



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

aspa
ANÀLISI I SIMULACIÓ
DE PROCESSOS AGROALIMENTARIS

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
Departamento de Tecnología de Alimentos

***Inactivación microbiana en matrices cárnicas mediante fluidos
supercríticos asistidos por ultrasonidos de potencia***

TESIS DOCTORAL

Presentada por:
Rosa Isela Castillo Zamudio

Dirigida por:
José Javier Benedito Fort
Carmen Ortuño Cases



Mayo, 2015
Valencia, España



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

DEPARTAMENTO DE
TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Dña. CARMEN ORTUÑO CASES Y D. JOSÉ JAVIER BENEDITO FORT PROFESOR
CATEDRÁTICO DE UNIVERSIDAD DEL DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE
ALIMENTOS DE LA UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

CERTIFICAN:

Que la memoria titulada "*Inactivación microbiana en matrices cárnicas mediante fluidos supercríticos asistidos por ultrasonidos de potencia*", presentada por Dña. Rosa Isela Castillo Zamudio para aspirar al grado de Doctora en Ciencia, Tecnología y Gestión Alimentaria y realizada bajo nuestra dirección en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universitat Politècnica de València, cumple las condiciones adecuadas para su aceptación como Tesis Doctoral, por lo que

AUTORIZAN:

A la interesada a su presentación en el Departamento de Tecnología de Alimentos de la Universitat Politècnica de València.

Y para que conste a los efectos oportunos, presentamos la referida memoria firmando el presente certificado en Valencia a 4 de mayo de 2015.

Fdo. Dra. Carmen Ortuño Cases

Fdo. Dr. José Javier Benedito Fort

A Dios, por darme cada día un soplo de vida.

A mi madre, por ser un referente para mí y apoyarme desde la distancia a culminar esta meta.

A Iván, por esas “cosas simples de la vida” que con amor me ha dado y me han impulsado a seguir hasta el final.

A mis dos amores, mis pequeños Diego y Paolo que dan luz, alegría y sentido a mi vida.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la financiación de mis estudios doctorales dentro del Programa Nacional de Becas al Extranjero.

Al Colegio de Postgraduados (CP), por el apoyo financiero otorgado dentro del Programa de Formación de Profesores Investigadores (PFPI) del CP.

A la Generalitat Valenciana a través del proyecto PROMETEOII/2014/0005, por la financiación recibida para el desarrollo experimental de la presente Tesis Doctoral.

A todos los integrantes del Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios (ASPA), del Departamento de Tecnología de Alimentos de la UPV, con quienes he compartido mis mayores alegrías y me han enseñado sus mejores lecciones de vida.

Al Dr. Antonio Mulet Pons, por aceptarme a formar parte, como estudiante de doctorado, de este prestigioso grupo de investigación ASPA-UPV.

A mi director de tesis, José J. Benedito Fort, por su encomiable dirección de la presente Tesis doctoral y su disposición incondicional para el buen desarrollo de la misma.

A Carmina Ortuño, por apoyarme desde el principio con este proyecto de investigación y dirigir la presente Tesis Doctoral, especialmente durante esta última etapa.

De este querido grupo ASPA, quiero agradecer particularmente a Ramón Peña, quien me apoyó incondicionalmente con el buen funcionamiento del equipo del laboratorio y a Nieves Pérez, por su disposición para colaborar durante el desarrollo experimental de la Tesis. Finalmente, quiero agradecer especialmente, a Gabriela Clemente por su amabilidad y el apoyo tan especial que nos ha brindado siempre a mí y a mi familia.

A esas personitas especiales de mi vida en Valencia que han formado parte de nuestra "Familia Española", a es@s verdader@s amig@s que han estado y se han ido, y aquell@s que actualmente comparten conmigo y con mi familia, un cariño sincero. Gracias a ustedes nuestra estancia en Valencia ha sido placentera!

A todos y cada uno de mis compañer@s de laboratorio que han compartido conmigo días buenos y otros mejores. De todos me llevo el mejor recuerdo, su amistad.

*Los días buenos te dan FELICIDAD.
Los días malos te dan EXPERIENCIA.
Los intentos te mantienen FUERTE.
Las pruebas te mantienen HUMANO.
Las caídas te mantienen HUMILDE.
Solo DIOS te mantiene de PIE.*

San Juan Pablo II

CONTENIDO

Resumen	iii
Abstract	xi
Resum	xx
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Seguridad alimentaria	3
1.2. Tecnologías tradicionales de conservación	4
1.3. Tecnologías emergentes no térmicas de conservación en la industria alimentaria	5
1.4. Fluidos supercríticos: CO ₂ Supercrítico	9
1.4.1. Definición de fluido supercrítico: CO ₂ Supercrítico	9
1.4.2. Propiedades fisicoquímicas del FSC-CO ₂	10
1.4.3. Aplicaciones de conservación con FSC-CO ₂ en la industria alimentaria	13
1.4.4. Mecanismos de inactivación microbiana mediante FSC-CO ₂	14
1.4.5. Factores que afectan la inactivación microbiana mediante FSC-CO ₂	18
1.4.6. Efecto del FSC-CO ₂ sobre las propiedades físico-químicas de los alimentos y su estabilidad microbiológica tras el tratamiento	25
1.5. Combinación de FSC-CO ₂ con tecnologías no térmicas de conservación	31
1.6. Ultrasonidos de alta intensidad	33
1.6.1. Definición	33
1.6.2. Sistemas de generación de ultrasonidos de potencia	35
1.6.3. Efectos de los HPU sobre diferentes medios de propagación	36
1.6.4. Aplicaciones de los HPU en la industria alimentaria	40
1.6.5. Aplicación de los HPU en procesos de conservación e inactivación microbiana	42
1.6.6. Efecto de los HPU en las propiedades fisicoquímicas de los alimentos	43
1.7. Combinación de FSC-CO ₂ y HPU	45
1.7.1. Efecto del tratamiento mediante FSC-CO ₂ +HPU sobre la inactivación microbiana	45
1.7.2. Efecto del tratamiento mediante FSC-CO ₂ +HPU sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos	49
1.8. Modelización matemática de la inactivación microbiana en alimentos	50

2.	OBJETIVOS	57
3.	METODOLOGÍA	61
3.1.	Plan de Trabajo	61
3.2.	Preparación del cultivo e inóculo	64
3.3.	Materia prima y preparación de las muestras	65
3.4.	Equipo de fluidos supercríticos	67
3.4.1	Gases	68
3.4.2	Depósito enfriador	68
3.4.3	Bomba	68
3.4.4	Baño termostático	69
3.4.5	Depósito de inactivación	69
3.4.6	Dispositivo de ultrasonidos de potencia (HPU)	69
3.4.7	Soporte de muestra	72
3.5.	Procedimiento experimental de los tratamientos de inactivación mediante fluidos supercríticos asistidos o no por ultrasonidos.	73
3.6.	Viabilidad de los microorganismos	75
3.7.	Inactivación de microorganismos en muestras cárnicas	76
3.7.1.	Tratamientos de inactivación en pechuga de pollo	76
3.7.2.	Tratamientos de inactivación en jamón de pavo	77
3.7.3.	Tratamientos de inactivación en jamón curado	77
3.8.	Modelización	80
3.8.1.	Modelo de Weibull	80
3.8.2.	Modelo de Bifásico	81
3.8.3.	Modelo de Peleg Tipo A	81
3.8.4.	Modelo de Peleg Tipo B	81
3.8.5.	Bondad de los ajustes	82
3.9.	Efecto del tipo de tratamiento mediante FSC-CO ₂ sobre la calidad de la muestras cárnicas	83
3.9.1.	Color	83
3.9.2.	Textura	84
3.9.3.	Humedad	85
3.9.4.	pH	85
3.9.5.	Determinación de grasa	86
3.9.6.	Microestructura	87
3.10.	Almacenamiento	89

4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	95
4.1.	Proceso de inactivación de <i>E. coli</i> mediante FSC-CO ₂	95
4.1.1.	Inactivación sobre pechuga de pollo	95
4.1.2.	Inactivación sobre jamón de pavo	109
4.1.3.	Inactivación sobre jamón curado	126
4.1.4.	Discusión	135
4.2.	Modelización de las cinéticas de inactivación de <i>E. coli</i> sobre muestras cárnicas mediante FSC-CO ₂ .	163
4.2.1.	Modelización primaria	163
4.2.2.	Modelización secundaria	171
4.3.	Efecto de los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO ₂ sobre los parámetros de calidad de las matrices cárnicas	189
4.3.1.	Color	190
4.3.2.	Textura	197
4.3.3.	Humedad	205
4.3.4.	Grasa	208
4.3.5.	Microestructura	212
4.4.	Estudio de almacenamiento de muestras cárnicas	223
4.4.1.	Color	224
4.4.2.	Textura	230
4.4.3.	Humedad	234
4.4.4.	pH	237
4.4.5.	Microbiota	240
5.	CONCLUSIONES	253
6.	RECOMENDACIONES	261
7.	REFERENCIAS	265

ÍNDICE DE FIGURAS

1. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1	Diagrama de fases del CO ₂ .	10
Figura 1.2	Propagación de la onda acústica, parámetros acústicos y zonas de compresión y rarefacción.	35
Figura 1.3	Burbujas de cavitación formadas durante los ciclos de compresión (C) y rarefacción (R).	38
Figura 1.4	Comportamiento de las curvas de inactivación microbiana. (a) Logarítmica lineal, (b) Con hombro, (c) Con cola, (d) Sigmoidea.	52

3. METODOLOGÍA

Figura 3.1	Plan de trabajo	63
Figura 3.2	Preparación de muestras cárnicas para su procesamiento A. Pechuga de pollo, B. Jamón de pavo, C. Jamón curado	66
Figura 3.3	Esquema de la planta de fluidos supercríticos: 1. Tanque de N ₂ ; 2. Tanque de CO ₂ ; 3. Depósito enfriador de CO ₂ y N ₂ ; 4. Bomba de inyección de CO ₂ , 5. Manómetros 6. Termopar; 7. Generador de ultrasonidos; 8. Bomba de recirculación de agua; 9. Baño con control de temperatura; 10. Depósito de inactivación. 11. Salida reducción de presión y toma de muestras líquidas, V. Válvulas.	67
Figura 3.4	Dispositivo de ultrasonidos de potencia (HPU) A. Vista Real. B. Esquema: 1. Conector de entrada de potencia; 2. Junta de cierre; 3. Soporte de aluminio; 4. Cerámicas; 5. Sonotrodo de aluminio; 6. Muestra de carne y 7. Soporte para muestra de carne.	71
Figura 3.5	Sistema porta muestra A. Porta muestra y útil para su introducción en el depósito de tratamiento. B. Porta muestra C. Porta muestra con jamón de pavo D. Porta muestra con pechuga de pollo E. Porta muestra con jamón curado.	72

Figura 3.6	Puntos de medición de color (A) y textura (B) en las muestras cárnicas.	84
Figura 3.7	Esquema del equipo de extracción Soxhlet. 1. Éter de petróleo en ebullición; 2. Matraz balón; 3. Cuerpo extractor; 4. Cartucho. 5. Muestra; 6. Entrada-salida de sifón; 7. Salida de solvente con extracto; 8. Adaptador de unión; 9. Cuerpo refrigerante (condensador); 10. Entrada de fluido frío; 11. Salida de fluido más caliente.	87
Figura 3.8	Cortes de las muestras de carne para el análisis de la microestructura mediante SEM.	88

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Apartado 4.1 Proceso de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂

Figura 4.1	Cinéticas de inactivación de <i>E. coli</i> inoculada en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO ₂ a diferentes presiones (41 °C). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo de Weibull (líneas).	96
Figura 4.2	Cinéticas de inactivación de <i>E. coli</i> inoculada en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO ₂ a diferentes temperaturas (350 bar). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo de Weibull (líneas).	98
Figura 4.3	Influencia de la aplicación de HPU y de sumergir la muestra en una disolución isotónica en el tratamiento de inactivación de <i>E. coli</i> en muestras de pechuga de pollo mediante FSC-CO ₂ a diferentes presiones (150, 250, 350, 450 bar) y temperaturas (36, 41, 46 y 51 °C). Valores promedio ± intervalos LSD.	99
Figura 4.4	Cinéticas de inactivación de <i>E. coli</i> inoculada en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO ₂ +HPU: A. diferentes presiones (41 °C) y B. diferentes temperaturas (350 bar). Datos experimentales (puntos); valores ajustados mediante el modelo de Weibull (líneas).	101

Figura 4.5	Cinéticas de inactivación de <i>E. coli</i> inoculada en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante: A. FSC-CO ₂ , B. FSC-CO ₂ +DI y C. FSC-CO ₂ +HPU+DI bajo diferentes condiciones de presión (150, 250, y 350 bar) a temperatura constante (46 °C). Datos experimentales (puntos); valores ajustados mediante el modelo de Weibull (líneas).	106
Figura 4.6	Cinéticas de inactivación de <i>E. coli</i> inoculada en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO ₂ a diferentes presiones (150, 250 y 350 bar; 46 °C). Datos experimentales, (puntos); valores calculados mediante el modelo de Peleg Tipo B (líneas).	110
Figura 4.7	Cinéticas de inactivación de <i>E. coli</i> inoculada en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO ₂ a diferentes temperaturas (41, 46 y 51 °C; 350 bar). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo de Peleg Tipo B (líneas).	112
Figura 4.8	Influencia de la aplicación de HPU y de sumergir la muestra en una disolución isotónica en el tratamiento de inactivación de <i>E. coli</i> en muestras de jamón de pavo mediante FSC-CO ₂ a diferentes presiones (150, 250, 350 bar; 46 °C) y temperaturas (41, 46 y 51 °C; 350 bar). Valores promedio ± intervalos LSD.	113
Figura 4.9	Cinéticas de inactivación de <i>E. coli</i> inoculada en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO ₂ +HPU: A. diferentes presiones (46 °C) y B. diferentes temperaturas (350 bar). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo Bifásico (líneas).	114
Figura 4.10	Cinéticas de inactivación de <i>E. coli</i> inoculada en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO ₂ +HPU: A. diferentes presiones (46 °C) y B. diferentes temperaturas (350 bar). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo Bifásico (líneas).	117

Figura 4.11	Cinéticas de inactivación de <i>E. coli</i> inoculada en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO ₂ +HPU+DI: A. diferentes presiones (46 °C) y B. diferentes temperaturas (350 bar). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo de Peleg Tipo B (líneas).	120
Figura 4.12	Curvas de inactivación de <i>E. coli</i> inoculada en muestras de jamón de pavo obtenidas mediante ■ HPU+DI, Δ FSC-CO ₂ +DI y ● FSC-CO ₂ +HPU+DI usando una presión de CO ₂ contante (350 bar) bajo diferentes condiciones de temperatura: A. 41 °C B. 46 °C y C. 51 °C.	123
Figura 4.13	Efecto de la presión, temperatura y tiempo de proceso sobre la inactivación de <i>E. coli</i> en jamón curado mediante el tratamiento de FSC-CO ₂ +HPU.	129
Figura 4.14	Efecto de la presión, temperatura y tiempo sobre la inactivación de <i>E. coli</i> mediante el tratamiento de FSC-CO ₂ +HPU+DI.	133
Figura 4.15	Lámina de papel de aluminio A. control (sin tratar); lámina de papel de aluminio tratada mediante: B. FSC-CO ₂ +DI; C. FSC-CO ₂ ; D. HPU+DI; E. FSC-CO ₂ +HPU y F. FSC-CO ₂ +HPU+DI. Condiciones de FSC-CO ₂ : 150 bar, 46 °C, 5 min. HPU: 42 ± 5 W.	159

Apartado 4.2 Modelización de las cinéticas de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂

Figura 4.16	Inactivación de <i>E. coli</i> experimental frente a calculada mediante el modelo de Weibull generalizado, durante el tratamiento de A. FSC-CO ₂ y B. FSC-CO ₂ +HPU a diferentes condiciones de presión (150 – 450 bar) y temperatura (36 – 51 °C).	176
Figura 4.17	Inactivación de <i>E. coli</i> experimental frente a calculada mediante el modelo de Weibull generalizado, durante el tratamiento de A. FSC-CO ₂ +DI y B. FSC-CO ₂ +HPU+DI a diferentes condiciones de presión (150 – 350 bar) y temperatura constante (46 °C).	178

Figura 4.18 Inactivación de *E. coli* experimental frente calculada mediante el modelo de Peleg Tipo B generalizado, durante el tratamiento de A. FSC-CO₂ y B. FSC-CO₂+HPU+DI a diferentes condiciones de presión (150 – 350 bar) y temperatura (41 – 51 °C). 181

Figura 4.19 Inactivación de *E. coli* experimental frente a calculada mediante el modelo Bifásico generalizado, durante el tratamiento de A. FSC-CO₂+HPU y B. FSC-CO₂+DI a diferentes condiciones de presión (150 – 350 bar) y temperatura (41 - 51°C) 184

Apartado 4.3 Efecto de los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ sobre los parámetros de calidad de las matrices cárnicas

Figura 4.20 Microscopía electrónica de barrido de una sección longitudinal de muestras de pechuga de pollo. A. Muestra Control; B. Muestra tratada con FSC-CO₂; C. Muestra tratada con HPU+DI y D. Muestra tratada con FSC-CO₂+HPU+DI. b. Fisuras; c. Tejido conectivo. f. Fibras musculares. 215

Figura 4.21 Muestras de jamón de pavo observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). A. 200x, Muestras control-sección central; B. 500x, Muestra control-sección central; C. 200x, Muestra tratada FSC-CO₂+HPU+DI-sección central; D. 500x, Muestra tratada FSC-CO₂+HPU+DI-sección central; E. 200x, Muestra tratada FSC-CO₂+HPU+DI-extremo y F. 500x, Muestra tratada FSC-CO₂+HPU+DI-extremo. a. Gránulo de almidón. 217

Figura 4.22 Sección longitudinal de la superficie de muestras de jamón curado observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). A. 200x, Muestra Control; B. 200x, Muestras tratadas mediante FSC-CO₂ (250 bar, 46 °C, 10 min); C. 150x Muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU y D. 200x, Muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI. f. Fibras musculares. 219

Apartado 4.4 Estudio de almacenamiento de muestras cárnicas tratadas mediante FSC-CO₂

- Figura 4.23** Evolución de los parámetros de color analizados en la superficie de muestras de pechuga de pollo sin tratar (control) y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI (250 bar, 46 °C, 20 min; 42 W ± 5 W), durante 30 días de almacenamiento a 4 °C. A. Valores de L*; B. Valores de a*; C. Valores de b* y D. Diferencia global de color (ΔE). 225
- Figura 4.24** Evolución de los parámetros de color analizados en la superficie de muestras de jamón de pavo sin tratar (control) y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C, 10 min; 42 W ± 5 W), durante 30 días de almacenamiento a 4 °C. A. Valores de L*; B. Valores de a*; C. Valores de b* y D. Diferencia global de color (ΔE). 227
- Figura 4.25** Evolución de los parámetros de color analizados en la superficie de muestras de jamón curado sin tratar (control) y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (250 bar, 46 °C, 10 min; 42 W ± 5 W), durante 30 días de almacenamiento a 4 °C. A. Valores de L*; B. Valores de a*; C. Valores de b* y D. Diferencia global de color (ΔE). 229
- Figura 4.26** Evolución de la dureza de muestras cárnicas control y tratadas: (A) Pechuga de pollo (FSC-CO₂+HPU+DI: 250 bar, 46 °C, 20 min); (B) Jamón de pavo (FSC-CO₂+HPU: 150 bar, 46 °C, 10 min); (C) Jamón curado (FSC-CO₂+HPU: 250 bar, 46 °C, 10 min); durante 30 días de almacenamiento a 4 °C. 233
- Figura 4.27** Evolución del contenido de agua (g agua/100 g m. h.) en muestras cárnicas control y tratadas: (A) Pechuga de pollo (FSC-CO₂+HPU+DI: 250 bar, 46 °C, 20 min); (B) Jamón de pavo (FSC-CO₂+HPU: 150 bar, 46 °C, 10 min); (C) Jamón curado (FSC-CO₂+HPU: 250 bar, 46 °C, 10 min); durante 30 días de almacenamiento a 4 °C. 236

- Figura 4.28** Evolución del pH en muestras cárnicas control y tratadas: (A) 238
Pechuga de pollo (FSC-CO₂+HPU+DI: 250 bar, 46 °C, 20 min);
(B) Jamón de pavo (FSC-CO₂+HPU: 150 bar, 46 °C, 10 min); (C)
Jamón curado (FSC-CO₂+HPU: 250 bar, 46 °C, 10 min); durante
30 días de almacenamiento a 4 °C.
- Figura 4.29** Microbiota presente en muestras de pechuga de pollo, tratadas 242
mediante FSC-CO₂+HPU+DI (250 bar, 46 °C, 20 min) y
muestras control, durante su almacenamiento a 4 °C
- Figura 4.30** Microbiota presente en muestras de jamón de pavo, tratadas 244
mediante FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C, 10 min) y muestras
control, durante su almacenamiento a 4 °C
- Figura 4.31** Microbiota presente en muestras de jamón curado, tratadas 248
mediante FSC-CO₂+HPU (250 bar, 46 °C, 10 min) y muestras
control, durante su almacenamiento a 4 °C

ÍNDICE DE TABLAS

1. INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1	Propiedades críticas de los algunos solventes usados en procesos de extracción y gases empleados en procesos de inactivación a alta-presión (Sanders, 1993; Erkmen, 2012)	11
Tabla 1.2	Propiedades físico-químicas del CO ₂ (Koutchma y Murakami 2005)	12
Tabla 1.3	Tratamientos de inactivación microbiana mediante FSC-CO ₂ sobre diferentes matrices cárnicas.	24
Tabla 1.4	Efecto del FSC-CO ₂ sobre las propiedades físico-químicas y nutricionales de diferentes alimentos sólidos.	27
Tabla 1.5	Estudios recientes sobre la inactivación microbiana en diferentes matrices alimentarias sólidas mediante FSC-CO ₂ +HPU.	48
Tabla 1.6	Efecto del tratamiento mediante FSC-CO ₂ +HPU sobre propiedades físico-químicas y nutricionales de diferentes alimentos sólidos.	50

3. METODOLOGÍA

Tabla 3.1	Medios y condiciones de crecimiento para diferentes microorganismos.	76
Tabla 3.2	Tratamientos de inactivación de <i>E. coli</i> en muestras de pollo.	76
Tabla 3.3	Relación de variables independientes físicas y codificadas en los tratamientos de inactivación de <i>E. coli</i> en muestras de jamón curado mediante FSC-CO ₂ +HPU y FSC-CO ₂ +HPU+DI	78
Tabla 3.4	Condiciones de presión, temperatura y tiempo de tratamiento seleccionadas para los análisis fisicoquímicos de cada muestra cárnica.	83

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

Apartado 4.1 Proceso de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂

- Tabla 4.1** Diseño experimental empleado en la metodología de superficie de respuesta para evaluar los efectos de las tres variables independientes (P, T y t) sobre la inactivación microbiana, en cada uno de los tratamientos (FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+HPU+DI). Valores experimentales y calculados de inactivación microbiana. 127
- Tabla 4.2** Coeficientes de regresión estimados mediante el modelo polinomial que describe la inactivación de *E. coli* en jamón curado usando FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+HPU+DI. 128

Apartado 4.2 Modelización de las cinéticas de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂

- Tabla 4.3** Parámetros estadísticos obtenidos al ajustar diferentes modelos matemáticos a las cinéticas de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo bajo diferentes condiciones de tratamiento. 164
- Tabla 4.4** Constantes cinéticas obtenidas al ajustar los modelos primarios a las curvas de inactivación experimentales de *E. coli* inoculadas en pechuga de pollo tratadas mediante diferentes condiciones de tratamiento. 166
- Tabla 4.5** Parámetros estadísticos obtenidos al ajustar diferentes modelos matemáticos a las cinéticas de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón de pavo bajo diferentes condiciones de tratamiento. 168
- Tabla 4.6** Constantes cinéticas obtenidas al ajustar los modelos primarios a las curvas de inactivación experimentales de *E. coli* inoculadas en jamón de pavo tratadas mediante diferentes condiciones de tratamiento. 170

Tabla 4.7	Estimación de los parámetros del modelo de Weibull generalizado para describir las cinéticas de inactivación de E. coli en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO ₂ y FSC-CO ₂ +HPU a diferentes condiciones de presión y temperatura	175
Tabla 4.8	Estimación de los parámetros del modelo de Weibull generalizado para describir las cinéticas de inactivación de E. coli en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO ₂ +DI y FSC-CO ₂ +HPU+DI, bajo diferentes condiciones de presión (150, 250 y 350 bar), a temperatura constante (46 °C).	177
Tabla 4.9	Estimación de parámetros del modelo de Peleg Tipo B generalizado, para describir las cinéticas de inactivación de E. coli en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO ₂ y FSC-CO ₂ +HPU+DI a diferentes condiciones de presión (150, 350, 450 bar) y temperatura (41, 46 y 51 °C)	180
Tabla 4.10	Estimación de los parámetros del modelo Bifásico generalizado, para describir las cinéticas de inactivación de E. coli en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO ₂ +HPU y FSC-CO ₂ +DI a diferentes condiciones de presión (150, 350, 450 bar) y temperatura (41, 46 y 51 °C)	183

Apartado 4.3 Efecto del tipo de tratamiento mediante FSC-CO₂ sobre atributos de calidad de muestras cárnicas

Tabla 4.11	Parámetros de color en las muestras cárnicas sometidas a diferentes tratamientos de inactivación.	192
Tabla 4.12	Valores de Fuerza máxima (F. máxima) de las matrices cárnicas sin tratar (control) y tratadas mediante diferentes tipos de tratamiento.	199
Tabla 4.13	Contenido de agua en las muestras cárnicas sin tratar (control) y muestras tratadas mediante los distintos tratamientos.	206
Tabla 4.14	Contenido en grasa en las muestras cárnicas sin tratar y muestras tratadas mediante los diferentes tratamientos.	209

ABSTRACT / RESUMEN / RESUM

Abstract

Changes in lifestyle and the growing demand for minimally processed products, or with very short cooking time, have led to the food industry to offer healthy and innocuous products, prepared through innovative and environmentally friendly technologies. In response to this need, non-thermal preservation technologies have arisen, which properly combine physical and chemical factors in order to reduce microorganism contents below a critical value with minimal impact on product quality. In this regard, the application of supercritical CO₂ (FSC-CO₂) is an environmentally-friendly, non-thermal inactivation technique that has shown to be efficient for reducing pathogenic and food spoilage microorganisms, with minimal impact over nutritional and organoleptic properties of food. The main disadvantage of FSC-CO₂ inactivation is the low speed of microbial inactivation. To deal with this problem, several authors have combined FSC-CO₂ with high power ultrasound (HPU). This combined technique (FSC-CO₂+HPU) has succeeded in reducing treatment times and in ensuring full microbial inactivation in liquid food matrices. However, there are few studies on its application viability in solid food matrices.

Within this context, the main purpose of this Doctoral Thesis was to study the influence of high power ultrasounds (HPU) on supercritical fluids treatments (FSC-CO₂) for microbial inactivation in meat samples. For this purpose, 3 types of meat matrices with different characteristics were selected: fresh chicken breast, turkey ham (cooked deli-meat type) and cured ham. To assess the effect of treatments on microbial inactivation, *Escherichia coli* cells DH1 in exponential growth phase were used as model microorganism, which were inoculated on the surface of meat samples. FSC-CO₂ and FSC-CO₂+HPU inactivation treatments were performed on meat samples, under different pressure (150 – 450 bar), temperature (36 – 51 °C) and treatment time (5 – 40 min) conditions. To analyze the nature of the medium around meat samples described above, inactivation treatments were performed on meat samples immersed in a saline dilution (DI), FSC-CO₂+DI and FSC-CO₂+HPU+DI, comparing the inactivation level obtained with inactivation results in non-immersed samples. Afterwards, treatment conditions that on average allowed a reduction in *E. coli*

population of at least 3 log-cycles, were selected to assess the effect of different FSC-CO₂ and HPU treatment systems on the quality properties of meat samples. Finally, the most appropriate inactivation treatment for each type of sample was chosen, in order to assess any changes in physico-chemical and microbiological properties of samples after the treatment and during refrigerated storage for 30 days at 4 °C.

The results showed that, using FSC-CO₂ at different pressure conditions (150, 250, 350, and 450 bar), at constant temperature of 41 °C and 46 °C, pressure did not produce a significant effect ($p < 0.05$) on the *E. coli* inactivation level obtained in chicken breast samples, reaching an average reduction of 1.5 and 2.5 log-cycles after a 40-min treatment at 41 and 46 °C, respectively. However, when using turkey ham, a rise in pressure from 150 to 350 bar (46 °C) resulted in a significant increase ($p < 0.05$) of *E. coli* inactivation level, and reached at 350 bar the total reduction of population (6.6 log-cycles) after a 20 min treatment. On the other hand, inactivation kinetics of *E. coli* under different temperature conditions for chicken breast (36, 41, 46 and 51 °C; 350 bar) and turkey ham samples (41, 46 and 51 °C; 350 bar) showed that treatment temperature was a key factor to increase *E. coli* inactivation level significantly ($p < 0.05$). By using the highest treatment temperature (51 °C; 350 bar), *E. coli* population was totally reduced (6.6 log-cycles) after 30 and 10 min treatment on chicken breast and turkey ham samples, respectively. These results showed that, inactivation mechanisms are directly influenced by the nature of the meat matrix, and in some cases, long process times were necessary to achieve the total reduction of the *E. coli* population inoculated into meat samples.

Accordingly, in order to try to overcome those limitations found in FSC-CO₂ inactivation process of *E. coli* in meat samples, FSC-CO₂+HPU inactivation kinetics were performed under the same treatment conditions as for FSC-CO₂. In addition, FSC-CO₂+HPU inactivation treatments of *E. coli* were performed on cured ham samples under different pressure (150, 250, 350 bar), temperature (41, 46 and 51 °C) and time (5, 10, 15 min) conditions, and response surface methodology was used in order to find the treatment conditions allowing the maximum inactivation level within the

treatment conditions range chosen. HPU conditions (42 W \pm 5 W; 24 kHz) were the same for all treatments assessed.

HPU application during FSC-CO₂ (FSC-CO₂+HPU) treatments allowed an inactivation level of *E. coli* in chicken breast samples (2.1 log-cycles) and turkey ham (3.5 log-cycles) significantly higher ($p < 0.05$) than the reductions obtained using only FSC-CO₂ (1.6 and 3.1 log-cycles for chicken and turkey, respectively). Pressure did not produce a significant effect ($p > 0.05$) on the inactivation level of *E. coli* on chicken breast and cured ham, reaching an average reduction of 1.3 and 1.6 log-cycles, respectively. By contrast, temperature increased significantly ($p < 0.05$) the inactivation level of *E. coli* in the 3 types of meat samples. Using the maximum treatment temperature (51 °C), *E. coli* population was totally reduced (6.8 log-cycles) after 20 and 10 min treatment in chicken breast and turkey ham samples, respectively. In cured ham samples, population was reduced 3.5 log-cycles after a 10 min treatment at 51 °C.

