fundamental en todo el mundo, ocasionando pérdidas millonarias, desabasteciendo importantes mercados en los cuales estos productos son necesarios para mitigar la desnutrición, y aumentando el nivel de contaminación si no son aprovechados en otros usos como por ejemplo: compostaje, producción de alimentos para animales, materias primas para fermentaciones o extracciones de compuestos bioactivos, entre otros (Filtenborg et al., 1996; Odeyemi et al., 2020).

Diversos factores hacen que los alimentos pierdan sus características sensoriales y que sus propiedades físico-químicas cambien a través del tiempo, reduciendo su vida útil (Huis In't Veld, 1996). Las bebidas no están exentas de esto, por lo que caracterizar el proceso en el cual se fabrican resulta de suma importancia para conocer cómo impactan en su estabilidad microbiológica.

Comúnmente, el deterioro microbiológico de bebidas resulta en empaques hinchados por fermentación del producto, presencia visible de micelios fúngicos suspendidos en la bebida, presencia de turbiedad, separación de fases por enzimas pectinolíticas, cambios de coloración, sabores extraños (no característicos) y presencia de olores atípicos como el guayacol y halofenoles (Gordon, 2017; Hernández et al., 2018; Rico-Munoz & dos Santos, 2019; Sant'Ana et al., 2010). Todas estas alteraciones son influenciadas por factores como el aire, la temperatura, humedad relativa, los manipuladores de alimentos, el diseño sanitario y los equipos y utensilios usados en el proceso de manufactura, los cuales impactan directa o indirectamente en la estabilidad microbiológica del producto final, ocasionando su deterioro y la disminución de su vida útil (Ramos Guerrero et al., 2020).

El aire es uno de los factores ambientales que influyen fuertemente en la contaminación microbiológica de las bebidas (Masotti et al., 2019). A través del aire se transportan los microorganismos, incluyendo sus esporas (Dijksterhuis, 2017; Wyatt et al., 2013), llegando a contaminar las bebidas donde se encuentran expuestas (antes del proceso de tapado). Por ello, es de suma importancia caracterizarlo y posteriormente mejorar su calidad para lograr minimizar la probabilidad de contaminación.

En los últimos años las bebidas han sido clasificadas en diversas categorías en función a la orientación del grupo consumidor, uso previsto o en base a sus características. Dentro de estas categorías se encuentran las bebidas con adición de electrolitos, comúnmente llamadas bebidas para deportistas, cuyo uso previsto es el consumo directo por personas que realizan actividades físicas extenuantes y deportistas calificados o de alto rendimiento, y se caracterizan principalmente por presentar en su composición sales minerales (como sodio y potasio), además de agua e ingredientes que aportan energía (Instituto Nacional de Calidad, 2018; Shephard, 2019).

Las bebidas con adición de electrolitos, generalmente no carbonatadas, son muy sensibles al deterioro ocasionado por mohos, los cuales llegan al producto como esporas y germinan posteriormente dentro de las bebidas en presencia de oxígeno y otros requerimientos específicos, dependiendo de la especie (Ramos Guerrero, 2014; Rico-Munoz & dos Santos, 2019). Durante el proceso de fabricación a nivel industrial de este tipo de bebidas, esta contaminación puede ocurrir entre la etapa de pasteurización y tapado, sin embargo, también podría suceder cuando el producto se encuentra en el mercado y pierde hermeticidad.

A nivel industrial las fábricas procesadoras de este tipo de bebidas cuidan minuciosamente la recontaminación y disminuyen su probabilidad a través de planes específicos de higiene y saneamiento y mediante procedimientos estandarizados. Sin embargo, aún existen problemas de contaminación asociados a otros factores presentes en las instalaciones de proceso (Snyder & Worobo, 2018b).

Por muchos años las ecuaciones matemáticas han permitido solucionar diversos problemas de inocuidad en la industria alimentaria (Ross et al., 2014). En las últimas décadas, diversas investigaciones han sido desarrolladas con la finalidad de unir los modelos matemáticos y la microbiología de alimentos, generando aplicaciones prácticas para la industria y fortaleciendo el control de alimentos por entes gubernamentales a través de esta nueva disciplina denominada “microbiología predictiva” (González et al., 2019). Dentro de las aplicaciones prácticas, últimamente se destacan aquellas relacionadas a la germinación y desarrollo fúngico, incluyendo la producción de micotoxinas, las cuales son desarrolladas bajo la “micología predictiva” (Marín et al., 2021).

El presente trabajo de investigación se centró en usar el modelamiento estocástico (que toma en cuenta la variabilidad y la incertidumbre) para poder estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos. Estos modelos fueron creados a partir de datos (carga microbiológica ambiental, estándares de proceso y dimensiones del empaque primario) obtenidos de una fábrica que procesa este tipo de bebidas, lo cual representa una aplicación práctica y una herramienta útil para la gestión de calidad en este tipo de industrias.

**CAPÍTULO I:**  
**PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**



## 1.1. Descripción del problema

Los hábitos alimenticios y las necesidades de los consumidores cambian constantemente y la industria de alimentos se adapta rápidamente en función de estos nuevos requerimientos (Guiné et al., 2020). Estos cambios ocurren debido a varios motivos, entre los cuales se encuentran: aspectos culturales (religión, otros), estilos de vida (deportistas, tendencia a los alimentos orgánicos y menos procesados, personas con menos disponibilidad de tiempo debido a su trabajo o estudio, entre otros) o situaciones coyunturales, debido por ejemplo, a pandemias como la COVID-19 (Finger et al., 2021).

En las últimas décadas, la industria de bebidas ha cambiado su portafolio siendo mucho más específica en el tipo de productos que ofrecen en el mercado (Tireki, 2021). Una categoría de productos que se ha diversificado y se ha consolidado en el mercado son las denominadas “bebidas con adición de electrolitos”.

De acuerdo con Maughan y Murray (2001), las bebidas con adición de electrolitos, las cuales están diseñadas para deportistas de alto rendimiento y para personas que practican actividades físicas extenuantes, son consideradas como productos de bajo riesgo para la salud pública, porque gracias a la aplicación de las buenas prácticas de manufactura, los principios generales de higiene, el sistema HACCP, sus métodos de fabricación y a sus características intrínsecas (como el  $\text{pH} < 4.6$ ), el crecimiento de las bacterias patógenas se ve limitado (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2011).

Este tipo de bebidas, generalmente no carbonatadas y no alcohólicas, son elaboradas industrialmente a partir de agua, diversos azúcares, sales minerales, otros ingredientes como calcio o magnesio y aditivos permitidos según el Codex Alimentarius (Instituto Nacional de Calidad, 2018), siendo posteriormente tratadas térmicamente y generalmente envasadas de forma aséptica en botellas de vidrio o PET (tereftalato de polietileno) para extender su vida útil (Ramos Guerrero, 2014).

Por otro lado, y a pesar de que las fábricas de alimentos y bebidas implementan y certifican diversos sistemas de gestión para mejorar la calidad e inocuidad de sus productos (Trienekens & Zuurbier, 2008), todavía el deterioro fúngico en alimentos y bebidas es un gran desafío a nivel mundial (Snyder & Worobo, 2018b). El deterioro ocasionado por mohos

filamentosos hace que el consumidor rechace la bebida, generando grandes pérdidas económicas para las fábricas y desprestigiando la marca del producto que está siendo comercializado en el mercado (Ramos Guerrero, 2014).

Durante su fabricación, las bebidas se ven expuestas a diversos factores ambientales, los cuales pueden influir negativamente sobre su estabilidad microbiológica, ocasionando una contaminación en el producto final (Azeredo et al., 2016; Ramos Guerrero et al., 2020). Dentro de ellos, el aire de las áreas de proceso es considerado un factor relevante, porque facilita la dispersión de las esporas fúngicas por diversas zonas donde el producto puede estar expuesto (Dijksterhuis, 2019). De esta manera, y bajo condiciones específicas como temperatura y requerimientos nutricionales, las esporas de mohos que llegan al producto logran germinar en la bebida durante el almacenamiento, formando posteriormente un micelio visible y alterando sensorialmente el producto (Dagnas & Membré, 2013; Sant´Ana et al., 2010).

Por lo expuesto anteriormente, es de suma importancia conocer las características microbiológicas del aire en los ambientes de proceso, para luego, mediante modelos matemáticos, cuantificar la probabilidad de contaminación fúngica que se genera dentro del proceso de producción y posteriormente poder modificar y aplicar barreras que disminuyan esta carga ambiental, reduciendo la probabilidad de deterioro.

## **1.2. Formulación del problema**

### **1.2.1. Problema general**

- ¿Es posible diseñar un modelo matemático que permita estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos?

### **1.2.2. Problemas específicos**

- ¿Cuáles son las cargas fúngicas ambientales de tres áreas de proceso de una fábrica de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos?

- ¿Son iguales las cargas fúngicas ambientales de las tres áreas de proceso en temporadas de verano e invierno?
- ¿Cuál es la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos basado en las dimensiones de su empaque y sus características de proceso?
- ¿Qué distribución estadística de probabilidad explica mejor el comportamiento de las cargas fúngicas ambientales?

### **1.3. Importancia y justificación del estudio**

A través de los años las industrias de alimentos se han reinventado y se están apoyando cada vez más en modelos matemáticos para poder garantizar la calidad e inocuidad de los alimentos y bebidas, satisfaciendo las necesidades de los consumidores, cumpliendo con las normativas legales y contribuyendo eficazmente a la salud pública (McKellar & Lu, 2004). Estos modelos matemáticos aplicados en microbiología de alimentos permiten estimar en cortos tiempos el crecimiento, muerte o sobrevivencia de determinados grupos de microorganismos de importancia en una matriz de alimento, pudiendo predecir su comportamiento a través de los factores extrínsecos, intrínsecos, implícitos y de procesamiento (McKellar & Lu, 2004; Ross et al., 2014).

Las predicciones matemáticas acerca del deterioro de bebidas causado por mohos son ahora de gran interés para la gestión de la calidad en las plantas procesadoras de bebidas (Ramos Guerrero, 2014; Sant´Ana et al., 2010), por ello es necesario identificar y cuantificar los factores que de manera individual o conjunta, influyen e interactúan sobre la presencia y crecimiento de los mismos. Así mismo, y como parte de un Sistema de Gestión de la Calidad, es necesario contar con una herramienta específica que permita dar soporte a la toma de decisiones en las fábricas de bebidas y que permita cuantificar el potencial de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos generada a partir del aire presente en los ambientes de procesamiento.

## **1.4. Delimitación del estudio**

Por razones técnicas y de accesibilidad, el estudio se llevó a cabo en una planta de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos ubicada en el Callao (Perú), considerando un año de muestreos semanales realizados de forma aleatoria para evaluar la carga microbiológica ambiental de mohos en 3 áreas de proceso (enjuagado de botellas, llenado y tapado).

Posteriormente, y para la cuantificación de la probabilidad de contaminación fúngica que se genera dentro del proceso de producción, se utilizó el modelo matemático de tipo estocástico recomendado por Whyte y Eaton (2004), en donde se utilizaron los datos recolectados de las cargas fúngicas ambientales, el tiempo en que el producto se encuentra expuesto en el área de llenado (antes del tapado), la velocidad de sedimentación y el área de exposición referidos al diámetro de las bocas de las botellas PET (empaques primarios) en presentaciones de 500 y 750 ml.

## **1.5. Objetivos de la investigación**

### **1.5.1. Objetivo general**

- Obtener un modelo matemático que permita estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.

### **1.5.2. Objetivos específicos**

- Cuantificar las cargas fúngicas ambientales de tres áreas de proceso de una fábrica de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.
- Comparar las cargas fúngicas ambientales de las tres áreas de proceso en temporadas de verano e invierno.
- Estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos basado en las dimensiones de su empaque y sus características de proceso.
- Determinar la distribución estadística de probabilidad que explica mejor el comportamiento de las cargas fúngicas ambientales.

**CAPÍTULO II:**  
**MARCO TEÓRICO**

## **2.1. Marco histórico**

Debido a los nuevos estilos y condiciones de vida, las necesidades de los consumidores se vuelven cada vez más específicas. Por ello, nuevas fórmulas y tipos de envases son diseñados de forma conjunta entre la industria y los consumidores, lo que se conoce con el nombre de co-creación. Esto facilita la apertura y desarrollo de nuevas categorías de productos, siendo específicas para satisfacer una necesidad vigente (Kemp, 2013). A través de esta técnica, es que surgen las denominadas bebidas con adición de electrolitos, llamadas también bebidas carbohidrato-electrolitos o deportivas, las cuales, de acuerdo con Maughan y Murray (2001), buscan proporcionar de una forma fácil el agua, la energía y las sales minerales durante el ejercicio físico (antes, durante y después), y están dirigidas principalmente a aquellas personas dedicadas a deportes de alto rendimiento o a aquellas que practican actividades físicas extenuantes. Debido a su formulación, este tipo de bebidas permite un mejor desempeño en el deportista porque hay una retención efectiva de fluidos y se previene la diuresis, comúnmente observada cuando solo se consume agua (Amendola et al., 2004).

Desde el punto de vista microbiológico y de acuerdo a lo indicado por la International Commission on Microbiological Specifications for Foods (2011), esta categoría de productos no representa un problema para la salud pública y es microbiológicamente muy estable, esto debido a que tanto su formulación, como sus métodos de procesamiento (pasteurización) y las buenas prácticas de higiene aplicadas durante su fabricación logran controlar los peligros biológicos que pueden llegar a través del ambiente de proceso o de sus ingredientes principalmente.

En microbiología de alimentos existe la denominada “tecnología de barreras”, la cual se basa en crear un ambiente hostil para los microorganismos, ya sea en el mismo producto o a través de su entorno, limitando su crecimiento y consecuentemente evitando así el deterioro de los productos (Leistner, 2000). Sin embargo, existen determinados grupos de microorganismos que aprovechando los nutrientes propios del alimento, tienen la capacidad de poder sobrepasar estas barreras. Entre ellos se encuentran los mohos, considerados microorganismos no patógenos, pero que son capaces de causar alteraciones indeseables en las bebidas como turbidez, separación de fases (por producción de enzimas pectinolíticas),

cambios de color, formación de micelio (creciendo en suspensión), sabores extraños, entre otros (Dagnas & Membré, 2013; Filtenborg et al., 1996; Ohnishi et al., 2013).

Una de las principales formas en cómo llegan las esporas de mohos al producto final es a través del aire de los ambientes de proceso, factor de suma importancia que debe caracterizarse y controlarse adecuadamente para evitar pérdidas de lotes de producto por deterioro (Wyatt et al., 2013).

Debido a la gran pérdida económica y desprestigio de la marca que pueden generar estos microorganismos de la alteración, las fábricas de alimentos adecuan e implementan los sistemas de gestión de la calidad (Trienekens & Zuurbier, 2008), los cuales ayudan a planear acciones y a controlar los peligros de manera organizada, evitando así productos no conformes y mejorando la calidad de los mismos.

Microbiología predictiva, una rama de la microbiología de alimentos focalizada en predecir y describir el comportamiento de los microorganismos en un producto alimentario a través de modelos matemáticos y de los parámetros de influencia, en los últimos años se ha desarrollado con mucha fuerza, generando diversas aplicaciones tanto para bacterias como para mohos y levaduras en diversas matrices alimentarias, los cuales son usados por las industrias y las agencias gubernamentales (Burgain et al., 2013; J.-M. Membré & Lambert, 2008; Ross et al., 2014). Si bien es cierto que la microbiología predictiva contempló inicialmente el estudio del comportamiento de bacterias patógenas y la producción de sus toxinas, cada vez hay más interés en el desarrollo de modelos matemáticos para cuantificar el crecimiento de mohos y levaduras en alimentos, contemplado a través de la “micología predictiva”, la cual, de acuerdo con Dantigny et al. (2016), toma en cuenta aspectos específicos de la germinación y desarrollo fúngico, muy diferentes a los aspectos del crecimiento bacteriano.

La necesidad de evitar problemas de deterioro en la industria de bebidas ha ocasionado que en la actualidad los gerenciadore de alimentos utilicen diversas herramientas para una mejor toma de decisiones, siendo una de ellas los modelos matemáticos predictivos. Estos modelos de la micología predictiva son específicos para determinados grupos de mohos o levaduras y son de aplicación práctica en el procesamiento de bebidas, por ejemplo en las tratadas térmicamente (Rico-Munoz & dos Santos, 2019; Sant’Ana et al., 2010). Estos

modelos aún tienen gran potencial de aplicación en la industria de alimentos, por lo que debe de considerarse como una herramienta fundamental y de gran apoyo en la gestión de calidad e inocuidad.

## **2.2. Investigaciones relacionadas con el tema**

El modelamiento del deterioro fúngico es de gran interés en la actualidad. Diversas investigaciones focalizadas sobre la germinación y el crecimiento fúngico en alimentos y bebidas, así como la caracterización de los factores que intervienen en la contaminación fúngica se han desarrollado y publicado a la fecha (Snyder & Worobo, 2018a).

Por ejemplo, Sant´Ana et. al (2010) a través de su investigación predijeron el tiempo en el que el 10% de un lote de botellas de jugo de manzana presentaron micelio fúngico visible ocasionado por *Byssochlamys fulva*, bajo dos temperaturas comunes de almacenamiento (21 y 30°C) y con dos cargas de inóculo, una baja ( $4.8 \pm 2.3$  ascosporas/100 ml) y una alta ( $19.3 \pm 4.6$  ascosporas/100 ml). Este estudio realizado en Brasil, usando un moho termorresistente y basado en la aplicación del modelo logístico de la microbiología predictiva, demostró que incluso con una pequeña cantidad de esporas de mohos dentro del producto, hay tiempos muy cortos en que se presenta el deterioro. Así mismo, demostraron que el tiempo en que se produce el deterioro disminuye con el aumento de la carga de esporas y de la temperatura de almacenamiento. Esta investigación se relaciona directamente con la presente tesis, debido a que usó modelos matemáticos para cuantificar la probabilidad del deterioro fúngico en bebidas, específicamente en un tipo de bebidas de frutas no carbonatadas.

Por otro lado, Silva et al. (2010) realizaron un estudio focalizado en la evaluación del comportamiento del moho *Aspergillus section Nigri* IOC 4573 en néctar de mango y cómo es afectado por la temperatura (factor extrínseco) y el pH (factor intrínseco relacionado con la variabilidad estacional de la fruta). A través de un diseño compósito central y por medio del uso del modelo primario de Baranyi y del modelo secundario de tipo polinomial de superficie de respuesta, el crecimiento de este moho fue evaluado. Como resultado se obtuvo que al pasar de una temperatura de 22.8 a 17.2°C el tiempo de latencia aumenta 16 veces y al incrementar la temperatura de 20 a 22.8°C con un pH constante de 4.0, el valor del ratio



máximo de crecimiento aumenta 4 veces. Este estudio tiene relación con la presente tesis debido a que usaron modelos matemáticos para cuantificar el crecimiento de un moho en una bebida, en función de factores ambientales que lo afectan directamente.

En otra investigación, García et al. (2019) evaluaron en 20 panaderías brasileñas el nivel de la carga fúngica ambiental, el nivel de adecuación de las buenas prácticas de manufactura (ABPM), así como la interrelación que puede existir entre estas dos variables. La ABPM fue realizada a través de una lista de verificación de 146 ítems, en donde se evaluaron aspectos relacionados a edificios, higiene, control de plagas, suministro de agua, manejo de residuos, higiene y competencia de los manipuladores de alimentos, ingredientes, preparación de alimentos, almacenamiento y distribución, exposición al consumo de alimentos preparados, documentación y registros, y responsabilidad. Por otro lado, la cuantificación de mohos en el ambiente de las panaderías fue llevada a cabo con la ayuda de un muestreador microbiológico ambiental (50 L de aire como muestra), específicamente en el área de enfriamiento y en las áreas de exposición donde los panes son más susceptibles a la contaminación ambiental. Los resultados mostraron que a pesar de que algunas panaderías tuvieron una buena calificación de ABPM, estas presentaron cargas altas de mohos en sus ambientes de proceso, indicando una baja correlación entre estos dos factores. Cargas fúngicas ambientales presentaron promedios de  $1.40 \times 10^3$  UFC/m<sup>3</sup> y  $1.47 \times 10^3$  UFC/m<sup>3</sup> para el área de enfriamiento y las áreas de exposición, respectivamente. Este trabajo tiene estrecha relación con la presente investigación debido a que se cuantificó la carga ambiental de mohos en zonas de procesos de alimentos por medio de un equipo específico para la toma de muestra de aire, teniendo como constante el volumen de aire filtrado.

Así mismo, dos Santos et al. (2018) investigaron el nivel de contaminación fúngica (específicamente de mohos termorresistentes (HRM)) presente en diferentes lotes de productos de frutas (puré de fresa, jugo concentrado de naranja y puré de manzana) y su prevalencia a través de las diversas etapas de proceso en industrias de Brasil, Bélgica y Países Bajos. Ellos también evaluaron si el nivel de contaminación con HRM disminuye a través del proceso de producción, y determinaron el tipo de distribución estadística que mejor representa las cargas microbiológicas por medio del software @RISK 7.0 acoplado a Microsoft Excel®. Como resultado obtuvieron que los HRM fueron detectados en el 96.4%

de los lotes evaluados, observándose solo una reducción significativa de los niveles de HRM en las etapas de proceso evaluadas en la línea de puré de manzana. Este estudio tiene mucha relevancia y relación con la presente investigación, debido a que se trabajó con el enfrentamiento de las cargas fúngicas a diferentes tipos de distribución estadística y se determinó cual es el que mejor enfrenta dichos datos.

Un estudio realizado en Brasil por dos Santos (2015) para obtener el título de Maestro en Ciencia de Alimentos en la Universidade Estadual de Campinas (p. 1), permitió cuantificar las especies fúngicas presentes en las materias primas, ambientes de proceso y producto final (panes integrales multigranos (PIM)) de una industria de panificación, así como estimar con modelamiento estocástico el nivel de contaminación fúngica presente sobre la superficie de los PIM durante la etapa de enfriamiento. La cuantificación de mohos en las materias primas y producto terminado fue realizada a través del método de recuento en placa y el muestreo de la carga ambiental fue llevado a cabo usando el muestreador de aire MD8 (Sartorius, Goettingen, Alemania). Los resultados mostraron que entre todas las materias primas evaluadas (n=120), la harina de maíz integral fue la que presentó mayor carga fúngica, con un valor de 4.8 log UFC/g y dentro de las especies aisladas se encontraron *Penicillium spinulosum* y *Penicillium polonicum*. Las etapas de enfriamiento, cortado y empacado fueron las zonas más críticas respecto a la carga microbiológica ambiental. Mediante el uso del software @RISK 5.7 y aplicando la simulación de Monte Carlo fue posible estimar un nivel promedio de contaminación de 1.86 log UFC/producto en la superficies de los PIM, con una variación entre 1.52 a 2.10 log UFC/producto (intervalo de confianza del 90%). Esta investigación tiene mucha importancia para la industria de alimentos y se correlaciona con los objetivos de la presente tesis, debido a que caracteriza los factores ambientales de un proceso de producción de alimentos y usa modelamiento estocástico para estimar la probabilidad de deterioro en productos alimentarios.

