

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUIMICA

**“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

AUTOR

Felix Giovani Ramos Guerrero

ASESORES

Benedicta Carmen López Flores

Lima – Perú

2014

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo es fruto de más de 5 años de dedicación, invirtiendo tiempo y esfuerzo desde la búsqueda de información bibliográfica hasta la obtención de los resultados finales. En todo este tiempo muchas personas me ayudaron a construir este sueño que ahora, gracias a Dios, se convierte en realidad.

El primer agradecimiento está dirigido a mi familia, a mi madre Rosa Amelia Guerrero Carreño, a quien nunca terminaré de agradecerle por haberme dado la vida, formarme, apoyarme en todos mis sueños y en permitir, gracias a su esfuerzo, que hoy en día sea un buen profesional. ¡Muchas gracias mamá! A mis hermanas María y Cinthia, a mi esposa Magaly Valencia y a mi hijo Joaquín, quienes permitieron tomar horas que compartía con ellos, para poder completar este gran sueño. Les estoy eternamente agradecido.

Un agradecimiento especial está dirigido a todas esas personas, “grandes investigadores de vanguardia”, a los cuales contacté, me dieron su soporte técnico y compartieron conmigo muchas de sus investigaciones, con el único fin de sustentar científicamente mi tesis. Realmente estoy muy agradecido con las siguientes personas: PhD. Ailsa D. Hocking (Australia), Dra. Ana Maria Queijeiro López (Brasil), Dra. Andréia Tremarin (Brasil), Dr. Basil Jarvis (Reino Unido), Dra. Beatriz Salomão (Brasil), Dra. Bernadette D.G.M. Franco (Brasil), M.Sc. Cristiano Dannenhauer (Brasil), Dr. Philippe Dantigny (Francia), Dr. Delio Guerra Filho (Brasil), Dra. Elisa Helena Da Rocha Ferreira (Brasil), Dra. Gláucia Maria Falcão de Aragão (Brasil), Dra. Maria Gougouli (Grecia), Dra. Jos Houbraken (Países Bajos), Dr. Juan Martín Oteiza (Argentina), Dr. Larry R. Beuchat (E.E.U.U.), Dra. Laura Celano (Uruguay), Dr. Laurent Rosso (Francia), Dra. Lourdes Maria Pessôa Masson (Brasil), Dra. María G. Corradini (Argentina), Dra. Maria do Socorro Rocha Bastos (Brasil), Dr. Nai Tran-Dinh (Australia), Dr. Nina Bjerre Østergaard (Dinamarca), Dr. Panagiotis Skandamis (Grecia), PhD. Mickey Parish (E.E.U.U.), M.Sc. Paulo Ricardo Santos da Silva (Brasil), M.Sc. Petra Rosas Ulloa (México),

PhD. Irving J. Pflug (E.E.U.U.), Dr. Lothar Leistner (Alemania), Dr. Richard Whiting (E.E.U.U.), Dra. Sandra Horvitz (España), Dra. Sonia Marín (España), Dr. Tom Ross (Australia), Dra. Valerie H. Tournas (E.E.U.U.), Dr. Yutaka Kikoku (Japón), PhD. Parthena Kotzekidou (Grecia).

Finalmente a mis asesores, a la Q.F. Benedicta Carmen López Flores, quien desde mis estudios de pre grado en la Facultad de Farmacia y Bioquímica, permitió que me siga desarrollando en el campo de la microbiología de los alimentos en el CLEIBA, dándome asesoría y quien accedió a dirigir tan amablemente mi tesis en un campo nuevo en nuestro país que es el modelamiento predictivo en microbiología de alimentos.

Al Dr. Anderson de Souza Sant'Ana, a quien conocí en el año 2010 en São Paulo (Brasil), a través de la Dra. Bernadette Franco, y desde esa fecha me viene apoyando con sus revisiones, sugerencias y compartiendo información relacionada al campo de la investigación de la microbiología predictiva y al deterioro microbiológico de alimentos. Quien desde el año 2012 formalmente es el co-asesor de esta tesis y quien realmente ha sido un gran apoyo en la realización de esta investigación, en la parte del diseño experimental y del modelamiento predictivo.

A todos muchas gracias, ya que si cada uno de ustedes no hubiera aportado algo en todos estos años, este sueño no se vería concluído el día de hoy.

Félix Ramos G.

## RESUMEN

Para prevenir que el consumidor rechace las bebidas deterioradas por mohos, es importante evaluar la probabilidad de que una determinada bebida sea deteriorada microbiológicamente antes que alcance su vida útil. Los modelos matemáticos, que son capaces de predecir el efecto de diferentes factores sobre el crecimiento fúngico, mejoran la toma de decisiones de la vida útil y optimizan las medidas de control durante la producción, siendo de gran utilidad como herramientas efectivas en el control de calidad de la industria de bebidas. Por esta razón, el objetivo principal de esta investigación fue usar el modelo logístico de la microbiología predictiva para determinar la probabilidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en la bebida isotónica sabor mandarina, frente a dos condiciones de temperaturas de almacenamiento: 20 y 30 °C y a dos cargas de inóculo:  $10^0$  y  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica. Los resultados mostraron que el deterioro ocurrió más rápido a 30 °C con una carga de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica (con un RMSE “Raíz del Error Cuadrático Medio” = 5.9196) que a 20 °C con  $10^0$  esporas/100 mL de bebida isotónica (RMSE = 5.4397) y el tiempo al crecimiento de *Fusarium oxysporum* decrece en función del incremento tanto de la temperatura de almacenamiento como del tamaño del inóculo. El menor valor de  $t_{10\%}$  (67.04 horas), que representa el tiempo que da la alerta a la industria de bebidas para recuperar los productos del mercado por un caso de contaminación, se obtuvo con un tratamiento de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica a 30 °C. Este estudio logró demostrar que incluso a muy bajas concentraciones de inóculo, la bebida isotónica es deteriorada fácilmente por *Fusarium oxysporum* y el modelo logístico proporciona a la industria de bebidas un método rápido y de bajo costo para estimar el efecto de la temperatura de almacenamiento y tamaño del inóculo en la bebida isotónica.

Palabras clave: *Fusarium oxysporum*, deterioro, bebida isotónica, modelo logístico, microbiología predictiva.

## ABSTRACT

Title: "Modeling of the spoilage caused by *Fusarium oxysporum* in tangerine flavor isotonic drink, using the logistic model of predictive microbiology"

To prevent consumer rejection of beverage spoiled by molds, it is important to assess the probability for a given beverage to be microbiologically spoiled before the end of its shelf life. Mathematical models that are able to predict the effect of different factors on fungal growth, improve the decision-making regarding to the shelf-life and optimize of control measures during the manufacturing, being usefull as effective tools in the quality control of the beverage industry. For this reason, the main aim of this research was to use the logistic model of predictive microbiology to determine the probability of growth of *Fusarium oxysporum* in the tangerine flavor isotonic drink, under two storage temperatures: 20 and 30 °C and two inoculum size conditions:  $10^0$  and  $10^1$  spores/100 mL of isotonic drink. The results showed that of spoilage occurred more speed at 30 °C with  $10^1$  spores/100 mL of isotonic drink (with RMSE "Root Mean Square Error" = 5.9196) than at 20 °C with  $10^0$  spores/100 mL of isotonic drink (RMSE = 5.4397), and the time-to-growth of *Fusarium oxysporum* decreases in function of increasing both of storage temperature as the inoculum size. The lower value of  $t_{10\%}$  (67.04 hours), which is the alert time to beverage industry to recall the products due to case contamination, was obtained with a treatment of  $10^1$  spores/100 mL of isotonic drink at 30 °C. This study demonstrated that even at a very low inoculum size, isotonic drink can be easily spoiled by *Fusarium oxysporum* and the logistic model provides to the beverage industry a quick and low cost method to estimating the effects of storage temperatures and inoculum size in the isotonic drink.

Keywords: *Fusarium oxysporum*, spoilage, isotonic drink, logistic model, predictive microbiology.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	4
ABSTRACT .....	5
ÍNDICE DE FIGURAS .....	9
ÍNDICE DE TABLAS .....	10
I. INTRODUCCIÓN .....	11
II. GENERALIDADES .....	14
2.1. Bebidas isotónicas.....	14
2.1.1. Concepto e importancia .....	14
2.1.2. Producción de bebidas isotónicas en el Perú y en el mundo .....	17
2.1.3. Proceso de fabricación: Llenado en caliente .....	20
2.2. Microbiología de Bebidas .....	22
2.2.1. Teoría de los obstáculos.....	22
2.2.1.1. Concepto barrera, efecto trampolín y tecnología de barreras.....	22
2.2.1.2. Fundamento de la tecnología de barreras .....	23
2.2.1.3. Clasificación de los factores de conservación .....	25
2.2.1.4. Aplicación de la tecnología de barreras.....	27
2.2.1.5. Calidad total en la conservación de alimento y bebidas .....	29
2.2.2. Microorganismos de importancia en el deterioro de bebidas tratadas térmicamente.....	29
2.2.2.1. Bacterias .....	29
2.2.2.2. Mohos.....	34
2.2.2.3. Levaduras .....	36
2.3. <i>Fusarium oxysporum</i> .....	38
2.3.1. Definición y ocurrencia.....	39
2.3.2. Fuentes de contaminación – Ecología.....	43
2.3.3. Factores que afectan su crecimiento .....	44
2.3.4. Deterioro de bebidas pasteurizadas .....	45
2.3.5. Episodio de contaminación de bebidas isotónicas en el Perú.....	45
2.3.6. Prevención y control .....	47
2.4. Microbiología Predictiva.....	50
2.4.1. Concepto e historia de la microbiología predictiva .....	50
2.4.2. Aplicaciones de la microbiología predictiva .....	52

2.4.3.	Etapas en el desarrollo de un modelo predictivo .....	56
2.4.4.	Modelos predictivos para estudio y evaluación de la calidad total de los alimentos y bebidas.....	58
2.4.4.1.	Modelos primarios .....	59
2.4.4.2.	Modelos secundarios .....	60
2.4.4.3.	Modelos terciarios .....	61
2.4.4.4.	Modelos de crecimiento / no crecimiento .....	68
2.4.5.	Micología Predictiva.....	70
2.4.5.1.	Bases de micología predictiva.....	70
2.4.5.2.	Modelos usados.....	72
2.4.6.	Futuro de la microbiología predictiva – Tendencias.....	78
III.	PARTE EXPERIMENTAL.....	80
3.1.	Preparación del inóculo (suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> )	80
3.1.1.	Microorganismo .....	80
3.1.2.	Obtención de esporas .....	80
3.1.3.	Estandarización del inóculo.....	81
3.1.3.1.	Conteo en Cámara de Neubauer.....	81
3.1.3.2.	Conteo por dilución y plaqueo.....	82
3.2.	Modelamiento del deterioro causado por <i>Fusarium oxysporum</i> en la bebida isotónica sabor mandarina .....	82
3.2.1.	Esquema de trabajo.....	82
3.2.2.	Evaluación e incorporación del inóculo en bebidas isotónicas.....	84
3.2.2.1.	Evaluación del inóculo (carga de esporas) .....	84
3.2.2.2.	Incorporación del inóculo (suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> ) .....	84
3.2.3.	Incubación y monitoreo del deterioro.....	85
3.2.4.	Cálculo de la probabilidad de crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> en la bebida isotónica sabor mandarina .....	85
3.2.5.	Ajuste del modelo a los datos (Goodness-of-fit) .....	86
IV.	RESULTADOS.....	87
4.1.	Determinación de la concentración de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> FRR 3414 en la solución madre .....	87
4.1.1.	Conteo en Cámara de Neubauer .....	87
4.1.2.	Conteo por dilución y plaqueo.....	87

4.2. Preparación y estandarización del inóculo (suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> FRR 3414) .....	88
4.2.1. Obtención de concentraciones de $10^0$ y $10^1$ esporas/100 mL de bebida isotónica .....	88
4.2.2. Verificación de la concentración final de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> FRR 3414 en unidades de bebidas isotónicas .....	89
4.3. Modelamiento del deterioro causado por <i>Fusarium oxysporum</i> FRR 3414 en la bebida isotónica sabor mandarina .....	91
4.3.1. Parámetros fisicoquímicos de los lotes de bebida isotónica.....	91
4.3.2. Resultado del monitoreo de las unidades inoculadas de bebida isotónica.....	91
4.3.3. Enfrentamiento de los datos al Modelo Logístico y cálculo del $t_{10\%}$ .....	94
V. DISCUSIÓN.....	98
VI. CONCLUSIONES .....	103
VII. RECOMENDACIONES.....	104
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105
IX. ANEXOS .....	137
Anexo 1. Nota de despacho del moho FRR 3414 <i>Fusarium oxysporum</i> , proveniente del FRR Culture Collection, CSIRO Food and Nutritional Sciences – Australia.....	137
Anexo 2. Análisis de varianza generados en cada experimento. ....	138



## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura N° 1.** Características macroscópicas y microscópicas de *Fusarium oxysporum*.

**Figura N° 2.** Representación esquemática de las cuatro fases cinéticas de una población microbiana. Donde  $\lambda$  es la fase de latencia,  $\mu$  es el ratio máximo de crecimiento,  $N_{\max}$  es el nivel de población máximo y  $N_0$  es la población microbiana inicial.

**Figura N° 3.** Set de botellas conteniendo bebida isotónica sabor mandarina inoculadas con esporas de *Fusarium oxysporum* FRR 3414.

**Figura N° 4.** Unidades inoculadas y codificadas de bebida isotónica sabor mandarina para cada experimento.

**Figura N° 5.** Verificación de unidades positivas de bebida isotónica en estudio contra una fuente de luz.

**Figura N° 6.** Porcentaje de botellas deterioradas ( $n = 60$ ) por *Fusarium oxysporum* FRR 3414 en bebida isotónica sabor mandarina en función del tiempo, para un inóculo de  $10^0$  esporas/100 mL de bebida. ( $\Delta$ ) 1° ensayo a 20 °C, ( $\blacktriangle$ ) 2° ensayo a 20 °C, ( $\circ$ ) 1° ensayo a 30 °C, ( $\bullet$ ) 2° ensayo a 30 °C.

**Figura N° 7.** Porcentaje de botellas deterioradas ( $n = 60$ ) por *Fusarium oxysporum* FRR 3414 en bebida isotónica sabor mandarina en función del tiempo, para un inóculo de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida. ( $\nabla$ ) 1° ensayo a 20 °C, ( $\blacklozenge$ ) 2° ensayo a 30 °C.

## ÍNDICE DE TABLAS

**Tabla N° 1.** Composición de las principales marcas de bebidas deportivas incluyendo jugos de frutas y un estándar de bebida de cola carbonatada, con fines comparativos.

**Tabla N° 2.** Aplicaciones de la tecnología de barreras en diversas categorías de alimentos.

**Tabla N° 3.** Características de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en medios de cultivo.

**Tabla N° 4.** Identificación de *Fusarium oxysporum* en bebidas isotónicas.

**Tabla N° 5.** Diseño experimental.

**Tabla N° 6.** Conteo de colonias de *Fusarium oxysporum* en cada dilución expresados en ufc/mL a partir de una suspensión inicial de 1/9.

**Tabla N° 7.** Cantidad de inóculo a agregar en cada botella con 350 mL de bebida isotónica.

**Tabla N° 8.** Concentración de mohos en cada dilución expresados en ufc/100 mL de bebida.

**Tabla N° 9.** Características fisicoquímicas de los lotes de bebida isotónica sabor mandarina usados como medio para el modelamiento predictivo.

**Tabla N° 10.** Tiempo para el crecimiento de *Fusarium oxysporum* FRR 3414 en bebida isotónica sabor mandarina en función de la carga de esporas a 20 °C.

**Tabla N° 11.** Tiempo para el crecimiento de *Fusarium oxysporum* FRR 3414 en bebida isotónica sabor mandarina en función de la carga de esporas a 30 °C.

**Tabla N° 12.** Parámetros estimados a partir del enfrentamiento de los datos de probabilidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* al Modelo Logístico, con una carga de  $10^0$  esporas/100 mL de bebida isotónica sabor mandarina.

**Tabla N° 13.** Parámetros estimados a partir del enfrentamiento de los datos de probabilidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* al Modelo Logístico, con una carga de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica sabor mandarina.

**Tabla N° 14.** Valores calculados de  $t_{10\%}$  para cada experimento.

## I. INTRODUCCIÓN

Los microorganismos presentes en las bebidas no son capaces de “saltar” todos los obstáculos presentes en ellas, como por ejemplo: el pH, los preservantes, el tratamiento térmico aplicado en el proceso de producción, entre otros. A este tema se le conoce como el “**Concepto Barrera**” el cual nos permite: determinar la probabilidad de crecimiento de un microorganismo en una bebida e inhibir su desarrollo con “barreras” para que no puedan adaptarse. Por otro lado, existe el “**Efecto Trampolín**”, que ocurre cuando los nutrientes de la bebida le brindan a los microorganismos la energía necesaria para vencer estos obstáculos. Utilizando estos dos términos el “**Crecimiento Microbiano**” es el resultado final entre el Concepto Barrera y el Efecto Trampolín<sup>1</sup>.

Debido a que cada microorganismo se comporta de manera diferente frente a los obstáculos, cada bebida llega a tener una microflora en particular, contaminando tipos de bebidas específicas que se encuentran a la venta en el mercado mundial. Por ejemplo las aguas embotelladas tienen frecuentes episodios de contaminación por mohos, así lo demuestra un estudio realizado en la Argentina, donde fueron evaluadas 126 muestras de aguas embotelladas, encontrando la presencia de *Penicillium citrinum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Alternaria alternata* y *Penicillium glabrum*<sup>2</sup>, éste último también fue aislado en Francia, de agua mineral aromatizada envasada en botellas PET (Politereftalato de etileno)<sup>3</sup> y en agua carbonatada junto al *Paecilomyces fulvu*<sup>4</sup>.

La preocupación por contrarrestar estas contaminaciones y además conseguir bebidas inocuas, es decir que no causen daño al consumidor, originó que las fábricas de procesamiento, implementen y validen sistemas como el ISO 22000: 2005 “Food Safety Management Systems. Requeriments for any organization in the food chain” y el Sistema HACCP (Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico), ayudando a prevenir y controlar sistemáticamente los peligros que

podieran ser inherentes al proceso de producción o que lleguen con las materias primas o los materiales de empaque<sup>5,6</sup>.

Dentro del gran grupo de bebidas no carbonatadas, existen las llamadas bebidas deportivas o rehidratantes, siendo la principal categoría las isotónicas, las cuales están dirigidas principalmente a reponer sales minerales en deportistas de alto rendimiento durante el ejercicio. El mercado de bebidas deportivas ha crecido mucho en los últimos años, llegando a tener una gama de presentaciones que incluyen bebidas para antes (suministrando energía y vitaminas), durante (reponiendo sales minerales y carbohidratos) y después del ejercicio (para la hidratación y recuperación de proteínas)<sup>7</sup>. La estabilidad microbiológica de las bebidas deportivas es conseguida gracias a su fórmula y a su procesamiento (pasteurización), para luego ser envasadas asépticamente o por la tecnología de llenado en caliente. Recientemente, la última publicación de la “International Commission on Microbiological Specifications for Foods” (ICMSF - 2011), indica que la categoría de bebidas deportivas (isotónicas) no presenta peligros microbiológicos significativos de importancia en la inocuidad alimentaria, a pesar de que la microbiota de los ingredientes puede incluir pequeños números de patógenos, ya que la formulación, sus métodos de procesamiento (pasteurización) y las Buenas Prácticas de Higiene (BPH) logran controlar estos peligros<sup>8</sup>.

Sin embargo, existen microorganismos que son capaces de saltar las barreras de la formulación de las bebidas isotónicas y aprovechar los nutrientes para poder desarrollarse y mantenerse. Dentro de estos microorganismos se encuentran los mohos, los cuales afectan la calidad del producto final, siendo los más representativos los mohos termorresistentes, cuyos géneros más comunes son *Byssochlamys*, *Neosartorya*, *Talaromyces* y *Eupenicillium*. Estos microorganismos no son patógenos pero son alterantes, ocasionando en el producto final una variación en la acidez, cambios en la apariencia, olores y sabores no característicos en la bebida y presencia de micelio visible, los cuales son indeseables para el consumidor<sup>9</sup>. Por toda esta importancia se los utiliza como

microorganismos “diana” en el diseño de procesos térmicos de bebidas y de otros productos de alta acidez<sup>10,11</sup>.

En Australia, durante el verano de los años 2001 - 2002, se presentaron casos de contaminación en jugos UHT empacados asépticamente causados por el moho *Fusarium oxysporum*, posteriormente los fabricantes de bebidas lácteas en Nueva Zelanda y en otros lugares como Singapur, Sudáfrica, Estados Unidos y en Europa, reportaron problemas similares<sup>12</sup>, considerando a este microorganismo como un importante agente deteriorador de bebidas no carbonatadas. En Perú, en el año 2009, este microorganismo fue el causante de deterioro en diferentes lotes y sabores de bebidas isotónicas, generando productos no conformes, no aptos para la venta por presentar micelio visible en la bebida y ocasionando pérdidas económicas para la planta de producción (data no publicada).

La Microbiología Predictiva es una herramienta clave en el Análisis de Riesgos, cuya función principal es usar ecuaciones matemáticas para modelizar y predecir en diferentes partes de un proceso productivo, la respuesta de un microorganismo (crecimiento, supervivencia o inhibición), frente a determinados factores: extrínsecos, intrínsecos, implícitos y de procesamiento. Por ello, es necesario conocer la probabilidad y la cinética de crecimiento de estos microorganismos, los cuales son determinados usando los modelos predictivos<sup>13</sup>.

El presente estudio tiene como objetivo general: determinar la probabilidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en la bebida isotónica sabor mandarina, frente a dos temperaturas de almacenamiento: 20 y 30 °C y a dos cargas de inóculos:  $10^0$  y  $10^1$  esporas/100 mL de bebida, usando el modelo logístico de la microbiología predictiva. Así mismo tiene como objetivos específicos: i) predecir el menor tiempo en que el 10 % ( $t_{10\%}$ ) de las botellas con bebida isotónica sabor mandarina presentarán deterioro ocasionado por *Fusarium oxysporum*, ii) determinar el ajuste de los datos generados en los experimentos al modelo logístico.

## II. GENERALIDADES

### 2.1. Bebidas isotónicas

#### 2.1.1. Concepto e importancia

Las bebidas deportivas, bebidas carbohidratos – electrolitos, bebidas de reemplazo de electrolitos, es una categoría de bebidas especialmente formuladas para el consumo antes, durante y después de la actividad física<sup>14</sup>. Según Palmer<sup>15</sup> (2005), las bebidas deportivas sirven para proporcionar agua, energía y electrolitos en una forma fácil de asimilar antes, durante y después del ejercicio, con el fin de evitar principalmente el agotamiento de energía y la pérdida de agua. Estas bebidas han sido diseñadas para personas que se dedican a actividades físicas extenuantes, sin embargo estas bebidas son a menudo consumidas por personas que simplemente aspiran a tales actividades o aquellas que disfrutan en asistir y ver los eventos deportivos.

Una bebida deportiva debe ser formulada para: fomentar el consumo de líquidos voluntariamente a través de la mejoría en las características sensoriales de la formulación, de la composición electrolítica, de los tratamientos térmicos para evitar el uso de preservantes, y de empaques ergonómicos, para estimular una rápida absorción de líquidos evitando al mínimo el vaciamiento gástrico y la absorción intestinal mientras que proporciona líquido, carbohidratos y electrolitos en cantidades conocidas para inducir respuestas fisiológicas positivas y rendimiento, para suministrar carbohidratos para mejorar el desempeño, requerido para una palatabilidad óptima y rápida absorción de líquidos a través de un rango óptimo de un tipo de carbohidratos, así como para aumentar la respuesta fisiológica como la homeostasis electrolítica y de glucosa y para asegurar una rápida rehidratación usando un tipo de electrolitos en la concentración adecuada<sup>14</sup>.

Las bebidas deportivas se clasifican en: isotónicas, las cuales contienen flúidos con electrolitos y carbohidratos entre 6 % – 8 %, hipotónicas con electrolitos y un nivel bajo de carbohidratos e hipertónicas, las cuales son flúidos con alto nivel de carbohidratos<sup>16</sup>.

La mayoría de bebidas deportivas, que actualmente son comercializadas, tienen una similitud en la formulación, sugiriendo algún consenso entre los fabricantes para los componentes claves de una bebida deportiva efectiva<sup>17</sup>. En general, las bebidas son aproximadamente isotónicas, con una osmolaridad que típicamente está en el rango de 280 a 320 mOsm/Kg. El contenido de carbohidratos es generalmente entre 6 – 7 % y normalmente incluye una combinación de glucosa, fructosa, sacarosa y maltodextrina. La concentración de sodio (Na) está típicamente entre 20 – 30 mmol/L, y la concentración de potasio (K) aproximadamente alrededor de 5 mmol/L<sup>18</sup>. Muchas de las bebidas deportivas son formuladas en un número de sabores relacionados a las frutas y contienen pequeñas cantidades de cloruros y fosfatos<sup>14</sup>.

A continuación, se muestra la tabla N° 1, donde se indica la composición de las principales marcas de bebidas deportivas y con fines comparativos se muestran también la de algunos jugos de frutas y la de un estándar de bebida de cola carbonatada.

Tabla N° 1. Composición de las principales marcas de bebidas deportivas incluyendo jugos de frutas y un estándar de bebida de cola carbonatada, con fines comparativos.

<b>Bebidas</b>	<b>Carbohidratos (%)</b>	<b>Sodio (mmol/L)</b>	<b>Potasio (mmol/L)</b>	<b>Osmolaridad (mosmol/Kg)</b>
Gatorade®	6	20	3	310
Isostar®	7	30	5	290
Lucozade Sport®	6.4	22	3	285
Powerade® (UK)	6	23	2	280/290
Jugo de frutas: Naranja	10	4	45	660
Jugo de frutas: Manzana	13	1	26	-
Jugo de frutas: Tomate	3	140	7	-
Coca	11	3	1	700

Tomado de Maughan RJ. Chapter 14: Sports beverages for optimising physical performance. In: Paquin P, editor. Functional and speciality beverage technology. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2009. p. 346–369<sup>18</sup>.

Las tendencias respecto a las formulaciones de las bebidas deportivas<sup>19</sup> se pueden resumir en 3 grandes grupos:

- Bebidas que atienden las necesidades de los atletas por tipo. Por ejemplo: Gatorade® Tiger, dirigido a los atletas que practican pruebas de resistencia o aquellos que participan en deportes en equipo y Powerade® Play for kids, este último está formulado especialmente para niños, ya que ellos tienen un gran riesgo de deshidratación.
- Bebidas que dan los nutrientes a tiempo. Estas bebidas facilitan mayores adaptaciones al entrenamiento y acortan el tiempo de recuperación. Actualmente estas formulaciones están basadas en diferentes combinaciones de carbohidratos y proteínas.
- Bebidas que se encuentran entre las bebidas deportivas y las bebidas funcionales. Por ejemplo el agua de coco, que los atletas están



comenzando a escoger porque es beneficiosa para la rehidratación, por ser considerada una bebida isotónica natural.

Con respecto a las características organolépticas, la diferenciación en los próximos años básicamente radicará en sabores más ligeros y menos artificiales, con colores tenues que busquen acercarse más a la imagen saludable del deporte<sup>20</sup>. Uno de los ejemplos más claros será el uso de antocianinas, logrando obtener una bebida isotónica de color rubí, que además proveerá antioxidantes naturales<sup>21</sup>.

#### 2.1.2. Producción de bebidas isotónicas en el Perú y en el mundo

Los nuevos estudios de mercado indican que en los próximos años China, India y Latinoamérica serán los que más desarrollen en el rubro de bebidas, donde el factor más importante será la edad de la población (menor a 15 años) y el dinero disponible del consumidor. Latinoamérica, que está proyectada a ser para el 2014 segunda en este rubro, se destaca actualmente por un crecimiento en tres sectores: gaseosas, cervezas y aguas embotelladas<sup>22</sup>. Por otro lado, el mercado de las Bebidas No Carbonatadas (NCB) está creciendo mucho más rápido que el de las Bebidas Carbonatadas (CSD). Los pronósticos del período 2009 – 2014, proyectan que las bebidas carbonatadas tendrán un crecimiento de 1.1 % contra 5.2 % para los jugos de frutas y verduras y 3.9 % para el agua embotellada<sup>23</sup>.

En América Latina, las bebidas energéticas, el té listo para beber y las bebidas deportivas son las categorías de más rápido crecimiento y también las más caras, en base al precio por litro<sup>24</sup>. Sin embargo, hay una gran oportunidad para que el consumo de refrescos se incremente en países como Brasil y Perú, los cuales poseen zonas urbanas bien desarrolladas y una población joven con aumento en poder adquisitivo<sup>25</sup>.

El consumo de bebidas deportivas en el mundo viene creciendo constantemente, así, por ejemplo, mientras que en Estados Unidos<sup>26</sup> las ventas de bebidas

deportivas no asépticas en supermercados, farmacias y otros (excluyendo al supermercado Walmart, tiendas de licores y clubes) se incrementaron 6.8 % para las últimas 52 semanas finalizando el 15 Abril 2012, en el Reino Unido, en general, se registró un incremento del 13.1 % en volumen, hasta situarse en 160 millones de litros en el 2010, esto equivale a 2,6 litros por persona y el valor total de la categoría fue de £ 260 millones<sup>16</sup>. Otro claro ejemplo es en el Brasil, donde el consumo de bebidas isotónicas creció 20 % en el año 2010, teniendo un crecimiento promedio de 13.2 % en los últimos 5 años, siendo la región de São Paulo la de mayor consumo<sup>27</sup>.

En el Perú 3 marcas de bebidas isotónicas lideran el mercado<sup>28</sup>: Sporade<sup>®</sup>, Gatorade<sup>®</sup> y Powerade<sup>®</sup>, las cuales se siguen impulsando, para poder elevar el consumo “per cápita” del año 2008 que fue de 2.1 litros por persona<sup>29</sup>.

El consumo de bebidas isotónicas en el Perú se incrementó en casi 32 % durante el año 2008, pasando de 30 hacia 100 millones de litros anuales en menos de 2 años<sup>30</sup>.

Durante el primer semestre del año 2009, el Perú experimentó un crecimiento de 15 %, a pesar del freno económico mundial<sup>31</sup> y a finales del mismo año obtuvo un crecimiento por encima del 40 %, principalmente debido al dinamismo de una marca por impulsar el mercado<sup>32</sup>.

En el año 2012, las bebidas deportivas y energizantes en el Perú crecieron en un 15 % tanto en volumen de producción como en ventas, alcanzando 165 millones de litros y 832 millones de nuevos soles respectivamente. En términos de consumo “per cápita”, el Perú es uno de los países “top” en Latinoamérica en el consumo de bebidas deportivas, ocupando el segundo lugar detrás de República Dominicana. Esta categoría ha desarrollado rápidamente durante el último período promovido por las empresas PepsiCo y Ajeper de forma conjunta con las autoridades regionales a través de eventos deportivos tales como maratones<sup>33</sup> y

debido al precio unitario, donde el costo promedio de las bebidas deportivas por litro sigue siendo el más bajo de la Región. Otra razón fundamental es el ingreso de nuevas marcas y la fuerte competencia entre ellas. Se estima que el mercado de bebidas deportivas en el Perú<sup>34</sup> tendrá un crecimiento anual de 14% hasta el 2014.

La tendencia de los peruanos a cuidar más su cuerpo y a tener una vida más saludable<sup>35</sup>, ha permitido el crecimiento de bebidas con valor agregado, sin gas y con menos azúcar, ayudando a que la categoría de bebidas deportivas puedan expandirse hacia provincias del Perú, siendo dentro de éstas la bodega como el lugar preferido para la compra (78 % de participación). Las ciudades de provincias más destacadas en el consumo durante el año 2011 fueron: Trujillo, Ica y Piura con 40, 35 y 33 % de participación respectivamente<sup>36</sup>. Estos datos son respaldados por un estudio realizado en la ciudad de Trujillo (Perú) en el año 2006, donde se demostró que el mayor porcentaje de personas que consumen bebidas rehidratantes envasadas pertenecen a un mercado de consumidores jóvenes con edades entre 21 – 25 años (41.1 % de participación), los cuales prefieren la marca Gatorade® y consumen estas bebidas principalmente por el ejercicio físico y el cansancio<sup>37</sup>.

En los próximos años, el crecimiento de la categoría de bebidas isotónicas estará impulsado por el cambio de presentación de envases de vidrio hacia envases PET<sup>38</sup> y definitivamente por el consumo en las provincias del Perú, teniendo en cuenta que, para lograr esto, las empresas productoras de bebidas rehidratantes tendrán que informar mucho mejor las ventajas y los efectos de este tipo de bebidas, eliminando la desinformación de estos sectores<sup>36</sup>.

### 2.1.3. Proceso de fabricación: Llenado en caliente

El procesamiento de bebidas isotónicas por llenado en caliente o “Hot Fill”, es una tecnología aceptable para la producción de bebidas de alta acidez comercialmente estériles ( $\text{pH} < 4.6$ ) y se refiere al proceso por el cual las bebidas son calentadas para destruir los microorganismos de importancia y luego llenadas (envasadas) a temperaturas en exceso de un punto de referencia crítico, éste último depende de la combinación de producto y empaque, microorganismos de importancia y la carga microbiana de diseño. Dentro de este mecanismo, el producto caliente es usado para esterilizar el envase<sup>39,40</sup>. Sumo cuidado deben tomarse en cuenta durante este procesamiento y en el almacenamiento, debido a que pueden ocurrir alteraciones sensoriales y fisicoquímicas en las bebidas isotónicas, las cuales influirán en su aceptación por los consumidores. Los factores de conservación más importantes en este tipo de bebidas son: alta acidez, tratamiento térmico (pasteurización), adición de conservantes en algunos casos, la asepsia y adecuación de embalajes en las condiciones de almacenamiento<sup>41</sup>.