Process temperature was a key factor to accelerate CO₂ inactivation mechanisms in solid matrices, fostering CO₂ diffusion in the matrix and cell membrane fluidity which allow enhancing the inactivation mechanisms associated to CO₂. However, the nature of meat matrix was a crucial factor in the microorganism inactivation process that produced a protecting effect and restricted direct contact of CO₂ with their cell membrane.

Low inactivation levels found in meat matrices compared to liquids such as juices can be due to the small water content available on sample's surface. The lack of liquid would reduce the mechanical effect of ultrasound, mainly because of the lack of cavitation in a medium with only FSC-CO₂, which limits ultrasonic microagitation and hinders any direct damage on cell membranes resulting from cavitation.

In this regard, FSC-CO₂ and FSC-CO₂+HPU inactivation treatments were performed, under the same pressure, temperature and time conditions of previous assays, but now immersing meat samples into 60 ml sterile saline dilution (0.9 % NaCl w/v) (DI).

Immersing chicken breast and turkey ham samples in DI during FSC-CO₂ treatments did not produce a significant ($p > 0.05$) increase in the inactivation level of *E. coli*

compared to the values obtained in non-immersed samples. However, soaking meat samples into DI during FSC-CO₂+HPU (FSC-CO₂+HPU+DI) inactivation treatments, in general, allowed a significant ($p<0.05$) reduction of *E. coli* population in meat samples compared to the application of only FSC-CO₂+HPU. For example, by using chicken breast immersed in DI, total inactivation of *E. coli* was reached after 10 min applying the FSC-CO₂+HPU+DI treatment at 150 bar and 46 °C, compared to the reduction of 3.1 *E. coli* log-cycles achieved in non-immersed samples (FSC-CO₂+HPU) under the same treatment conditions.

In general, pressure did not produce a significant ($p>0.05$) effect on the FSC-CO₂+HPU+DI inactivation level obtained for the 3 meat samples. Nevertheless, as it has been observed in previous treatments, temperature increased significantly ($p<0.05$) the inactivation level of *E. coli* in turkey ham and cured ham samples; reaching the total reduction of population (6.6 log-cycles) after a 5 min treatment at 51 °C in turkey ham samples, compared to the 3.1 log-cycles reduced at 46 °C. In cured ham samples, the inactivation level obtained after a 10 min treatment increased from 1 log-cycle at 41 °C to 3.3 log-cycles reached at 51 °C.

Therefore, by adding DI, FSC-CO₂+HPU microbial inactivation treatment was enhanced, mainly due to mechanical effects produced by HPU on the solution, which may be attributed to cavitation, to contraction and rarefaction movements or to high intensity micro-currents produced in the medium. These effects enhance the solubilization of the CO₂ into the DI, its transport to cellular inner part and the extraction of vital components. Moreover, cavitation can affect cell membrane integrity resulting in the inactivation of microorganisms. Moreover, it was verified through assays using aluminum foil that cavitation and effects from ultrasonic agitation are produced only on those assays where DI is added.

A synergistic effect was found in the joint application of FSC-CO₂ and HPU. For example, the reduction of *E. coli* in turkey ham samples obtained after 30 min applying the combined FSC-CO₂+HPU+DI treatment (150 bar, 46 °C), 6.4 log-cycles, was 45 % higher than the sum of reductions obtained by the application of individual FSC-CO₂+DI (3.2 log-cycles) and HPU+DI (1.2 log-cycles) techniques.

When comparing the inactivation reached in the 3 meat samples under similar treatment conditions (250 bar, 46 °C, 10 min), it was found out that turkey ham samples reached an average inactivation level (3.7 log-cycles) significantly higher ($p < 0.05$) than that obtained in chicken breast (2.0 log-cycles) and cured ham samples (2.5 log-cycles) by applying FSC-CO₂ + HPU and FSC-CO₂+HPU+DI. These results shows the different degree of protection against microbial inactivation of the 3 meat matrices studied; turkey ham < cured ham < chicken breast.

Different mathematical models were used to describe inactivation kinetics of *E. coli* on chicken breast and turkey ham samples, obtained by applying different FSC-CO₂ and HPU inactivation treatments. Peleg logistic equation was used to include the influence of pressure and temperature on the model. General Weibull model described properly ($R^2_{\text{average}} = 0.912$; $\text{RMSE}_{\text{average}} = 0.317$) the inactivation kinetics of *E. coli* obtained through the different treatment systems considered (FSC-CO₂ and FSC-CO₂+HPU) on chicken breast samples immersed in DI and non-immersed samples. Regarding turkey ham samples, general Peleg Type B Model ($R^2_{\text{average}} = 0.915$; $\text{RMSE}_{\text{average}} = 0.345$) described properly FSC-CO₂ and FSC-CO₂+HPU+DI inactivation kinetics, while general Biphasic model showed a good fit ($R^2_{\text{average}} = 0.920$; $\text{RMSE}_{\text{average}} = 0.565$) of FSC-CO₂+HPU and FSC-CO₂+DI experimental inactivation kinetics of *E. coli*.

In order to assess the effect of different FSC-CO₂ and HPU treatment systems on the quality of meat samples, physical and chemical analyses (color, texture, moisture and fat) of treated meat samples were compared with control samples. Global color variation (ΔE) obtained after different treatments showed that only turkey ham samples ($\Delta E < 2.5$, in all treatments) did not produce noticeable color differences in treated vs. control samples.

Changes observed in the color of treated chicken meat samples can be attributed mainly to muscle protein denaturation. This phenomenon changes the properties of the sample surface, by modifying the ratio of absorbed and reflected light, creating a pallid color in chicken. On the other hand, the pale aspect of cured ham during the storage period may result from the increase in methemiyoglobin content.

Likewise, texture values (F_{max}) evidenced that hardness in turkey ham samples (0.76 N) did not show significant changes ($p>0.05$) for any of the applied treatments. The hardness of chicken breast (4.26 N) and cured ham samples (4.97 N) was reduced significantly ($p<0.05$) after all treatments studied, obtaining average hardness values of 3.21 N and 3.53 N for treated chicken breast and cured ham samples, respectively. Microstructure results obtained in chicken breast and cured ham samples showed the existence of fiber rupture and myofibril disorganization as well as larger intermyofibrillar spaces in treated samples, which would justify the textural changes observed.

On the other hand, in general, sample moisture in general was not affected by treatments, except for FSC-CO₂ treatment where it was reduced significantly ($p<0.05$) in chicken breast 68.29 % (w. m.) and cured ham 43.45 % (w. m.) samples compared to the control samples (75.35 and 47.36 % w. m. for chicken breast and cured ham, respectively); and with FSC-CO₂+HPU+DI treatment, which increased significantly ($p<0.05$) the moisture in turkey ham samples, from 73.44 to 76.55 % (w. m.).

Moreover, in general, fat contents were reduced by applying different FSC-CO₂ treatments in chicken breast and cured ham samples, but no changes were observed in turkey ham. These results show that CO₂ is capable to extract non-polar compounds, which can be useful to obtain healthier meat products with fat reduced content.

Finally, in order to analyze the microbiological stability of treated meat samples, using FSC-CO₂+HPU+DI treatment on chicken breast and FSC-CO₂+HPU treatments on turkey ham and cured ham, the evolution of physico-chemical and microbiological properties of treated meat samples was examined, during a 30 day refrigerated storage at 4 °C.

The results showed, in general, that color changes in the 3 treated samples during the storage period were minimal, with a $\Delta E<2$ in chicken breast and turkey ham samples after a 20 day storage. Likewise, minimal changes were observed in the textural properties in the 3 meat matrices studied, maintaining initial hardness values, 3.5 N, 0.56 N and 3.1 N for chicken breast, turkey ham and cured ham, respectively, during the whole storage period. Moisture of meat samples just after the treatment, 73.0 %, 73.0 %, and 73.0 %, respectively.

73.9 % and 44.9 % (b. h) for chicken breast, turkey ham and cured ham, respectively, remained without changes during the whole storage period. This proves that FSC-CO₂+HPU treatments selected for each sample allowed water retention stability in samples by limiting drip losses.

The pH variations were different for each sample. Regarding chicken breast, the pH at the start of the study (5.97) rose significantly ($p>0.05$) after a 30 day storage period (6.48), which could be due to degradation of muscle tissue; the pH of turkey ham samples just after the treatment (5.90) rose significantly ($p<0.05$) after 10 days (6.18), and remained without changes at the end of the storage period (30 days). No significant changes were observed in the pH of cured ham samples (5.90) during the whole storage period.

Microbiota content in meat samples, which consisted of mesophyll, psychrophilic, lactic acid bacteria, fungi and yeast, coliforms and *E. coli* was analyzed during a 30 day storage at 4 °C. Results showed that in general, at the start of the storage period (just after the treatment), meat samples treated did not show microbial growth. After a 10 day storage, chicken breast samples showed a microbial count similar slightly lower than the microbiota of the control sample; though microbial count remained growing during the whole storage period. Turkey ham samples showed a microbial count similar to control samples, after a 20 day storage period, regarding most of microorganisms studied. In general, microbiota of cured ham maintained microbial counts below the control sample during the whole storage period.

These results showed that the inactivation treatments performed on meat samples caused reversible damages to microbial cells, restoring their biological activity during cold store. This recovery period varied depending on the resistance of each microorganism to the treatment and the growth medium. Therefore, due to high salt content and low a_w in cured ham, microorganism recovery was limited compared to chicken breast where recovery was very fast.

Accordingly, the different FSC-CO₂+HPU treatments considered for each meat sample ensured affecting the viability of the microorganisms after treatment, but they do recover. In this regard, the use of vacuum or modified atmosphere packaging could be

studied in order to analyze whether under these storage conditions considered, the microbial growth was delayed or even inhibited, as observed for cured ham.

Based on the different results obtained, it can be concluded that the combined FSC-CO₂+HPU technology showed to be effective in reducing the viability of microbial population in meat samples, without excessive damage on the quality attributes, neither at the end of the treatment nor during the 20 day refrigerated storage period. The nature of the matrix was a key factor for the effects caused by the FSC-CO₂+HPU, being turkey ham the meat matrix where the treatment showed to be more effective in totally reducing the microbial population with minimal changes in quality attributes. From the 3 matrices assayed, cured ham showed the highest stability during the storage period. On the other hand, protein denaturation resulting from FSC-CO₂+HPU treatment on chicken breast samples immersed in a saline solution may be applied for the manufacturing of pre-cooked meat products.

Resumen

El cambio en el estilo de vida de los consumidores, y la creciente demanda por parte de los mismos por productos mínimamente procesados, o con periodos de cocción muy cortos, ha generado la necesidad en la industria alimentaria de ofrecer productos saludables e inoocuos, elaborados mediante tecnologías innovadoras y respetuosas con el medioambiente. En respuesta a esta necesidad, surgen las tecnologías de conservación no térmicas, que combinan diferentes factores físico-químicos de forma adecuada con el objetivo de reducir el contenido de microorganismos por debajo de un valor crítico, afectando mínimamente a la calidad del producto. En este sentido, la aplicación de CO₂ supercrítico (FSC-CO₂) es una tecnología no térmica de inactivación, respetuosa con el medioambiente, y que ha demostrado ser eficaz para reducir el contenido de microorganismos responsables del deterioro de los alimentos, con un mínimo impacto sobre las propiedades nutricionales y organolépticas de los mismos. El principal inconveniente de la inactivación mediante FSC-CO₂ es la baja velocidad de inactivación microbiana en sistemas discontinuos. Para intentar solventar este problema, varios autores han combinado el FSC-CO₂ con ultrasonidos de potencia (HPU). Esta técnica combinada, ha logrado reducir los tiempos de tratamiento y garantizar la completa inactivación microbiana en matrices alimentarias líquidas, no obstante, existen muy pocas referencias bibliográficas que evalúen la viabilidad de la combinación de estas dos tecnologías (FSC-CO₂+HPU) para aplicaciones sobre matrices sólidas.

En este contexto, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue estudiar la influencia de los HPU en procesos de inactivación microbiana mediante FSC-CO₂ sobre matrices cárnicas. Para ello, se seleccionaron tres tipos de matrices cárnicas con características diferentes, pechuga de pollo fresco, jamón de pavo (tipo fiambre cocido) y jamón curado. Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la inactivación microbiana, se seleccionó la bacteria *Escherichia coli* DH1, en fase de crecimiento tardía exponencial, como microorganismo modelo, inoculándose sobre la superficie de las muestras cárnicas. Se llevaron a cabo tratamientos de inactivación sobre las muestras cárnicas usando FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU, bajo diferentes

condiciones de presión (150 – 450 bar), temperatura (36 – 51 °C) y tiempo de tratamiento (5 – 40 min). Para analizar el efecto de la naturaleza del medio que rodea a las muestras cárnicas, los tratamientos de inactivación descritos previamente, se llevaron también a cabo en muestras de carne sumergidas en una disolución salina (DI), FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI. Posteriormente, se seleccionaron las condiciones (presión, temperatura y tiempo) de tratamiento, que en promedio, permitieron obtener una reducción en la población de *E. coli* de, al menos de 3 ciclos-log, para cada tipo de muestra. Una vez seleccionadas, éstas fueron empleadas para evaluar los cambios en las propiedades físico-químicas y microbiológicas de las muestras tras los diferentes tratamientos y durante su almacenamiento en refrigeración (30 días a 4 °C) para los mejores tratamientos en cada muestra cárnica.

Los resultados mostraron que, empleando FSC-CO₂ a diferentes condiciones de presión (150, 250, 350, y 450 bar), a temperatura constante de 41 °C y 46 °C, la presión no tuvo efecto significativo ($p>0.05$) sobre el nivel de inactivación de *E. coli* obtenido en muestras de pechuga de pollo, alcanzando una reducción promedio de 1.5 y 2.5 ciclos-log tras 40 min de tratamiento a 41 y 46 °C, respectivamente. Sin embargo, empleando jamón de pavo, un incremento en la presión de 150 a 350 bar (46 °C), supuso un aumento significativo ($p<0.05$) del nivel de inactivación de *E. coli*, alcanzando a 350 bar, la reducción total de la población (6.6 ciclos-log) tras 20 min de tratamiento. Por otra parte, las cinéticas de inactivación de *E. coli* bajo diferentes condiciones de temperatura sobre muestras de pechuga de pollo (36, 41, 46 y 51 °C; 350 bar) y jamón de pavo (41, 46 y 51 °C; 350 bar) mostraron que el aumento de la temperatura de tratamiento fue un factor determinante para incrementar de forma significativa ($p<0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli*. Empleando la máxima temperatura de tratamiento (51 °C; 350 bar), la población de *E. coli* se redujo totalmente (6.6 ciclos-log) tras 30 y 10 min de tratamiento en las muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo, respectivamente. Estos resultados indican que los mecanismos de inactivación están directamente influenciados por la naturaleza de la matriz cárnica, y en algunos casos, se precisa de tiempos de tratamiento muy largos para conseguir la reducción total de la población de *E. coli* inoculada en las muestras cárnicas.

Por ello, para intentar superar las limitaciones encontradas en el proceso de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂ en las muestras cárnicas, se llevaron a cabo las cinéticas de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU, bajo las mismas condiciones de tratamiento usadas sólo con FSC-CO₂. Además, empleando FSC-CO₂+HPU se realizaron tratamientos de inactivación de *E. coli* sobre muestras de jamón curado bajo diferentes condiciones de presión (150, 250, 350 bar), temperatura (41, 46 y 51 °C) y tiempo (5, 10, 15 min) y se usó la metodología de superficies de respuesta, con el objetivo de encontrar las condiciones de tratamiento que permitieran obtener el máximo nivel de inactivación, en el intervalo de condiciones de tratamiento seleccionado. Las condiciones de HPU (42 W ± 5 W; 24 kHz) fueron las mismas para todos los tratamientos evaluados.

La aplicación de HPU durante los tratamientos con FSC-CO₂ (FSC-CO₂+HPU), permitió obtener, en promedio, un nivel de inactivación de *E. coli* significativamente ($p < 0.05$) mayor en muestras de pechuga de pollo (2.1 ciclos-log) y jamón de pavo (3.5 ciclos-log), en comparación a las reducciones encontradas usando sólo FSC-CO₂ (1.6 y 3.1 ciclos-log para pollo y pavo, respectivamente). La presión no mostró un efecto significativo ($p > 0.05$) en el nivel de inactivación de *E. coli* sobre pechuga de pollo y jamón curado, alcanzándose una reducción promedio de 1.3 y 1.6 ciclos-log, respectivamente. Sin embargo, la temperatura aumentó significativamente ($p < 0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli* en los tres tipos de muestras cárnicas. Empleando la máxima temperatura de tratamiento (51 °C), se redujo totalmente la población de *E. coli* (6.8 ciclos-log) tras 20 y 10 min de tratamiento, en muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo, respectivamente. En muestras de jamón curado, la población se redujo 3.5 ciclos-log tras 10 min de tratamiento a 51 °C.

La temperatura del proceso, fue un factor clave para acelerar los mecanismos de inactivación propios del CO₂ en matrices sólidas, favoreciendo la difusión del CO₂ en la matriz y aumentando la fluidez de las membranas celulares, lo que permitió potenciar los mecanismos de inactivación asociados al CO₂. Sin embargo, los elevados tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar una completa inactivación, en comparación a los necesarios empleando matrices líquidas, reflejan que la naturaleza de la matriz

cárnica fue determinante en el proceso de inactivación de los microorganismos, generando un efecto protector y limitando el contacto directo del CO₂ con la membrana celular de los mismos.

Los menores niveles de inactivación sobre matrices cárnicas en comparación con líquidos como los zumos, pueden deberse al bajo contenido en agua disponible sobre la superficie de las muestras. La falta de líquido reduciría el efecto mecánico de los ultrasonidos, principalmente por la falta de cavitación en un medio formado únicamente por FSC-CO₂, lo que limitaría la microagitación ultrasónica e imposibilitaría la generación de daños directos sobre las membranas celulares producidos por la cavitación.

En este sentido, se llevaron a cabo tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU, bajo las mismas condiciones de presión, temperatura y tiempo estudiados previamente, pero sumergiendo las muestras de carne en 60 ml de una disolución salina estéril (0.9 % de NaCl w/v) (DI).

El sumergir las muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo en la DI durante los tratamientos con FSC-CO₂, no mostró un aumento significativo ($p > 0.05$) en el nivel de inactivación de *E. coli* respecto a los valores obtenidos en las muestras sin sumergir. Sin embargo, el sumergir las muestras de carne en DI durante los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU (FSC-CO₂+HPU+DI), en general, permitió reducir significativamente ($p < 0.05$) la población de *E. coli* en las matrices cárnicas, respecto al uso de solo FSC-CO₂+HPU. Por ejemplo, empleando pechuga de pollo sumergida en DI, se alcanzó la inactivación total de *E. coli* tras 10 min mediante FSC-CO₂+HPU+DI a 150 bar y 46 °C, comparado con la reducción de 3.1 ciclos-log lograda en los tratamientos sin sumergir la muestra (FSC-CO₂+HPU), bajo las mismas condiciones de tratamiento.

En general, la presión no presentó un efecto significativo ($p > 0.05$) en el nivel de inactivación obtenido mediante FSC-CO₂+HPU+DI en las tres muestras cárnicas, sin embargo, como se observó en los tratamientos anteriores, la temperatura incrementó significativamente ($p < 0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón de pavo y jamón curado. En jamón de pavo se alcanzó una reducción total de la población (6.6 ciclos-log) tras 5 min de tratamiento a 51 °C, en comparación a los 3.1 ciclos-log

reducidos a 46 °C. En las muestras de jamón curado, el nivel de inactivación obtenido tras 10 min de tratamiento aumentó de 1 a 3.3 ciclos-log, al aumentar la temperatura de 41 °C a 51 °C.

Así pues, el sumergir las muestras cárnicas en una DI mejoró el tratamiento de inactivación microbiana mediante FSC-CO₂+HPU debido fundamentalmente a los efectos mecánicos generados por los HPU en la disolución, que pueden ser atribuidos a la cavitación, a movimientos de contracción y rarefacción o a microcorrientes de alta intensidad producidas en el medio. Estos efectos aceleran la solubilización del CO₂ en la DI, su transporte hasta el interior celular y la extracción de componentes vitales. Asimismo, la cavitación puede afectar a la integridad de la membrana celular dando lugar a la inactivación de los microorganismos. En este sentido, se verificó mediante ensayos empleando papel de aluminio, que la cavitación y los efectos intensos de la agitación ultrasónica, solo se producen en los ensayos donde está presente una DI.

Se encontró un efecto sinérgico en la aplicación conjunta de FSC-CO₂ y HPU. Por ejemplo, la reducción de *E. coli* en muestras de jamón de pavo obtenida tras 30 min mediante el tratamiento combinado de FSC-CO₂+HPU+DI (150 bar, 46 °C), 6.4 ciclos-log, fue un 45 % superior a la suma de las reducciones obtenidas mediante las técnicas individuales de FSC-CO₂+DI (3.2 ciclos-log) y HPU+DI (1.2 ciclos-log).

Comparando la inactivación alcanzada en las tres muestras cárnicas bajo condiciones de tratamiento similares (250 bar, 46 °C, 10 min), se observó que en las muestras de jamón de pavo se alcanzó un nivel de inactivación promedio (3.7 ciclos-log) significativamente ($p < 0.05$) superior que el obtenido en las muestras de pechuga de pollo (2.0 ciclos-log) y jamón curado (2.5 ciclos-log) empleando FSC-CO₂ + HPU y FSC-CO₂+HPU+DI. Estos resultados reflejan el diferente grado de protección frente a la inactivación microbiana de las tres matrices cárnicas estudiadas; jamón de pavo < jamón curado < pechuga de pollo.

Se usaron diferentes modelos matemáticos para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli* sobre muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo, obtenidas mediante los distintos tratamientos de inactivación con FSC-CO₂ y HPU. Se empleó la ecuación logística de Peleg para indicar la dependencia de los parámetros de cada modelo, con

la presión y temperatura del proceso. El modelo de Weibull generalizado (incluyendo el efecto de presión y temperatura), describió adecuadamente ($R^2_{\text{promedio}} = 0.912$; $\text{RMSE}_{\text{promedio}} = 0.317$) las cinéticas de inactivación obtenidas mediante los distintos sistemas de tratamiento considerados (FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU), sobre muestras de pechuga de pollo sumergidas en DI y sin sumergir. En el caso de las muestras de jamón de pavo, el modelo de Peleg Tipo B generalizado ($R^2_{\text{promedio}} = 0.915$; $\text{RMSE}_{\text{promedio}} = 0.345$), describió adecuadamente las cinéticas de inactivación obtenidas mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU+DI, mientras que el modelo Bifásico generalizado mostró un buen ajuste ($R^2_{\text{promedio}} = 0.920$; $\text{RMSE}_{\text{promedio}} = 0.565$) de las cinéticas de inactivación obtenidas mediante FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+DI.

Para evaluar el efecto de los distintos sistemas de tratamiento mediante FSC-CO₂ y HPU sobre la calidad de las muestras cárnicas, se compararon los análisis fisicoquímicos (color, textura, humedad y grasa) de las muestras cárnicas tras su tratamiento, con las muestras control sin tratar. La variación global de color (ΔE) obtenida tras los distintos tratamientos, reveló que los mismos produjeron un cambio significativo de color en todas la muestras, excepto en las muestras de jamón de pavo ($\Delta E < 2.5$, en todos los tratamientos).

Los cambios observados en el color de las muestras de pechuga de pollo tras su tratamiento, pueden ser atribuidos principalmente a la desnaturalización de las proteínas musculares. Este fenómeno cambia las propiedades de la superficie de las muestras, modificando la proporción de la luz que es absorbida y reflejada, creando un color blanquecino en la muestra de pollo. Por otro lado, se observó un aspecto más pálido del jamón curado tras los tratamientos que puede deberse al incremento del contenido de metamioglobina.

Asimismo, los valores de textura (F_{max}) revelaron que la dureza en las muestras de jamón de pavo (0.76 N) no mostraron cambios significativos ($p > 0.05$) para ninguno de los tratamientos aplicados. La dureza de las muestras de pechuga de pollo (4.26 N) y jamón curado (4.97 N), disminuyó significativamente ($p < 0.05$) tras todos los tratamientos estudiados, obteniendo valores de dureza promedio de 3.21 N y 3.53 N para las muestras de pechuga de pollo y jamón curado, respectivamente. Los

resultados de microestructura, realizados en muestras de pechuga de pollo y jamón curado, muestran la rotura de las fibras y desorganización en las miofibrillas así como mayores espacios intermiofibrilares en las muestras tratadas, lo que justificaría los cambios texturales observados.

Por otro lado, la humedad de las muestras no se vio en general afectada por los tratamientos, excepto en el tratamiento mediante FSC-CO₂, tras el cual la humedad disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en las muestras de pechuga de pollo 68.29 % (b. h.) y jamón curado 43.45 % (b. h.), con respecto al control (75.35 y 47.36 % b. h., para pechuga de pollo y jamón curado, respectivamente); y en el tratamiento de FSC-CO₂+HPU+DI, donde la humedad de las muestras de jamón de pavo aumentó significativamente ($p < 0.05$) respecto de las muestras control pasando de 73.44 a 76.55 % b. h.

Por otra parte, en cuanto al efecto de los diferentes tratamientos sobre el porcentaje de grasa, éste se redujo en las muestras de pechuga de pollo y jamón curado, no viéndose modificado en el jamón de pavo. Estos resultados reflejan la capacidad del CO₂ para la extracción de compuestos apolares, lo que podría aprovecharse para la obtención de productos cárnicos más saludables, con contenido reducido de grasa.

Finalmente, para analizar la estabilidad de las muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI sobre pechuga de pollo y FSC-CO₂+HPU sobre jamón de pavo y jamón curado, se estudió la evolución de las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas durante 30 días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

Los resultados revelaron que, en general, las muestras tratadas tuvieron variaciones de color mínimas durante el almacenamiento, mostrando un $\Delta E < 2$ en las muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo tras 20 días de almacenamiento. Asimismo, se observaron cambios mínimos en las propiedades texturales de las tres matrices cárnicas estudiadas, manteniendo los valores iniciales de dureza (3.5 N, 0.56 N y 3.1 N, para pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado, respectivamente), durante todo el tiempo de almacenamiento. La humedad de las muestras de carne tras el tratamiento 73.0 %, 73.9 % y 44.9 % (b. h) para pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado, respectivamente, permaneció sin variaciones durante todo el

almacenamiento, lo que indica que los tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU aplicados a cada tipo de muestra, permitió una estabilidad en la retención de agua de las mismas, limitando las pérdidas por goteo.

La variación en el pH durante el almacenamiento fue distinta para cada tipo de muestra estudiada. En pechuga de pollo, el pH aumentó significativamente ($p < 0.05$) tras 30 días de almacenamiento (6.48), en comparación con el pH al inicio del estudio (5.97), lo que podría ser debido a la degradación del tejido muscular; el pH de las muestras de jamón de pavo tras el tratamiento (5.90) aumentó significativamente ($p < 0.05$) tras 10 días (6.18), y se mantuvo sin cambios hasta el final del almacenamiento (30 días). Las muestras de jamón curado no mostraron cambios significativos en el pH (5.90) durante el almacenamiento.

Se analizó el contenido de la microbiota en las muestras cárnicas constituida por mesófilos, psicrófilos, bacterias ácido-lácticas, hongos y levaduras, coliformes y *E. coli* durante los 30 días de almacenamiento a 4 °C. Los resultados mostraron que, en general, al inicio del almacenamiento (justo tras el tratamiento), las muestras cárnicas tratadas no mostraron crecimiento microbiano. Tras 10 días de almacenamiento, las muestras de pechuga de pollo tratadas mostraron un recuento microbiano similar, a la microbiota de la muestra sin tratar, continuando el aumento del recuento microbiano durante todo el tiempo de almacenamiento. En las muestras de jamón de pavo tratadas se retardó el crecimiento microbiano, respecto a la pechuga de pollo, siendo necesarios 20 días de almacenamiento para encontrar un recuento microbiano similar a las muestras sin tratar, en la mayoría de los microorganismos estudiados. En el caso del jamón curado tratado, el crecimiento de los microorganismos fue prácticamente nulo hasta los 20 días de almacenamiento.

Estos resultados mostraron que los tratamientos de inactivación aplicados sobre las muestras cárnicas, provocaron daños reversibles en las células microbianas, logrando éstas, recuperar su actividad biológica durante el almacenamiento refrigerado. El periodo de recuperación varió en función de la resistencia del propio microorganismo al tratamiento y del tipo de matriz cárnica donde se encuentra. En este sentido, el alto contenido en sales y la baja actividad de agua del jamón curado, hace que sobre esta

matriz la recuperación fuera más limitada, que en pechuga de pollo, donde la recuperación fue muy rápida.

Así pues, los distintos tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU considerados para cada muestra cárnica consiguen afectar la viabilidad de los microorganismos tras el tratamiento, pero éstos pueden recuperarse. En este sentido, debería estudiarse el uso del envasado al vacío o en atmosfera modificada, para analizar si bajo estas condiciones de almacenamiento es posible retrasar o incluso detener el crecimiento microbiano, tal y como sucede con el jamón curado.

En base a los diferentes resultados obtenidos, puede concluirse que la tecnología combinada de FSC-CO₂+HPU mostro ser eficaz para reducir la viabilidad de la población microbiana en muestras cárnicas, sin deteriorar en exceso sus atributos de calidad, ni al finalizar el tratamiento, ni durante 20 días de almacenamiento refrigerado. La naturaleza de la matriz fue un factor determinante sobre los efectos causados por el FSC-CO₂+HPU, siendo el jamón de pavo la matriz cárnica donde el tratamiento mostró ser más eficaz para reducir totalmente la población microbiana con cambios mínimos en sus atributos de calidad. De las tres matrices ensayadas, el jamón curado presentó la mayor estabilidad durante su almacenamiento. Por otro lado, la desnaturalización proteica debida al tratamiento con FSC-CO₂+HPU en muestras de pechuga de pollo sumergidas en una disolución salina, podría aplicarse a la elaboración de productos cárnicos preparados pre-cocinados.