## **2.3. Estructura teórica y científica que sustenta el estudio**

### **2.3.1. Bebidas con adición de electrolitos**

Conocidas también como bebidas para deportistas, este tipo de producto está especialmente formulado y diseñado para los atletas, buscando hidratar y reponer

rápidamente las sales minerales que son perdidas durante el ejercicio, sin embargo, en los últimos años hay una tendencia en su consumo a nivel recreacional (Raizel et al., 2019).

De acuerdo con Maughan y Murray (2001), la bebida ideal para los deportistas debe proveer mediante su formulación un equilibrio de los fluidos corporales, reposición de las sales minerales perdidas, una tasa de vaciado gástrico rápido y una fuente de carbohidratos adecuada con el fin de suministrar energía.

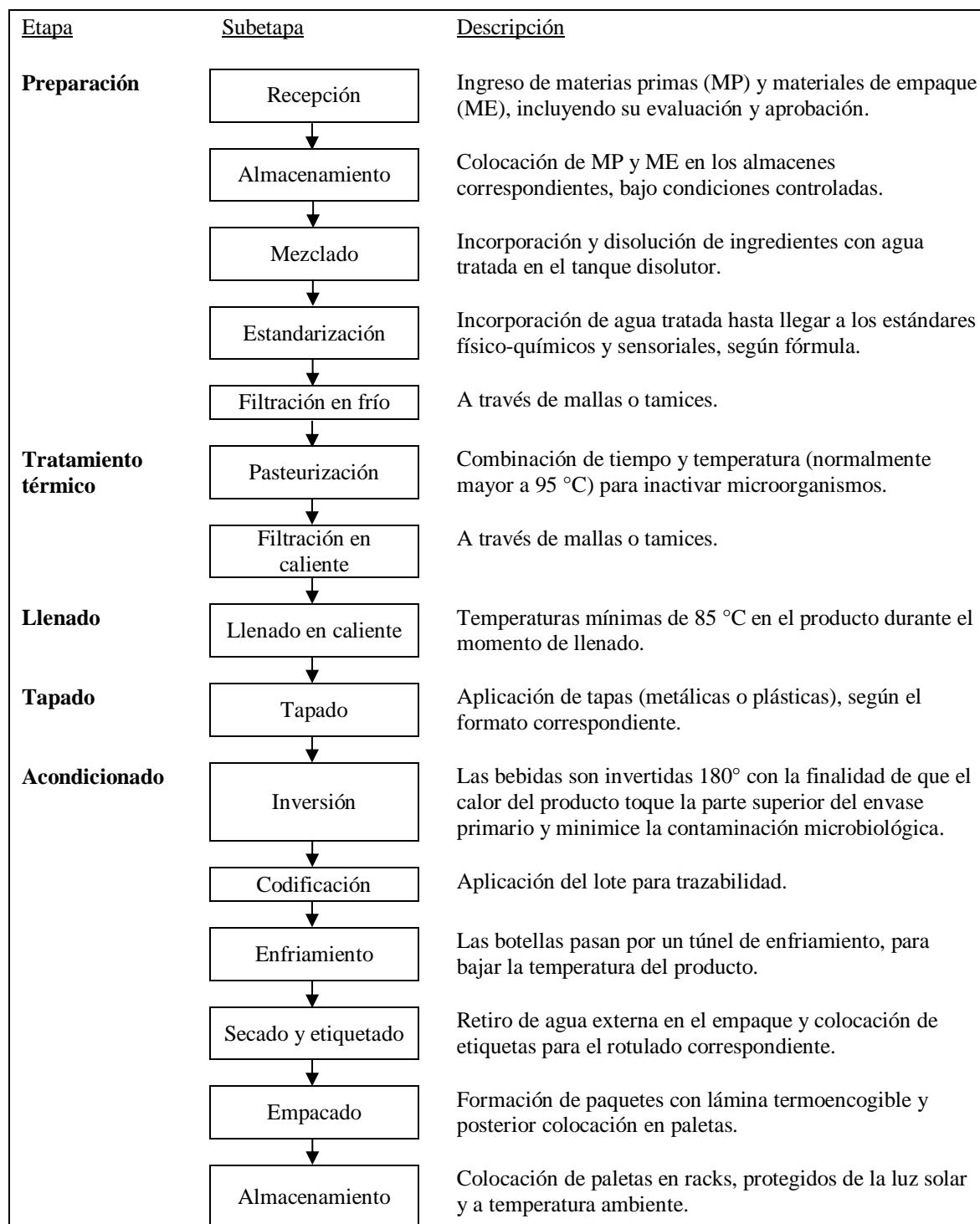
Este grupo de bebidas puede clasificarse en isotónicas (niveles de sal y azúcar tal y como se presenta en el cuerpo humano), hipertónicas (con altas concentraciones de sal y azúcar) e hipotónicas (con bajas concentraciones de sal y azúcar), todas ellas relacionadas al equilibrio osmótico característico en el ser humano (Raizel et al., 2019).

Debido a la gran diferencia entre los requerimientos, cada tipo de bebida con adición de electrolitos debe ser direccionada para cada atleta en función al deporte que realiza y a los factores ambientales a los cuales está expuesto durante el ejercicio (Shephard, 2019). Según Maughan (2009), los carbohidratos son esenciales para el suministro de energía por lo que son de vital importancia en la formulación.

Comúnmente, este tipo de bebidas son elaboradas a nivel industrial siguiendo cinco etapas de proceso fundamentales: preparación, tratamiento térmico, llenado, tapado y acondicionado. Las etapas y sub-etapas por las cuales pasa esta bebida durante su fabricación son detalladas en la figura 1.

Adicionalmente, los principios generales de higiene deben de ser aplicados estrictamente y de manera preventiva en la fabricación de este producto, contemplando aspectos tales como el manejo integrado de plagas, diseño de instalaciones y equipos, control del medio ambiente, producción higiénica (limpieza y desinfección), manipulación, almacenamiento y transporte, capacitación y entrenamiento del personal, mantenimiento de instalaciones y equipos, calibración y verificación de equipos e instrumentos, manejo de residuos, higiene del personal, control de las operaciones, gestión de alérgenos, tratamiento de agua, control de la contaminación cruzada, procedimientos relacionados a los reclamos de clientes y al recojo de productos del mercado, rastreabilidad, etiquetado, entre otros, que de manera conjunta al Sistema de Análisis de Peligros y de Puntos Críticos de Control (HACCP)

permitirán obtener una bebida con la calidad e inocuidad adecuada y que cumpla con los requerimientos gubernamentales aplicables (FAO/OMS, 2020).



**Figura 1.** *Proceso industrial de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – Llenado en caliente*

Fuente: Propia

### **2.3.2. Deterioro fúngico en alimentos y bebidas**

El deterioro microbiológico es un proceso complejo por el cual a través de diversos factores se pierden las características particulares y distintivas de los alimentos y bebidas, pasando de ser agradables a desagradables para el consumidor (público objetivo) y generando pérdidas económicas para los sectores involucrados (Gram et al., 2002).

Cada alimento en particular es susceptible de alteración, en el cual los denominados “organismos específicos de deterioro” (SSO) juegan un rol importante, ejerciendo un efecto dominante durante este proceso y ocasionando una serie de reacciones bioquímicas y cambios físicos en el alimento (Dalgaard, 1995; McMeekin & Ross, 1996). Así por ejemplo, las bebidas con adición de electrolitos son afectadas por el moho *Fusarium oxysporum* generando presencia de un micelio visible que flota dentro del producto (Ramos Guerrero, 2014), *Penicillium paneum* y *Penicillium polonicum* generan deterioro en panes cambiando su aspecto físico (dos Santos et al., 2016) y *Alicyclobacillus acidoterrestris* es capaz de generar olores extraños como el guayacol y halofenoles en jugos y concentrados de frutas (Gordon, 2017).

El deterioro fúngico es ocasionado por mohos o levaduras, los cuales al encontrar condiciones ideales en los alimentos pueden germinar y desarrollarse en ellos, ocasionando una serie de cambios indeseables (sensoriales, físicos o químicos) y, en algunos casos, generando la incorporación de una serie de metabolitos secundarios, como las micotoxinas, las cuales son consideradas dañinas para el ser humano (Filtenborg et al., 1996; Hernández et al., 2018; Sant´Ana et al., 2008).

Episodios de contaminación y reclamos de consumidores insatisfechos ocurren mundialmente (Snyder & Worobo, 2018b). Recientemente, un estudio realizado en el Brasil usando la plataforma “Reclame Aqui”, puso de manifiesto la diversidad de reclamos de consumidores en diversos grupos de alimentos (chocolates, bombones, panes, quesos, panetones, pastas y otros productos de baja actividad de agua) a causa del deterioro ocasionado por mohos, representado un 7.72% (2812 registros) del total de reclamos en la categoría de alimentos evaluada (Lemos et al., 2018).

En relación a las bebidas no alcohólicas, las cuales comúnmente reciben un tratamiento térmico para su conservación, se han reportado a la fecha diversos episodios de contaminación por mohos y levaduras. En la tabla 1 se muestra una relación de los principales mohos que han sido implicados en episodios de deterioro y que puedan estar presentes en diversos ambientes o equipos de la planta de fabricación.

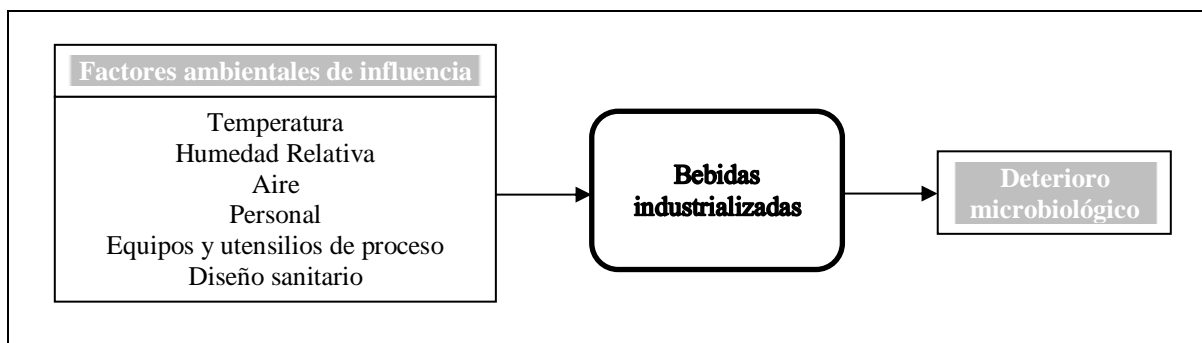
**Tabla 1.**

*Principales mohos relacionados al deterioro de bebidas no alcohólicas tratadas térmicamente*

Moho	Producto relacionado	Fuente
<i>Aspergillus section Nigri</i> IOC 4573	Néctar de mango	Silva et al. (2010)
<i>Fusarium oxysporum</i>	Bebidas isotónicas (sabores de manzana, lima limón y mandarina) llenadas en caliente	Ramos Guerrero (2014)
<i>Byssochlamys fulva</i>	Jugo de manzana	Sant´Ana et al. (2009)
<i>Neosartorya fischeri</i>	Jugo de Piña	Zimmermann et al. (2011)
<i>Paecilomyces variotii</i>	Té edulcorado deteriorado	van den Brule, Lee et al. (2020)
	Bebida deportiva deteriorada, jarabe líquido de alta fructosa	van den Brule, Punt et al. (2020)

Elaboración: Propia

Diversos factores ambientales influyen en si un producto puede o no contaminarse durante la realización de un proceso a nivel industrial. En la figura 2 se muestran los principales factores ambientales presentes en las fábricas de alimentos. Estos factores de manera individual o combinada representan un riesgo para mantener la calidad del producto final.



**Figura 2.** Principales factores ambientales que impactan sobre la estabilidad microbiológica de las bebidas durante su producción a nivel industrial

Elaboración: Propia

De acuerdo con Dagnas y Membré (2013), el deterioro fúngico puede ocurrir incluso con muy bajos niveles de inóculo. Una sola espora es capaz de germinar y desarrollarse en el alimento o bebida, siempre y cuando logre adecuarse a las diversas condiciones ambientales a la que está expuesto. Comúnmente, el deterioro fúngico es detectado visualmente a través de la presencia de un crecimiento radial del micelio en la superficie de los alimentos y bebidas, específicamente cuando alcanzan un diámetro de 3 mm, siendo detectado por el ojo humano (Gougouli et al., 2011).

El desarrollo de mohos en bebidas con adición de electrolitos está condicionado a la presencia de oxígeno disuelto en el producto o a la permeabilidad del oxígeno a través del material de empaque (como es el caso de las botellas PET), siendo un requerimiento específico para el desarrollo fúngico (Lawlor & Leighton, 2015).

Biológicamente, el crecimiento fúngico se compone de las siguientes fases: elongación del tubo germinativo, crecimiento microscópico (desarrollo de la hifa, y ramificación) y crecimiento macroscópico (Gougouli & Koutsoumanis, 2013). De acuerdo a Dantigny (2021), diferentes respuestas biológicas (tiempo de germinación, ratio máximo de crecimiento, tiempo para el crecimiento visible, entre otros) ocurren en estas fases, por lo que a través de diversos modelos matemáticos es posible describirlos usando micología predictiva.

### **2.3.3. Modelamiento matemático del deterioro fúngico**

El uso de modelos matemáticos por la industria de alimentos no es nuevo, siendo implementado desde el año 1920, fecha en que se desarrollaron los modelos cinéticos para la inactivación de *Clostridium botulinum* en alimentos enlatados de baja acidez con el fin de asegurar su inocuidad (McMeekin et al., 2007). Posteriormente en los años 80, el aumento de enfermedades transmitidas por alimentos, la necesidad de técnicas de análisis microbiológicas más rápidas a bajo costo y la disponibilidad de las computadoras, hicieron que una nueva disciplina dentro de la microbiología de alimentos se formara de manera organizada, conocida al día de hoy como “microbiología predictiva”, la cual usa modelos matemáticos para cuantificar el crecimiento, muerte o inactivación de microorganismos en

alimentos bajo la influencia de factores intrínsecos, extrínsecos, implícitos y de procesamiento (Ross & McMeekin, 1994).

Para una mejor aplicación y entendimiento, los modelos matemáticos de la microbiología predictiva fueron clasificados en tres grandes grupos: primarios, secundarios y terciarios (Whiting & Buchanan, 1993).

A través de los modelos primarios, se puede obtener la fase de latencia, el ratio máximo de crecimiento, la densidad máxima poblacional y el ratio de inactivación, parámetros cinéticos de importancia en el modelamiento microbiológico predictivo (Arroyo-López et al., 2014). Los principales modelos primarios usados en microbiología predictiva son: Baranyi y Roberts, Gompertz y Logístico (Dalgaard et al., 1994; Giannuzzi et al., 1998; Panagou & Nychas, 2008).

Por otro lado, los modelos secundarios cuantifican la influencia de los factores ambientales y propios del alimento (temperatura, presión, pH, actividad de agua, contenido de sal, entre otros) sobre los parámetros cinéticos obtenidos en el modelamiento primario (Li et al., 2008). El modelo de la raíz cuadrada, el modelo de Arrhenius, el modelo cardinal con inflexión y los modelos polinomiales son los principales representantes de esta clase de modelos (Li et al., 2008; Ross, 1993; Rosso & Robinson, 2001).

Finalmente, los modelos terciarios son simplemente paquetes de software o sistemas expertos en donde los modelos primarios y secundarios convergen en una plataforma amigable y fácil de usar. Ejemplos de modelos terciarios son el Pathogen Modeling Program, ComBase y MicroHibro (Baranyi & Tamplin, 2004; Buchanan, 1990; González et al., 2019).

Durante muchos años la aplicación de estos modelos matemáticos ha sido usada para predecir el comportamiento de bacterias patógenas y deteriorantes en diversos grupos de alimentos (Ross et al., 2014), sin embargo, y debido a la necesidad de controlar las pérdidas de alimentos causadas por mohos y levaduras y teniendo en cuenta las especificidades de los mismos, nació una nueva disciplina conocida hoy como “micología predictiva” (Marín et al., 2021).

A través de esta disciplina, focalizada en la contaminación fúngica, es posible cuantificar y determinar la probabilidad de crecimiento de hongos en diferentes matrices



alimentarias, considerando aspectos biológicos relevantes, tales como su germinación y desarrollo. Los modelos matemáticos permiten predecir estas dos fases importantes del desarrollo fúngico, incluso y debido a la importancia del mismo, al día de hoy se aplican modelos específicos para la germinación fúngica (no desarrollada para bacterias) y modelos que permiten cuantificar la acumulación gradual de micotoxinas formadas en los alimentos (Marín et al., 2021).

Cada una de las etapas del crecimiento fúngico puede ser modelada a través de ecuaciones matemáticas, pero teniendo en cuenta el estado fisiológico de las esporas fúngicas. En la naturaleza las esporas fúngicas pueden estar sometidas a diversas situaciones de estrés, impidiendo su normal germinación, a diferencia de las que se pueden obtener a nivel de laboratorio bajo condiciones ideales. De acuerdo con Dantigny y Nanguy (2009), cuatro estados fisiológicos pueden afectar las respuestas fúngicas durante un experimento en micología predictiva: la edad de las esporas, las condiciones de esporulación, las condiciones pos esporulación y la rehidratación de las esporas. Una lista de estudios realizados en jugos de frutas para verificar la influencia de estos estados fisiológicos sobre el crecimiento fúngico son mostrados en la tabla 2.

**Tabla 2.**

*Estudios sobre la influencia del estado fisiológico de las esporas fúngicas en jugos de frutas*

Estado fisiológico	Matriz de alimento	Moho	Respuesta	Referencia
Edad de la espora	Jugo de piña	<i>Neosartorya fischeri</i>	La edad de las ascosporas no influenciaron el crecimiento de estos mohos termorresistentes en las matrices evaluadas	Zimmermann et al. (2011)
	Jugo de papaya	<i>Byssochlamys nivea</i>		Zimmermann et al. (2013)
Condiciones de esporulación	Jugo de piña y jugo de papaya	<i>Neosartorya fischeri</i>	Elevadas temperaturas para la producción de ascosporas aumentaron el tiempo óptimo para la activación de las mismas	Slongo y Aragão (2006)

Elaboración: Propia

La germinación es el primer paso para el deterioro, si una espora germina luego será capaz de desarrollarse en el alimento si encuentra las condiciones ideales. En este paso, el

modelo logístico principalmente ha sido aplicado por Dantigny et al. (2005) para modelar el efecto del vapor de etanol sobre los tiempos de germinación de *Penicillium chrysogenum*, simulando lo que puede ocurrir en productos de panificación; y por Sant´Ana et al. (2010) para evaluar el deterioro ocasionado por el moho termorresistente *Byssochlamys fulva* en jugo de manzana clarificado.

En cuanto a la fase de desarrollo fúngico, que ocurre justo después de la germinación y a través del desarrollo de las hifas formando micelio, el modelo más usado para calcular el ratio de crecimiento ha sido el lineal, debido a que una característica de esta fase es el crecimiento radial sobre el alimento (expresado en  $\text{mm}\cdot\text{h}^{-1}$ ). Otra forma de cuantificar el desarrollo fúngico ha sido a través de la medición de ergosterol, un componente importante de las membranas fúngicas (Tremarin et al., 2015). Estudios llevados a cabo sobre productos de frutas han usado otros modelos primarios de la microbiología predictiva para modelar el desarrollo fúngico, como el de Silva et al. (2010) que utilizaron el modelo de Baranyi y Roberts para cuantificar el ratio de crecimiento de *Aspergillus section Nigri* IOC 4573 en néctar de mango, o como el de Da Silva et. al (2013) que a través del modelo de Gompertz determinaron el crecimiento de *Byssochlamys fulva* en pulpa de papaya, con buen ajuste de los datos al modelo matemático.

#### **2.3.4. Modelamiento estocástico**

A diferencia de los modelos determinísticos, en donde solo un valor representa la salida de una ecuación matemática, este tipo de modelamiento incluye variabilidad e incertidumbre. Es decir, permite representar los diferentes escenarios a los cuales puede estar expuesto un determinado alimento y de esta manera, por ejemplo, calcular un nivel global de contaminación mediante probabilidades (McKellar & Lu, 2004; Mckellar & Lu, 2005).

Los modelos estocásticos están asociados a la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico y entre sus aplicaciones prácticas tenemos por ejemplo: la estimación del riesgo de salmonelosis asociado al consumo de pistachos producidos y consumidos en los Estados Unidos (Lambertini et al., 2017), la estimación del crecimiento de *Listeria monocytogenes* en tanques de almacenamiento de leche a granel en las granjas de Francia considerando aspectos ambientales y el volumen de la leche presente en los tanques a través del tiempo (Albert et al., 2005), la estimación del riesgo de contaminación cruzada con

microorganismos patógenos durante la etapa de untado en un proceso industrial de quesos (Aziza et al., 2006), y la estimación de la sobrevivencia de *Escherichia coli* O157:H7 en cidra de manzana con o sin preservantes (Duffy & Schaffner, 2001).

### 2.3.5. Distribuciones estadísticas de probabilidad (DEP)

La variabilidad puede expresarse a través de DEP, las cuales son incorporadas en la simulación de Monte Carlo (modelamiento estocástico) para obtener una serie de respuestas, evaluándose diferentes escenarios (Marks & Coleman, 1998). Las DPE son funciones que permiten describir cómo se comporta una variable. Dependiendo del tipo de variable en estudio, una DPE puede ser aplicada. Tipos de distribución, ejes clave y ejemplos de su aplicación son mostrados en las tablas 3 y 4, según se contemple una variable continua, en donde el valor puede ubicarse dentro de un rango establecido (valores infinitos), y una variable discreta, en donde solo se asume valores enteros (Jarvis, 2016).