Los principales pasos en la fabricación de bebidas isotónicas por esta tecnología son: la mezcla de ingredientes y su estandarización para conseguir una bebida homogénea final; el calentamiento de la bebida (en un intercambiador de calor) y su tiempo de retención (en un tubo de retención) a una temperatura establecida (pasteurización) para alcanzar una muerte microbiana requerida; el llenado en caliente dentro del empaque (vidrio, PET u otro) generalmente a temperaturas mayores a 85 °C; el tapado y la inversión para asegurar la esterilización completa del envase por contacto directo de la bebida caliente con la tapa y la botella; y el enfriamiento en el cual las botellas van descendiendo de temperatura de forma gradual con la ayuda de un túnel de enfriamiento, constituido por diferentes compartimientos de toberas rociadoras de agua con diferentes caídas de temperaturas para evitar dañar las características organolépticas de la bebida y terminar de crear el vacío en el empaque<sup>42,43</sup>.

La combinación del tiempo y temperatura en el tratamiento térmico es diseñada con el fin de llegar a reducir como mínimo 5-log de la carga de microorganismos patógenos<sup>44</sup> o “dianas” que presenta la bebida, lamentablemente al tratar de eliminar a los microorganismos “dianas” en la mayoría de los casos se disminuye y desestabiliza los micro y macro nutrientes en la bebida<sup>45,46</sup> y las características sensoriales se ven afectadas<sup>47</sup>, por lo que esto debe tomarse como referencia al momento de aplicar esta tecnología. Teniendo en cuenta lo anterior, las temperaturas y tiempos de pasteurización varían de fórmula a fórmula en las bebidas deportivas, así por ejemplo Petrus<sup>48</sup> (2000) usó una conjugación de temperatura y tiempo de 95 °C x 5 segundos para una bebida isotónica, considerando como microorganismo “diana” al *Enterobacter aerogenes*, bacteria gram negativa anaerobia facultativa, mientras que Arias<sup>49</sup> (2008) determinó una temperatura y tiempo de 67.3 °C x 15 minutos, cuando formuló una bebida hidratante a base de un fruto amazónico “el Arazá” (*Eugenia stipitata*), De Marchi<sup>50</sup> (2003) consideró una temperatura y tiempo de 92 °C x 4 segundos para una formulación basada en maracuyá, y Asante-Donyinah<sup>51</sup> (2010) usó la conjugación de 70 °C por 30 minutos para tratar térmicamente una bebida deportiva basada en agua de coco y jugo de piña.

Las principales ventajas del proceso de llenado en caliente resultan en que es una tecnología de procesamiento flexible para una amplia gama de bebidas no carbonatadas y requiere menos inversión (capital) que otras tecnologías como el procesamiento aséptico o tetra pack. Por el contrario, sus principales desventajas incluyen: la restricción de empaques, por ejemplo empaques PET que requieren paneles de vacío y contornos de botella, lo que lo hace más caro; temperaturas y tiempos severos; consideraciones en las fórmulas ya que algunos ingredientes son más sensibles al calor como las vitaminas; y restricciones para productos con pH < 4.6 con la excepción de algunos tés de baja acidez que contienen preservantes naturales<sup>40</sup>.

## 2.2. Microbiología de Bebidas

### 2.2.1. Teoría de los obstáculos

#### 2.2.1.1. Concepto barrera, efecto trampolín y tecnología de barreras

Para conseguir que los alimentos y bebidas tengan una estabilidad y seguridad microbiológica, así como también conserven sus propiedades nutricionales y sensoriales, se les deben aplicar diversos factores combinados de conservación, comúnmente llamados barreras<sup>52,53</sup>. Existen en el mundo diversas barreras que permiten conservar los alimentos y bebidas<sup>54,55</sup> como el calentamiento, la refrigeración, la congelación, el secado por congelación, el secado, el curado, el salado, la adición de azúcar, la acidificación, la fermentación, el ahumado y la remoción de oxígeno, sin embargo todas ellas pueden resumirse o están basadas en las siguientes: alta temperatura (F-value), baja temperatura (t-value), actividad de agua ( $a_w$ ), acidificación (pH), potencial redox (Eh), conservantes (pres.), y flora competitiva (c.f.). Estas barreras han sido aplicadas desde tiempos muy remotos de forma empírica y en la actualidad se usan de manera lógica e inteligente para obtener alimentos y bebidas de calidad total, lo que se conoce ahora como la tecnología de barreras o de métodos combinados de conservación, el cual fue derivado del concepto barrera<sup>56-59</sup>.

Por el contrario y en contraste al concepto barrera, un alimento rico en nutrientes y vitaminas fomentará el crecimiento de los microorganismos, lo que se conoce como el “Efecto Trampolín”, por lo tanto las barreras en estos alimentos deberán ser mejoradas, de otra manera serán sobrepasadas, y los microorganismos contaminarán y deteriorarán los alimentos<sup>60-62</sup>.

#### 2.2.1.2. Fundamento de la tecnología de barreras

La conservación de los alimentos y bebidas implica poner a los microorganismos en un ambiente hostil, con el fin de inhibir su crecimiento, acortar su sobrevivencia o causar su muerte. Los microorganismos presentes en un alimento o bebida no deberían de sobrepasar las barreras presentes durante el almacenamiento de un producto, de otro modo el alimento se deteriorará o incluso causará una ETA (Enfermedad Transmitida por Alimentos), causando pérdidas económicas para la industria o muerte en los consumidores. Por ello, entender su fisiología y comportamiento es de suma importancia y es la base para aplicar diversas barreras que permitan conservar los alimentos y bebidas. Los puntos a tomar en cuenta cuando se aplica la tecnología de barreras son los siguientes:

**La homeostasis:** Un fenómeno clave que merece mucha atención dentro de la conservación de alimentos, y es la tendencia a la uniformidad y estabilidad en el ambiente de los organismos<sup>63</sup>. Si la homeostasis de los microorganismos presentes en los alimentos y bebidas es perturbada por factores de conservación o barreras, ellos no se multiplicarán, permanecerán en la fase de latencia o incluso morirán antes de que la homeostasis sea reparada. En resumen, la conservación del alimento o bebida es alcanzada por la perturbación de la homeostasis en los microorganismos presentes sea temporaria o permanentemente. Así los procedimientos más útiles para la conservación de alimentos y bebidas son los más eficaces en superar los mecanismos homeostáticos, que los microorganismos han evolucionado para sobrevivir al estrés originado por ambientes extremos u hostiles<sup>64</sup>.

**El agotamiento metabólico:** Es otro fenómeno de importancia práctica que puede causar la auto-esterilización de un alimento. Los microorganismos presentes en los alimentos, que están tecnológicamente diseñados con barreras, no podrán crecer y morirán, y lo harán más rápidamente si la estabilidad del alimento está cercana al umbral de su crecimiento, la temperatura de

almacenamiento es elevada, los antimicrobianos están presentes y los microorganismos han sido injuriados sub letalmente. Los microorganismos intentarán reparar su homeostasis para sobrepasar el ambiente hostil, haciendo uso de su energía, ocasionando su muerte por el agotamiento metabólico. Se ha concluido que el agotamiento metabólico es acelerado si más barreras están presentes y esto puede ser causado por un incremento en la demanda de energía para mantener la homeostasis interna bajo condiciones de estrés<sup>65</sup>.

**Reacciones de estrés:** Los microorganismos pueden llegar a ser más resistentes<sup>66</sup> o más virulentos cuando están bajo situaciones de estrés, sobre todo si el mismo microorganismo sufre varias situaciones de estrés en distintas fases del procesamiento del alimento o bebida (protección cruzada). Los microorganismos se hacen más resistentes porque generan proteínas protectoras, las cuales son inducidas ya sea por calor, pH, actividad de agua, etanol, componentes oxidativos o por necesidad de nutrientes. Las diversas respuestas de los microorganismos al estrés pueden obstaculizar la conservación de los alimentos y pueden tornarse un problema para la aplicación de la tecnología de barreras. Sin embargo, las exposiciones de los microorganismos simultáneamente a diferentes situaciones de estrés, requerirán que ellos consuman energía para producir dichas proteínas protectoras, conllevándolos a agotarse metabólicamente<sup>67</sup>.

**Conservación “multitarget” o multi objetivo:** Varios efectos sobre la conservación de alimentos pueden ser conseguidos con la aplicación de diferentes barreras sobre un mismo alimento, pudiendo llegar a un efecto aditivo, sinérgico o antagónico<sup>68,69</sup>. El efecto que se desea conseguir, cuando se formula alimentos o bebidas es el sinérgico<sup>70-72</sup>, el cual puede ser alcanzado si las barreras van direccionadas sobre diferentes objetivos dentro de la célula microbiana (sobre la membrana celular, sobre el ADN, sobre el sistema de enzimas, sobre el pH, sobre la actividad de agua, etc.) ocasionando una perturbación en la homeostasis del microorganismo. Además, empleando diferentes barreras a bajas intensidades es



más efectivo que usando una sola barrera con alta intensidad, ya que actúa sobre diferentes “dianas” u objetivos<sup>73-75</sup>. Una aplicación clara en productos lácteos es cuando se combinan antimicrobianos (bio-preservantes) a bajas dosis con suaves tratamientos físicos, logrando expandir el rango de microorganismos a ser inhibidos<sup>76</sup>. Pero de manera general las combinaciones de antimicrobianos con bajos pH, atmósferas modificadas con almacenamiento en refrigeración, baja actividad de agua con suaves aplicaciones de calor o varios tratamientos de conservación no térmicos conllevan a mejorar la estabilidad y protección del alimento<sup>77</sup>.

Otros puntos de suma importancia en la tecnología de barreras son: las células adjuntas (“biopelículas”) y células independientes o sueltas, la cuantificación del comportamiento microbiano (microbiología predictiva), uniformidad del proceso y el acceso a los agentes de preservación (tecnologías) y el impacto sobre la estructura, la calidad y funcionalidad del producto<sup>78</sup>.

#### 2.2.1.3. Clasificación de los factores de conservación

Una bacteria con un tiempo de generación de 20 minutos puede crecer de 1 hacia 1 millón de células en solo 7 horas. Esto hace que necesitemos de un control microbiológico estricto en las plantas de fabricación de alimentos y bebidas, sobre todo porque no son áreas estériles. Las fases de crecimiento y muerte de los microorganismos: fase lag (latencia), fase logarítmica, fase estacionaria y fase de muerte, se ven influenciadas por diversos factores: intrínsecos, extrínsecos, implícitos y de procesamiento, los cuales son aprovechados por la industria para extender la fase de latencia, reducir el ratio de crecimiento o acelerar la destrucción de los microorganismos. Esto ayuda a promover alimentos y bebidas seguros y retardar su deterioro<sup>79</sup>. A continuación, se muestra una descripción de cada una de los factores:

**Factores Intrínsecos:** Son aquellos que son relativos a las propiedades físicas, químicas y biológicas del alimento<sup>80</sup>. Los factores más importantes son los siguientes: pH,  $a_w$ , acidez, entre otros.

**Factores Extrínsecos:** Son aquellos que resultan de las propiedades físicas y químicas del ambiente en el que se mantiene el alimento<sup>81</sup>. Los factores más importantes son: composición de la atmósfera gaseosa, humedad relativa, temperatura, entre otros.

**Factores Implícitos:** Son aquellos efectos que dependen de la microflora particular dominante que inicialmente se desarrolla en respuesta a los factores intrínsecos, extrínsecos y de procesamiento. Pueden ser sinérgicos o antagónicos. Los efectos sinérgicos implican la alteración de las condiciones por un grupo de microorganismos de modo que otro resulta favorecido, esto puede ser como consecuencia de un organismo que elimina una sustancia inhibidora para otro, de un organismo que produce factores de crecimiento requerido para otros o alteración microbiana del pH, contenido de agua, estructura del alimento que favorece el crecimiento de otros. Los efectos antagónicos actúan de modo opuesto<sup>82</sup>.

**Factores de elaboración o de procesamiento:** Son aquellos que son consecuencia de los tratamientos aplicados durante la elaboración de los alimentos y bebidas, los cuales modifican la composición de la microflora por ejemplo los tratamientos físicos y los tratamientos químicos<sup>83</sup>. Los factores más importantes a mencionar en esta clasificación son: el tratamiento térmico, la preservación por adición de conservantes, el tipo de envasado / empaquetado y los tratamientos no térmicos como la alta presión, pulsos de campo eléctricos, irradiación UV, alta presión con dióxido de carbono, entre otros.

#### 2.2.1.4. Aplicación de la tecnología de barreras

La tecnología de barreras es aplicada en una variedad de productos y ha ganado amplia popularidad y aceptación en todo el mundo, así en países industrializados es aplicada en: alimentos mínimamente procesados consiguiendo alta calidad y similaridad a los alimentos frescos; en el cuidado de alimentos refrigerados; en alimentos fermentados; en alimentos saludables bajos en sal, grasa, azúcar, preservantes; en alimentos mínimamente empacados; en procedimientos de empacados ultra limpios consiguiendo baja contaminación de alimentos preservados suavemente, asépticos; en alimentos con bajo potencial de preservantes indeseables (nitrito, sulfitos); en evitar la pérdida de energía por uso de congelación o refrigeración por conversión a alimentos estables a temperatura ambiente; en materias primas descontaminadas por múltiples barreras (carnes, frutas, vegetales); y en mejorar las defensas contra patógenos<sup>84-86</sup>.

En países en desarrollo, la tecnología de barreras es aplicada en: productos de fruta, carnes y pescados (Sudamérica), para mejorar los alimentos tradicionales y alimentos fusión de China y Taiwán, una variedad de productos lácteos, cereales, frutas, aves y pescados (India), en jugos, frutas y canales de carne en el África<sup>87-90</sup>.

En Sudamérica, actualmente la tecnología de barreras se aplica para obtener frutas mínimamente procesadas basándose en 3 enfoques: optimizando los métodos de conservación tradicionales; por desarrollo de procesos suaves mediante combinaciones de métodos tradicionales y nuevos (físicos y químicos) cada uno a baja intensidad; y por el desarrollo de técnicas innovadoras que permitirán desarrollar nuevos alimentos derivados de frutas. Todo esto con el único fin de obtener frutas y derivados con atributos de calidad lo más similares posibles al de los productos frescos<sup>78</sup>.

La tabla N° 2 muestra un resumen sobre la aplicación de la tecnología de barreras en diversos productos, logrando la extensión de la vida útil y el mantenimiento de las características organolépticas.

Tabla N° 2. Aplicaciones de la tecnología de barreras en diversas categorías de alimentos

Categoría de alimento	Ejemplos de productos	Referencias
Frutas	Açaí, Aguaje, Camu Camu, Carambola, Coco, Duraznos, Frutillas, Guayaba, Platano	Alexandre <sup>91</sup> (2004); García <sup>92</sup> (2002); Ramos <sup>93</sup> (2002); Tello <sup>94</sup> (2002); Hashimoto <sup>95</sup> (2005); Araújo <sup>96</sup> (2007); Vidales <sup>97</sup> (1997); Torrezan <sup>98</sup> (1996), Rosas <sup>99</sup> (1994).
Tubérculos	Papa	Mateucci <sup>100</sup> (2011)
Verduras	Espinaca, Pimiento Rojo, Zanahoria	Piagentini <sup>101</sup> (1999); Horvitz <sup>102</sup> (2010); Jois Vibhakara <sup>103</sup> (2006)
Productos de panificación	Bollerías, Pan al vapor (Sudáfrica)	Guynot <sup>104</sup> (2003); Lombard <sup>105</sup> (2000)
Leguminosas	Frijoles	Sluka <sup>106</sup> (2009)
Alimentos regionales	Lup Cheong (China): Salchicha cruda no fermentada, Paneer (India): Queso de campo mezclado con salsa de tomate, cebollas y especias	Leistner <sup>107</sup> (1994)
Cárnicos y pescados	Cecina, Charqui, Pescado	Iribarren <sup>108</sup> (2002); Shimokomaki <sup>109</sup> (1998); Guillem <sup>110</sup> (2002)
Leche y productos lácteos	Leche, queso, suero	Rodriguez <sup>111</sup> (2010); Pérez <sup>112</sup> (2010); Roche <sup>113</sup> (1991)
Salsas	Salsas para aderezo	González <sup>114</sup> (1998)

#### 2.2.1.5. Calidad total en la conservación de alimento y bebidas

Un tratamiento térmico aplicado para la conservación de un alimento no necesariamente será efectivo para otro por más similar que sea en su composición, así por ejemplo un tratamiento térmico de 71.7 °C por 15 minutos puede ser tomado como base para destruir los ciclos logarítmicos de *Salmonella* en leche fluida, pero no será efectivo en la destrucción de la misma *Salmonella* en leche chocolatada, por lo que confirma que cada matriz y el ambiente de procesamiento del alimento provee un único ambiente microbiano que prohíbe una extrapolación hacia otras matrices<sup>79</sup>. Por ello una correcta e inteligente combinación de la tecnología de barreras (usada para el diseño de alimentos y bebidas), del concepto HACCP (usado para el control de procesos) y de la microbiología predictiva (usada para el refinamiento del proceso) aplicados a cada alimento o bebida individualmente, permitirá asegurar la calidad total de los mismos<sup>115,116</sup>.

#### 2.2.2. Microorganismos de importancia en el deterioro de bebidas tratadas térmicamente

##### 2.2.2.1. Bacterias

Históricamente, las bebidas a base de frutas como cítricos o manzanas no son consideradas como bebidas de alto riesgo para la salud (con excepción de la Patulina en jugo de manzana), debido a que presentan un pH menor a 4.6, limitando el crecimiento de los microorganismos patógenos. Sin embargo la FDA (Food and Drug Administration) de los E.E.U.U., a raíz de observar varios episodios de enfermedades ligadas a estos productos, estableció desde el año 2001 una regla HACCP para jugos, donde los procesadores deben asegurar que el producto reciba un tratamiento capaz de conseguir como mínimo una reducción de 5 log de un patógeno tal como *E. coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* u otro de importancia<sup>117</sup>. Para cumplir este objetivo, pueden

aplicarse diversos tratamientos como pasteurización térmica, alta presión, pulsos eléctricos u otros similares. Una aplicación práctica para la industria de jugos de manzana, naranja y uvas es asegurarse que éstos pasen por un tratamiento térmico a 71.1°C por 3 segundos como mínimo<sup>118</sup> (probado para reducir 5-log en *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* y *Listeria monocytogenes*) o que los jugos de uvas blancas reciban una dosis de irradiación UV de 75.04 mJ/cm<sup>2</sup> por 10 minutos para reducir 5-log de *E. coli* K12<sup>119</sup>. Al aplicar cualquiera de estos tratamientos a los productos, se consigue eliminar los microorganismos patógenos, pero al mismo tiempo se logra eliminar o disminuir la carga microbiana relacionada con microorganismos aerobios mesófilos viables, bacterias ácido lácticas, mohos y levaduras, los cuales están implicados en el deterioro de las bebidas.

Por otro lado, en los últimos años se ha realizado una investigación profunda sobre bacterias deterioradoras de bebidas (no patogénicas) que son capaces de resistir tratamientos térmicos y alta acidez. Entre ellas, se encuentra el *Alicyclobacillus* spp., aislado en 1982 e identificado como el agente causante de deterioro de un jugo de manzana pasteurizado. Este microorganismo posee distintas características, una de las cuales es su capacidad para sobrevivir a procesos comerciales de pasteurización y por producir olores extraños en los jugos de frutas, siendo el guayacol y los halofenoles los principales agentes químicos identificados como el olor extraño en el deterioro<sup>120</sup>.

*Alicyclobacillus* spp. se halla disperso en la naturaleza, y puede llegar a colonizar los ambientes de procesamiento de jugos y concentrados de frutas<sup>121</sup>, ubicándose principalmente en el agua de condensado durante el proceso de concentración<sup>122</sup>. Recientemente estudios han demostrado que *Alicyclobacillus* spp. también está presente en los aromas concentrados naturales de manzana y pera, pudiendo contaminar los productos finales de los cuales formará parte<sup>123,124</sup>.

La especie de *Alicyclobacillus acidoterrestris*, considerada como la especie de deterioro más importante dentro del género *Alicyclobacillus*, ha sido investigada en

una gama de productos de frutas en el mundo, por ejemplo en un estudio realizado en Campinas (Brasil), se halló en un 28 % en las muestras de jugo de maracuyá. Al mismo tiempo se registró que el mejor binomio de tiempo y temperatura para la activación de sus esporas fue de 70 °C por 20 minutos y que las cepas aisladas sobrevivieron al proceso de pasteurización, aplicado por las industrias procesadoras de jugos<sup>125</sup>. Por otro lado en la Argentina, un estudio de 14 años liderado por el Dr. Oteiza<sup>126</sup> y realizado en 8556 muestras de jugos de frutas y vegetales, dió como resultado la presencia de *Alicyclobacillus* en jugos de manzana, pera, durazno, mandarina, piña, mango, ciruela, guayaba, albaricoque, limón, banana, zanahoria, fresa, toronja y remolacha.

Las industrias de jugos, pulpas y concentrados de frutas han reconocido que *Alicyclobacillus* spp. es uno de los microorganismos “diana” en el control de calidad de estos productos<sup>127</sup> y por ello, al diseñar los procesos térmicos, se debe tener en cuenta su resistencia, y principalmente la de sus esporas<sup>128</sup>. Valores “D”, para esta bacteria, han sido calculados y pueden ser usados por las industrias procesadoras de jugos concentrados de manzana, así por ejemplo tenemos que valores de 15.63, 9.21, 6.23 y 3.50 minutos son capaces de destruir las esporas de esta bacteria cuando son sometidas a temperaturas de 88, 90, 92 y 95 °C respectivamente<sup>129</sup>. Adicionalmente, se ha creado una serie de medidas preventivas<sup>130</sup>, para ser llevadas a cabo durante el procesamiento de jugos y concentrados de frutas, ya que la resistencia térmica de las esporas de *Alicyclobacillus* spp. es muy alta, pudiendo ocasionar pérdidas en las características organolépticas del producto final cuando se le aplican altas temperaturas al tratar de eliminar las esporas.

Una de estas medidas es que cuando las plantas de procesamiento se encuentren en una época alta de producción, es recomendable que la planta adopte un tiempo de producción continuo no mayor a 84 horas y entre operaciones debe realizarse una limpieza CIP (“Cleaning-in-place”), con la finalidad de minimizar la acumulación de *Alicyclobacillus* en jugos concentrados<sup>131</sup>. Otras medidas que

coadyuvan a evitar el deterioro de los productos por este microorganismo, son las siguientes: análisis del agua usada en la planta, análisis del condensado del concentrador, la fruta no debe ser recogida del suelo ni estar almacenada en contacto directo con el suelo, en el procesamiento la fruta excesivamente maltratada o podrida debe ser rechazada (incluso si está sujeta a una etapa de limpieza posterior). Durante el embotellado de bebidas a base de frutas (llenadas en caliente) el enfriamiento del producto (después de la pasteurización y del llenado) debe ser tan rápido como sea posible<sup>132</sup> hasta conseguir temperaturas menores a 20 °C.

*Clostridium pasteurianum*, es otra bacteria anaerobia obligada y formadora de esporas, la cual es resistente a elevadas temperaturas, pudiendo germinar a pH 4.3 en jugos de manzanas embotellados. En bebidas ácidas, esta bacteria produce los gases H<sub>2</sub> y CO<sub>2</sub> como un bioproducto de su crecimiento, resultando en empaques hinchados. También produce ácido butírico, que lleva a un olor y sabor extraño en la bebida y que es fácilmente detectado por los consumidores, produciendo su rechazo. En los E.E.U.U, *Clostridium pasteurianum* pudo ser aislado e identificado a partir de múltiples brotes de deterioro de lotes de jugo de manzana de vida útil larga (fabricado a partir de concentrado importado, el cual contenía 1 espora/2Litros), y que presentaban empaques severamente hinchados. El deterioro ocasionó un recojo voluntario del producto y una pérdida económica significativa para el fabricante, porque las botellas de 1.89 Litros del lote se encontraban hinchadas (mostrando altos niveles de producción de gas), con turbidez y con un fuerte olor a ácido butírico. Feng<sup>133</sup> y col. basados en un estudio en jugo de manzana, recomendaron que una medida clave para prevenir el deterioro potencial debido a *Clostridium pasteurianum* en jugos de frutas es controlar el pH del producto final y mantenerlo por debajo de 4.0, siempre que el nivel de contaminación sea bajo.

Otra bacteria que causa deterioro en bebidas, es *Asaia* sp., un género descrito en el año 2002, que tiene principalmente 2 especies: *A. bogorensis* y *A. siamensis*.



Estos bacilos gram negativos causan deterioro en agua embotellada con sabor a frutas. Este género tiene el potencial de proliferar en bebidas con un bajo pH, donde la fermentación no es requerida, y se incluye en el linaje de las bacterias ácido acéticas, por su relación filogenética con los géneros *Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Acidomonas* y *Gluconacetobacter*<sup>134</sup>. El deterioro que causó esta bacteria en un lote de agua embotellada con sabor a frutas estuvo asociado a la formación de turbidez (equivalente a la escala de McFarland N° 5), con un olor característico y un pH de 3.5. Estas bacterias crecen sobre “Agar Plate Count” a 22 y 30 °C por 48 horas formando colonias lisas, translúcidas y brillantes, de color palo rosa, las cuales son extremadamente pequeñas (de 1 a 2 mm de diámetro, aproximadamente), y son incapaces de crecer a 37 °C, teniendo mínima influencia sobre la salud humana por su incapacidad de reproducirse a la temperatura del cuerpo humano. Son catalasas positivas y oxidasas negativas, y presentan relativa resistencia a los antibióticos tales como la ceftazidima (30 µg), amikacina (30 µg), imipenem (10 µg), entre otros, sin embargo se ha demostrado que es sensible a la netilmicina, gentamicina y doxiciclina<sup>135</sup>. Recientemente hay reportes de deterioro en bebidas de frutas y en té frío embotellado listo para beber, incluyendo productos ácidos conservados con benzoato, sorbato y dimetildicarbonato. Estas bacterias, debido a su superficie celular hidrofílica, también han sido halladas en el equipo de procesamiento en forma de “biopelículas”, siendo persistentes y difícilmente removibles con las operaciones de saneamiento común<sup>136,137</sup>.

*Asaia lannensis*, ha sido reportado recientemente en Polonia como un deteriorador de agua mineral embotellada sabor a fresa (pH entre 3.3 – 3.6), produciendo flóculos como un defecto visual en este producto a las 2 semanas desde su producción y durante su distribución. Este microorganismo también fue aislado del concentrado sabor fresa natural<sup>138</sup> usado en la producción del agua mineral saborizada, por lo que se pudo concluir que este componente podría ser la fuente de contaminación final del producto. Esta bacteria tiene una gran capacidad de adherencia y por consiguiente puede formar “biopelículas”, siendo la superficie más susceptible la del empaque a base de PET, usado en la industria de bebidas,

seguido por el vidrio y el polipropileno, así lo demostró un estudio realizado por Kregiel<sup>139</sup>, dando valores de 2900, 320 y 44 RLU/cm<sup>2</sup> respectivamente, durante un período de incubación de 14 días.

#### 2.2.2.2. Mohos

La importancia de los mohos en las bebidas se relaciona principalmente con el deterioro, pudiendo causar olores y sabores extraños, decoloración, podredumbre y formación de micelio visible<sup>140</sup>, sin embargo en los últimos años su importancia ha crecido en temas de inocuidad alimentaria, debido a que pueden producir micotoxinas, las cuales son perjudiciales para la salud y por ello una mejora en la prevención y el control de mohos en los alimentos debe estar basada en el conocimiento de la flora fúngica<sup>141</sup>.

La mayoría de las esporas y células vegetativas de los mohos son fácilmente destruidas por el calor, sin embargo existen esporas de mohos que poseen una suficiente resistencia térmica (ascosporas) para sobrevivir a los procesos de los alimentos ácidos<sup>142</sup>. Estas esporas pertenecen a los llamados mohos termorresistentes, los cuales son considerados de alta importancia, porque son capaces de resistir temperaturas de pasteurización normalmente aplicadas por las industrias en el procesamiento de jugos, pulpas y bebidas de frutas de larga vida útil<sup>143-145</sup>. La primera incidencia de estos microorganismos fue en el año de 1930, cuando en Inglaterra *Byssochlamys fulva* causó deterioro en fresas enlatadas<sup>146</sup>. Luego, a través de los años, fueron apareciendo diversos casos de deterioro en diferentes tipos de productos y en diferentes partes del mundo<sup>147-149</sup>. Estos microorganismos pueden colonizar y deteriorar también: aceitunas verdes<sup>150</sup> (enlatadas y procesadas térmicamente), aguas<sup>151-152</sup>, bebidas rehidratantes<sup>153</sup> o también productos lácteos tales como quesos, helados<sup>154</sup>, y margarina<sup>155</sup>.

Los géneros y especies comúnmente implicados y de mayor importancia en el deterioro de productos de frutas pasteurizadas son: *Byssochlamys*, *Neosartorya*,

*Talaromyces* y *Eupenicillium*<sup>1,156-157</sup>. Otras especies de mohos resistentes al calor que también han sido aisladas de frutas con menores incidencias, son: *Paecilomyces variotii*<sup>158</sup>, *Devriesia spp.*, *Hamigera striata*<sup>159</sup>, *E. chevalieri*<sup>160</sup>, *Hamigera avellanea*, *Thermoascus crustaceus*<sup>161</sup> y algunas especies de *Fusarium*, como *F. oxysporum*, recientemente han tomado importancia<sup>162</sup>.

Estos microorganismos se encuentran ampliamente distribuidos en el suelo<sup>163-166</sup>, en el ambiente y consecuentemente pueden migrar y contaminar las frutas, las cuales muchas veces caen a la tierra durante las cosechas y es de esta forma como sucede la contaminación, siendo las frutas más afectadas las que crecen muy cercanas al suelo como las fresas y uvas<sup>167-168</sup>. Una vez que los mohos termorresistentes han sido llevados a las plantas de fabricación por medio de las materias primas o materiales de empaque, éstas pueden colonizar los ambientes y máquinas<sup>169</sup>, siendo después muy difícil de retirarlos. Así lo demuestran los aislamientos de hongos termorresistentes en glucosa, tanques de glucosa, filtros de tanques, empaquetaduras, tuberías corroídas, tuberías de producto, enjuagadoras de botellas, botellas, tapadoras y túneles de enfriamiento en plantas de bebidas rehidratantes<sup>9</sup>.

Algunas especies de *Byssochlamys* pueden producir gas<sup>170</sup> y ser consideradas como productoras potenciales de micotoxinas, tales como la Patulina<sup>171-172</sup>, sobre todo en las etapas post-pasteurización durante el procesamiento de bebidas. Los productos deteriorados por mohos termorresistentes se manifiestan por lo general con: alteraciones del sabor, producción de gas, producción de micelio visible, separación de fases en jugos y bebidas de fruta y alteración de los tejidos de las frutas debido a la producción de enzimas pectinolíticas<sup>173</sup>, ocasionando grandes pérdidas económicas sobre los lotes afectados por la inacceptabilidad del público consumidor.

Tratar de eliminar los mohos termorresistentes con tratamientos térmicos más elevados o por tiempos más prolongados no es viable, desde que afecta la calidad

y propiedades nutricionales de los productos, por el contrario, el calor activa las ascosporas ocasionando la germinación de los mismos en el producto final durante el almacenamiento<sup>174</sup>. La mejor forma de eliminar los mohos termorresistentes es en los pasos previos al ingreso de la materia prima a la planta o incluso en los primeros pasos del procesamiento. Para ello, se debe seguir buenas prácticas de manufactura en la línea de fabricación, asegurando un transporte adecuado para que no haya riesgo de rompimiento de las frutas (facilitando con ello la contaminación con los mohos termorresistentes), seleccionando y dejando pasar sólo las frutas sanas y aptas para el proceso, garantizando un correcto lavado y sanitización de las frutas, y evitando el contacto de los equipos de la planta de proceso con tierra<sup>175</sup>.

### 2.2.2.3. Levaduras

De acuerdo con Fleet<sup>176</sup> (2011), el deterioro de bebidas por levaduras se produce por el crecimiento de estos microorganismos en el producto final. Los componentes de las bebidas son utilizados como sustratos de crecimiento por las levaduras y son transformados en una variedad de metabolitos, ocasionando los indeseables cambios químicos, físicos y sensoriales en el producto final. La producción del gas dióxido de carbono (uno de los principales metabolitos de deterioro), causa que los empaques de bebidas se hinchen, distorsionen y eventualmente exploten como una consecuencia de la presión interna que se ejerce, pudiendo llegar a presiones entre 5 – 10 atmósferas.

La mayoría de levaduras no son resistentes al calor<sup>177</sup>, destruyéndose fácilmente en pocos minutos a temperaturas entre 55 y 65 °C, específicamente entre 5- 10 minutos a 55 °C y < 1 minuto a 65 °C. La resistencia térmica de las levaduras es comparable al de las bacterias vegetativas, sin embargo las ascosporas de levaduras pueden ser más resistentes al calor que las células vegetativas. Adicionalmente, la resistencia térmica de las células de levaduras decrece a valores de pH bajos y se incrementan con bajas actividades de agua ( $a_w$ ).

*Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, y ocasionalmente especies de *Brettanomyces* y *Candida* son las levaduras principalmente responsables del deterioro de jugos de frutas procesados térmicamente<sup>178</sup>. Aislamientos de *Candida pelliculosa* y *Kloeckera apis* en jugos y néctares de frutas tropicales pasteurizados<sup>179</sup>, han sido reportados también en Camerún, en los sabores de piña, guayaba y maracuyá.