Resum

El canvi en l'estil de vida dels consumidors i la creixent demanda per part dels mateixos per productes mínimament processats, o amb períodes de cocció molt curts, han generat la necessitat en la indústria alimentària d'oferir productes saludables i innocus, elaborats mitjançant tecnologies innovadores i respectuoses amb el medi ambient. En resposta a aquesta necessitat, surten les tecnologies de conservació no tèrmiques, que combinen diferents factors fisicoquímics de forma adequada amb l'objectiu de reduir el contingut de microorganismes per baix d'un valor crític i que afecte mínimament la qualitat del producte. Així, l'aplicació de CO₂ supercrític (FSC-CO₂) és una tecnologia no tèrmica d'inactivació respectuosa amb el medi ambient, i que ha demostrat ser eficaç per a reduir el contingut de microorganismes responsables del deteriorament dels aliments, amb un mínim impacte sobre les propietats nutritives i organolèptiques dels mateixos. El major inconvenient de la inactivació mitjançant FSC-CO₂ és la baixa velocitat d'inactivació microbiana en sistemes discontinus. Per a intentar solucionar aquest problema, diversos autors han combinat el FSC-CO₂ amb ultrasons de potència (HPU). Esta tècnica combinada ha aconseguit reduir els temps de tractament i garantir la completa inactivació microbiana en matrius alimentàries líquides, però existeixen poques referències bibliogràfiques que avaluen la viabilitat de la combinació d'aquestes dos tecnologies (FSC-CO₂+HPU) per a aplicacions sobre matrius sòlides.

En aquest context, l'objectiu principal de la present Tesi Doctoral va ser estudiar la influència dels HPU en processos d'inactivació microbiana mitjançant FSC-CO₂ sobre matrius càrnies. Per això, es van seleccionar tres tipus de matrius càrnies, amb diferents característiques, pit de pollastre, pernil de polit cuit i pernil curat. Per a avaluar l'efecte dels tractaments sobre la inactivació microbiana, es va seleccionar la bactèria *Escherichia coli* DH1, en fase de creixement tardà exponencial, com microorganisme model, fent inoculacions sobre la superfície de les mostres càrnies. Es feren tractaments d'inactivació sobre les mostres càrnies amb FSC-CO₂ i FSC-CO₂+HPU, sota diferents condicions de pressió (150-450 bar), temperatura (36-51 °C) i temps de tractament (5-4 min). Per a analitzar l'efecte de la naturalesa del medi que envolta a les matèries càrnies, els tractaments d'inactivació descrits prèviament, es

van fer també en mostres de carn submergides en una dissolució salina (DI), FSC-CO₂+HPU. Posteriorment, se seleccionaren les condicions (pressió, temperatura i temps) de tractament que van permetre obtenir una reducció en la població *E. coli* de, al menys 3 cicles-log, per a cada tipus de mostra. Una vegada seleccionades, aquestes van ser utilitzades per a avaluar el canvis en les propietats fisicoquímiques i microbiològiques de les mostres després dels diferents tractaments i durant el seu emmagatzemament en refrigeració (30 dies a 4 °C) per als millors tractaments en cada mostra càrnia.

Els resultats van mostrar que, si s'utilitza FSC-CO₂ a diferents condicions de pressió (150, 250, 350 i 450 bar), a temperatura constant de 41 °C i 46 °C, la pressió no va tindre un efecte significatiu ($p > 0.05$) sobre el nivell d'inactivació de *E. coli* obtingut en mostres de pit de pollastre, aconseguint una reducció mitjana de 1.5 i 2.5 cicles-log després de 40 min de tractament a 41 i 46 °C, respectivament. No obstant això, en utilitzar pernil de polit, un increment de la pressió de 150 a 350 bar (46 °C), va suposar un augment significatiu ($p < 0.5$) del nivell d'inactivació de *E. coli*, arribant a 350 bar, la reducció total de la població (6.6 cicles-log) després de 20 min de tractament. D'altra banda, les cinètiques d'inactivació de *E. coli* sota diferents condicions de temperatura sobre mostres de pit de pollastre (36, 41, 46 i 51 °C) i pernil de polit (41, 46, i 51 °C) van mostrar que l'augment de la temperatura de tractament van ser un factor determinant per a incrementar de forma significativa ($p < 0,05$) el nivell d'inactivació d'*E. coli*. Emprant la mateixa temperatura de tractament (51 °C; 350 bar), la població d' *E. coli* es va reduir totalment (6.6 cicles-log) després de 30 i 10 min de tractament en les mostres de pit de pollastre i pernil de polit respectivament. Aquests resultats indiquen que els mecanismes d'inactivació estan directament influenciats per la naturalesa de la matriu càrnia, i en alguns casos, fan falta temps de tractaments molts llargs per a aconseguir la reducció total de la població d' *E. coli* inoculada en les mostres càrnies.

Per això, per a intentar superar les limitacions trobades en el procés d'inactivació d' *E. coli* mitjançant FSC-CO₂ en les mostres càrnies, es van dur a terme les cinètiques d'inactivació mitjançant FSC-CO₂+HPU, sota les mateixes condicions de tractament utilitzades només amb FSC.CO₂. A més, utilitzant FSC-CO₂+HPU es van realitzar

tractaments d'inactivació d' *E. coli* sobre mostres de pernil curat sota diferents condicions de pressió (150, 250, 350 bar), temperatura (41, 46 i 51 °C) i temps (5, 10, 15 min) i es va utilitzar la metodologia de superfícies de resposta, amb l'objectiu de trobar les condicions de tractament que permeteren obtenir el màxim nivell d'inactivació, en l'interval de condicions de tractament seleccionat. Les condicions de HPU (42 W \pm 5 W; 24 kHz) van ser les mateixes per a tots els tractaments avaluats.

L'aplicació d'HPU durant els tractaments amb FSC-CO₂ (FSC-CO₂+HPU), va permetre obtenir, com a mitjana, un nivell d'inactivació d' *E. coli* significativament ($p < 0,05$) major en mostres de pit de pollastre (2.1 cicles-log) i pernil de polit (3.5 cicles-log), en comparació a les reduccions trobades utilitzant només FSC-CO₂ (1.6 i 3.1 cicles-log per a pollastre i polit respectivament). La pressió no va mostrar un efecte significatiu ($p > 0,05$) en el nivell d'inactivació d' *E. coli* sobre pit de pollastre i pernil curat, aconseguint-se una reducció mitjana de 1.3 i 1.6 cicles-log, respectivament. No obstant això, la temperatura va augmentar significativament ($p < 0,5$) el nivell d'inactivació d' *E. coli* en els tres tipus de mostres càrnies. En utilitzar la màxima temperatura de tractament (51 °C), es va reduir totalment la població d' *E. coli* (6.8 cicles-log) després de 20 i 10 min de tractament, en mostres de pit de pollastre i pernil de polit, respectivament. En mostres de pernil curat, la població es va reduir 3.5 cicles-log després de 10 min de tractament a 51 °C.

La temperatura del procés, va ser un factor clau per a accelerar els mecanismes d'inactivació propis del CO₂ en matrius sòlides, afavorint la difusió del CO₂ en la matriu i augmentant la fluïdesa de les membranes cel·lulars, la qual cosa va permetre potenciar els mecanismes d'inactivació associats al CO₂. No obstant això, els elevats temps de tractament necessaris per a aconseguir una completa inactivació, en comparació als necessaris emprant matrius líquides, reflectixen que la naturalesa de la matriu càrnia va ser determinant en el procés d'inactivació dels microorganismes, generant un efecte protector i limitant el contacte directe del CO₂ amb la membrana cel·lular dels mateixos.

Els menors nivells d'inactivació sobre matrius càrnies en comparació amb líquids com els suc, poden deure's al baix contingut en aigua disponible sobre la superfície de les mostres. La falta de líquid reduiria l'efecte mecànic dels ultrasons, principalment per

la falta de cavitació en un mitjà format únicament per FSC-CO₂, la qual cosa limitaria la microagitació ultrasònica i impossibilitaria la generació de danys directes sobre les membranes cel·lulars produïts per la cavitació.

En este sentit, es van dur a terme tractaments d'inactivació per mitjà de FSC-CO₂ i FSC-CO₂+HPU, davall les mateixes condicions de pressió, temperatura i temps estudiats prèviament, però submergint les mostres de carn en 60 ml d'una dissolució salina estèril (0.9 % de NaCl w/v) (DI).

El submergir les mostres de pit de pollastre i pernil de titot en la DI durant els tractaments amb FSC-CO₂, no va mostrar un augment significatiu ($p > 0.05$) en el nivell d'inactivació de *E. coli* respecte als valors obtinguts en les mostres sense submergir. No obstant això, el submergir les mostres de carn en DI durant els tractaments d'inactivació per mitjà de FSC-CO₂+HPU (FSC-CO₂+HPU+DI), en general, va permetre reduir significativament ($p < 0.05$) la població de *E. coli* en les matrius càrnies, respecte a l'ús de només FSC-CO₂+HPU. Per exemple, emprant pit de pollastre submergida en DI, es va aconseguir la inactivació total de *E. coli* després de 10 min per mitjà de FSC-CO₂+HPU+DI a 150 bar i 46 °C, comparat amb la reducció de 3.1 cicles-log aconseguida en els tractaments sense submergir la mostra (FSC-CO₂+HPU), davall les mateixes condicions de tractament.

En general, la pressió no va presentar un efecte significatiu ($p > 0.05$) en el nivell d'inactivació obtingut per mitjà de FSC-CO₂+HPU+DI en les tres mostres càrnies, no obstant això, com es va observar en els tractaments anteriors, la temperatura va incrementar significativament ($p < 0.05$) el nivell d'inactivació de *E. coli* en mostres de pernil de titot i pernil curat. En pernil de titot es va aconseguir una reducció total de la població (6.6 cicles-log) després de 5 min de tractament a 51 °C, en comparació als 3.1 cicles-log reduïts a 46 °C. En les mostres de pernil curat, el nivell d'inactivació obtingut després de 10 min de tractament va augmentar d'1 a 3.3 cicles-log, a l'augmentar la temperatura de 41 °C a 51 °C.

Així, doncs, el submergir les mostres càrnies en una DI va millorar el tractament d'inactivació microbiana per mitjà de FSC-CO₂+HPU degut fonamentalment als efectes mecànics generats pels HPU en la dissolució, que poden ser atribuïts a la cavitació, a moviments de contracció i rarefacció o a microcorrents d'alta intensitat produïdes en el mig. Estos efectes acceleren la solubilització del CO₂ en la DI, el seu transport fins a l'interior cel·lular i l'extracció de components vitals. Així mateix, la cavitació pot afectar la integritat de la membrana cel·lular donant lloc a la inactivació dels microorganismes. En este sentit, es va verificar per mitjà d'assajos emprant paper d'alumini, que la cavitació i els efectes intensos de l'agitació ultrasònica, només es produïxen en els assajos on està present una DI.

Es va trobar un efecte sinèrgic en l'aplicació conjunta de FSC-CO₂ i HPU. Per exemple, la reducció de *E. coli* en mostres de pernil de titot obtinguda després de 30 min per mitjà del tractament combinat de FSC-CO₂+HPU+DI (150 bar, 46 °C), 6.4 cicles-log, va ser un 45 % superior a la suma de les reduccions obtingudes per mitjà de les tècniques individuals de FSC-CO₂+DI (3.2 cicles-log) i HPU+DI (1.2 cicles-log).

Comparant la inactivació aconseguida en les tres mostres càrnies baix condicions de tractament semblants (250 bar, 46 °C, 10 min), es va observar que en les mostres de pernil de titot es va aconseguir un nivell d'inactivació mitjana (3.7 cicles-log) significativament ($p < 0.05$) superior que el obtesn en les mostres de pit de pollastre (2.0 cicles-log) y pernil curat (2.5 cicles-log) empleando FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+HPU+DI. Els resultats reflecteixen el diferent grau de protecció enfront de la inactivació microbiana de les tres matrius càrnies estudiades; pernil de titot <pernil curat < pit de pollastre.

Es van usar diferents models matemàtics per a descriure les cinètiques d'inactivació de *E. coli* sobre mostres de pit de pollastre i pernil de titot, obtingudes per mitjà dels distints tractaments d'inactivació amb FSC-CO₂ i HPU. Es va emprar l'equació logística de Peleg per a indicar la dependència dels paràmetres de cada model, amb la pressió i temperatura del procés. El model de Weibull generalitzat (incloent l'efecte de pressió i temperatura), va descriure adequadament ($R^2_{\text{promedio}} = 0.912$; $RMSE_{\text{promedio}} = 0.317$) les

cinètiques d'inactivació obtingudes per mitjà dels distints sistemes de tractament considerats (FSC-CO₂ i FSC-CO₂+HPU), sobre mostres de pit de pollastre submergides en DI i sense submergir. En el cas de les mostres de pernil de titot, el model de Peleg Tipus B generalitzat ($R^2_{\text{promedio}} = 0.915$; $\text{RMSE}_{\text{promedio}} = 0.345$), va descriure adequadament les cinètiques d'inactivació obtingudes per mitjà de FSC-CO₂ i FSC-CO₂+HPU+DI, mentre que el model Bifàsic generalitzat va mostrar un bon ajust ($R^2_{\text{promedio}} = 0.920$; $\text{RMSE}_{\text{promedio}} = 0.565$) de les cinètiques d'inactivació obtingudes per mitjà de FSC-CO₂+HPU i FSC-CO₂+DI.

Per a avaluar l'efecte dels distints sistemes de tractament per mitjà de FSC-CO₂ i HPU sobre la qualitat de les mostres càrnies, es van comparar els anàlisis fisicoquímics (color, textura, humitat i greix) de les mostres càrnies després del seu tractament, amb les mostres control sense tractar. La variació global de color (ΔE) obtinguda després dels distints tractaments, va revelar que els mateixos van produir un canvi significatiu de color en totes la mostres, excepte en les mostres de pernil de titot ($\Delta E < 2.5$, en tots els tractaments).

Els canvis observats en el color de les mostres càrnies després del seu tractament, poden ser atribuïts principalment a la desnaturalització de les proteïnes musculars. Este fenomen canvia les propietats de la superfície de les mostres, modificant la proporció de la llum que és absorbida i reflectida, creant un color blanquinós en la mostra de pollastre. D'altra banda, es va observar un aspecte més pàl·lid del pernil curat després dels tractaments que es pot deure a l'increment en la proporció de metamioglobina.

Així mateix, els valors de textura (Fmax) van revelar que la duresa en les mostres de pernil de titot (0.76 N) no van mostrar canvis significatius ($p < 0.05$) per a cap dels tractaments aplicats. La duresa de les mostres de pit de pollastre (4.26 N) i pernil curat (4.97 N), va disminuir significativament ($p < 0.05$) després de tots els tractaments estudiats, obtenint valors de duresa mitjana de 3.21 N i 3.53 N per a les mostres de pit de pollastre i pernil curat, respectivament. Els resultats de microestructura, realitzats en mostres de pit de pollastre i pernil curat, mostren trencament de les fibres i

desorganització en les miofibril·les així com majors espais intermiofibril·lars en les mostres tractades, la qual cosa justificaria els canvis observats.

D'altra banda, la humitat de les mostres no es va veure en general afectada pels tractaments, excepte en el tractament per mitjà de FSC-CO₂, després del qual la humitat va disminuir significativament ($p < 0.05$) en les mostres de pit de pollastre 68.29 % (b. h.) i pernil curat 43.45 % (b. h.), respecte al control (75.35 i 47.36 % b. h., per a pit de pollastre i pernil curat, respectivament); i en el tractament de FSC-CO₂+HPU+DI, on la humitat de les mostres de pernil de titot va augmentar significativament ($p < 0.05$) respecte de les mostres control passant de 73.44 a 76.55 % b. h.

D'altra banda, quant a l'efecte dels diferents tractaments sobre el percentatge de greix, este es va reduir en les mostres de pit de pollastre i pernil curat, no veient-se modificat en el pernil de titot. Estos resultats reflectixen la capacitat del CO₂ per a l'extracció de compostos apolars, la qual cosa podria aprofitar-se per a l'obtenció de productes carnis més sans, amb contingut reduït de greix.

Finalment, per a analitzar l'estabilitat de les mostres tractades per mitjà de FSC-CO₂+HPU+DI sobre pit de pollastre i FSC-CO₂+HPU sobre pernil de titot i pernil curat, es va estudiar l'evolució de les propietats fisicoquímiques i microbiològiques durant 30 dies d'emmagatzemament en refrigeració a 4 °C.

Els resultats van revelar que, en general, les mostres tractades van tindre variacions de color mínimes durant l'emmagatzemament, mostrant un $\Delta E < 2$ en les mostres de pit de pollastre i pernil de titot després de 20 dies d'emmagatzemament. Així mateix, es van observar canvis mínims en les propietats texturals de les tres matrius càrnies estudiades, mantenint els valors inicials de duresa (3.5 N, 0.56 N i 3.1 N, per a pit de pollastre, pernil de titot i pernil curat, respectivament), durant tot el temps d'emmagatzemament. La humitat de les mostres de carn després del tractament (73.0 %, 73.9 % i 44.9 % (b. h) per a pit de pollastre, pernil de titot i pernil curat, respectivament), va romandre sense variacions durant tot l'emmagatzemament, la qual cosa indica que els tractaments per mitjà de FSC-CO₂+HPU aplicats a cada tipus

de mostra, va permetre una estabilitat en la retenció d'aigua de les mateixes, limitant les perdudes per goteig.

La variació en el pH durant l'emmagatzemament va ser distinta per a cada tipus de mostra estudiada. En pit de pollastre, el pH va augmentar significativament ($p < 0.05$) després de 30 dies d'emmagatzemament (6.48), en comparació amb el pH a l'inici de l'estudi (5.97), la qual cosa podria ser degut a la degradació del teixit muscular; el pH de les mostres de pernil de titot després del tractament (5.90) va augmentar significativament ($p < 0.05$) després de 10 dies (6.18), i es va mantindre sense canvis fins al final de l'emmagatzemament (30 dies). Les mostres de pernil curat no van mostrar canvis significatius en el pH (5.90) durant l'emmagatzemament.

Es va analitzar el contingut de la microbiota en les mostres càrnies constituïda per mesòfils, psicròfils, bacteris àcids-làctics, fongs i rents, coliformes i *E. coli* durant els 30 dies d'emmagatzemament a 4 °C. Els resultats van mostrar que, en general, a l'inici de l'emmagatzemament (just després del tractament), les mostres càrnies tractades no van mostrar creixement microbià. Després de 10 dies d'emmagatzemament, les mostres de pit de pollastre tractades van mostrar un recompte microbià semblant a la microbiota de la mostra sense tractar, continuant l'augment del recompte microbià durant tot el temps d'emmagatzemament. En les mostres de pernil de titot tractades es va retardar el creixement microbià, respecte al pit de pollastre, sent necessaris 20 dies d'emmagatzemament per a trobar un recompte microbià semblant a les mostres sense tractar, en la majoria dels microorganismes estudiats. En el cas del pernil curat tractat, el creixement dels microorganismes va ser pràcticament nul fins als 20 dies d'emmagatzemament.

Estos resultats van mostrar que els tractaments d'inactivació aplicats sobre les mostres càrnies, van provocar danys reversibles en les cèl·lules microbianes, aconseguint estes, recuperar la seua activitat biològica durant l'emmagatzemament refrigerat. El període de recuperació va variar en funció de la resistència del propi microorganisme al tractament i del tipus de matriu càrnia on es troba. En este sentit, l'alt contingut en sals i la baixa activitat d'aigua del pernil curat, fa que sobre esta

matriu la recuperació fóra més limitada, que en pit de pollastre, on la recuperació va ser molt ràpida.

Així, doncs, els distints tractaments per mitjà de FSC-CO₂+HPU considerats per a cada mostra càrnia aconseguixen afectar la viabilitat dels microorganismes després del tractament, però estos poden recuperar-se. En este sentit, hauria d'estudiar-se l'ús de l'envasament al buit o en atmosfera modificada, per a analitzar si davall estes condicions d'emmagatzemament és possible retardar o inclús detindre el creixement microbià, tal com succeïx amb el pernil curat.

Sobre la base dels diferents resultats obtinguts, pot concloure's que la tecnologia combinada de FSC-CO₂+HPU va mostrar ser eficaç per a reduir la viabilitat de la població microbiana en mostres càrnies, sense deteriorar en excés els seus atributs de qualitat, ni en finalitzar el tractament, ni durant 20 dies d'emmagatzematge refrigerat. La naturalesa de la matriu va ser un factor determinant sobre els efectes causats pel FSC-CO₂+HPU, sent el pernil de pit la matriu càrnia on el tractament va mostrar ser més eficaç per a reduir totalment la població microbiana amb canvis mínims en els seus atributs de qualitat. De les tres matrius assajades, el pernil curat va presentar la major estabilitat durant el seu emmagatzematge. D'altra banda, la desnaturalització proteica deguda al tractament amb FSC-CO₂+HPU en mostres de pit de pollastre submergides en una dissolució salina, podria aplicar-se a l'elaboració de productes càrnics preparats precuinats.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Seguridad alimentaria

La mejora de la competitividad de la industria alimentaria se basa en primer lugar, en la oferta de productos saludables e inofensivos elaborados mediante tecnologías respetuosas con el ambiente; en segundo lugar, en la oferta de productos con una calidad diferenciada a través de la transparencia y control de los procesos mediante su trazabilidad; y en tercer lugar, en la adaptación a la demanda, lo cual permitirá replantear los modelos productivos y métodos de autocontrol que permitan garantizar la seguridad alimentaria (Bello, 2008).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), a través de la Cumbre Mundial sobre la Alimentación (CMA), reconoció el vínculo intrínseco que existe entre seguridad alimentaria y el control de la calidad e inocuidad de los alimentos. Sólo existe seguridad alimentaria cuando todas las personas tienen en todo momento acceso físico y económico a suficientes alimentos inocuos y nutritivos para satisfacer sus necesidades alimentarias y sus preferencias al respecto a fin de llevar una vida activa y sana. Por otra parte, la producción de alimentos inofensivos entraña la ausencia, o niveles aceptables, de contaminantes, adulterantes, toxinas o cualquier otra sustancia que pueda hacer nocivo el alimento, y provocar problemas de salud con carácter agudo o crónico. Así, la inocuidad de los alimentos, es un requisito básico de la calidad de los mismos y el consumo de alimentos que no cumplen las normas mínimas de inocuidad pueden también poner en peligro esa seguridad alimentaria (FAO, 2006).

Por otra parte, las proyecciones realizadas entre 1996 y 2020, indicaron un aumento del 31 % de la población mundial, particularmente de la población urbana, por tanto, las necesidades y las preferencias en el consumo de alimentos ha cambiado notablemente en la última década (Hugas y col., 2002). El cambio de estilo de vida acentúa también el riesgo de contaminación alimentaria en la vida diaria; las nuevas formas de cocinar con periodos de cocción muy cortos, así como la tendencia de consumir alimentos crudos, mínimamente procesados y congelados, contribuyen en

gran medida al aumento del riesgo alimentario. De hecho, la creciente demanda por productos mínimamente procesados o bien, listos para el consumo (RTE) ha reconducido el desarrollo de tratamientos de post-procesado menos severos, que permiten desarrollar nuevos alimentos que sean sanos y seguros sin comprometer los atributos de apariencia, sabor y frescor que garanticen su calidad.

El acceso a alimentos de buena calidad, ha sido objetivo principal del hombre del siglo XX, por lo tanto, en las últimas décadas la industria alimentaria se ha preocupado por asegurar la calidad e inocuidad de los alimentos, partiendo de su producción en el campo, el almacenamiento, procesamiento y la distribución, así como de buscar alternativas de procesamiento y conservación de alimentos que garanticen su estabilidad.

1.2. Tecnologías tradicionales de conservación

La conservación de alimentos es una actividad realizada por el hombre desde el inicio de su existencia. Las técnicas de secado y salado de carne, fueron las primeras tecnologías de conservación usadas que surgieron por la necesidad de conservar la carne obtenida tras la caza de animales. Posteriormente, la tecnología de conservación de alimentos continuó con el descubrimiento de Nicolás Appert, a principios del siglo XIX. Con el tiempo, este procedimiento empírico se fue perfeccionando hasta convertirse en una auténtica tecnología de conservación por calor, dando lugar a las conservas esterilizadas térmicamente que se conocen hasta la fecha, aplicadas más ampliamente en alimentos de origen vegetal, las cuales mantienen su conservación durante largos períodos de tiempo gracias a la destrucción de los microorganismos responsables de su alteración y a la protección que los envases herméticamente cerrados le confieren frente a posibles contaminaciones posteriores.

Las tecnologías de conservación aplicadas en productos cárnicos pretenden mantener una serie de condiciones que impidan el crecimiento de microorganismos patógenos y que retrasen al máximo el crecimiento de microorganismos responsables del deterioro de dichos productos. En los productos cárnicos crudos, destacan las tecnologías de fermentación (Ricke y col., 2007), secado (Nummer y col., 2004) y

salado (Ozuna y col., 2013), las cuales inducen los cambios necesarios para estabilizar el producto y obtener propiedades organolépticas características y una seguridad sanitaria satisfactoria. Sin embargo, en todos ellos pueden existir alteraciones que suponen, en muchos casos, pérdidas de calidad sensorial, como el reblandecimiento o endurecimiento del producto, cambios significativos en la apariencia y sabor original del alimento fresco, y en otros casos, pérdidas en la calidad nutritiva, principalmente de vitaminas (Hugas y col., 2002).

Por otra parte, en los productos cárnicos tratados por calor, el objetivo principal del tratamiento es eliminar los microorganismos e inactivar enzimas presentes en la carne, para garantizar la calidad y seguridad de estos productos, pero como contrapartida, el tratamiento modifica drásticamente las propiedades organolépticas.

Por lo anterior, y debido a la creciente demanda de productos de mayor calidad y mínimamente procesados, con un uso mínimo de conservantes y listos para su consumo, se han desarrollado tecnologías de transformación, conservación y envasado menos severas que aseguren la calidad higiénica y la seguridad del alimento, sin afectar a las propiedades organolépticas más apreciadas en los mismos.

1.3. Tecnologías emergentes no térmicas de conservación en la industria alimentaria

El principio de aplicación de las nuevas tecnologías se basa en combinar factores de conservación físicos y químicos de una forma adecuada, con el objetivo principal de inactivar microorganismos o reducir la presencia de éstos en los alimentos por debajo de un valor crítico para extender la vida útil de los mismos (García-González y col., 2010; Ferrentino y Spilimbergo, 2011). Incluso en algunos casos, la combinación de tecnologías, ha sido útil para mejorar el efecto sobre la inactivación, proporcionando mejores características en el producto final (Barbosa y Bermúdez, 2010).

Como tecnologías no térmicas se puede citar, entre otras, las radiaciones ionizantes (Kanatt y col., 2005); irradiación y pulsos de luz (Bendicho y col., 2002); altas presiones hidrostáticas (Knorr y col., 2002); campos eléctricos pulsados (Barbosa y

Bermúdez 2010); ultrasonidos (Piyasena y col., 2003) y fluidos supercríticos (Ortuño y col., 2014a).

La radiación ionizante es una tecnología emergente que garantiza la seguridad microbiológica de la carne y productos cárnicos, prolongando su vida útil (Kanatt y col., 2005). Dicha técnica se ha aplicado principalmente para el transporte de carne en ultramar, la cual suele almacenarse a temperaturas superiores a la de congelación. Sin embargo, uno de los inconvenientes más importantes de irradiar la carne es la falta de control en la dosificación, y el incremento heterogéneo de la temperatura de la carne (Gómez y col., 2007), lo cual puede producir algunos cambios indeseables en el tejido muscular y generar radicales libres que pueden inducir peroxidación lipídica y alteración de color y olor (Kanatt y col., 2005; Brewer, 2009). Los ejemplos más importantes de esta técnica son la radiación gamma y el haz de electrones. También es una técnica usada comúnmente para inhibir la germinación de vegetales y extender la vida útil de los productos comercializados en fresco; además es una técnica prometedora para el control de microorganismos patógenos como *Listeria monocytogenes*, *Salmonella spp.* o *Escherichia coli*, entre otros (Brewer, 2009), así como la eliminación de los insectos en alimentos y los materiales de envasado (Kanatt y col., 2005). Sin embargo, su uso en carnes está limitado debido a cambios de aroma, color, y sabor, principalmente causados por la formación de metamioglobina durante la exposición a dosis altas de radiación (>10 kGy), produciendo un cambio de coloración en la carne fresca (Brewer, 2009).

La aplicación de radiación ultravioleta (UV) o luz pulsada (PL), es una técnica que consiste en la emisión de destellos de luz, en un ancho de banda entre 200 y 1000 nm. Es usada principalmente para la descontaminación de superficies y fue aprobada por la Food and Drug Administration (FDA) para mejorar la calidad y seguridad de productos cárnicos cocidos “listos para consumo” (RTE) (Hierro y col., 2011).

Otra técnica de conservación no térmica son los campos eléctricos pulsados (Pulsed electric fields; PEF). Esta tecnología consiste en la aplicación de campos eléctricos de alta intensidad, generalmente en un intervalo de 20 a 80 kV/cm, aplicados en forma de pulsos cortos (μ s) en un alimento que es colocado entre dos electrodos (Señorans y

col, 2003). Dicha tecnología ha sido ampliamente estudiada en el procesamiento de alimentos líquidos, como son zumos y leche, en los cuales se han obtenido resultados prometedores, ya que además de inactivar totalmente los microorganismos patógenos presentes (*Penicillium expansum*) y sus formas esporuladas, permite también inactivar las enzimas existentes (Evrendilek y col., 2008). Sin embargo, la principal desventaja de dicha tecnología sobre su aplicación en alimentos sólidos, es la falta de efectividad para la inactivación total de los microorganismos presentes, y su limitación a alimentos con dimensiones reducidas que puedan ser colocados entre los electrodos. Por tanto, no ha sido empleada en productos cárnicos ni a escala industrial.

Por otra parte, la tecnología de altas presiones (High Pressure Processing: HPP) está considerada como una de las tecnologías más prometedoras para la conservación de alimentos y ha sido empleada como tratamiento de conservación en alimentos ya comercializados como mermeladas, concentrados de purés de fruta o productos cárnicos cocidos o crudo-curados, loncheados y listos para consumo (Fuentes y col., 2010). El poder de inactivación asociado a las HPP se debe a la modificación de la estructura celular de los microorganismos por el efecto de la presión, que les hace perder su viabilidad (Renduales y col., 2011), de ahí que las HPP presenten mayor efectividad en microorganismos con un elevado grado de organización celular. No obstante, los tratamientos de HPP pueden inducir efectos especiales en la textura y estructura de un determinado alimento. Sin embargo, estos cambios pueden ser utilizados para el desarrollo de nuevos productos o para aumentar la funcionalidad de algunos ingredientes (Hugas y col., 2002). Su principal desventaja reside en los elevados costes del equipamiento empleado.

Otras tecnologías de conservación no térmica que han mostrado resultados prometedores en la inactivación, son los fluidos supercríticos (FSC), en particular el CO₂ supercrítico (FSC-CO₂), y los ultrasonidos de alta intensidad (High Power Ultrasound; HPU).