**Tabla 3.**

*Principales distribuciones estadísticas de probabilidad aplicables a variables continuas en ciencia de alimentos*

Distribución	Ejes clave	Aplicación/Ejemplo	Fuente
Normal	Describe fenómenos que tienen una tendencia central y que se distribuyen uniformemente alrededor de la media. Hay un comportamiento simétrico de los datos.	Concentración de un microorganismo patógeno en un alimento (Log UFC/g)	Organización Panamericana de la Salud (2021)
Uniforme	Es usado en procesos de comportamientos cíclicos. Hay dos valores (máximo y mínimo) y ambos tienen la misma probabilidad de ocurrir.	Proporción de consumidores que no cocinan adecuadamente un alimento	Organización Panamericana de la Salud (2021)
Triangular	Aplicado en fenómenos donde hay un valor máximo, mínimo y uno considerado como modal.	Frecuencia de consumo de huevos por un individuo en un año	Vose (1998)
Pert	Es muy similar a la distribución triangular, pero tiene énfasis en los valores modales o más frecuentes en la distribución	Tiempo de almacenamiento de un producto cárnico cocido hasta la venta al por menor	Mataragas et al. (2010)
Beta	Cero y uno comprenden el rango de posible de valores. Es aplicable para incorporar incertidumbre en una distribución binomial. Se usa para poder estimar la probabilidad que un suceso ocurra en un número independiente de ensayos.	Probabilidad que otro paquete de carne (PC) esté contaminado en un lote, considerando que en una inspección previa de 100 unidades, 27 de ellos estuvieron contaminados	Vose (1998)

Elaboración: Propia

**Tabla 4.**

*Principales distribuciones estadísticas de probabilidad aplicables a variables discretas en ciencia de alimentos*

Distribución	Ejes clave	Aplicación/Ejemplo	Fuente
Binomial	Se usa cuando se dispone de una gran cantidad de sucesos y en donde solo hay 2 resultados: positivo o negativo.	Prevalencia de <i>Salmonella</i> en huevos	Cummins (2016)
Binomial negativa	Llamada también Gamma-Poisson. Es usada para datos microbiológicos sobre dispersos.	Prevalencia y nivel de contaminación de <i>Cronobacter sakazakii</i> en alimentos para lactantes	Jarvis (2014)
Poisson	Se aplica en la ocurrencia (al azar) de eventos raros en función del tiempo.	Distribución de pequeños números de bacterias en una gran cantidad de alimento	Jarvis (2016)

Elaboración: Propia

### **2.3.6. Evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (ECRM)**

La Evaluación Cuantitativa del Riesgo Microbiológico (ECRM) ha sido aplicada por varios países desde hace muchos años, con el fin de poder estimar el nivel de riesgo asociado a determinados peligros microbiológicos en diversos grupos de alimentos (Vose, 1998) y así mismo, poder establecer los niveles de protección adecuados para mantener la salud pública en su población. Inicialmente su enfoque estuvo relacionado a los microorganismos patógenos en productos de alto riesgo, como los cárnicos y derivados (Danyluk et al., 2006; Lindqvist & Westöö, 2000) o en productos no tratados térmicamente como las cidras de manzana (Duffy & Schaffner, 2001), pero en los últimos años está siendo aplicado al deterioro de alimentos, principalmente enfocados en la contaminación fúngica y en la concentración de micotoxinas (Abdallah et al., 2020; dos Santos et al., 2018; Gougouli & Koutsoumanis, 2017).

La ECRM comprende tres niveles: evaluación, gestión y comunicación del riesgo (FAO/OMS, 2014). En la evaluación del riesgo se llevan a cabo etapas como la identificación del peligro, la caracterización del peligro, la evaluación de la exposición y la caracterización

del riesgo; mientras que en la gestión del riesgo se aplican diversas medidas de control para alcanzar un nivel de protección adecuado y en la comunicación del riesgo se evalúan las informaciones y las opiniones de expertos, gestores y partes interesadas en relación a los riesgos y los factores relacionados (FAO/OMS, 2014; J.-M. Membré, 2016).

Los modelos matemáticos son muy útiles y aplicativos en las diversas etapas que componen la ECRM. Dos enfoques son usados comúnmente, el “bottom-up” en donde se inicia a partir de la identificación del peligro en el alimento y finaliza sobre el impacto sobre la salud humana, y el “top-down”, el cual parte desde un efecto adverso para la salud pública obtenido mediante estudios observacionales y va hacia atrás buscando las fuentes de alimentos que han causado este efecto (Gkogka et al., 2013; Nauta et al., 2018).

En cuanto a su aplicación en relación al deterioro de alimentos ocasionado por mohos podemos encontrar investigaciones relacionadas a la determinación de la vida útil de productos panificación (J.-M. Membré & Boué, 2018) y en yogurt (Gougouli & Koutsoumanis, 2017), estimación del nivel de contaminación en productos expuestos antes de su envasado (dos Santos, 2015), el riesgo que la micotoxina “patulina” exceda el límite máximo permitido de 50 ppb en jugo de manzana (Sant’Ana, 2007), entre otros.

Para un mejor entendimiento y considerando su importancia, recientemente la Organización Panamericana de la Salud (2021) ha publicado un documento guía sobre la evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos para su implementación en los países. En este documento se mencionan ejemplos de su uso como herramienta para la toma de decisiones en los países y la labor que han cumplido diversos grupos de evaluación u organismos gubernamentales, como por ejemplo el Grupo de Evaluación de Riesgos Alimentarios y Plaguicidas (EIRA) en Colombia, la Red de Seguridad Alimentaria en Argentina, la Agencia Chilena para la Inocuidad y Calidad Alimentaria (ACHIPIA) en Chile, la Dirección General de Control de Inocuidad Alimentaria (DIGECIA) en Uruguay, la Dirección de Epidemiología y Análisis de Riesgo perteneciente a la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) de la Secretaría de Salud en México, y la Coordinación General de Evaluación de Riesgos e Inteligencia Estratégica (CGRI) perteneciente a la “Secretaria de Defesa Agropecuaria” en el Brasil.

## **2.4. Definición de términos básicos**

Bebidas con adición de electrolitos: También llamadas bebidas de reemplazo de electrolitos, bebidas carbohidratos-electrolitos, bebidas para deportistas o bebidas rehidratantes. Forman parte del gran grupo de bebidas no carbonatadas no alcohólicas, especialmente diseñadas para reponer de forma rápida agua, energía y sales minerales antes, durante y después de las actividades físicas. Este tipo de bebidas están orientadas a satisfacer las necesidades de los deportistas de alto rendimiento, pero también de aquellas personas que realizan actividades físicas extenuantes. En el mercado actual este tipo de bebidas puede encontrarse en las presentaciones de listas para beber, en mezcla de polvos para ser disueltas en agua y como concentrados líquidos. (Instituto Nacional de Calidad, 2018; R. Maughan & Murray, 2001).

Micología predictiva: Disciplina que usa modelos matemáticos para cuantificar y predecir el desarrollo de hongos en los alimentos y en diversas materias primas, así como estudiar la inactivación de esporas fúngicas y la acumulación de micotoxinas (metabolitos secundarios) en diversas matrices alimentarias. A diferencia de la microbiología predictiva, inicialmente focalizada en bacterias patógenas, esta disciplina toma en cuenta especificidades de los hongos, pudiendo utilizar modelos específicos, por ejemplo, en la germinación de esporas (P. Dantigny, 2021).

Modelamiento estocástico: Modelamiento dedicado al término estocástico o error. Mediante este tipo de modelamiento se puede caracterizar un proceso utilizando distribuciones estadísticas de probabilidad en donde están inmersos la incertidumbre y la variabilidad de las variables (Cummins, 2016).

## **2.5. Fundamentos teóricos que sustentan las hipótesis**

Dagnas y Membré (2013) a través de su publicación titulada “Predicting and preventing mold spoilage of food products” (p. 538) mencionaron que el deterioro causado por mohos puede ser expresado matemáticamente como una combinación de 2 probabilidades: la contaminación en la fábrica y que el moho ya presente en la bebida se desarrolle en esta matriz antes del fin de su vida útil. Esta investigación está focalizada en la

primera probabilidad, en donde diversos factores ambientales convergen en el área de proceso para finalmente generar una potencial contaminación de los productos finales.

Las líneas de fabricación de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos, debido a la sensibilidad de esta categoría de productos, cumplen con un riguroso y adecuado programa de buenas prácticas de manufactura y de higiene y saneamiento, por lo que esos factores son controlados a través de diversos procedimientos e instructivos estandarizados. Por otro lado, los factores ambientales en las fábricas de bebidas son minimizados principalmente a través del diseño sanitario, con el fin controlar estas fuentes de contaminación, pero teniendo en cuenta que este tipo de bebidas no son productos estériles, una carga ambiental de microorganismos es permitido en las zonas de proceso.

El aire es uno de los principales factores responsables por el traslado de esporas fúngicas desde el ambiente hacia el producto terminado (Dijksterhuis, 2019; Ramos Guerrero et al., 2020). Sistemas de ventilación y de filtración son adecuadamente colocados en las fábricas de bebidas para disminuir la carga microbiológica ambiental que puede llegar finalmente al producto cuando está expuesto en el proceso (Brown & Wray, 2014). Uno de los procesos más críticos es justamente cuando la botella (enjuagada y llenada en caliente con la bebida) está sin tapa, transcurriendo un tiempo en el que la probabilidad de que una o varias esporas fúngicas (presentes en el ambiente) puedan caer en la botella antes de que ingrese al proceso de tapado.

Estudios basados en la evaluación cuantitativa de riesgo microbiológico han podido demostrar la probabilidad de recontaminación microbiológica vía aérea a través de simulaciones de Monte Carlo, considerando el número de microorganismos presentes en el ambiente, la velocidad fijada, el área expuesta y tiempo de exposición del producto (den Aantrekker et al., 2003).

Gracias a la aplicación de diversos modelos matemáticos es posible al día de hoy cuantificar la probabilidad de contaminación fúngica asociada a los factores ambientales de la fábrica, generándose una herramienta única basada en las características del proceso, incluyendo el tipo de empaque primario.

## **2.6. Hipótesis**

### **2.6.1. Hipótesis general**

- La aplicación de un modelo matemático permite estimar de manera significativa la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.

### **2.6.2. Hipótesis específicas**

- Las cargas fúngicas ambientales de tres áreas de proceso de una fábrica de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos son iguales.
- Las cargas fúngicas ambientales de las tres áreas de proceso son iguales durante las temporadas de verano e invierno.
- A través de las dimensiones de su empaque y sus características de proceso es posible estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.
- Las cargas fúngicas ambientales presentan diferentes distribuciones estadísticas de probabilidad para explicar su comportamiento.

## **2.7. Variables**

Debido a que la investigación fue de tipo no experimental, en el cual no hay una manipulación de las variables, éstas no fueron clasificadas en dependientes e independientes. A continuación, se muestran las variables del presente estudio:

- a. Concentración/carga de mohos en el aire
- b. Velocidad de sedimentación
- c. Área de exposición
- d. Tiempo de exposición
- e. Nivel de contaminación fúngica

La matriz de operacionalización de las variables es detallada en el anexo 4.



**CAPÍTULO III:**  
**MARCO METODOLÓGICO**

### **3.1. Enfoque, tipo, método y diseño de la investigación**

#### **3.1.1. Enfoque de la investigación**

La investigación fue de tipo cuantitativa.

#### **3.1.2. Tipo de investigación**

El tipo de la investigación fue aplicada, debido a que el modelo matemático fue construido en base a ecuaciones matemáticas teóricas y a las características propias de las áreas de proceso y de los empaques primarios (botellas), el cual será utilizado por la industria de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos con el fin de estimar la probabilidad de contaminación fúngica en el producto final.

#### **3.1.3. Método de investigación**

La investigación usó el método correlacional sin manipulación de variables, debido a que buscó estimar el nivel de contaminación fúngica de las bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos (producto final) a través de modelos matemáticos, cuyas entradas (variables no manipuladas) fueron las cargas fúngicas ambientales (concentración/carga de mohos en el aire), velocidad de sedimentación, área y tiempo de exposición.

#### **3.1.4. Diseño de investigación**

La investigación fue tipo no experimental y longitudinal, debido a que se colectaron los datos de las cargas ambientales en las áreas de proceso a través del tiempo con el fin de estimar el nivel de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos, sin manipulación de las variables. Se buscó cuantificar el nivel de contaminación fúngica que puede presentar la bebida final en base a las características propias y bajo condiciones normales de una fábrica que elabora bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.

## **3.2. Población y muestra**

### **3.2.1. Población**

Referida a la cargas fúngicas ambientales de 3 áreas de procesamiento (enjuagado de botellas, llenado y tapado) de una línea de fabricación de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.

### **3.2.2. Muestra**

En una planta de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos se tomó semanalmente 1 muestra microbiológica del ambiente (100 L de aire, equivalente a 0.1 m<sup>3</sup>) en las áreas de enjuagado de botellas, llenado y tapado. Estas muestras fueron tomadas de forma aleatorizada bajo condiciones normales de producción.

## **3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos**

### **3.3.1. Método para el muestreo microbiológico ambiental**

Para la recolección de la muestra (aire) se utilizó un equipo muestreador M Air T™, marca Millipore, Cat. N° ATASPLR01. El muestreo se llevó a cabo de forma aséptica en las zonas/áreas de proceso (enjuagado de botellas, llenado y tapado) durante una operacional normal de fabricación de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.

En cada muestreo se colocó sobre el muestreador microbiológico una placa casete conteniendo Agar Papa Dextrosa (BD Difco™). En el lugar del muestreo se encendió el equipo muestreador y se colectó 100 L de aire de forma aséptica. Posteriormente al muestreo, la placa fue retirada del equipo y colocada en un contenedor isotérmico (bajo refrigeración), y de esta forma se trasladó al laboratorio para su incubación.

### **3.3.2. Metodología para el análisis microbiológico**

Las placas casete conteniendo las muestras de cada área de proceso fueron incubadas a una temperatura de  $25 \pm 1$  °C por un tiempo de 5 a 7 días. Al término de este tiempo, se realizó el conteo de mohos presentes en cada placa, y los resultados fueron expresados en UFC/100 L de aire y su equivalencia en UFC/m<sup>3</sup>. Los datos fueron organizados en una hoja de cálculo para posteriormente ser enfrentados a las funciones de probabilidad estadística y simulaciones de Monte Carlo.

### 3.3.3. Determinación de la velocidad de sedimentación ( $V_s$ )

De acuerdo con McCartney y West (2007) la velocidad de sedimentación está en relación al tamaño de la espora fúngica presente en los ambientes de proceso. Para determinar sus valores, se tomaron en cuenta el tamaño de las principales esporas fúngicas presentes en las áreas de proceso y que están implicadas en el deterioro de bebidas. La fórmula que se usó fue:

$$V_s = [(d)/(18.02)]^2$$

Donde:

$V_s$  = Velocidad de sedimentación (cm/s)

$d$  = Diámetro aerodinámico de la espora ( $\mu\text{m}$ )

### 3.3.4. Cálculo del área de exposición ( $A$ )

El área de exposición fue calculado en base al área del empaque primario por donde pueden ingresar las esporas fúngicas ambientales antes del proceso de tapado. Específicamente se tomaron los datos del diámetro de la boca de las botellas PET de 500 y 750 ml, y el área se calculó mediante la siguiente fórmula dada para un círculo:

$$A = \frac{1}{4} [(\pi) \cdot (d)^2]$$

Donde:

$A$  = Área de exposición a ser determinada ( $\text{m}^2$ )

$\pi$  = Constante, con un valor equivalente a 3.1416

$d$  = Diámetro de la boca de la botella (m)

### 3.3.5. Determinación del tiempo de exposición

Definido como el tiempo (segundos) en el que el producto está expuesto y es propenso a ser contaminado con esporas fúngicas ambientales antes del proceso de tapado. Este tiempo está configurado por la fábrica de bebidas con adición de electrolitos, y se tomaron como referencia los valores mínimo, máximo y objetivo establecidos en el proceso de manufactura.

### **3.3.6. Software @RISK 8.2**

Para la simulación estocástica (simulación de Monte Carlo) y para determinar el tipo de distribución estadística que mejor explica el comportamiento de los datos microbiológicos se usó el software @RISK 8.2 (Palidase Corporation, NY, USA), el cual está desarrollado a través de una interface de análisis de riesgo en Microsoft Excel®.

## **3.4. Descripción de procedimientos de análisis**

### **3.4.1. Procedimiento experimental**

Durante la producción de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos se tomaron semanalmente, por un período global de 1 año, muestras ambientales (100 L de aire, equivalente a 0.1 m<sup>3</sup>) en 3 áreas de proceso (enjuagado de botellas, llenado y tapado) haciendo un total de n = 162 muestras. Para ello, se usó el equipo de muestreo M Air T™, y se siguió las metodologías descritas en las secciones 3.3.1 y 3.3.2. Los datos fueron clasificados por área de proceso y por estaciones del año con el fin de compararlos estadísticamente.

Los conteos microbiológicos en cada grupo de datos (enjuagado de botellas, llenado y tapado) fueron enfrentados a las distribuciones estadísticas de probabilidad usando el software @RISK Versión 8.2 (Palidase Corporation, NY, USA).

Para realizar el modelamiento estocástico y obtener la probabilidad de contaminación fúngica en el producto final se utilizó la siguiente fórmula recomendada por Whyte y Eaton (2004):

$$L_c = (C_{ar}) * (V_s) * (A) * (t)$$

Donde:

L<sub>c</sub>= Nivel de contaminación fúngica. Equivalente al número de mohos que ingresan al producto vía aérea

C<sub>ar</sub>= Concentración/carga de mohos en el aire

V<sub>s</sub>= Velocidad de sedimentación

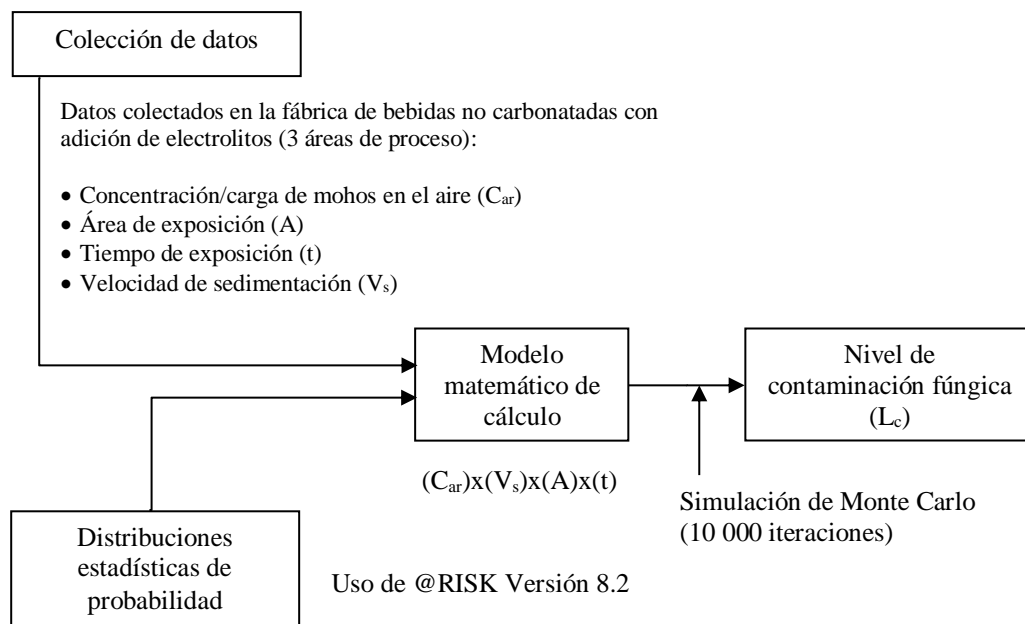
A= Área de exposición del producto (en este caso referido al diámetro de la boca del envase)

t= Tiempo de exposición

Esta fórmula fue incorporada en el software @RISK Versión 8.2 y se colocaron los datos obtenidos del proceso para cuantificar el deterioro fúngico a través de simulaciones de Monte Carlo con 10 000 iteraciones.

### 3.4.2. Diseño experimental

En la figura 3 se muestra el esquema del diseño experimental que se usó en la investigación.



**Figura 3.** Esquema de diseño experimental

Elaboración: Propia

### **3.4.3. Pruebas estadísticas**

Cada set de datos pasó por la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. Posteriormente, fueron comparados estadísticamente mediante pruebas no paramétricas debido a que los datos no se ajustaron a una distribución normal.

El criterio de información de Akaike (AIC) se usó para determinar que distribución estadística de probabilidad se ajustó mejor a los datos de las cargas ambientales de las áreas de enjuagado de botellas, llenado y tapado.

Mediante el tipo de distribución estadística de probabilidad seleccionada y 10 000 iteraciones de la simulación de Monte Carlo aplicada a la fórmula recomendada por Whyte y Eaton (2004) (ver ítem 3.4.1) se estimó la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.

A través de un análisis de sensibilidad de tipo tornado y tomando en cuenta los coeficientes de correlación de Spearman ( $r$ ) se identificaron las variables de mayor relevancia sobre la probabilidad de contaminación fúngica en las bebidas con adición de electrolitos.

**CAPÍTULO IV:**  
**RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS**



## 4.1. Resultados

### 4.1.1. Niveles de contaminación fúngica en ambientes de proceso

Para poder estimar el nivel de contaminación fúngica en las bebidas con adición de electrolitos fue importante contar con los datos de la carga fúngica ambiental de los tres ambientes de proceso. El muestreo microbiológico fue realizado con ayuda del equipo M Air T™ y el conteo de colonias fue realizado luego de su incubación a  $25 \pm 1$  °C por 5 a 7 días. En las tablas 5, 6 y 7 se muestran los resultados microbiológicos clasificados por estaciones del año y expresados en UFC/100 L de aire y su equivalencia en UFC/m<sup>3</sup>.

**Tabla 5.**

*Carga ambiental de mohos en la zona de enjuagado de botellas por estaciones del año*

Estación	UFC/100 L	UFC/m <sup>3</sup>	Estación	UFC/100 L	UFC/m <sup>3</sup>
Verano	0	0	Otoño	0	0
	1	10		0	0
	6	60		0	0
	0	0		0	0
	0	0		0	0
	2	20		6	60
	10	100		0	0
	0	0		1	10
	0	0		0	0
	1	10		0	0
	0	0		0	0
	1	10		10	100
	0	0		1	10
Invierno	1	10	Primavera	0	0
	0	0		0	0
	0	0		0	0
	0	0		0	0
	1	10		8	80
	0	0		1	10
	0	0		1	10
	0	0		0	0
	0	0		0	0
	0	0		1	10
	0	0		1	10
	0	0		0	0
	0	0		0	0
0	0	1	10		

*Nota.* Siendo UFC: Unidad formadora de colonias. Todos los conteos son reportados en litros o m<sup>3</sup> de aire muestreado. El valor de “0” equivale a <1 UFC en el recuento en placa.