Otro gran grupo de bebidas tratadas térmicamente son las llamadas “thermally processed non-preserved CSDs” (bebidas carbonatadas sin conservantes procesadas térmicamente), y son bebidas carbonatadas con 1.5–2.5 volúmenes de CO<sub>2</sub>, llenadas en frío en botellas de vidrio, en botellas de plástico resistentes al calor o en latas de aluminio, y llevadas a un túnel de pasteurización (generalmente entre 65–75 °C por 10–20 minutos) para cuidar la estabilidad microbiológica. Estos productos pueden contener entre 5 – 10 % (o más) de jugos de frutas<sup>180</sup>. En este tipo de bebidas tales como los “sparkling juices” o jugos espumosos, las sodas orgánicas o totalmente naturales, y las bebidas energizantes, las levaduras son los principales microorganismos de deterioro, siendo los géneros más importantes *Saccharomyces* spp., *Pichia* spp., y *Kloeckera* spp., los cuales forman ascosporas resistentes al calor capaces de sobrevivir a la pasteurización, pudiendo germinar y crecer en la bebida final. La manifestación del deterioro típicamente incluye abundante producción de CO<sub>2</sub> (con una probable explosión o ruptura del empaque), generación de olor y sabor extraño (etanol, éster, ácido orgánico, acetaldehído), turbidez, opalescencia y formación de sedimento o películas<sup>181</sup>.

### 2.3. *Fusarium oxysporum*

El Reino Fungi, que comprende a las levaduras y a los mohos, incluye cuatro filos<sup>182</sup>: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota* y *Ascomycota*. Dentro de ellos, el género *Fusarium* se encuentra ubicado en *Ascomycotas*<sup>183</sup> y es uno de los mohos más importantes debido a su capacidad patogénica en plantas y por producir potentes micotoxinas las cuales afectan a los animales y a los seres humanos. También es conocido porque puede deteriorar productos alimenticios como: leche<sup>184</sup>, leches saborizadas UHT<sup>185</sup>, mermeladas<sup>186</sup>, palomitas de maíz o popcorn<sup>187</sup>, jugo de naranja sin pasteurizar<sup>188</sup> y frutas como bananos (en sus variedades de la Isla, Manzano y Seda), papaya, tomate, naranja, palta, uva italia, chirimoya y piña<sup>189</sup>.

Además las especies de *Fusarium* de origen alimentario se caracterizan por un rápido crecimiento de sus colonias con un micelio aéreo flocoso y por la pigmentación de sus colonias que varía desde rosa pálido hasta un violeta azulado dependiendo de las especies y las condiciones de crecimiento<sup>190</sup>. Los conidios son producidos a menudo en esporodoquios que aparecen como puntos viscosos en el cultivo y en algunos casos pueden ser prolíficos que se unen en una gran capa viscosa. El típico conidio de *Fusarium* (macroconidium) es fusiforme, multicelular por septas transversales, con una característica de una célula basal con forma de pie y una célula apical apuntada. Adicionalmente, algunas especies pueden también producir conidios menores (microconidios), los cuales existen mayormente como unicelulares, en algunos casos de 3 a 5 células, y varían desde globosas, ovals, reniformes hasta fusiformes. Unas pocas especies producen microconidias en cadenas, los otros lo hacen en forma de cabezas viscosas o solitarias. En general, las especies de *Fusarium* prefieren condiciones húmedas con alta actividad de agua (mayor que 0,86) y crecen bien a temperaturas alrededor de 0 – 37 °C.

Existen especies del género *Fusarium* tales como *Fusarium graminearum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium proliferatum* y *Fusarium culmorum* las cuales son productoras de micotoxinas<sup>191-193</sup> como la Zearalenona, Deoxynivalenol, Fumonisin y Nivalenol, y otras con capacidad patogénica en plantas como *Fusarium oxysporum*.

### 2.3.1. Definición y ocurrencia

*Fusarium oxysporum* es un moho que dependiendo de las condiciones de crecimiento (tiempo, temperatura, medio de cultivo, entre otros) puede presentar 3 tipos de esporas: macroconidias, microconidias y clamidosporas<sup>194</sup>.

En cuanto a sus **macroconidias**, están dispersas en algunas cepas, pero usualmente son abundantes en los esporodoquios y ocasionalmente en hifas en crecimiento sobre la superficie del agar. Son de longitud cortas a medianas, relativamente delgadas, rectas o ligeramente curvadas y de pared delgada. La mayoría de aislados producen abundante esporodoquio naranja pálido, sin embargo en algunos aislados los esporodoquios pueden ser escasos, dispersos o no existen. Su célula apical es cónica y curva, a veces con un ligero gancho. Sus células basales son en forma de pie a punteadas. Presentan usualmente 3 septas.

Sus **microconidias**, son esporas unicelulares, abundantes en el micelio aéreo (el cual se presenta como cabezas falsas), son ovales, elípticas o en forma de riñón y por lo general no presentan septas.

Sus **clamidosporas**, son esporas formadas a partir de la condensación de células de las hifas o de las macroconidias y se caracterizan por poseer paredes bastante gruesas, lo que las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables o a la ausencia de plantas hospedantes. Son lisas o rugosas amuralladas (con pared), se forman rápidamente y en abundancia (de 2 a 4 semanas en "Carnation Leaf-piece Agar") para la mayoría de los aislamientos,

pero en algunos casos los pueden formar lentamente. Usualmente se forman solas o en pares, pero también pueden ser halladas en “clusters” (agrupaciones) o en cadenas cortas. Pueden ser terminales o intercalares en las hifas aéreas, sumergidas o superficiales y son las principales responsables de la sobrevivencia del moho en tejidos muertos de plantas hospedantes o en el suelo.

En en la tabla N° 3 se muestra las características de las colonias de *Fusarium oxysporum* en diferentes medios de cultivo, los cuales han sido descritos por Pitt<sup>195</sup> y col. (2009) y en la figura N° 1 se muestra una foto con las características morfológicas de *Fusarium oxysporum*.



Tabla N° 3. Características de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en medios de cultivo

Medio de cultivo	Diámetro de colonia ( mm)	Características del micelio	Otras características de importancia
CYA (Czapek Yeast Extract Agar)	50 – 70 mm, algunas veces cubren el total de la placa Petri.	Micelio flocoso de color blanco a grisáceo y en el reverso es de pálido a gris verde pálido.	-
MEA (Malt Extract Agar)	65 – 70 mm, a menudo cubriendo el total de la placa Petri.	Micelio flocoso de color blanco a magenta grisáceo pálido y en el reverso de magenta grisáceo a morado oscuro, a menudo más pálido en los bordes.	-
G25N (25 % Glycerol Nitrate Agar)	12 – 16 mm, ocasionalmente grandes.	-	A 5 °C hay germinación con formación de micro colonias. A 37 °C no hay crecimiento o las colonias crecen máximo a 5 mm.
PDA (Potato Dextrose Agar)	25 – 40 mm, a temperaturas de 25 °C y 30 °C, después de 3 días.	Colonias con micelios blancos, palo salmón o palo malva, algunas veces denso y flocoso. En el reverso es palo salmón, a menudo malva centralmente, algunas veces magenta oscuro, violeta o magenta grisáceo.	A menudo con esporodoquio en una masa central y algunas veces en uno o 2 pobremente anillos concéntricos definidos.

Tomado de Pitt JI, Hocking AD<sup>195</sup>. Chapter 5: Primary Keys and Miscellaneous Fungi. In: Pitt JI, Hocking AD, editors. Fungi and Food Spoilage. Third edition. New York: Springer Science + Business Media, LCC; 2009. p. 53-143.

# *Fusarium oxysporum*

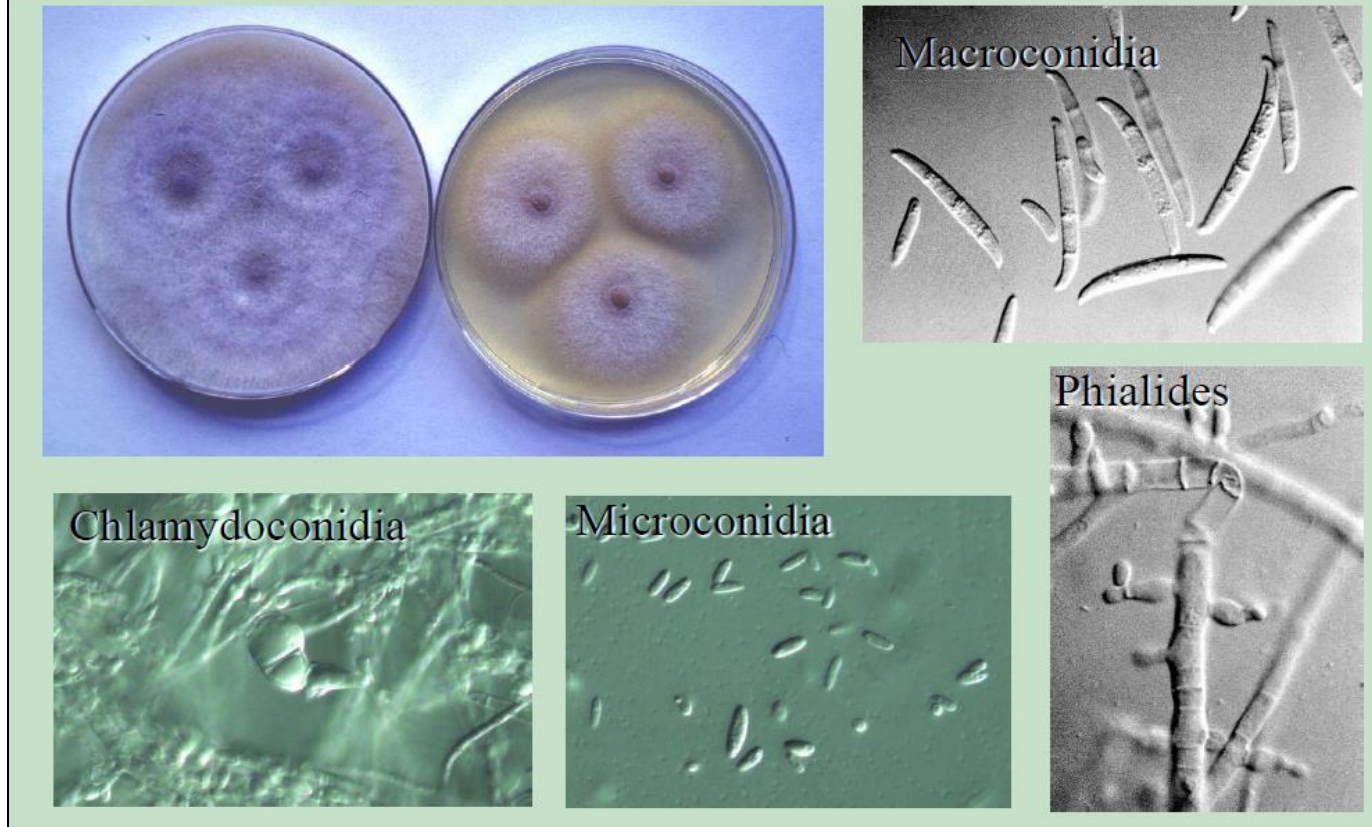


Figura N° 1. Características macroscópicas y microscópicas de *Fusarium oxysporum*.

Tomado de: Tran-Dinh N, Hocking A, Charley N. *Fusarium oxysporum* as a spoilage agent of ready-to-drink beverages. In: 8<sup>th</sup> International Mycological Congress; 2006 August 20-25; Cairns, Australia<sup>12</sup>.

*Fusarium oxysporum* es responsable por un gran número de enfermedades en plantas, usualmente envolviendo un síndrome de marchitez vascular. La mayoría de los aislados causantes de éste síndrome son cepas específicas que infectan solo un pequeño número de plantas hospederas y que son diferenciadas sobre la base de patogenicidad como formas especiales<sup>196</sup>. Por lo anteriormente dicho y a través del tiempo, se ha comprobado que *Fusarium oxysporum* es un agente patogénico en plantas. Así por ejemplo en Colombia se registraron epidemias muy severas en la zona bananera del Magdalena, también en las zonas productoras de pepino cohombro en los departamentos de Cundinamarca y del Valle del Cauca y en los cultivos de clavel para exportación en la Sabana de Bogotá<sup>197</sup>, mientras que en la región Mid Murray de Sudáfrica, este hongo es causante de enfermedades en cebollas<sup>198</sup>. Adicionalmente, estudios de investigación en Nigeria<sup>199</sup> han demostrado que también está presente en tomates, causando su deterioro.

Recientemente, en los últimos años, se han reportado casos de deterioro causados por *Fusarium oxysporum* en: jugos y leches saborizadas UHT empacadas asépticamente (Australia), bebidas lácteas en Nueva Zelanda y en otros lugares como Singapur, Sudáfrica, Estados Unidos y Europa<sup>12,185</sup>. Este moho puede causar en unas pocas semanas un olor similar al de los quesos azules en leches UHT pudiendo producir gas y a menudo es detectado cuando los empaques comienzan a hincharse. Puede ingresar a los empaques de leche UHT a través del aire contaminado en la máquina de llenado y una vez dentro es muy difícil eliminarlo<sup>200</sup>.

### 2.3.2. Fuentes de contaminación – Ecología

*Fusarium oxysporum* ha sido aislado en agua de bebida<sup>152</sup> y está ampliamente distribuido en el ambiente, pudiendo ocasionar daños en diferentes tubérculos (camotes, papas), frutas (melones, tomates, bananas, cítricos, piñas), cereales (maíz, arroz), vegetales (espárragos) y otros misceláneos (cacao, quesos, palmas, soya, pecanas, bebidas pasteurizadas y otros)<sup>195</sup>. Se ha aislado también en

ambientes de fabricación de productos lácteos<sup>201</sup> (yogurt) y de partes de máquinas de proceso incluyendo las empaquetaduras, sellos<sup>12</sup> y toberas rociadoras de agua del túnel de enfriamiento usado en el proceso de bebidas isotónicas llenadas en caliente. Existen también reportes que se ha aislado de alimentos completos para su uso en hospitales y en alimentos pasteurizados<sup>202</sup>.

### 2.3.3. Factores que afectan su crecimiento

Pitt<sup>195</sup> y col. (2009), han reportado que su temperatura óptima de crecimiento está entre 25 °C y 30 °C, con un mínimo de 5 °C y un máximo de 37 °C. Con respecto al pH, es capaz de crecer en un amplio rango (entre 2.2 a 9.0), con un pH óptimo de 7.7.

Atmósferas de 20 – 40 % de CO<sub>2</sub> con 1 ó 5 % de O<sub>2</sub>, reducen el ratio de crecimiento de la colonia de *Fusarium oxysporum* y su contenido de ergosterol en un 40 % – 50 % y 80% – 90 % respectivamente<sup>203</sup>, lo que indica que éste microorganismo es capaz de crecer en ambientes anaeróbicos<sup>204</sup>, sobreviviendo en bebidas carbonatadas<sup>205</sup>, tolerando bajos niveles de oxígeno<sup>12</sup> (< 1%) y elevadas concentraciones de CO<sub>2</sub>, creciendo débilmente en 99 % de CO<sub>2</sub>. Sin embargo, el bicarbonato de sodio o de potasio, es capaz de reducir el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, afectando su ratio de crecimiento<sup>206</sup>.

El amonio provoca un rápido descenso del pH extracelular en *Fusarium oxysporum* reprimiendo sus funciones de virulencia en las plantas. Esto fue demostrado cuando plantas de tomate suplementadas con amonio durante la infección con *F. oxysporum* mostraron una reducción significativa de los síntomas de marchitez vascular en comparación con plantas suplementadas con nitrato<sup>207</sup>.

Con respecto a la actividad de agua, estudios han demostrado que *Fusarium oxysporum* es capaz de crecer en el medio Agar Papa Dextrosa (PDA) a 25 °C y 15 °C entre 0,90 - 0,995 y entre 0,95 - 0,995 de actividad de agua ( $a_w$ ) respectivamente<sup>208</sup>, siendo el crecimiento máximo cuando la  $a_w$  fue de 0,995 y la

temperatura de 25 °C. Por otro lado, también se ha reportado que la  $a_w$  mínima para su crecimiento es de 0,89 a 20 °C, después de un tiempo de germinación de 2 meses<sup>195</sup>.

#### 2.3.4. Deterioro de bebidas pasteurizadas

Desde el año 2001, en Australia y Nueva Zelanda, se han reportado casos de contaminación por *Fusarium oxysporum* en bebidas de frutas, con soya y lácteas tratadas térmicamente y llenadas de forma aséptica. Problemas similares se dieron en Europa, Asia y Norte América, donde este microorganismo colonizó el área aséptica del equipo de envasado, siendo muy difícil su eliminación<sup>185,195</sup>.

En bebidas que son producidas usando la tecnología de llenado en caliente, la contaminación se focaliza en las fallas durante la producción (pre pasteurización, proceso térmico, post pasteurización y sistema de tapado) y en las fallas con los ingredientes y empaques<sup>209</sup>. Adicionalmente, se ha demostrado que *Fusarium oxysporum* es inactivado a 63 °C x 45 segundos (solución de pH = 4.2 y °Brix = 10), temperaturas y tiempos mucho menores de los cuales la industria de bebidas usa en los procesos de pasteurización o UHT (“Ultra High Temperature”)<sup>12</sup>. Por ello, y debido a su capacidad de crecer a bajas tensiones de oxígeno, el deterioro de bebidas pasteurizadas causado por este microorganismo se focaliza en las etapas post pasteurización, principalmente en la etapa de tapado y en el enfriado de botellas, que es donde se termina de crear el vacío.

#### 2.3.5. Episodio de contaminación de bebidas isotónicas en el Perú

En el año 2009, en una planta de fabricación de bebidas no carbonatadas ubicada en el Callao, sucedió un problema de deterioro relacionado con mohos en diferentes lotes y sabores de bebidas isotónicas comercializadas en el Perú. La característica principal de deterioro en las bebidas fue la presencia de hifas visibles en suspensión (data no publicada).

De los lotes afectados se seleccionaron 6 unidades con presencia de contaminación visible (hifas), de diferentes sabores (manzana, lima limón y mandarina), las cuales fueron enviadas al laboratorio BCN Research Laboratories, Inc., ubicado en los Estados Unidos, para su aislamiento e identificación, bajo la dirección de la PhD. Emilia Rico.

Los resultados de la tabla N° 4 que se muestra a continuación, han sido tomados del Sample Analysis Report N° 09-081701 emitido el 01/09/09 por el BCN Research Laboratories, Inc., y muestra la identificación de *Fusarium oxysporum* en diferentes sabores de bebidas isotónicas, confirmando a este moho como el agente responsable de esta contaminación.

Tabla N° 4. Identificación de *Fusarium oxysporum* en bebidas isotónicas

Código	Descripción de la muestra	Identificación del cultivo
81773	Bebida isotónica sabor Apple VENCE 17ENE10 SI17D09A 15:09	<i>Fusarium oxysporum</i>
81774	Bebida isotónica sabor Lima Limón VENCE 15ENE10 SI15D09A 14:13	Crecimiento no detectado
81775	Bebida isotónica sabor Lima Limón VENCE 15ENE10 SI15D09A 12:49	Crecimiento no detectado
81776	Bebida isotónica sabor Lima Limón VENCE 15ENE10 SI15D09A 13:50	<i>Fusarium oxysporum</i>
81777	Bebida isotónica sabor Mandarina VENCE 27MAR10 SI27F09A 16:48	<i>Fusarium oxysporum</i>
81778	Bebida isotónica sabor Mandarina VENCE 27MAR10 SI27F09A 18:24	<i>Fusarium oxysporum</i>

### 2.3.6. Prevención y control

Una de las formas de controlar el crecimiento de *Fusarium oxysporum* es centrándose en los factores extrínsecos, tal es así que al estar en ambientes con 80 % de CO<sub>2</sub> – 20 % de N<sub>2</sub> o con 60 % CO<sub>2</sub> – 40 % N<sub>2</sub> la germinación de este moho se inhibe completamente<sup>210</sup>. Otra forma es limitando su crecimiento con factores intrínsecos, por ejemplo usando ácidos grasos como el ácido láurico, que inhibe el crecimiento de *F. oxysporum* hasta por 30 días cuando es aplicado en concentraciones de 20 ppm en medio PDA<sup>211</sup> o usando el eugenol (el mayor componente fenólico del aceite de clavo) como antifúngico. Campaniello y col. (2010), encontraron que altas concentraciones de eugenol (150 ppm) mostraron actividad fungicida contra *Fusarium oxysporum*<sup>212</sup>, mejorando su inhibición cuando se combina 100 ppm de eugenol<sup>213</sup> con un pH de 2.5. También el benzoato de sodio a concentraciones de 200 y 400 mg/L decrecieron 3 log ufc/mL de esporas viables de *Fusarium oxysporum* en jugo de piña, después de 1 día de almacenamiento; mientras que en la misma matriz, concentraciones de extractos cítricos de 1500 y 2000 mg/L redujeron 1.14 y 2.92 log ufc/mL de esporas respectivamente cuando se sometió al mismo tiempo de almacenamiento<sup>214</sup>.

Hay que tener muy en cuenta también los factores implícitos, ya que es otra forma de control sobre todo en plantas, por ejemplo usando *Penicillium oxalicum* para causar antagonismo<sup>215</sup>, ya que es un moho que posee mayor habilidad para competir y dominar cuando las condiciones de  $a_w$  no son las óptimas para su crecimiento, siendo esta circunstancia la que le permitirá controlar a las cepas de *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici y de *Fusarium oxysporum* f. sp. gladioli cuando la temperatura es de 25 °C y las condiciones de  $a_w$  no superen el valor de 0,95.

Las conidias de *Fusarium oxysporum* presentan limitada resistencia al calor húmedo (63 °C x 45 segundos) y al calor seco<sup>12</sup> (98 °C x 60 segundos), por ello la pasteurización en bebidas no carbonatadas aplicada por las industrias pueden

eliminar sus conidias y formas vegetativas, sin embargo cuando se encuentran en forma de esporas éstas se activan con el calor ocasionando la germinación, pudiendo desarrollarse en la bebida (como micelio visible) si tiene las condiciones adecuadas.

Formas de control alternativo al tratamiento térmico, son las tecnologías no térmicas como la Alta Presión, cuyo proceso es efectivo para la inactivación de microorganismos patógenos, levaduras, conidias y micelios fúngicos. La eficacia de este proceso, que depende de la combinación de la presión, tiempo y temperatura usados para cada microorganismo “diana”<sup>216</sup>, hace que sea importante en el control de *Fusarium oxysporum*. Así, ensayos con esta tecnología han demostrado que una suspensión mixta de  $2.5 \times 10^7$  ufc/mL de conidias y clamidoconidias de *Fusarium oxysporum* fueron reducidas a  $1.4 \times 10^2$  ufc/mL después de 15 segundos a 400 MPa (Megapascal) y con una combinación de 30 segundos a 400 MPa no hubo sobrevivientes detectados<sup>217</sup>. Al aplicar esta tecnología hay que tener en cuenta el efecto baroprotector que tienen los solutos como sacarosa, glicerol o NaCl sobre la inactivación de las conidias de *Fusarium oxysporum*<sup>218</sup>, por ejemplo las soluciones de sacarosa con 20, 40 y 50 °Brix no ejercen protección contra los tratamientos de presión a 600 MPa por 60 segundos, mientras que en soluciones de 60 °Brix solo reducciones de 1 log y menos que 2 log se consiguen después de aplicar 600 MPa por 120 y 180 segundos respectivamente, demostrando que la inactivación es más rápida a menores concentraciones de sacarosa. Sin embargo el mejor baroprotector para *Fusarium oxysporum* de los 3 solutos mencionados anteriormente es el NaCl a una  $a_w$  de 0,903.

La Homogenización por Alta Presión, otra tecnología no térmica, ha demostrado ser capaz de inactivar varios tipos de mohos sin pérdida significativa de la calidad del producto, dando al mismo tiempo estabilidad y prolongada vida útil. Inactivaciones de 5.84 log ufc/mL de conidias de *Fusarium oxysporum* son conseguidas con una aplicación de esta tecnología a 120 MPa en 3 pasos “multi



procesos” sobre Tween 80 (0.05 %), a 150 MPa en 2 pasos en jugo de tomate (pH= 4.23, 12 °Brix y viscosidad entre 42-48 P) y a 150 MPa en 3 pasos en jugo de tomate diluído (pH= 4.21, 4.5 °Brix y viscosidad entre 5.5-9.6 P)<sup>219</sup>. Ensayos de inactivación de esporas de *Fusarium oxysporum* en jugo de piña usando la homogenización por alta presión, lograron eliminar una carga de 4.53 log ufc/mL con 3 tratamientos multipasos de 120 MPa, y cuando se combinó tratamientos de 1 paso a 120 MPa con benzoato de sodio (100 mg/L) o con extractos cítricos (2000 mg/L) mejoraron fuertemente el efecto fungicida debido a que entre ellos se ejerce un efecto sinérgico<sup>214</sup>.

El ultrasonido junto a componentes antimicrobianos tales como extractos cítricos o benzoato de sodio, han demostrado ser efectivos en el control de *Fusarium oxysporum* en jugo de naranja<sup>220</sup>. Esta tecnología no térmica, es definida como ondas de presión a una frecuencia mínima de 20 kHz, requiriendo de un medio líquido y de una fuente de vibraciones de alta energía (ultrasonido). Los efectos antimicrobianos de esta tecnología dependen de la amplitud de la onda, de la temperatura, de la duración del tratamiento, del volumen y de la composición del alimento. Tratamientos de 40 % de energía acústica por 10 minutos con pulsos de 2 y 10 segundos logran reducir las esporas de *F. oxysporum* hasta un nivel de 2.80 y 2.27 log ufc/mL en agua destilada, a partir de una concentración inicial de 5.28 log ufc/mL. Por otro lado, la posibilidad de prolongar la vida útil de jugos de naranja es alta cuando se aplican tratamientos combinados de ultrasonido y antimicrobianos, logrando controlar el crecimiento de *Fusarium oxysporum* a través de una reducción de 5 log ufc/mL después de 2 días cuando se usa benzoato de sodio y después de 14 días para el caso de los extractos cítricos.

## 2.4. Microbiología Predictiva

### 2.4.1. Concepto e historia de la microbiología predictiva

La microbiología predictiva puede ser considerada como la aplicación de la investigación interesada con la ecología microbiana cuantitativa de los alimentos. Está basada sobre la premisa de que las respuestas de las poblaciones microbianas a los factores ambientales son reproducibles y que caracterizando los ambientes en términos de esos factores que afectan mayormente el crecimiento y la sobrevivencia microbiana, de observaciones pasadas es posible predecir las respuestas de esos microorganismos en otros ambientes similares. Este conocimiento puede ser descrito y resumido en modelos matemáticos que pueden ser usados para predecir cuantitativamente el comportamiento de las poblaciones microbianas en los alimentos<sup>13</sup>.

Roberts<sup>221</sup> (1995), indica que en la mayoría de casos, el crecimiento microbiano es mayormente determinado por un número de factores tales como el pH, actividad de agua, temperatura, atmósfera y ácidos orgánicos y es en estos factores donde el modelamiento debe ser aplicado.

La aplicación de modelos matemáticos para describir el comportamiento de los microorganismos tiene sus orígenes en la década de 1920, con los cálculos en los procesos térmicos, para obtener el tiempo de muerte térmica (TDT), el tiempo de reducción decimal (valor D), y del coeficiente térmico, asegurando la eliminación del riesgo de intoxicación por *Clostridium botulinum* en alimentos<sup>222</sup>. McMeekin<sup>223</sup> y col. (2007), mencionaron que el concepto amplio de microbiología predictiva parece haber sido enunciado primero por Scott en 1937, quienes anunciaron el potencial de predecir el deterioro microbiano en carnes y el potencial para predecir el crecimiento de patógenos sobre canales. Por otro lado, Ross y col. (1994) indicaron que la microbiología predictiva de alimentos parece haber sido generada

a partir de 2 líneas de investigación: el control del deterioro de pescados y la prevención de botulismo y otras intoxicaciones microbianas<sup>224</sup>.

El incremento de episodios de enfermedades de origen alimentario durante la década de 1980 y la necesidad de los microbiólogos de alimentos de tener técnicas de análisis más rápidas y menos costosas, contribuyeron al desarrollo e interés por la microbiología predictiva como un campo de estudio organizado<sup>225</sup>. Adicionalmente Buchanan (1992) puntualizó que el acceso a las computadoras también permitió que esta disciplina se desarrolle de manera más rápida<sup>226</sup>.

Por ello, la microbiología predictiva atrajo considerablemente el interés de investigadores y de agencias gubernamentales de los Estados Unidos, el Reino Unido, Australia y Europa, originando proyectos de investigación internacionales para el control de calidad e inocuidad alimentaria. Así, por ejemplo, el MAFF (Ministry of Agriculture, Fisheries and Food) del Reino Unido, inició un programa de 5 años coordinado a nivel nacional, basado en la investigación del crecimiento y sobrevivencia de microorganismos en alimentos, con el objetivo de desarrollar una base de datos computarizada de microbiología predictiva. Este programa fue desarrollado involucrando microbiólogos y matemáticos del Norwich and Reading Laboratories del Institute of Food Research, de la CFDR (Campden Food and Drink Research Association), del Flour Milling and Baking Research Association, de la Leatherhead Food Research Association y de la Torry Research Station, juntamente con Unilever Research y las Universidades de Surrey, Bath y Wales College of Cardiff. El resultado se dió en Octubre de 1992, con el desarrollo del software Food MicroModel, el cual a diferencia del Pathogen Modeling Program (PMP) muestra que la validación de los modelos predictivos estaba hecha en alimentos y no en medios de cultivo<sup>227</sup>.

Actualmente, existen diversos “software” de microbiología predictiva originados en diversas partes del mundo, con el fin de conectar de manera fácil y amigable al usuario, principalmente a la industria de alimentos con el modelamiento predictivo.

#### 2.4.2. Aplicaciones de la microbiología predictiva

Las aplicaciones de la microbiología predictiva son diversas, y sirven de ayuda tanto a la industria de alimentos como a los entes gubernamentales, instituciones de investigación y de enseñanza. A continuación, mencionaremos las principales aplicaciones:

**En la determinación de la vida útil**, por ejemplo en un estudio realizado en salchichas frescas de aves a diferentes temperaturas de almacenamiento<sup>228</sup>, dando como resultado 2.54 días a 7 °C y 36 días a 1 °C, alcanzando un conteo de 6.69 log ufc/g de microorganismos aerobios mesófilos, considerado como límite máximo, a partir de una carga inicial de 5.17 log ufc/g. Gracias a la aplicación de la ecuación de Arrhenius, se pudo extender la vida útil de un postre a base de crema de leche pasteurizada sabor vainilla, cuando se evaluó en dos escenarios de almacenamiento con temperaturas de refrigeración comúnmente usados: cuando el producto se preserva en el supermercado (mejor escenario) y cuando se preserva en la parte alta de las refrigeradoras domésticas. Usando como microorganismo “diana” a *Bacillus cereus* (organismo específico de deterioro de la crema pasteurizada), se determinó que el promedio de la vida útil en condiciones de temperaturas de 5.8 +/- 2.6 °C (en supermercados) fue de 269 días, mientras que a 7.6 +/- 3.1 °C (refrigeradoras domésticas) fue de 163 días. En ambos escenarios, se comprobó que la vida útil superaba los 30 días que los industriales le habían establecido al producto de crema pasteurizado<sup>229</sup>. Por otro lado, existen todavía oportunidades de mejoras en los modelos predictivos para su aplicación en las cremas pasteleras preparadas en polvos (fríos y calientes) y las listas para usar, ya que aún no existen modelos disponibles para estas matrices<sup>230</sup>.

**En la investigación de brotes epidemiológicos**, por ejemplo Dinamarca usó el “Combase Predictor” para determinar si *Yersinia enterocolitica* pudo haber sobrevivido o incluso mutiplicado, durante la producción de una salchicha fermentada semiseca orgánica. Este microorganismo estuvo implicado junto a un

brote de 20 casos de *Escherichia coli* O26:H11 en el año 2007, el cual afectó a niños con edades entre 2 a 3 años. El modelo determinístico desarrollado, predijo que el nivel de *Y. enterocolitica* se incrementaría en 2.3, 4.2 y 7.8 log durante las fases de fermentación, secado y almacenamiento respectivamente<sup>231</sup>.

**En la determinación de los Puntos de Control Crítico (PCC) en un plan HACCP**, por ejemplo un proceso de blanqueado a 60 °C por 5 minutos de un determinado producto (pH = 5.2, % NaCl = 1.0), que reduce 2.4 log del peligro microbiológico *Escherichia coli* O157:H7, no puede ser considerado un PCC si existe una etapa posterior en el que se elimine completamente este patógeno, y por el contrario sería considerado un PCC, si fuera la última etapa en la producción capaz de reducir carga microbiana, esto es aplicando la premisa que cuando una condición de proceso lleva a un estándar requerido de un peligro microbiológico, el proceso debe ser considerado un PCC. En el último caso los parámetros de tiempo y temperatura del blanqueado deben ser re evaluados para conseguir una eliminación del patógeno<sup>232</sup>.

**En el establecimiento de los límites críticos en un plan HACCP**, por ejemplo cuando se determinó que en el zumo de tomate tratado por altas presiones era necesario una conjugación de 300 MPa por 12 minutos, 400 MPa por 1.7 minutos ó 500 MPa por 0.24 minutos, con la finalidad de eliminar la presencia de *Listeria monocytogenes* a partir de una carga inicial de  $10^3$  ufc/g. Del mismo modo se determinó que para eliminar la misma carga inicial de este patógeno, una conjugación de 400 MPa por 182 minutos, 500 MPa por 22 minutos ó 600 MPa por 2.7 minutos, era necesario ser aplicada al jamón cocido cuando se deseaba obtener una vida comercial prolongada de 70 días<sup>233</sup>.