El FSC-CO₂ ha sido empleado para inactivar un gran número de microorganismos, desde bacterias gram-negativas como la *Salmonella typhimurium*, *E. coli* o *Yersinia enterocolitica*, hasta bacterias gram-positivas como *Listeria innocua*, *Listeria*

monocytogenes, levaduras y hongos (García González y col., 2007; Corrandi y Peleg, 2012). Sin embargo, para conseguir niveles de esterilización aceptables, son necesarios tiempos de tratamiento excesivamente largos, y condiciones de presión y temperatura extremas, que podrían producir alteraciones indeseables en los alimentos.

Por otro lado, los HPU han sido empleados en múltiples aplicaciones en la tecnología de alimentos como salado de carne (Siró y col., 2009; Ozuna y col., 2013) y queso (Sánchez y col., 2000), la deshidratación de vegetales (Cárcel y col., 2007; Ozuna y col., 2014a) y en procesos de extracción (Riera y col., 2010; Esclapez y col., 2011; Ahmad-Qasem y col., 2013; Rodríguez y col., 2014). Además los HPU se han empleado para procesos de inactivación microbiana, pero normalmente se requieren intensidades muy elevadas para alcanzar niveles de inactivación aceptables (Piyasena y col., 2003), lo que puede generar sobrecalentamiento de los alimentos, alterando sus propiedades nutricionales y organolépticas.

En este sentido, con el objetivo de superar las limitaciones asociadas al FSC-CO₂ y los HPU, Ortuño y col. (2012b) desarrollaron la combinación de estas dos tecnologías (FSC-CO₂+HPU) con resultados prometedores, particularmente como método de conservación en matrices alimentarias líquidas (Ortuño y col., 2012b, 2013a, 2014a, 2014b).

Asimismo, la efectividad de esta tecnología combinada de inactivación (FSC-CO₂+HPU) ha sido estudiada recientemente, sobre matrices sólidas. Spilimbergo y col. (2014) y Ferrentino y Spilimbergo (2015) observaron un efecto sinérgico de aplicar HPU al tratamiento de FSC-CO₂ sobre la inactivación de *L. monocytogenes* y *E. coli* en muestras de jamón curado y microbiota en zanahoria. En ambos trabajos la aplicación de FSC-CO₂+HPU disminuyó significativamente el tiempo necesario para lograr la inactivación total de la población microbiana en las muestras, en comparación con el tiempo necesario mediante sólo FSC-CO₂.

A continuación se describen ambas técnicas individualmente y en combinación con otras tecnologías no térmicas.

1.4. Fluidos supercríticos: CO₂ Supercrítico

La tecnología de fluidos supercríticos es una de las tecnologías emergentes que surge dado el creciente interés de la industria alimentaria, por el uso de nuevos procesos de conservación que minimicen la alteración de los alimentos, garantizando su estabilidad microbiológica, buscando además que sean procesos respetuosos con el medio ambiente.

1.4.1. Definición de fluido supercrítico: CO₂ Supercrítico

El fluido supercrítico es cualquier sustancia que se encuentra en unas condiciones de presión y temperatura superiores a las de su punto crítico. El fluido más empleado es el CO₂ debido a que no es tóxico, no es corrosivo ni inflamable, presenta un bajo coste y se elimina fácilmente de la matriz donde es empleado.

La Figura 1.1 muestra que, dependiendo de la temperatura y presión del CO₂, este puede estar en fase líquida, sólida, gaseosa o en fase supercrítica. En principio se observa que a una temperatura de -78.5°C, la presión de vapor del CO₂ en estado sólido es 1.01 bar, y que a presión ambiente, la fase líquida no es estable, así que el sólido se sublima a dicha temperatura, provocando un sólido llamado “hielo seco” (Ferrentino y col., 2012c). El punto triple se encuentra bajo una presión de 5.25 bar y a -56.4°C. Finalmente, la línea de ebullición que separa la región gaseosa de la líquida, culmina en el punto crítico.

La región comprendida por debajo del punto crítico, es llamada comúnmente por algunos autores “fase densa del dióxido de carbono” (DPCD); se usa para indicar que el CO₂ supercrítico se mantiene en un estado de “fluido” y tiene la característica de ser más denso con respecto al CO₂ gaseoso (Erkmen, 2012).

Este término fue usado por Fraser (1951) y Foster (1962), pero no fue hasta los años 80's, que se estudió el dióxido de carbono en estado supercrítico (FSC-CO₂), como una técnica de pasteurización no térmica en matrices líquidas tales como soluciones y medios de crecimiento artificiales; y a partir de los 90's se usó como técnica de

inactivación de formas vegetativas y esporas bacterianas en alimentos reales a temperaturas y presiones moderadas (Hong y Pyun, 1999; Liao y col., 2007)

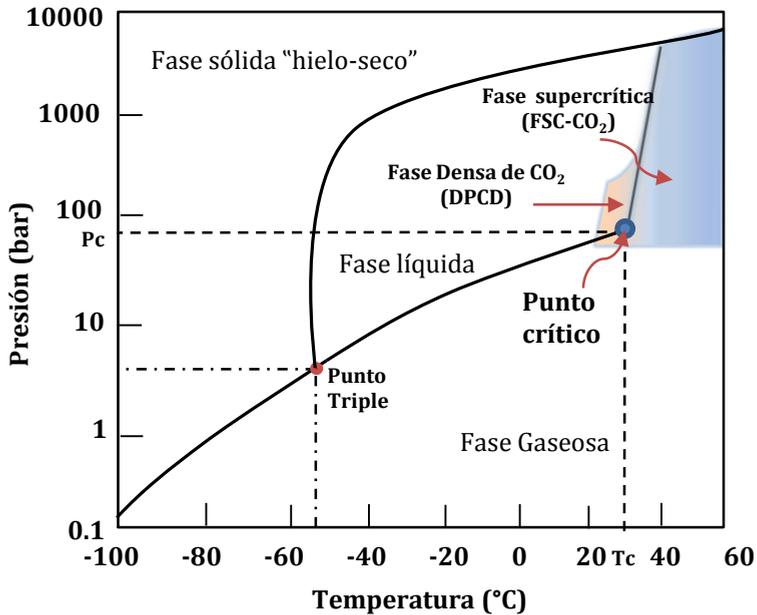


Figura 1.1. Diagrama de fases del CO₂

1.4.2. Propiedades fisicoquímicas de los FSC-CO₂

El uso de FSC-CO₂, ha sido estudiado ampliamente como solvente en procesos de extracción, el cual representa grandes ventajas sobre otros compuestos (Tabla 1.1.): es barato (con respecto del hexafluoruro y los otros hidrocarburos), por lo tanto es susceptible de ser usado a escala industrial; es inerte (no reacciona con polímeros) y es atóxico, a diferencia de los hidrocarburos halogenados que pueden alterar el medioambiente y la salud pública; no es inflamable y, es fácil obtenerlo con alta pureza sin dejar residuos cuando se retira del proceso donde es aplicado (Spilimbergo y col., 2003; Riera y col., 2010); además en proceso extractivos, ha sido considerado un solvente GRAS (generalmente reconocido como seguro), lo cual quiere decir que puede ser usado con seguridad en productos alimentarios (Ferrentino y Spilimbergo, 2011; Erkmen, 2012).

Tabla 1.1 Propiedades críticas de los algunos solventes usados en procesos de extracción y gases empleados en procesos de inactivación a alta-presión (Sanders, 1993; Erkmen, 2012)

Aplicación	Compuesto	Temperatura (°C)	Presión (bar)	Densidad (kg/m ³)
Solventes en procesos de extracción	Eteno	9.9	51.1	200
	Trifluoruro metano	25.9	47.4	520
	Clorotrifluoruro	28.8	39.4	580
	Metano			
	Etano	32.2	48.7	200
	Dióxido de nitrógeno	36.5	72.4	460
	Hexafluoruro de Azufre	45.6	38.1	730
	Propeno	91.9	45.8	220
	n-Propano	96.8	42.8	220
Extracción e inactivación	Dióxido de carbono	31.05	73.629	470
Gases a alta presión en procesos de inactivación	Argón	-122.3	49.1	540
	Nitrógeno	-147.0	33.9	310
	Óxido nitroso	36.42	72.5	450

El CO₂ en condiciones de presión y temperatura por encima de la presión (P_c) y temperatura (T_c) críticas, existe en una sola fase: tiene la capacidad de difundirse a través de los sólidos como un gas, y de solubilizarse como un líquido (García-González, 2007). Así que el uso y la eficiencia de los procesos en los que se aplique dependerán directamente de sus propiedades fisicoquímicas, directamente ligadas a las condiciones de presión y temperatura.

En la Tabla 1.2, se presentan el intervalo de valores de densidad, viscosidad y difusividad para el CO₂ en estado gaseoso, líquido o supercrítico. En la fase supercrítica, el CO₂ tiene propiedades de transporte favorables para ser aplicado en los procesos de extracción. Su densidad, que es de 100 a 1000 veces mayor que en estado gaseoso y cercana a los líquidos (Esclapez y col., 2011), lo que le confiere un

alto poder de disolución. Además, su viscosidad cercana a la de los gases, y la difusividad de 10 a 100 veces superior a los líquidos y una tensión superficial nula, son características que le confieren mayor facilidad para difundirse a través de una matriz alimentaria, solubilizar los solutos o compuestos de interés y extraerlos con mayor eficiencia que cualquier otro solvente (García-González y col., 2007). Por otro lado, gracias a su baja polaridad, tiene la capacidad de extraer selectivamente compuestos con estructuras químicas similares a los extraídos con solventes convencionales (Herrero y col., 2006).

Tabla 1.2 Propiedades físico-químicas del CO₂ (Koutchma y Murakami 2005)

Estado	Densidad (g/cm³)	Viscosidad (g/cm·s)	Difusividad (cm²/s)
Gas	0.02	0.01	0.01
Fluido supercrítico P=P _C = 71.4 bar T=T _C = 31.1 °C	0.47	0.02-0.12	0.0001
Líquido	1.0	1.0	0.00001

La ventaja adicional de trabajar con el CO₂ en fase supercrítica, es que es posible cambiar estas propiedades con pequeños cambios de presión y temperatura. Un aumento en la presión, puede aumentar la solubilidad. Un incremento en la temperatura, aunque disminuye la solubilidad, provoca una disminución en la densidad y aumenta la presión de vapor del soluto en el que se aplica, favoreciéndose el proceso de extracción. Por otro lado, reduce la temperatura de transición vítrea (T_g) y de fusión (T_m) de compuestos saturados con este gas, proporcionando una ventaja por su acción plastificante o fundente natural (Dillow y col., 1999).

Por lo tanto, los fluidos supercríticos y en particular el FSC-CO₂ tienen propiedades de transporte muy favorables que los hacen adecuados en distintos procesos, proporcionando numerosas ventajas tanto tecnológicas como medioambientales: procesos de extracción de productos naturales como pigmentos, aceites, grasas y principios activos (Riera y col., 2010; Rodríguez y col., 2014); en procesos de

separación y fraccionamiento de mezclas (Brunner, 2005); microionización, cristalización u obtención de partículas (Jung y Perrut, 2001); encapsulación, recubrimientos e impregnación de matrices orgánicas (Cocero y col., 2009) y especialmente, ofrece grandes ventajas en la industria alimentaria como método de conservación (García-González, 2007; Ferrentino y Spilimbergo, 2011; Ortuño y col., 2012a, 2013a, 2014a, 2014b).

1.4.3. Aplicaciones de conservación con FSC-CO₂ en la industria alimentaria

Los primeros estudios realizados empleando FSC-CO₂ como técnica de conservación fueron realizados en soluciones sencillas, como medios tamponados y medios de cultivo (Erkmen, 2000). Posteriormente, se emplearon matrices reales como zumos, y se dedujo que el proceso de inactivación microbiana mediante FSC-CO₂ está condicionado por parámetros inherentes a las condiciones del tratamiento, como la complejidad de la matriz alimenticia o las características propias del microorganismo (Erkmen, 2012).

La aplicación de FSC-CO₂ ha demostrado ser más eficaz en matrices líquidas que en matrices sólidas. Como matrices líquidas se han empleado zumos de frutas (Li y col., 2012a; Liao y col., 2010; Ortuño y col., 2014a, 2014b); cerveza y vino (Damar y Balaban 2006; Yuk y col., 2010); o leche (Erkmen, 2000; Yao y col., 2013; Hongmei y col., 2014), entre otros. Sin embargo, la eficiencia del proceso disminuye conforme aumenta la complejidad del alimento, como es el caso de la inactivación microbiana en yema de huevo líquida (Wei y col., 1991), o pasta de tomate (Parton y col., 2007). En cuanto a matrices alimentarias sólidas donde se ha estudiado la inactivación microbiana mediante FSC-CO₂, se pueden citar vegetales y frutas cortadas (Zhong y col., 2008; Valverde y col., 2010; Ferrentino y col., 2012a, 2012b; Spilimbergo y col., 2013; Galvanin y col., 2013; Ferrentino y col., 2013a; Ferrentino y col. 2014), o productos cárnicos (Choi y col. 2009a; Bae y col., 2011; Ferrentino y col., 2013b, 2013c).

1.4.4. Mecanismos de inactivación microbiana mediante FSC-CO₂

Los mecanismos de inactivación asociados al proceso de inactivación con FSC-CO₂ están basados en teorías detalladas por Daniels y col. (1985) que han sido aceptadas por la mayoría de autores (Damar y Balaban, 2006; García-González, 2010; Tamburini y col., 2014). Sin embargo, hoy en día estos mecanismos de inactivación han sido reforzados y descritos con mayor claridad gracias a estudios llevados a cabo empleando la microscopia electrónica de barrido (SEM) (Dillow y col., 1999; Spilimbergo y col., 2003a) y de transmisión (TEM; Oulé y col., 2006; Kim y col., 2007, 2008; Ortuño y col., 2014b), en los cuales se ha evaluado el estado de las células antes y después del tratamiento. Además, recientemente, Tamburini y col. (2013), llevaron a cabo un análisis de flujo citométrico de células de *E. coli* inoculadas en muestras de zanahoria fresca, técnica que usa un indicador (yoduro de propidio; PI) para realizar el análisis y cuantificación en tiempo real de los parámetros celulares como son el estatus fisiológico, tamaño celular y granulometría de la superficie de la célula, con el fin de conocer los daños generados en función del tiempo de exposición al FSC-CO₂.

Todos estos trabajos permiten resumir los mecanismos de inactivación asociados al FSC-CO₂ en siete etapas fundamentales: (1) la solubilización del CO₂ presurizado en la fase externa líquida y disminución del pH; (2) difusión del CO₂ y modificación de la membrana celular; (3) penetración del CO₂ en el interior de la célula y disminución del pH intracelular; (4) inhibición del metabolismo celular debido a la inactivación de enzimas claves; (5) inhibición directa del metabolismo celular en respuesta a la presencia del CO₂ y formación de HCO₃⁻; (6) desequilibrio de los electrolitos intracelulares y (7) extracción de los componentes intracelulares y ruptura celular (Damar y Balaban, 2006; García-González y col., 2007; Spilimbergo y col., 2009). Dichos mecanismos no se producen consecutivamente, sino que se llevan a cabo simultáneamente de forma compleja e interrelacionada (Erkmen, 2012).

Solubilización del CO₂ en la fase externa y disminución del pH

El CO₂ puede disolverse en la fase líquida de los alimentos, o en alimentos líquidos, para formar ácido carbónico (H₂CO₃). Para mantener el equilibrio, el H₂CO₃ se disocia

en una segunda reacción reversible liberando los iones H^+ y HCO_3^- . Esta liberación de iones H^+ provoca la acidificación del medio (pH extracelular) (Erkmen, 2012).

La acidificación del medio extracelular puede favorecer al efecto antimicrobiano del CO_2 presurizado en varios sentidos: la célula pretende encontrar el equilibrio quimiostático y para ello sintetiza componentes básicos que transporta al exterior, por lo cual utiliza mucha más energía de la que ella misma puede generar; por otra parte, el bajo pH extracelular causa una modificación química de la bicapa de fosfolípidos que forma la membrana, aumentando la permeabilidad al CO_2 . Ambos efectos contribuyen a la difusión del CO_2 hacia el interior de la célula, y una vez dentro, éste interactúa con biomoléculas en el citoplasma, comprometiendo el balance biológico de la misma.

Durante esta etapa, la resistencia del microorganismo juega un papel muy importante ya que la célula consume una gran cantidad de energía para mantener la homeostasis y por otro lado, algunos microorganismos presentan una membrana más resistente a la difusión del CO_2 (García-González y col., 2007).

Difusión del CO_2 y modificación de la membrana celular

En esta etapa, el CO_2 se difunde al interior de la membrana celular, acumulándose en la fase lipídica de la membrana, lo que podría modificar estructural y funcionalmente la membrana debido, principalmente, a un desorden de la cadena hidrocarbonada del lípido y la ruptura de las interacciones lípido-proteicas que provocan un aumento de la fluidez y permeabilización de la membrana celular (Damar y Balaban, 2006; García-González y col., 2007). La acumulación de CO_2 en el interior de la célula, provoca la extracción de componentes intracelulares, alterando su sistema biológico y promoviendo la inactivación (García-González y col., 2010; Ortuño y col., 2014b).

La mayoría de los autores coinciden en que la integridad de la membrana celular y su daño (irreversible o no), es el evento crítico que conduce a una pérdida de viabilidad cuando los microorganismos están expuestos a CO_2 supercrítico (García-González, 2010; Tamburini y col., 2014).

Esta teoría es usada para explicar la lenta inactivación microbiana en matrices alimentarias sólidas, mostrando como etapa limitante el difícil contacto entre el CO₂ con los microorganismos, dado el bajo contenido en agua y la difícil disolución del CO₂ (Ferrentino y col., 2013b).

Disminución del pH intracelular

En respuesta al aumento de permeabilidad en la membrana celular, el CO₂ presurizado puede penetrar fácilmente a través de la membrana y acumularse en el interior del citoplasma. El CO₂ se disuelve dando lugar a HCO₃⁻, que a su vez se disociará en H⁺ y CO₃²⁻, produciendo un desequilibrio interno, que es fundamental para el correcto funcionamiento celular.

Si bien las células son capaces de generar su propio sistema homeostático a través de sistemas de transporte secundarios de protones y regular el pH interno y externo; cuando penetra una cantidad de CO₂ al citoplasma por encima de un valor crítico, el pH puede disminuir a un nivel tal, que la célula no sea capaz de liberar tantos protones (H⁺) al exterior produciendo un colapso del sistema celular, perdiendo su viabilidad (García-González y col., 2007; Erkmén, 2012).

Inactivación enzimática

La acidificación del citoplasma puede conducir a la desnaturalización y precipitación de enzimas presentes en el mismo, y que son esenciales para procesos metabólicos como la glicólisis, movilización de aminoácidos, transporte activo de iones o translocación de protones (Ballestra y col., 1996; Hong y Pyun, 2001; Spilimbergo, 2002).

Inhibición de la actividad metabólica celular

La regulación de la actividad metabólica de las células depende además del pH, de la concentración de sustratos, productos y cofactores que actúan como elementos primarios de la actividad enzimática. La concentración del anión HCO₃⁻ es importante en la regulación de la actividad enzimática y en consecuencia del metabolismo celular,

ya que regula la actividad de aniones sensibles presentes en sitios activos de los enzimas (Damar y Balaban, 2006; García-González y col., 2007).

Durante los tratamientos con FSC-CO₂, el CO₂ disuelto y la concentración de HCO₃⁻ formado, pueden actuar como sustrato y producto, respectivamente, en reacciones de carboxilación y descarboxilación. Como las reacciones de carboxilación son importantes para la síntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos, si las concentraciones de la proporción de CO₂/ HCO₃⁻ no son las adecuadas, el metabolismo de la célula se verá alterado, favoreciendo su inactivación.

Desequilibrio celular

El daño letal provocado por el tratamiento mediante FSC-CO₂ en los sistemas biológicos ocurre principalmente por la acumulación del CO₂ en el interior del citoplasma de la célula bacteriana (Erkmen, 2012).

Esto se debe a que durante la conversión de HCO₃⁻ a CO₃⁻², puede precipitar electrolitos inorgánicos como Ca⁺² o Mg⁺². Estos electrolitos, unidos a otros constituyentes citoplasmáticos como las proteínas, son importantes para el equilibrio osmótico entre la célula y su entorno (Spilimbergo y Bertucco, 2003). De modo que si los electrolitos se precipitan pierden su actividad reguladora y provocan un desequilibrio celular (García-González y col., 2007).

Extracción de constituyentes celulares y ruptura celular

El incremento de la permeabilidad de las membranas permite la difusión del CO₂ al interior celular. El CO₂ supercrítico puede extraer componentes intracelulares como son: fosfolípidos y compuestos hidrofóbicos, proteínas y ácidos grasos; produciendo un desequilibrio del sistema biológico (García-González y col., 2007), e incluso rompiendo la estructura celular. Al respecto, Hong y Pyun (1999) demostraron que las células tratadas mediante CO₂ presurizado presentan fracturas en las membranas, aumento del espacio periplásmico entre la membrana y la pared celular y fugas citoplasmáticas. Finalmente, la lisis celular es debida a la ruptura de la pared y membrana celular. Este mismo comportamiento fue observado posteriormente por

Oulé y col. (2006) quienes observaron, mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM), que las células de *E. coli* fueron destruidas totalmente después de 30 min de tratamiento mediante FSC-CO₂ a 250 bar y 40 °C.

1.4.5. Factores que afectan a la inactivación microbiana mediante FSC-CO₂

La resistencia que presentan los microorganismos a los tratamientos con FSC-CO₂ varía en función de múltiples factores que pueden intervenir en el proceso. Estos factores pueden ser factores intrínsecos, que involucran las propiedades físico-químicas del propio alimento y factores extrínsecos, que comprenden las condiciones ambientales del proceso.

Efecto del tipo de microorganismo

La comparación entre microorganismos es difícil ya que los resultados publicados en bibliografía provienen de investigaciones realizadas sobre microorganismos concretos, inoculados en matrices con propiedades distintas, sometidos a unas condiciones de tratamiento específicas, y empleando sistemas diferentes (García-González y col., 2009).

A pesar de ello, en general se ha observado que, las bacterias Gram positivas presentan una mayor resistencia al tratamiento mediante FSC-CO₂, ya que tienen una pared celular más gruesa que las Gram negativas, y son por lo tanto, menos susceptibles al daño mecánico o a un aumento en la permeabilidad (Erkmen, 2012). Las bacterias Gram negativas, por el contrario, tienen una membrana celular más delgada, que favorece su fluidez, permeabilidad y la penetración del CO₂ a su interior (Damar y Balaban, 2006).

Un ejemplo de esta diferente sensibilidad fue mostrado por Ortuño y col. (2012b) y Ortuño y col. (2013) quienes aplicaron un tratamiento con FSC-CO₂ en medio de crecimiento inoculado con *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente. Los resultados mostraron que tras 30 minutos de tratamiento a 36 °C y 350 bar, se obtuvo una

reducción de 3.0 ciclos-log para *E. coli*, mientras que para *S. cerevisiae*, no se detectó reducción.

Por contra, Sirisee y col. (1998), estudiaron la inactivación de *E. coli* y *S. aureus*, ambos inoculados en muestras cárnicas y tratados mediante FSC-CO₂ a 310 bar y 42.5 °C, observando que tras 180 min, *E. coli* alcanzó una inactivación de 1.0 ciclo-log, mientras que la reducción de *S. aureus* (Gram positiva) fue de 3.0 ciclos-log después de 120 min.

Respecto a las esporas bacterianas y fúngicas, numerosas investigaciones han demostrado que su resistencia a la inactivación por FSC-CO₂ es mucho mayor que las formas vegetativas (Perrut, 2012). Aunque los mecanismos de inactivación no se conocen claramente, se sabe que la exposición al FSC-CO₂ puede provocar la perforación de la membrana externa de las esporas, especialmente cuando el proceso se efectúa en presencia de algún aditivo oxidante como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), o bien si se combina con un tratamiento térmico moderado (60 °C) u otras tecnologías emergentes (Spilimbergo y col., 2002).

Efecto de la concentración inicial de microorganismos

La capacidad de inactivación del FSC-CO₂ puede estar influenciada por el número inicial de microorganismos presentes en el medio de tratamiento. Así, bajo las mismas condiciones de tratamiento, el nivel de inactivación alcanzado será mayor, cuanto más baja sea la concentración microbiana presente inicialmente en el alimento.

Ferrentino y col. (2013c) redujeron de 30 a 5 min, el tiempo de tratamiento con FSC-CO₂ (120 bar, 45 °C) necesario para inactivar *L. monocytogenes* inoculada en jamón curado, al reducir la población inicial de 7 a 3 log (UFC/g). Los autores concluyeron que los componentes celulares como proteínas, carbohidratos o lípidos derivados de la ruptura de algunas células, pueden provocar un efecto protector sobre el resto de microorganismos. Además Ferrentino y col. (2013c) encontraron que las células adheridas a la superficie de jamón curado podían formar agregados o microcolonias, provocando que las células microbianas internas del alimento queden menos expuestas a los efectos del CO₂.

Efecto de la fase de crecimiento del microorganismo

En general, las células en fases de crecimiento más tempranas son más sensibles al efecto del FSC-CO₂, que las células en fase estacionaria. Ortuño y col. (2012a), estudiaron las cinéticas de inactivación mediante FSC-CO₂ (350 bar, 35 °C) de *E. coli* y *S. cerevisiae* en cuatro etapas de crecimiento: fase temprana, intermedia y tardía exponencial y fase temprana estacionaria.

Estos autores observaron un aumento progresivo de la resistencia al tratamiento de FSC-CO₂ conforme avanzaba el crecimiento celular. El tiempo necesario de tratamiento para alcanzar una reducción total (7-8 ciclos-log) aumentó de 3 a 25 min, y de 60 a 140 min, conforme la fase de crecimiento aumentó de la fase temprana exponencial a la fase temprana estacionaria, para *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente.

Este comportamiento puede deberse a que los microorganismos, al alcanzar la fase estacionaria de crecimiento, sintetizan proteínas y otras biomoléculas que les protegen de las condiciones adversas como las altas temperaturas y presiones o la exposición al FSC-CO₂, entre otros factores (Erkmen, 2012).

Efecto del estado físico del CO₂

El CO₂ en estado supercrítico presenta mayor capacidad de inactivación que en fase gaseosa o líquida (Erkmen, 2012). Este efecto está asociado a las propiedades físico-químicas que presenta el CO₂ en este estado. Por una parte presenta una densidad similar a los líquidos, que le confiere una mayor capacidad de disolución y extracción de componentes intracelulares; por otro lado, presenta una elevada difusividad y baja viscosidad, similares a los gases, que le confieren una elevada capacidad de penetración en las paredes y membranas celulares, lo que mejora los fenómenos de transferencia de materia asociados a los procesos de inactivación (Oulé y col., 2006).

Efecto de la presión

En el proceso de inactivación mediante FSC-CO₂, la presión controla la velocidad de solubilización del CO₂ en el medio. Por tanto, el uso de una presión por encima del punto crítico, contribuye a aumentar la solubilidad del CO₂ en el medio donde están disueltas las células, facilitando el contacto entre las células y el CO₂ y, en consecuencia, acelerando los mecanismos de inactivación como la alteración de la membrana celular (Oulé y col., 2006). Dichos efectos no aumentan indefinidamente con el incremento de presión, como se demuestra principalmente en matrices líquidas, sino que están limitados por la saturación del medio de suspensión con CO₂ (Sims y Estigarribia, 2003; Erkmen, 2012).

El efecto de la presión ha sido estudiado por diversos autores en matrices líquidas. Por una parte, cuando el CO₂ se encuentra alrededor del punto crítico, un incremento de la presión puede aumentar significativamente la velocidad de inactivación (Erkmen, 2000). Sin embargo, bajo condiciones de presión superiores a 100 bar, no se observa un efecto significativo en la solubilidad del CO₂, y como consecuencia en el grado de inactivación microbiana alcanzado (Spilimbergo, 2002).

Estudios realizados en matrices alimentarias sólidas muestran, igual que en líquidos, resultados discordantes respecto al efecto de la presión. Ferrentino y col. (2014) redujeron de 25 a 10 min el tiempo necesario para reducir en 7 ciclos-log una población de *E. coli* inoculada en muestras de zanahoria fresca, al aumentar la presión de 80 a 120 bar (26 °C). Sin embargo, estudios realizados en cacao y pera conferencia, demostraron que, la presión no influye significativamente sobre la inactivación de la microbiota y *S. cerevisiae*, respectivamente para ambos productos (Calvo y col., 2007; Valverde y col., 2007).

Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura en la inactivación mediante FSC-CO₂ ha sido ampliamente estudiado sobre matrices líquidas, sin embargo, sobre matrices sólidas existen muy pocas referencias. La temperatura del tratamiento afecta a las propiedades fisicoquímicas del CO₂, y por tanto a su capacidad de inactivación (Erkmen, 2012).

Un incremento de temperatura favorece la inactivación mediante FSC-CO₂ ya que se produce una disminución en la viscosidad del CO₂, lo cual aumenta su coeficiente de difusión, facilitando los mecanismos de inactivación gracias a un mejor contacto con los microorganismos (Oulé y col., 2006; García-González y col., 2009). Además, la temperatura puede afectar a la integridad de la membrana celular, y aumentar su fluidez (Erkmen, 2012). Esto favorece la entrada de CO₂ a la célula y la extracción de componentes vitales, responsable de su inactivación.

Efecto de la agitación en el sistema

Los mecanismos de inactivación del FSC-CO₂ son más eficaces cuanto mayor es el contacto entre el CO₂ y las células microbianas, de manera que una adecuada agitación del sistema, que permita una correcta disolución del CO₂ en el medio donde están suspendidas las células puede aumentar la eficacia del tratamiento (Ortuño y col. 2014b).

La agitación en el sistema de FSC-CO₂ puede producirse empleando un sistema de agitadores mecánicos o mezcladores dentro del recipiente (Hong y col., 1997; García-González, 2009) o bien la agitación provocada debido a efectos mecánicos generados por ultrasonidos de alta potencia dentro del sistema (Ortuño y col., 2012b).

En cualquier tipo de sistema de inactivación mediante FSC-CO₂, la etapa limitante es el tiempo necesario hasta alcanzar la saturación del medio a tratar con CO₂, por lo tanto aquellos sistemas que permiten una saturación rápida del medio, permitirán inactivar más rápidamente los microorganismos (García-González y col., 2009; Cappelletti y col., 2014).