Elaboración: Propia

**Tabla 6.***Carga ambiental de mohos en la zona de llenado por estaciones del año*

Estación	UFC/100 L	UFC/m <sup>3</sup>	Estación	UFC/100 L	UFC/m <sup>3</sup>
Verano	1	10	Otoño	0	0
	0	0		0	0
	4	40		0	0
	5	50		0	0
	0	0		0	0
	0	0		1	10
	10	100		0	0
	0	0		1	10
	1	10		0	0
	3	30		4	40
	3	30		0	0
	1	10		6	60
	1	10		8	80
	Invierno	0		0	Primavera
0		0	0	0	
0		0	0	0	
0		0	0	0	
2		20	5	50	
0		0	1	10	
0		0	1	10	
0		0	3	30	
3		30	0	0	
0		0	0	0	
0		0	0	0	
3		30	0	0	
0		0	0	0	
0		0	3	30	

*Nota.* Siendo UFC: Unidad formadora de colonias. Todos los conteos son reportados en litros o m<sup>3</sup> de aire muestreado. El valor de "0" equivale a <1 UFC en el recuento en placa.

Elaboración: Propia

**Tabla 7.***Carga ambiental de mohos en la zona de tapado por estaciones del año*

Estación	UFC/100 L	UFC/m <sup>3</sup>	Estación	UFC/100 L	UFC/m <sup>3</sup>
Verano	0	0	Otoño	0	0
	0	0		0	0
	4	40		0	0
	6	60		0	0
	3	30		0	0
	1	10		2	20
	3	30		0	0
	0	0		1	10
	1	10		0	0
	9	90		4	40
	0	0		0	0
	2	20		8	80
	0	0		1	10

Estación	UFC/100 L	UFC/m <sup>3</sup>	Estación	UFC/100 L	UFC/m <sup>3</sup>
Invierno	3	30	Primavera	0	0
	0	0		0	0
	0	0		0	0
	0	0		0	0
	1	10		0	0
	0	0		1	10
	0	0		0	0
	0	0		10	100
	0	0		2	20
	1	10		0	0
	0	0		0	0
	0	0		0	0
	0	0		0	0
	0	0		1	10

*Nota.* Siendo UFC: Unidad formadora de colonias. Todos los conteos son reportados en litros o m<sup>3</sup> de aire muestreado. El valor de “0” equivale a <1 UFC en el recuento en placa.

Elaboración: Propia

Basado en los resultados de los conteos microbiológicos ambientales fue importante clasificar los datos en función de los valores “0” debido a su alta incidencia, así como establecer los valores máximos y mínimos obtenidos en cada estación y zona de muestreo. Esta clasificación se muestra en la tabla 8.

**Tabla 8.**

*Resumen estadístico de los conteos microbiológicos ambientales obtenidos en cada área de proceso*

Área	Estación	UFC/100 L de aire		Valores “0”	
		Mínimo	Máximo	Ratio	%
Enjuagado de botellas	Verano	0	10	7/13	53.8
	Otoño	0	10	9/13	69.2
	Invierno	0	1	12/14	85.7
	Primavera	0	10	8/14	57.1
Llenado	Verano	0	10	4/13	30.8
	Otoño	0	8	8/13	61.5
	Invierno	0	3	11/14	78.6
	Primavera	0	5	9/14	64.3
Tapado	Verano	0	9	5/13	38.5
	Otoño	0	8	8/13	61.5
	Invierno	0	3	11/14	78.6
	Primavera	0	10	10/14	71.4

*Nota.* Siendo UFC: Unidad formadora de colonias. El valor de “0” equivale a <1 UFC en el recuento en placa.

Elaboración: Propia

#### 4.1.2. Velocidades de sedimentación

Los valores para la velocidad de sedimentación (tabla 9) fueron calculados en base a los siguientes aspectos: el tamaño de la espora fúngica para las principales especies de mohos implicados en deterioro de bebidas y que están comúnmente presentes en los ambientes de proceso (Dijksterhuis, 2017, 2019; van den Brule, Lee, et al., 2020) y la fórmula dada por McCartney y West (2007) el cual es detallada en la sección 3.3.3.

#### Tabla 9.

*Velocidades de sedimentación calculadas a partir del tamaño de esporas fúngicas ambientales*

Tamaño de esporas fúngicas (diámetro expresado en $\mu\text{m}$ )			Velocidad de sedimentación (m/s)		
Mínimo	Objetivo	Máximo	Mínimo	Objetivo	Máximo
2	3.6	30	0.000123	0.000399	0.027716

Elaboración: Propia

#### 4.1.3. Áreas de exposición relacionadas al empaque primario

Durante el proceso de producción de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos, la única fase en que el producto está expuesto y puede ser contaminado después de la pasteurización (tratamiento de inactivación) es inmediatamente después del llenado y antes del tapado. En esta etapa, la única forma en que se contamine el producto con esporas fúngicas provenientes del ambiente es a través de la boca del envase de la botella.

En esta investigación se trabajó con dos formatos de presentación que tiene el empaque primario (botella PET): 500 y 750 ml, cuyas bocas tienen en promedio un diámetro interno de 26.5 y 30 mm, respectivamente. En base a este diámetro se calculó el área correspondiente del círculo (forma que tiene la boca del envase), el cual se muestra en detalle en la tabla 10.

La fórmula usada para el cálculo del área de exposición es detallada en la sección 3.3.4.

**Tabla 10.**

*Áreas de exposición calculadas en base a las dimensiones del empaque primario (botellas PET)*

Formato	Diámetro interno de la boca de la botella (m)			Área de exposición (m <sup>2</sup> )		
	Mínimo	Objetivo	Máximo	Mínimo	Objetivo	Máximo
500 ml	0.0263	0.0265	0.0267	0.000543	0.000552	0.000560
750 ml	0.0297	0.0300	0.0303	0.000693	0.000707	0.000721

Elaboración: Propia

#### 4.1.4. Tiempos de exposición

En el proceso de envasado, hay un tiempo permitido desde el momento en que la botella con producto sale de la llenadora en dirección hacia la tapadora. El valor mínimo, objetivo y máximo de este tiempo es detallado en la tabla 11. Dichos valores fueron establecidos a partir de las especificaciones de proceso de la fábrica (mínimo y máximo) y del tiempo real (configurado) que ocurre en producciones normales.

**Tabla 11.**

*Valores de tiempo de exposición entre el proceso de llenado y tapado de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos*

Formato	Tiempo (segundos)		
	Mínimo	Objetivo	Máximo
500 ml	3	4	10
750 ml	3	4	10

*Nota.* El objetivo representa el valor estándar que normalmente se trabaja en la fábrica.

Elaboración: Propia

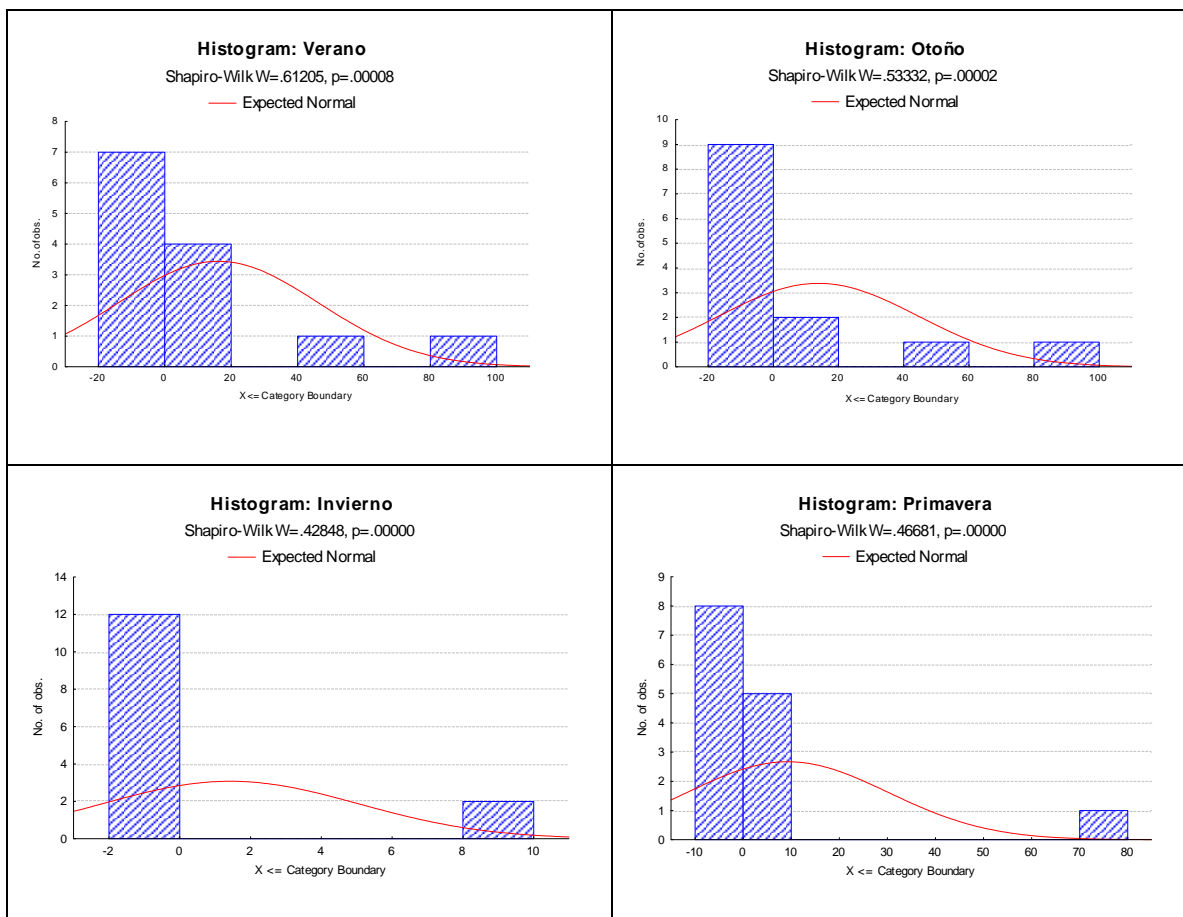
#### 4.1.5. Pruebas de normalidad para las cargas fúngicas ambientales

Con el fin de compararlos posteriormente, cada conjunto de datos de los conteos microbiológicos ambientales fue sometido a la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, siendo las hipótesis planteadas:

H<sub>0</sub>: Los datos siguen una distribución normal

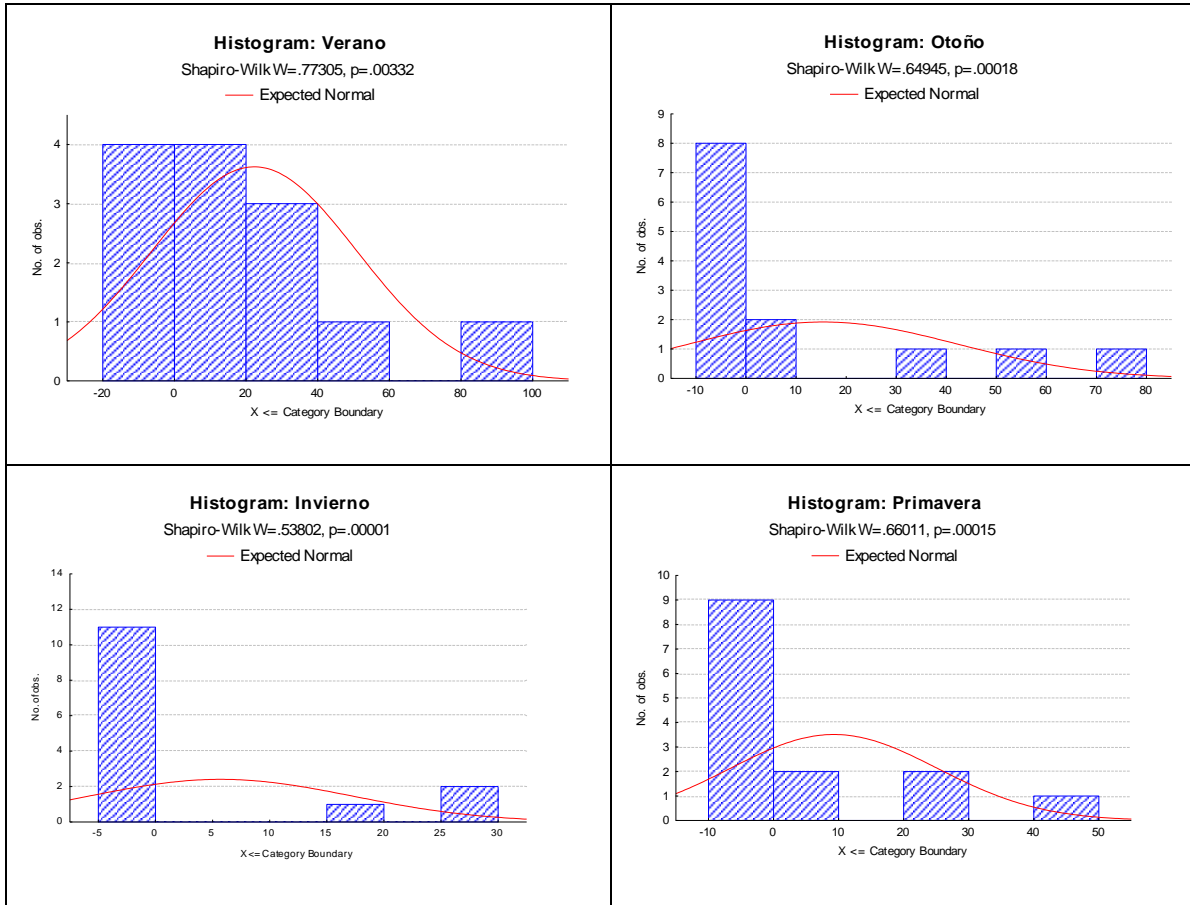
H<sub>1</sub>: Los datos no siguen una distribución normal

En las figuras 4, 5 y 6 se muestran los resultados de las pruebas de normalidad, en donde se indican los p-value al 95% de confianza.



**Figura 4.** Pruebas de normalidad para cargas fúngicas ambientales obtenidas en las 4 estaciones del año - Zona de enjuagado de botellas

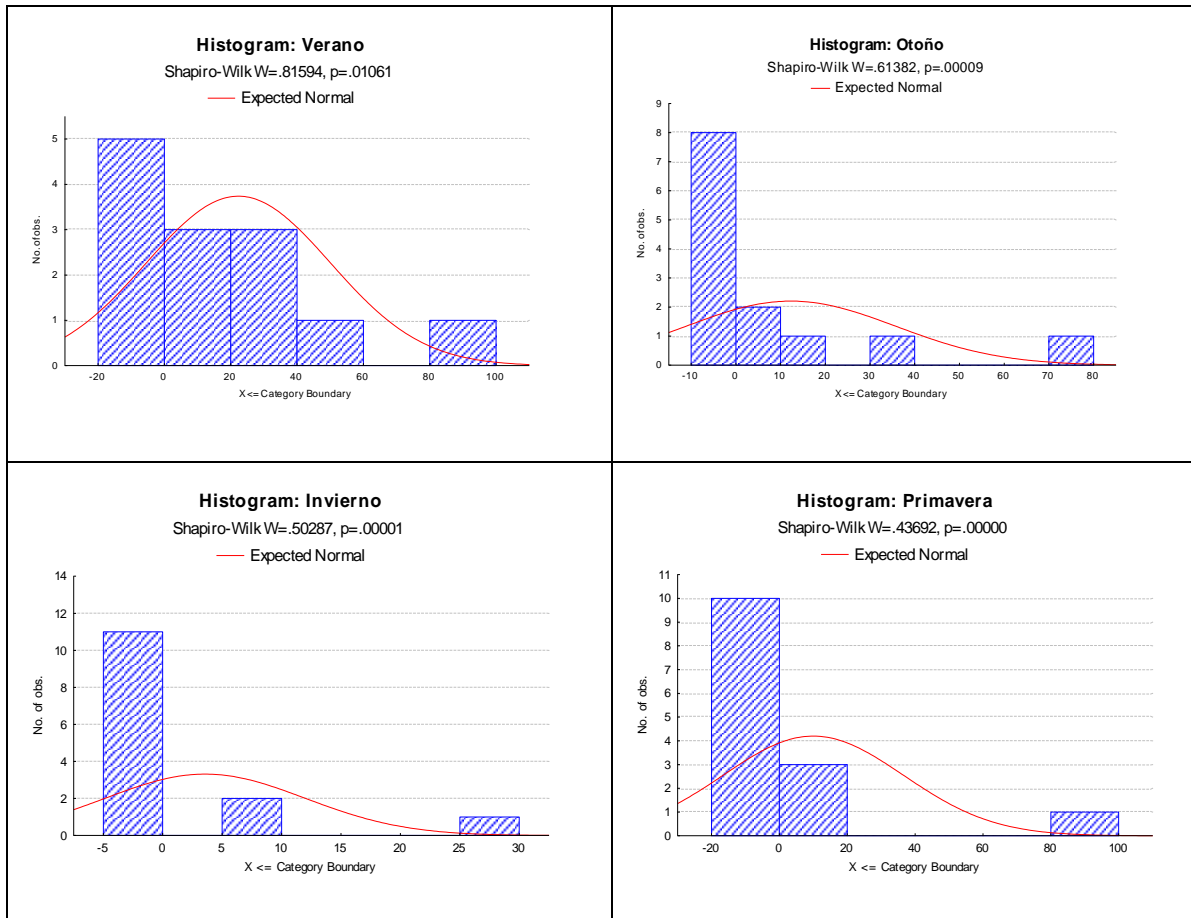
Elaboración: Propia



**Figura 5.** Pruebas de normalidad para cargas fúngicas ambientales obtenidas en las 4 estaciones del año – Zona de llenado

Elaboración: Propia

Basado en los valores del p-value obtenidos en las pruebas de normalidad realizadas y siendo todos menores a 0.05, se procedió a rechazar la  $H_0$ , concluyendo que en ningún caso los conjuntos de datos evaluados siguen una distribución normal, por lo que para la comparación de datos se aplicó estadística no paramétrica.



**Figura 6.** Pruebas de normalidad para cargas fúngicas ambientales obtenidas en las 4 estaciones del año – Zona de tapado

Elaboración: Propia

#### 4.1.6. Análisis comparativo de la carga fúngica ambiental entre estaciones del año

Con la finalidad de determinar el efecto de las estaciones del año (verano, otoño, invierno y primavera) y el lugar de muestreo (zona de enjuagado de botellas, llenado y tapado) sobre la carga fúngica ambiental, se construyó un modelo lineal generalizado con distribución binomial negativa y función de enlace logarítmico (Anexo 5). Esto, tomando en cuenta que los set de datos no pasaron la prueba de normalidad y debido a que hay mucha diferencia entre los valores cero y el resto de valores. Esto permitió comparar los set de datos mediante estadística no paramétrica.



En las tablas 12, 13, 14, 15, 16 y 17, se muestran los estadísticos y las pruebas de comparación realizadas al conjunto de datos de las áreas de muestreo (enjuagado de botellas, llenado y tapado) entre estaciones del año (invierno, otoño, primavera y verano).

**Tabla 12.**

*Estadísticos de la carga fúngica ambiental del área de enjuagado de botellas por estación del año*

Estación	Media	Desv. Error	95% de intervalo de confianza de Wald	
			Inferior	Superior
Invierno	1.43	0.498	0.72	2.83
Otoño	13.85	3.976	7.89	24.31
Primavera	9.29	2.612	5.35	16.12
Verano	16.15	4.617	9.23	28.28

*Nota:* Valores comparados en UFC/m<sup>3</sup>

Elaboración: Propia

**Tabla 13.**

*Comparaciones estadísticas de la carga fúngica ambiental del área de enjuagado de botellas entre estaciones del año*

(I) Estación	(J) Estación	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	gl	Sig.	95% de intervalo de confianza de Wald para la diferencia	
						Inferior	Superior
Invierno	Otoño	-12.42 <sup>a</sup>	4.008	1	0.002	-20.27	-4.56
	Primavera	-7.86 <sup>a</sup>	2.659	1	0.003	-13.07	-2.65
	Verano	-14.73 <sup>a</sup>	4.644	1	0.002	-23.83	-5.62
Otoño	Invierno	12.42 <sup>a</sup>	4.008	1	0.002	4.56	20.27
	Primavera	4.56	4.758	1	0.338	-4.76	13.89
	Verano	-2.31	6.093	1	0.705	-14.25	9.63
Primavera	Invierno	7.86 <sup>a</sup>	2.659	1	0.003	2.65	13.07
	Otoño	-4.56	4.758	1	0.338	-13.89	4.76
	Verano	-6.87	5.304	1	0.195	-17.26	3.53
Verano	Invierno	14,73 <sup>a</sup>	4.644	1	0.002	5.62	23.83
	Otoño	2.31	6.093	1	0.705	-9.63	14.25
	Primavera	6.87	5.304	1	0.195	-3.53	17.26

*Nota.* Comparaciones por parejas de medias marginales estimadas basadas en la escala original de la variable dependiente Concentración (UFC/m<sup>3</sup>)

<sup>a</sup> La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

Elaboración: Propia

Como es observado en la tabla 13, las cargas fúngicas ambientales del área de enjuagado de botellas presentaron una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los periodos de invierno y otoño, invierno y primavera e invierno y verano.

Por otro lado, con un 95% de confianza, no hubo evidencia significativa para indicar que las cargas fúngicas ambientales del área de enjuagado de botellas son diferentes, cuando comparados entre sí en los periodos de otoño y primavera, otoño y verano y primavera y verano.

**Tabla 14.**

*Estadísticos de la carga fúngica ambiental del área de llenado por estación del año*

Estación	Media	Desv. Error	95% de intervalo de confianza de Wald	
			Inferior	Superior
Invierno	5.71	1.655	3.24	10.08
Otoño	15.38	4.403	8.78	26.96
Primavera	9.29	2.612	5.35	16.12
Verano	22.31	6.324	12.80	38.88

*Nota.* Valores comparados en UFC/m<sup>3</sup>

Elaboración: Propia

En el área de llenado, al realizar la prueba estadística de comparación por pares entre las cargas fúngicas ambientales de cada estación del año, se obtuvo una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los periodos de invierno y otoño e invierno y verano (Tabla 15).

Así mismo, las cargas fúngicas ambientales entre las estaciones de invierno y primavera, otoño y primavera, otoño y verano, y verano y primavera, no presentaron diferencias significativas con un nivel de confianza del 95%.