**En la toma de decisiones sobre un producto que excedió los límites críticos en un plan HACCP**, por ejemplo en quesos cremas<sup>234</sup>, demostrando que al aumentar la temperatura sobre todo en situaciones de abuso térmico (15 y 22 °C), la flora ácido láctica que no se ve afectada por el descenso del pH, incrementa su

población por tener una temperatura más propicia y por lo tanto aumenta su poder biopreservante reduciendo la posibilidad de crecimiento del patógeno *Staphylococcus aureus*.

El modelamiento predictivo fue satisfactoriamente aplicado por los operadores de una planta de cárnicos en Australia<sup>235</sup>, tras haber pasado por el ciclón tropical “Yasi” en febrero del 2011 (el más intenso del continente Australiano en los últimos 100 años), evitando grandes pérdidas económicas y el desabastecimiento en el mercado de carnes deshuesadas empacadas en cartón bajo refrigeración. La planta tras este desastre natural quedó sin suministro de electricidad, ocasionando que los productos se queden sin refrigeración por varias horas, comprometiendo la inocuidad de los mismos. Usando el RI (Índice de Refrigeración, criterio para la aceptabilidad de un producto cárnico en Australia) y los “data loggers”, el equipo de Aseguramiento de la Calidad de la planta pudo demostrar a la autoridad sanitaria que los productos cárnicos que se encontraban en las cámaras de refrigeración, eran microbiológicamente seguros para el consumo, pero considerando una reducción de la vida útil. De esta forma la compañía evitó una pérdida económica de US \$ 500 000.

**En el desarrollo de productos nuevos**, por ejemplo cuando se decidió extender la vida comercial de productos cárnicos cocidos mediante tratamientos de inactivación post loncheado<sup>236</sup>. Para ello, se usaron atmósferas modificadas, una con mezclas de CO<sub>2</sub> y Argón, y otra con CO<sub>2</sub> y Nitrógeno, resultando en un menor crecimiento de bacterias mesófilas y ácido lácticas, con una mayor preferencia por parte de los evaluadores sensoriales y una extensión de vida útil de estos productos hasta 120 días. O cuando las fórmulas de la mortadela y del chorizo de cerdo ahumado fueron cambiadas porque no cumplían el tiempo de vida útil indicado por el fabricante. Estudios previos demostraron que la mortadela a una temperatura de 30 °C duraba solamente 40 días en vez de 60 días y que el chorizo de cerdo ahumado a una temperatura de 10 °C duraba 45 días, la mitad del tiempo declarado por la industria. Con la ayuda de los modelos Gompertz

modificado y Logístico, se determinó que los factores que más influenciaban el crecimiento de las bacterias ácido lácticas (*Lactobacillus sakey* y *Lactobacillus plantarum*) fueron las concentraciones de lactato, polifosfato y sal, por ello se procedió a la reformulación de los productos obteniendo para la mortadela un conteo total de  $10^7$  ufc/g durante 60 días de almacenamiento y para el chorizo de cerdo ahumado se consiguió un aumento de 20 días en la vida útil<sup>237</sup>.

**En la evaluación de riesgos microbiológicos cuantitativos**, permitiendo estimar el número de patógenos en los alimentos (sobre todo en el punto de consumo), basados en los niveles conocidos en el punto de partida de la evaluación de riesgos y las condiciones durante el procesamiento, almacenamiento y distribución<sup>238</sup>. La evaluación microbiológica cuantitativa de riesgos requiere de expresiones matemáticas para describir los cambios en los diferentes eventos en la historia del producto. Por ello, la microbiología predictiva es una herramienta muy útil en la evaluación de la exposición, ya que involucra el desarrollo de modelos matemáticos del crecimiento, muerte y supervivencia de los microorganismos en función de los parámetros físico-químicos del ambiente y del alimento. Estos modelos pueden constituir sub-modelos dentro de un modelo global de evaluación de la exposición, pudiendo contribuir a evaluar diferentes escenarios de procesamiento y de almacenamiento del alimento, jugando un rol importante sobre todo cuando no existen datos suficientes para la evaluación<sup>239</sup>. Un ejemplo claro de esta aplicación es cuando Zwietering<sup>240</sup> y col. (1996), aplicaron los modelos de la microbiología predictiva para estimar el número de *Bacillus cereus* en leche pasteurizada en el punto de consumo.

**En la educación y enseñanza**, ya que los modelos pueden explicar el comportamiento microbiano a personas no técnicas. La generación de gráficos o estimados de tiempo para re-alcanzar poblaciones críticas, pueden dramáticamente ilustrar la importancia de los puntos de control crítico (PCC), o la importancia de obtener materias primas con bajos conteos microbianos. Los modelos son de utilidad en la enseñanza de la microbiología de alimentos<sup>241</sup> por

su capacidad de ilustrar rápidamente los efectos de las condiciones ambientales sobre el comportamiento microbiano.

#### 2.4.3. Etapas en el desarrollo de un modelo predictivo

De acuerdo con Nakashima y col.<sup>242</sup> (2000), el desarrollo de un modelo predictivo para su uso en la microbiología de alimentos, debe considerar las siguientes etapas: planificación, colecta de datos y análisis, descripción matemática, validación y manutención:

**Planificación:** Se deben definir claramente las características relacionadas a las variables dependientes (densidad de población bacteriana, producción de metabolitos secundarios, etc), a las variables independientes (pH, actividad de agua, atmósfera, temperatura, etc.), al inóculo (definiendo que tipo y cantidad de microorganismo será inoculado y bajo qué condiciones) y al modelo experimental (eligiendo si se usará un medio de cultivo de laboratorio o el mismo alimento, siendo este último el más recomendado). Un especial cuidado hay que tener con el tamaño del inóculo, el cual afecta la cinética de crecimiento, así lo demuestra un estudio realizado sobre la germinación de esporas de *Clostridium botulinum*, dando como resultado que cuando el inóculo incrementa de 1 a 100 esporas/muestra, el porcentaje de muestras con crecimiento positivo se incrementa y el tiempo a la detección decrece<sup>243</sup>. También al momento de elegir un modelo, tiene que tenerse en cuenta la estructura del alimento<sup>244</sup>, ya que afectará directamente la distribución del microorganismo.

**Colecta de datos y análisis:** Basados en las fases de la curva de crecimiento microbiano, se debe definir claramente donde se trabajará para la recolección de datos, eligiendo la fase lag llamada también de latencia, donde las células microbianas ajustan la fisiología y bioquímica para que puedan ser capaces de explorar el ambiente donde se encuentran, la fase exponencial llamada también como fase de crecimiento balanceado, todo metabolismo está dirigido a la



reproducción, la fase estacionaria donde la muerte celular es debida al acúmulo de metabolitos tóxicos en el medio de crecimiento y la velocidad de la muerte celular es equivalente a la velocidad de crecimiento o la fase de muerte o declinio donde hay mayor acúmulo de metabolitos tóxicos, determinando una velocidad de muerte celular. La fase lag y la exponencial son de mucha importancia en la microbiología de alimentos, porque para la mayoría de alimentos el deterioro ocurre antes de que los microorganismos lleguen a la fase estacionaria. A mayor fase lag, mayor será el tiempo de vida útil de un producto y a mayor velocidad de crecimiento en la fase exponencial, el tiempo de vida útil se acortará.

**Descripción matemática:** El escoger una determinada función para describir una determinada respuesta es netamente estadístico, por otro lado el ajuste de dicha función es algebraico, y consiste en la determinación de los valores de parámetros que mejor ajustan el modelo escogido al conjunto de datos colectados.

**Validación:** Los valores obtenidos en la práctica deben ser comparados contra los valores predichos por el modelo, esto debe ser repetido en varios puntos de la curva. Existen diversas maneras de hacerlo, por ejemplo mediante representaciones gráficas de los datos, o por técnicas de análisis estadístico (correlación múltiple, error cuadrado medio, desviación estándar de los residuales, factor bias y factor exactitud, entre otros)<sup>245</sup>.

**Mantenimiento:** Una vez que el modelo ha sido validado e implementado en la práctica, es necesario definir un procedimiento para mantener el modelo y reconocer cuando éste se encuentra obsoleto. Es recomendado que el modelo debe ser periódicamente verificado por métodos estadísticos y cartas de control de calidad estándar<sup>246</sup>.

#### 2.4.4. Modelos predictivos para estudio y evaluación de la calidad total de los alimentos y bebidas

De acuerdo con Legan<sup>247</sup> (2007), los modelos predictivos pueden clasificarse de manera simple en función a la respuesta que ellos intentan darnos (crecimiento microbiano, sobrevivencia o muerte). Entre ellos, tenemos los modelos cinéticos de crecimiento microbiano que son construídos usando curvas de crecimiento medidas sobre un rango de condiciones, y se usan para predecir ratios de crecimiento, tiempo para alcanzar una cantidad crítica de crecimiento o incluso una curva de crecimiento total; los modelos de límites de crecimiento los cuales son construídos a partir de mediciones cualitativas o cuantitativas de crecimiento sobre el tiempo, y pueden ser usados para identificar nuevas condiciones que prevengan el crecimiento de un determinado microorganismo; los modelos probabilísticos que son construídos a partir de la proporción de las respuestas de crecimiento y no crecimiento de un determinado microorganismo a través de un diseño experimental a un punto definido en el tiempo y nos ayudan a predecir la probabilidad de ocurrencia de crecimiento de un microorganismo a un punto definido en el tiempo para otras condiciones dentro de la matriz de diseño experimental; los modelos cinéticos de muerte que son construídos de curvas de muerte bajo condiciones de interés y pueden ser usados para predecir la cantidad de muerte de un microorganismo durante un tratamiento letal o incluso predecir una curva de muerte entera; los modelos de inactivación en el tiempo los cuales son construídos sobre respuestas cualitativas de muerte y no muerte para un determinado microorganismo y son capaces de predecir el tiempo hasta un punto final deseado (comúnmente hasta que no haya sobrevivientes) pero incapaces de predecir una curva de muerte total; y los modelos de sobrevivencia que son construídos sobre conteos viables medidos en el tiempo bajo condiciones de interés, y están relacionados con condiciones transitorias donde cualquiera de las 2 opciones siguientes puede ocurrir: crecimiento o muerte. A continuación, desarrollaremos la clasificación postulada por Whiting y Buchanan<sup>248</sup> en 1993, una de las más aceptadas para los modelos de la microbiología predictiva:

#### 2.4.4.1. Modelos primarios

Los modelos primarios describen las cuatro fases de una típica población microbiana: fase lag o período de adaptación, fase exponencial, fase estacionaria y fase de muerte. (Figura N° 2). Estos modelos se centran en describir los cambios de la población microbiana a través del tiempo, que en aplicaciones prácticas son la fase de almacenamiento, procesamiento y/o tratamiento térmico, y estiman los parámetros cinéticos como la fase lag ( $\lambda$ ), ratio máximo de crecimiento ( $\mu$ ), nivel de población máxima y ratio de inactivación<sup>249</sup>.

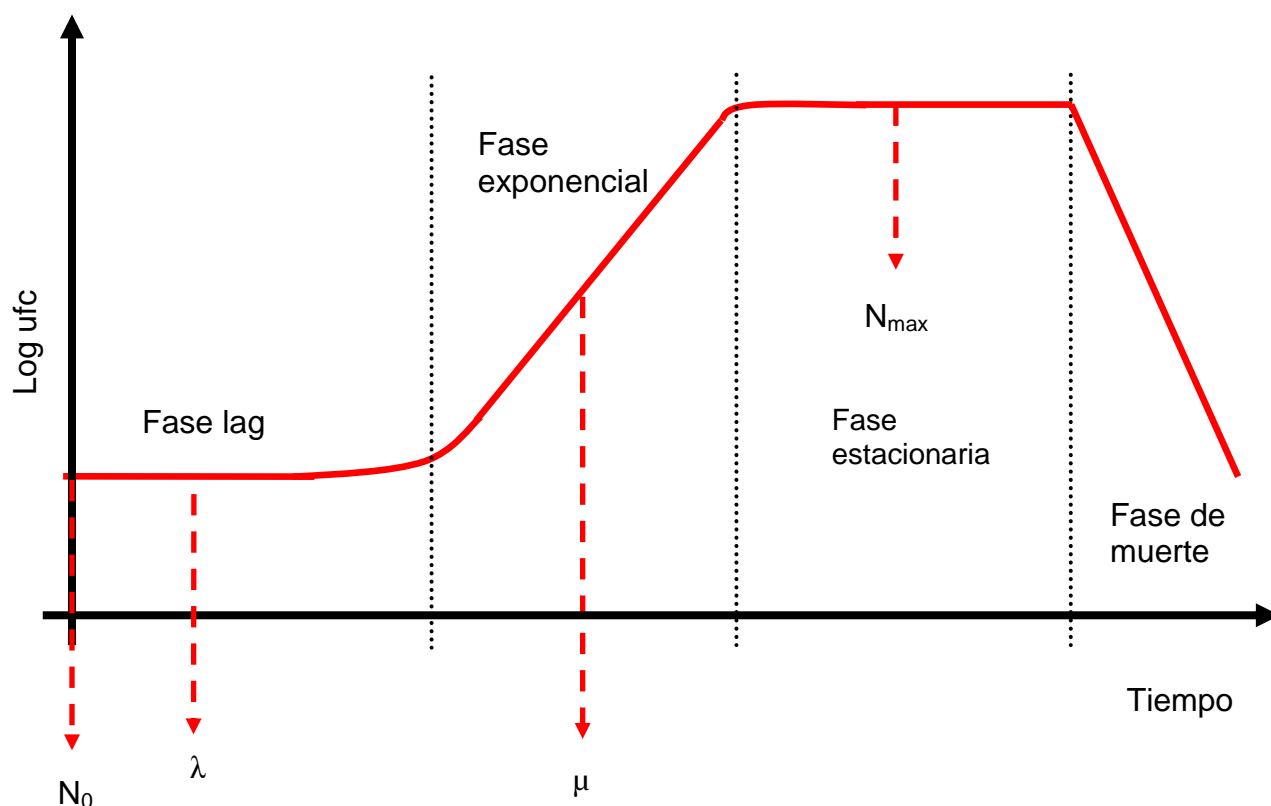


Figura N° 2. Representación esquemática de las cuatro fases cinéticas de una población microbiana. Donde  $\lambda$  es la fase de latencia,  $\mu$  es el ratio máximo de crecimiento,  $N_{max}$  es el nivel de población máxima y  $N_0$  es la población microbiana inicial.

Tomado de: Pérez-Rodríguez F, Valero A<sup>249</sup>. Chapter 3: Predictive Models: Foundation, Types, and Development. In: Pérez-Rodríguez F, Valero A, editors. Predictive Microbiology in Foods. New York: Springer; 2013. p. 25-55.

El Modelo de Baranyi es uno de los principales modelos primarios más usados en el campo de la microbiología predictiva así, por ejemplo, se usó de forma práctica para evaluar la sobrevivencia/crecimiento de *Listeria monocytogenes* en agua de coco verde fresca<sup>250</sup>, una bebida muy preferida en el Brasil, porque tiene una mejor característica sensorial a comparación de las que son tratadas térmicamente. Estas bebidas son comercializadas frescas, teniendo que ser envasadas en botellas plásticas y mantenidas en refrigeración hasta el tiempo de su vida útil que en promedio es de 7 días. Con la ayuda del “Pathogen Modelling Program” y usando el modelo de Baranyi, Walter<sup>250</sup> y col. en el año 2009, lograron demostrar que el agua de coco verde fresca es una bebida propicia para el crecimiento de este patógeno y que la refrigeración de 10 °C hacia 4°C retardó, pero no inhibió el crecimiento de *Listeria monocytogenes*.

Otros modelos primarios como el de Gompertz y el Logístico son mostrados en detalle en el punto 2.4.5.2 del presente trabajo.

#### 2.4.4.2. Modelos secundarios

Los modelos secundarios de la microbiología predictiva son construídos a partir de los parámetros estimados del modelamiento primario y son usados para caracterizar cuantitativamente esos parámetros en función de los factores ambientales incluídos en el diseño experimental<sup>251</sup>. Una vez construídos los modelos secundarios, estos pueden ser usados para predecir la respuesta de los microorganismos frente a nuevas combinaciones de las variables ambientales<sup>252</sup>.

Uno de los modelos secundarios más representativos es el Modelo de la Raíz Cuadrada (“Square Root Models”) o también llamado tipo Belehrádek o tipo Ratkowsky, el cual viene representado por la siguiente ecuación:

$$\sqrt{\mu_{max}} = b(T - T_{min})$$

Donde  $T$  es la temperatura,  $T_{min}$  es la temperatura mínima teórica que soporta el crecimiento,  $\mu_{max}$  es el ratio máximo de crecimiento y  $b$  es un valor constante sin significado biológico, que se obtiene de la curva al enfrentar los datos.

Otros modelos importantes son el Modelo del Concepto Gamma, el cual fue usado por Zwietering<sup>240</sup> y col. para estimar el número de *Bacillus cereus* en leche pasteurizada en el punto de consumo, el Modelo de Parámetro Cardinal elaborado por Rosso<sup>253</sup> y col. destacado por su simplicidad y por la significancia biológica de sus parámetros, los modelos basados en la ecuación de Arrhenius, los Modelos Polinomiales, los Modelos de Redes Neuronales Artificiales, los Modelos Secundarios de Inactivación y los Modelos de Crecimiento/No crecimiento<sup>254</sup>.

#### 2.4.4.3. Modelos terciarios

Los modelos terciarios son expresiones matemáticas, paquetes de software o sistemas expertos, que usan la información de los modelos primarios y secundarios para calcular y mostrar gráficos, predicciones y comparaciones deseadas. En este nivel, el usuario no necesita conocer a profundidad los modelos matemáticos primarios y secundarios, lo que permite su uso con facilidad en las industrias de alimentos<sup>255</sup>. Los paquetes de software de la microbiología predictiva, basados sobre 2 principales pilares: la base de datos (Bioinformática) y los modelos matemáticos (Biomatemática), proveen una interfaz entre el modelo matemático y el usuario, permitiendo que las estimaciones a ser observadas se muestren de forma fácil a través de salidas gráficas simplificadas, de esta manera los programas informáticos han mejorado marcadamente el uso de los modelos microbianos por la industria de alimentos, evaluadores de riesgo y por los microbiólogos de alimentos<sup>256</sup>.

Actualmente, en el mercado existen varios programas de microbiología predictiva, los cuales pueden ser de acceso libre o restringido. A continuación, mencionaremos los principales:

**El “Pathogen Modeling Program” (PMP)**, es un programa que fue descrito por primera vez por Robert Buchanan<sup>257</sup> en el año 1991 y tiene el objetivo de determinar las variaciones entre cepas de un patógeno, crear modelos para la fase de latencia cuando las condiciones ambientales cambian, modelar el crecimiento y supervivencia de microorganismos patógenos de origen alimentario e incorporar modelos microbianos en una nueva versión del PMP que pueda modelar operaciones de procesamiento y conducir la evaluación de riesgos<sup>258</sup>, así mismo fue desarrollado como un medio para introducir el potencial de la microbiología predictiva a la industria de alimentos<sup>259</sup>. El PMP contiene modelos multivariantes basados en el uso de la función de Gompertz en combinación con el análisis de superficie de respuesta a la formulación de alimentos y parámetros de almacenamiento como temperatura, pH, contenido de NaCl, concentración de nitrito de sodio y atmósfera controlada. Actualmente, la versión vigente es la 7.0, se encuentra disponible en los idiomas inglés y portugués, lista para descargar en la página web <http://portal.arserrc.gov/PMP.aspx> y ofrece modelos de crecimiento, de sobrevivencia (inactivación no térmica), de inactivación térmica, de transferencia y de enfriamiento.

**El “ComBase”**, es el resultado de los esfuerzos combinados del “Institute of Food Research” (Norwich, UK), la “Food Standards Agency” (UK) y el USDA ARS Eastern Regional Research Center. Fue lanzado en junio del año 2004 en la cuarta conferencia internacional de modelamiento predictivo en alimentos realizado en Quimper (Francia), y es un programa de microbiología predictiva proveniente de la unión del “Pathogen Modeling Program” (PPM) y del “Food MicroModel” (FMM). Actualmente se registran dos tipos de respuestas microbianas: curvas totales de crecimiento y sobrevivencia producidas por mediciones de conteos viables, y ratios de inactivación y crecimiento específicos, derivados de conteos viables u otras medidas como densidad óptica. Este programa además de proveer un acceso a los datos en bruto con el que los modelos fueron generados, satisface dos requerimientos importantes: la

uniformidad del sistema en unidades físicas, químicas y biológicas asociadas a una terminología para facilitar las comparaciones entre set de datos, y proporciona una conformidad en la información de la microbiología predictiva mediante procedimientos de control de calidad, ya que sin esta conformidad cualquier intento de compilar datos de varias fuentes se traduciría en un vaciado de datos en lugar de una base de datos estructurada. Por lo tanto, este programa provee un registro permanente de los datos y diseños experimentales, incrementa la eficiencia de los análisis de datos, permite una mayor difusión de los datos entre los usuarios finales, mejora la identificación de las limitaciones de los modelos, y facilita la aplicación de nuevas técnicas de modelamiento<sup>260</sup>. Los microorganismos que pueden ser evaluados en el “ComBase” son los alterantes como *Brochothrix thermosphacta*, *Pseudomonas* psicrótróficas, bacterias ácido lácticas, enterobacterias, entre otros, y los patógenos como *Aeromonas hydrophila / sobria / caviae*, *Bacillus cereus* (esporas y células vegetativas), *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* O157 y también no patogénicas, *Listeria monocytogenes / innocua*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonellae*, y *Yersinia enterocolitica*<sup>261</sup>.

**El “Seafood Spoilage Predictor” (SSP)**, fue creado por el “Danish Institute of Fisheries Research”, bajo la dirección del Dr. Paw Dalgaard<sup>262</sup> y nació para predecir e ilustrar el efecto de la temperatura (constante y fluctuante) sobre el crecimiento de los organismos deterioradores específicos responsables por el deterioro de los alimentos de origen marino. La versión 1.1 contenía 2 modelos cinéticos: uno para el crecimiento de *Shewanella putrefaciens* (en el rango de aplicación de 0 a 10 °C) y otro para *Photobacterium phosphoreum* (en el rango de 0 a 15 °C y con niveles de dióxido de carbono de 0 a 100 %). Adicionalmente, el SSP, contenía 2 modelos empíricos de ratios relativos al deterioro para predecir la vida útil a diferentes temperaturas de almacenamiento, los cuales incluían el modelo de la raíz cuadrada (“square root”) y el modelo exponencial. Actualmente, la versión vigente del ahora llamado **“Seafood Spoilage and Safety Predictor” (SSSP)** es la 3.1 y se encuentra disponible de manera gratuita en la página web

<http://sssp.dtuqua.dk/download.aspx>. Contiene 15 modelos para predecir la inocuidad y vida útil de alimentos de origen marino y puede ser evaluado en 15 idiomas. Entre ellos podemos encontrar los modelos para evaluar la producción de histamina por *Morganella morganii* y *Morganella psychrotolerans* a temperaturas de almacenamiento en refrigeración, y los modelos para predecir el límite de crecimiento – no crecimiento de *Listeria monocytogenes* bajo 7 parámetros ambientales (temperatura, atmósfera (CO<sub>2</sub>), pH, a<sub>w</sub>, componentes de ahumado / fenol, lactato y diacetato). La industria que procesa alimentos marinos, suministrando información básica de las características de su producto, puede usar un rango de modelos del programa para contestar las interrogantes acerca de la seguridad y vida útil de sus productos, en muchos casos los modelos pueden predecir el estado del producto después de que se ha aplicado un proceso de preservación o después de que ha sido almacenado bajo diferentes condiciones conocidas<sup>263</sup>.

El “**FORECAST System**”, fue creado por la “Campden and Chorleywood Food Research Association” (CCFRA), y es el único programa que está interesado únicamente en los microorganismos deteriorantes de los alimentos, y puede ser usado para evaluar los ratios de deterioro o las estabilidades de diferentes formulaciones de productos. Los modelos fueron desarrollados en medios de laboratorio y validados apropiadamente en matrices de alimentos y por comparación con datos de crecimientos publicados. La mayoría de modelos son los de crecimiento cinético que pueden ser usados para predecir el ratio de crecimiento y el tiempo de latencia o fase lag. “*FORECAST System*” está disponible para usuarios potenciales a través de un servicio de información, de esta manera se ejecutan los modelos en nombre de los clientes después de una consulta detallada con respecto a sus necesidades, es decir opera como un servicio de predicción<sup>258</sup>. Actualmente, hay modelos para carnes y pescados (como matrices), así como para levaduras en frutas y bebidas, incluyendo un rango de modelos relevantes para alimentos acidificados<sup>264</sup>.



En el año 2010, Cristiano Dannenhauer<sup>265</sup>, desarrolló en el Brasil un aplicativo de microbiología predictiva (**MP**), como tesis para obtener el título de master en Ingeniería de Alimentos. Este programa posee los principales modelos de la microbiología predictiva (Gompertz, Logístico, Logístico modificado, Baranyi, Arrhenius, Raíz Cuadrada, Weibull y los modelos no isotérmicos de Micha Peleg y de Van Impe); además tiene una interfaz que permite el uso de esos modelos de modo simple y seguro. Es posible simular el crecimiento microbiano para las condiciones ambientales dinámicas a las cuales un producto es sometido durante su procesamiento, transporte o almacenamiento y también simula el impacto de los abusos de temperatura en la vida útil de los productos refrigerados.

**El “Pasta Salad Predictor”**, fue creado por Østergaard<sup>266</sup> y col., con la finalidad de ayudar a los establecimientos de comida que venden ensaladas de pastas listas para consumir, permitiendo evaluar la vida útil y la inocuidad del producto a partir de la contaminación microbiana inicial de enterobacterias, bacterias ácido lácticas, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas* y *Salmonella*, y de las condiciones de temperatura y tiempos de almacenamiento. Fue presentado por primera vez en la versión N° 7 de la conferencia internacional de modelamiento predictivo en alimentos, realizada durante el año 2011 en Dublín, Irlanda.

**MicroHibro**, es una herramienta on-line de evaluación del riesgo microbiano en vegetales y productos cárnicos<sup>267</sup>. Fue desarrollado por Optimum Quality y el Grupo Hibro de la Universidad de Córdoba, y financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación de España. Actualmente, la versión vigente es la 2.0 Beta y los modelos de crecimiento, inactivación y de contaminación cruzada están disponibles para carne, carne cocida con y sin nitritos, carne curada lista para el consumo, acelga, vegetales de hoja, lechuga, lechuga en atmósferas modificadas, perejil y espinacas. Los microorganismos incluidos en el programa son deteriorantes como las bacterias ácido lácticas y los patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 y *Salmonella* spp.

**El “Sym'Previus”**, fue desarrollado a raíz de que varios equipos de científicos franceses que habían participado anteriormente en proyectos europeos relacionados a la microbiología predictiva, encontraron promisorias la real aplicación de modelos predictivos en plantas de fabricación de productos lácteos. Además, el “Sym'Previus”, también nació del interés del Gobierno Francés (en la oportunidad de implementar una pericia en el dominio de patógenos y su aplicación en la evaluación de riesgos cuantitativo) y del apoyo de la industria francesa quienes deseaban obtener un programa común para compartir sus conocimientos en inocuidad de alimentos (pruebas de desafíos, modelos, entre otros). El mayor interés de este programa no es solo dar una base de datos y modelos matemáticos, sino el de proveer información combinada y suministrar un análisis hecho por un grupo de expertos (microbiólogos, estadísticos), apoyado por laboratorios, centros técnicos y compañías quienes conocen las dificultades que hay en el uso de la microbiología predictiva. En esta herramienta, el usuario puede seleccionar una matriz y el microorganismo asociado, verificar si los parámetros de pH y actividad de agua de la matriz propuesta por defecto corresponden a su producto y finalmente configurar el nivel del factor temperatura. Adicionalmente, también pueden confrontar los resultados obtenidos por el modelamiento de sus datos de forma independiente en su propio laboratorio y agregarlos para el gráfico final<sup>268</sup>.

**El “Microbial Responses Viewer” (MRV)**, es una base de datos web que provee información de interés en los límites de crecimiento / no crecimiento y en los ratios de crecimiento específicos de 16 tipos de microorganismos (*Aeromonas hydrophila*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Brochothrix thermosphacta*, *Clostridium botulinum* (non.prot.), *Campylobacter*, *Clostridium perfringens*, *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, bacterias ácido lácticas, *Listeria monocytogenes / innocua*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus aureus*, *Shigella flexneri*, *Salmonella* spp., y *Yersinia enterocolitica*). Los datos del MRV fueron calculados sobre la base de datos de temperatura, pH y actividad de agua ( $a_w$ ) extraídos del “ComBase”. La diferencia básica con el “ComBase” es que mientras que el MRV es una

plataforma focalizada sobre datos de crecimiento / no crecimiento, el “ComBase” es una plataforma que consiste de datos cinéticos de respuestas microbianas<sup>269,270</sup>.

El “**Fishmap**”, es un programa que ha sido desarrollado por el Institute of Food Research, Norwich, UK, es propiedad de AZTI-Tecnalia y puede ser descargado de forma libre de la siguiente dirección de internet: <http://www.azti.net/fish-map-software.html>. Permite la predicción del crecimiento de bacterias deteriorantes en productos de pescado bajo empacado en atmósferas modificadas, con diferentes concentraciones de CO<sub>2</sub> (0 – 100 % v/v, con balance de nitrógeno) a temperaturas constantes y fluctuantes. El programa fue creado usando modelos de crecimiento predictivos de *Carnobacterium maltaromaticum*, *Serratia proteamaculans*, *Shewanella baltica*, *Yersinia intermedia* y un mix de cultivos de estas 4 especies, los cuales han sido validados en filetes de jurel<sup>271</sup>.

“**Food Microbial Database**”, es un proyecto desarrollado en Irlanda por la FIRM (Food Institutional Research Measure), la UCD (University College Dublin), la DAFF (Department of Agriculture, Fisheries and Food), la FSAI (Food Safety Authority of Ireland), la MI (Marine Institute), la AFRC (Teagasc Moorepark Food Research Centre) y la UU (University of Ulster). Este programa proveerá de una base de datos relevante, confiable y oportuna sobre microorganismos patógenos (*Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157, *Listeria* spp., y *Salmonella* spp.) y norovirus, cubriendo 28 categorías de alimentos y ambientes. Está previsto que esta base de datos fortalecerá los lazos entre los sistemas de vigilancia institucionales (veterinaria, alimentos clínica), mejorará la calidad de los datos, identificará los vacíos en la información y fomentará los vínculos internacionales<sup>272</sup>.

#### 2.4.4.4. Modelos de crecimiento / no crecimiento

Estos modelos nacen en respuesta a la necesidad de entender la preservación de alimentos (los cuales están basados sobre la prevención del crecimiento microbiano o proliferación, inactivación microbiana o la extensión de la fase de latencia) cuando los factores de conservación son usados en combinación, sobre todo en situaciones de sinergismo. Los modelos de interfaz de crecimiento/no crecimiento cuantifican el efecto de varias barreras sobre la probabilidad de crecimiento y define combinaciones al que el ratio de crecimiento es cero o el tiempo de latencia es infinito. Incrementando la fuerza de una o más barreras en la interfaz por solo una pequeña cantidad decrecerá significativamente la probabilidad que un organismo crezca<sup>273</sup>.

Ratkowsky y Ross<sup>274</sup> (1995), propusieron la aplicación del modelo de regresión logística en microbiología de alimentos, que permite el modelamiento del límite entre el crecimiento y el no crecimiento de bacterias cuando se estudian uno o más factores de control. Este enfoque incluyó una modificación del modelo de la raíz cuadrada para describir la influencia de la temperatura, el pH, la  $a_w$  y la concentración de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) sobre la probabilidad de crecimiento.

$$\text{logit}(P) = b_0 + b_1 \cdot \ln(T - T_{\min}) + b_2 \cdot \ln(\text{pH} - \text{pH}_{\min}) + \dots$$
$$\dots + b_3 \cdot \ln(a_w - a_{w \min}) + b_4 \cdot (\text{NO}_{2 \max} - \text{NO}_2)$$

Donde  $P$  es la probabilidad de crecimiento (entre 0 y 1, llegando a ser "0" cuando no hay crecimiento y "1" cuando hay crecimiento),  $b_0$ ,  $b_1$ ,  $b_2$ ,  $b_3$  y  $b_4$  son los coeficientes de regresión a ser estimados por el modelo,  $T$  es la temperatura en °C,  $a_w$  es la actividad de agua, y  $\text{NO}_2$  es la concentración de nitrito en ppm. Valores mínimos son los valores teóricos donde el crecimiento es permitido

cuando se sobrepasan estos valores y valores máximos son los valores teóricos bajo el cual el crecimiento es permitido.

Posteriormente, modelos de regresión logística de segundo orden que incluían también términos lineales para el tiempo, fueron usados por Battey<sup>275</sup> y col. en el año 2002 para predecir la probabilidad de deterioro en bebidas llenadas en frío y listas para beber causados por levaduras tales como *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, y *Candida lipolytica* usando el modelo:

$$\text{logit}(P) = \ln \left[ \frac{P}{1-P} \right] = \sum_{i=1}^5 \beta_i X_i + \sum_{ij=1}^5 \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^5 \beta_{ii} X_i^2 + \text{tiempo} + \text{tiempo}^2$$

Donde  $P$  es la probabilidad de crecimiento, los valores de  $\beta$  representan los parámetros estimados para cada término, y los valores de  $X$  corresponden a las 5 variables (pH, acidez titulable, °Brix, concentración de sorbato de potasio y concentración de benzoato de sodio).