Efecto de la composición y propiedades de la matriz a tratar

La composición y complejidad de la matriz afecta a la eficacia del tratamiento mediante FSC-CO₂. Esto puede ser debido a las interacciones de los constituyentes de la misma con el CO₂ que limita el contacto del CO₂ con los microorganismos (Shigehisa, 1991; Sirisee y col., 1998; Choi y col., 2009a; Calvo y Torres 2010; Meujo y col., 2010; Ferrentino y Spilimbergo, 2011; Ji y col., 2012; Ortuño y col., 2012b).

Se ha observado que el poder de inactivación asociado al FSC-CO₂ aumenta en medios con elevado contenido en agua, ya que es en ésta donde el CO₂ se disuelve, permitiendo entrar en contacto con los microorganismos (Erkmen, 2012).

Adicionalmente, estudios en leche sugieren que la grasa puede proporcionar cierta protección a los microorganismos frente al tratamiento con FSC-CO₂, además, algunos estudios en medios líquidos revelan que el contenido de grasa o aceite en suspensión, incrementa la resistencia microbiana al tratamiento mediante FSC-CO₂, debido a un cambio en la estructura de la pared y membrana celular (Erkmen, 2000).

Por otra parte, la presencia de azúcares en las disoluciones tratadas también ha mostrado disminuir la eficacia del tratamiento de FSC-CO₂, ya que el azúcar del medio se asocia con el agua del mismo, dejando de estar disponible para que el CO₂ se disuelva en ella, disminuyendo el CO₂ disuelto y dificultando el contacto de éste con los microorganismos, lo que retrasa los mecanismos de inactivación (Ortuño y col., 2014b).

En cuanto al pH del medio, se ha demostrado que un bajo pH inicial de la muestra a tratar, favorece los mecanismos de inactivación, ya que podría contribuir a un aumento de la permeabilidad de la membrana, facilitando la penetración del CO₂ en las células, y por tanto acelerando la velocidad de inactivación microbiana (Damar y Balaban, 2006; García-González y col., 2007).

Por otra parte, la viscosidad del medio influye directamente en los procesos de inactivación mediante FSC-CO₂. García-González y col. (2009) estudiaron la inactivación de *P. fluorescens* con FSC-CO₂ (105 bar, 35 °C, 20 min) inoculada en diferentes medios con distinta viscosidad (concentración de gelatina: 5-30 %). Estos autores observaron que la inactivación disminuyó significativamente con el incremento de la viscosidad. La reducción obtenida en una suspensión del 5 % y del 30 % de gelatina fue de 3.5 ciclos-log y <1 ciclo-log, respectivamente.

En cuanto a la inactivación mediante FSC-CO₂ sobre matrices sólidas (Tabla 1.3), no se ha demostrado que una determinada estructura y/o composición de la matriz afecte al nivel de inactivación alcanzado.

Tabla 1.3 Tratamientos de inactivación microbiana mediante FSC-CO₂ sobre diferentes matrices cárnicas

Alimento	Condiciones	Microorganismo	Resultado* log (CFU/g)	Referencia
Carne molida	<ul style="list-style-type: none"> • 103 bar • 36 °C • 15 min 	• <i>E. coli</i>	• 1.0	Meurehg (2006)
		• <i>Salmonella spp.</i>	• 1.1	
		• <i>E. coli</i> O157:H7	• 0.9	
		• TPC	• 0.8	
Lomo de cerdo marinado (<i>longissimus dorsi</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • 120 bar • 40 °C • 30 min 	• <i>E. coli</i>	• 0.8	Choi y col. (2009)
		• <i>L. monocytogenes</i>	• 1.0	
		• <i>E. coli</i> O157:H7	• 0.2	
		• <i>S. typhimurium</i>	• 0.5	
Lomo de cerdo en pasta picante (<i>longissimus dorsi</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • 140 bar • 45 °C • 40 min 	• <i>E. coli</i>	• 0.3	
		• <i>L. monocytogenes</i>	• 0.7	
		• <i>E. coli</i> O157:H7	• 1.0	
		• <i>S. typhimurium</i>	• 0.6	
Lomo de cerdo (<i>longissimus dorsi</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • 120 bar • 40 °C • 30 min 	• Mesófilos (TPC)	• 2.0	Bae y col. (2011)
Camarón	<ul style="list-style-type: none"> • 250 bar • 55 °C • 35 min 	• Mesófilos (TPC)	• 3.9	Ji y col. (2012)
Jamón curado	<ul style="list-style-type: none"> • 120 bar • 40 °C • 30 min 	• <i>L. monocytogenes</i>	• 4.5	Ferrentino y col. (2013b)
Jamón Cocido	<ul style="list-style-type: none"> • 120 bar • 40 °C • 15 min 	• Mesófilos	• 2.8	Ferrentino y col. (2013c)
		• Psicrófilos	• 1.0	
		• Bacterias Acido-lácticas (BAL)	• 1.9	

* Reducción en ciclos logarítmicos, expresado como: unidades formadoras de colonias por gramo de muestra (CFU/g).

TPC: Recuento total en placa

No obstante, el estudio realizado por Choi y col. (2009), sobre la inactivación de *L. monocytogenes*, *S. typhimurium*, *E. coli* O157:H7 (patógena) y *E. coli* (no patógena) mediante FSC-CO₂ bajo diferentes condiciones de presión (100 – 140 bar), temperatura (40 y 45 °C) y tiempo (20, 30 y 40 min) en muestras de lomo de cerdo marinado, presentaron en general, un nivel de inactivación superior al obtenido en muestras de cerdo cubiertas con pasta picante. Los autores asociaron este resultado a

que el marinado presenta un mayor contenido de agua (65.4 %) que la pasta picante (58.3 %).

1.4.6. Efecto del FSC-CO₂ sobre las propiedades físico-químicas de los alimentos y su estabilidad microbiológica tras el tratamiento

El efecto del tratamiento con FSC-CO₂ sobre medios líquidos ha sido ampliamente estudiado por diversos autores (Erkmen, 2000; Parton y col., 2007; Liao y col., 2010; Li y col., 2012a; Ortuño y col., 2014a, 2014b), los cuales han empleado numerosas matrices como medios de cultivo, zumos de frutas, leche, huevo líquido, cerveza o vino, entre otros. Sin embargo, en relación al efecto del FSC-CO₂ sobre las propiedades físico-químicas y nutricionales de alimentos sólidos, existe un número limitado de trabajos, dada la complejidad del tratamiento sobre este tipo de matrices.

Entre las propiedades físico-químicas más destacadas de los alimentos se pueden citar: color textura, pH, humedad o grasa, siendo el contenido en grasa una característica importante en los productos de origen animal debido al interés de los consumidores por adquirir productos con bajo contenido graso. Entre las propiedades nutricionales se puede citar el contenido en compuestos fenólicos, actividad de enzimas clave, contenido en vitaminas, etc. La Tabla 1.4 resume el efecto de los FSC-CO₂ sobre diferentes parámetros físico-químicos y nutricionales de alimentos sólidos como frutas, vegetales y productos cárnicos.

Efecto del FSC-CO₂ sobre el color

Los estudios realizados en muestras de origen vegetal muestran resultados contradictorios sobre el efecto del FSC-CO₂ sobre el color de las muestras. Valverde y col. (2010) observaron que el FSC-CO₂ provocó el oscurecimiento de muestras de pera, adquiriendo un color similar al proceso de caramelización. Los autores atribuyeron este efecto a la actividad enzimática residual (enzimas polifenoloxidasas y peroxidasas) de las muestras después del tratamiento. Por otra parte, Zhong y col. (2008) y Calvo y Torres (2010) observaron la decoloración de hojas de espinaca y paprika en polvo, respectivamente, tratadas mediante FSC-CO₂. Sin embargo, Ferrentino y col. (2012a y 2012b), no observaron cambios de color significativos en muestras de coco y

zanahoria, respectivamente, tras la aplicación de FSC-CO₂, bajo condiciones de tratamiento similares (Tabla 1.4).

Por otra parte, los estudios realizados en muestras cárnicas mostraron que la aplicación de FSC-CO₂ provocó modificaciones en el color de muestras de carne de cerdo, tanto en las muestras de carne molida, en las cuales se observó un tono más oscuro (Sirisse y col., 1998), como en muestras de lomo de cerdo en las cuales se encontró un aumento en la luminosidad de las muestras tras su tratamiento con FSC-CO₂ (Choi y col., 2008). No obstante, en los estudios realizados por Ferrentino y col. (2013b y 2013c) sobre muestras de jamón curado y jamón cocido, respectivamente, los autores no observaron diferencias de color significativas.

Efecto del FSC-CO₂ sobre la humedad

Los estudios realizados por Calvo y col. (2007) y Calvo y Torres (2010), mostraron en cacao y paprika en polvo, respectivamente, que el tratamiento de inactivación mediante FSC-CO₂ provocó una disminución de la humedad en ambas muestras. Igualmente, Ferrentino y col. (2013a) observaron una disminución en el contenido de agua de muestras de coco durante el tratamiento con FSC-CO₂.

Por otra parte, Choi y col. (2008) no observaron un efecto en el contenido de agua de muestras de lomo de cerdo, tras el tratamiento con FSC-CO₂.

Efecto del FSC-CO₂ sobre la grasa

Hace más de dos décadas, varios estudios demostraron la eficiencia del tratamiento mediante FSC-CO₂ sobre la extracción de colesterol y otros lípidos en muestras de carne (Chao y col., 1991). El potencial de esta técnica como sistema de desgrasado resulta atractivo debido al interés del consumidor actual por dietas reducidas en grasa. Recientemente, Ferrentino y col. (2013a) obtuvieron una disminución del 2 % en el contenido de grasa de muestras de coco tras el tratamiento con FSC-CO₂ (Tabla 1.4).

Tabla 1.4 Efecto del FSC-CO₂ sobre las propiedades físico-químicas y nutricionales de diferentes alimentos sólidos.

Alimento	Condiciones	Análisis	Resultados	Referencia
<i>Frutos, vegetales, brotes y semillas</i>				
Cacao en polvo	<ul style="list-style-type: none"> • 300 bar • 65 °C • 40 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Humedad • Compuestos polifenólicos 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Disminución de agua en la muestra ✓ Retención de los compuestos fenólicos 	Calvo y col. (2007)
Hojas de espinaca fresca	<ul style="list-style-type: none"> • 100 bar • 40 °C • 40 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Color • Firmeza 	<ul style="list-style-type: none"> × Decoloración × Pérdida de firmeza 	Zhong y col. (2008)
Lechuga	<ul style="list-style-type: none"> • 550 bar • 45 °C • 120 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Estructura 	<ul style="list-style-type: none"> × Estructura más blanda 	Matsufuji (2009)
Paprika en polvo	<ul style="list-style-type: none"> • 300 bar • 90 °C • 45 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Humedad • Color 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Disminución de agua × Ligera reducción de la intensidad del color 	Calvo y Torres (2010)
Pera fresca pre-cortada	<ul style="list-style-type: none"> • 100 bar • 50 °C • 10 min 	<ul style="list-style-type: none"> • pH • Azúcares • Color • Textura (consistencia) 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ No alteró el pH ni el contenido de azúcares × Pérdida de líquido × Pérdida de consistencia × Textura más blanda × Cambios de color (oscurecimiento) × Inactivación parcial enzimática × Reducción de Vitamina C 	Valverde y col. (2010)
Coco	<ul style="list-style-type: none"> • 120 bar • 45 °C • 15 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Textura • Color • pH • Acidez Titulable (AT) • Grasa • Materia seca • Fenoles • Flavonoides • Capacidad antioxidante (CA) • Actividad enzimática 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ No hubo efecto en consistencia ni color × Disminución de pH y aumento de AT ✓ 2.7% menos grasa × 32% menos de Fenoles y 53 % de Flavonoides × 31% menos CA ✓ 98.5 % inactivación de Polifenoloxidasas y 30.4 % incremento de Peroxidasas 	Ferrentino y col. (2012a, 2012b, 2013a)

Tabla 1.4 ...Continuación

Alimento	Condiciones	Análisis	Resultados	Referencia
Zanahoria	<ul style="list-style-type: none"> • 120 bar • 45 °C • 15 min 	<ul style="list-style-type: none"> • pH • Acidez titulable (AT) • Fenoles • Capacidad antioxidante • Carotenoides • Vitamina C • Actividad enzimática • Textura 	<ul style="list-style-type: none"> × Disminución de pH y aumento de AT ✓ No hay efectos en fenoles, carotenoides, capacidad antioxidante ✓ Inactivación enzimática completa (Pectinmetil esterasa) × 40% disminución de Vitamina C × Reblandecimiento 	Spilimbergo y col. (2013)
Carnes y Productos cárnicos				
Carne molida	<ul style="list-style-type: none"> • 310 bar • 42 °C • 180 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Color • Apariencia 	<ul style="list-style-type: none"> × Color más oscuro × Apariencia de cocido 	Sirisee y col. (1998)
Carne molida	<ul style="list-style-type: none"> • 103 bar • 36 °C • 15 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Textura 	<ul style="list-style-type: none"> × Mayor dureza 	Meurehg, (2006)
Lomo de cerdo (<i>longissimus dorsi</i>)	<ul style="list-style-type: none"> • 100 bar • 45 °C • 5 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Color • pH • Dureza • Humedad • Capacidad de retención de agua (CRA) • Desnaturalización proteica 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Aumento de luminosidad ✓ No hubo efecto en pH, dureza, humedad, CRA × Desnaturalización de las proteínas sarcoplasmáticas 	Choi y col. (2008)
Jamón curado	<ul style="list-style-type: none"> • 120 bar • 50 °C • 30 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Color • pH 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ No hubo cambios de color, ni pH 	Ferrentino y col. (2013b)
Jamón Cocido	<ul style="list-style-type: none"> • 120 bar • 50 °C • 15 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Color • pH • Textura 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ No hubo diferencia de color ✓ No hubo variación del pH ✓ No varió la textura 	Ferrentino y col. (2013c)

✓ Ventaja

× Desventaja

Efecto del FSC-CO₂ sobre el pH

Los primeros estudios sobre el empleo del CO₂ como técnica de conservación fueron usándolo como atmósfera en el interior de distintos envases de carnes. El CO₂ era fácilmente adsorbido por la carne, disminuyendo el pH por la formación de ácido carbónico y su subsecuente disociación en iones carbonato e hidrogenión (Jacobsen y Bertelsen, 2002). Recientemente, Choi y col. (2008) han mostrado que la aplicación de FSC-CO₂ no provoca cambios en el pH de muestras de carne de cerdo; sin embargo, Ferrentino y col. (2013a) y Spilimbergo y col. (2013), observaron que la aplicación de FSC-CO₂ sobre muestras de coco y zanahoria, respectivamente, provocó una ligera pero significativa disminución del pH en las muestras tras su tratamiento. Por lo tanto, el efecto sobre el pH depende directamente de la naturaleza del medio.

Efecto del FSC-CO₂ sobre la textura

La aplicación de FSC-CO₂ en muestras alimentarias de origen vegetal, en general provocan una disminución significativa en la textura y pérdida de consistencia tras el tratamiento (Zhong y col., 2008; Matsufuji y col., 2009; Valverde y col., 2010; Ferrentino y col., 2012a; Spilimbergo y col., 2013) (Tabla 1.4). Sin embargo, los estudios realizados en muestras de lomo de cerdo (Choi y col., 2008) y jamón cocido (Ferrentino y col., 2013c), no mostraron efecto sobre la dureza de las mismas, tras la aplicación de FSC-CO₂.

Efecto del FSC-CO₂ sobre la microestructura

Hasta la fecha, solo el estudio de Ferrentino y col. (2013a) ha estudiado el efecto de los FSC-CO₂ sobre la microestructura de muestras de coco tras el tratamiento. Los autores observaron un desorden evidente en el tejido de las muestras tratadas en comparación a las muestras control, en las cuales el tejido estaba constituido por grupos de células con una estructura intacta en forma de mosaico. En cambio, el tejido de las muestras tratadas, presentaba células agrupadas y zonas completamente colapsadas.

Efecto del FSC-CO₂ sobre la vida útil

Los estudios de vida útil llevados a cabo en muestras tratadas mediante FSC-CO₂ revelan que el efecto del tratamiento sobre la microbiota y atributos de calidad de las muestras, permite garantizar la inocuidad y estabilidad microbiana de las mismas, además de conservar los atributos que permiten dar a la muestra un aspecto de frescura durante el tiempo de almacenamiento. Spilimbergo y col. (2013) estudiaron el tiempo de vida útil de muestras de zanahoria tratadas mediante FSC-CO₂ (120 bar, 45 °C, 15 min). Los autores no detectaron crecimiento microbiano en las muestras tras su tratamiento, prolongando su vida útil hasta 4 semanas en refrigeración (4 °C), en comparación a los 20 días de vida útil obtenidos en las muestras de zanahoria sin tratar.

Por otra parte, Ferrentino y col. (2013c), realizaron estudios de almacenamiento de muestras de jamón cocido tratadas mediante FSC-CO₂ a 120 bar, 50 °C y 5 min. Los resultados mostraron que, tras 30 días de almacenamiento se observaron diferencias significativas en el color, presentando, en general un color más rosa conforme avanzaba el periodo de almacenamiento. Respecto al pH y textura, no hubo cambios durante todo el periodo de almacenamiento; mientras que el pH de las muestras sin tratar disminuyó hasta alcanzar un valor de 5.0 al final del almacenamiento. Los autores observaron que las muestras sin tratamiento presentaron mal olor y formación de limo viscoso, tras 10 días de almacenamiento, mientras que las muestras tratadas no mostraron cambios durante todo el tiempo de almacenamiento.

El efecto del FSC-CO₂ está directamente relacionado con las propiedades de cada alimento, por ello es necesario conocer cómo afecta la estructura y composición de los mismos a los mecanismos de inactivación, de los cuales dependerá la estabilidad microbiológica de los alimentos durante el almacenamiento post-tratamiento.

En este sentido, para intentar superar las limitaciones que presentan el FSC-CO₂ se ha planteado la aplicación del mismo de forma conjunta con otras tecnologías no térmicas, como alternativa a las tecnologías tradicionales de pasteurización.

1.5. Combiación de FSC-CO₂ con tecnologías no térmicas de conservación

La combinación de FSC-CO₂ con otras tecnologías no térmicas para procesos de pasteurización tiene como objetivo conseguir alimentos microbiológicamente estables minimizando el daño sobre sus propiedades nutricionales y organolépticas naturales. Algunos ejemplos son la combinación de FSC-CO₂ con conservantes naturales como los ácidos orgánicos (Kim y col., 2008); y por otra parte, la aplicación consecutiva o simultánea de FSC-CO₂ con otras tecnologías como los PEF (Pataro y col., 2010), las HHP (Park y col., 2002; Li y col., 2012b) o los HPU (Ortuño y col., 2013a, 2014).

La combinación de FSC-CO₂ y PEF, ha sido estudiada por diversos autores. Spilimbergo y col. (2003b) estudiaron la aplicación consecutiva de PEF (25 kV/cm, intervalos de 5 segundos) y FSC-CO₂ (200 bar, 34 °C, 10 min) para procesos de inactivación de *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus* inoculados en soluciones de glicerol. Estos autores observaron un efecto sinérgico de ambas tecnologías en el nivel de inactivación, comparado con la suma del efecto individual de cada una de ellas. Pataro y col. (2010) compararon la inactivación de *S. cerevisiae* mediante FSC-CO₂ y aplicando de forma consecutiva PEF y FSC-CO₂. La aplicación consecutiva de PEF (12 kV/cm) y FSC-CO₂ (80 bar, 35 °C, 5 min) permitió reducir 7 ciclos-log la población de *S. cerevisiae*, mientras que aplicando únicamente FSC-CO₂ se obtuvo una reducción de 1.79 ciclos-log.

La combinación de FSC-CO₂ y HHP se ha empleado mayoritariamente para procesos de inactivación enzimática. Park y col. (2002) mostraron que la aplicación consecutiva de FSC-CO₂ (100-300 bar, 35 °C, 5 min) y HHP (2000 bar, 25 °C, 5 min) permitió obtener una actividad residual del 35 %, 17 % y 45 %, para las enzimas PPO, LOX y PME en zumo de zanahoria, respectivamente. Sin embargo, aplicando individualmente los tratamientos, la actividad residual de las enzimas PPO, LOX y PME fue del 40 %, 20 % y 50 %, empleando FSC-CO₂ y del 83 %, 78 % y 80 % usando HHP, respectivamente.

El uso combinado de FSC-CO₂ y HPU ha sido ampliamente estudiado en procesos de extracción, en los cuales, el CO₂ ejerce de agente extractor y los HPU actúan generando una vigorosa agitación y vibraciones mecánicas (Balachandran y col., 2006) que reducen la resistencia a la transferencia de materia, favoreciendo tanto la difusión del

CO₂ sobre la matriz, como la extracción de los componentes de interés. Riera y col. (2004) aumentaron un 20 % el porcentaje de aceite de almendra extraído mediante FSC-CO₂+HPU con respecto a la extracción realizada sólo con FSC-CO₂. Esta mejora en los rendimientos de extracción también ha sido observada por Rodríguez y col. (2014). Estos autores aumentaron un 150 % el rendimiento de la extracción de manteca de cacao mediante FSC-CO₂+HPU (40 °C, 450-550 bar, 30 min, 40 W), respecto al proceso realizado solo con FSC-CO₂ en similares condiciones. Además, observaron mediante microscopia electrónica de barrido (SEM) que los HPU causaron huecos y rupturas en la estructura superficial de las partículas de cacao, lo que habría facilitado el proceso de extracción.

Recientemente, se han dado a conocer los efectos de la aplicación simultánea de FSC-CO₂+HPU en procesos de inactivación microbiana en alimentos líquidos. Ortuño y col. (2012b, 2013a, 2014a, 2014b) estudiaron el efecto de los HPU sobre las cinéticas de inactivación de *E. coli* y *S. cerevisiae* inoculadas en medios de cultivo y en zumos de frutas a diferentes condiciones de presión (100-350 bar; 36 °C) y temperatura (31-41 °C; 225 bar). En todos los trabajos desarrollados, estos autores observaron una drástica inactivación de ambos microorganismos al combinar FSC-CO₂ y HPU, en comparación con los tratamientos de solo FSC-CO₂.

Estos autores atribuyeron este comportamiento a los efectos mecánicos producidos por los HPU. La agitación vigorosa generada por los HPU en el líquido, facilita la disolución del CO₂ en el medio y su contacto con los microorganismos, acelerando todos los mecanismos de inactivación asociados al FSC-CO₂, desde la disminución del pH del medio hasta la extracción de componentes intracelulares esenciales. Además, también asociaron esta drástica inactivación al fenómeno de cavitación generado por los HPU, que puede dañar las membranas celulares, facilitando los procesos de transferencia de materia, desde el medio al interior celular y viceversa, acelerando la extracción de componentes vitales.

Considerando los prometedores resultados obtenidos en procesos de inactivación combinando FSC-CO₂ y HPU en matrices líquidas, parece interesante aplicar dicha tecnología a la inactivación microbiana en matrices sólidas.

Hasta el momento sólo existen dos referencias bibliográficas de inactivación microbiana en matrices sólidas aplicando FSC-CO₂ y HPU (FSC-CO₂+HPU) por lo tanto, resulta interesante estudiar la inactivación microbiana en distintos tipos de matrices sólidas para conocer el efecto de aplicar simultáneamente ambas tecnologías, y determinar si existe mejora del proceso al combinarlas, respecto de la inactivación alcanzada de forma individual con cada una de ellas. Además, estudiar el efecto del tratamiento con FSC-CO₂+HPU sobre los atributos de calidad de las muestras tras su tratamiento y durante su almacenamiento en refrigeración es un aspecto que, hasta el momento, no se ha abordado con detalle.

1.6. Ultrasonidos de alta intensidad

Los ultrasonidos de alta intensidad o ultrasonidos de potencia (HPU, Intensidad > 1 W/cm²), representan una alternativa no-térmica para la conservación de alimentos. Hasta la fecha, los HPU no han sido aplicados en productos comerciales como tecnología de conservación, aunque se han llevado a cabo numerosas investigaciones en las que se ha demostrado que mejoran diferentes procesos agroalimentarios en los que intervienen procesos de transferencia de materia (Knorr y col., 2004; Chemat y col., 2011).

1.6.1. Definición

Los ultrasonidos pueden definirse como ondas acústicas que viajan a través del medio conductor produciendo zonas de compresión (alta presión) y descompresión o rarefacción (baja presión) (Figura 1.2), y cuya frecuencia supera a la del sonido audible por el oído humano (20 kHz). Dichas ondas forman un campo acústico que está definido por una frecuencia; velocidad acústica; longitud y amplitud de la onda; intensidad, presión, potencia e impedancia acústica; densidad de energía y atenuación (Ozuna, 2014).

- Longitud de onda [m], se define como la distancia entre dos planos en los que las partículas se encuentran en un mismo estado de vibración.

- Amplitud de onda [m], es el máximo desplazamiento de una partícula desde la posición de equilibrio.
- La frecuencia de onda [kHz], está definida como el número de ciclos completados por la onda o vibraciones producidas, por unidad de tiempo. En función de la frecuencia, las ondas acústicas se dividen en cinco grupos: infrasonido (<20 Hz), espectro audible (de 20 Hz a 18 kHz), ultrasonidos de baja frecuencia (de 18-100 kHz), ultrasonidos de alta frecuencia (de 100 kHz–1 MHz) y los ultrasonidos de diagnóstico (>1 MHz) (Chemat y col., 2011).
- La velocidad acústica [m/s], se define como la velocidad de propagación de la onda: cuando las partículas se mueven en dirección de propagación de la onda se llaman ondas longitudinales, si el movimiento es perpendicular, transversales, y cuando el movimiento de las partículas se lleva a cabo por la superficie, se denominan ondas de Rayleigh (Corona, 2013).
- La intensidad de una onda acústica [W/m^2], está definida como la energía media transmitida a través de una unidad de área perpendicular a la dirección de la onda por unidad de tiempo.
- La potencia acústica [W], es la energía total irradiada por la fuente ultrasónica por unidad de tiempo (Ozuna, 2014).
- La presión acústica [N/m^2], es la presión que existe entre las diversas zonas del medio. La presión es mayor en las zonas de mayor concentración de partículas y menor en las zonas dilatadas.
- La densidad de energía [J/m^3], está definida como la relación entre la intensidad acústica y la velocidad de propagación de la onda. La densidad de energía da idea de la cantidad energía que puede ser disipada en forma de calor debido al trabajo realizado por las partículas que se desplazan en sentido contrario a la fuerza ejercida por el medio de propagación.

- La impedancia acústica [MRayl], se puede definir como la relación entre la presión acústica y la velocidad de la vibración de la partícula. La diferencia de impedancia entre dos medios influirá en la proporción de energía reflejada con respecto a la energía transmitida en la interface entre ambos medios, ya sea en sistemas sólido-líquido o sólido-gas. Esto quiere decir que, si la proporción de energía reflejada es mayor que la transmitida, los efectos de los ultrasonidos serán más intensos en la interface presente entre los medios. Mientras que, si la energía transmitida es mayor que la reflejada, los efectos de los ultrasonidos serán más agudos en el interior del segundo medio (García-Pérez, 2007).

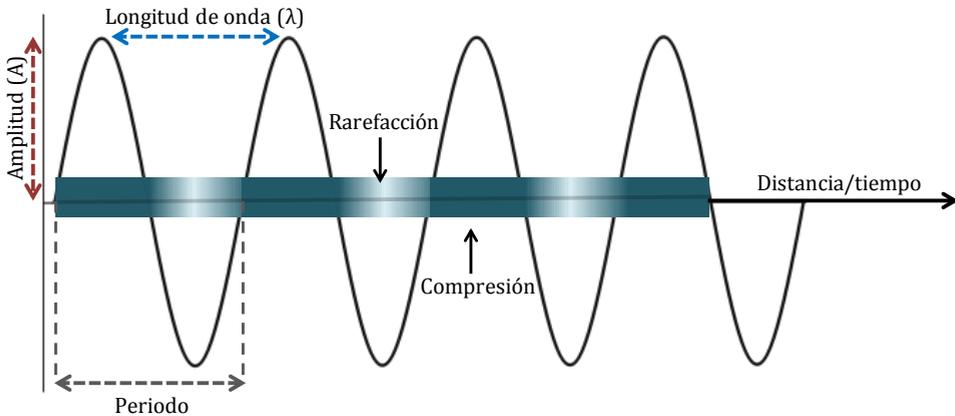


Figura 1.2 Propagación de la onda acústica, parámetros acústicos y zonas de compresión y rarefacción.

1.6.2. Sistemas de generación de ultrasonidos de potencia

En general, la producción de ultrasonidos consiste en transformar cualquier tipo de energía, en energía acústica. Todos los sistemas de ultrasonidos constan de tres partes fundamentales: generador, transductor y emisor. El generador es el encargado de transformar la señal eléctrica de la red, a la frecuencia y amplitud deseada; el transductor convierte la señal eléctrica de alta frecuencia en vibraciones mecánicas; y el emisor irradia la energía acústica generada por el transductor al medio a tratar (Cárcel, 2003).

Los transductores empleados habitualmente en procesos agroalimentarios pueden ser de dos tipos: magnetostrictivos y piezoeléctricos. En el presente apartado se describirán las características más importantes del transductor piezoeléctrico debido a que fue el tipo de transductor usado en la presente tesis doctoral.

Un transductor piezoeléctrico se basa en la generación de oscilaciones eléctricas, de una frecuencia determinada, sobre las caras de un cristal, este se contrae o se expande en función de la polaridad de las cargas eléctricas. Así, el paso de una corriente eléctrica alterna de elevada frecuencia, provocará la vibración del material, lo que dará lugar a la generación de una onda ultrasónica. Los cristales piezoeléctricos que pueden presentar dicho efecto son el cuarzo o bien, materiales cerámicos ferroeléctricos policristalinos, llamados comúnmente, cerámicas piezoeléctricas (García-Pérez, 2007). Dichas cerámicas están acopladas a elementos metálicos de alta calidad como el titanio que las aísla de un sobrecalentamiento. Una de las disposiciones más usadas en la aplicación de ultrasonidos es el sistema tipo “sándwich”. El cual consiste en montar un par de cerámicas conectadas con las polarizaciones en sentido opuesto, a las que se les suele acoplar dos cilindros metálicos que comprimen la estructura mediante un tornillo colocado en forma axial. De esta manera, la onda transmitida por cada transductor está relacionada con la longitud de los cilindros metálicos. Así, los transductores son conectados a sistemas vibrantes cuya función consiste en transmitir la vibración del transductor al medio y finalmente, es el cilindro frontal quien dirige la onda ultrasónica generada al medio de tratamiento (Ortuño, 2014).

1.6.3. Efectos de los HPU sobre diferentes medios de propagación

Medio líquido

Los sistemas de aplicación de HPU en medios líquidos usados comercialmente pueden ser baños de ultrasonidos y sistemas tipo sonda. Siendo este último, el tipo de sistema empleado en la presente tesis doctoral.