**Tabla 15.**

*Comparaciones estadísticas de la carga fúngica ambiental del área de llenado entre estaciones del año*

(I) Estación	(J) Estación	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	gl	Sig.	95% de intervalo de confianza de Wald para la diferencia	
						Inferior	Superior
Invierno	Otoño	-9.67 <sup>a</sup>	4.704	1	0.040	-18.89	-0.45
	Primavera	-3.57	3.092	1	0.248	-9.63	2.49
	Verano	-16.59 <sup>a</sup>	6.537	1	0.011	-29.41	-3.78
Otoño	Invierno	9.67 <sup>a</sup>	4.704	1	0.040	0.45	18.89
	Primavera	6.10	5.120	1	0.234	-3.94	16.13
	Verano	-6.92	7.706	1	0.369	-22.03	8.18
Primavera	Invierno	3.57	3.092	1	0.248	-2.49	9.63
	Otoño	-6.10	5.120	1	0.234	-16.13	3.94
	Verano	-13.02	6.842	1	0.057	-26.43	0.39
Verano	Invierno	16,59 <sup>a</sup>	6.537	1	0.011	3.78	29.41
	Otoño	6.92	7.706	1	0.369	-8.18	22.03
	Primavera	13.02	6.842	1	0.057	-0.39	26.43

*Nota.* Comparaciones por parejas de medias marginales estimadas basadas en la escala original de la variable dependiente Concentración (UFC/m<sup>3</sup>)

<sup>a</sup> La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

Elaboración: Propia

**Tabla 16.**

*Estadísticos de la carga fúngica ambiental del área de tapado por estación del año*

Estación	Media	Desv. Error	95% de intervalo de confianza de Wald	
			Inferior	Superior
Invierno	3.57	1.080	1.97	6.46
Otoño	12.31	3.550	6.99	21.66
Primavera	10.00	2.803	5.77	17.32
Verano	22.31	6.324	12.80	38.88

*Nota.* Valores comparados en UFC/m<sup>3</sup>

Elaboración: Propia

En la tabla 17 se muestran los resultados estadísticos de las pruebas comparativas realizadas en el área de tapado. Estas pruebas indicaron una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las cargas fúngicas ambientales de las estaciones de invierno y otoño, invierno y primavera, e invierno y verano. Por otro lado, las pruebas estadísticas de comparación

también indicaron que no hay evidencia para demostrar una diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre las cargas fúngicas ambientales de las estaciones de otoño y primavera, otoño y verano, y primavera y verano.

**Tabla 17.**

*Comparaciones estadísticas de la carga fúngica ambiental del área de tapado entre estaciones del año*

(I) Estación	(J) Estación	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	gl	Sig.	95% de intervalo de confianza de Wald para la diferencia	
						Inferior	Superior
Invierno	Otoño	-8.74 <sup>a</sup>	3.710	1	0.019	-16.01	-1.46
	Primavera	-6.43 <sup>a</sup>	3.004	1	0.032	-12.32	-0.54
	Verano	-18.74 <sup>a</sup>	6.416	1	0.003	-31.31	-6.16
Otoño	Invierno	8.74 <sup>a</sup>	3.710	1	0.019	1.46	16.01
	Primavera	2.31	4.523	1	0.610	-6.56	11.17
	Verano	-10.00	7.252	1	0.168	-24.21	4.21
Primavera	Invierno	6.43 <sup>a</sup>	3.004	1	0.032	0.54	12.32
	Otoño	-2.31	4.523	1	0.610	-11.17	6.56
	Verano	-12.31	6.918	1	0.075	-25.87	1.25
Verano	Invierno	18,74 <sup>a</sup>	6.416	1	0.003	6.16	31.31
	Otoño	10.00	7.252	1	0.168	-4.21	24.21
	Primavera	12.31	6.918	1	0.075	-1.25	25.87

*Nota.* Comparaciones por parejas de medias marginales estimadas basadas en la escala original de la variable dependiente Concentración (UFC/m<sup>3</sup>)

<sup>a</sup> La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

Elaboración: Propia

#### 4.1.7. Análisis comparativo de la carga fúngica ambiental entre zonas de muestreo

En las tablas 18, 19, 20 y 21, se muestran los estadísticos y las pruebas de comparación realizadas al conjunto de datos de las áreas enjuagado de botellas, llenado y tapado durante el periodo de verano e invierno.

**Tabla 18.***Estadísticos de la carga fúngica ambiental por área de proceso en el periodo de verano*

Área de proceso	Media	Desv. Error	95% de intervalo de confianza de Wald	
			Inferior	Superior
Enjuagado de botellas	16.15	4.617	9.23	28.28
Llenado	22.31	6.324	12.80	38.38
Tapado	22.31	6.324	12.80	38.88

*Nota.* Valores comparados en UFC/m<sup>3</sup>

Elaboración: Propia

**Tabla 19.***Comparaciones estadísticas de la carga fúngica ambiental proveniente de las áreas de proceso durante la estación de verano*

(I) Área de proceso	(J) Área de proceso	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	gl	Sig.	95% de intervalo de confianza de Wald para la diferencia	
						Inferior	Superior
Enjuagado de botellas	Llenado	-6.15	7.830	1	0.432	-21.50	9.19
	Tapado	-6.15	7.830	1	0.432	-21.50	9.19
Llenado	Enjuagado de botellas	6.15	7.830	1	0.432	-9.19	21.50
	Tapado	0.00	8.944	1	1.000	-17.53	17.53
Tapado	Enjuagado de botellas	6.15	7.830	1	0.432	-9.19	21.50
	Llenado	0.00	8.944	1	1.000	-17.53	17.53

*Nota.* Comparaciones por parejas de medias marginales estimadas basadas en la escala original de la variable dependiente Concentración (UFC/m<sup>3</sup>)La diferencia de medias no es significativa a un valor de  $p > 0.05$  (Sig.)

Elaboración: Propia

Mediante las pruebas de comparación realizadas, se observó que no hay diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los conteos de las áreas de enjuagado de botellas, llenado y tapado durante la estación de verano (Tabla 19).

**Tabla 20.***Estadísticos de la carga fúngica ambiental por área de proceso en el periodo de invierno*

Área de proceso	Media	Desv. Error	95% de intervalo de confianza de Wald	
			Inferior	Superior
Enjuagado de botellas	1.43	0.498	0.72	2.83
Llenado	5.71	1.655	3.24	10.08
Tapado	3.57	1.080	1.97	6.46

*Nota.* Valores comparados en UFC/m<sup>3</sup>

Elaboración: Propia

**Tabla 21.***Comparaciones estadísticas de la carga fúngica ambiental proveniente de las áreas de proceso durante la estación de invierno*

(I) Área de proceso	(J) Área de proceso	Diferencia de medias (I-J)	Desv. Error	gl	Sig.	95% de intervalo de confianza de Wald para la diferencia	
						Inferior	Superior
Enjuagado de botellas	Llenado	-4.29 <sup>a</sup>	1.729	1	0.013	-7.67	-0.90
	Tapado	-2.14	1.189	1	0.072	-4.47	0.19
Llenado	Enjuagado de botellas	4.29 <sup>a</sup>	1.729	1	0.013	0.90	7.67
	Tapado	2.14	1.977	1	0.278	-1.73	6.02
Tapado	Enjuagado de botellas	2.14	1.189	1	0.072	-0.19	4.47
	Llenado	-2.14	1.977	1	0.278	-6.02	1.73

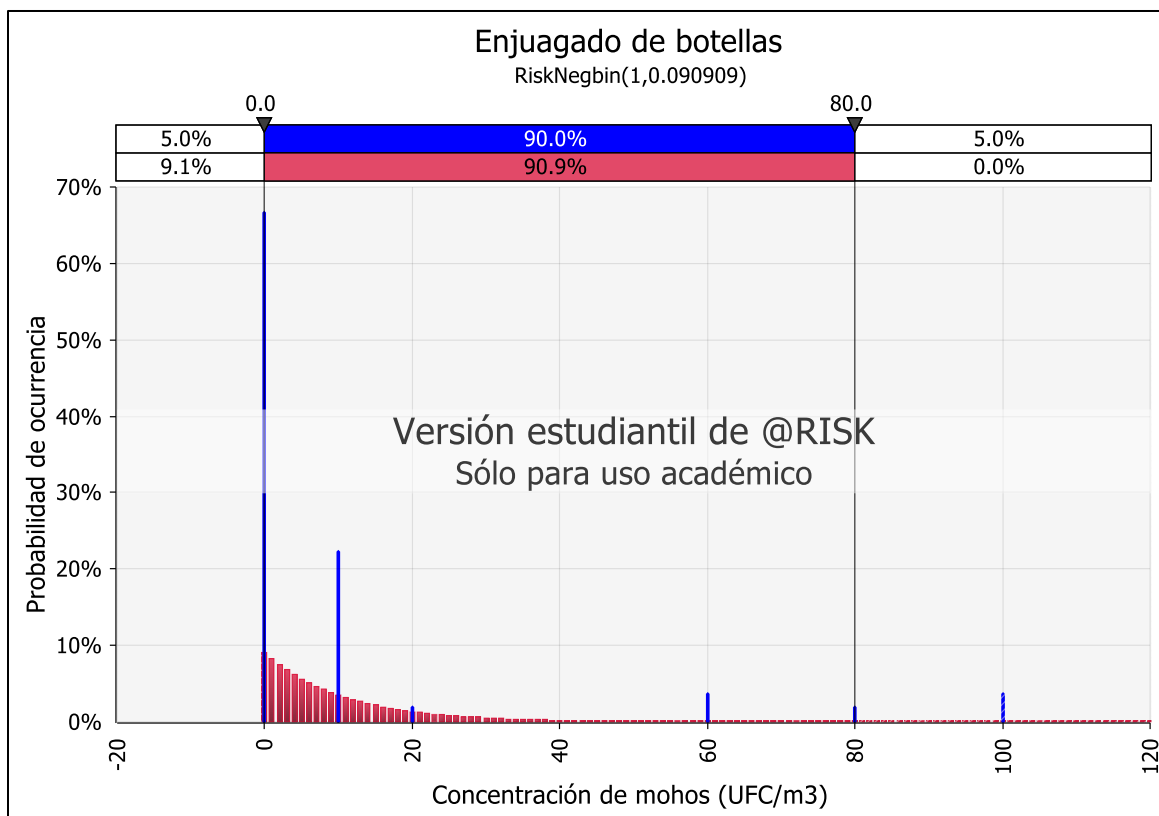
*Nota.* Comparaciones por parejas de medias marginales estimadas basadas en la escala original de la variable dependiente Concentración (UFC/m<sup>3</sup>)<sup>a</sup> La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05

Elaboración: Propia

Al realizar las pruebas estadísticas comparativas entre las cargas fúngicas ambientales de las áreas de enjuagado de botellas, llenado y tapado durante el periodo de invierno se evidenció que hay una diferencia significativa (95% de confianza) entre las áreas de enjuagado de botellas y llenado (Tabla 21). Por otro lado, no hay evidencia significativa para demostrar que las cargas fúngicas ambientales de las áreas de enjuagado de botellas y tapado, y de llenado y tapado, son diferentes.

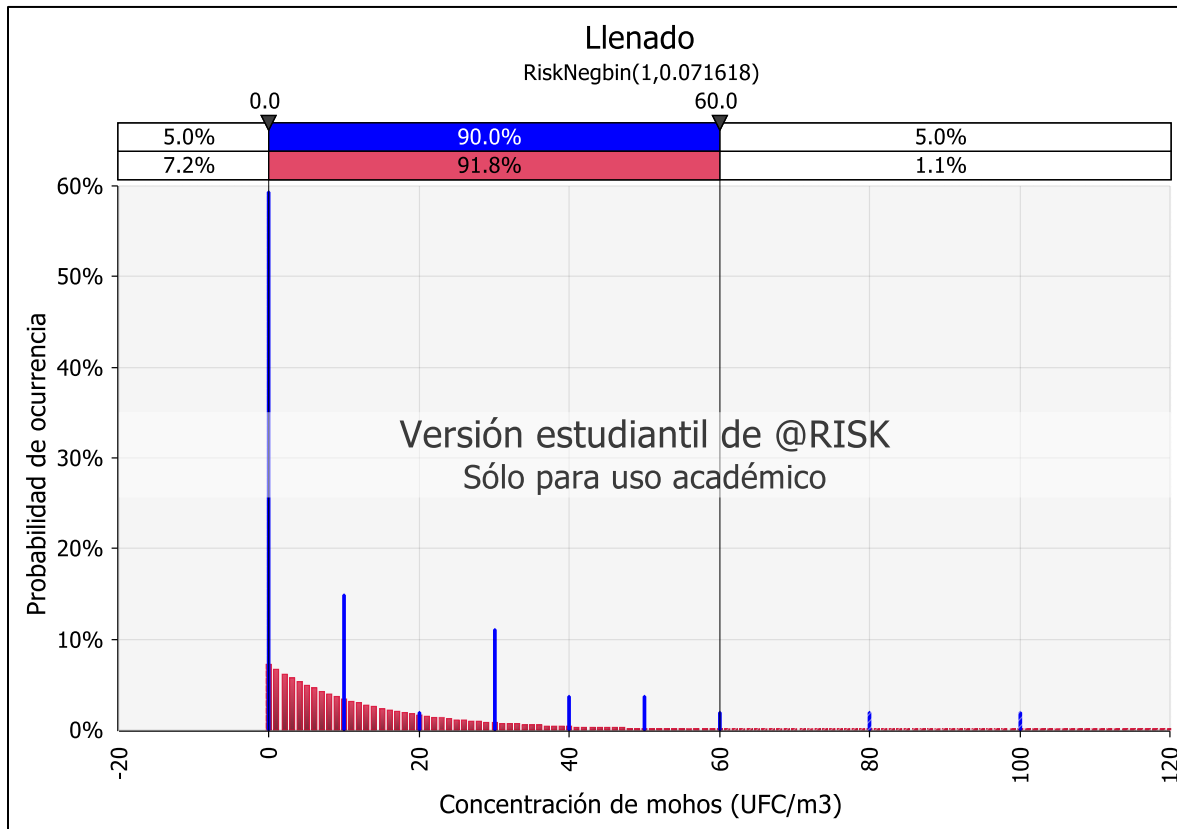
#### 4.1.8. Distribuciones estadísticas de probabilidad (DEP) determinadas para cada set de datos microbiológicos

Las cargas fúngicas ambientales obtenidas a través de 1 año de muestreo en las áreas de enjuagado de botellas, llenado y tapado fueron enfrentadas de manera independiente a las distribuciones estadísticas de probabilidad usando el software @RISK 8.2. En las figuras 7, 8 y 9 se muestran los gráficos relacionados por cada área de proceso evaluada.



**Figura 7.** Distribución estadística de probabilidad para las cargas microbiológicas anuales del área de enjuagado de botellas

Elaboración: Propia

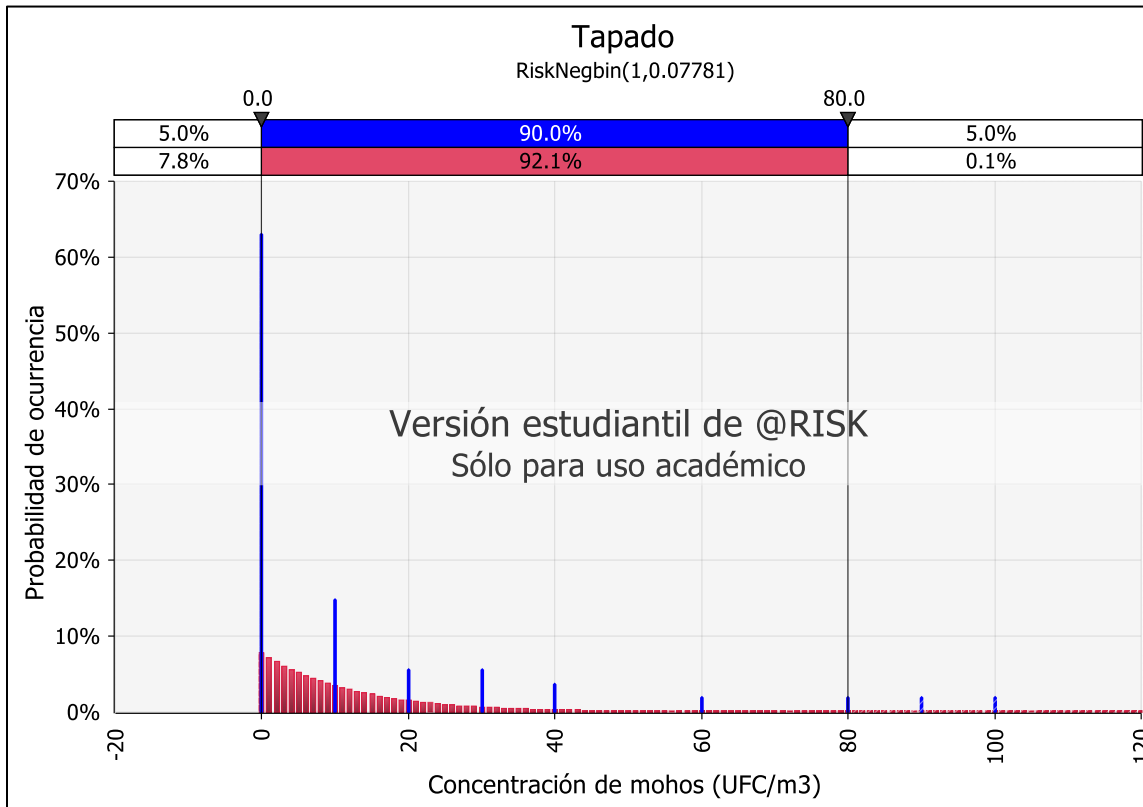


**Figura 8.** *Distribución estadística de probabilidad para las cargas microbiológicas anuales del área de llenado*

Elaboración: Propia

Los conteos fúngicos de cada área se ajustaron mejor a la distribución estadística de probabilidad denominada binomial negativa, determinada bajo el criterio de información de Akaike (AIC), el cual se detalla en la tabla 22.





**Figura 9.** Distribución estadística de probabilidad para las cargas microbiológicas anuales del área de tapado

Elaboración: Propia

**Tabla 22.**

*Medida de la bondad de ajuste de las cargas fúngicas ambientales a la distribución estadística de probabilidad*

Área de proceso	DPE	Unidad	Criterio de información de Akaike (AIC)
Enjuagado de botellas	Binomial negativa	UFC/m <sup>3</sup>	366.143
Llenado	Binomial negativa	UFC/m <sup>3</sup>	393.004
Tapado	Binomial negativa	UFC/m <sup>3</sup>	383.697

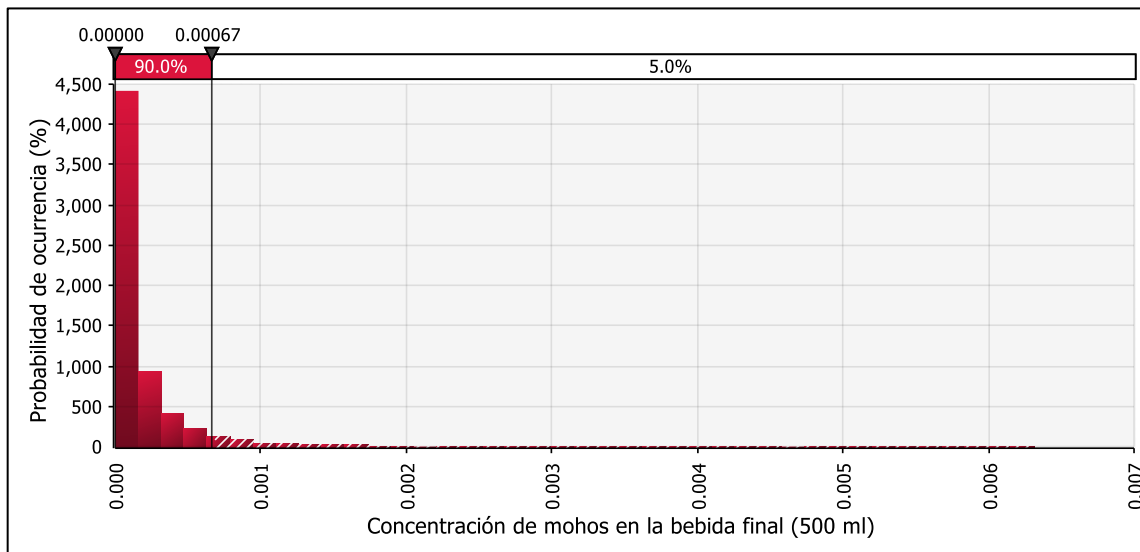
*Nota.* Siendo DPE la distribución estadística de probabilidad

Elaboración: Propia

#### 4.1.9. Estimación de la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas con adición de electrolitos

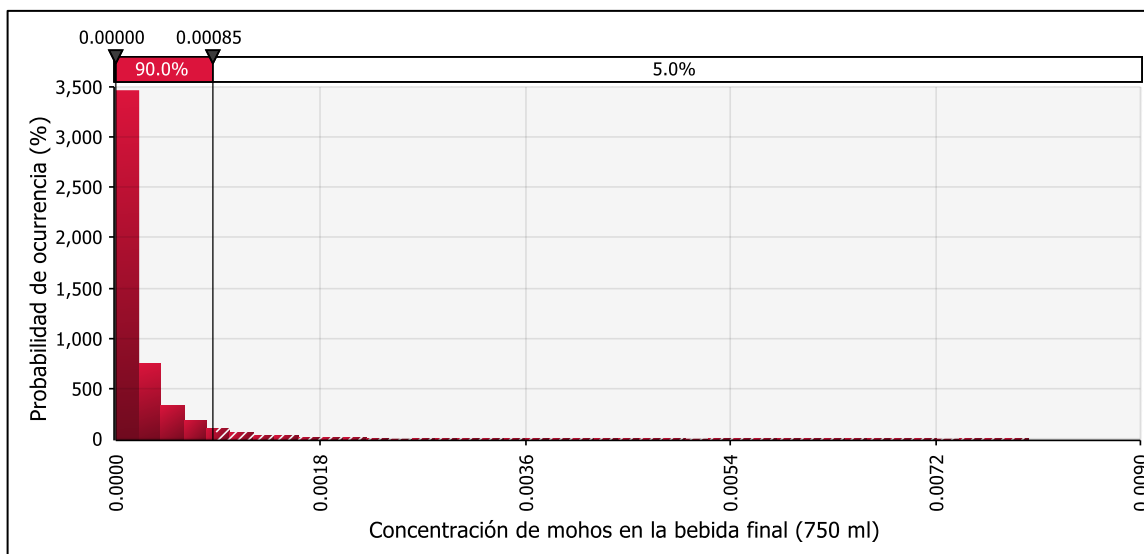
El modelamiento estocástico del nivel de contaminación fúngica en las bebidas con adición de electrolitos fue estimado usando la fórmula recomendada por Whyte y Eaton (2004) y la simulación de Monte Carlo con 10 000 iteraciones bajo la plataforma del @RISK 8.2, en donde se incorporaron los valores obtenidos para las variables: concentración/carga de mohos en el aire (ambiente de proceso), velocidad de sedimentación, área de exposición y tiempo de exposición.