Panagou<sup>276</sup> y col. en el año 2010 usó la siguiente ecuación para modelar la interfaz de crecimiento/no crecimiento de *Byssochlamys fulva* y *Byssochlamys nivea* sobre Agar Extracto de Malta en función de la temperatura y la  $a_w$ :

$$\text{logit}(P) = \ln \left[ \frac{P}{1-P} \right] = \sum_{i=1}^2 a_i X_i + \sum_{ij=1}^2 a_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^2 a_{ii} X_i^2 + \text{tiempo}$$

Donde  $P$  es la probabilidad de crecimiento (en el rango de 0 – 1),  $a_i$  son los coeficientes a ser estimados para cada término, y los valores de  $X_i$  corresponden a las 2 variables independientes en el modelo (temperatura y  $a_w$ ).

## 2.4.5. Micología Predictiva

### 2.4.5.1. Bases de micología predictiva

Durante años, los modelos predictivos que en su mayoría han sido aplicados a bacterias patógenas y a algunas bacterias que causan deterioro, han sido extendidos a los mohos, esto debido a que la mayoría de micólogos de alimentos no estaban muy familiarizados con las técnicas de modelamiento usando las ya existentes para bacterias y, por otro lado, porque las personas involucradas en el modelamiento no conocían a fondo las especificidades de los mohos, que necesariamente se tienen que tomar en cuenta<sup>277</sup>.

Las principales razones por las cuales el modelamiento matemático del crecimiento fúngico no recibió el mismo interés que el del crecimiento bacteriano fueron: la dificultad para adquirir suficientes datos reproducibles que estén disponibles para el modelamiento, la falta de soporte de los fabricantes de alimentos y la inherente complejidad asociada a la cuantificación del crecimiento fúngico<sup>278</sup>.

La Micología Predictiva, es una herramienta clave en la microbiología de alimentos, específicamente en el deterioro causado por mohos, y tiene como objetivo desarrollar herramientas específicas para predecir el crecimiento fúngico y la producción de micotoxinas (metabolitos) en los alimentos y materias primas<sup>279</sup>, así mismo puede ser usado en el campo de la biotecnología y la fitopatología.

El desarrollo fúngico envuelve la germinación seguido por la proliferación del micelio, el cual comúnmente es reportado como la medida del crecimiento radial en milímetros por día<sup>280</sup>. La germinación de las esporas fúngicas (responsables por la diseminación de los mohos) comienza con la elongación del tubo germinativo y es de gran importancia en la microbiología de alimentos debido a que después de que ésta se completa, el micelio fúngico comienza a aparecer

muy rápidamente. Lamentablemente, la germinación requiere de observación microscópica para la evaluación de la longitud del tubo germinativo y además debe llevarse a cabo sin abrir las placas de Petri, lo cual dificulta su realización<sup>281</sup>.

Debido a los problemas mencionados anteriormente y a la necesidad de los micólogos de alimentos por estandarizar todo lo relacionado a la germinación de los mohos, en el año 2005 se llevó a cabo un taller en Francia, organizado por la Sociedad Microbiológica Francesa<sup>282</sup> donde se organizaron cinco grandes secciones: técnicas, definiciones, modelos, fisiología de la germinación y métodos alternativos a la observación microscópica.

Se revisaron las técnicas usadas en la preparación de esporas, los protocolos de inoculación (por dispersión en superficie y por incorporación), así como los equipos experimentales usados para el monitoreo de la germinación, llegando a la conclusión de que las diferentes técnicas no influyen sobre la obtención de datos exactos sin procesar y que todas son realizadas con el objetivo final de monitorear de 10 – 20 esporas por campo en el microscopio a 100 – 400X.

Se acordaron definiciones importantes, tales como considerar que una espora ha germinado cuando la longitud del tubo germinativo más largo es mayor o igual que la mayor dimensión de la espora hinchada. Por otro lado, el tiempo de germinación fue definido como el tiempo en que el 50 % de todas las esporas viables han germinado, sin embargo las personas interesadas en el deterioro de alimentos consideran que el porcentaje debería ser más bajo (10 %) mientras que las personas interesadas en el inicio de la producción de metabolitos fúngicos (micotoxinas) consideran que un 90 % es aceptable.

Se revisaron los métodos alternativos a la evaluación microscópica con la finalidad de evitar observaciones tediosas, consumo de tiempo y dificultad de validar modelos predictivos en productos turbios. Esto fue basado en un estudio realizado por Dantigny y col. (2002) con el moho *Mucor racemosus* sobre Agar Papa

Dextrosa donde se halló que el período lag coincidió con la finalización del proceso de germinación<sup>283</sup>, pudiendo ser reemplazado en algunos casos por la observación microscópica.

Actualmente, hay una tendencia para sustituir el tiempo de latencia con el tiempo al crecimiento visible<sup>284</sup>. Esto debido a dos razones: el tiempo de latencia aplicado a bacterias es un término erróneo para mohos porque la germinación de esporas y el crecimiento microscópico ocurren durante este tiempo y el tiempo al crecimiento visible es un parámetro de utilidad porque un producto es considerado deteriorado tan pronto como una colonia es visible dentro de él.

#### 2.4.5.2. Modelos usados

En micología predictiva, se usan los modelos primarios para determinar la inactivación, germinación y crecimiento fúngico, mientras que los modelos secundarios son usados para cuantificar los efectos de los diversos factores sobre el desarrollo fúngico. A continuación, mostraremos los principales modelos que son usados actualmente:

#### **Modelo de Inactivación (Ecuación clásica de primer orden)**

$$dN/dt = -kN$$

Este modelo primario es usado para modelar la inactivación de esporas fúngicas<sup>285</sup>, donde  $N$  es el número de esporas sobrevivientes después de un tratamiento (ufc/mL),  $t$  es el tiempo (min) y  $k$  es un ratio de inactivación ( $\text{min}^{-1}$ ). El valor  $D$  (min) o tiempo de reducción decimal es el tiempo que es necesario para inactivar el 90 % de las esporas a una determinada temperatura, donde  $D = (\ln 10)/k$ .



Por otro lado y de acuerdo con lo mencionado por Dagnas<sup>280</sup> y col. (2013) la cuantificación del desarrollo fúngico involucra la germinación y la proliferación del micelio. Usando los modelos primarios de Gompertz, Logístico y Asimétrico, los cuales son dedicados a describir la germinación fúngica, se puede estimar el tiempo de latencia antes de la germinación ( $\lambda_G$ ), el máximo porcentaje de esporas germinadas ( $P_{\max}$ ) y el tiempo de germinación ( $t_G$ ; tiempo para que el 50 % de las esporas en el inóculo germinen).

### La Ecuación de Gompertz

$$P_{(t)} = P_{\max} \cdot \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{\mu_G \cdot e(1)}{P_{\max}} \cdot (\lambda_G - t) + 1 \right] \right\}$$

Donde  $t$  es el tiempo (horas),  $P_{(t)}$  es el porcentaje de esporas germinadas al tiempo  $t$ ,  $P_{\max}$  (porcentaje) es el valor asintótico al que  $t \rightarrow + \infty$ ,  $\mu_G$  (porcentaje por hora) es el término de la pendiente de la línea tangente a través del punto de inflexión, y el  $\lambda_G$  (horas) es la latencia geométrica (t eje de intersección de la tangente a través del punto de inflexión).

En la práctica, este modelo ha sido usado por Zimmermann<sup>286,287</sup> y col. (2011, 2013), para evaluar el crecimiento de *Byssochlamys nivea* en jugo de piña y papaya influenciado por la actividad de agua y la edad de las ascosporas.

### El Modelo Logístico

$$P_{(t)} = \frac{P_{\max}}{1 + \exp [k(\tau - t)]}$$

Donde  $t$ ,  $P_{(t)}$ , y  $P_{\max}$  tienen las mismas definiciones que en la Ecuación de Gompertz,  $\tau$  (horas) es el punto de inflexión donde  $P = P_{\max}/2$  (con  $\tau$  igual al tiempo de germinación  $t_G$ ), “exp” es la función exponencial y  $k$  (porcentaje por hora) está

relacionado a la pendiente de la línea tangente a través del punto de inflexión. Por derivación, se extrapola la latencia antes de la germinación  $\lambda_G$ . Para los casos de deterioro, el tiempo de germinación es considerado como la germinación del 10 % de las esporas viables<sup>288</sup> y el modelo logístico simplificado es el siguiente:

$$\text{Para } P=10 \%, \quad t_{10\%} = \tau - \frac{\text{Ln} \left[ \frac{P_{\max}}{10} \right] - 1}{k}$$

### El Modelo Asimétrico

$$P_{(t)} = P_{\max} \left[ 1 - \frac{1}{1 + \left( \frac{t}{\tau} \right)^d} \right]$$

Este es el primer modelo dedicado a la germinación fúngica, y está basado sobre parámetros biológicos, teniendo la capacidad de ajustar satisfactoriamente las formas simétricas y asimétricas de las curvas de germinación<sup>289</sup>. Adicionalmente a los parámetros definidos en la ecuación de Gompertz y en el Modelo Logístico,  $d$  es un parámetro de forma y cuando este valor incrementa, la curva de germinación aparece más simétrica. Por derivación, es extrapolada la latencia antes de la germinación  $\lambda_G$ .

Con respecto a la proliferación del micelio, comúnmente es evaluada por ploteo del crecimiento radial visible (diámetro de la colonia) contra el tiempo. Los datos del crecimiento visible son enfrentados a los modelos primarios para estimar la latencia antes de la proliferación ( $\lambda$ ) y el ratio de proliferación radial ( $\mu$ ). Estos modelos pueden ser lineales o no lineales (como el de Baranyi).

### El Modelo Lineal (con punto de quiebre)

$$r = \mu \cdot (t - \lambda)$$

Donde  $r$  es el radio de la colonia (mm),  $\mu$  es el ratio de crecimiento radial ( $\text{mm d}^{-1}$ ), y  $\lambda$  es el tiempo de latencia (d). La sección lineal del gráfico (con ratio de crecimiento de  $\mu$ ) es extrapolado hacia el incremento cero en el diámetro y el intercepto con el eje del tiempo es definido como la fase de latencia previo al crecimiento ( $\lambda$ ).

### El Modelo de Baranyi

$$\begin{cases} D_{(t)} = D_0 + \mu \cdot A_{(t)} - \ln \left\{ 1 + \frac{[\exp(\mu \cdot A_{(t)}) - 1]}{\exp(D_{\max} - D_0)} \right\} \\ A_{(t)} = t + \left( \frac{1}{\mu} \right) \cdot \ln [\exp(-\mu \cdot t) + \exp(-\mu \cdot \lambda) - \exp(-\mu \cdot t - \mu \cdot \lambda)] \end{cases}$$

Donde  $t$  es el tiempo (días),  $D_{(t)}$  (milímetros) es el diámetro de la colonia al tiempo  $t$ ,  $D_{(0)}$  (milímetros) es el diámetro de colonia inicial,  $\lambda$  es la latencia (horas) antes del incremento en el diámetro de la colonia,  $\mu$  (milímetros por hora) es el ratio de proliferación radial, y  $D_{\max}$  (milímetros) es el máximo diámetro de la colonia (a menudo igual al diámetro de la placa de Petri usada para el cultivo).

Los modelos secundarios han sido desarrollados para cuantificar los efectos de la formulación, procesamiento y los factores ambientales sobre la cinética de proliferación del micelio y en cierta medida de la cinética de germinación. Son comúnmente usados tres modelos: cardinal con inflexión, polinomial y regresión logística.

### El Modelo Cardinal con Inflexión (CMI)

$$r = r_{\text{opt}} \cdot CM_n(Y, Y_{\min}, Y_{\text{opt}}, Y_{\max})$$

$$CM_n(Y, Y_{\min}, Y_{\text{opt}}, Y_{\max}) =$$

$$\left\{ \begin{array}{l} Y \leq Y_{\min}, \quad 0.0 \\ Y_{\min} < Y < Y_{\max}, \\ (Y - Y_{\min})^n \cdot (Y - Y_{\max}) \\ \hline (Y_{\text{opt}} - Y_{\min})^{n-1} \cdot \{(Y_{\text{opt}} - Y_{\min}) \cdot (Y - Y_{\text{opt}}) - (Y_{\text{opt}} - Y_{\max}) \cdot [(n - 1) \cdot Y_{\text{opt}} + Y_{\min} + nY]\} \\ Y \geq Y_{\max}, \quad 0.0 \end{array} \right.$$

Donde  $Y$  es el factor (por ejemplo,  $a_w$ , temperatura y pH),  $Y_{\min}$ ,  $Y_{\text{opt}}$  y  $Y_{\max}$  son el mínimo, óptimo y máximo valor de crecimiento respectivamente para este factor o variable,  $n$  es un parámetro de la curva o forma,  $r$  es el parámetro cinético ( $\mu$ : ratio de crecimiento específico, ratio de crecimiento radial, entre otros), y  $r_{\text{opt}}$  es el valor óptimo de  $r$  en el producto considerando los factores estudiados. Una de las ventajas de este modelo, propuesto por Rosso<sup>290</sup> y col., es que permite una estimación de la  $a_w$  (min) que no es fácilmente determinable porque el crecimiento fúngico bien puede ocurrir después de varios meses de incubación<sup>285</sup>.

### Los Modelos Polinomiales

$$Y = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 a_{ij} \cdot X_i \cdot X_j$$

Donde  $Y$  es la respuesta cinética (por ejemplo ratio de proliferación radial,  $\mu$ ), los coeficientes  $a_0$  y  $a_i$  son los parámetros estimados, y donde  $X_i$  y  $X_j$  son las variables independientes o de ingreso (por ejemplo  $a_w$  y temperatura).

Basado en la ecuación polinomial, Gibson<sup>291</sup> y col., desarrollaron el primer modelo secundario dedicado a los mohos, evaluando el efecto de la  $a_w$  (entre 0,995 y 0,810) a 30 °C sobre el ratio de proliferación radial ( $\mu$ ) de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus nomius*.

$$\ln(\mu) = a_0 + a_1 \cdot \sqrt{1 - a_w} + a_2 \cdot (1 - a_w)$$

Donde  $\mu$  es el ratio de proliferación radial,  $a_0$ ,  $a_1$  y  $a_2$ , son las constantes a ser estimadas y  $a_w$  es la actividad de agua.

### **Modelo de Crecimiento / No Crecimiento (basado en regresión logística)**

Otro tipo de modelo secundario es el modelo de límite de crecimiento / no crecimiento, donde el enfoque es más simple que en los otros casos y los operadores deben registrar un valor de “1” si hay crecimiento y “0” si no hay crecimiento, bajo una cierta combinación de factores intrínsecos y extrínsecos y después de un cierto tiempo. Para determinar la interfaz de crecimiento/no crecimiento sobre los factores considerados, los datos obtenidos son enfrentados a una regresión logística, a menudo relacionado a un modelo polinomial.

$$\text{logit}(P) = \ln\left(\frac{P}{1-P}\right) = a_0 + \sum_{i=1}^3 a_i \cdot X_i + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=1}^3 a_{ij} X_i X_j$$

Donde  $P$  es la probabilidad de crecimiento (rango de 0 a 1), los coeficientes  $a_i$  son parámetros estimados y los valores de  $X_i$  son los factores independientes (por ejemplo la  $a_w$ , temperatura y el pH).

Adicionalmente a los modelos mencionados anteriormente, Larralde<sup>292</sup> en 1996, presentó una nueva metodología para cuantificar la tasa específica de crecimiento de cultivos fúngicos, basada en la determinación morfométrica de los micelios durante la fase de germinación y el crecimiento vegetativo. La ecuación que usó fue la siguiente:

$$\mu_{\text{calc}} = \frac{u_r}{\alpha L_{\text{av}}} \left( \frac{\ln^2}{\ln\left(\frac{L_c}{D_h}\right)} \right)$$

Donde los parámetros morfométricos de la hifa estaban expresados en la longitud crítica ( $L_c$ ) y el diámetro ( $D_h$ ), y los de las colonias expresadas en la velocidad de

extensión radial ( $u_r$ ), la longitud de sus hifas distales ( $L_{av}$ ). Esta ecuación demostró satisfactoriamente su aplicación sobre la determinación de la tasa específica de crecimiento para *Gibberella fujikuroi* y *Aspergillus niger*, a pesar de que estos mohos presentaban diferentes comportamientos en su morfología.

#### 2.4.6. Futuro de la microbiología predictiva – Tendencias

Uno de los últimos avances en la microbiología predictiva es la unión de ésta área al uso de sistemas integradores de tiempo y temperatura (TTI – Time Temperature Integrator), los cuales son adheridos al producto y reaccionan cuando la cadena de frío se rompe, permitiendo hacer una evaluación en tiempo real del manejo de la temperatura en toda la cadena de distribución. Basado en esta aplicación y en que el monitoreo de la temperatura de la cadena de frío permite anticipar el efecto de abusos de temperatura sobre un determinado producto, Garcés<sup>293</sup> (2012) desarrolló un prototipo a nivel de componentes y modelos de respuesta para un TTI de base microbiológica, el cual mediante modelos obtenidos permitió relacionar de manera satisfactoria la respuesta del indicador frente al crecimiento de microorganismos presentes en leche pasteurizada comercial. Con esos modelos se consiguió indicar satisfactoriamente el fin de la vida útil de la leche pasteurizada refrigerada antes de que los patógenos alcancen un nivel crítico o la dosis infectiva, adicionalmente se desarrollaron modelos que relacionan el crecimiento del microorganismo indicador con el cambio del pH y con el cambio de color.

La unión de modelos cinéticos de la microbiología predictiva al modelamiento matemático integrado de ingeniería de procesos es un campo promisorio para el mejoramiento de la inocuidad alimentaria y para evaluar el deterioro de alimentos. Así lo demostró Santos da Silva<sup>294</sup> y col. (2014), quienes estudiaron y modelaron el proceso de enfriamiento evaporativo el efecto de la velocidad del aire de refrigeración y la temperatura inicial del producto sobre el tiempo al que *Byssochlamys fulva* deteriora la pulpa de papaya almacenada<sup>295</sup>.

Por otro lado, Schaffner<sup>296</sup> menciona que la tendencia son los modelos de contaminación cruzada y aquellos referentes al tamaño del inóculo, los cuales representan las nuevas áreas de modelamiento predictivo que serán desarrolladas en los próximos años. Las 3 líneas de investigación de contaminación cruzada que llegan de la evaluación de riesgos y de la epidemiología están relacionadas con 3 diferentes microorganismos: *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* y los virus de origen alimentario.

Recientemente, Pin<sup>297</sup> y col. (2013), mencionaron que en el futuro la microbiología predictiva centrará su atención en los **modelos a un nivel de población celular** con importancia en los dinámicos (donde las herramientas predictivas de la microbiología de alimentos estarán basadas sobre modelos dinámicos con variables que cuantifiquen: el nivel de concentración de un cierto organismo de origen alimentario, el nivel de un producto metabólico de interés, la capacidad de las células para sobrevivir, adaptarse y proliferar en un determinado ambiente), en el efecto de la competencia microbiana, en los cambios de los modelos determinísticos a estocásticos; los **modelos a nivel de células individuales** dando importancia a la relación entre células individuales y poblaciones y al efecto de la historia sobre las células individuales; los **modelos a nivel molecular**, modelando la expresión de los genes y las relaciones metabólicas. En resumen, la tendencia es a revelar la influencia molecular que define las respuestas bacterianas y la cinética poblacional a través de la cadena alimenticia.

Sin embargo, una de las áreas de mayor desafío para la microbiología predictiva será obtener modelos realistas para el tiempo de latencia, el cual está sujeto a importantes fuentes de variabilidad<sup>298</sup>.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. Preparación del inóculo (suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum*)

##### 3.1.1. Microorganismo

Después de la identificación del moho que causó el deterioro de las bebidas isotónicas por el BCN Research Laboratories, Inc. en el año 2009, se adquirió una cepa pura de *Fusarium oxysporum* FRR 3414 (Ver Anexo 1), el cual fue aislado por Ailsa D. Hocking en el año 1987, de un jugo de naranja fermentado. Actualmente, esta cepa se mantiene en el FRR Culture Collection del CSIRO Food and Nutritional Sciences, Australia y es la cepa elegida para este estudio.

##### 3.1.2. Obtención de esporas

La cepa pura de *Fusarium oxysporum* (FRR 3414), fue repicada sobre 10 placas de Petri conteniendo Agar Extracto de Malta (MEA), usando el método de sembrado con asa en aguja en 3 puntos sobre el agar, luego estas placas fueron incubadas a 30 °C por 7 días (pre – esporulación). Después de este período de incubación, se recogió el crecimiento del moho sobre la superficie del agar, incorporando 2 mL de agua destilada estéril en cada placa, y raspando suavemente la superficie con la ayuda de Asas de Drigalsky estériles. El sobrenadante fue recogido con una pipeta estéril y trasvasado a un frasco de vidrio estéril de capacidad de 250 mL.

De esta suspensión, 0.4 mL fue inoculado en cada una de las 50 placas de Petri conteniendo Agar Extracto de Malta (MEA), dispersando la suspensión sobre el agar con la ayuda de las Asas de Drigalsky estériles. Las placas fueron colocadas y selladas en bolsas plásticas para evitar su deshidratación y protegerlos de la contaminación, e incubadas a 30 °C por 30 días.



Después de los 30 días de incubación se realizó el raspado del crecimiento del moho sobre el agar, usando 4 mL de agua destilada estéril por placa y Asas de Drigalsky estériles. Toda la suspensión recogida con la ayuda de una pipeta estéril, fue llevada a un frasco de vidrio Schott estéril de 500 mL de capacidad.

La suspensión fue filtrada a través de 3 capas de gasa estéril para remover las hifas, siendo colectada en un frasco de vidrio seco y estéril, luego fue homogeneizada y sometida al proceso de centrifugación a 15000 rpm a 4 °C por 15 minutos (International Portable Refrigerated Centrifuge Model PR-2 Serial N° 40 000 M). El proceso fue repetido 2 veces usando como diluyente agua destilada estéril, evitándose así daños en las paredes de las esporas<sup>299</sup>.

La suspensión final fue transferida hacia tubos plásticos de ensayo estériles con capacidad de 50 mL conteniendo 30 perlas de vidrio estériles y luego fue mantenida en refrigeración entre 2 - 3 °C hasta su uso.

### 3.1.3. Estandarización del inóculo

#### 3.1.3.1. Conteo en Cámara de Neubauer

Una gota de la suspensión de esporas fue colocada en la cánula de la Cámara de Neubauer, siendo inmediatamente cubierta con una laminilla cubreobjeto. Después, la cámara fue llevada a un microscopio con aumento a 400 X para su lectura. Se contaron las esporas en los campos correspondientes, obteniendo así un valor aproximado del número de esporas/mL contenidos en la suspensión original. El valor obtenido es dado como aproximado, debido a que en ésta metodología se cuentan todas las esporas consideradas como viables y no viables por no poder distinguirse entre ellas. Por tal motivo, normalmente cuando se compara con el método de conteo por dilución y plaqueo, el conteo en la Cámara de Neubauer presenta cerca de 1 ciclo logarítmico a más<sup>300</sup>. Para obtener la

concentración de esporas en la solución madre analizada se utilizó la siguiente fórmula:

$$N_0 = \frac{N \times F \times 10^6}{0.25 \times n \times 16}$$

Donde  $N_0$  representa la concentración de la solución madre analizada (esporas/mL),  $N$  el número total de esporas contadas,  $F$  es el factor de la dilución usada, 0.25 es una constante de la fórmula,  $n$  el número de cuadrados contados de la cámara y 16 el número de divisorios de cada cuadrado.

### 3.1.3.2. Conteo por dilución y plaqueo

De la suspensión madre de esporas (debidamente homogenizada), se realizaron diferentes diluciones:  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$ , siguiendo la norma ISO 6887-1 (1999)<sup>301</sup>. De cada dilución fue extraído 1 mL para ser incorporado en una placa estéril y luego ser mezclado con Agar Extracto de Malta (MEA), siguiendo el método de incorporación de la ICMSF<sup>302</sup>. Las placas fueron incubadas a 30 °C por 7 días. Este método confirma la cantidad real de esporas viables/mL de la suspensión.

## 3.2. Modelamiento del deterioro causado por *Fusarium oxysporum* en la bebida isotónica sabor mandarina

### 3.2.1. Esquema de trabajo

Se diseñó un experimento para verificar el deterioro de la bebida a través del tiempo, en el cual se involucre cargas de esporas muy cercanas al límite máximo permisible por la R.M N° 591 - 2008 – MINSA -27/06/2008: “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano”<sup>303</sup>, y temperaturas de almacenamiento normalmente usadas en los puntos de venta o centrales de distribución en Perú. A

continuación se muestra una tabla resumen donde se indica los 4 experimentos diseñados:

Tabla N° 5. Diseño experimental

Experimento	Cantidad de unidades (bebidas isotónicas)	Carga de inóculo	Temperatura de Incubación (°C)	Monitoreo	Tiempo de monitoreo máximo
A	60	10 <sup>0</sup> esporas/ 100 mL de bebida	20 °C	3 veces por día	9 meses
B	60	10 <sup>1</sup> esporas/ 100 mL de bebida	20 °C	3 veces por día	9 meses
C	60	10 <sup>0</sup> esporas/ 100 mL de bebida	30 °C	3 veces por día	9 meses
D	60	10 <sup>1</sup> esporas/ 100 mL de bebida	30 °C	3 veces por día	9 meses

Estos experimentos fueron realizados por duplicado, en dos tiempos diferentes y utilizando distintos lotes de fabricación de bebidas isotónicas. El tiempo de monitoreo máximo fue de 9 meses, el cual es el tiempo de vida útil especificado para este producto.

Cada experimento fue acompañado de dos unidades positivas (mostrando un deterioro estándar) y dos unidades blancos (solo bebida isotónica sin ningún tipo de contaminación).

Cada lote de bebida isotónica fue evaluado en los siguientes parámetros: °Brix, sólidos disueltos totales (TDS), acidez titulable y pH, de acuerdo a las técnicas TM 200.010 (2005)<sup>304</sup>, TM 200.062 (2004)<sup>305</sup>, TM 200.076 (2004)<sup>306</sup> y TM 134.003 (2004)<sup>307</sup> respectivamente.

### 3.2.2. Evaluación e incorporación del inóculo en bebidas isotónicas

#### 3.2.2.1. Evaluación del inóculo (carga de esporas)

Después de conocer la carga de esporas en la solución madre, se realizaron diluciones sucesivas con el fin de obtener bajas concentraciones de esporas a ser inoculadas. Se realizaron los cálculos necesarios de inóculo a agregar (mL), con el fin de obtener cargas muy cercanas a  $10^0$  y  $10^1$  esporas/100 mL de bebida, tomando en cuenta que el volumen final de cada botella con producto es de 350 mL. Se usó la siguiente fórmula:

$$C_d = \frac{(V \times C_e)}{V_m}$$

Donde  $C_d$  es la concentración deseada ( $10^0$  o  $10^1$  esporas / 100 mL de bebida isotónica),  $V_m$  es el volumen de la muestra (en este caso representa 350 mL de bebida),  $V$  es el volumen de la suspensión de esporas a agregar y  $C_e$  es la concentración de la suspensión de esporas.

#### 3.2.2.2. Incorporación del inóculo (suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum*)

De manera aséptica se incorporó el inóculo previamente calculado en las unidades de bebida isotónica (350 mL). Las unidades fueron cerradas con las mismas tapas metálicas de origen, homogeneizadas y para evitar su contaminación externa, fueron cubiertas con un film plástico adherente a la altura del cuello de la botella. Cada unidad de cada experimento fue rotulada con un número consecutivo (del 1 al 60) e indicándose la temperatura de incubación, de esta manera cada botella pudiese ser eliminada después de una lectura positiva, sin llevar a confusión.

### 3.2.3. Incubación y monitoreo del deterioro

Las unidades inoculadas de los experimentos A y B fueron incubadas a la temperatura de  $20 \pm 1$  °C, y las de los experimentos C y D a una temperatura de  $30 \pm 1$  °C.

El monitoreo se realizó 3 veces por día durante 90 días como máximo, contra una buena fuente de luz y comparando las unidades contra los estándares y los blancos. Para que una unidad (botella de vidrio con 350 mL de bebida isotónica) sea considerada deteriorada o positiva, tenía que tener presencia de micelios visibles en suspensión, los cuales son fácilmente vistos contra luz a partir de un crecimiento mínimo radial de 3 mm, de acuerdo a lo postulado por Gibson<sup>291</sup> y col. (1994).

### 3.2.4. Cálculo de la probabilidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en la bebida isotónica sabor mandarina

La probabilidad de que el moho *Fusarium oxysporum* crezca y deteriore la bebida isotónica ( $P_{(t)}$ ) fue calculada por el número de botellas que presentan deterioro (positivas) a través del tiempo a una determinada temperatura y ajustada usando el modelo logístico de la microbiología predictiva mediante la siguiente ecuación:

$$P_{(t)} = \frac{P_{\max}}{1 + \exp [k(\tau - t)]}$$

Donde  $P_{\max}$  es el porcentaje máximo de botellas deterioradas,  $t$  es el tiempo en horas,  $k$  ( $h^{-1}$ ) es un parámetro de la pendiente que representa la tasa de crecimiento, “exp” es la función exponencial y  $\tau$  (h) es el tiempo para el que  $P = P_{\max}/2$ . El valor de  $P_{(t)}$  inicialmente es 0.0 y puede aumentar hasta 1.0, si todas las botellas presentaran crecimiento. Todos los tratamientos de los datos y las soluciones de ecuaciones fueron realizados en el software STATISTICA Version 7.

De acuerdo con Whiting y Call<sup>308</sup> (1993), y en base a las ecuaciones desarrolladas para cada experimento, se calculó el  $t_{10\%}$ , que representa para las industrias un tiempo límite para realizar un recojo de los productos en el mercado cuando fueran detectadas las primeras botellas deterioradas.

### 3.2.5. Ajuste del modelo a los datos (Goodness-of-fit)

De acuerdo a lo recomendado por Ratkowsky<sup>309</sup> (2004) para modelos de regresión lineal o no lineal, el ajuste del modelo a los datos fue evaluado por medio del RMSE (Root Mean Square Error o raíz del error cuadrático medio). El RMSE es definido matemáticamente como la raíz cuadrada del MSE (Mean Square Error) y puede ser visto como la discrepancia promedio entre los datos observados (transformados si es necesario) y sus valores predichos. Cuanto más cercano a cero mejor es el ajuste de los datos al modelo. Este valor fue obtenido del análisis de varianza (ANOVA) detallado en el Anexo 2.

#### IV. RESULTADOS

4.1. Determinación de la concentración de esporas de *Fusarium oxysporum* FRR 3414 en la solución madre

4.1.1. Conteo en Cámara de Neubauer

Se realizaron los conteos de esporas en 5 campos de la Cámara de Neubauer y los valores fueron reemplazados en la fórmula, obteniendo:

$$N_0 = \frac{N \times F \times 10^6}{0.25 \times n \times 16} = \frac{4695 \times 1 \times 10^6}{0.25 \times 5 \times 16} = 5 \times 10^9 \text{ esporos /mL}$$

En base a estos resultados se realizaron las diluciones sucesivas para conocer la cantidad de esporas viables, por medio del método por incorporación.

4.1.2. Conteo por dilución y plaqueo

De los resultados mostrados en la tabla N° 6 se eligieron los conteos de la dilución  $10^{-6}$  para realizar el cálculo, por contener valores entre 30 – 300 para ambos ensayos.

Tabla N° 6. Conteo de colonias de *Fusarium oxysporum* en cada dilución expresados en ufc/mL a partir de una suspensión inicial de 1/9

Dilución	Ensayo N° 1	Ensayo N° 2
$10^{-6}$	55	52
$10^{-7}$	1	4
$10^{-8}$	0	0

El resultado final de la carga de esporas en la solución madre fue de  $5 \times 10^8$  ufc/mL.

## 4.2. Preparación y estandarización del inóculo (suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* FRR 3414)

### 4.2.1. Obtención de concentraciones de $10^0$ y $10^1$ esporas/100 mL de bebida isotónica

A partir de la solución madre de esporas de *Fusarium oxysporum* ( $5 \times 10^8$  esporas/mL), se realizaron diluciones sucesivas (hasta  $10^{-8}$ ), tomando una cantidad en mL de la suspensión madre con  $1 \times 10$  esporas /mL, con el fin de incorporarlo en la bebida isotónica (botellas x 350 mL y obtener una concentración de  $10^0$  y  $10^1$  esporas/100 mL de bebida.

Reemplazando los valores correspondientes en la fórmula  $C_d = \frac{(V \times C_e)}{V_m}$ , se obtuvo un valor de inóculo de 0.7 mL de la dilución  $10^{-7}$  para obtener una concentración de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida y un valor de inóculo de 0.7 mL de la dilución  $10^{-8}$  para obtener una concentración de  $10^0$  esporas /100 mL de bebida. Debido a la alta variabilidad en este rango de inóculo (baja concentración de esporas), se decidió incorporar por seguridad 1 mL de las diluciones  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  en cada botella de bebida isotónica (cuyo volumen es de 350 mL).

Tabla N° 7. Cantidad de inóculo a agregar en cada botella con 350 mL de bebida isotónica

Experimento	Dilución $10^{-7}$	Dilución $10^{-8}$	Cantidad de unidades inoculadas
A	-	1 mL	60
B	1 mL	-	60
C	-	1 mL	60
D	1 mL	-	60



#### 4.2.2. Verificación de la concentración final de esporas de *Fusarium oxysporum* FRR 3414 en unidades de bebidas isotónicas

Para verificar la concentración final de esporas de *Fusarium oxysporum* en las unidades experimentales, se simuló la inoculación en unidades de bebida isotónica sabor mandarina (350 mL), y se analizaron siguiendo el método de filtración en membrana<sup>310</sup>, usando Agar Patata Dextrosa (PDA) como medio de cultivo, colocando las placas sobre una bolsa debidamente sellada e incubándolas a 30 °C por 7 días. El conteo de las placas para las diluciones  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  fueron los siguientes:

Tabla N° 8. Concentración de mohos en cada dilución expresados en ufc/100 mL de bebida

	Dilución	
	$10^{-7}$	$10^{-8}$
Ensayo 1	3	12
Ensayo 2	4	11
Ensayo 3	2	15

De acuerdo a estos resultados, los cuales comprueban un correcto cálculo, se decidió seguir con la inoculación de las demás botellas (conteniendo la bebida isotónica) hasta completar las 60 unidades de cada experimento, como puede ser apreciado en la figuras N° 3 y 4.