Los sistemas tipo sonda se basan en la transmisión al medio de la energía ultrasónica que produce el transductor mediante una sonda metálica. El sistema consta de un

generador, un transductor y una sonda que transmite la energía acústica al medio a tratar. La intensidad de la onda emitida, es decir, la amplitud de vibración de la punta de la sonda, se puede controlar cambiando la potencia suministrada por el generador. El material utilizado para la fabricación de las sondas debe tener una gran resistencia a la fatiga dinámica, bajas pérdidas acústicas y resistencia a la erosión que produce la cavitación (Cárcel, 2003).

En general las ondas ultrasónicas se propagan en los medios provocando diferentes efectos como la cavitación (Mason y col., 2012), mecanismos de compresión y rarefacción (Knorr y col., 2004), formación de radicales libres (O'Donnell, 2010), choques micro-mecánicos (Piyasena y col., 2003) y calentamiento (Mason y Lorimer, 2002). El tipo de efecto generado puede variar dependiendo de las características del medio donde son aplicados.

En medios líquidos, los HPU generan ciclos de compresión y rarefacción, de manera que cuando la energía ultrasónica alcanza un umbral, durante el ciclo de rarefacción se pueden superar las fuerzas de atracción que mantienen unidas a las moléculas y, a partir de núcleos de gas existentes, podrían aparecer burbujas de cavitación (Soria y Villamiel, 2010).

La **cavitación** puede ser producida de dos formas: transitoria y estable (Mason y col., 2003) (Figura 1.3). En la primera de ellas, las burbujas generadas por la cavitación se llenan de gas o vapor debido a oscilaciones irregulares, aumentando su tamaño e implosionando, provocando elevaciones de presión (~1000 bar) y temperatura (>4000 °C); en consecuencia, se pueden producir fuerzas de corte y **turbulencia** en la zona de cavitación. Este fenómeno podría favorecer el efecto de inactivación enzimática y la desintegración celular (Knorr y col., 2004; Pingret y col., 2013). La cavitación estable se refiere a la oscilación de las burbujas en un comportamiento regular durante los ciclos acústicos, pudiendo mantener un aumento y disminución de su tamaño hasta alcanzar dicha estabilidad y favoreciendo la formación de **microcorrientes** de alta intensidad en el líquido circundante. Esta micro-agitación puede estresar las especies biológicas favoreciendo la inactivación de microorganismos presentes en el medio (Chemat y col., 2011). La intensidad de la

cavitación y sus efectos dependerán de las características del medio, como son su viscosidad, las variables de proceso, la intensidad, frecuencia y presión ultrasónica (Cárcel y col., 2012; Chandrapala y col., 2012).

Por otra parte, cuando el colapso de las burbujas producidas por la cavitación se lleva a cabo en la cercanía de la superficie de un sólido, se puede generar una corriente de líquido que atraviesa la burbuja provocando que golpee la superficie del sólido. Este efecto es llamado “**microjet**” y permite el incremento de los fenómenos de transporte de materia y energía entre el sólido y el líquido, disminuyendo el espesor de la capa límite.

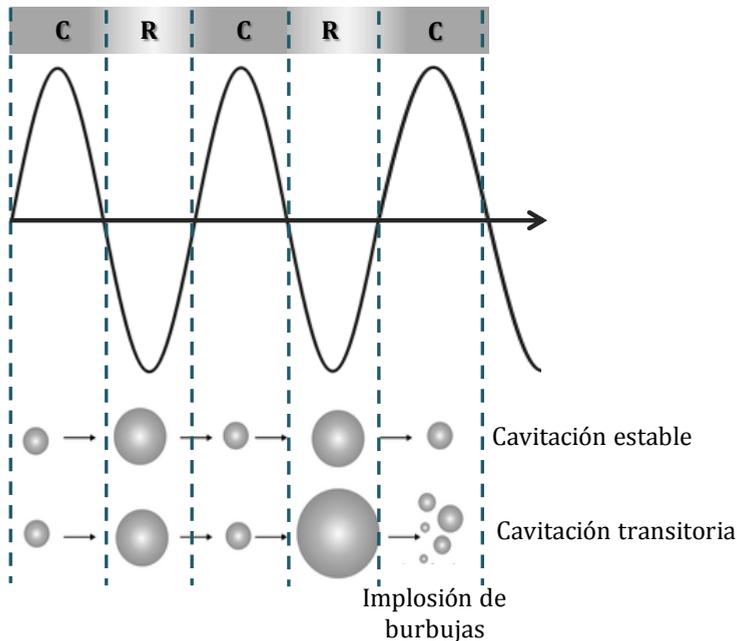


Figura 1.3 Burbujas de cavitación formadas durante los ciclos de compresión (C) y rarefacción (R).

En general, muchos de los efectos atribuidos a los ultrasonidos, ocurren en presencia de cavitación. Algunas consecuencias favorables producidas por la cavitación asociada a los HPU en procesos alimentarios son la desgasificación de líquidos, la aceleración de reacciones, la mejora de los procesos de extracción, el incremento de los índices de

emulsión y difusión y la inactivación microbiana, efecto producido por los HPU que será estudiado con detalle en la presente tesis.

Medio gaseoso

La propagación de los ultrasonidos en un medio gaseoso, como puede ser el aire durante los procesos de secado, es un reto importante debido a dos factores importantes, la gran diferencia de impedancia acústica entre los transductores y el gas y la alta atenuación ultrasónica en el medio (Riera y col., 2011). No obstante, cuando los ultrasonidos son aplicados de manera eficiente, se pueden intensificar los efectos en las interfases, de tal manera que tanto variaciones de presión como la formación de **micro-agitación**, pueden afectar a los fenómenos de transporte de masa y reducir la capa límite (Cárcel y col., 2007).

Hoy en día se han desarrollado sistemas ultrasónicos eficientes con un mejor acople de impedancias con el aire y alta capacidad de potencia. Los HPU pueden provocar intensos efectos en las interfases como variaciones de presión, velocidades y microcorrientes. Así, estos efectos pueden contribuir a la reducción de las resistencias externas en el transporte de masa y energía durante distintos procesos (Mulet y col., 2010). Por tanto, los HPU han permitido intensificar procesos distintos, desde la destrucción de espumas (Riera y col., 2006), hasta el secado de alimentos (Cárcel y col., 2012; Ozuna y col., 2014a).

Medio sólido

La propagación de los HPU en medios sólidos se lleva a cabo mediante ciclos alternantes de compresión y expansión generados por las ondas ultrasónicas en un denominado "**efecto esponja**". Es decir, cuando el material sólido está en contacto con un medio gaseoso, este estrés de compresión/descompresión, facilita los fenómenos de transferencia y salida de líquido del interior del material durante la fase de compresión (Cárcel y col., 2012). Cuando se trata de una matriz alimentaria sumergida en un medio líquido, éste puede entrar a la matriz durante la fase de expansión, favoreciendo la impregnación de los sólidos solubles disueltos en dicho líquido (Ozuna, 2014). En este último mecanismo, las fuerzas implicadas pueden ser

superiores a la tensión superficial que mantiene unidas a las moléculas de agua dentro de los capilares del material, creándose **microcanales** y facilitando los procesos de transferencia de materia (Ozuna y col., 2014b).

1.6.4. Aplicaciones de los HPU en la industria alimentaria

Los ultrasonidos han demostrado tener un efecto significativo en la intensificación de procesos asociados a la industria alimentaria en los que están involucrados fenómenos de transferencia de masa y calor (Cárcel y col., 2012), como por ejemplo aumentar la agitación, provocar la inestabilidad de las interfases, fricción, roturas mecánicas y efectos químicos, entre otros (Joice y Mason, 2008). Así, los HPU son aplicados generalmente para intensificar una amplia gama de procesos en la industria alimentaria tales como:

- Cocción y fritura: incrementa la transferencia de calor, permitiendo tiempos más cortos de cocción y mayor uniformidad de producto (Han y col., 2006).
- Cortado: se puede lograr rápidamente mediante vibraciones ultrasónicas en el borde de la herramienta de corte. Es usado para cortar alimentos muy blandos o congelados (Zahn y col., 2006).
- Dispersión, mezclado y homogenización: Mediante el fenómeno de cavitación se produce un mezclado turbulento de la interface líquido/líquido. Actualmente, se utiliza en la producción de salsas, mayonesa o la homogenización de la grasa en leche (Soria y Villamiel., 2010; Robles y col., 2012).
- Impregnación/deshidratación: Son efectivos durante procesos de deshidratación e impregnación de sólidos solubles, como azúcares en el caso de frutos y vegetales y sal en el caso de carne (Ozuna y col. 2014a). La aplicación de HPU provoca el aumento en la velocidad de difusión del agua. Cárcel y col. (2007) demostraron que la sonicación del sistema manzana-disolución permitió aumentar 117 % la difusividad del agua y 137 % el transporte de la solución azucarada hacia la manzana.

- Secado y liofilización: mejora los mecanismos asociados a la transferencia de masa y salida de agua del producto, debido a la posible ruptura de las paredes celulares y el incremento de los coeficientes de transferencia de masa tanto internos como externos (García-Perez y col., 2012; Rodríguez y col., 2014).
- Desgasificación y antiespumante: se realiza como tratamiento previo al enlatado o embotellado de bebidas (Jambrak y col., 2008).
- Ablandamiento de carne: los HPU pueden producir vibraciones mecánicas que permiten modificar la textura de la carne principalmente sobre la superficie de la misma. En consecuencia, se produce una modificación de la estructura y ablandamiento de la muestra (Jayasooriya y col., 2004).
- Extracción: permite la ruptura de las paredes celulares de las plantas, mejorando la penetración del solvente y aumentando el rendimiento de los extractos obtenidos de plantas, hierbas y semillas (Ahmad-Qasem y col., 2013). La aplicación de ultrasonidos en medios o fluidos supercríticos ha sido estudiada generalmente en procesos de extracción supercrítica en los cuales los HPU aumentan la velocidad de extracción y mejoran el rendimiento (Rodríguez y col., 2014).
- Inactivación microbiana y enzimática: Los ultrasonidos de potencia a bajas frecuencias (20–100 W) han mostrado un gran potencial para usarse como método de inactivación microbiana; permite la ruptura de las membranas celulares de los microorganismos favoreciendo la extracción de los constituyentes vitales para su actividad celular (Piyasena y col., 2003).

1.6.5. Aplicación de los HPU en procesos conservación e inactivación microbiana

Existen numerosos estudios sobre el efecto de los HPU como técnica de inactivación, aunque la eficacia de los mismos depende de muchos factores como el tipo de microorganismo, el volumen y características del medio donde se propagan los HPU, así como de los parámetros ultrasónicos empleados (Piyasena y col., 2003).

En la mayoría de los estudios, los HPU han sido aplicados en matrices líquidas, por tanto los mecanismos de inactivación microbiana asociados, son atribuidos al fenómeno de cavitación, al aumento puntual de la temperatura, a la formación de radicales libres, a la turbulencia, al esfuerzo cortante y a los ciclos de compresión y rarefacción (Knorr y col., 2004). El fenómeno de cavitación puede dañar las estructuras de los microorganismos, y favorecer los procesos de transferencia de materia desde el exterior al interior de las células y viceversa. Está demostrado que ondas ultrasónicas de alta intensidad pueden causar: ruptura de células, perturbar la membrana citoplasmática y la estructura interna de la célula además de la desnaturalización de enzimas (Piyasena y col., 2003).

Sin embargo, usando solo ultrasonidos los efectos no son suficientemente severos para reducir el contenido microbiano del producto alimentario y alcanzar niveles de inactivación adecuados, o bien son necesarias intensidades muy elevadas que conllevan un sobrecalentamiento del medio donde se aplican, causando una alteración del mismo. Por lo anterior, se ha estudiado la aplicación de HPU con otros factores de inactivación como son el incremento de la temperatura y presión o pHs extremos.

La combinación de HPU con temperaturas moderadas se denomina termosonicación y ha sido empleada para la inactivación de *E. coli* y *Salmonella enteritidis* en zumo de mango (Kiang y col., 2013). La termosonicación se ha empleado para inactivar enzimas de la microbiota de zumo de manzana (Abid y col., 2014). Para aumentar los efectos de la cavitación en los procesos de termosonicación, se añadió el efecto de la presión. Esta técnica da lugar a la manotermosonicación y ha sido probada con éxito en la inactivación de microorganismos en leche (Halpin y col., 2013) o en la inactivación de enzimas del tomate (Vercet y col., 2002).

La ventaja principal del uso de la termosonicación frente al proceso de pasteurización, es que las temperaturas empleadas son menores que las asociadas a los tratamientos térmicos. En consecuencia, mediante la termosonicación se pueden mantener muchas de las propiedades organolépticas que se pierden a causa de los tratamientos térmicos, disminución en la intensidad de color, sabor a cocido y finalmente, se consigue un ahorro energético considerable.

1.6.6. Efecto de los HPU en las propiedades fisicoquímicas de los alimentos

La influencia de la aplicación de HPU en los procesos alimentarios sobre los parámetros de calidad y estructura de los productos, ha sido estudiada ampliamente en matrices líquidas. Sin embargo, en matrices sólidas existen menos estudios sobre la aplicación de HPU para la intensificación de los procesos y el efecto sobre la calidad del producto, destacando el salado/desalado de queso (Sánchez y col., 2000) y carnes (Ozuna y col., 2013; 2014b), la deshidratación osmótica/impregnación de frutas y vegetales (Cárcel y col., 2007) y el secado convectivo de vegetales (Puig y col., 2012),

Sánchez y col. (2000) encontraron que el salado de quesos llevado a cabo con HPU permitía obtener quesos con mejor sabor y un aroma más intenso que el salado convencional. Esos cambios fueron atribuidos al aumento en el contenido de ácidos grasos y aminoácidos libres durante el proceso de maduración, debido a la ruptura de los glóbulos grasos y desnaturalización de las proteínas en presencia del campo acústico.

Por otra parte, el efecto de la aplicación de HPU en muestras cárnicas, ha sido abordado en dos sentidos: modificación de la textura de la carne para provocar su ablandamiento, llamado comúnmente "Tenderización" (Jayasooriya y col., 2007) o bien, para acelerar mecanismos de transferencia de materia (agua y sal) durante los procesos de salado (Ozuna y col., 2013) y desalado de carne (Ozuna y col., 2014).

Jayosooriya y col. (2007) estudiaron el efecto de la aplicación de HPU (24 kHz, 12 W/cm²) sobre la textura, color, pH y pérdidas por goteo y cocinado en dos cortes distintos de carne de ternera. Los autores observaron que la aplicación de HPU afectó positivamente la textura de todas las muestras de carne, obteniendo reducciones

significativas en la fuerza de compresión y un ablandamiento de las mismas tras el tratamiento con HPU. Además, aunque mostraron una reducción del pH, no mostraron cambios significativos en el color, ni tuvieron pérdidas por goteo o cocinado para ninguna de las muestras tratadas. Esto indica que la aplicación de HPU es capaz de reducir la textura a niveles deseados sin comprometer los parámetros de calidad.

Durante el salado de carne de cerdo (*Longissimus dorsi*) asistido de HPU, Ozuna y col. (2013) observaron que la concentración de la salmuera en la cual era sumergida la muestra de carne, no solo determinó la concentración final de sal en la muestra tras el tratamiento, también definió la dirección del transporte (agua y sal) entre la solución y la carne y en consecuencia, modificaciones significativas en la textura de la carne tratada con HPU. Una mayor concentración de sal en la salmuera, provocó una mayor concentración de sal final en la muestra. Así, las muestras que obtuvieron mayor ganancia de sal, experimentaron mayores cambios en la textura de la carne generando valores de dureza más elevados, es decir, muestras más duras. Al igual que en muestras de queso (Sánchez y col., 2001), la dureza de las muestras fue atribuida a la modificación de la estructura de las proteínas y a concentraciones mayores de sal, debido principalmente a reacciones de proteólisis y lipólisis que se llevan a cabo durante el tratamiento con HPU. Por otro lado, la tenderización de la carne ha sido asociada sustancialmente a la naturaleza destructiva de la cavitación (Jayasooriya y col., 2004).

Por otra parte durante el proceso de secado convectivo, Schössler y col. (2012), estudiaron los parámetros de calidad afectados por la aplicación de HPU durante el proceso de secado de zanahoria (60 °C) y patata (70 °C). Estos autores observaron menores cambios en el contenido de azúcares, compuestos fenólicos y capacidad antioxidante en los productos, respecto a las muestras secadas sin HPU. Igualmente, Puig y col. (2012) indicaron que la aplicación de HPU durante el proceso de secado favoreció la conservación de la estructura de calabacín gracias a que, usando una potencia moderada de HPU (45 W), no fueron necesarios tiempo de secado tan largos, comparados con los tiempos de secado sin HPU.

A pesar de que la combinación de HPU con temperatura y presión favorece los mecanismos de inactivación, existen limitaciones que hacen necesaria la combinación de HPU con otras tecnologías no térmicas. Entre estas limitaciones se puede citar el deterioro generado en el alimento debido a la cavitación y a las altas temperaturas asociadas a ésta, y la elevada cantidad de energía disipada al aumentar la distancia entre el emisor de ultrasonidos y el medio receptor.

1.7. Combinación de FSC-CO₂ y HPU

La combinación de FSC-CO₂ y HPU ha sido ampliamente estudiada para procesos de extracción, tal y como se ha especificado anteriormente. Sin embargo, la combinación de ambas tecnologías para procesos de inactivación microbiana se ha desarrollado recientemente.

1.7.1. Efecto del tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU sobre la inactivación microbiana

Ortuño y col. (2012b, 2013a, 2014a, 2014b) y Cappelletti y col. (2014) estudiaron la aplicación simultánea de FSC-CO₂+HPU en sistemas líquidos, es decir, donde el medio de propagación de los HPU es una disolución. Por otra parte, Spilimbergo y col. (2014) y Ferrentino y Spilimbergo (2015) han abordado la aplicación de FSC-CO₂+HPU como técnica de inactivación en matrices sólidas (jamón curado y zanahoria, respectivamente), por tanto el medio de propagación de los HPU es un medio supercrítico, donde la muestra sólida se encuentra inmersa.

Ortuño y col. (2012b), estudiaron el efecto de aplicar HPU en la inactivación de *E. coli* (10⁷ UFC/ml) en medio LB mediante FSC-CO₂ a diferentes condiciones de presión (100–350 bar) y temperatura (31–41 °C). Por otra parte, Ortuño y col. (2013a) realizaron el mismo estudio en medio de cultivo YPD inoculado con células de *S. cerevisiae* (10⁷ UFC/ml). Ambos tratamientos fueron llevados a cabo bajo las mismas condiciones de proceso. En los dos estudios, los autores encontraron que los HPU aceleraron drásticamente la velocidad de inactivación de ambos microorganismos. Usando FSC-CO₂, se necesitaron al menos 20 min para lograr la inactivación total de *E. coli* a la máxima presión de trabajo (350 bar; 36 °C), y bajo estas mismas condiciones

de tratamiento, no se produjo ninguna reducción en la población de *S. cerevisiae* en medio YPD. Mientras que, empleando el tratamiento combinado de FSC-CO₂+HPU, se redujo a sólo 2 min, el tiempo necesario para lograr reducir totalmente la población de *E. coli* y *S. cerevisiae* para todas las condiciones de presión y temperatura estudiadas. Este efecto fue atribuido al fenómeno de cavitación generada por los HPU, el cual podría dañar la pared celular de los microorganismos, acelerando su inactivación. Además, el estudio de la existencia de un posible efecto sinérgico entre ambas tecnologías reveló que la combinación de FSC-CO₂ y HPU tuvo un mayor efecto en la inactivación, que la adición de los efectos individuales de ambas técnicas.

Adicionalmente, para conocer los mecanismos de inactivación asociados al tratamiento combinado (FSC-CO₂+HPU) y determinar el daño celular asociado a la inactivación provocada por los tratamientos de FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU sobre las células de *E. coli* y *S. cerevisiae*, Ortuño y col. (2014b), realizaron un estudio morfológico, usando microscopía óptica (LM) y microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las imágenes en ambas técnicas mostraron que el tratamiento mediante FSC-CO₂, produjo una distribución irregular del contenido citoplasmático y aparecieron pequeñas modificaciones en la envoltura celular, sin embargo estos cambios no fueron letales para las células de *E. coli* ni de *S. cerevisiae*. Mientras que tras 5 min de tratamiento con FSC-CO₂+HPU ambos microorganismos fueron totalmente inactivados y las imágenes de LM y TEM revelaron mayor proporción de regiones vacías dentro de las células tratadas lo cual indica una clara reducción del contenido citoplasmático. La envoltura de las células de *E. coli* se desintegró totalmente, mientras que en *S. cerevisiae*, las paredes celulares perdieron la estructura parcialmente y en algunas partes se observaron roturas. Esto confirma que los mecanismos de inactivación asociados al FSC-CO₂+HPU están relacionados con el fenómeno de cavitación generado por los HPU, el cual daña bruscamente la envoltura celular incrementando tanto la ruptura de la membrana celular como la desintegración del contenido intracelular.

En alimentos líquidos, Ortuño y col. (2014a, 2014b) estudiaron las cinéticas de inactivación de *E. coli* y *S. cerevisiae* en zumo de naranja y zumo de manzana, respectivamente. Los autores compararon los resultados obtenidos en ambos trabajos

con los obtenidos en trabajos anteriores por Ortuño y col. (2012b) y Ortuño y col., (2013a). En promedio, la inactivación de ambos microorganismos mediante FSC-CO₂+HPU en zumo de manzana (5.3 min) fue más lenta que en zumo de naranja (4.6 min) y, en ambos zumos fue más lenta que en medios de cultivo (1.5 min). Los autores asociaron este efecto a que, el alto contenido de azúcares en ambos zumos retiene parte del agua del medio, lo que podría dificultar la solubilidad del CO₂ en el mismo disminuyendo la velocidad de inactivación.

Por otro lado, Cappelletti y col. (2014) estudiaron la aplicación del tratamiento combinado de FSC-CO₂ y HPU sobre agua de coco. Los autores mostraron que para conseguir una reducción adecuada (5 ciclos-log) de la microbiota en el agua de coco mediante el tratamiento con FSC-CO₂ (120 bar, 40 °C) fueron necesarios 30 min, mientras que, aplicando HPU se consiguió reducir totalmente la microbiota en sólo 15 min bajo las mismas condiciones de tratamiento. Además, respecto al estudio de vida útil, los autores observaron que el agua de coco tratada sólo con FSC-CO₂ (120 bar, 40 °C, 30 min) presentó un crecimiento de los microorganismos durante su almacenamiento, mientras que el agua de coco tratada con la técnica combinada de FSC-CO₂+HPU (120 bar, 40 °C, 15 min, 10 W) aseguró una vida útil del producto de 4 semanas.

Esto demuestra que la aplicación de HPU en medios líquidos tratados mediante FSC-CO₂ puede garantizar un efecto antimicrobiano en dos sentidos: los HPU permiten intensificar los mecanismos de inactivación propios del CO₂, favoreciendo una rápida saturación del medio como consecuencia de su agitación y turbulencia, promoviendo el contacto con los microorganismos (Ortuño y col., 2013a; Cappelletti y col., 2014) y, por otra parte la aplicación simultánea de FSC-CO₂+HPU ha demostrado causar severos daños en la membrana celular de los microorganismos (*E. coli* y *S. cerevisiae*), permitiendo la salida de los constituyentes vitales y causando la muerte de los microorganismos (Ortuño y col., 2014b).

Recientemente, Spilimbergo y col. (2014) y Ferrentino y Spilimbergo (2015), evaluaron la viabilidad de aplicar el tratamiento combinado de FSC-CO₂+HPU como técnica de inactivación microbiana en muestras sólidas (Tabla 1.5). Los resultados en

ambos trabajos mostraron que los tratamientos llevados a cabo sólo con HPU, no fueron capaces de inactivar ninguno de los tipos de células durante todo el tiempo de tratamiento estudiado. Mientras que, para reducir totalmente la población de *L. monocytogenes* en muestras de jamón curado, solo fueron necesarios 5 min usando FSC-CO₂+HPU (120 bar, 35 °C, 10 W) y 30 min empleando FSC-CO₂.

Igualmente, Ferrentino y Spilimbergo (2015) observaron que el tratamiento de HPU no redujo la población de *E. coli* durante 30 min de tratamiento. Mientras que, empleando FSC-CO₂+HPU (100 bar, 35 °C, 10 W) fueron necesarios solo 3 min para inactivar totalmente la población de *E. coli* (8 ciclos-log) y 10 min empleando FSC-CO₂. Por otro lado, observaron que tras 15 min de tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU (120 bar, 40 °C, 10 W) lograron reducir 4 y 2 ciclos-log de mesófilos y bacterias ácido-lácticas, respectivamente, en muestras de zanahoria.

Tabla 1.5 Estudios recientes sobre la inactivación microbiana en diferentes matrices alimentarias sólidas mediante FSC-CO₂+HPU.

Alimento	Condiciones	Microorganismo	Resultados	Referencia
Jamón curado	<ul style="list-style-type: none"> • 120 bar • 35 °C • 5 min • 10 W 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>L. monocytogenes</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • 8 ciclos-log (inactivación total) 	Spilimbergo y col., (2014)
Zanahoria	<ul style="list-style-type: none"> • 120 bar • 40 °C • 15 min • 10 W 	<ul style="list-style-type: none"> • Mesófilos • Bacterias ácido-lácticas 	<ul style="list-style-type: none"> • 3.7 log • 2.5 log 	Ferrentino y Spilimbergo (2015)
	<ul style="list-style-type: none"> • 100 bar • 35 °C • 3 min • 10 W 	<ul style="list-style-type: none"> • <i>E. coli</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • 8 log 	

1.7.2. Efecto del tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos.

Existen pocas referencias que revelen el efecto de la técnica combinada mediante FSC-CO₂ y HPU sobre las propiedades fisicoquímicas de los alimentos. Ortuño y col. (2014a) estudiaron el contenido de la enzima pectinmetilesterasa en el zumo de naranja tras el tratamientos con FSC-CO₂+HPU. Los resultados de la investigación muestran que el tratamiento permitió una inactivación más rápida que con el tratamiento sólo con FSC-CO₂, observando que la actividad residual de la enzima disminuyó con el tiempo de tratamiento y con el incremento de presión y temperatura.

Recientemente, Spilimbergo y col. (2014) estudiaron el efecto de aplicar FSC-CO₂+HPU sobre los atributos de calidad (pH, acidez titulable, color) de jamón curado (Tabla 1.6). Además, realizaron el estudio de vida útil de muestras tras 5 min de tratamiento a 120 bar y 35 °C (10 W). Los resultados no mostraron diferencias significativas en general, entre las muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU y el tratamiento sólo con FSC-CO₂. Por otro lado, el estudio de vida útil reveló que, en las muestras de jamón curado tratadas mediante FSC-CO₂+HPU, no se detectó la presencia de *L. monocytogenes* inoculada en las muestras, durante todo el tiempo de almacenamiento estudiado (4 semanas).

Por otro lado, Ferrentino y Spilimbergo (2015) estudiaron distintos parámetros de calidad medidos instrumentalmente (pH, color, textura) así como los parámetros del análisis sensorial en muestras de zanahoria tras 5 min de tratamiento con FSC-CO₂+HPU (120 bar, 40 °C, 10 W) (Tabla 1.6). Los resultados mostraron que el tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU afectó significativamente a los atributos de calidad de las muestras de zanahoria. Estas observaciones coinciden con los resultados descritos anteriormente por Spilimbergo y col. (2013), quienes obtuvieron claras diferencias entre las muestras tratadas mediante FSC-CO₂ y las muestras control.

Tabla 1.6 Efecto del tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU sobre las propiedades fisicoquímicas y nutricionales de diferentes alimentos sólidos.

Alimento	Condiciones	Análisis	Resultados	Referencia
Jamón curado	<ul style="list-style-type: none"> • 100 bar • 50 °C • 10 min 	<ul style="list-style-type: none"> • pH • Acidez Titulable (AT) • Color 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ No alteró el pH ni la AT ✓ No hubo cambios de color 	Spilimbergo y col. (2014)
Zanahoria	<ul style="list-style-type: none"> • 100 bar • 40 °C • 40 min 	<ul style="list-style-type: none"> • Color • Textura • Análisis sensorial 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ No hubo cambios de color × Reducción del 92 % en la firmeza × Cambios en apariencia, textura y sabor 	Ferrentino y Spilimbergo (2015)

✓ Favorable

× Desfavorable

1.8. Modelización matemática de la inactivación microbiana en alimentos

En la industria alimentaria la introducción de cualquier tecnología emergente o bien la combinación con tecnologías tradicionales, implica el conocimiento de los mecanismos del proceso y su optimización. Por ello, se requiere la implementación de estrategias que sean rápidas y seguras para evaluar los riesgos microbiológicos asociados al consumo de alimentos y modelos de predicción. Así, el estudio de las cinéticas de crecimiento e inactivación provee información que puede ser utilizada para predecir la seguridad microbiológica de los alimentos y su vida útil.

Los modelos son descripciones simplificadas de un espacio de la realidad que puede reflejar lo que sucede en el proceso y predecir con precisión las relaciones existentes. En particular, los modelos microbianos y sus parámetros cinéticos son esenciales para desarrollar procesos de conservación que garanticen su inocuidad. Dichos parámetros, permiten comparar la habilidad de distintos procesos tecnológicos para reducir poblaciones microbianas (Coronel y col., 2011). Por lo tanto, la microbiología cuantitativa es uno de los enfoques más útiles para determinar las condiciones

óptimas de los procesos de conservación y entender el comportamiento de los sistemas biológicos (Alzamora y col., 2009).

Los modelos se clasifican, según el esquema propuesto por Whiting y Buchanan (1993), en modelos primarios y secundarios.

Los **modelos primarios** son aquellos que describen la evolución del número de microorganismos en función del tiempo, bajo unas condiciones particulares del entorno. La respuesta se mide directamente mediante el recuento total de microorganismos, formación de compuestos de interés, concentración de sustrato o metabolito formado; o bien, de forma indirecta por ejemplo, mediante la medición de la densidad óptica. Los datos experimentales proporcionan información sobre los parámetros cinéticos o tasa de crecimiento, muerte o supervivencia de la población.

Dentro de esta clasificación, las cinéticas de inactivación de microorganismos (principalmente por tratamiento térmico) son ajustadas convencionalmente mediante cinéticas de primer orden. Donde, las curvas de supervivencia de células y esporas microbianas están regidas por una relación lineal entre el logaritmo decimal del número de microorganismos supervivientes y el tiempo de tratamiento a una temperatura o presión dada (Fig. 1.4 a). Generalmente, una curva con este comportamiento, indica que todas las células presentes tienen la misma resistencia al agente letal (temperatura o presión) y cada microorganismo tiene la misma probabilidad de morir (Peleg, 2006) y se expresa mediante la Ec. 1.1.

$$\log\left(\frac{N}{N_0}\right) = -\frac{t}{D} \quad (t \geq 0) \quad (\text{Ec. 1.1})$$

Donde, N_0 es la concentración de microorganismos presentes en la muestra inicialmente; N , es la fracción superviviente en un tiempo (t) dado y D es el tiempo de reducción decimal (min).