Los resultados de forma gráfica para las presentaciones de 500 y 750 ml son mostrados en las figuras 10 y 11, respectivamente.



**Figura 10.** Modelamiento estocástico de la contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – Formato: PET 500 ml

Elaboración: Propia



**Figura 11.** Modelamiento estocástico de la contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – Formato: PET 750 ml

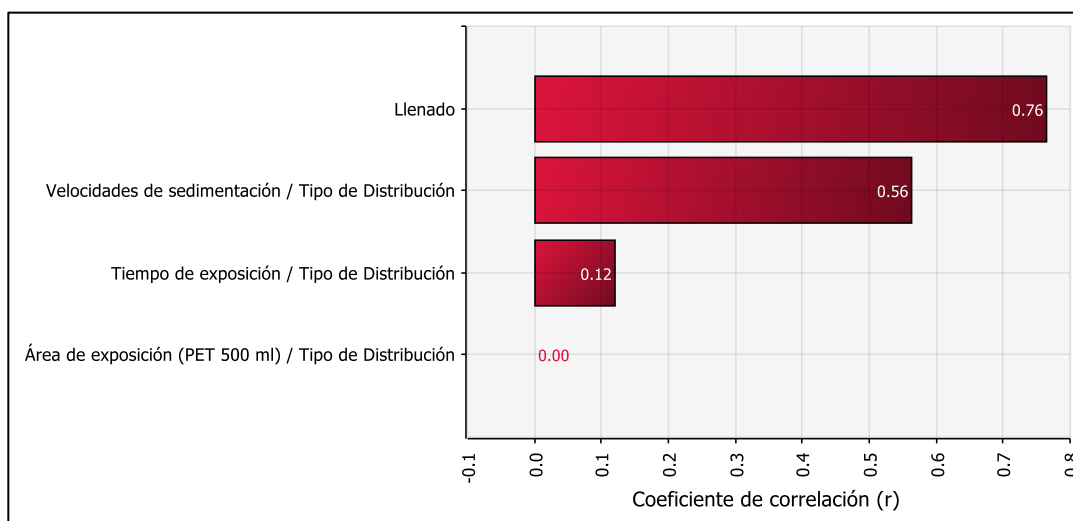
Elaboración: Propia

A través de las figuras 10 y 11 se pudo estimar que en el 5% de un lote de producción hay una probabilidad que 67/100 000 bebidas envasadas en botellas PET de 500 ml con tapa 33 mm presenten contaminación con al menos 1 espora fúngica. Así mismo, esta probabilidad aumenta a 85/100 000 bebidas si se usan como empaques primarios botellas PET de 750 ml con tapa 38 mm. Las tapas 33 y 38 mm están asociadas al diámetro de la boca de la botella, variable incluida en el modelamiento estocástico.

#### 4.1.10. Determinación de las variables con mayor relevancia sobre la contaminación fúngica en bebidas con adición de electrolitos

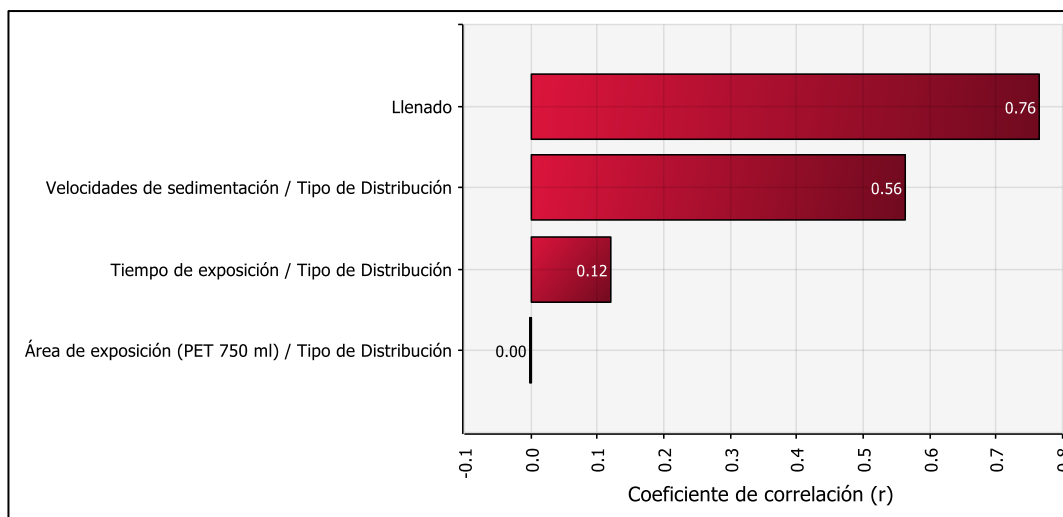
Mediante un análisis de sensibilidad de tipo tornado llevado a cabo en el software @RISK 8.2, se determinó la relevancia de cada variable sobre la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas con adición de electrolitos. Basado en el coeficiente de correlación de Spearman (r), la concentración/carga de mohos en el aire ( $r = 0.76$ , obtenido para ambos formatos de presentación), seguida de la velocidad de sedimentación ( $r = 0.56$ )

fueron las variables con mayor relevancia en la contaminación fúngica de las bebidas (Figuras 12 y 13), es decir fueron las variables más críticas.



**Figura 12.** *Análisis de correlación sobre la contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – Formato: PET 500 ml*

Elaboración: Propia



**Figura 13.** *Análisis de correlación sobre la contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – Formato: PET 750 ml*

Elaboración: Propia

#### 4.1.11. Modelo estocástico desarrollado para la industria de bebidas con adición de electrolitos

En las tablas 23 y 24 se muestran los inputs (variables de entrada) y sus correspondientes distribuciones estadísticas de probabilidad (descripciones matemáticas) contemplados en el modelamiento estocástico, según sea el caso, para ambos formatos de presentación (botellas PET de 500 y 750 ml).

**Tabla 23.**

*Inputs probabilísticos del modelo de evaluación de riesgo en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – PET 500 ml*

Variable	Distribución	Unidades
Concentración de mohos en el ambiente – Enjuagado de botellas	=RiskNegbin(1,0.090909)	UFC/m <sup>3</sup>
Concentración de mohos en el ambiente - Llenado	=RiskNegbin(1,0.071618)	UFC/m <sup>3</sup>
Concentración de mohos en el ambiente - Tapado	=RiskNegbin(1,0.07781)	UFC/m <sup>3</sup>
Velocidades de sedimentación	=RiskPert(0.000123,0.000399,0.027716)	m/s
Área de exposición	=RiskPert(0.000543,0.000552,0.00056)	m <sup>2</sup>
Tiempo de exposición	=RiskPert(3,4,10)	s

Elaboración: Propia

**Tabla 24.**

*Inputs probabilísticos del modelo de evaluación de riesgo en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos – PET 750 ml*

Variable	Distribución	Unidades
Concentración de mohos en el ambiente - Enj. Botellas	=RiskNegbin(1,0.090909)	UFC/m <sup>3</sup>
Concentración de mohos en el ambiente - Llenado	=RiskNegbin(1,0.071618)	UFC/m <sup>3</sup>
Concentración de mohos en el ambiente - Tapado	=RiskNegbin(1,0.07781)	UFC/m <sup>3</sup>
Velocidades de sedimentación	=RiskPert(0.000123,0.000399,0.027716)	m/s
Tiempo de exposición	=RiskPert(3,4,10)	s
Área de exposición	=RiskPert(0.000693,0.000707,0.000721)	m <sup>2</sup>

Elaboración: Propia

La tabla 25 muestra en detalle los valores de la variable de salida (output) relacionados a la contaminación fúngica de bebidas con adición de electrolitos (incluyendo sus intervalos de confianza al 90%).

**Tabla 25.**

*Output del modelo de evaluación de riesgo en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos*

<b>Variable</b>	<b>Valor (media, 90% IC)</b>	<b>Unidades</b>
Contaminación fúngica final en la bebida con adición de electrolitos en botellas PET 500 ml	0.0001708, ± 4.393E-006	UFC/producto
Contaminación fúngica final en la bebida con adición de electrolitos en botellas PET 750 ml	0.0002148, ± 5.780E-006	UFC/producto

*Nota.* IC es el intervalo de confianza

Elaboración: Propia

Basado en los datos mostrados en la tabla 25, se concluye que el nivel de contaminación fúngica media en botellas PET de 500 ml es de 0.0001708 UFC/producto, es decir 1708 de cada 10 000 000 productos presentarán contaminación con al menos 1 espora fúngica. Así mismo, para el caso de botellas PET de 750 ml, está probabilidad de contaminación fúngica media aumenta a 2148 de cada 10 000 000 productos (0.0002148 UFC/producto).

## 4.2. Análisis de resultados

Diversos factores ambientales impactan directamente sobre la contaminación final de los productos alimentarios elaborados a nivel industrial. Cuando se diseña una línea de fabricación, se siguen/adoptan los estándares generales recomendados por entes internacionales (FAO/OMS, 2020), las regulaciones locales y las guías/normas emitidas por organismos en las cuales participan expertos técnicos, con el fin de evitar o minimizar el riesgo de contaminación a través de factores como el aire, equipos y utensilios (superficies inertes), manipuladores (superficies vivas), entre otros. Dentro de estos factores, el aire representa una fuente potencial de contaminación, por lo que debe ser tratado adecuadamente a través de sistemas de filtración u otros previo a su ingreso a la fábrica, y también se debe de tener en cuenta la fuente desde donde se extrae y hacia donde se lleva (Brown & Wray, 2014; Masotti et al., 2019). Muchas de las contaminaciones en el producto final, asociadas a las denominadas “áreas críticas”, han sido a través de las fuentes de aire, en donde las cargas microbiológicas ambientales fueron muy altas y comprometieron la estabilidad microbiológica de los productos fabricados (Garnier et al., 2017; Odeyemi et al., 2020).

Las tres áreas de proceso que fueron evaluadas en esta investigación son de gran importancia en la fabricación de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos, debido a que representan los últimos puntos de probable contaminación ambiental directa sobre la bebida, justo antes del proceso de tapado. De acuerdo al plan establecido, los monitoreos microbiológicos ambientales de estas zonas fueron llevados a cabo semanalmente a lo largo de un año, siendo clasificados por estaciones (verano, otoño, invierno y primavera).

Los resultados mostraron que de forma global, en todas las áreas de proceso, las cargas fúngicas ambientales estuvieron en el rango de 0 – 100 UFC/m<sup>3</sup> de aire. Estos conteos son muy similares a los hallados en una investigación realizada por Beletsiotis et al. (2011) en una área de llenado de una fábrica de yogurt en Grecia (< 94 UFC/m<sup>3</sup> de aire), pero bajos en comparación a cargas ambientales encontradas en áreas críticas de otras líneas de elaboración de alimentos (zonas de llenado o donde el producto se encuentra expuesto justo antes del envasado). Por ejemplo, en un estudio llevado a cabo por García et al. (2019) en las áreas de enfriado de diversas panaderías localizadas en Santa María (RS, Brasil) se encontró que hubieron conteos de hongos ambientales entre  $2.4 \times 10^2$  a  $> 10^4$  UFC/m<sup>3</sup>, y en una

investigación realizada por Scaramuzza et al. (2015) en cuartos de envejecimiento de “Culatello” (producto cárnico italiano) se hallaron recuentos fúngicos entre 4.15 a 5.15 log UFC/m<sup>3</sup>.

A la fecha, no existe una especificación global relacionada a la carga microbiológica máxima permitida para los ambientes de proceso de alimentos, por lo que debe ser evaluada y determinada por cada industria, teniendo en cuenta aspectos tales como la naturaleza y la ecología microbiana del producto, así como también, su proceso de fabricación (Moberg & Kornacki, 2015; Ramos Guerrero et al., 2020). Así por ejemplo, un sistema de clasificación específico para la calidad microbiológica del aire de una fábrica de productos cárnicos ha sido propuesta por Al-Dagal y Fung (1993) basado en un monitoreo microbiológico ambiental de 28 semanas (antes y después de su ocupación para la fabricación). En esta clasificación se indican 3 categorías: bajo conteo (< 100 UFC/m<sup>3</sup>) relacionado a un lugar limpio, con una corta permanencia de la carne en los ambientes de proceso, con ventilación y menos tránsito de personas; conteo intermedio (> 100 UFC/m<sup>3</sup>) donde el ambiente cuenta con mayor número de personas y hay procesamiento de carnes; y alto conteo (> 300 UFC/m<sup>3</sup>) donde el ambiente presenta alto número de personas, animales vivos y presencia de polvo. Otro ejemplo, es la clasificación propuesta por Ramos Guerrero et al. (2020) para las cargas de mohos ambientales en una zona de llenado ubicada dentro de una línea de procesamiento de pulpas de frutas tropicales, en donde se estableció un conteo  $\leq 25$  UFC/Placa/15 minutos en la zona segura, de 26 – 50 UFC/Placa/15 minutos para la zona de precaución y > 50 UFC/Placa/15 minutos para la zona insegura, siendo estos valores establecidos después de realizar un monitoreo microbiológico ambiental por 3 años en dicha zona (n=156, con 1 muestra por semana) durante operaciones normales de fabricación. Recientemente, en una publicación realizada por García et al. (2019) se ha propuesto una clasificación para la calidad microbiológica (fúngica) del aire dirigida a la industria de panificación, el cual también puede ser de aplicación o guía para diversos productos que presentan mohos en sus superficies (quesos y carnes fermentadas, salchichas, entre otros). Esta clasificación, asociada también a la probabilidad de ocurrencia de deterioro temprano, muestra 4 niveles: 0 – 100 UFC/m<sup>3</sup> (limpio), 101 – 500 UFC/m<sup>3</sup> (aceptable, de baja contaminación), 501 – 1500 UFC/m<sup>3</sup> (aceptable, con una contaminación moderada), y > 1500 UFC/m<sup>3</sup> (altamente contaminado, siendo inaceptable).



Un conteo microbiológico igual a 0 UFC/m<sup>3</sup> de aire (< 1 UFC/m<sup>3</sup>) es el escenario ideal para las áreas de proceso en la industria de bebidas, por lo que siempre se busca estar lo más cercano a este valor. En las evaluaciones realizadas, el área de enjuagado de botellas durante el periodo de invierno fue el que presentó una mayor prevalencia (85.7%) en relación a valores de 0 UFC/m<sup>3</sup> de aire, mientras que el área de llenado durante el periodo de verano presentó la menor prevalencia (30.8%) (Tabla 8).

Cuando se evaluaron los resultados microbiológicos en las áreas por estaciones del año, se observó que en las tres áreas de proceso el menor porcentaje de valores iguales a 0 UFC/m<sup>3</sup> de aire se dio comúnmente en las estaciones de verano (30.8, 38.5 y 53.8% para las áreas de llenado, tapado y enjuagado de botellas, respectivamente). Durante esta estación hay más calor y sumado a la alta humedad relativa que se tiene en el Callao (mayor al 95%) y a la presencia de oxígeno, posibilitan la germinación y el desarrollo fúngico en los ambientes. Esto se ve reflejado en las cargas microbiológicas de los ambientes de proceso, debido a que hay menos valores con resultados de 0 UFC/m<sup>3</sup> de aire en esas semanas.

Por el contrario, el invierno permitió un mejor control de la carga microbiológica ambiental en las áreas de proceso evaluadas, obteniéndose muchos más conteos iguales a 0 UFC/m<sup>3</sup> de aire, lo que representa valores de prevalencia iguales a 78.6% para las áreas de tapado y llenado, y de 85.7% para el área de enjuagado de botellas. Definitivamente, el factor ambiental (estación del año) juega un rol importante e impacta sobre las cargas microbiológicas en los ambientes de las áreas de producción, siendo también demostrado en otros estudios realizados en productos lácteos (Beletsiotis et al., 2011). Esto tiene estrecha relación con el denominado “cambio climático”, el cual viene golpeando al mundo y es un factor a tener en cuenta en el deterioro de alimentos causado por microorganismos, principalmente en aquellos grupos de alimentos que son almacenados por largos periodos de tiempo (Misiou & Koutsoumanis, 2021). Temperaturas ambientales muy extremas, podrían generar conteos fúngicos indeseables en las áreas de proceso. Estudios realizados en otras líneas de producción han comprobado la influencia del factor climático sobre el grado de contaminación microbiológica en diversas matrices alimentarias, como por ejemplo en los vegetales (Ailes et al., 2008; Coroneo et al., 2010), por lo que la industria le debe prestar una especial atención y establecer medidas de mitigación/prevención, según corresponda.

El modelo estocástico desarrollado permitió estimar el nivel de contaminación fúngica en la bebida final, mostrando una diferencia entre los formatos evaluados (botellas PET de 500 y 750 ml). A pesar de tener el mismo tiempo de exposición y estar expuesto a la misma carga fúngica ambiental, el diámetro de la boca de la botella (más amplia para el formato PET de 750 ml) jugó un rol importante en la contaminación final. Una gran ventaja en la línea de producción evaluada es el corto tiempo que está configurado para que la bebida con adición de electrolitos esté expuesta justo antes del tapado (máximo 10 segundos). Esto permite cortos tiempos de contacto con el ambiente, disminuyendo probabilísticamente la posibilidad de que las esporas fúngicas ambientales ingresen al producto.

La probabilidad de contaminación fúngica estimada para la bebida no carbonatada con adición de electrolitos (tabla 25) es muy baja cuando es comparada a otros procesos de producción de alimentos. Por ejemplo, procesos de manufactura relacionados a productos de panificación, tienen alta probabilidad de que el producto se contamine con esporas fúngicas provenientes del ambiente, debido a que una de las etapas más críticas en su proceso es el enfriado, estando el producto expuesto al ambiente por tiempos muy prolongados antes de su empaclado. Así lo demuestra la investigación realizada por dos Santos (2015), en donde determinó probabilísticamente una contaminación final media de 1.86 log UFC/producto (panes integrales multigranos) tomando en cuenta tiempos de enfriamiento equivalente a 4800 segundos y un área de exposición de 0.02816 m<sup>2</sup>. Otros estudios realizados sobre pizza, carne en tajadas y salsas, han demostrado la influencia que tiene el área y el tiempo de exposición sobre la contaminación microbiológica final del producto, pero es importante destacar que también otros factores como el tipo de producto y las condiciones de fabricación influirán fuertemente en la contaminación final (den Aantrekker et al., 2003).

La naturaleza de las materias primas involucradas en la formulación del producto marca una gran diferencia en la contaminación ambiental (Bernardi, Garcia, et al., 2019; dos Santos et al., 2016). Las carnes y derivados, así como los vegetales y frutas presentan elevadas cargas microbiológicas debido a sus orígenes (Nguyen-the & Carlin, 1994; Yang, 2017) afectando directamente la aeromicrobiología de los ambientes de proceso (Al-Dagal & Fung, 1990). Por el contrario, los ingredientes de las bebidas con adición de electrolitos (azúcar, sales minerales, ácidos orgánicos, sabores concentrados) presentan cargas

microbiológicas muy bajas debido a su reducida actividad de agua y a sus procesos de producción, los cuales siguen los principios generales de higiene, las buenas prácticas de manufactura y el sistema HACCP, haciéndolos microbiológicamente muy estables (International Commission on Microbiological Specifications for Foods, 2011; Wojtczak et al., 2012). Esto permite una mejor calidad microbiológica del aire en el ambiente de proceso, disminuyendo el riesgo de contaminación.

De llegar al ambiente de proceso a través de las materias primas o del aire, las esporas fúngicas también pueden colonizar los equipos de manufactura, permaneciendo por un largo periodo de tiempo en los procesos de producción (Dijksterhuis, 2017). Así por ejemplo, *Galactomyces geotrichum*, mejor conocido como el “moho de la maquinaria”, puede originar contaminaciones post-tratamiento térmico en bebidas debido a su colonización en diversos equipos y ambientes de proceso (Cai & Snyder, 2019), al igual que las esporas de *Fusarium oxysporum* pueden dispersarse y llegar a colonizar llenadoras, tapadoras y túneles de enfriado (Ramos Guerrero, 2014; Rico-Munoz & dos Santos, 2019), causando deterioro en bebidas no carbonatadas industrializadas.

Al conocer la carga fúngica de los ambientes de proceso y las variables que la afectan directamente, es posible identificar y desarrollar estrategias para poder mejorar la calidad del aire en las áreas de fabricación (Brown & Wray, 2014; Holah et al., 1995). Entre las principales medidas que las industrias pueden implementar se encuentran: mejorar el diseño higiénico/layout de los ambientes de proceso, limitando por ejemplo, los accesos del personal, para conseguir menores flujos de aire y dispersión de las esporas; revisar el flujo y tipo de aire que ingresa a cada área fabricación, reduciendo de esta manera el ingreso inadecuado de mohos ambientales; y mejorar la higiene ambiental de acuerdo a la necesidad específica de la fábrica (Bernardi, Garcia, et al., 2019; Brown & Wray, 2014; Burfoot et al., 2000; Faille et al., 2018; Oliveira et al., 2020).

La higiene ambiental en la planta debe de considerar como primer punto la calidad microbiológica requerida para cada área de proceso, estableciéndose los límites adecuados. Después de ello, las cargas microbiológicas ambientales pueden disminuirse a través de métodos físicos (con calor, filtración e irradiación de luz UV), químicos (con desinfectantes aprobados para la industria de alimentos), o finalmente con una combinación de ellos

(Bernardi et al., 2018; Oliveira et al., 2020). Diversos principios activos incluidos en los desinfectantes industriales pueden ser efectivos frente a cepas microbianas patrones, las cuales son usadas en las pruebas de enfrentamiento microbiano o de desafío, sin embargo, pueden no presentar la misma efectividad para la microbiota propia de las áreas de proceso en cada industria. Así lo demuestra un estudio realizado sobre 11 cepas de mohos (*Aspergillus pseudoglaucus*, *Hyphopichia burtonii*, *Penicillium paneum* y *Penicillium roqueforti*) aisladas de productos de panificación (Bernardi, Stefanello, et al., 2019), en donde se evaluó la actividad antifúngica de 5 tipos de desinfectantes químicos usados comúnmente por la industria (ácido peracético (0.15, 1.5 y 3.0%), cloruro de benzalconio (0.3, 2.5 y 5.0%), hipoclorito de sodio (100, 1000 y 2000 ppm), amonio cuaternario (0.3, 2.5 y 5.0%) y biguanida en concentraciones de 2.0, 3.5 y 5.0 %), y cuyos resultados mostraron que el agente químico más efectivo fue el ácido peracético, mientras que el menos efectivo fue el hipoclorito de sodio y la que no presentó actividad antifúngica fue la biguanida a las concentraciones de uso evaluadas. Todos estos aspectos son de aplicación directa para la industria de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos, los cuales deben ser considerados para poder reducir la carga ambiental de las áreas de enjuagado de botellas, llenado y tapado.