Figura N° 3. Set de botellas conteniendo bebida isotónica sabor mandarina inoculadas con esporas de *Fusarium oxysporum* FRR 3414



Figura N° 4. Unidades inoculadas y codificadas de bebida isotónica sabor mandarina para cada experimento

#### 4.3. Modelamiento del deterioro causado por *Fusarium oxysporum* FRR 3414 en la bebida isotónica sabor mandarina

##### 4.3.1. Parámetros fisicoquímicos de los lotes de bebida isotónica

La siguiente tabla muestra los resultados obtenidos de °Brix, pH, acidez titulable y sólidos disueltos totales en los 2 lotes de bebida isotónica sabor mandarina pasteurizada y llenada en caliente.

Tabla N° 9. Características fisicoquímicas de los lotes de bebida isotónica sabor mandarina usados como medio para el modelamiento predictivo

Valores					
Lote de:	Fecha de Producción	° Brix	pH	Acidez titulable*	Sólidos Disueltos Totales (TDS)
Ensayo N° 1	19/06/2013	6.2	3.01	45.70 mL	1585 ppm
Ensayo N° 2	19/06/2013	6.3	2.97	45.10 mL	1579 ppm

\*mL gastados de NaOH al 0.1 N

##### 4.3.2. Resultado del monitoreo de las unidades inoculadas de bebida isotónica

A continuación se muestra en las tablas N° 10 y 11 los resultados del monitoreo de las bebidas inoculadas a través del tiempo, donde cada unidad fue eliminada si el resultado era positivo (presencia de hifas en suspensión).

Tabla N° 10. Tiempo para el crecimiento de *Fusarium oxysporum* FRR 3414 en bebida isotónica sabor mandarina en función de la carga de esporas a 20 °C.

Hora	10 <sup>0</sup> esporas/100 mL de bebida isotónica				10 <sup>1</sup> esporas/100 mL de bebida isotónica			
	Ensayo N° 1		Ensayo N° 2		Ensayo N° 1		Ensayo N° 2	
	Número de botellas positivas	%	Número de botellas positivas	%	Número de botellas positivas	%	Número de botellas positivas	%
0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
14	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
19	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
24	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
38	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
43	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
48	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
62	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
67	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
72	0	0.0	0	0.0	2	3.3	0	0.0
86	0	0.0	1	1.7	11	18.3	8	13.3
91	0	0.0	1	1.7	25	41.7	29	48.3
96	2	3.3	3	5.0	39	65.0	47	78.3
110	21	35.0	52	86.7	60	100.0	60	100.0
115	29	48.3	60	100.0	-	-	-	-
120	33	55.0	-	-	-	-	-	-
134	53	88.3	-	-	-	-	-	-
139	60	100.0	-	-	-	-	-	-

Tabla N° 11. Tiempo para el crecimiento de *Fusarium oxysporum* FRR 3414 en bebida isotónica sabor mandarina en función de la carga de esporas a 30 °C.

Hora	10 <sup>0</sup> esporas/100 mL de bebida isotónica				10 <sup>1</sup> esporas/100 mL de bebida isotónica			
	Ensayo N° 1		Ensayo N° 2		Ensayo N° 1		Ensayo N° 2	
	Número de botellas positivas	%	Número de botellas positivas	%	Número de botellas positivas	%	Número de botellas positivas	%
0	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
3	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
8	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
22	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
27	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
32	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
46	0	0.0	0	0.0	0	0.0	0	0.0
51	0	0.0	0	0.0	1	1.7	0	0.0
56	0	0.0	0	0.0	10	16.7	6	10.0
70	5	8.3	1	1.7	60	100.0	57	95.0
75	17	28.3	21	35.0	-	-	60	100.0
80	46	76.7	59	98.3	-	-	-	-
94	60	100.0	60	100.0	-	-	-	-

En la figura N° 5 se aprecia el control de cada unidad contra una buena fuente de luz para lograr observar la colonia de *Fusarium oxysporum* en la bebida isotónica, que se muestra en forma de un copo de algodón o hilos en suspensión.

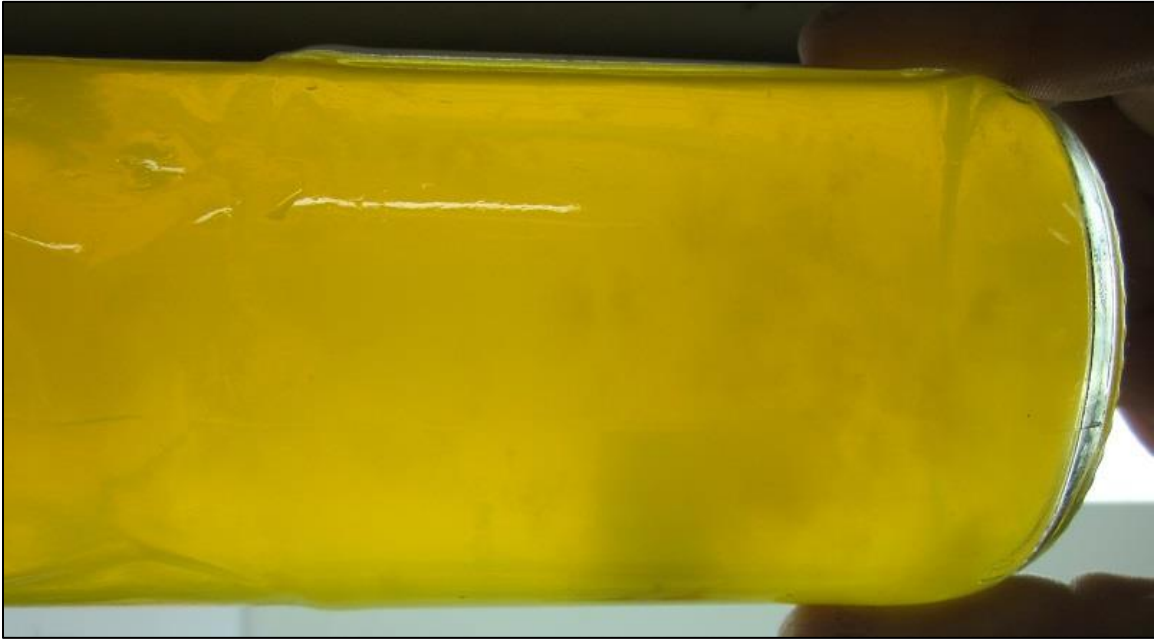


Figura N° 5. Verificación de unidades positivas de bebida isotónica en estudio contra una fuente de luz

#### 4.3.3. Enfrentamiento de los datos al Modelo Logístico y cálculo del $t_{10\%}$

Los datos generados por los experimentos A, B, C y D, fueron ingresados en el software STATISTICA Version 7, y enfrentados al modelo logístico, obteniéndose los parámetros  $P_{\max}$  (%),  $\kappa$  ( $h^{-1}$ ) y  $\tau$  (h) y las gráficas correspondientes, los cuales se muestran en las tablas N° 12 y 13, y figuras N° 6 y 7 respectivamente.

Tabla N° 12. Parámetros estimados a partir del enfrentamiento de los datos de probabilidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* al Modelo Logístico, con una carga de 10<sup>0</sup> esporas/100 mL de bebida isotónica sabor mandarina.

Condiciones experimentales		Valores de parámetros		
Temperatura de almacenamiento	Ensayos	P <sub>max</sub> (%)	κ (h <sup>-1</sup> )	τ (h)
20 °C	N° 1	100.00	0.13	116.48
		[99.99; 100.00]*	[0.08; 0.17]	[113.93; 119.03]
	N° 2	100.00	0.35	104.57
		[99.99; 100.00]	[0.31; 0.39]	[103.88; 105.26]
30 °C	N° 1	100.00	0.33	77.62
		[90.99; 100.00]	[0.23; 0.44]	[76.46; 78.79]
	N° 2	100.00	1.01	75.61
		[99.99; 100.00]	[0.82; 1.21]	[75.46; 75.75]

\*Intervalo de confianza al 95 % entre corchetes.

Tabla N° 13. Parámetros estimados a partir del enfrentamiento de los datos de probabilidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* al Modelo Logístico, con una carga de 10<sup>1</sup> esporas/100 mL de bebida isotónica sabor mandarina.

Condiciones experimentales		Valores de parámetros		
Temperatura de almacenamiento	Ensayos	P <sub>max</sub> (%)	κ (h <sup>-1</sup> )	τ (h)
20 °C	N° 1	100.00	0.20	93.76
		[91.54; 108.45]*	[0.15; 0.25]	[92.79; 94.72]
	N° 2	100.00	0.26	92.46
		[99.99; 100.00]	[0.16; 0.37]	[91.29; 93.63]
30 °C	N° 1	100.00	6.13	67.26
	N° 2	100.00	1.69	68.2
		[97.40; 102.59]	[1.07; 2.30]	[67.77; 68.81]

\*Intervalo de confianza al 95 % entre corchetes.

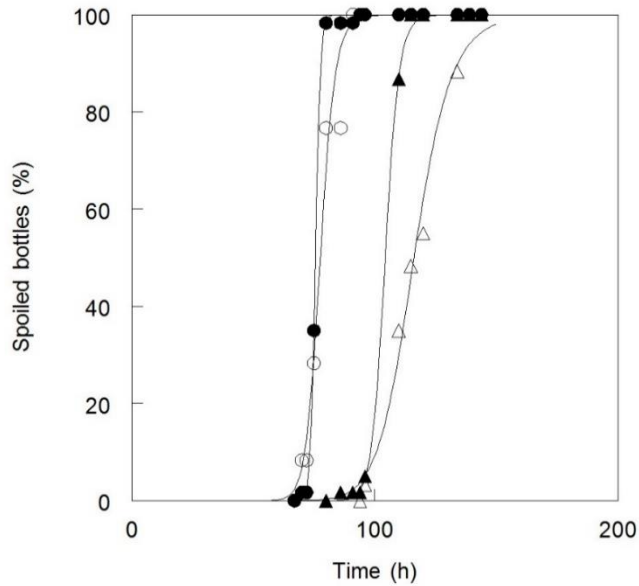


Figura N° 6. Porcentaje de botellas deterioradas (n = 60) por *Fusarium oxysporum* FRR 3414 en bebida isotónica sabor mandarina en función del tiempo, para un inóculo de  $10^0$  esporas/100 mL de bebida. ( $\Delta$ ) 1° ensayo a 20 °C, ( $\blacktriangle$ ) 2° ensayo a 20 °C, ( $\circ$ ) 1° ensayo a 30 °C, ( $\bullet$ ) 2° ensayo a 30 °C.

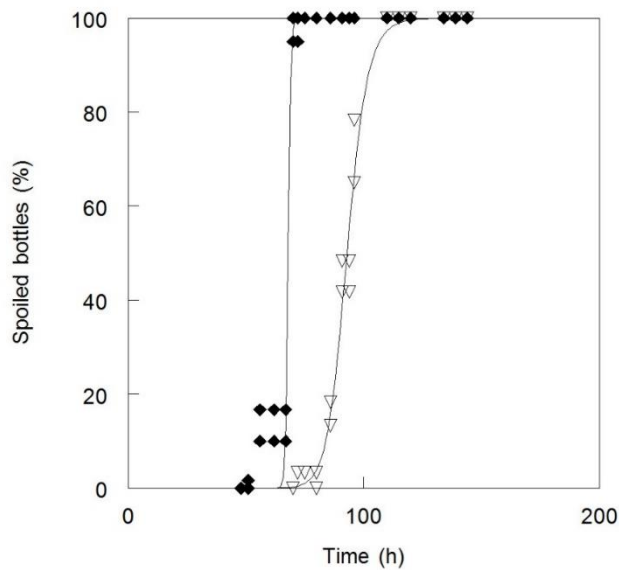


Figura N° 7. Porcentaje de botellas deterioradas (n = 60) por *Fusarium oxysporum* FRR 3414 en bebida isotónica sabor mandarina en función del tiempo, para un inóculo de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida. ( $\nabla$ ) 1° ensayo a 20 °C, ( $\blacklozenge$ ) 2° ensayo a 30 °C.



Reemplazando los valores de  $P_{\max}$  (%),  $\kappa$  ( $h^{-1}$ ) y  $\tau$  (h) para cada experimento se pudo generar 8 ecuaciones, las cuales se usaron para predecir en cada caso el tiempo al que el 10 % ( $t_{10\%}$ ) de las unidades evaluadas presentarán contaminación. Ver tabla N° 14.

Tabla N° 14. Valores calculados de  $t_{10\%}$  para cada experimento.

Carga de esporas	Temperatura de almacenamiento	Ensayo	Número de ecuación	Ecuación	$t_{10\%}$ (h)	RMSE
$10^0$ / 100 mL de bebida isotónica	20 °C	N° 1	E-1	$P_{(t)} = \frac{100}{1+\exp [0.13(116.48 - t)]}$	106.46	5.4397
		N° 2	E-2	$P_{(t)} = \frac{100}{1+\exp [0.35(104.57 - t)]}$	100.84	1.1240
	30 °C	N° 1	E-3	$P_{(t)} = \frac{100}{1+\exp [0.33(77.62 - t)]}$	73.77	5.8145
		N° 2	E-4	$P_{(t)} = \frac{100}{1+\exp [1.01(75.61 - t)]}$	74.32	0.8448
$10^1$ / 100 mL de bebida isotónica	20 °C	N° 1	E-5	$P_{(t)} = \frac{100}{1+\exp [0.20(93.76 - t)]}$	87.24	3.8416
		N° 2	E-6	$P_{(t)} = \frac{100}{1+\exp [0.26(92.46 - t)]}$	87.45	5.6850
	30 °C	N° 1	E-7	$P_{(t)} = \frac{100}{1+\exp [6.13(67.26 - t)]}$	67.04	5.9196
		N° 2	E-8	$P_{(t)} = \frac{100}{1+\exp [1.69(68.2 - t)]}$	67.42	3.8573

RMSE (Root Mean Square Error o Raíz del Error Cuadrático Medio).

## V. DISCUSIÓN

De acuerdo con Dagnas y Membré<sup>280</sup> (2013), el deterioro fúngico ocurre cuando un alimento o bebida es contaminado antes del fin de su vida útil con esporas fúngicas, las cuales germinan y forman un micelio visible. Matemáticamente, el deterioro puede ser expresado como una combinación de probabilidades: la probabilidad de llegar a contaminarse y la probabilidad del crecimiento fúngico dentro del alimento o bebida (germinación y proliferación), siendo ésta última probabilidad de gran importancia en esta investigación.

*Fusarium oxysporum* fué inoculado en la bebida isotónica sabor mandarina a dos niveles de inóculo ( $10^0$  y  $10^1$  esporas /100 mL de bebida isotónica) y luego incubada a 20 y 30 °C, consideradas como temperaturas de almacenamiento. El bajo nivel del inóculo corresponde a la menor carga microbiológica de esporas que podría llegar a la bebida y porque es más representativo de lo que ocurre en la realidad<sup>280</sup>, mientras que el alto nivel del inóculo se estableció de acuerdo a la R.M N° 591 - 2008 – MINSA -27/06/2008: “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano”<sup>303</sup> y también porque es un límite microbiológico que usan las industrias de bebidas para la carga microbiológica ambiental de la sala de procesamiento<sup>311</sup>.

Al realizar la inoculación de *Fusarium oxysporum* en las bebidas isotónicas para alcanzar las concentraciones de esporas deseadas, se incorporaron 0.3 mL más de las diluciones  $10^{-7}$  y  $10^{-8}$  (solución madre), debido a que bajo condiciones ambientales marginales algunas esporas son incapaces de iniciar la formación del tubo germinativo<sup>277</sup> y también porque en rangos bajos de inóculo hay una alta variabilidad. Esto podría haber afectado la investigación, generando tiempos de crecimientos más largos o incluso no crecimiento.

El monitoreo fue realizado 3 veces por día de acuerdo a lo especificado en la tabla N° 5. El primer control fue a las 08:00 horas, el segundo control a las 13:00 horas, y el último control fue a las 18:00 horas. El intervalo de horas que existe entre el primer y segundo control es de 5 horas, al igual que entre el segundo y tercero, mientras que entre el tercer control y el primero hay un intervalo de 14 horas. Esto es reflejado en las tablas N° 10 y 11, donde se muestran que el experimento con  $10^0$  y  $10^1$  esporas /100 mL de bebida isotónica a 20 °C comenzó a las 18:00 horas de un día (hora "0") y el segundo control fue a las 08:00 horas del día siguiente, mientras que para el experimento con  $10^0$  y  $10^1$  esporas /100 mL de bebida isotónica a 30 °C debido a un retraso por capacidad del laboratorio, comenzó a las 10:00 horas de un día (hora "0") y de ahí se siguió con el intervalo según lo mencionado anteriormente. Todas las réplicas en cada experimento fueron dadas en las mismas condiciones.

Los resultados obtenidos de los experimentos A, B, C y D (tablas N° 10 y 11), demuestran que el tiempo que toma *Fusarium oxysporum* en aparecer en la bebida isotónica sabor mandarina decrece en función del aumento tanto de la temperatura de almacenamiento como de la carga del inóculo, siendo el tratamiento que mejor retrasa el deterioro el que combina una temperatura de 20 °C con una carga de  $10^0$  esporas/100 mL de bebida isotónica y el tratamiento que genera un deterioro más rápido es aquel dado a una temperatura de 30 °C con una carga de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica. Estos resultados son muy semejantes a los obtenidos por Sant'Ana<sup>288</sup> y col. (2010) cuando modeló el deterioro de jugo clarificado de manzana ocasionado por el moho *Byssochlamys fulva* y también por Guedes<sup>312</sup> y col. (2013) cuando usó el modelo logístico para evaluar el deterioro causado por *Mrakia frigida* en jugo de naranja refrigerado.

En todos los experimentos el máximo porcentaje de botellas positivas (deterioradas) alcanzó el 100 % ( $P_{max}$ ). A una temperatura de 20 °C, *Fusarium oxysporum* llegó a deteriorar el 100 % de las botellas en un máximo de 139 horas cuando presenta una carga de  $10^0$  esporas/100 mL de bebida isotónica, mientras

que a 30 °C lo hizo en 94 horas (tablas N° 10 y 11). Así mismo, al almacenar las botellas a una temperatura de 30 °C el máximo deterioro ocurrió a las 94 y 75 horas para una carga de  $10^0$  y  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica respectivamente (tabla N° 11).

Al analizar los parámetros obtenidos del enfrentamiento de los datos al modelo logístico, los cuales son mostrados en las tablas N° 12 y 13 y representados en las figuras N° 6 y 7, podemos observar que cuando se mantiene la carga de esporas el valor de  $\tau$  en horas ( $P = P_{\max}/2$ ), que en este caso representa el 50 % de probabilidad de deterioro en cada experimento, aumenta cuando la temperatura disminuye. Se evidenció también que cuando la carga del inóculo fue de  $10^0$  esporas/100 mL de bebida isotónica, incluso a 20 y 30 °C, los datos mostraron diferencias significativas en el tiempo para obtener el 50 % de botellas deterioradas.

Los parámetros del modelo fueron estimados con una buena exactitud, basados en los valores de RMSE (raíz del error cuadrático medio) reportados en la tabla N° 14 y comparados contra los valores obtenidos por Sant'Ana<sup>288</sup> y col. (2010). Con una carga de inóculo de  $10^0$  esporas/100 mL de bebida isotónica, se obtuvieron valores máximos de 5.4397 y 5.8145 a temperaturas de almacenamiento de 20 y 30 °C respectivamente. Valores similares se obtuvieron para una carga de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica a 20 y 30 °C, dando como máximos resultados 5.6850 y 5.9196 en cada caso. Estos valores indican que los datos generados en los experimentos se ajustaron con buena exactitud al modelo logístico de la microbiología predictiva.

Con excepción del tratamiento a 30 °C con  $10^0$  esporas/100 mL de bebida isotónica y  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica a 20 °C, todos los demás tratamientos presentaron diferentes tiempos para el deterioro de las 60 botellas con respecto a sus réplicas (tablas N° 10 y 11). Esto puede ser explicado debido a que las esporas fúngicas incluso con el mismo tratamiento (estado fisiológico) y

las mismas condiciones de germinación son muy heterogéneas en términos de tiempos para germinar individualmente. Por ello el tiempo de germinación de una espora no es un valor fijo y puede ser caracterizado mejor usando una distribución de probabilidades, tal como lo hizo Gougouli<sup>313</sup> y col. (2011) cuando comparó las distribuciones de tiempos de germinación de esporas individuales de *Penicillium expansum* y *Aspergillus niger* con el fin de investigar la relación del tiempo de germinación con los tiempos de latencia micelial. La proporción de unidades deterioradas de 7/1000 y 8/10 000 para los sabores de mandarina y frutas tropicales respectivamente, que obtuvo la planta de fabricación después de una revisión al 100 % de casi 170 000 unidades (data no publicada), es probablemente debido a lo mencionado anteriormente asociado a los factores intrínsecos que se presenta en cada sabor.

Los valores de  $t_{10\%}$ , que representa el tiempo al que el 10 % de las botellas estarán deterioradas, fueron calculados para cada combinación de temperatura y carga de inóculo (tabla N° 14). Al mantener la misma condición de temperatura en un experimento, el valor de  $t_{10\%}$  aumenta en función de la disminución en la carga del inóculo, por ejemplo a una temperatura constante de 30 °C se obtuvo un valor máximo de 67.42 horas con una carga de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica en comparación a 74.32 horas como máximo para una carga de  $10^0$  esporas/100 mL de bebida isotónica. Esto se da porque al presentar una mayor población de esporas en solución, hay mayor probabilidad de que cualquiera de ellas pueda germinar más rápido en comparación a una sola.

El menor valor de  $t_{10\%}$  (67.04 horas), se obtuvo con un tratamiento de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica a 30 °C. Este tiempo es de suma importancia para la industria de bebidas, ya que dispara la alerta de recojo de productos en el mercado cuando las primeras botellas son detectadas.

A diferencia de las curvas obtenidas para los experimentos A y C que se mostraron individualmente en la figura N° 6, los datos obtenidos de los

experimentos B y D ( $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica a 20 y 30 °C), pueden ser mostrados gráficamente en solo 2 curvas debido a que la diferencia de los resultados del primer ensayo en cada experimento con respecto a su réplica fue mínima.

Los ensayos fueron realizados en 2 lotes diferentes de bebidas isotónicas sabor mandarina, con la finalidad de verificar si los datos de probabilidad de crecimiento eran reproducibles. Como puede ser observado en la tabla N° 9, los valores de °Brix, pH, sólidos disueltos totales (TDS) y acidez titulable no fueron muy diferentes entre sí y los resultados de probabilidad de crecimiento tampoco (tablas N° 10, 11 y 14). Es importante mencionar que debe realizarse un estudio más profundo acerca de la interacción de °Brix, pH, sólidos disueltos totales (TDS), acidez titulable y las temperaturas de almacenamiento, considerando valores máximos, mínimos y promedios que se obtienen durante la fabricación, debido a que pueden influenciar significativamente en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* en la bebida isotónica.

## VI. CONCLUSIONES

A través de esta investigación se puede concluir que:

- *Fusarium oxysporum* es capaz de crecer y deteriorar la bebida isotónica sabor mandarina, incluso a muy bajas concentraciones de inóculo ( $10^0$  esporas/100 mL de bebida isotónica) formando un micelio visible en suspensión. El tratamiento que mejor retrasa el deterioro es dado a una temperatura de 20 °C con una carga de  $10^0$  esporas/100 mL de bebida isotónica, mientras que el tratamiento que genera un deterioro más rápido es dado a una temperatura de 30 °C con una carga de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica.
- El menor valor de  $t_{10\%}$  (67.04 horas) se obtuvo con un tratamiento de  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica a 30 °C. A una temperatura constante, el valor de  $t_{10\%}$  aumenta en función de la disminución en la carga de esporas.
- Basados en los valores obtenidos de RMSE (0.8448 – 5.9196), los datos generados en los experimentos se ajustaron con buena exactitud al modelo logístico.

## VII. RECOMENDACIONES

La presente investigación fue realizada en un solo sabor de bebida isotónica, sin embargo en la actualidad existe en el mercado diversos sabores y presentaciones, las cuales básicamente se diferencian en el aceite esencial que contienen, aportándole ese aroma característico a determinada fruta. La presencia de estos aceites esenciales podría influenciar la probabilidad de crecimiento de *Fusarium oxysporum* en los diversos sabores de bebidas isotónicas produciendo diferentes tiempos para el crecimiento de este microorganismo, por ello debería ser investigado.

Es necesario conocer a profundidad: ¿cómo es el desarrollo de este microorganismo en la bebida isotónica cuando ya la espora está dentro?, esto podría conocerse usando modelos primarios tal como el de Baranyi para cuantificar las fases de latencia, los ratios máximos de crecimiento y los diámetros máximos alcanzados por las colonias de *Fusarium oxysporum* en las bebidas isotónicas. La interacción entre los diversos valores de los parámetros fisicoquímicos en estas bebidas, como °Brix, pH, sólidos disueltos totales y acidez titulable, pueden influir en el comportamiento del *F. oxysporum*. Estudios para cuantificar la influencia de estos parámetros usando modelos secundarios de la microbiología predictiva tal como el de Superficie de Respuesta podrían ser usados para elucidar esta hipótesis.

Debido a que muchas especies del género *Fusarium* producen importantes micotoxinas, es necesario evaluar si el *F. oxysporum* es capaz de generar algún tipo de micotoxina dentro de la bebida isotónica, y si lo hace, poder cuantificarlo a través del tiempo.

Finalmente las ecuaciones desarrolladas en esta investigación pueden ser aplicadas en la industria de bebidas isotónicas con sabor a mandarina, para ayudar a la toma de decisiones en el aseguramiento de la calidad.



## VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. PepsiCo International. Herramienta de Calidad de Bebidas No Carbonatadas: Microbiología. Versión N° 2, Mayo 2005. p. 1-66.
2. Cabral D, Fernández P. Fungal spoilage of bottled mineral water. *Int J Food Microbiol.* 2002; 72:73-6.
3. Nevarez L, Vasseur V, Le Madec A, Le Bras MA, Coroller L, Leguériel I, Barbier G. Physiological traits of *Penicillium glabrum* strain LCP 08.5568, a filamentous fungus isolated from bottled aromatised mineral water. *Int J Food Microbiol.* 2009; 130(3):166-71.
4. Ancasi EG, Carrillo L, Benitez Ahrendts MR. Mohos y levaduras en agua envasada y bebidas sin alcohol. *Rev Argent Microbiol.* 2006; 38(2):93-6.
5. Trienekens J, Zuurbier P. Quality and safety standards in the food industry, developments and challenges. *Int J Prod Econ.* 2008; 113(1):107-22.
6. Mortimore S, Wallace C. Chapter 1: An introduction to HACCP and its role in food safety control. In: Mortimore S, Wallace C, editors. *HACCP: A practical approach*. Third Edition. New York: Springer; 2013. p. 1-36.
7. Gatorade.com [página de internet]. Gatorade Company. [citado el 18 de Diciembre de 2011]. Disponible en: <http://www.gatorade.com/default.aspx#gseries?s=gseries>.
8. Simpson P, Taormina P. Chapter 20: Nonalcoholic beverages. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), editor. *Microorganisms in Foods 8. Use of data for assessing process control and product acceptance*. New York: Springer Science + Business Media, LLC; 2011. p. 269-280.
9. Quaker Microbiology Manual. "Manual Microbiology Beverage 80MB0400 - Yeast and Mold Identification". December 1999. New York.
10. Encina C, Ureña M. Determinación de la máxima retención de ácido ascórbico del Aguaymanto (*Physalis peruviana*, Linnaeus, 1753) en almíbar aplicando el método de superficie de respuesta. *An cient UNALM.* 2008; 69(4):106-14.

11. Silva F, Gibbs P. Target Selection in Designing Pasteurization Processes for Shelf-Stable High-Acid Fruit Products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004; 44 (5): 353-60.
12. Tran-Dinh N, Hocking A, Charley N. *Fusarium oxysporum* as a spoilage agent of ready-to-drink beverages. In: 8<sup>th</sup> International Mycological Congress; 2006 August 20-25; Cairns, Australia.
13. Ross T, McMeekin TA, Baranyi J. Predictive microbiology and food safety. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology.* Volume 3. Second Edition. London: Academic Press; 2014. p. 53-68.
14. Murray R, Stofan J. Chapter 8: Formulating carbohydrate-electrolyte drinks for optimal efficacy. In: Maughan RJ, Murray R. editors. *Sports drinks. Basic Science and Practical Aspects.* Boca Raton: CRC Press LLC; 2001. p. 197-223.
15. Palmer Q. Chapter 13: Special topics. In: Ashurst PR, editor. *Chemistry and Technology of Soft Drinks and Fruit Juices.* Second Edition. Oxford: Blackwell Publishing Ltd.; 2005. p. 336–368.
16. British Soft Drink Association. *The 2011 UK Soft Drinks Reports.* By popular demand. *Sports & Energy Drinks Statistics.* 2011.
17. Maughan RJ. Chapter 20: Sports beverages for optimizing physical performance. In: Wilson T, Temple NJ, editors. *Beverages in Nutrition and Health.* New Jersey: Humana Press Inc.; 2004. p. 289-305.
18. Maughan RJ. Chapter 14: Sports beverages for optimising physical performance. In: Paquin P, editor. *Functional and speciality beverage technology.* Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2009. p. 346–369.
19. Spano M. Trends in sports drink formulations. *Prepared Foods.* 2010 June; 179(6): 75-85.
20. Magnenet J. El futuro de los sabores en las bebidas deportivas. *Mundo Alimentario.* 2008 Marzo/Abril. p. 20-21.
21. Gamarra S. Bebidas para deportistas: Antocianinas y el boom del óxido nítrico. *Mundo Alimentario.* 2008 Marzo/Abril. p. 17.
22. Torres E. Reportaje especial. Actualidad de la Industria Alimenticia de América Latina: Bebidas. *Industria Alimenticia.* 2011 Noviembre; 22(11): 26-29.

23. Torres E. Refrescante irrumpir de las bebidas. Hay camino aún por recorrer. *Industria Alimenticia*. 2010 Octubre; 21(10): 12-17.
24. Torres E. Informe Anual de Bebidas. La sed mundial a buen ritmo. *Industria Alimenticia*. 2012 Agosto; 23: 14-24.
25. Torres E. Reportaje anual de bebidas. Lo que usted debe conocer. *Industria Alimenticia*. 2011 Agosto; 22(8): 18-25.
26. Zegler J. Sports drinks focus on performance. *Beverage Industry*. 2012 July. S01-6.
27. BNA Brasil Relatório 2011 – ABIR. Consumo de todas as bebidas comerciais 2005 – 2010. ABIR, CANADEAN.
28. Ipsos APOYO Opinión y Mercado S.A. Liderazgo en productos comestibles 2013. Informe Gerencial de Marketing. Junio 2013.
29. El comercio. Consumo de líquidos y medida: ¿Cómo estamos en el consumo de bebidas?. 2008 Jun 16; Supl. Día\_1: 22 (col. 1-4).
30. Elcomercio.pe [página de internet]. Empresa editora El Comercio. [citado el 18 de Diciembre de 2011]. Disponible en: <http://elcomercio.pe/ediciononline/html/2009-01-25/el-consumo-bebidas-deportivas-triplico-dos-anos-peru.html>.
31. Pizarro J. Crece mercado de bebidas isotónicas. *La República*. 2009 Jul 02; Secc. Economía: 15 (col. 1).
32. Torres A. Crisis no afectó consumo real de familias durante el 2009. *El Comercio*. 2010 Mar 10; Economía & Negocios: B2 (col. 1-5).
33. Euromonitor International. Passport. Sports and Energy drinks in Peru. July 2013.
34. Elcomercio.pe [página de internet]. Empresa editora El Comercio. [citado el 19 de Diciembre de 2011]. Disponible en: <http://elcomercio.pe/economia/379285/noticia-consumo-bebidas-deportivas-peru-doble-promedio-regional>.
35. Elcomercio.pe [página de internet]. Empresa editora El Comercio. [citado el 04 de Agosto de 2012]. Disponible en:

<http://elcomercio.pe/economia/1408699/noticia-cambio-saludable-peruanos-buscan-bebidas-sin-gas-menos-azucar>.