La aplicación de cinéticas de primer orden se ha usado durante mucho tiempo en la microbiología cuantitativa, para conocer el valor D (min) en procesos térmicos de conservación y para conocer las combinaciones tiempo-temperatura óptimos en la

pasteurización o esterilización de alimentos (Mafart y col., 2002). El valor D , es el inverso de la constante de velocidad k : $D = \ln(10)/k = 2.303/k$ (Buzrul y col., 2005). El D -valor es el tiempo necesario para reducir una décima parte el tamaño de la población microbiana, lo cual nos permite conocer la resistencia (térmica) de un microorganismo. Sin embargo, este valor D no es suficiente para explicar el comportamiento de las curvas de supervivencia de tipo semi-logarítmicas con patrones más complejos como se presenta en la Figura 1.4 b-d (Aragao y col., 2007).

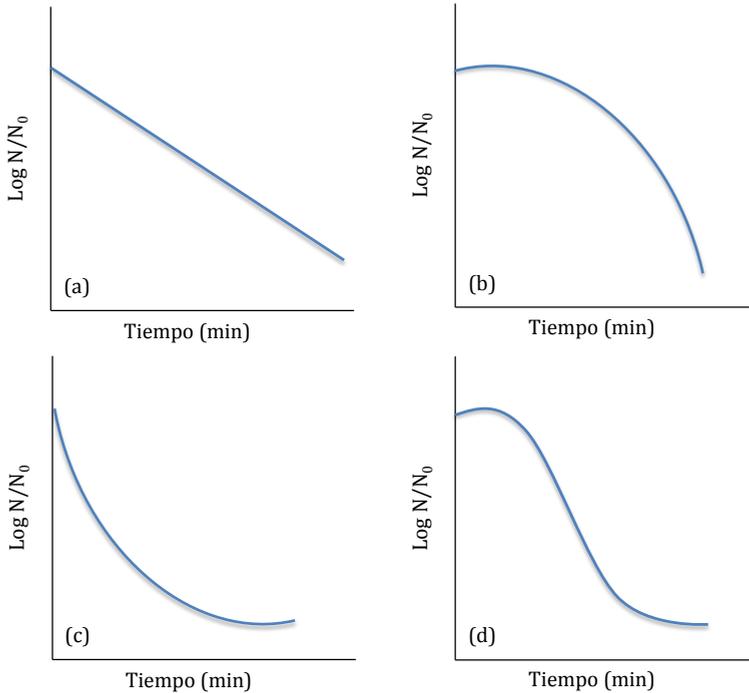


Fig. 1.4 Comportamiento de las curvas de inactivación microbiana. (a) Logarítmica lineal, (b) Con hombro, (c) Con cola, (d) Sigmoidea.

En este sentido, el modelo de Weibull (Ec. 1.2) supone un espectro de resistencias en la población microbiana frente al tratamiento; de forma que, algunos microorganismos se destruyen más pronto que otros, y por tanto, la forma de la curva de supervivencia se determina por una distribución de su sensibilidad al tratamiento (Ferrentino y col., 2014). Este comportamiento puede dar lugar a las curvas mostradas en la Figura 1.4. Las principales ventajas del modelo, son su simplicidad y

su capacidad de modelizar tanto curvas de supervivencia lineales como patrones complejos (Peleg, 2006).

$$\log(N/N_0) = -b \times t^n \quad (\text{Ec. 1.2})$$

En este modelo a diferencia de la Ec. 1.1, se introducen los parámetros cinéticos b y n , donde b es considerado un parámetro no lineal relacionado con la velocidad de inactivación y n es el parámetro que indica la forma de la curva; así cuando $n > 1$, la curva resultante es cóncava hacia abajo y con presencia de hombros (Figura 1b); cuando $n < 1$, la forma es cóncava hacia arriba o presencia de colas (Fig. 1c) y cuando $n=1$ la curva de supervivencia tiene una forma logarítmico-lineal (Figura 1a).

Los **modelos secundarios** se construyen a partir de ecuaciones que describen la variación de los parámetros de crecimiento o inactivación, obtenidos en los modelos primarios, en función de uno o más factores, ya sean extrínsecos (temperatura, presión, tiempo), intrínsecos (pH, contenido de agua) o implícitos (microorganismo gram + o gram -, fase de crecimiento). Entre los modelos secundarios destacan el modelo de Gompertz modificado, el modelo bifásico, los modelos log-logísticos, el modelo de Peleg y el modelo de Weibull, siendo este último uno de los más usados, y más simples (Peleg, 2006).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Las tecnologías de FSC-CO₂ y HPU, aplicadas de forma individual, han sido estudiadas ampliamente, mostrando su efectividad para procesos de inactivación de microorganismos y enzimas en medios de cultivo y zumos de frutas. No obstante, en ciertas ocasiones se requiere de tiempos de tratamiento excesivamente largos o de presiones y temperaturas elevadas, lo que encarece el proceso, pudiendo llegar a dañar las propiedades organolépticas y nutricionales de los alimentos tratados.

Por esta razón, algunos autores han estudiado la aplicación de HPU simultáneamente al tratamiento de FSC-CO₂ en matrices líquidas, reduciendo notablemente los tiempos de tratamiento necesarios para alcanzar la inactivación total de la población microbiana, empleando condiciones de temperatura y presión moderadas.

En este contexto, el objetivo principal de la presente Tesis Doctoral fue estudiar la influencia de los ultrasonidos de potencia (HPU) en tratamientos de inactivación microbiana mediante fluidos supercríticos (FSC-CO₂) en matrices cárnicas.

Se pretende estudiar la influencia de la presión, temperatura y tiempo, en distintos sistemas de tratamiento mediante FSC-CO₂ para inactivar células de *E. coli*. Para conocer el efecto de la naturaleza del medio y de la matriz donde se encuentran los microorganismos, se realizarán tratamientos de inactivación usando un inóculo de células de *E. coli* sobre tres matrices cárnicas de diferentes características (pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado), sumergidas o no en una disolución salina (DI), usando el tratamiento con FSC-CO₂ por sí solo o mediante la combinación del mismo con HPU (FSC-CO₂+HPU). Se usarán modelos matemáticos para describir el comportamiento de las curvas de inactivación experimental, incluyendo los parámetros del proceso como variables de los modelos matemáticos. Además, se desea analizar el efecto de los distintos sistemas de tratamiento mediante FSC-CO₂ sobre diferentes atributos de calidad de las muestras cárnicas y su vida útil durante el almacenamiento en refrigeración.

Para la consecución del objetivo general de la presente Tesis Doctoral se planteó el desarrollo de los siguientes objetivos particulares:

- Evaluar el efecto de las condiciones de proceso, presión, temperatura y tiempo, mediante FSC-CO₂, sobre la inactivación de *E. coli* inoculada en pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado.
- Determinar la influencia de los HPU sobre la inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂, en diferentes matrices cárnicas
- Determinar la influencia de sumergir las muestras cárnicas en una disolución salina (DI) sobre el nivel de inactivación alcanzado mediante FSC-CO₂.
- Comparar el efecto de los HPU sobre la inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂ en muestras cárnicas sumergidas en una DI.
- Comparar el efecto combinado del uso de FSC-CO₂ y HPU frente al efecto individual de ambas tecnologías, en muestras sumergidas en DI.
- Desarrollar modelos matemáticos que describan la inactivación de *E. coli* mediante diferentes sistemas de inactivación de FSC-CO₂ (FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU, FSC-CO₂+DI, FSC-CO₂+HPU+DI), incluyendo presión y temperatura como variables del modelo.
- Estudiar la influencia de los sistemas de tratamiento mediante FSC-CO₂ sobre diferentes atributos de calidad (color, textura, humedad y grasa) de las muestras cárnicas y el efecto de ambas tecnologías (FSC-CO₂+HPU) sobre la microestructura de la matriz.
- Estudiar la evolución de los atributos de calidad (color, textura, pH y humedad) y de la microbiota presente en las muestras cárnicas tratadas y envasadas, durante su almacenamiento en refrigeración.

CAPÍTULO 3

METODOLOGÍA

3. METODOLOGIA

3.1. Plan de trabajo

Para alcanzar los objetivos planteados en la presente Tesis Doctoral, se desarrolló un plan de trabajo general que se muestra en la Figura 3.1. Dicha estructura se agrupó en cuatro apartados, que se corresponden con los capítulos reflejados en el apartado de resultados. El primer capítulo de Resultados engloba el estudio de las cinéticas de inactivación de *E. coli* mediante CO₂ supercrítico (FSC-CO₂) en tres matrices diferentes: pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado; el segundo capítulo describe los modelos matemáticos usados para describir los datos experimentales obtenidos en las curvas de inactivación, el tercer y cuarto apartados abordan el análisis de los parámetros de calidad y el estudio de almacenamiento y vida útil, respectivamente, realizado en las muestras cárnicas tratadas y control.

En concreto, en el primer capítulo de Resultados (**Capítulo 4.1**) se estudiaron las cinéticas de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado de cerdo, mediante FSC-CO₂ y se evaluó el efecto de las variables del proceso: presión, temperatura y tiempo, sobre la viabilidad del microorganismo. Además, partiendo de la tecnología combinada de FSC-CO₂+HPU, desarrollada por Ortuño y col. (2012b) para la inactivación de microorganismos en matrices líquidas; en el presente trabajo se desarrolló un soporte para matrices sólidas acoplado al sistema de FSC-CO₂+HPU. Empleando dicho sistema, se estudió el efecto de los HPU sobre las cinéticas de inactivación de *E. coli* en las citadas matrices cárnicas con FSC-CO₂. Por otro lado, dado que numerosos autores han demostrado que la inactivación mediante FSC-CO₂ en matrices sólidas presenta una mayor dificultad que en matrices líquidas (Calvo y col., 2007), se ha evaluado el efecto de la adición de una disolución salina (DI) en la inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU.

En el segundo capítulo (**Capítulo 4.2**), se aplicaron diferentes modelos matemáticos para describir las cinéticas de inactivación microbiana, incluyendo la presión y la temperatura del tratamiento como variables del modelo. En el caso de las muestras de jamón curado, se utilizó la metodología de superficie de respuesta para determinar las condiciones óptimas de cada tratamiento empleado (FSC-CO₂+HPU y FSC-

CO₂+HPU+DI). Para ello se empleó un diseño central compuesto que evaluó el efecto de las tres variables del proceso: presión, temperatura y tiempo. Dicho estudio permitió conocer, para cada tratamiento, el valor óptimo de las variables que permitan maximizar la tasa de inactivación de *E. coli*.

La presente Tesis Doctoral es de los primeros trabajos que estudian la inactivación de microorganismos en matrices sólidas mediante FSC-CO₂+HPU. Con el objetivo de conocer el efecto de dicha tecnología sobre las propiedades físico-químicas de las matrices tratadas, se estudiaron diferentes parámetros: color, humedad, grasa, textura y microestructura, tras los tratamientos mediante FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU, FSC-CO₂+DI, FSC-CO₂+HPU+DI y HPU+DI (**Capítulo 4.3**).

El último capítulo de Resultados (**Capítulo 4.4**) evalúa el tiempo de vida útil de las muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU bajo las condiciones de proceso óptimas encontradas a partir de los ANOVA's (muestras de pollo y jamón de pavo) o de la metodología de superficie de respuesta (muestras de jamón curado). Para llevar a cabo dicho estudio se realizaron análisis periódicos de muestras tratadas y de muestras control (sin tratamiento) a los 10, 20 y 30 días de almacenamiento en refrigeración (4 °C), evaluándose color, humedad, textura, pH y la microbiota presente.

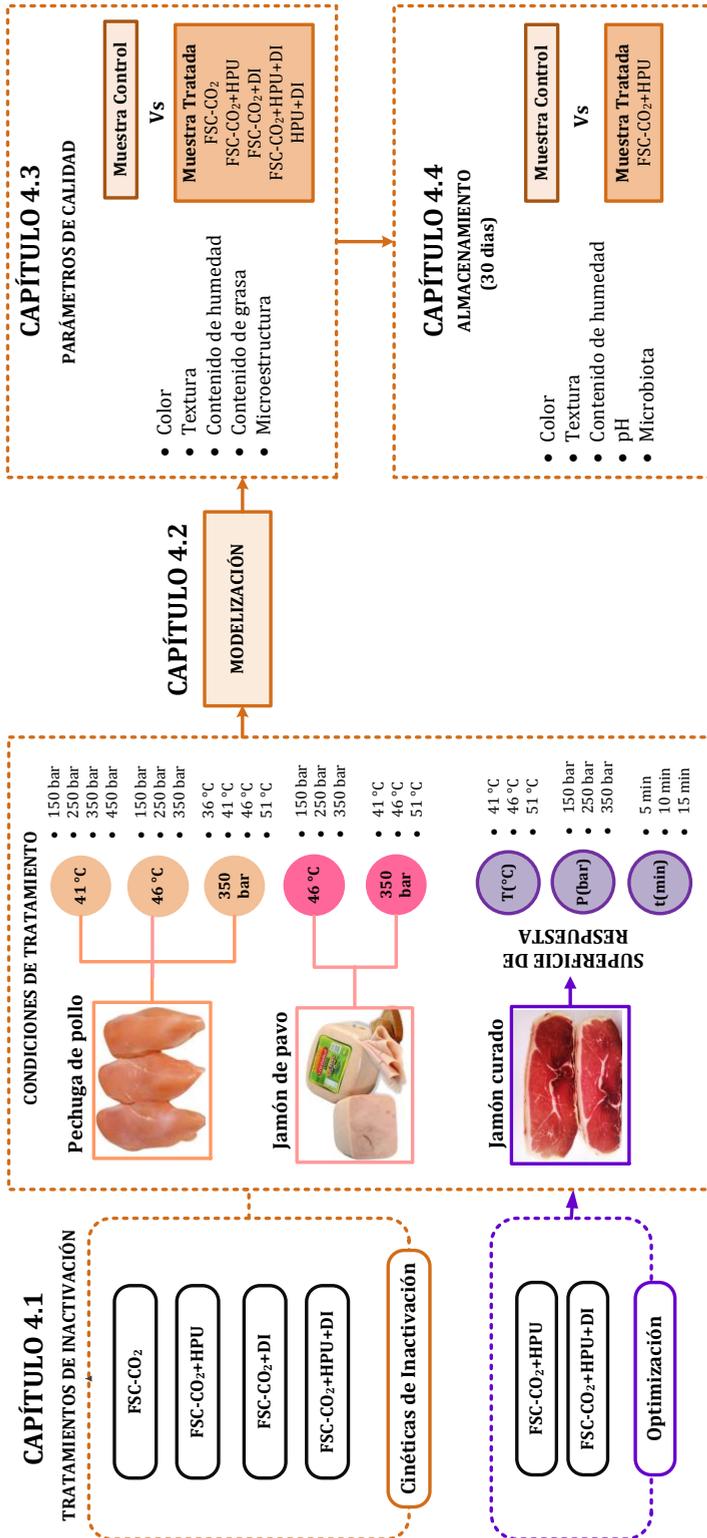


Figura 3.1 Plan de trabajo

3.2. Preparación del cultivo e inóculo

El microorganismo empleado en los estudios de inactivación fue la bacteria *Escherichia coli* DH1 (*E. coli*) (genotipo cromosómico: endA1 gyrA9, thi-1, hsdR179 (rK-,mK+) supE44,relA1). El cultivo madre se mantuvo en Luria Bertani Agar (LB Agar, Sigma-Aldrich, USA) almacenado a 4 °C y se resembró mensualmente en nuevas placas de LB Agar.

Para preparar el inóculo de *E. coli* que posteriormente fue inoculado en la matriz correspondiente, se partió de un cultivo starter. Dicho cultivo se preparó inoculando una colonia de *E. coli* en 50 mL de Luria Bertani Broth (LB Broth, Sigma-Aldrich, USA) a 37 °C y se dejó crecer toda la noche en una cámara incubadora (J.P. SELECTA, Modelo 3000957, Barcelona, España) situada sobre un agitador orbital a 120 rpm (J.P. SELECTA, Rotabit Modelo 3000974, Barcelona, España). 100 µL de ese cultivo se inocularon en 50 mL de LB Broth estéril y se incubó a 37 °C durante 18 h, tiempo tras el cual se obtuvieron las células de *E. coli* en fase estacionaria temprana (Ortuño y col., 2012a). Transcurrido dicho tiempo, se centrifugaron 15 mL de la suspensión microbiana a 2600 g y 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante fue descartado y el precipitado fue resuspendido en 50 mL de solución salina estéril (SS, 0.85% w/w) hasta una concentración de 10⁸ UFC/mL. Finalmente, usando una micropipeta (SOCOREX Acura 825, 20-200 µL, Suiza), 100 µL de dicha solución fueron inoculados sobre la superficie de las muestras cárnicas para obtener una concentración en la muestra previa al tratamiento de aproximadamente 10⁶ UFC/g.

3.3. Materia prima y preparación de las muestras

Las matrices cárnicas empleadas fueron pechuga de pollo sin piel, jamón de pavo y jamón curado de cerdo, que se adquirieron en un mercado local. Las muestras de cada matriz se obtuvieron de forma similar (Figura 3.2) en una zona de trabajo aséptica. Todos los utensilios de corte empleados fueron de acero inoxidable esterilizados a la llama. Las muestras de jamón de pavo y jamón curado se cortaron con una loncheadora comercial (Braher Modelo IFFACO 300, España) con un espesor de 1 ± 0.2 cm. En el caso de la pechuga de pollo, se cortaron manualmente filetes hasta obtener un espesor entre 1 y 1.5 cm. Posteriormente, para la obtención de los cilindros de carne, se empleó un sacabocados de 3.3 cm de diámetro. Las muestras cárnicas cortadas, se colocaron en placas Petri estériles para registrar el peso antes de su tratamiento.

A continuación, las muestras inoculadas superficialmente se colocaron en una placa Petri estéril y se dejaron secar durante 10 min en una campana de flujo laminar (TELSTAR TECHNOLOGIES, modelo AH-100, Terrassa, Spain) previamente a ser procesadas. Para todos los tratamientos, se preparó una muestra control que fue inoculada de forma similar aunque no fue tratada, para conocer la concentración inicial de *E. coli* en la muestra.

Para estudiar la inactivación de la microbiota, las muestras cárnicas se cortaron como se ha detallado anteriormente y se reservaron en placas Petri para su posterior tratamiento. De forma similar, se preparó una muestra control para conocer la concentración inicial de microorganismos presentes.

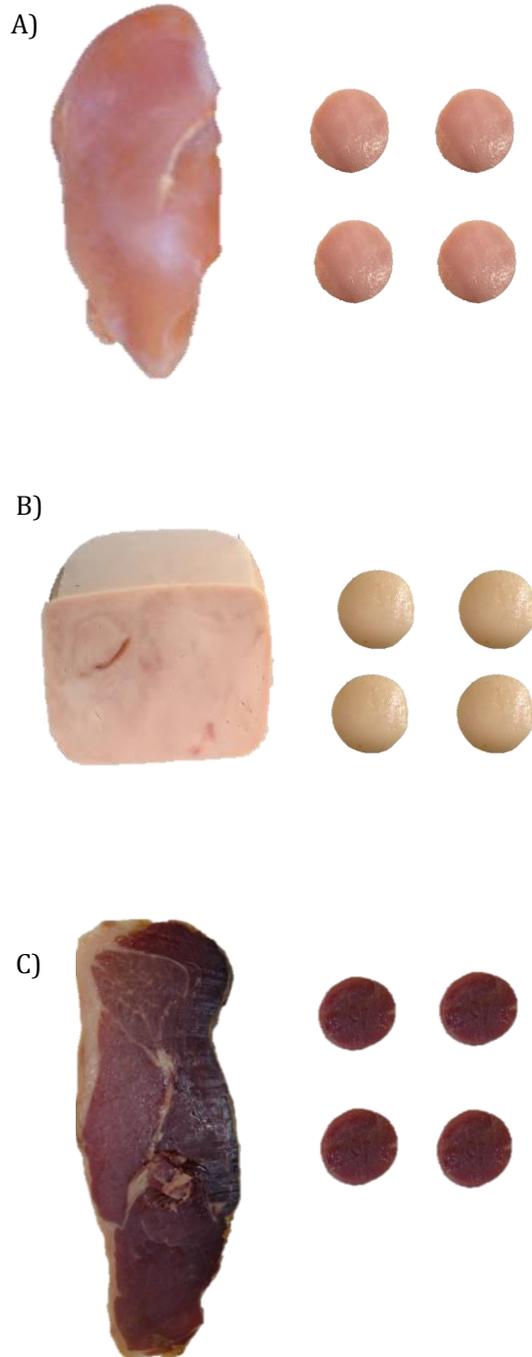


Figura 3.2 Preparación de muestras cárnicas para su procesamiento **A.** Pechuga de pollo, **B.** Jamón de pavo, **C.** Jamón curado

3.4. Equipo de fluidos supercríticos

Las experiencias de inactivación se llevaron a cabo empleando la planta de fluidos supercríticos (Figura 3.3) diseñada y construida por el grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios (ASPA) de la UPV. El equipo de FSC-CO₂ está provisto de un sistema de HPU acoplado al equipo (Benedito y col., 2011). A continuación se describen detalladamente las diferentes partes que integran el equipo.

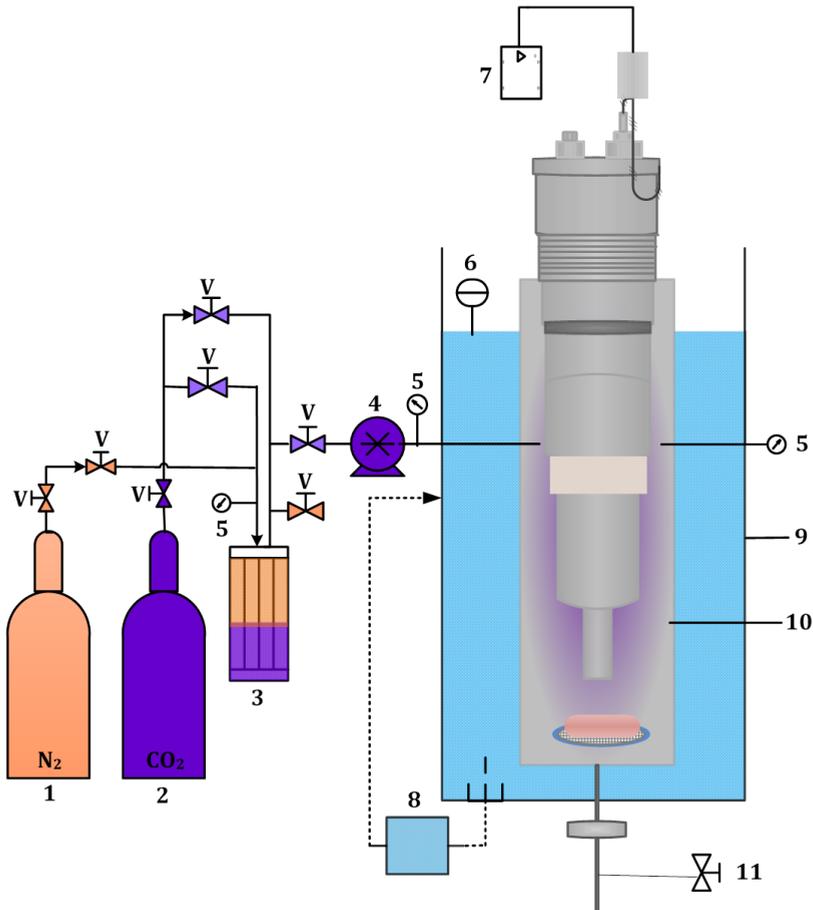


Figura 3.3. Esquema de la planta de fluidos supercríticos: 1. Tanque de N₂; 2. Tanque de CO₂; 3. Depósito enfriador de CO₂ y N₂; 4. Bomba de inyección de CO₂, 5. Manómetros 6. Termopar; 7. Generador de ultrasonidos; 8. Bomba de recirculación de agua; 9. Baño con control de temperatura; 10. Depósito de inactivación. 11. Salida reducción de presión y toma de muestras líquidas, V. Válvulas.

3.4.1 Gases

Los gases empleados fueron CO₂ y N₂, suministrados por Abelló Linde (Barcelona, España). Ambos gases cumplieron la normativa vigente según el Real Decreto 1466/2009 en materia de aditivos alimentarios dentro de los países de la UE y en el territorio nacional español.

El N₂ se adquirió en tanques de 9.5 m³ y 200 bar de presión, y el CO₂ en tanques de 37.5 kg y 60 bar de presión. Durante todo el desarrollo experimental, ambos tanques se colocaron en un lugar bien ventilado y a temperatura ambiente como marca la normativa.

3.4.2 Depósito enfriador

El depósito enfriador (Figura 3.2-3) consistió en un cilindro de 250 mL, construido en acero inoxidable Tipo 316. En dicho depósito se almacenó el CO₂ a $-18\text{ °C} \pm 3\text{ °C}$. Este depósito mantiene el CO₂ en estado líquido para ser absorbido por la bomba, que posteriormente lo inyectará al depósito de tratamiento donde alcanzará el estado supercrítico.

3.4.3 Bomba

La bomba (Figura 3.3-4) está constituida por dos bombas de jeringa de 103 mL cada una, de alta presión y precisión (Teledyne ISCO, VERTEX Technics, S.L., Barcelona, España) conectadas a un controlador incorporado en el equipo. La bomba de doble jeringa operó en continuo de manera que, mientras un cilindro cargaba CO₂ proveniente del depósito enfriador, el otro lo inyectaba hacia el recipiente de inactivación.

La bomba se encargó de absorber el CO₂ desde el depósito enfriador y de inyectarlo al depósito de inactivación hasta alcanzar la presión requerida. Ésta funcionó en modo de presión constante, en el cual el CO₂ es inyectado usando un caudal de 50 ml/min hasta alcanzar la presión deseada, que se mantiene constante durante todo el tratamiento.

3.4.4 Baño termostático

El baño termostático (Figura 3.3-9) consistió en un tanque construido en acero inoxidable con una pared de metacrilato, en el que estaba sumergido el depósito de inactivación. El sistema de calentamiento del baño consistía en: una resistencia eléctrica sumergible (1500 W-230 V, 50 Hz, Ref. 131 CFOR) ubicada en el interior del baño y que calentaba el agua del baño hasta alcanzar la temperatura deseada en el depósito de tratamiento; un transductor de temperatura (PT100) ubicado en el centro del baño (Figura 3.3-6) que registraba la temperatura del agua, y un controlador de temperatura digital (E5CK, Omron, Hoofddorp, Holanda) que estaba conectado a la PT100 y a la resistencia para regular la temperatura mediante un sistema de control todo-nada. El baño disponía de una bomba auto-aspirante (Figura 3.3-8) con pre-filtro incorporado (Potencia=1045 W; Modelo SWT75M, Ebara, Madrid, España) que permitía recircular continuamente el agua del baño para mantener una temperatura uniforme en el depósito durante todo el proceso.

3.4.5 Depósito de inactivación

El depósito de inactivación (Figura 3.3-10) consistió en un cilindro de acero inoxidable tipo 316, con un diámetro y volumen interno de 30.5 cm y 500 mL, respectivamente, y un espesor de pared de 3 cm. Dicho depósito se encontraba sumergido dentro del baño termostático, y por tanto, su temperatura era regulada por la temperatura de éste.

El depósito contaba con un manómetro (Figura 3.3-5) de muelle sumergido en glicerina (PTG Pressure Technology, Gesellschaft für Hochdrucktechnik mbH, Modelo EN 837-1, Alemania) para verificar la presión en su interior.

3.4.6 Dispositivo de ultrasonidos de potencia (HPU)

El sistema de aplicación de ultrasonidos de alta intensidad se basa en un sistema electroacústico. El dispositivo de HPU (Figura 3.4) empleado fue patentado, junto con el procedimiento de inactivación por la UPV (Benedito y col., 2011).

El sistema se compone de tres partes principales: un generador que permite convertir la señal eléctrica suministrada de la red (energía eléctrica), a la frecuencia y potencia requeridas durante el tratamiento ($42 \text{ W} \pm 5 \text{ W}$; $I = 250 \text{ mA} \pm 10 \text{ mA}$; $U = 220 \text{ V} \pm 5 \text{ V}$). Dicha potencia era registrada mediante un medidor de potencia digital (Modelo WT210, Yokogawa Electric Corporation, Japón). Un transductor piezoeléctrico, constituido por dos cerámicas comerciales de tipo anular (Figura 3.4-4: de 35 mm diámetro externo; 12.5 mm diámetro interno; 5 mm de espesor) de 30 kHz de frecuencia, que transforma dicha corriente de alta frecuencia en vibraciones mecánicas (energía acústica) y que estaba unido al generador mediante una conexión, recubierta con silicona flexible y de alto poder dieléctrico, situada en la cabeza del tapón (Figura 3.4-1). Finalmente, la sonda o sonotrodo (Figura 3.4-5) fabricado en aluminio (calidad 7075), transmitía la energía acústica generada por el transductor al medio a tratar. Cuando la muestra cárnica es tratada directamente con FSC-CO₂ y HPU (FSC-CO₂+HPU), la sonda transmite la energía acústica al CO₂ en estado supercrítico, llegando a la muestra que se encuentra ubicada a 3.3 cm debajo de la sonda; cuando la muestra es tratada mediante FSC-CO₂+HPU+DI, la sonda transmite la energía acústica a la disolución salina donde se encuentra sumergida la muestra de carne.

El transductor junto al sonotrodo, estaban unidos al cuerpo del tapón del depósito de inactivación, el cual podía abrirse o cerrarse mediante una rosca dispuesta en la parte superior. Además, para mantener la estanqueidad del depósito, el tapón disponía de una junta de cierre (Figura 3.4-2). Por otro lado, para evitar cortocircuitos, las cerámicas fueron cubiertas con teflón y en el cuerpo del tapón, se colocaba una funda de polipropileno antes de cada tratamiento.