El deterioro fúngico es expresado matemáticamente a través de dos probabilidades: la primera está directamente relacionada con la contaminación que se puede generar en la fábrica, es decir la probabilidad que al menos 1 espora fúngica llegue al producto final (bebida) durante el proceso de fabricación; mientras que la segunda probabilidad se relaciona con que esa espora que ya está dentro del producto pueda germinar y desarrollarse hasta formar un micelio visible, el cual normalmente está suspendido en la bebida y es detectado por el consumidor cuando alcanza un diámetro mayor o igual a 3 mm (Dagnas & Membre, 2013; Gougouli et al., 2011; J. M. Membre & Dagnas, 2016). La investigación desarrollada contempló la primera probabilidad, determinando que para la bebida no carbonatada con adición de electrolitos envasada en botellas PET de 500 ml con tapa 33 mm, hay un nivel de contaminación media de 0.0001708 UFC/producto (1708 de cada 10 000 000 productos presentarán contaminación con al menos 1 espora fúngica), aumentando esta probabilidad de contaminación a 0.0002148 UFC/producto (2148 de cada 10 000 000 productos) si el envase cambia a botella PET de 750 ml con tapa 38 mm. Esta investigación puede relacionarse

directamente al estudio realizado por Ramos Guerrero (2014), en el cual se cuantificó la probabilidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en este tipo de bebidas, bajo 2 concentraciones de inóculo ( $10^0$  y  $10^1$  esporas/100 ml de producto) y 2 temperaturas de almacenamiento (20 y 30 °C). De esta manera, matemáticamente la probabilidad global del deterioro fúngico en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos podría ser calculada y la fábrica podría tomar nuevas medidas preventivas para poder disminuir el riesgo de contaminación final en las bebidas, según nuevos objetivos.

## **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## Conclusiones

1. Las cargas fúngicas ambientales de las áreas de enjuagado de botellas, llenado y tapado de la línea de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos no superaron el valor de 100 UFC/m<sup>3</sup> de aire, considerándose cargas microbiológicas muy bajas en comparación a otras industrias de alimentos como las de panificación y productos cárnicos.
2. Al realizar las pruebas estadísticas de comparación entre las cargas fúngicas ambientales de las áreas de proceso, se evidenció que hay una diferencia significativa (95% de confianza) entre las áreas de enjuagado de botellas y llenado durante el periodo de invierno. Así mismo, no hubo evidencia significativa para demostrar que las cargas fúngicas ambientales de las áreas de enjuagado de botellas, llenado y tapado en el periodo de verano son diferentes entre sí.
3. El modelo estocástico desarrollado permitió estimar la probabilidad de contaminación fúngica en las bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos, tomando en cuenta las dimensiones de su empaque primario (diámetro de las bocas de las botellas PET de 500 y 750 ml para calcular el área de exposición) y las características intrínsecas de su proceso (tiempo de exposición, carga fúngica ambiental y la velocidad de sedimentación de las esporas fúngicas), generando una herramienta de gran valor para los gestores de calidad e inocuidad en la planta de fabricación.
4. Basado en el criterio de información de Akaike (AIC) los datos de las cargas fúngicas ambientales de las 3 áreas de proceso evaluadas se ajustaron mejor a una distribución de tipo binomial negativa.
5. Mediante un análisis de sensibilidad de tipo tornado fue posible identificar que la concentración/carga de mohos en el aire y la velocidad de sedimentación fueron las variables más relevantes sobre la probabilidad de contaminación fúngica estimada en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.

## Recomendaciones

1. Teniendo en cuenta que las cargas fúngicas ambientales fueron más altas durante la estación de verano, se recomienda que la fábrica adopte nuevos procedimientos de desinfección en las áreas de enjuagado de botellas, llenado y tapado, utilizando químicos alternativos y evaluando intervalos de aplicación para disminuir eficientemente la carga microbiológica ambiental en ese periodo del año.
2. Considerando que solo las cargas fúngicas ambientales provenientes de las áreas de enjuagado de botellas y llenado medidas durante el periodo de invierno fueron significativamente diferentes entre sí, es recomendable realizar nuevos conteos microbiológicos en esas zonas, con la finalidad de verificar si al aumentar la cantidad de datos, las cargas llegan a ser iguales estadísticamente en dicha época. Esto, basado en la premisa que esas áreas se encuentran bajo las mismas condiciones de proceso (dentro de una cabina con filtración tipo HEPA).
3. Es recomendable evaluar el desarrollo de un modelo estocástico alternativo para esta línea de producción de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos, en donde se incorpore la estación del año como variable, debido a que las cargas microbiológicas ambientales podrían llevar a un nivel de contaminación fúngica mayor en el producto final durante la estación de verano, siendo menores en otras épocas del año.
4. El modelo desarrollado podría ser más específico teniendo en cuenta un estudio llevado a cabo en los ambientes de las áreas de proceso en donde se identifique el género y especie fúngica que predomina y que pueda generar algún tipo de deterioro en la bebida final.



## **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Abdallah, M. F., Audenaert, K., Lust, L., Landschoot, S., Bekaert, B., Haesaert, G., De Boevre, M., & De Saeger, S. (2020). Risk characterization and quantification of mycotoxins and their producing fungi in sugarcane juice: A neglected problem in a widely-consumed traditional beverage. *Food Control*, *108*, 106811. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2019.106811>
- Ailes, E. C., Leon, J. S., Jaykus, L. A., Johnston, L. M., Clayton, H. A., Blanding, S., Kleinbaum, D. G., Backer, L. C., & Moe, C. L. (2008). Microbial concentrations on fresh produce are affected by postharvest processing, importation, and season. *Journal of Food Protection*, *71*(12), 2389–2397. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.12.2389>
- Al-Dagal, M., & Fung, D. Y. C. (1990). Aeromicrobiology — A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *29*(5), 333–340. <https://doi.org/10.1080/10408399009527531>
- Al-Dagal, M., & Fung, D. Y. C. (1993). Aeromicrobiology: An assessment of a new meat research complex. *Journal of Environmental Health*, *56*(1), 7–14. <https://www.jstor.org/stable/44534538>
- Albert, I., Pouillot, R., & Denis, J. B. (2005). Stochastically modeling *Listeria monocytogenes* growth in farm tank milk. *Risk Analysis*, *25*(5), 1171–1185. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2005.00665.x>
- Amendola, C., Iannilli, I., Restuccia, D., Santini, I., & Vinci, G. (2004). Multivariate statistical analysis comparing sport and energy drinks. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *5*(2), 263–267. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.01.006>
- Arroyo-López, F. N., Bautista Gallego, J., Valero, A., García-Gimeno, R. M., & Garrido Fernández, A. (2014). Predictive Microbiology: A Valuable Tool in Food Safety and Microbiological Risk Assessments. In R. Bhat & V. M. Gómez-López (Eds.), *Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions* (pp. 517–534). Wiley-Blackwell. <https://doi.org/10.1002/9781118474563.ch25>
- Azeredo, D. R. P., Alvarenga, V., Sant’Ana, A. S., & Sabaa Srur, A. U. O. (2016). An overview of microorganisms and factors contributing for the microbial stability of

- carbonated soft drinks. *Food Research International*, 82(April), 136–144.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.01.024>
- Aziza, F., Mettler, E., Daudin, J. J., & Sanaa, M. (2006). Stochastic, compartmental, and dynamic modeling of cross-contamination during mechanical smearing of cheeses. *Risk Analysis*, 26(3), 731–745. <https://doi.org/10.1111/j.1539-6924.2006.00758.x>
- Baranyi, J., & Tamplin, M. L. (2004). ComBase: a common database on microbial responses to food environments. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1967–1971.  
<https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.9.1967>
- Beletsiotis, E., Ghikas, D., & Kalantzi, K. (2011). Incorporation of microbiological and molecular methods in HACCP monitoring scheme of molds and yeasts in a Greek dairy plant: A case study. *Procedia Food Science*, 1, 1051–1059.  
<https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.157>
- Bernardi, A. O., Garcia, M. V., & Copetti, M. V. (2019). Food industry spoilage fungi control through facility sanitization. *Current Opinion in Food Science*, 29, 28–34.  
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.07.006>
- Bernardi, A. O., Stefanello, A., Garcia, M. V., Parussolo, G., Stefanello, R. F., Moro, C. B., & Copetti, M. V. (2018). Efficacy of commercial sanitizers against fungi of concern in the food industry. *LWT - Food Science and Technology*, 97(June), 25–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.037>
- Bernardi, A. O., Stefanello, A., Lemos, J. G., Garcia, M. V., & Copetti, M. V. (2019). Antifungal activity of commercial sanitizers against strains of *Penicillium roqueforti*, *Penicillium paneum*, *Hyphopichia burtonii*, and *Aspergillus pseudoglaucus*: Bakery spoilage fungi. *Food Microbiology*, 83(October 2018), 59–63.  
<https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.04.005>
- Brown, K. L., & Wray, S. (2014). Control of airborne contamination in food processing. In H. L. M. Lelieveld, J. T. Holah, & D. Napper (Eds.), *Hygiene in Food Processing: Principles and Practice* (2nd ed., pp. 174–202). Woodhead Publishing Limited.  
<https://doi.org/10.1533/9780857098634.2.174>

- Buchanan, R. L. (1990). Using Spreadsheet Software for Predictive Microbiology Applications. *Journal of Food Safety*, 11(2), 123–134. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.1990.tb00045.x>
- Burfoot, D., Brown, K., Xu, Y., Reavell, S. V., & Hall, K. (2000). Localised air delivery systems in the food industry. *Trends in Food Science and Technology*, 11(11), 410–418. [https://doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00021-8](https://doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00021-8)
- Burgain, A., Bensoussan, M., & Dantigny, P. (2013). Effect of inoculum size and water activity on the time to visible growth of *Penicillium chrysogenum* colony. *International Journal of Food Microbiology*, 163(2–3), 180–183. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.021>
- Cai, S., & Snyder, A. B. (2019). Machinery mold (*Galactomyces geotrichum*) survival following thermal and hydrostatic pressure processing. *Journal of Food Protection*, 82(6), 1034–1038. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-568>
- Coroneo, V., Sanna, A., Danjou, F., Caboni, P., & Dessì, S. (2010). Influence of season on microbiological loads in ready-to-eat vegetables. *Italian Journal of Food Science*, 22(2), 205–209.
- Cummins, E. (2016). Quantifying microbial propagation. In J.-M. Membré & V. Valdramidis (Eds.), *Modeling in Food Microbiology: From Predictive Microbiology to Exposure Assessment* (pp. 17–31). ISTE Press, Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-155-0.50002-2>
- Da Silva, P. R. S., Tessaro, I. C., & Marczak, L. D. F. (2013). Integrating a kinetic microbial model with a heat transfer model to predict *Byssoschlamys fulva* growth in refrigerated papaya pulp. *Journal of Food Engineering*, 118(3), 279–288. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.04.014>
- Dagnas, S., & Membré, J.-M. (2013). Predicting and Preventing Mold Spoilage of Food Products. *Journal of Food Protection*, 76(3), 538–551. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-349>
- Dalgaard, P. (1995). Modelling of microbial activity and prediction of shelf life for packed

- fresh fish. *International Journal of Food Microbiology*, 26(3), 305–317.  
[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00136-T](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)00136-T)
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., & McMeekin, T. a. (1994). Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology*, 23(3–4), 391–404.  
[https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90165-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90165-1)
- Dantigny, P. (2016). Relevant issues in predictive mycology. *Current Opinion in Food Science*, 11, 29–33. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2016.08.011>
- Dantigny, P. (2021). Applications of predictive modeling techniques to fungal growth in foods. *Current Opinion in Food Science*, 38, 86–90.  
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.10.028>
- Dantigny, P., & Nanguy, S. P.-M. (2009). Significance of the physiological state of fungal spores. *International Journal of Food Microbiology*, 134(1–2), 16–20.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.02.005>
- Dantigny, P., Tchobanov, I., Bensoussan, M., & Zwietering, M. H. (2005). Modeling the effect of ethanol vapor on the germination time of *Penicillium chrysogenum*. *Journal of Food Protection*, 68(6), 1203–1207. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-68.6.1203>
- Danyluk, M. D., Harris, L. J., & Schaffner, D. W. (2006). Monte Carlo simulations assessing the risk of salmonellosis from consumption of almonds. *Journal of Food Protection*, 69(7), 1594–1599. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-69.7.1594>
- den Aantrekker, E. D., Beumer, R. R., Van Gerwen, S. J. C., Zwietering, M. H., Van Schothorst, M., & Boom, R. M. (2003). Estimating the probability of recontamination via the air using Monte Carlo simulations. *International Journal of Food Microbiology*, 87(1–2), 1–15. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00041-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00041-2)
- Dijksterhuis, J. (2017). The fungal spore and food spoilage. *Current Opinion in Food Science*, 17, 68–74. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.10.006>
- Dijksterhuis, J. (2019). Fungal spores: Highly variable and stress-resistant vehicles for distribution and spoilage. *Food Microbiology*, 81(November 2018), 2–11.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.11.006>

dos Santos, J. L. P. (2015). *Modelagem Preditiva da Deterioração de Pães Integrais Multigrãos por Fungos Filamentosos* [Dissertação para obtenção do título do Mestre em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas]. [http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/254423/1/Santos\\_JulianaLanePaixa\\_o\\_M.pdf](http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/254423/1/Santos_JulianaLanePaixa_o_M.pdf)

dos Santos, J. L. P., Bernardi, A. O., Pozza Morassi, L. L., Silva, B. S., Copetti, M. V., & Sant'Ana, A. (2016). Incidence, populations and diversity of fungi from raw materials, final products and air of processing environment of multigrain whole meal bread. *Food Research International*, *87*, 103–108. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.07.002>

dos Santos, J. L. P., Samapundo, S., Biyikli, A., Van Impe, J., Akkermans, S., Höfte, M., Abatih, E. N., Sant'Ana, A. S., & Devlieghere, F. (2018). Occurrence, distribution and contamination levels of heat-resistant moulds throughout the processing of pasteurized high-acid fruit products. *International Journal of Food Microbiology*, *281*, 72–81. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.05.019>

Duffy, S., & Schaffner, D. W. (2001). Modeling the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in apple cider using probability distribution functions for quantitative risk assessment. *Journal of Food Protection*, *64*(5), 599–605. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.5.599>

Faille, C., Cunault, C., Dubois, T., & Bénézech, T. (2018). Hygienic design of food processing lines to mitigate the risk of bacterial food contamination with respect to environmental concerns. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, *46*(April), 65–73. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2017.10.002>

FAO/OMS. (2014). CAC/GL 30-1999. Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk assessment. *Codex Alimentarius*, 1–5.

FAO/OMS. (2020). CXC 1-1969 Principios generales de higiene de los alimentos. *Codex Alimentarius*, 1–39.

Filtborg, O., Frisvad, J. C., & Thrane, U. (1996). Moulds in food spoilage. *International*

*Journal of Food Microbiology*, 33(1), 85–102. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01153-1](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01153-1)

Finger, J. A. F. F., Lima, E. M. F., Coelho, K. S., Behrens, J. H., Landgraf, M., Franco, B. D. G. M., & Pinto, U. M. (2021). Adherence to food hygiene and personal protection recommendations for prevention of COVID-19. *Trends in Food Science and Technology*, 112(June), 847–852. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.016>

Garcia, M. V., Bregão, A. S., Parussolo, G., Bernardi, A. O., Stefanello, A., & Copetti, M. V. (2019). Incidence of spoilage fungi in the air of bakeries with different hygienic status. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 254–261. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.022>

Garnier, L., Valence, F., Pawtowski, A., Auhustsinava-Galerie, L., Frotté, N., Baroncelli, R., Deniel, F., Coton, E., & Mounier, J. (2017). Diversity of spoilage fungi associated with various French dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 241, 191–197. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.026>

Giannuzzi, L., Pinotti, A., & Zaritzky, N. (1998). Mathematical modelling of microbial growth in packaged refrigerated beef stored at different temperatures. *International Journal of Food Microbiology*, 39, 101–110. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(97\)00127-X](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(97)00127-X)

Gkogka, E., Reij, M. W., Gorris, L. G. M., & Zwietering, M. H. (2013). Risk assessment strategies as a tool in the application of the Appropriate Level of Protection (ALOP) and Food Safety Objective (FSO) by risk managers. *International Journal of Food Microbiology*, 167(1), 8–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.013>

González, S. C., Possas, A., Carrasco, E., Valero, A., Bolívar, A., Posada-Izquierdo, G. D., García-Gimeno, R. M., Zurera, G., & Pérez-Rodríguez, F. (2019). ‘MicroHibro’: A software tool for predictive microbiology and microbial risk assessment in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 290, 226–236. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.10.007>

Gordon, A. (2017). Case study: addressing the problem of *Alicyclobacillus* in tropical

- beverages. In *Food Safety and Quality Systems in Developing Countries* (pp. 245–276). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801226-0/00009-8>
- Gougouli, M., Kalantzi, K., Beletsiotis, E., & Koutsoumanis, K. P. (2011). Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production. *Food Microbiology*, 28(8), 1453–1462. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2011.07.006>
- Gougouli, M., & Koutsoumanis, K. P. (2013). Primary models for fungal growth. In Philippe Dantigny & E. Z. Panagou (Eds.), *Predictive Mycology* (pp. 63–130). Nova Science Publishers, Inc.
- Gougouli, M., & Koutsoumanis, K. P. (2017). Risk assessment of fungal spoilage: A case study of *Aspergillus niger* on yogurt. *Food Microbiology*, 65, 264–273. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.009>
- Gram, L., Ravn, L., Rasch, M., Bruhn, J. B., Christensen, A. B., & Givskov, M. (2002). Food spoilage-interactions between food spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 78(1–2), 79–97. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(02\)00233-7](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(02)00233-7)
- Guiné, R. P. F., Florença, S. G., Barroca, M. J., & Anjos, O. (2020). The link between the consumer and the innovations in food product development. *Foods*, 9(9), 1317. <https://doi.org/10.3390/foods9091317>
- Hernández, A., Pérez-Navado, F., Ruiz-Moyano, S., Serradilla, M. J., Villalobos, M. C., Martín, A., & Córdoba, M. G. (2018). Spoilage yeasts: What are the sources of contamination of foods and beverages? *International Journal of Food Microbiology*, 286(July), 98–110. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.031>
- Holah, J. T., Hall, K. E., Holder, J., Rogers, S. J., Taylor, J., & Brown, K. L. (1995). *R&D Report N° 12 - Airborne microorganism levels in food processing environments* (Issue June).
- Huis In't Veld, J. H. J. (1996). Microbial and biochemical spoilage of foods: An overview. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01139-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01139-7)



- Instituto Nacional de Calidad. (2018). *NTP 103.001:2018. Bebidas con adición de electrolitos. Requisitos* (pp. 1–14). Instituto Nacional de la Calidad (INACAL), Lima, Perú.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods. (2011). *Microorganisms in foods 8: Use of data for assessing process control and product acceptance*. Springer Science+Business Media, LLC. <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-9374-8>
- Jarvis, B. (2014). Statistical approaches to the analysis of microbiological data. In D. Granato & A. Gastón (Eds.), *Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology* (1st ed., pp. 249–284). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118434635.ch15>
- Jarvis, B. (2016). Frequency distributions. In B. Jarvis (Ed.), *Statistical Aspects of the Microbiological Examination of Foods* (3rd ed., pp. 13–45). Academic Press, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803973-1.00003-6>
- Kemp, S. E. (2013). Consumers as part of food and beverage industry innovation. In M. Garcia Martinez (Ed.), *Open Innovation in the Food and Beverage Industry* (pp. 109–138). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9780857097248.2.109>
- Lambertini, E., Barouei, J., Schaffner, D. W., Danyluk, M. D., & Harris, L. J. (2017). Modeling the risk of salmonellosis from consumption of pistachios produced and consumed in the United States. *Food Microbiology*, 67, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.06.003>
- Lawlor, K. A., & Leighton, S. J. (2015). Ready-to-Drink Beverages. In Y. Salfinger & M. Lou Tortorello (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (5th ed., pp. 779–789). American Public Health Association. <https://doi.org/doi:10.2105/MBEF.0222.064>
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6)

- Lemos, J. G., Garcia, M. V., de Oliveira Mello, R., & Copetti, M. V. (2018). Consumers complaints about moldy foods in a Brazilian website. *Food Control*, 92(May), 380–385. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.05.017>
- Li, H., Xie, G., & Edmondson, A. S. (2008). Review of secondary mathematical models of predictive microbiology. *Journal of Food Products Marketing*, 14(2), 57–74. <https://doi.org/10.1080/10454440801918283>
- Lindqvist, R., & Westöö, A. (2000). Quantitative risk assessment for *Listeria monocytogenes* in smoked or gravad salmon and rainbow trout in Sweden. *International Journal of Food Microbiology*, 58, 181–196. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00272-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00272-5)
- Marín, S., Freire, L., Femenias, A., & Sant’Ana, A. S. (2021). Use of predictive modelling as tool for prevention of fungal spoilage at different points of the food chain. *Current Opinion in Food Science*, 41, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.02.006>
- Marks, H., & Coleman, M. (1998). Estimating distributions of numbers of organisms in food products. *Journal of Food Protection*, 61(11), 1535–1540. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.11.1535>
- Masotti, F., Cattaneo, S., Stuknyte, M., & De Noni, I. (2019). Airborne contamination in the food industry: An update on monitoring and disinfection techniques of air. *Trends in Food Science and Technology*, 90(June), 147–156. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.06.006>
- Mataragas, M., Zwietering, M. H., Skandamis, P. N., & Drosinos, E. H. (2010). Quantitative microbiological risk assessment as a tool to obtain useful information for risk managers — Specific application to *Listeria monocytogenes* and ready-to-eat meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S170–S179. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.005>
- Maughan, R. J. (2009). Sports beverages for optimising physical performance. In *Functional and Speciality Beverage Technology* (pp. 346–369). Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845695569.3.346>
- Maughan, R., & Murray, R. (2001). *Sports drinks: Basic Science and Practical Aspects*. CRC

Press LLC. <https://doi.org/10.1201/9781420037180>

McCartney, A., & West, J. (2007). Dispersal of fungal spores through the air. In J. Dijksterhuis & R. A. Samson (Eds.), *Food mycology: A multifaceted approach to fungi and food* (pp. 65–81). CRC Press, Taylor & Francis Group. <https://doi.org/10.1201/9781420020984.ch4>

McKellar, R. C., & Lu, X. (2004). *Modeling Microbial Responses in Foods* (1st ed.). CRC Press, LLC. <https://doi.org/10.1201/9780203503942>

McKellar, R., & Lu, X. (2005). Development of a global stochastic model relating the distribution of individual cell and population physiological states. *International Journal of Food Microbiology*, *100*(1–3), 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.10.019>

McMeekin, T. A., Mellefont, L. A., & Ross, T. (2007). Predictive microbiology: Past, present and future. In S. Brul, S. Van Gerwen, & M. H. Zwietering (Eds.), *Modelling Microorganisms in Food*. Woodhead Publishing Limited. <https://doi.org/10.1533/9781845692940.1.7>

McMeekin, T. A., & Ross, T. (1996). Shelf life prediction: status and future possibilities. *International Journal of Food Microbiology*, *33*(1), 65–83.