36. Consumo: La oportunidad de las bebidas isotónicas. A rehidratar el interior. *El Comercio*. 2011 Dic 12; Supl. Día\_1: 23 (col. 1-4).
37. Periche C, Rodríguez P. Bebidas rehidratantes envasadas: Consumo en la ciudad de Trujillo y determinación e identificación de colorantes azoicos. [Tesis para optar el grado académico en Farmacia y Bioquímica]. Trujillo, Perú: Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional de Trujillo; 2006.
38. Crece la demanda de envases PET para bebidas isotónicas. *Diario Gestión*. 2011 Dic 20; 4 (col. 1-4).
39. Matthews C. Soft drinks/Production. In: Caballero B, Trugo L, Finglas P, editors. *Encyclopedia of Food Science and Nutrition*. U.S.A.: Academic Press; 2003. p. 5352–5358.
40. Pepsi. eLearning Course Non-Carbonated Beverage 101 - Workbook. 2012.
41. Monteiro M, De Marchi R. Bebidas Isotônicas. Em: Venturini Filho WG, editor. *Bebidas Não Alcoólicas: Ciência e Tecnologia – Volume 2*. São Paulo: Editora Blucher; 2010. p. 81–88.
42. Alvarez C, De la Jara P. Análisis y mejora de procesos en una empresa embotelladora de bebidas rehidratantes. [Tesis para obtener el título de Ingeniero Industrial]. Lima, Perú: Facultad de Ciencias e Ingeniería, Pontificia Universidad Católica del Perú; 2012.
43. Illescas JA. Operaciones unitarias y características nutricionales en la elaboración de bebidas isotónicas. [Trabajo monográfico final para obtener el título de Ingeniero en Industrias Alimentarias]. Lima, Perú: Facultad de Industrias Alimentarias, Universidad Nacional Agraria La Molina; 2012.
44. FDA, editor. *Guide for Industry: Juice HACCP Hazards and Controls Guidance First Edition; Final Guidance*. [monograph on the internet]; 2004. [cited 2011 Apr 23]. Available from: <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/Juice/ucm072557.htm>

45. Amaro AP, Bonilha PRM, Monteiro M. Efeito do tratamento térmico nas características físico-químicas e microbiológicas da polpa de maracujá. *Alimen Nutr*, São Paulo. 2002; 13:151-62.
46. Teixeira GHA, Durigan JF, Alves RE. Qualidade de frutos de Carambola após tratamento térmico. *Braz J Food Technol*. 2007; 10(1):43-50.
47. Chutintrasri B, Noomhorm A. Color degradation kinetics of pineapple puree during thermal processing. *LWT – Food Sci Technol*. 2007; 40(2):300-6.
48. Petrus R. Desenvolvimento de proceso e avaliação de estabilidade de bebida isotónica acondicionada em garrafa plástica asséptica. [Tese - Mestrado em Tecnologia de Alimentos]. Campinas, Brasil: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2000.
49. Arias C. Utilización del arazá (*Eugenia stipitata*) para la elaboración de una bebida hidratante. [Tesis – Titulación en Ingeniería Agroindustrial]. Riobamba, Ecuador: Escuela de Ingeniería Agroindustrial, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Chimborazo; 2008.
50. De Marchi R, Montero M, Cardello HMAB. Avaliação da vida-de-prateleira de um isotônico natural de maracujá (*Passiflora edulis* Sims. f. *flavicarpa* Deg.). *Braz J Food Technol*. 2003; 6(2):291-300.
51. Asante-Donyinah D. Product development of sports drink using coconut water and pineapple juice. [Dissertation – M. Sc. Food Science and Technology]. Kumasi, Ghana: Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biosciences, Kwame Nkrumah University of Science and Technology; 2010.
52. Leistner L. Introduction to hurdle technology. In: Leistner L, Gorris LGM, editors. *Food Preservation by Combined Processes. Final Report of FLAIR Concerted Action N° 7, Subgroup B. EU 15776 EN*. European Commission; 1997. p. 2-7.
53. Leistner L. Hurdle Technology. In: Francis FJ, editor. *The Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*. New York: John Wiley & Sons; 1999. p. 1302–1307.

54. Leistner L. Chapter 1: Principles and applications on hurdle technology. In: Gould GW, editor. *New Methods of Food Preservation*. Glasgow: Springer Science + Business Media Dordrecht; 1995. p. 1-21.
55. Leistner L, Gorris LGM. Food preservation by hurdle technology. *Trends Food Sci Technol*. 1995; 6(2): 41-46.
56. Leistner L. Stable Hurdle Technology Foods and Packaging – Worldwide. *J ScL Technol*. 1997; 6(1):4-14.
57. Goff HD. Food Preservation. In: Francis FJ, editor. *The Wiley Encyclopedia of Food Science and Technology*. New York: John Wiley & Sons; 1999. p. 953–959.
58. Leistner L. Basics aspects of food preservation by hurdle technology. *Int J Food Microbiol*. 2000; 55(1-3):181-6.
59. Mukhopadhyay S, Gorris LGM. Hurdle Technology. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Volume 2. Second Edition. London: Academic Press; 2014. p. 221–227.
60. Leistner L. Food preservation by combined methods. *Food Res Int*. 1992; 25(2):151-8.
61. Leistner L, Gould GW. Chapter 2: The Hurdle Concept. In: Leistner L, Gould GW, editors. *Hurdle Technologies. Combination treatments for food stability, safety and quality*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. p. 17–27.
62. Leistner L. Das Hürdenkonzept in der Fleischwirtschaft. *Hygienicum News*. 2003; 4:4-8. German.
63. Leistner L. Chapter 38: Update on Hurdle Technology. In: Welte-Chanes J, Barbosa-Cánovas GV, Aguilera JM, editors. *Engineering and Food for the 21<sup>st</sup> Century*. Boca Raton: CRC Press LLC; 2002. p. 615-630.
64. Ulloa JA, Díaz L. Capítulo 4: Fundamentos de la tecnología de obstáculos. En: Ulloa JA, editor. *Frutas autoestabilizadas en el envase por la tecnología de obstáculos*. Nayarit: Universidad Autónoma de Nayarit; 2007. p. 36-44.

65. Leistner L. Chapter 36: Combined Methods for Food Preservation. In: Rahman MS, editor. Handbook of Food Preservation. Second Edition. Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group; 2007. p. 867-894.
66. Capozzi V, Fiocco D, Amodio ML, Gallone A, Sparro G. Bacterial Stressors in Minimally Processed Food. *Int J Mol Sci.* 2009; 10:3076-105.
67. Leistner L. Chapter 37: Update on Hurdle Technology for Mild and Effective Preservation of Foods. In: Rahman MS, editor. Handbook of Food Preservation. Second Edition. Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group; 2007. p. 895-904.
68. Tapia de Daza MS, Alzamora SM, Welte-Chanes J. Combination of preservation factors applied to minimal processing of foods. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1996; 36(6): 629-59.
69. Raso J, Barbosa-Cánovas GV. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003; 43(3): 265-85.
70. Chirife J, Favetto GJ. Some physico-chemicals basis of food preservation by combined methods. *Food Res Int.* 1992; 25(5):389-96.
71. Chirife J. Physicochemical aspects of food preservation by combined methods. *Food Control.* 1993; 4(4):210-5.
72. Alzamora SM, Tapia MS, Welte-Chanes J. New strategies for minimally processed foods. The role of multitarget preservation. *Food Sci Technol Int.* 1998; 4(5):353-61.
73. Leistner L. Hurdle Technology. In: Jensen WK, Devine C, Dikeman M, editors. *Encyclopedia of Meat Science.* Volume one. Oxford: Elsevier; 2004. p. 640-647.
74. Ray B, Bhunia A. Chapter 40: Control by a combination of methods (hurdle concept). In: Ray B, Bhunia A, editors. *Fundamental Food Microbiology.* Fourth Edition. Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group; 2008. p. 429-432.
75. Betts G, Everis L. Chapter 8: Hurdle Techniques. In: Tucker GS, editor. *Food Biodeterioration and Preservation.* Singapore: Blackwell Publishing Ltd.; 2008. p. 193-210.

76. Touch V, Deeth HC. Chapter 3: Microbiology of Raw and Market Milks. In: Tamime AY, editor. Milk Processing and Quality Management. First Edition. Singapore: Blackwell Publishing Ltd.; 2009. p. 48-71.
77. Gould GW. Chapter 2: Strategies for Food Preservation. In: Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW, editors. The Microbiological Safety and Quality of Food. Vol. I. Maryland: Aspen Publishers Inc.; 2000. p. 19-35.
78. Gómez PL, Welte-Chanes J, Alzamora SM. Hurdle Technology in Fruit Processing. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2011; 2:447-65.
79. Kornacki JL. Chapter 5: What factors are required for microbes to grow, survive, and die? In: Kornacki JL, editor. Principles of Microbiological Troubleshooting in the Industrial Food Processing Environment. New York: Springer Science + Business Media, LLC; 2010. p. 103-115.
80. Leistner L, Gould GW. Chapter 1: Introduction. In: Leistner L, Gould GW, editors. Hurdle Technologies. Combination treatments for food stability, safety and quality. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. p. 1-16.
81. Mossel DAA, Moreno B, Struijk CB. Capítulo 5: Mecanismo y fundamentos de la prevención de las alteraciones microbianas de los alimentos. En: Mossel DAA, Moreno B, Struijk CB, editores. Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos. Segunda edición. Zaragoza: Acribia; 2003. p. 239-287.
82. Huis in't Veld JHJ. Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview. *Int J Food Microbiol.* 1996; 33:1-18.
83. Mossel DAA, Moreno B, Struijk CB. Capítulo 3: Factores que influyen el destino y las actividades metabólicas de los microorganismos en los alimentos. En: Mossel DAA, Moreno B, Struijk CB, editores. Microbiología de los alimentos: fundamentos ecológicos para garantizar y comprobar la integridad (inocuidad y calidad) microbiológica de los alimentos. Segunda edición. Zaragoza: Acribia; 2003. p. 79-135.
84. Leistner L, Gould GW. Chapter 7: Applications in Industrialized Countries. In: Leistner L, Gould GW, editors. Hurdle Technologies. Combination treatments



- for food stability, safety and quality. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. p. 65-90.
85. Leistner L, Gould GW. Chapter 19: Update on Hurdle Technology Approaches to Food Preservation. In: Davidson PM, Sofos JN, Braner AL, editors. Antimicrobial in Food. Third Edition. Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group; 2005. p. 621-631.
  86. De la Fuente NM, Barboza JE. Inocuidad y bioconservación de alimentos. Acta Universitaria (Universidad de Guanajuato, México). 2010; 20(1):43-52.
  87. Aguilera JM, Parada E. CYTED-D AHI: An Ibero American project on intermediate moisture foods and combined methods technology. Food Res Int. 1992; 25: 159-65.
  88. Aguilera JM, Chirife J. Combined methods for the preservation of foods in Latin American and the CYTED-D Project. J Food Eng. 1994; 22(1-4):433-44.
  89. Leistner L. Chapter 14: Use of Combined Preservatives Factors in Foods of Developing Countries. In: Lund BM, Baird-Parker TC, Gould GW, editors. The Microbiological Safety and Quality of Food. Vol. I. Maryland: Aspen Publishers Inc.; 2000. p. 294-314.
  90. Leistner L, Gould GW. Chapter 8: Applications in Developing Countries. In: Leistner L, Gould GW, editors. Hurdle Technologies. Combination treatments for food stability, safety and quality. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2002. p. 91-144.
  91. Alexandre D, Cunha RL, Hubinger MD. Conservação do açaí pela tecnologia de obstáculos. Ciênc Tecnol Aliment, Campinas. 2004; 24(1):114-19.
  92. García R, Reátegui M. Conservación de pulpa de *Mauritia flexuosa* L. "Aguaje" con aplicación de métodos de factores combinados. Rev Amaz Inv Aliment. 2002; 2(1):59-68.
  93. Ramos Z, García L, Pinedo M, Sousa R. Evaluación de factores de procesamiento y conservación de pulpa de *Myrciaria dúbia* H.B.K. (Camu-Camu) que reducen el contenido de vitamina C (Ácido ascórbico). Rev Amaz Inv Aliment. 2002; 2(2):89-99.

94. Tello O, García R, Vásquez O. Conservación de *Averrhoa carambola* “Carambola” por azúcar y calor. Rev Amaz Inv Aliment. 2002; 2(1):49-58.
95. Hashimoto JM. Utilização da tecnologia dos métodos combinados na conservação do leite de coco. [Tese – Doutorado em Ciências de Alimentos]. Campinas, Brasil: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2005.
96. Araújo PF, Rodrigues R da S, Duarte AP. Qualidade de polpa de pêsegos preservada por métodos combinados. Rev Braz Tecnol Agroind. 2007; 1(2):8-16.
97. Vidales SL. Desarrollo de tecnologías combinadas para la conservación de frutillas. Aspectos texturales. [Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas]. Buenos Aires, Argentina: Área de Química Industrial, Universidad de Buenos Aires; 1997.
98. Torrezan R. Preservação de polpa de goiaba por métodos combinados. [Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos]. Campinas, Brasil: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 1996.
99. Rosas P. Conservación de rebanadas de plátanos en almíbar por métodos combinados. [Tesis – Título de Ingeniero Químico Industrial]. Tepic, Nayarit, México: Universidad Autónoma de Nayarit; 1994.
100. Mateucci R, Della Rocca P, Mascheroni R. Estudio microbiológico y estructural de papas deshidratadas por métodos combinados y envasadas en atmósfera modificada. Proyecciones. 2011; 9(1):25-36.
101. Piagentini AM. Conservación de vegetales listos para usar por la tecnología de factores combinados. [Tesis – Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos]. Argentina: Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral; 1999.
102. Horvitz S. Aplicación de métodos combinados para la obtención de un producto mínimamente procesado a partir de pimiento rojo cv. Lamuyo. [Tesis Doctoral – Tecnología y Calidad en las Industrias Agroalimentarias]. Navarra,

- España: Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad Pública de Navarra; 2010.
103. Jois Vibhakara HS, Das Gupta DK, Sundaram Jayaraman K, Srikantiah Mohan M. Development of a high-moisture shelf-stable grated carrot product using hurdle technology. *J Food Process Pres.* 2006; 30(2):134-44.
  104. Guynot ME. Aplicación de métodos combinados a la prevención del deterioro fúngico en productos de bollería. [Tesis Doctoral]. Lleida, España: Departamento de Tecnología de Alimentos, Universidad de Lleida; 2003.
  105. Lombard GE, Weinert IAG, Minnaar A, Taylor JRN. Preservation of South African Steamed Bread using hurdle technology. *LWT – Food Sci Technol.* 2000; 33:138-43.
  106. Sluka E, Fernández de Rank E, Del Valle S, Condorí M, Arce O. Tecnologías emergentes aplicadas a la conservación de porotos (*Phaseolus vulgaricus* L.). *Rev FCA UNCuyo.* 2009; 41(2):13-21.
  107. Leistner L. Further developments in the utilization of hurdle technology for food preservation. *J Food Eng.* 1994; 22(1-4):421-32.
  108. Iribarren N, Cerezal P, Murray R, Muñoz H, Willans X, Cornejo A. Elaboración de cecinas mediante métodos combinados a partir de carne recuperada de pollo “Broiler”. En: XIV Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. “Tecnologías Emergentes en Alimentos”. 2002 Oct 21-25; Chillán, Chile.
  109. Shimokomaki M, Franco BDGM, Biscontini TM, Pinto MF, Terra NN, Zorn TMT. Charqui meats are hurdle technology meat products. *Food Rev Int.* 1998; 14(4):339-49.
  110. Guillem MI. Efecto de la aplicación de métodos combinados de conservación sobre la calidad microbiológica en bacalao desalado. [Proyecto de fin de carrera]. Valencia, España: Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos, Universidad Politécnica de Valencia; 2002.
  111. Rodríguez O. Hurdle technologies: Microbial inactivation by pulsed electric fields during milk processing. [Thesis – PhD. Food Science]. Guelph, Canada:

- Canadian Research Institute for Food Safety, Department of Food Science, University of Guelph; 2010.
112. Pérez F, Bucio A. Microbial safety of raw milk cheeses traditionally made at a pH below 4.7 and with other hurdles limiting pathogens growth. In: Méndez-Vilas A, editor. Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology. Microbioloy Book Series N° 2. Vol. 2. Badajoz: Formatex; 2010. p. 1205-1216.
  113. Roche D. Estabilidad microbiológica del suero de queso cheddar concentrado y conservado por métodos combinados. [Tesis de Pre grado]. Venezuela: Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela; 1991.
  114. Gonzáles MD. Preservación de la estabilidad microbiológica de salsas para aderezo con alto contenido de humedad por métodos combinados. [Tesis de Maestría]. Venezuela: Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Central de Venezuela; 1998.
  115. Leistner L. User guide to food design. In: Leistner L, Gorris LGM, editors. Food Preservation by Combined Processes. Final Report of FLAIR Concerted Action N° 7, Subgroup B. EU 15776 EN. European Commission; 1997. p. 26-29.
  116. Leistner L. Chapter 20: Hurdle Technology. In: Juneja VK, Sofos JN, editors. Control of Foodborne Microorganisms. New York: Marcel Dekker, Inc.; 2002. p. 493-508.
  117. Keller SE, Miller AJ. Chapter 9: Microbiological safety of fresh citrus and apple juices. In: Sapers GM, Gorny JR, Yousef AE, editors. Microbiology of Fruits and Vegetables. Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group; 2006. p. 211–230.
  118. Mazzota AS. Thermal inactivation of stationary-phase and acid-adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. J Food Protect. 2001; 64(3):315-20.
  119. Hakgüder B. UV disinfection of some of the fruit juices. [Thesis – Master of Science in Food Engineering]. Izmir, Turkey: Graduate School of Engineering and Science, İzmir Institute of Technology; 2009.

120. Chang S-S, Kang D-H. *Alicyclobacillus* spp. in the fruit juice industry: History, characteristics, and current isolation / detection procedures. *Crit Rev Microbiol.* 2004; 30: 55-74.
121. Groenewald WH, Gouws PA, Witthuhn RC. Isolation, identification and typification of *Alicyclobacillus acidoterrestris* and *Alicyclobacillus acidocalcaricus* strains from orchard soil and the fruit-processing environment in South Africa. *Food Microbiol.* 2009; 26(1):71-6.
122. Steyn CE, Cameron M, Witthuhn RC. Occurrence of *Alicyclobacillus* in the fruit-processing environment – A review. *Int J Food Microbiol.* 2011; 147(1):1-11.
123. Oteiza JM, Soto S, Sant´Ana AS, Giannuzzi L. Aislamiento e identificación por PCR en tiempo real de *Alicyclobacillus* en aroma concentrado natural de manzana y pera. En: LAS-ICMSF, Asociación Argentina de Microbiología, DAMyC, editores. Programa y Libro de Resúmenes MICROAL 2012 - “XI Congreso Latinoamericano de Microbiología e Higiene de Alimentos”. 2012 Nov 26-29. Buenos Aires, Argentina, p. 45-46.
124. Oteiza JM, Soto S, Alvarenga VO, Sant´Ana AS, Giannuzzi L. Flavorings as new sources of contamination by deteriorogenic *Alicyclobacillus* of fruit juices and beverages. *Int J Food Microbiol.* 2014; 172:119-24.
125. Mc Knight ICS. Isolamento e identificação de *Alicyclobacillus acidoterrestris* a partir de sucos de maracujá e abacaxi pasteurizados, e determinação da resistência térmica de seus esporos. [Tese - Doutorado em Ciência de Alimentos]. Campinas, Brasil: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2003.
126. Oteiza JM, Ares G, Sant´Ana AS, Soto S, Giannuzzi L. Use of a multivariate approach to assess the incidence of *Alicyclobacillus* spp. in concentrate fruit juices marketed in Argentina: Results of a 14-year survey. *Int J Food Microbiol.* 2011; 151(2): 229-34.
127. Vieira MC, Teixeira AA, Silva FM, Gaspar N, Silva CLM. *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores as a target for Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) nectar thermal processing: kinetic parameters and experimental methods. *Int J Food Microbiol.* 2002; 77:71-81.

128. Silva F, Gibbs P. Target Selection in Designing Pasteurization Processes for Shelf-Stable High-Acid Fruit Products. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2004; 44(5):353-60.
129. Luján MI. Determinación de los tiempos de reducción decimal (D) a distintas temperaturas de cepas de *Alicyclobacillus* spp aisladas durante la elaboración de jugos concentrados de manzana. Comportamiento de las mismas frente a sanitizantes de uso industrial. [Tesis – Maestría em Ciencia y Tecnología de Alimentos]. Santa Fé, Argentina: Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral; 2010.
130. Association of the Industries of Juices and Nectars from Fruits and Vegetables of the European Union (A.I.J.N.). *Alicyclobacillus* Best Practice Guideline. A guideline for the reduction and control of thermophylic, acidophilic sporeforming bacteria (*Alicyclobacillus* species, ACB) in the production, packing and distribution of fruit juices, juice concentrates purées and nectars. February 2013. 30 p.
131. Steyn CE. Evaluation of the distribution and accumulation of species of *Alicyclobacillus* in the fruit concentrate processing environment. [Thesis - Master of Science in Food Science]. Matieland, South Africa: Department of Food Science, Faculty of AgriSciences, Stellenbosch University; 2011.
132. Spinelli AC, Sant'Ana AS, Rodrigues-Junior S, Massaguer PR. Influence of different filling, cooling and storage conditions on the growth of *Alicyclobacillus acidoterrestris* CRA7152 in orange juice. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75(23):7409-16.
133. Feng G, Churey JJ, Worobo RW. Thermoaciduric *Clostridium pasteurianum* spoilage of shelf-stable apple juice. *J Food Protect.* 2010; 73(10):1886-90.
134. Moore JE, McCalmont M, Xu J, Cherie Millar B, Heaney N. *Asaia* sp., an unusual spoilage organism of fruit-flavored bottled water. *Appl Environ Microbiol.* 2002; 68(8): 4130-31.
135. Tuuminen T, Heinäsmäki T, Kerttula T. First report of bacteremia by *Asaia bogorensis*, in a patient with a history of intravenous-drug abuse. *J Clin Microbiol.* 2006; 44(8):3048-50.

136. Horsáková I, Voldřich M, Čeřovský M, Sedláčková P, Šicnerová P, Ulbrich P. *Asaia* sp., as a bacterium decaying the packaged still fruit beverages. Czech J Food Sci. 2009; 27:S362-5.
137. Sedláčková P, Čeřovský M, Horsáková I, Voldřich M. Cell surface characteristic of *Asaia bogorensis* – Spoilage microorganism of bottled water. Czech J Food Sci. 2011; 29(4):457-61.
138. Kregiel D, Rygala A, Libudzisz Z, Walczak P, Oltuszek-Walczak E. *Asaia lannensis* – the spoilage acetic acid bacteria isolated from strawberry-flavored bottled water in Poland. Food Control. 2012; 26:147-50.
139. Kregiel D. Attachment of *Asaia lannensis* to materials commonly used in beverage industry. Food Control. 2013; 32:537-42.
140. Ramos AJ, Marín S. Chapter 15: Spoiling microorganisms in fruit juices. In: Falguera V, Ibarz A, editors. Juice Processing. Quality, Safety and Value-Added Opportunities. Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group; 2014. p. 311-328.
141. Filtenborg O, Frisvad JC, Thrane U. Moulds in food spoilage. Int J Food Microbiol. 1996; 33(1):85-102.
142. Massaguer PR. Capítulo IX: Bolores Termoresistentes. Em: Massaguer PR, editor. Microbiologia dos processos alimentares. São Paulo: Varela Editora e Livraria Ltda.; 2006. p. 103-119.
143. Masson LMP. Avaliação do processo de pasteurização de suco de abacaxi (*Ananas comosus* L. Merr.) na inativação de fungos termorresistentes. [Dissertação – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos]. Rio de Janeiro, Brasil: Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2004.
144. Ferreira EH. Caracterização da resistência térmica de fungo termorresistente isolado de néctar de maracujá. [Dissertação – Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos]. Rio de Janeiro, Brasil: Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2004.
145. Ferreira EH, Masson LMP, Rosenthal A, Souza M, Tashima L, Massaguer PR. Termorresistência de fungos filamentosos isolado de néctares de frutas

- envasados assepticamente. Braz J Food Technol, Campinas. 2011; 14(3):164-71.
146. Oliver M, Rendle T. A new problem in fruit preservation. Studies on *Byssochlamys fulva* and its effects on the tissue of processed fruit. J Soc Chem Ind. 1934; 53:166-72.
147. Welke JE, Hoeltz M, Dottori HA, Noll IB. Ocorrência de fungos termorresistentes em suco de maçã. Braz J Food Technol. 2009; II SAA:78-83.
148. Kutama AS, Yusuf I, Hayatu M. Detection of heat resistant molds in some canned fruit juices sold in Kano, Nigeria. Biosci Res Commun. 2010; 22:221-5.
149. Mansour F, Nagy K, Taqi A, Askar K. Factors affecting the fungal contamination of some fruit juices packaged in Tetra pak. Afr J Biotechnol. 2011; 10(60):12957-62.
150. Panagou EZ, Katsaboxakis CZ, Nychas G-J E. Heat resistance of *Monascus ruber* ascospores isolated from thermally processed green olives of the Conservolea variety. Int J Food Microbiol. 2002; 76(1-2):11-8.
151. PepsiCo International. HRM and ACB Overview with Case Studies. In: NCB Micro Training. 2009 Nov 10-11; Guadalajara, México.
152. Hageskal G, Knutsen AK, Gaustad P, de Hoog GS, Skaar I. Diversity and significance of mold species in Norwegian drinking water. Appl Environ Microbiol. 2006; 72(12):7586-93.
153. Kluck N. Basic Microbiology of LIT. In: PLI International, editor. PLI Workshop. 2010 Sep 20-21; Cali, Colombia.
154. Aydin A, Ulusoy BH, Ergün Ö. A survey on heat-resistant moulds in heat treated milk, milk products and fruit juices. Archiv für Lebensmittelhygiene. 2005; 56(3):58-60. German.
155. Demirci AŞ. A study on determination and identification of heat resistant moulds in margarine. [Thesis – Master of Science]. Edirne, Turkey: School of Natural and Applied Sciences, Fen Bilimleri Enstitüsü, Trakya University; 2005.
156. Tournas V. Heat-resistant fungi of importance to the food and beverage industry. Crit Rev Microbiol. 1994; 20:243-63.



157. Pitt JI, Hocking AD. Chapter 4: Methods for isolation, enumeration and identification. In: Pitt JI, Hocking AD, editors. *Fungi and Food Spoilage*. Third edition. New York: Springer Science + Business Media, LLC; 2009. p. 19-52.
158. Piecková E, Samson RA. Heat resistance of *Paecilomyces variotii* in sauce and juice. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2000; 24:227-30.
159. Kikoyu Y, Tagashira N, Nakano H. Heat resistance of fungi isolated from frozen blueberries. *J Food Protect*. 2008; 71:2030-5.
160. Kocakaya A, Çoksöyler N. Heat-resistance characteristics of ascospores of *Eurotium chevalieri* isolated from apricot juice. *Nahrung*. 2002; 46: 28-30.
161. Scaramuzza N, Berni E. Heat-resistance of *Hamigera avellanea* and *Thermoascus crustaceus* isolated from pasteurized acid products. *Int J Food Microbiol*. 2014; 168-169:63-8.
162. Houbraken J, Samson RA. Standardization of methods for detecting heat resistant fungi. In: Hocking AD, Pitt JI, Samson RA, Thrane U, editors. *Advances in Food Mycology. Advances in Experimental Medicine Biology*. Vol. 571. New York: Springer Science + Business Media, Inc.; 2006. p. 107-111.
163. Jesenská Z, Piecková E, Bernát D. Heat resistance of fungi in the soil. *Int J Food Microbiol*. 1993; 19:187-92.
164. Piecková E, Bernát D, Jesenská Z. Heat resistant fungi isolated from soil. *Int J Food Microbiol*. 1994; 22:297-9.
165. Jesenská Z, Piecková E. Heat-resistant fungi. *Czech Mycol*. 1995; 48(1):73-6.
166. Arias E, Piñeros P. Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestras de suelo de los páramos de Guasca y Cruz Verde. [Tesis – Título de Microbiólogo Industrial]. Bogotá, Colombia: Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
167. Jesenská Z, Piecková E, Bernát D. Heat-resistant fungi in the soil. *Int J Food Microbiol*. 1992; 16:209-14.
168. Javoreková S, Labuda R, Kupcová M, Selešiová Z, Maková J. Occurrence and importance of heat-resistant fungi on the strawberries. *Potravinárstvo*. 2009; 3(2):27-30. Slovak.

169. Dahmen M. Problems with potentially heat resistant moulds during validation of an aseptic filling machine. International Commission of Food Mycology. Workshop 2010 – “Fungi in food and beverages: new research on spoilage, mycotoxins and prevention”. 2010 Jun 7-9; Freising, Germany
170. Aragão GMF. Identificação e determinação da resistência térmica de fungos filamentosos termo-resistentes isolados de polpa de morango. [Tese – Mestrado em Ciência de Alimentos]. Campinas, Brasil: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 1989.
171. Sant’Ana AS, Rosenthal A, Massaguer PR. The fate of patulin in apple juice processing: A review. *Food Res Int.* 2008; 41:441-53.
172. Sant’Ana AS, Simas RC, Almeida CA, Cabral EC, Rauber RH, Mallmann CA, Eberlin MN, Rosenthal A, Massaguer PR. Influence of package type of apple juice and temperature on the production of patulin by *Byssochlamys nivea* and *Byssochlamys fulva*. *Int J Food Microbiol.* 2010; 142:156-63.
173. Ugwuanyi JO, Obeta JAN. Pectinolytic and cellulolytic activities of heat resistant fungi and their macerating effects on mango and African mango. *J Sci Food Agr.* 1999; 79:1054-9.
174. Hoffmann MVG. Estudo da resistência térmica de *Byssochlamys nivea* e *Talaromyces flavus* em suco de maçã. [Dissertação – Mestrado em Engenharia Química]. Florianópolis, Brasil: Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina; 2004.
175. Victorino CG. Contaminação da matéria-prima de suco de laranja por fungos termoresistentes e como prevenir a presença do mesmo no material. In: Massambani O, editor. Coletânea de respostas técnicas produzidas e veiculadas no âmbito do serviço brasileiro de respostas técnicas – SBRT. 02 Alimentos y Bebidas. São Paulo: Midiamix Editora Digital; 2006. p. 88-92.
176. Fleet G. Chapter 5: Yeast spoilage of foods and beverages. In: Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, editors. *The yeasts, a taxonomic study*. Volume 1. Fifth Edition. San Diego: Elsevier B.V.; 2011. p. 53-63.

177. Deák T. Chapter 6: Preservation: Inhibition and inactivation of yeasts. In: Deák T, editor. Handbook of Food Spoilage Yeasts. Second Edition. Boca Raton: CRC Press. Taylor & Francis Group; 2008. p. 87-115.
178. Fleet G. Spoilage yeasts. Crit Rev Biotechnol. 1992; 12(1/2):1-44.
179. Tchango Tchango J, Tailliez R, Eb P, Njine T, Hornez JP. Heat resistance of the spoilage yeasts *Candida pelliculosa* and *Kloeckera apis* and pasteurization values for some tropical fruit juices and nectars. Food Microbiol. 1997; 14:93-9.
180. Lawlor KA, Schuman JD, Simpson PG, Taormina PJ. Microbial Spoilage of Beverages. In: Sperber WH, Doyle MP, editors. Compendium of the Microbiological Spoilage of Foods and Beverages. New York: Springer Science+Business Media, LLC; 2009. p. 245-284.
181. Stewart C, Deibel K. Chapter 13: Soft drinks, fruit juices, concentrates, and fruit preserves. In: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), editor. Microorganisms in foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities. Second Edition. New York: Kluwer Academic / Plenum Publishers; 2005. p. 544-573.
182. Rall VLM. Capítulo 8: Microrganismos deteriorantes e patogênicos em bebidas. Em: Venturini Filho WG, editor. Indústria de Bebidas: Inovação, Gestão e Produção – Volume 3. São Paulo: Editora Blucher; 2011. p. 163-181.
183. Sutton BC. Overview of Classification of the Fungi. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. Encyclopedia of Food Microbiology. Volume 2. Second Edition. London: Academic Press; 2014. p. 1-10.
184. Pešić-Mikulec D, Stojanović L, Jovanović L. Moulds associated with milk depending on macroclimate and geographical location. Appl Ecol Environ Res. 2005; 3(2):61-5.
185. Sørhaug T. Spoilage Molds in Dairy Products. In: Fuquay JW, Fox PF, McSweeney PLH, editors. Encyclopedia of Dairy Sciences. Second Edition. Vol. 4. Oxford: Academic Press. Elsevier; 2011. p. 780-784.
186. Malamud F. Control microbiológico en mermeladas de fresa (*Fragaria vesca*) y naranja (*Citrus aurantium* y *Citrus sinensis*). [Tesis de Bachiller]. Lima,

- Perú: Cátedra de Microbiología e Higiene de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1967.
187. Katta SK, Eskridge KM, Bullerman LI B. Mold content of comercial popcorn. *J Food Protect.* 1995; 58(9):1014-7.
188. Parish ME, Higgins DP. Yeast and molds isolated from spoiling citrus products and by-products. *J Food Protect.* 1989; 52(4):261-3.
189. Nakasone J. Hongos causantes de alteraciones de frutas almacenadas. [Tesis de Bachiller]. Lima: Cátedra de Microbiología de los Alimentos, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 1965.
190. Thrane U. *Fusarium*. In: Batt CA, Tortorello ML, editors. *Encyclopedia of Food Microbiology. Volume 2. Second Edition.* London: Academic Press; 2014. p. 76–81.
191. Lazzari FA. Ocurrence of *Fusarium* toxins in stored maize in southern Brazil. In: Highley E, Wright EJ, Banks HJ, Champ BR, editors. *Proceedings of the 6<sup>th</sup> International Working Conference on Stored-product Protection. Volume 2.* 1994; Canberra, Australia; p. 1014-1016.
192. Bennet GA, Richard JL. Infuence of processing on *Fusarium* mycotoxins in contaminated grains. *Food Technol.* 1996; 50(5):235-8.
193. Magan N, Hope R, Aldred D. Ecophysiology of *Fusarium culmorum* and mycotoxin production. In: Hocking AD, Pitt JI, Samson RA, Thrane U, editors. *Advances in Food Mycology. Advances in Experimental Medicine Biology. Vol. 571.* New York: Springer Science + Business Media, Inc.; 2006. p. 123-136.
194. Leslie JF, Summerell BA. Chapter 13: Species Descriptions. In: Leslie JF, Summerell BA, editors. *The Fusarium Laboratory Manual.* U.S.A.: Blackwell Publishing; 2006. p. 121-278.
195. Pitt JI, Hocking AD. Chapter 5: Primary Keys and Miscellaneous Fungi. In: Pitt JI, Hocking AD, editors. *Fungi and Food Spoilage. Third edition.* New York: Springer Science + Business Media, LLC; 2009. p. 53-143.
196. Leslie JF, Summerell BA. Chapter 11: Practical Approaches to Identification. In: Leslie JF, Summerell BA, editors. *The Fusarium Laboratory Manual.* U.S.A.: Blackwell Publishing; 2006. p. 101-110.