Membré, J.-M. (2016). Microbiological risk assessments in food industry. In P. Kotzekidou (Ed.), *Food Hygiene and Toxicology in Ready-to-Eat Foods* (pp. 337–350). Academic Press, Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801916-0.00019-4>

Membré, J.-M., & Boué, G. (2018). Quantitative microbiological risk assessment in food industry: Theory and practical application. *Food Research International*, *106*, 1132–1139. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.025>

Membré, J.-M., & Lambert, R. J. W. (2008). Application of predictive modelling techniques in industry: From food design up to risk assessment. *International Journal of Food Microbiology*, *128*(1), 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.07.006>

Membré, J. M., & Dagnas, S. (2016). Modeling microbial responses: Application to food spoilage. In J.-M. Membré & V. Valdramidis (Eds.), *Modeling in Food Microbiology:*

- From Predictive Microbiology to Exposure Assessment* (pp. 33–60). ISTE Press, Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-155-0.50003-4>
- Misiou, O., & Koutsoumanis, K. (2021). Climate change and its implications for food safety and spoilage. *Trends in Food Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.031>
- Moberg, L., & Kornacki, J. L. (2015). Microbiological Monitoring of the Food Processing Environment. In Y. Salfinger & M. Lou Tortorello (Eds.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods* (5th ed., pp. 27–43). American Public Health Association. <https://doi.org/10.2105/mbef.0222.008>
- Nauta, M. J., Andersen, R., Pilegaard, K., Pires, S. M., Ravn-Haren, G., Tetens, I., & Poulsen, M. (2018). Meeting the challenges in the development of risk-benefit assessment of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 76, 90–100. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.04.004>
- Nguyen-the, C., & Carlin, F. (1994). The microbiology of minimally processed fresh fruits and vegetables. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 34(4), 371–401. <https://doi.org/10.1080/10408399409527668>
- Odeyemi, O. A., Alegbeleye, O. O., Strateva, M., & Stratev, D. (2020). Understanding spoilage microbial community and spoilage mechanisms in foods of animal origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(2), 311–331. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12526>
- Ohnishi, T., Goto, K., Kanda, T., Kanazawa, Y., Ozawa, K., Sugiyama, K., Watanabe, M., Konuma, H., & Hara-Kudo, Y. (2013). Microbial contamination associated with consumption and the growth in plastic bottled beverage. *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, 48(7), 781–790. <https://doi.org/10.1080/10934529.2013.744647>
- Oliveira, M., Tiwari, B. K., & Duffy, G. (2020). Emerging technologies for aerial decontamination of food storage environments to eliminate microbial cross-contamination. *Foods*, 9(12), 1779. <https://doi.org/10.3390/foods9121779>

- Organización Panamericana de la Salud, (O.P.S.). (2021). *Evaluación de riesgos microbiológicos en alimentos: Guía para implementación en los países*. Organización Panamericana de la Salud. <https://www.paho.org/es/documentos/evaluacion-riesgos-microbiologicos-alimentos-guia-para-implementacion-paises>
- Panagou, E. Z., & Nychas, G.-J. E. (2008). Dynamic modeling of *Listeria monocytogenes* growth in pasteurized vanilla cream after postprocessing contamination. *Journal of Food Protection*, 71(9), 1828–1834. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-71.9.1828>
- Raizel, R., Coqueiro, A. Y., Bonvini, A., & Tirapegui, J. (2019). Sports and energy drinks: Aspects to consider. In C. A. Batt & M. Lou Tortorello (Eds.), *Sports and Energy Drinks: Volume 10: The Science of Beverages* (pp. 1–37). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815851-7.00001-2>
- Ramos Guerrero, F. G. (2014). *Modelamiento del deterioro de la bebida isotónica sabor mandarina causado por Fusarium oxysporum, usando el modelo logístico de la microbiología predictiva* [Tesis para optar al título profesional de Químico Farmacéutico, Universidad Nacional Mayor de San Marcos]. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/3799>
- Ramos Guerrero, F. G., Rodrigues, R. da S., López Flores, B. C., & Ramos Gorbeña, J. C. (2020). Padrões propostos para a carga ambiental de micro-organismos indicadores de uma área crítica de processo de polpa de frutas. In C. Severo (Ed.), *Anais 7º do congresso brasileiro de segurança alimentar [livro eletrônico]*. Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos - Seção Regional do R.G.S. [http://schenautomacao.com.br/ssa7/envio/files/trabalho3\\_150.pdf](http://schenautomacao.com.br/ssa7/envio/files/trabalho3_150.pdf)
- Rico-Munoz, E., & dos Santos, J. L. P. (2019). The fungal problem in thermal processed beverages. *Current Opinion in Food Science*, 29(August), 80–87. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.08.003>
- Ross, T. (1993). Bělehrádek-type models. *Journal of Industrial Microbiology*, 12, 180–189. <https://doi.org/10.1007/BF01584188>
- Ross, T., & McMeekin, T. A. (1994). Predictive microbiology. *International Journal of Food*

*Microbiology*, 23, 241–264. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)90155-4](https://doi.org/10.1016/0168-1605(94)90155-4)

- Ross, T., McMeekin, T. A., & Baranyi, J. (2014). Predictive Microbiology and Food Safety. In C. A. Batt & M. Lou Tortorello (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology* (2nd ed., Vol. 3, pp. 59–68). Elsevier, Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00256-1>
- Rosso, L., & Robinson, T. P. (2001). A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. *International Journal of Food Microbiology*, 63(3), 265–273. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00469-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00469-4)
- Sant’Ana, A. de S. (2007). *Avaliação quantitativa do risco da patulina em suco de maçã* [Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas]. <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/255414>
- Sant’Ana, A. S., Rosenthal, A., & Massaguer, P. R. (2009). Heat resistance and the effects of continuous pasteurization on the inactivation of *Byssochlamys fulva* ascospores in clarified apple juice. *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), 197–209. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04195.x>
- Sant’Ana, A. de S., Dantigny, P., Tahara, A. C., Rosenthal, A., & Massaguer, P. R. (2010). Use of a logistic model to assess spoilage by *Byssochlamys fulva* in clarified apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 137(2–3), 299–302. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.029>
- Sant’Ana, A. de S., Rosenthal, A., & Massaguer, P. R. (2008). The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Research International*, 41(5), 441–453. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.001>
- Scaramuzza, N., Diaferia, C., & Berni, E. (2015). Monitoring the mycobiota of three plants manufacturing *Culatello* (a typical Italian meat product). *International Journal of Food Microbiology*, 203, 78–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.034>
- Shephard, R. J. (2019). Factors influencing the optimal choice of sports beverages. In *Sports and Energy Drinks: Volume 10: The Science of Beverages* (pp. 131–159). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815851-7.00004-8>

- Silva, A. R., Sant'Ana, A. S., & Massaguer, P. R. (2010). Modelling the lag time and growth rate of *Aspergillus section Nigri* IOC 4573 in mango nectar as a function of temperature and pH. *Journal of Applied Microbiology*, *109*(3), 1105–1116. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04803.x>
- Slongo, A. P., & Aragão, G. M. F. (2006). Factors affecting the thermal activation of *Neosartorya fischeri* in pineapple and papaya nectars. *Brazilian Journal of Microbiology*, *37*(3), 312–316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300021>
- Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2018a). Fungal spoilage in food processing. *Journal of Food Protection*, *81*(6), 1035–1040. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-18-031>
- Snyder, A. B., & Worobo, R. W. (2018b). The incidence and impact of microbial spoilage in the production of fruit and vegetable juices as reported by juice manufacturers. *Food Control*, *85*, 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.09.025>
- Tireki, S. (2021). A review on packed non-alcoholic beverages: Ingredients, production, trends and future opportunities for functional product development. *Trends in Food Science and Technology*, *112*(June), 442–454. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.03.058>
- Tremarin, A., Longhi, D. A., Salomão, B. D. C. M., & Aragão, G. M. F. (2015). Modeling the growth of *Byssochlamys fulva* and *Neosartorya fischeri* on solidified apple juice by measuring colony diameter and ergosterol content. *International Journal of Food Microbiology*, *193*, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.006>
- Trienekens, J., & Zuurbier, P. (2008). Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges. *International Journal of Production Economics*, *113*(1), 107–122. <https://doi.org/10.1016/j.ijpe.2007.02.050>
- van den Brule, T., Lee, C. L. S., Houbraken, J., Haas, P.-J., Wösten, H., & Dijksterhuis, J. (2020). Conidial heat resistance of various strains of the food spoilage fungus *Paecilomyces variotii* correlates with mean spore size, spore shape and size distribution. *Food Research International*, *137*(November), 109514.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109514>

van den Brule, T., Punt, M., Teertstra, W., Houbraken, J., Wösten, H., & Dijksterhuis, J. (2020). The most heat-resistant conidia observed to date are formed by distinct strains of *Paecilomyces variotii*. *Environmental Microbiology*, 22(3), 986–999. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14791>

Vose, D. J. (1998). The application of quantitative risk assessment to microbial food safety. *Journal of Food Protection*, 61(5), 640–648. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.5.640>

Whiting, R. C., & Buchanan, R. L. (1993). Letter to the Editor. A classification of models in predictive microbiology - a reply to K.R. Davey. *Food Microbiology*, 10(2), 175–177. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/fmic.1993.1017>

Whyte, W., & Eaton, T. (2004). Microbiological contamination models for use in risk assessment during pharmaceutical production. *European Journal of Parenteral and Pharmaceutical Sciences*, 9(1), 11–15.

Wojtczak, M., Biernasiak, J., & Papiewska, A. (2012). Evaluation of microbiological purity of raw and refined white cane sugar. *Food Control*, 25(1), 136–139. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.10.031>

Wyatt, T. T., Wösten, H. A. B., & Dijksterhuis, J. (2013). Fungal spores for dispersion in space and time. In *Advances in Applied Microbiology* (1st ed., Vol. 85). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-407672-3.00002-2>

Yang, X. (2017). Microbial ecology of beef carcasses and beef products. In A. de S. Sant´Ana (Ed.), *Quantitative microbiology in food processing: Modeling the microbial ecology* (pp. 442–462). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118823071.ch22>

Zimmermann, M., Massaguer, P. R., & Aragão, G. M. F. (2013). *Byssoschlamys nivea* growth in papaya juice as influenced by water activity and ascospore age. *Focusing on Modern Food Industry*, 2(1), 17–25.



Zimmermann, M., Miorelli, S., Massaguer, P. R., & Aragão, G. M. F. (2011). Modeling the influence of water activity and ascospore age on the growth of *Neosartorya fischeri* in



pineapple juice. *LWT - Food Science and Technology*, 44(1), 239–243.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.034>

## **ANEXOS**

## Anexo 1. Declaración de autenticidad

	<b>Universidad Ricardo Palma</b>	<b>Escuela de Posgrado</b>
<b>DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD Y NO PLAGIO</b>		
<b>DECLARACIÓN DEL GRADUANDO</b>		
Por el presente, el graduando:		
<b>Ramos Guerrero, Félix Giovanni</b>		
en condición de egresado del Programa de Posgrado:		
<b>Maestría en Sistemas de Gestión de la Calidad e Inocuidad en la Industria Alimentaria</b>		
deja constancia que ha elaborado la tesis intitulada		
<b>"Uso de modelamiento estocástico para estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos"</b>		
<p>Declara que el presente trabajo de tesis ha sido elaborado por el mismo y no existe plagio/copia de ninguna naturaleza, en especial de otro documento de investigación (tesis, revista, texto, congreso, o similar) presentado por cualquier persona natural o jurídica ante cualquier institución académica, de investigación, profesional o similar.</p> <p>Deja constancia que las citas de otros autores han sido debidamente identificadas en el trabajo de investigación, por lo que no ha asumido como suyas las opiniones vertidas por terceros, ya sea de fuentes encontradas en medios escritos, digitales o de la internet.</p> <p>Asimismo, ratifica que es plenamente consciente de todo el contenido de la tesis y asume la responsabilidad de cualquier error u omisión en el documento y es consciente de las connotaciones éticas y legales involucradas.</p> <p>En caso de incumplimiento de esta declaración, el graduando se somete a lo dispuesto en las normas de la Universidad Ricardo Palma y los dispositivos legales vigentes.</p>		
	<b>Félix Giovanni Ramos Guerrero</b> DNI: 41208516	<b>28 de enero de 2021</b>
Firma del graduando		Fecha

## Anexo 2. Autorización de consentimiento para realizar la investigación

	<b>Universidad Ricardo Palma</b>	<b>Escuela de Posgrado</b>
<b>AUTORIZACIÓN PARA REALIZAR LA INVESTIGACIÓN</b>		
<b>DECLARACIÓN DEL RESPONSABLE DEL ÁREA O DEPENDENCIA DONDE SE REALIZARÁ LA INVESTIGACIÓN</b>		
Dejo constancia que el área o dependencia que dirijo, ha tomado conocimiento del proyecto de tesis titulado:		
"Uso de modelamiento estocástico para estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos"		
el mismo que es realizado por el Sr. Estudiante:		
Ramos Guerrero, Félix Giovanni		
en condición de estudiante – investigador del Programa de:		
Maestría en Sistemas de Gestión de la Calidad e Inocuidad en la Industria Alimentaria		
Asimismo señalamos, que según nuestra normativa interna procederemos con el apoyo al desarrollo del proyecto de investigación, dando las facilidades del caso para la aplicación de los instrumentos de recolección de datos. En razón de lo expresado doy mi consentimiento para el uso de la información y/o la aplicación de los instrumentos de recolección de datos.		
Nombre de la empresa: <b>SELVA INDUSTRIAL S.A.</b>	Autorización para el uso del nombre de la Empresa en el informe final	<input checked="" type="checkbox"/> SI <input type="checkbox"/> NO
Apellidos y Nombres del Jefe/Responsable del área: <b>BULOS SEJURO, DIEGO LEONARDO</b>	Cargo del Jefe/Responsable del área: <b>GERENTE DE OPERACIONES</b>	
Teléfono fijo y/o celular: <b>989 060 542</b>	Correo electrónico de la empresa: <b><a href="mailto:dbulos@selva.com.pe">dbulos@selva.com.pe</a></b>	
 <b>DIEGO LEONAR BULOS SEJURO</b> GERENTE DE OPERACIONES SELVA INDUSTRIAL S.A.		<u>28.01.2021</u> Fecha

### Anexo 3. Matriz de consistencia

**Tabla 26.**

*Matriz de consistencia*

Problema Principal	Objetivo General	Hipótesis General	Variables	Indicador
¿Es posible diseñar un modelo matemático que permita estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos?	Obtener un modelo matemático que permita estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos	La aplicación de un modelo matemático permite estimar de manera significativa la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos	Concentración/carga de mohos en el aire	*UFC/m <sup>3</sup> de aire
			Velocidad de sedimentación	m/s
			Área de exposición	m <sup>2</sup>
			Tiempo de exposición	Tiempo (segundos)
			Nivel de contaminación fúngica	UFC/Producto
Problemas Específicos	Objetivos Específicos	Hipótesis Específicas		
¿Cuáles son las cargas fúngicas ambientales de tres áreas de proceso de una fábrica de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos?	Cuantificar las cargas fúngicas ambientales de tres áreas de proceso de una fábrica de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.	Las cargas fúngicas ambientales de tres áreas de proceso de una fábrica de bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos son iguales.		
¿Son iguales las cargas fúngicas ambientales de las tres áreas de proceso en temporadas de verano e invierno?	Comparar las cargas fúngicas ambientales de las tres áreas de proceso en temporadas de verano e invierno.	Las cargas fúngicas ambientales de las tres áreas de proceso son iguales durante las temporadas de verano e invierno.		

¿Cuál es la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos basado en las dimensiones de su empaque y sus características de proceso?

Estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos basado en las dimensiones de su empaque y sus características de proceso.

A través de las dimensiones de su empaque y sus características de proceso es posible estimar la probabilidad de contaminación fúngica en bebidas no carbonatadas con adición de electrolitos.

¿Qué distribución estadística de probabilidad explica mejor el comportamiento de las cargas fúngicas ambientales?

Determinar la distribución estadística de probabilidad que explica mejor el comportamiento de las cargas fúngicas ambientales.

Las cargas fúngicas ambientales presentan diferentes distribuciones estadísticas de probabilidad para explicar su comportamiento.

---

*Nota:* \*UFC significa unidad formadora de colonia

Elaboración: Propia

## Anexo 4. Matriz de operacionalización

**Tabla 27.**

*Matriz de operacionalización*

Variable	Indicador	Definición Conceptual	Definición Operacional	Instrumento
Concentración/carga de mohos en el aire	*UFC/m <sup>3</sup> de aire	Se refiere a la carga de mohos presente en el aire de un área de proceso	Cantidad de mohos (expresado en UFC) presente en una muestra de 1 m <sup>3</sup> de aire del área de proceso	Muestreador microbiológico ambiental
Velocidad de sedimentación	m/s	Velocidad que tiene una spora fúngica (suspendida en el aire) para poder sedimentarse en una superficie	Calculo basado en la ecuación de McCartney y West (2007) usando el diámetro de la spora fúngica y cuyo resultado es expresado en m/s.	Ecuación de McCartney y West (2007)
Área de exposición	m <sup>2</sup>	Área de un producto expuesto a la contaminación ambiental	Área calculada en base al diámetro de la boca de la botella por donde puede ingresar la contaminación ambiental durante el proceso de producción	Vernier
Tiempo de exposición	Tiempo (segundos)	Tiempo en que el producto está expuesto a la contaminación ambiental	Tiempo (segundos) en el cual la botella llena con producto está expuesta antes de ser tapada.	Cronómetro
Nivel de contaminación fúngica	UFC/Producto	Cantidad de mohos presentes en la bebida final	Carga de mohos (expresada en UFC) presente en el producto final (bebida)	Conteo microbiológico

*Nota:* \*UFC significa unidad formadora de colonia

Elaboración: Propia

## Anexo 5. Modelo lineal generalizado

\* Modelos lineales generalizados.

```

GENLIN Concentración BY Estación (ORDER=ASCENDING)
  /MODEL Estación INTERCEPT=YES
  DISTRIBUTION=NEGBIN(1) LINK=LOG
  /CRITERIA METHOD=FISHER(1) SCALE=1 COVB=MODEL MAXITERATIONS=100
  MAXSTEPHALVING=5
  PCONVERGE=1E-006(ABSOLUTE) SINGULAR=1E-012 ANALYSISTYPE=3(WALD) CILEVEL=95
  CITYPE=WALD
  LIKELIHOOD=FULL
  /EMMEANS TABLES=Estación SCALE=ORIGINAL COMPARE=Estación CONTRAST=PAIRWISE
  PADJUST=LSD
  /MISSING CLASSMISSING=EXCLUDE
  /PRINT CPS DESCRIPTIVES MODELINFO FIT SUMMARY SOLUTION.
  
```

### Modelos lineales generalizados

#### Información de modelo

Variable dependiente	Concentración
Distribución de probabilidad	Binomial negativa (1)
Función de enlace	Logaritmo

#### Resumen de procesamiento de casos

	N	Porcentaje
Incluido	54	100,0%
Excluido	0	0,0%
Total	54	100,0%

#### Información de variable categórica

			N	Porcentaje
Factor	Estación	Invierno	14	25,9%
		Otoño	13	24,1%
		Primavera	14	25,9%
		Verano	13	24,1%
		Total	54	100,0%

#### Información de variable continua

		N	Mínimo	Máximo	Media	Desv. Desviación
Variable dependiente	Concentración	54	0	100	12,96	22,032



**Bondad de ajuste<sup>a</sup>**

	Valor	gl	Valor/gl
Desviación	190,809	50	3,816
Desviación escalada	190,809	50	
Chi-cuadrado de Pearson	133,415	50	2,668
Chi-cuadrado de Pearson escalado	133,415	50	
Logaritmo de verosimilitud <sup>b</sup>	-188,086		
Criterio de información Akaike (AIC)	384,173		
AIC corregido para muestras finitas (AICC)	384,989		
Criterio de información bayesiana (BIC)	392,128		
AIC consistente (CAIC)	396,128		

Variable dependiente: Concentración

Modelo: (Intersección), Estación<sup>a</sup>

a. Los criterios de información están en un formato de cuanto más pequeño mejor.

b. La función de logaritmo de la verosimilitud completa se visualiza y utiliza en el cálculo de los criterios de información.

**Prueba ómnibus<sup>a</sup>**

Chi-cuadrado de razón de verosimilitud	gl	Sig.
12,596	3	,006

Variable dependiente: Concentración

Modelo: (Intersección), Estación<sup>a</sup>

a. Compara el modelo ajustado con el modelo de sólo intersección.

**Pruebas de efectos del modelo**

Origen	Tipo III		
	Chi-cuadrado de Wald	gl	Sig.
(Intersección)	295,783	1	,000
Estación	12,890	3	,005

Variable dependiente: Concentración

Modelo: (Intersección), Estación

**Estimaciones de parámetro**

Parámetro	B	Desv. Error	95% de intervalo de confianza de		Contraste de
			Inferior	Superior	hipótesis
			Wald		Chi-cuadrado de
					Wald
(Intersección)	3,105	,2835	2,549	3,661	119,951
[Estación=Invierno ]	-1,362	,4053	-2,156	-,568	11,290
[Estación=Otoño ]	-,372	,4029	-1,161	,418	,851
[Estación=Primavera]	-,876	,3994	-1,659	-,094	4,816
[Estación=Verano ]	0 <sup>a</sup>	.	.	.	.
(Escala)	1 <sup>b</sup>	.	.	.	.
(Binomial negativa)	1 <sup>b</sup>	.	.	.	.

**Estimaciones de parámetro**

Parámetro	Contraste de hipótesis	
	gl	Sig.
(Intersección)	1	,000
[Estación=Invierno ]	1	,001
[Estación=Otoño ]	1	,356
[Estación=Primavera]	1	,028
[Estación=Verano ]	.	.
(Escala)	.	.
(Binomial negativa)	.	.

Variable dependiente: Concentración

Modelo: (Intersección), Estación

a. Definido en cero porque este parámetro es redundante.

b. Fijado en el valor visualizado.