197. Arbeláez G. Algunos aspectos de los hongos del género *Fusarium* y de la especie *Fusarium oxysporum*. Agron Colomb. 2000; 17:11-22.
198. Smith Y. Investigation of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae* and *Phoma terrestres* on onion (*Allium cepa*) in the Mid Murray región of South Africa. [Thesis – Master of Agricultural Science]. Australia: Faculty of Sciences, University of Adelaide; 2009.
199. Akinmusire O. Fungal species associated with the spoilage of some edible fruits in Maiduguri Northern Eastern Nigeria. Adv Environ Biol. 2011; 5(1):151-61.
200. Datta N, Deeth HC. Chapter 4: UHT and Aseptic Processing of Milk and Milk Products. In: Tewari G, Juneja VK, editors. Advances in Thermal and Non-Thermal Food Preservation. U.S.A.: Blackwell Publishing; 2007. p. 63-90.
201. Gougouli M, Kalantzi K, Beletsiotis E, Koutsoumanis K. Development and application of predictive models for fungal growth as tools to improve quality control in yogurt production. Food Microbiol. 2011; 28(8):1453-62.
202. Williams AP, Williams and Neves. Chapter 18: Other types of spoilage moulds. In: de W. Blackburn C, editor. Food Spoilage Microorganisms. England: Woodhead Publishing Ltd.; 2006. p. 488-503.
203. Taniwaki MH, Hocking AD, Pitt JI, Fleet GH. Growth of fungi and mycotoxin production on cheese under modified atmospheres. Int J Food Microbiol. 2001; 68:125-33.
204. Gunner H, Alexander M. Anaerobic growth of *Fusarium oxysporum*. J Bacteriol. 1964; 87(6):1309-16.
205. Shiva Shanker A, Kodaparthi A, Kumar Pindi P. Microbial diversity in soft drinks. J Pharm Sci Innov. 2012; 1(3):23-6.
206. Hang YD, Woodams EE. Control of *Fusarium oxysporum* by baking soda. LWT – Food Sci Technol. 2003; 36(8):803-5.
207. López-Berges M, Segorbe D, Rispail N, Prados R, Di Pietro A. El amonio reprime funciones de virulencia en *Fusarium oxysporum* a través de cambios en el pH extracelular. En: Universidad de Cádiz, editor. XI Congreso Nacional de Micología. 2012 Sep 20-22; Cádiz, España. pág. 78.

208. Roselló J. Capacidad antagónica de *Penicillium oxalicum* Currie & Thom y *Trichoderma harzianum* Rifai frente a diferentes agentes fitopatogénicos. [Tesis Doctoral]. Florianópolis, Brasil: Escuela Técnica Superior del Medio Rural y Enología, Universidad Politécnica de Valencia; 2003.
209. PepsiCo. Hot Fill Process Workshop. Dallas Gatorade. 2013 Mar 5-7; Dallas, E.E.U.U.
210. El Halouat A, Debevere JM. Effect of water activity, modified atmosphere packaging and storage temperature on spore germination of moulds isolated from prunes. *Int J Food Microbiol.* 1997; 35(1):41-8.
211. Altieri C, Bevilacqua A, Cardillo D, Sinigaglia M. Antifungal activity of fatty acids and their monoglycerides against *Fusarium* spp. in a laboratory medium. *Int J Food Sci Technol.* 2009; 44:242-5.
212. Campaniello D, Corbo MR, Sinigaglia M. Antifungal activity of Eugenol against *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J Food Protect.* 2010; 73(6):1124-8.
213. Campaniello D, Corbo MR, Ciccarone C, Sinigaglia M. Combined antifungal activity of eugenol, pH and water activity against *Fusarium oxysporum*. *Ann Microbiol.* 2009; 59:44-5.
214. Bevilacqua A, Campaniello D, Sinigaglia M, Ciccarone C, Corbo MR. Sodium-benzoate and citrus extract increase the effect of homogenization towards spores of *Fusarium oxysporum* in pineapple juice. *Food Control.* 2012; 28(2):199-204.
215. Santamarina M, Roselló J, Barceló S, Marín S. Efecto de la actividad de agua y de la temperatura sobre el comportamiento de *Penicillium oxalicum* frente a *Fusarium oxysporum*. *Rev Iberoam Micol.* 2003; 20:154-9.
216. Black EP, Setlow P, Hocking AD, Stewart CM, Kelly AL, Hoover DG. Response of Spores to High-Pressure Processing. *Compr Rev Food Sci Food Safety.* 2007; 6(4):103-19.
217. Hocking AD, Begum M, Stewart CM. Inactivation of fruit spoilage yeasts and moulds using high pressure processing. In: Hocking AD, Pitt JI, Samson RA, Thrane U, editors. *Advances in Food Mycology. Advances in Experimental*

- Medicine Biology. Vol. 571. New York: Springer Science + Business Media, Inc.; 2006. p. 239-246.
218. Goh ELC, Hocking AD, Stewart CM, Buckle KA, Fleet GH. Baroprotective effect of increased solute concentrations on yeast and moulds during high pressure processing. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2007; 8(4):535-42.
219. Corbo MR, Bevilacqua A, Campaniello D, Ciccarone C, Sinigaglia M. Use of high pressure homogenization as a mean to control the growth of foodborne moulds in tomato juice. *Food Control.* 2010; 21(11):1507-11.
220. Bevilacqua A, Sinigaglia M, Corbo MR. Ultrasound and antimicrobial compounds: A suitable way to control *Fusarium oxysporum* in juices. *Food Bioprocess Technol.* 2013; 6(5):1153-63.
221. Roberts TA. Microbial Growth and Survival: Developments in Predictive Modelling. *Int Biodeter Biodegr.* 1995; 36(3):297-309.
222. Massaguer PR, Júnior SR. Capítulo 16: Microbiologia Preditiva: Revisão. In: Bastos M do SR, editor. *Ferramentas da Ciência e Tecnologia para Segurança dos Alimentos.* Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical; 2008. p. 301-334.
223. McMeekin TA, Mellefont LA, Ross T. Chapter 2: Predictive microbiology: past, present and future. In: Brul S, Van Gerwen S, Zwietering M, editors. *Modelling Microorganisms in Food.* Boca Raton: Woodhead Publishing Limited; 2007. p. 7-21.
224. Ross T, McMeekin TA. Predictive Microbiology. *Int J Food Microbiol.* 1994; 23:241-64.
225. Jagannath A, Tsuchido T. Predictive Microbiology: A Review. *Biocontrol Sci.* 2003; 8(1):1-7.
226. Buchanan RL. Chapter 24: Predictive Microbiology. *Mathematical Modeling of Microbial Growth in Foods.* In: Finley J, Robinson S, Armstrong D, editors. *Food Safety Assessment.* Washington DC: American Chemical Society; 1992. p. 250-260.
227. McClure PJ, Blackburn C de W, Cole MB, Curtis PS, Jones JE, Legan JD, Ogden ID, Peck MW, Roberts TA, Sutherland JP, Walker SJ. Modelling the

- growth, survival and death of microorganisms in foods: the UK Food Micromodel approach. *Int J Food Microbiol.* 1994; 23(3-4):265-75.
228. Valero A, Carrasco E, Acosta M, Pérez-Rodríguez F, Amaro MA. Aplicación de la microbiología predictiva para la determinación de la vida comercial en salchichas frescas de ave. En: *Alimentaria Congresos: "3<sup>er</sup> Congreso Internacional de Autocontrol y Seguridad Alimentaria – 2008. Córdoba, España".* 2009; 2: 24-25.
229. Fasoulaki A, Panagou EZ, Nychas G-JE. Application of mathematical modelling in microbiological spoilage analysis and shelf-life assessment of pasteurized cream. In: *Proceedings of the 5<sup>th</sup> ICPMF – International Conference Predictive Modelling in Foods.* 2007 Sep 16-19; Athens, Greece.
230. Duarte JCF. Contribuição da microbiologia predictiva na análise de cremes de pasteleiro. [Dissertação – Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar]. Lisboa, Portugal: Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa; 2011.
231. Hansen TB, Møller COA, Andersen KJ. Using ComBase Predictor and Pathogen Modeling Program as support tools in outbreak investigation: an example from Denmark. In: *6<sup>th</sup> ICPMF – International Committee of Predictive Modelling in Food,* 2009; Washington DC, US.
232. Fujikawa H, Kokubo Y. Practical application of predictive microbiology software programs to HACCP plans. *J Food Hyg Soc Japan.* 2001; 42(4):252-6.
233. Carrasco E, Valero A, Pérez-Rodríguez F, García-Gimeno RM, Zurera G. Aplicación de modelos predictivos en el establecimiento de límites críticos dentro del sistema APPCC. En: *Alimentaria Congresos: "3<sup>er</sup> Congreso Internacional de Autocontrol y Seguridad Alimentaria – 2008. Córdoba, España".* 2009; 2: 32.
234. Siciliano M. Estudio de la vida útil de queso crema utilizando microbiología predictiva. [Tesis - Maestría en Tecnología de los Alimentos]. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Facultad Regional Buenos Aires, Universidad Tecnológica Nacional; 2010.



235. Sumner J, Jenson I, Ross T. Chapter 30: Using predictive microbiology to benefit the Australian Meat Industry. In: Hoorfar J, editor. Cases studies in food safety and authenticity. Lessons from real-life situations. Cornwall: Woodhead Publishing Limited; 2012. p. 276-283.
236. Rivera A, Posada GD, Pérez-Rodríguez F, Carrasco E, Valero A, García-Gimeno RM. Aplicación de modelos predictivos de crecimiento microbiano para la extensión de la vida comercial de productos cárnicos cocidos loncheados. En: Comunicaciones del 4º Congreso Internacional de Autocontrol y Alimentos Inocuos para proteger la Salud. 2010 May 5-7; Bilbao, España.
237. Sarmiento CMP. Modelagem do crescimento microbiano e avaliação sensorial no estudo da vida de prateleira da mortadela e da lingüiça defumada em armazenamento isotérmico e não isotérmico. [Tese – Doutorado em Engenharia Química]. Florianópolis, Brasil: Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina; 2006.
238. Koutsoumanis K. The use of predictive microbiology in risk assessment. In: Duffy G, Nychas GJ, editors. Adva Safety through Research and Innovation. Proceeding of a meeting at Ashtown Food Research Conference Centre. 2009 Mar 25-26; Teagasc, Dublin, Ireland. p. 16.
239. Alzamora SM. Microbiología predictiva para análisis de riesgo. En: 17º Congreso Chileno de Medicina Veterinaria. 2012 Nov 18-20; Valdivia, Chile.
240. Zwietering MH, de Wit JC, Notermans S. Application of predictive microbiology to estimate the number of *Bacillus cereus* in pasteurized milk at the point of consumption. Int J Food Microbiol. 1996; 30:55-70.
241. Whiting RC. Microbial database building: What have we learned? Food Technol. 1997; 51:82-6.
242. Nakashima SMK, André CDS, Franco BDGM. Revisão: Aspectos básicos da microbiología prediva. Braz J Food Technol. 2000; 3:41-51.
243. Zhao L, Montville TJ, Schaffner DW. Inoculum size of *Clostridium botulinum* 56A spores influences time-to-detection and percent growth-positive samples. J Food Sci. 2000; 65(8):1369-75.

244. Malakar PK. Modelling Interactions and Food Structure in Predictive Microbiology. [Ph.D. Thesis]. Wageningen, Países Bajos: Wageningen University; 2002.
245. Betts GD, Walker SJ. Chapter 10: Verification and validation of food spoilage models. In: Steele R, editor. Understanding and measuring the shelf-life of food. England: Woodhead Publishing Limited; 2004. p. 184-217.
246. Braun PG, Sutherland JP. Chapter 4: Modelling microbial food spoilage. In: de W. Blackburn C, editor. Food Spoilage Microorganisms. England: Woodhead Publishing Ltd.; 2006. p. 86-118.
247. Legan JD. Chapter 6: Application of models and other quantitative microbiology tools in predictive microbiology. In: Brul S, Van Gerwen S, Zwietering M, editors. Modelling Microorganisms in Food. Boca Raton: Woodhead Publishing Limited; 2007. p. 82-109.
248. Whiting RC, Buchanan RL. A classification of models in predictive microbiology – a reply to K.R. Davey. Food Microbiol. 1993; 10(2):175-77.
249. Pérez-Rodríguez F, Valero A. Chapter 3: Predictive Models: Foundation, Types, and Development. In: Pérez-Rodríguez F, Valero A, editors. Predictive Microbiology in Foods. New York: Springer; 2013. p. 25-55.
250. Walter EHM, Kabuki DY, Esper LMR, Sant'Ana AS, Kuaye AY. Modelling the growth of *Listeria monocytogenes* in fresh green coconut (*Cocos nucifera* L.) water. Food Microbiol. 2009; 26(6):653-7.
251. Arroyo-López FN, Bautista Gallego J, Valero A, García-Gimeno RM, Garrido Fernández A. Chapter 25: Predictive Microbiology: A Valuable Tool in Food Safety and Microbiological Risk Assessments. In: Bhat R, Gómez-López VM, editors. Practical Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions. First Edition. New York: John Wiley & Sons, Ltd. Published; 2014. p. 517-534.
252. Li H, Xie G, Edmondson AS. Review of Secondary Mathematical Models of Predictive Microbiology. J Food Prod Mark. 2008; 14(2):57-74.
253. Rosso L, Lobry JR, Flandrois JP. An Unexpected Correlation between Cardinal Temperatures of Microbial Growth Highlighted by a New Model. J Theor Biol. 1993. 162:447-63.

254. Ross T, Dalgaard P. Chapter 3: Secondary Models. In: McKellar RC, Lu X, editors. Modeling Microbial Responses in Foods. Boca Raton: CRC Press LLC; 2004. p. 63-150.
255. Whiting RC, Buchanan RL. Microbial Modeling. Food Technol. 1994; 48(6):113-20.
256. Tamplin M, Baranyi J, Paoli G. Chapter 6: Software programs to increase the utility of predictive microbiology information. In: McKellar RC, Lu X, editors. Modeling Microbial Responses in Foods. Boca Raton: CRC Press LLC; 2004. p. 233-242.
257. Buchanan R. Using spreadsheet software for predictive microbiology applications. J Food Safety. 1991; 11(2):123-34.
258. Betts G, Everis L. Chapter 27: Modeling Systems and Impact on Food Microbiology. In: Barnosa-Cánovas G, Tapia MS, Cano MP, editors. Novel Food Processing Technologies. New York: CRC Press; 2005. p. 555-578.
259. Buchanan R. Developing and distributing user-friendly application software. J Ind Microbiol. 1993; 12(3-5):251-5.
260. Baranyi J, Tamplin ML. ComBase: A common database on microbial responses to food environments. J Food Protect. 2004; 67(9):1967-71.
261. Baranyi J, Tamplin ML, Ross T. The ComBase initiative. Microbiol Australia. 2004; 25(3):32-3.
262. Dalgaard P, Buch P, Silberg S. Seafood Spoilage Predictor – development and distribution of a product specific application software. Int J Food Microbiol. 2002; 73:343-9.
263. Fletcher GC. Chapter 20: Using predictive models for the shelf-life and safety of seafood. In: Alasalvar C, Shahidi F, Miyashita K, Wanasundara U, editors. Handbook of Seafood Quality, Safety and Health Applications. New Delhi: Blackwell Publishing Ltd.; 2011. p. 237-250.
264. Everis LK, Betts GD. Development and use of microbiological spoilage models in the food industry. In: 6<sup>th</sup> ICPMF – International Committee of Predictive Modelling in Food, 2009; Washington DC, US.

265. Dannenhauer C. Desenvolvimento de um aplicativo computacional para microbiologia preditiva. [Dissertação – Mestrado em Engenharia de Alimentos]. Florianópolis, Brasil: Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina; 2010.
266. Østergaard NB, Leisner JJ, Dalgaard P, 2011. Pasta Salad Predictor – development of a new tool to support shelf-life and safety management. In: Cummins E, Frías JM, Valdramidis VP, editors. 7<sup>th</sup> ICPMF - Predictive Modelling of Food Quality and Safety. Conference Proceedings. 2011 Sep 12-15; Teagasc, Dublin, Ireland. p. 371.
267. Posada G, Linares G, Pérez-Rodríguez F, García-Gimeno R, Zurera G. Desarrollo y aplicación de una herramienta informática para la gestión de la seguridad microbiológica en alimentos. En: Comunicaciones del 4º Congreso Internacional de Autocontrol y Alimentos Inocuos para proteger la Salud. 2010 May 5-7; Bilbao, España.
268. Leporq B, Membré J-M, Dervin C, Buche P, Guyonnet JP. The “Sym'Previous” software, a tool to support decisions to the foodstuff safety. *Int J Food Microbiol.* 2005; 100(1-3):231-7.
269. Koseki S. Microbial Responses Viewer (MRV): A new ComBase-derived database of microbial responses to food environments. *Int J Food Microbiol.* 2009; 134(1-2):75-82.
270. Koseki S. Alternative approaches to predicting microbial behaviour: A probabilistic modelling approach for microbial inactivation and a revised web-tool, the Microbial Responses Viewer. *Food Control.* 2013; 29(2): 416-21.
271. Alfaro B, Hernández I, Le Marc Y, Pin C. Modelling the effect of the temperature and carbon dioxide on the growth of spoilage bacteria in packed fish products. *Food Control.* 2013; 29(2):429-37.
272. Tansey F, Butler F. Development of an all-Ireland food microbial database and its implications for food chain integrity. In: Cummins E, Frías JM, Valdramidis VP, editors. 7<sup>th</sup> ICPMF - Predictive Modelling of Food Quality and Safety. Conference Proceedings. 2011 Sep 12-15; Teagasc, Dublin, Ireland. p. 376-378.

273. Palou E, López-Malo A. Chapter 31: Groth/No-Growth Interface Modeling and Emerging Technologies. In: Barbosa-Cánovas G, Tapia MS, Cano MP, editors. Novel Food Processing Technologies. New York: CRC Press; 2005. p. 629-651.
274. Ratkowsky DA, Ross T. Modelling the bacterial growth/no growth interface. Lett Appl Microbiol. 1995; 20:29-33.
275. Battey AS, Duffy S, Schaffner DW. Modeling yeast spoilage in cold-filled ready-to-drink beverages with *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygosaccharomyces bailii*, and *Candida lipolytica*. Appl Environ Microbiol. 2002; 68(4):1901-6.
276. Panagou EZ, Chelonas S, Chatzipavlidis I, Nychas G-J E. Modelling the effect of temperature and water activity on the growth rate and growth/no growth interface of *Byssoschlamys fulva* and *Byssoschlamys nivea*. Food Microbiol. 2010; 27:618-27.
277. Dantigny P. Chapter 11: Predictive Mycology. In: McKellar RC, Lu X, editors. Modeling Microbial Responses in Foods. Boca Raton: CRC Press LLC; 2004. p. 313-320.
278. Gibson AM, Hocking AD. Advances in the predictive modelling of fungal growth in food. Trends Food Sci Technol. 1997; 8:353-8.
279. Dantigny P, Guilmart A, Bensoussan M. Predictive mycology: some definitions. Cryptogamie, Mycologie. 2003; 24(4):377-83.
280. Dagnas S, Membré J-M. Predicting and Preventing Mold Spoilage of Food Products. J Food Protect. 2013; 76(3):538-51.
281. Gougouli M, Koutsoumanis P. Chapter 4: Primary Models for Fungal Growth. In: Dantigny P, Panagou EZ, editors. Predictive Mycology. New York: Nova Science Publishers; 2013. p. 63-132.
282. Dantigny P, Bensoussan M, Vasseur V, Lebrihi A, Buchet C, Ismaili-Alaoui M, Devlieghere F, Roussos S. Standardisation of methods for assessing mould germination: A workshop report. Int J Food Microbiol. 2006; 108(2):286-91.
283. Dantigny P, Soares Mansur C, Sautour M, Tchobanov I, Bensoussan M. Relationship between spore germination kinetics and lag time during growth of *Mucor racemosus*. Lett Appl Microbiol. 2002; 35(5):395-8.

284. Burgain A, Bensoussan M, Dantigny P. Effect of inoculum size and water activity on the time to visible growth of *Penicillium chrysogenum* colony. Int J Food Microbiol. 2013; 163:180-3.
285. Dantigny P, Guilmart A, Bensoussan M. Basis of predictive mycology. Int J Food Microbiol. 2005; 100:187-96.
286. Zimmermann M, Miorelli S, Massaguer PR, Aragão GMF. Growth of *Byssochlamys nivea* in pineapple juice under the effect of water activity and ascospore age. Braz J Microbiol. 2011; 42:203-10.
287. Zimmermann M, Massaguer PR, Aragão GMF. *Byssochlamys nivea* growth in papaya juice as influenced by water activity and ascospore age. Focusing on Modern Food Ind. 2013; 2(1):17-25.
288. Sant´Ana AS, Dantigny P, Tahara AC, Rosenthal A, Massaguer PR. Use of a logistic model to assess spoilage by *Byssochlamys fulva* in clarified apple juice. Int J Food Microbiol. 2010; 137:299-302.
289. Dantigny P, Nanguy SP-M, Judet-Correia D, Bensoussan M. A new model for germination of fungi. Int J Food Microbiol. 2011; 146:176-81.
290. Rosso L, Robinson TP. A cardinal model to describe the effect of water activity on the growth of moulds. Int J Food Microbiol. 2001; 63:265-73.
291. Gibson AM, Baranyi J, Pitt JI, Eyles MJ, Roberts TA. Predicting fungal growth: the effect of water activity on *Aspergillus flavus* and related species. Int J Food Microbiol. 1994; 23:419-31.
292. Larralde C. Cinética de crecimiento de hongos filamentosos: Morfometría de los micélios de *A. niger* y *G. fujikuroi* y su posible utilización en la predicción de la tasa específica de crecimiento. [Tesis – Doctorado en Ciencias]. México D.F., México: Unidad Iztapalapa, Universidad Autónoma Metropolitana; 1996.
293. Garcés F. Diseño de un prototipo de integrador de tiempo temperatura para el monitoreo de la calidad de leche refrigerada. [Tesis - Maestría en Diseño y Gestión de Procesos]. Chía, Colombia: Facultad de Ingeniería, Universidad de la Sabana; 2012.


294. Santos Da Silva PR, Tessaro IC, Marczak LDF. Modeling and simulation of *Byssoschlamys fulva* growth on papaya pulp subjected to evaporative cooling. Chem Eng Sci. 2014; 114:134-43.
295. Santos Da Silva PR, Tessaro IC, Marczak LDF. Integrating a kinetic microbial model with a heat transfer model to predict *Byssoschlamys fulva* growth in refrigerated papaya pulp. J Food Eng. 2013; 118:279-88.
296. Schaffner DW. Chapter 10: Models – What comes after the next generation? In: McKellar RC, Lu X, editors. Modeling Microbial Responses in Foods. Boca Raton: CRC Press LLC; 2004. p. 303-311.
297. Pin C, Metris A, Baranyi J. Chapter 25: Next generation of predictive models. In: Sofos J, editor. Advances in Microbial food Safety. Volume 1. UK: Woodhead Publishing Limited; 2013. p. 498-515.
298. Pérez-Rodríguez F. Chapter 18: Development and application of predictive microbiology models in foods. In: Granato D, Ares G, editors. Mathematical and Statistical Methods in Food Science and Technology. First Edition. New York: John Wiley & Sons, Ltd. Publishing; 2014. p. 321-361.
299. Sant´Ana AS. Avaliação quantitativa do risco da patulina em suco de maçã. [Dissertação - Mestrado em Ciência de Alimentos]. Campinas, Brasil: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2007.
300. Marcolino VA. Quantificação de leveduras, bolores comuns e termorresistentes em linha de processamento asséptico de bebida de uva. [Dissertação - Mestrado em Ciência de Alimentos]. Campinas, Brasil: Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas; 2003.
301. ISO 6887-1. 1999. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination – Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
302. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Recuento de Mohos y Levaduras. En: International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF), editor. Microorganismos de

- los Alimentos. Volumen 1. Su significado y métodos de enumeración. Segunda Edición. Zaragoza: Editorial Acribia; 2000. p. 165-167.
303. Resolución Ministerial N° 591 - 2008 – MINSA: “Norma Sanitaria que establece los Criterios Microbiológicos de Calidad Sanitaria e Inocuidad para los Alimentos y Bebidas de Consumo Humano” (Jun 27, 2008).
304. Pepsi-Cola Company. TM 200.010. Brix by Refractometer. Rev.4. 2005. p. 1-24.
305. Pepsi-Cola Company. TM 200.062. Conductive Dissolved Solids Determination. Rev. 2. 2004. p. 1-8.
306. Pepsi-Cola Company. TM 200.076. Titratable Acidity of Beverages. Rev. 3. 2004. p. 1-21.
307. Pepsi-Cola Company. TM 134.003. pH. Rev. 3. 2004. p. 1-12.
308. Whiting RC, Call JE. Time of growth model for proteolytic *Clostridium botulinum*. Food Microbiology 1993; 10: 295-301.
309. Ratkowsky DA. Chapter 4: Model fitting and uncertainty. In: McKellar RC, Lu X, editors. Modeling Microbial Responses in Foods. Boca Raton: CRC Press LLC; 2004. p. 151-196.
310. Pepsi-Cola Company. TM 701.001. Método de filtración de membrana para detección de bacterias, levaduras, mohos, bacterias acidúricas, levaduras resistentes a preservantes y bacterias coliformes. Rev. 2. 2004. p. 1-24.
311. PepsiCo. 18000.9004. Global beverage microbiological sampling plan, category 4 Hot Fill. Rev. 7. 2014. p. 1-11.
312. Guedes RO, Silva AR, Massaguer PR. Predictive modeling to determine the time for deterioration of single strength orange juice, pH 4. In: Tenenhaus-Azida F, Ellouze M, editors. 8<sup>th</sup> ICPMF - Predictive microbiology in food: Today's tools to meet stakeholders' expectations. Proceedings. 2013 Sep 16-20; Paris, France. p. 132-134.
313. Gougouli M, Koutsoumanis K. Relation between germination and mycelium growth of individual fungal spores. Int J Food Microbiol. 2013; 161:231-9.



## IX. ANEXOS

Anexo 1. Nota de despacho del moho FRR 3414 *Fusarium oxysporum*, proveniente del FRR Culture Collection, CSIRO Food and Nutritional Sciences – Australia

<b>CSIRO FOOD and NUTRITIONAL SCIENCES FRR CULTURE COLLECTION</b>			
An affiliate of the World Federation of Culture Collections And the Australian Federation of Culture Collections			
<b>CURATOR: Mark Wilson (BSc, AssocDip)</b>			
Our reference: 2010-113, Report 2010093321-01 Your reference: email received 7/9/2010 Date: 28/9/2010			
<b>DESPATCH NOTE</b>			
<hr/>			
<b>To:</b>	<b>Felix Giovanni Ramos Guerrero</b> Selva Industrial S.A. Av Victor Andres Belaunde 801-803 Carmen de la Legua Callao 3 06 Peru		
<hr/>			
<b>FRR No:</b>	<b>Species</b>	<b>Culture conditions</b>	<b>AU\$</b>
3414	<i>Fusarium oxysporum</i>	PDA, 25°C	60.00
Postage and Packaging			50.00
<hr/>			
<b>This is not an invoice.</b>		<b>Total cost including GST:</b>	<b>\$110.00</b>
<hr/>			
<b>CSIRO Division of Food and Nutritional Sciences, Sydney</b> CSIRO and the Victorian Government – partners in food and nutrition research through Food Science Australia Contact Mark Wilson   PO Box 52   North Ryde NSW 1670   Australia   <a href="http://www.foodscience.csiro.au">www.foodscience.csiro.au</a> Phone +61 2 9490 8315 Fax +61 2 9490 8499 Email <a href="mailto:mark.wilson@csiro.au">mark.wilson@csiro.au</a>			

Anexo 2. Análisis de varianza generados en cada experimento.

<b>Experimento A:</b> 10 <sup>0</sup> esporas/100 mL de bebida isotónica sabor mandarina a 20 °C						
<b>1° Ensayo</b>						
User-Defined $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$						
r2	Coef Det	DF	Adj r2	Fit Std Err	F-Statistic	
0.98579	0.980106		5.439717	173.43547		
	Value	Std Error	t-Value	95% Confidence Limits		
a0	100	0.000544	183833.108997	99.998601	100.001399	
a1	0.130409	0.017987	7.25011	0.084164	0.176654	
a2	116.48499	0.993215	117.280698	113.931433	119.038547	
User-Defined $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$						
a0=100	a1=0.130409	a2=116.48499				
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Statistic		
Regression	10264.090044	2	5132.045022	173.43547		
Error	147.952579	5	29.590516			
Total	10412.042623	7				
<b>2° Ensayo (Réplica)</b>						
User-Defined $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$						
r2	Coef Det	DF	Adj r2	Fit Std Err	F-Statistic	
0.999599	0.999499		1.124067	9980.554675		
	Value	Std Error	t-Value	95% Confidence Limits		
a0	100	0.000112	889626.38889	99.999741	100.000259	
a1	0.356493	0.016777	21.248449	0.317804	0.395181	
a2	104.572405	0.298897	349.861156	103.883148	105.261661	
User-Defined $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$						
a0=100	a1=0.356493	a2=104.572405				
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Statistic		
Regression	25221.409882	2	12610.704941	9980.554675		
Error	10.10822	8	1.263527			
Total	25231.518102	10				

**Experimento B:**  $10^1$  esporas/100 mL de bebida isotónica sabor mandarina a 20 °C

**1° Ensayo**

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

r2	Coef Det	DF	Adj r2	Fit	Std Err	F-Statistic
0.99344	0.992247	3.841618	832.851542			

Value	Std Error	t-Value	95% Confidence Limits
-------	-----------	---------	-----------------------

a0	100	3.841618	26.030695	91.544598	108.455402
a1	0.203568	0.022489	9.05184	0.15407	0.253067
a2	93.76214	0.438342	213.901696	92.797349	94.726931

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

a0=100	a1=0.203568	a2=93.76214		
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Statistic
Regression	24582.500378	2	12291.250189	832.851542
Error	162.338358	11	14.758033	
Total	24744.838737	13		

**2° Ensayo (Réplica)**

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

r2	Coef Det	DF	Adj r2	Fit	Std Err	F-Statistic
0.981545	0.976932	5.685052	212.748843			

Value	Std Error	t-Value	95% Confidence Limits
-------	-----------	---------	-----------------------

a0	100	0.000057	1758998.880291	99.999869	100.000131
a1	0.269308	0.044654	6.031063	0.166337	0.372279
a2	92.462637	0.508463	181.847347	91.290122	93.635153

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

a0=100	a1=0.269308	a2=92.462637		
Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Statistic
Regression	13752.006748	2	6876.003374	212.748843
Error	258.558525	8	32.319816	
Total	14010.565272	10		

**Experimento C:**  $10^0$  esporas/100 mL de bebida isotónica sabor mandarina a 30 °C

**1° Ensayo**

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

r2	Coef Det	DF	Adj r2	Fit	Std Err	F-Statistic
0.981661	0.978605	5.814524	321.175255			

Value	Std Error	t-Value	95% Confidence Limits
a0	100	0.000581	171983.130236 99.998733100.001267
a1	0.336452	0.048315	6.963668 0.23117 30.441731
a2	77.627384	0.535665	144.917915 76.460171 78.794597

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Statistic
a0=100	a1=0.336452	a2=77.627384		
Regression	21717.027154	2	10858.513577	321.175255
Error	405.704241	12	33.808687	
Total	22122.731395	14		

**2° Ensayo (Réplica)**

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

r2	Coef Det	DF	Adj r2	Fit	Std Err	F-Statistic
0.999656	0.999598	0.844922	17425.077642			

Value	Std Error	t-Value	95% Confidence Limits
a0	100	0.000845	118354.112799 99.998159 100.001841
a1	1.01905	0.091111	11.184696 0.820519 1.217581
a2	75.6113	0.067942	1112.87820175.463254 75.759346

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Statistic
a0=100	a1=1.01905	a2=75.6113		
Regression	24879.29153	2	12439.645765	17425.077642
Error	8.566719	12	0.713893	
Total	24887.858249	14		

**Experimento D:**  $10^7$  esporas/100 mL de bebida isotónica sabor mandarina a 30 °C

**1° Ensayo**

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

r2	Coef Det	DF	Adj r2	Fit	Std Err	F-Statistic
0.984104	0.982117	5.919618	495.265015			

Value	Std Error	t-Value	95% Confidence Limits	
a0	100	1.871948e+20	5.342030e-19	-
		3.968529e+203.968529e+20		
a1	6.139914	383925.497196	0.000016	-
		813915.870204813928.150032		
a2	67.261729	18838.253225	0.00357	-39869.83295240004.35641

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Statistic
a0=100				
a1=6.139914				
a2=67.261729				
Regression	34710.029545	2	17355.014772	495.265015
Error	560.67	16	35.041875	
Total	35270.699545	18		

**2° Ensayo (Réplica)**

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

r2	Coef Det	DF	Adj r2	Fit	Std Err	F-Statistic
0.992476	0.991473	3.857325	989.329522			

Value	Std Error	t-Value	95% Confidence Limits	
a0	100	1.219793	81.981095	97.40062102.59938
a1	1.690026	0.286938	5.88987	1.078562 2.30149
a2	68.294968	0.24319	280.829338	67.776729 68.813206

User-Defined  $y=100/(1+\exp(a1*(a2-x)))$

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-Statistic
a0=100				
a1=1.690026				
a2=68.294968				
Regression	29440.388571	2	14720.194286	989.329522
Error	223.184398	15	14.87896	
Total	29663.57297	17		