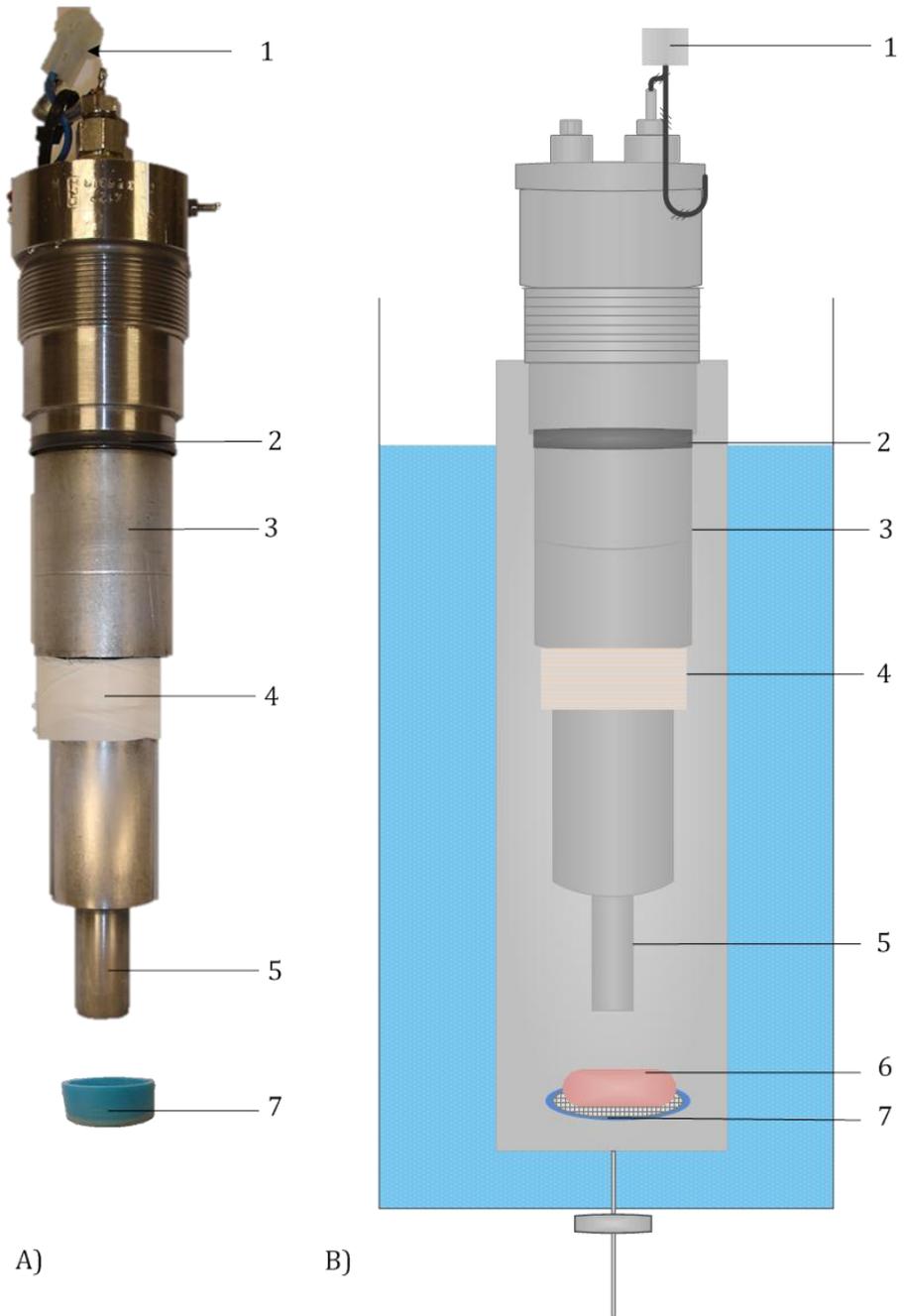


Figura 3.4 Dispositivo de ultrasonidos de potencia (HPU) **A.** Vista Real. **B.** Esquema: 1. Conector de entrada de potencia; 2. Junta de cierre; 3. Soporte de aluminio; 4. Cerámicas; 5. Sonotrodo de aluminio; 6. Muestra de carne y 7. Soporte para muestra de carne.

3.4.7 Soporte de muestra

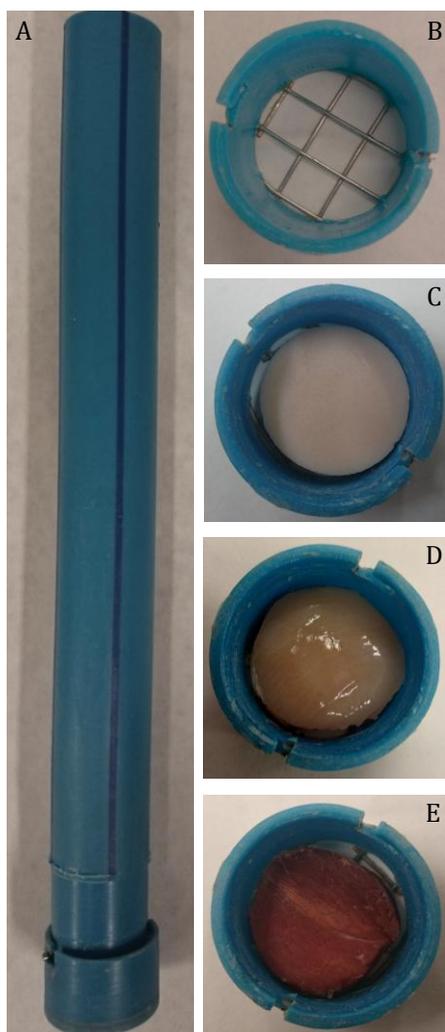


Figura 3.5 Sistema porta muestra **A.** Porta muestra y útil para su introducción en el depósito de tratamiento. **B.** Porta muestra **C.** Porta muestra con jamón de pavo **D.** Porta muestra con pechuga de pollo **E.** Porta muestra con jamón curado.

Para sujetar las muestras cárnicas dentro del recipiente de inactivación se diseñó un porta-muestras (Figura 3.5-B), realizado en polipropileno el cual cumple con la norma AENOR CC/001/782 PP/R/PP-R+FG/PP-R-PPR100, impermeable al CO₂. Éste, estaba provisto de una rejilla de acero inoxidable con 0.5 cm de espacio de malla. Dicho soporte, con la muestra en su interior, tal y como puede observarse en la Figura 3.5 C-

E, era colocado dentro del depósito de inactivación mediante un útil (Figura 3.5-A) realizado con el mismo material del soporte. Ambos eran lavados con alcohol antes y después de cada tratamiento.

3.5. Procedimiento experimental de los tratamientos de inactivación mediante fluidos supercríticos asistidos o no por ultrasonidos.

El tratamiento de inactivación mediante FSC-CO₂ consistió en cinco etapas fundamentales (1) preparación del equipo (limpieza y sistema de calentamiento); (2) preparación de la muestra; (3) presurización; (4) puesta en marcha de HPU y (5) extracción de muestras.

Previamente, antes de cada tratamiento, se realizó un proceso de limpieza del depósito de inactivación que consistía en hacer pasar una disolución (1-4 % v/v) de un desinfectante industrial para superficies externas (Diversey Dellated, Barcelona, España), seguido de dos lavados con agua destilada y un lavado final con agua esterilizada.

Simultáneamente al lavado, se ponía en marcha el sistema de calentamiento, que consistía en encender las resistencias del baño termostático y la bomba auto-aspirante con el fin de recircular y homogenizar la temperatura en todo el baño. Además, se realizaba el llenado de la bomba con CO₂. Para ello, en principio, se expulsaba todo el aire contenido en el depósito enfriador que se encontraba a -18 °C dentro del congelador, seguidamente se llenaba con el CO₂ procedente del tanque. A continuación, el depósito enfriador se presurizaba con N₂, para que el CO₂ se encontrara en estado líquido. Finalmente, se procedía al llenado de la bomba.

Una vez que la bomba de CO₂ estaba llena, el depósito de inactivación limpio y el sistema a la temperatura deseada, se procedía a preparar la muestra cárnica como se especifica en el apartado 3.3. La muestra se situaba en el porta-muestras (Figura 3.5 B) que se introducía inmediatamente en el depósito. En los tratamientos con DI, una vez la muestra estaba dentro del depósito, se añadían 90 mL de disolución salina (DI) (0.9 % NaCl w/v). Se cerraba el depósito con el tapón que tenía insertado el sistema de HPU (Figura 3.4-A). A continuación comenzaba el proceso de presurización.

La presurización del depósito de inactivación se iniciaba especificando el valor de la presión de trabajo en el set-point del controlador de la bomba inyectora de CO₂ (Figura 3.3.-4). En el momento que el controlador se ponía en marcha, la bomba inyectaba CO₂ al depósito hasta que se alcanzaba la presión deseada, tiempo que variaba de 1 a 4 min al operar entre 100 y 350 bar, respectivamente. En ese momento, la bomba se paraba automáticamente manteniendo posteriormente la presión constante durante todo el tratamiento. Para tratamientos con FSC-CO₂, se consideró tiempo inicial de tratamiento una vez alcanzada la presión y temperatura deseada en el depósito de inactivación. Para los tratamientos con FSC-CO₂+HPU, el tiempo inicial se consideraba cuando se alcanzaban la presión y temperatura deseadas y se conectaban los HPU.

Una vez transcurrido el tiempo de tratamiento, el recipiente de inactivación era despresurizado mediante la apertura de una válvula on/off (Figura 3.3-11), situada en la parte inferior del depósito de tratamiento, a razón de 10 bar/min. Esta velocidad moderada de despresurización tenía dos objetivos: no causar un efecto colateral en el grado de inactivación del microorganismo al disminuir drásticamente la presión, y por otro lado no causar deterioro significativo en la calidad de la muestra cárnica. En el caso de los tratamientos donde se usaba disolución salina, previamente a la despresurización, se tomó una muestra líquida de esta disolución mediante la apertura de dicha válvula. Una vez evacuada toda la muestra líquida, se procedió de igual forma a despresurizar completamente el depósito. Despresurizado el depósito, el tapón era desenroscado y la muestra se extraía por la parte superior del recipiente con la ayuda del útil de polipropileno descrito anteriormente. La muestra era recogida mediante unas pinzas de acero inoxidable esterilizadas a la llama y colocada en una bolsa estéril para su posterior análisis microbiológico.

3.6. Viabilidad de los microorganismos

La viabilidad de los microorganismos, tanto las células de *E. coli* inoculadas en las muestras cárnicas como la microbiota presente en las mismas, se evaluó mediante la técnica de siembra en placa y conteo de las unidades formadoras de colonias.

Cada muestra tratada, así como cada muestra control, se colocaba en una bolsa estéril provista de un filtro. En primer lugar se adicionaban 90 mL de solución salina estéril (0.85% NaCl; SS) a la bolsa con la muestra y se homogeneizaba en un Stomacher (IUL INSTRUMENTS, modelo 1000475/2510, Barcelona, España) durante 2 minutos, para el caso de muestras de pollo y pavo, y 4 minutos en el caso de las muestras de jamón curado.

En una campana de flujo laminar se tomaba una muestra de la parte filtrada de la bolsa, para realizar la siembra en placa directamente, o bien para diluirla en solución salina (0.85% NaCl v/v), hasta la dilución adecuada y realizar la siembra en placa. En el caso de muestras inoculadas inicialmente con *E. coli*, 100 μ L de la dilución adecuada, se sembraron en placas de LB Agar, tanto para las muestras tratadas como las muestras control. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h en una estufa. Para el análisis microbiológico de la microbiota, 100 μ L de la dilución adecuada se sembraron en distintos medios comerciales, específicos para cada tipo de microorganismo (Tabla 3.1). Las placas se incubaron en estufa o refrigerador, durante el tiempo y a la temperatura adecuada en cada caso (Tabla 3.1).

Los resultados de las cinéticas de inactivación se expresaron como el cociente entre las células presentes tras cada tratamiento (N) y aquellas contenidas en las muestras sin tratar (N_0). Para cada condición experimental (Apartado 3.7), el resultado es el promedio de tres replicas y cada muestra de cada replica se analizó en al menos tres placas.

Tabla 3.1. Medios y condiciones de crecimiento para diferentes microorganismos.

Microorganismo	Tipo de siembra	Medio de cultivo*	Condiciones de incubación
Mesófilos	Superficial	PCA	35 °C – 24 h
Psicrófilos	Superficial	PCA	4 °C – 7 días
Hongos y levaduras	Superficial	YGC	25 °C – 5 días
Bacterias ácido lácticas	Profunda	MRS	35 °C – 3 días
Coliformes	Profunda	VRB	35 °C – 24 h
<i>E. coli</i>	Superficial	LB	37 °C – 24 h

* PCA (Plate Count Agar), YGC (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar Fil-IDF), MRS (Lactobacillus Agar acc to De Man Rogosa and Sharpe), VRB (Violet Red Bile) y LB (Luria-Bertani). Todos los medios de Sigma-Aldrich (USA).

3.7. Inactivación de microorganismos en muestras cárnicas

3.7.1. Tratamientos de inactivación en pechuga de pollo

Los tratamientos de inactivación de *E. coli* llevados a cabo en las muestras de pechuga de pollo, así como las condiciones de presión, temperatura y tiempo seleccionados se resumen en la Tabla 3.2. Dichas condiciones fueron seleccionadas en base a los resultados obtenidos por Ortuño y col. (2012b) quienes usaron el mismo sistema de inactivación de FSC-CO₂ asistido con HPU en matrices líquidas.

Tabla 3.2. Tratamientos de inactivación de *E. coli* en muestras de pollo.

Código	Tratamiento	P (bar)	T (°C)	t (min)
T1	FSC-CO ₂	350	36, 41, 46, 51	10, 20, 30, 40
T2	FSC-CO ₂ +HPU	350	36, 41, 46, 51	10, 20, 30, 40
T1	FSC-CO ₂	150, 250, 350, 450	41	10, 20, 30, 40
T2	FSC-CO ₂ +HPU	150, 250, 350, 450	41	10, 20, 30, 40
T3	FSC-CO ₂ +DI	150, 250, 350	46	10, 20, 30, 40
T4	FSC-CO ₂ +HPU+DI	150, 250, 350	46	10, 20, 30, 40

3.7.2. Tratamientos de inactivación en jamón de pavo

Las muestras de jamón de pavo inoculadas con *E. coli* fueron sometidas a diferentes tratamientos de inactivación: FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU, FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI. Todos estos tratamientos se llevaron a cabo a diferentes condiciones de presión (150, 250 y 350 bar, a 46 °C y 51 °C) temperatura (41, 46 y 51 °C, a 350 bar) y tiempo (5, 10, 20 y 30 min). Con el objetivo de evaluar el efecto sinérgico de los HPU, se realizó un quinto tratamiento (HPU+DI) que consistió en aplicar HPU (42 W ± 5 W; I = 250 mA ± 10 mA; U = 220 V ± 5 V) sobre la muestra de jamón de pavo sumergida en disolución salina (0.9% de NaCl w/v) dentro del recipiente de inactivación a presión atmosférica y bajo las tres condiciones de temperatura estudiadas (41, 46 y 51 °C). Finalmente se compararon los niveles de inactivación obtenidos mediante HPU+DI con la inactivación conseguida mediante los tratamientos realizados previamente (FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU, FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI) usando 41, 46 y 51 °C, a presión constante (350 bar).

3.7.3. Tratamientos de inactivación en jamón curado

Empleando el jamón curado como matriz cárnica se usó la metodología de superficie de respuesta (Montgomery, 2008) con la finalidad de encontrar una región de experimentación óptima (presión, temperatura y tiempo) que permita obtener el máximo nivel de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de jamón curado tratadas mediante FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+HPU+DI.

El diseño de experimentos empleado fue un modelo central compuesto que consistió en 15 tratamientos distintos, realizados por triplicado y que incluyó tres niveles para cada variable del proceso (P, T y t). El intervalo de valores usado para cada variable junto con su valor codificado se presenta en Tabla 3.3. El intervalo de valores para la presión fue 150 a 350 bar, 41 a 51 °C para la temperatura y 5 a 15 min para el tiempo de tratamiento. Los valores codificados de las variables (-1, 0 y 1) para cada tratamiento, fueron obtenidos mediante las ecuaciones 3.1-3.3.

Tabla 3.3. Relación de variables independientes físicas y codificadas en los tratamientos de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón curado mediante FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+HPU+DI.

Nº tratamiento	Variables Codificadas			Variables evaluadas		
	T	P	t	T (°C)	P (bar)	t (min)
1	-1	1	0	41	350	10
2	0	0	0	46	250	10
3	-1	0	1	41	350	15
4	0	1	1	46	350	15
5	0	1	-1	46	350	5
6	1	0	-1	51	250	5
7	0	0	0	46	250	10
8	1	1	0	51	350	10
9	-1	0	-1	41	250	5
10	0	0	0	46	250	10
11	1	0	1	51	250	15
12	1	-1	0	51	150	10
13	-1	-1	0	41	150	10
14	0	-1	1	46	150	15
15	0	-1	-1	46	150	5

$$x_{i1} = \frac{P_i - 250}{100} \quad (\text{Ec. 3.1})$$

$$x_{i2} = \frac{T_i - 46}{5} \quad (\text{Ec. 3.2})$$

$$x_{i3} = \frac{t_i - 10}{5} \quad (\text{Ec. 3.3})$$

Donde P_i, T_i y t_i hacen referencia a la presión, temperatura y tiempo de tratamiento, respectivamente. El subíndice *i* hace referencia al número de tratamiento dentro de los recogidos en la Tabla 3.3. Los 15 tratamientos se llevaron a cabo empleando FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+HPU+DI. Para minimizar los efectos debido a la variabilidad del propio procesamiento, el orden de los experimentos se llevó a cabo de forma aleatoria.

Para realizar la optimización del proceso de inactivación de *E. coli* se usó un modelo de segundo orden (Ec. 3.4) que genera una superficie de respuesta con curvaturas, región en la cual se puede obtener el máximo valor de la respuesta. La respuesta está representada como los ciclos logarítmicos reducidos (Ec. 3.5) bajo las condiciones de tratamiento obtenidas en la superficie.

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{23} X_2 X_3 + \beta_{33} X_3^2 + \quad (\text{Ec. 3.4})$$

$$y_i = \ln \left(\frac{N}{N_0} \right) \quad (\text{Ec. 3.5})$$

Donde y_i , representa el vector de respuestas predichas (ciclos-log de *E. coli*) para los distintos tratamientos indicados en la Tabla 3.3, β_0 es el término que representa la intercepción, β_i representa los coeficientes de los parámetros estimados mediante el ajuste de los datos experimentales, para el efecto lineal con la presión (β_1), temperatura (β_2) y tiempo (β_3), β_{ii} son los coeficientes cuadráticos y β_{ij} son los coeficientes que indican el efecto de las interacciones. X_i , son las variables (P, T y t) codificadas de acuerdo a la Tabla 3.3 y obtenidas por las ecuaciones 3.1 a 3.3. N_0 , es el número de microorganismos iniciales en una muestra en el tiempo de tratamiento 0, y N , es el número de microorganismos después de un determinado tiempo de tratamiento.

La resolución del modelo y generación de las superficies se llevó a cabo usando Matlab R2011b versión 7.13.0.564 (Mathworks Inc., Massachusetts, USA).

3.8. Modelización

Las cinéticas de inactivación no-térmica de microorganismos han sido descritas por varios autores como cinéticas de primer orden usando modelos primarios (Aragao y col., 2007; Corradini y Peleg 2007). Sin embargo también se ha demostrado que algunos microorganismos presentan cinéticas de inactivación con un comportamiento no lineal y más complejo: patrones de cola, hombro, o bien patrones sigmoideos (Corradini y Peleg, 2012). En los últimos años se han usado varios modelos no-lineales para describir estos comportamientos más complejos, siendo el modelo de Weibull el más simple y flexible (Buzrul y col., 2008). Recientemente, Ortuño y col. (2014a) adaptó el modelo de Weibull para describir las cinéticas de inactivación de *S. cerevisiae* usando FSC-CO₂+HPU en zumo de manzana, en función de los parámetros del proceso. Por otro lado, también se ha empleado el modelo de Peleg y el modelo Bifásico para describir las cinéticas de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU de *E. coli* en zumo de manzana y naranja, respectivamente (Ortuño y col., 2014a; Ortuño y col., 2014b). Estos modelos mencionados han sido empleados en la presente Tesis Doctoral y se describen a continuación.

3.8.1. Modelo de Weibull

En la literatura se pueden encontrar diferentes versiones del modelo de Weibull, sin embargo, la más aceptada viene descrita por la Ec. 3.6.

$$\log (N/N_0) = - b \cdot t^n \quad (\text{Ec. 3.6})$$

donde t es el tiempo de proceso; b y n son parámetros cinéticos del modelo, b es un parámetro escalar de velocidad y n es un parámetro que indica la forma de la curva $\log (N/N_0)$ vs t ; cuando $n < 1$ describe un comportamiento cóncavo hacia arriba o bien, una curva semi-logarítmica, cuando $n > 1$ la curva es cóncava hacia abajo y para $n = 1$ la ecuación describe un comportamiento lineal.

3.8.2. Modelo de Bifásico

El modelo bifásico (Ec. 3.7) describe las curvas que representan dos comportamientos diferentes en una misma población microbiana, una proporción más sensible respecto a otra proporción más resistente. Esto queda reflejado mediante los parámetros del modelo: $(1-f)$ para la fracción de microorganismos más sensible y f para la fracción más resistente (Hereu y col., 2012)

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = \log_{10} \left[(1-f) \cdot 10^{\frac{-t}{k_{\max_1}}} + f \cdot 10^{\frac{-t}{k_{\max_2}}} \right] \quad (\text{Ec. 3.7})$$

Donde, k_{\max_1} y k_{\max_2} son parámetros del modelo.

3.8.3. Modelo de Peleg Tipo A

Las curvas descritas mediante este modelo son características de los tratamientos en los cuales la población microbiana más sensible disminuye rápidamente durante los primeros minutos y posteriormente se inactiva la población más resistente (Peleg, 2006). Esto da lugar inicialmente a una curva cóncava hacia arriba que puede cambiar o no gradualmente a cóncava hacia abajo a medida que avanza el tratamiento. En el presente trabajo se ha empleado la ecuación descrita por Ortuño y col. (2014a) para definir este tipo de curvas (Ec. 3.8).

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = - \frac{k_1 \cdot t}{(1 + k_2 \cdot t)(k_3 - t)} \quad (\text{Ec. 3.8})$$

Donde k_1 , k_2 y k_3 son los parámetros del modelo.

3.8.4. Modelo de Peleg Tipo B

El comportamiento de las curvas representadas bajo este modelo se interpreta mediante un daño inicial provocado a los microorganismos más débiles durante los primeros minutos del tratamiento. Una vez que dichos microorganismos son eliminados, el resto de la población se hace progresivamente más resistente. Este comportamiento puede ser descrito mediante una curva cóncava hacia abajo, y dar

lugar a una concavidad opuesta conforme avanza el tratamiento. Este modelo se ha definido como Peleg Tipo B (Ortuño y col., 2014a) (Ec. 3.9).

$$\log_{10} \frac{N}{N_0} = - \frac{a_1 \cdot t^m}{a_2 + t^m} \quad (\text{Ec. 3.9})$$

Donde m , a_1 y a_2 son los parámetros del modelo.

3.8.5. Bondad de los ajustes

Las constantes cinéticas de los modelos estudiados se calcularon mediante la minimización de la suma de las diferencias al cuadrado entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo, usando la herramienta Solver de Microsoft Excel™. Para evaluar la bondad del ajuste de cada modelo se empleó la raíz del error cuadrático medio (RMSE) (Ec. 3.10) y el coeficiente de determinación R^2 (Ec. 3.11).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum_{j=1}^z (y_j - y_j^*)^2}{z}} \quad (\text{Ec. 3.10})$$

$$R^2 = 1 - \left[\frac{S_{yx}^2}{S_y^2} \right] \quad (\text{Ec. 3.11})$$

Donde y_j and y_j^* son los valores experimentales y estimados, respectivamente; z es el número de datos experimentales; S_y y S_{yx} corresponden a la desviación estándar total y la desviación estándar de la estimación, respectivamente.

3.9. Efecto del tipo de tratamiento mediante FSC-CO₂ sobre la calidad de las muestras cárnicas

Con el objetivo de evaluar el efecto de los diferentes tratamientos (FSC-CO₂, FSC-CO₂+DI, FSC-CO₂+HPU, FSC-CO₂+HPU+DI, HPU+DI) sobre las propiedades físico-químicas de las muestras cárnicas, se evaluaron diferentes parámetros: color, humedad, pH, contenido en grasa, textura y microestructura. Estos análisis se realizaron tanto en las muestras sin tratar (control), como en las muestras procesadas justo tras cada tratamiento.

Para llevar a cabo los análisis fisicoquímicos, se seleccionaron unas condiciones de proceso específicas (presión, temperatura y tiempo) para cada matriz que garantizaran un efecto significativo en la inactivación de *E. coli* en cada una de ellas (Tabla 3.4). Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento estudiado.

Tabla 3.4 Condiciones de presión, temperatura y tiempo de tratamiento seleccionadas para los análisis fisicoquímicos de cada muestra cárnica.

Matriz Cárnica	Condiciones del tratamiento	Análisis realizados
Pechuga de Pollo	250 bar – 46 °C – 20 minutos	Color (L*a*b*) Textura (Fuerza Máxima)
Jamón de Pavo	150 bar – 46 °C – 10 minutos	pH Humedad
Jamón curado	250 bar – 46 °C – 10 minutos	Grasa Microestructura (SEM)

3.9.1. Color

Las determinaciones de las coordenadas de color CIE L*a*b* se realizaron con un espectrofotómetro (CM-2500d, KONICA – MINOLTA, Japón) provisto de un sistema de referencia D65, un ángulo de observación 10° y calibrado con un blanco estándar. El análisis de color se llevó a cabo sobre la superficie de las muestras cárnicas (control y tratadas) a temperatura ambiente (25 ±1 °C), realizando 5 mediciones por cada muestra (Figura 3.6-A). Los parámetros medidos fueron L* que indica la luminosidad

y a^* y b^* que indican el nivel de tono rojo y amarillo, respectivamente. Los análisis fueron realizados por triplicado para cada muestra tratada.

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre las muestras cárnicas se evaluó la diferencia de color (ΔE) mediante la Ec. 3.12:

$$\Delta E = \sqrt{(L^* - L_0^*)^2 + (a^* - a_0^*)^2 + (b^* - b_0^*)^2} \quad \text{Ec. 3.12}$$

donde L^* , a^* y b^* son las coordenadas de la muestra tras el tratamiento y L_0^* , a_0^* y b_0^* los valores de las coordenadas antes del tratamiento.

3.9.2. Textura

La textura de las muestras cárnicas, control y tratadas, fue evaluada empleando un texturómetro (TA-XT2i, Stable Micro Systems, Surrey, England), conectado a un ordenador para la adquisición y tratamiento de datos. El texturómetro estaba equipado con una célula de carga de 25 kg y una sonda de 2 mm de diámetro, además el equipo estaba ubicado en una cámara (Modelo ERC 36B, Valencia, España) con temperatura controlada (6 ± 0.5 °C).

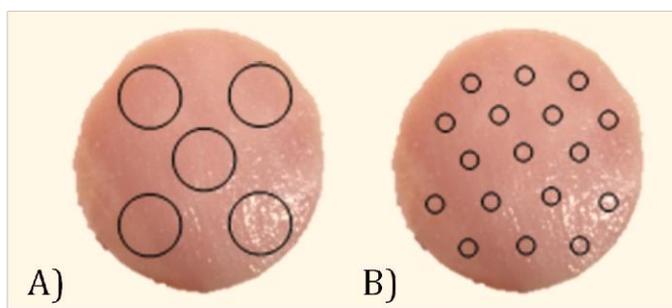


Figura 3.6. Puntos de medición de color (A) y textura (B) en las muestras cárnicas.

El análisis de textura consistió en una prueba de compresión/punción que se llevó a cabo usando una sonda cilíndrica de acero inoxidable con fondo plano (2 mm de diámetro) de acuerdo a los siguientes parámetros de ensayo:

- Distancia de penetración: 5 mm
- Velocidad de descenso de la sonda de punción: 1 mm/s

Para asegurar la representatividad de los resultados, se realizó un mínimo de 16 punciones (Figura 3.6-B) en cada una de las tres muestras analizadas por tratamiento. Mediante las curvas adquiridas con el Software Texture Expert (Stable micro Systems. Ltd Versión 1.22), se obtuvo el valor máximo de la fuerza (F_{\max} ; N). Finalmente, la dureza se expresó como el promedio de las punciones llevadas a cabo en las tres muestras obtenidas por cada tipo de tratamiento estudiado.

3.9.3. Humedad

La humedad de las muestras cárnicas se llevó a cabo por desecación en una cámara de secado por convección forzada (Binder, Modelo FD53, España) hasta peso constante, conforme al protocolo recomendado por la AOAC No. 934.06 (AOAC, 1990). 3 g de muestra triturada se pusieron en un pesa-muestras. Se secaron a 105 ± 1 °C durante 24 horas. Transcurrido dicho tiempo, los pesa-muestras se taparon y se dejaron en un desecador hasta alcanzar la temperatura ambiente previamente a ser pesados. Finalmente, la humedad de la muestra (b. h.) se estimó por diferencia de peso. Los análisis de humedad se realizaron por triplicado, en cada una de las tres muestras obtenidas por cada tipo de tratamiento estudiado.

3.9.4. pH

El pH de las muestras se midió empleando un pH-metro especial para alimentos sólidos (pHmeter FG-FiveGo™, Mettler Toledo, Suiza-USA) que se introdujo en la parte central de la muestra de carne. Previamente a los análisis, el dispositivo se calibró usando soluciones tampón comerciales de pH 4.0 y 7.0. Cada medida de pH fue realizada por triplicado, en cada una de las tres muestras obtenidas por cada tipo de tratamiento estudiado.

3.9.5. Determinación de grasa

La determinación de grasa se llevó a cabo mediante el método de la AOAC 991.36 (AOAC, 1997). Dicho método está basado en la utilización de un equipo Soxhlet y el uso de un disolvente orgánico, que en este caso fue éter de petróleo. El sistema (Figura 3.7) estaba formado por un balón vacío previamente pesado, el cuerpo Soxhlet, un condensador, un baño de agua a 75 °C y el disolvente orgánico. Las muestras cárnicas deshidratadas y trituradas (3.0 ± 0.2 g) se colocaron en un cartucho dentro del cuerpo extractor.

La técnica consta de cuatro etapas principales: colocación del éter de petróleo en el balón receptor (Figura 3.7-2), calentamiento hasta ebullición del mismo cuyos vapores llegan al condensador (Figura 3.7-9), donde se condensa y cae hasta el cuerpo extractor conteniendo el cartucho poroso (Figura 3.7-4) con la muestra en su interior (Figura 3.7-5). En el momento en el que el nivel de éter de petróleo sobrepasa el cartucho y llega a la parte superior del brazo extractor (Figura 3.7-3), se produce el reflujo. El sifón del cuerpo extractor (Figura 3.7-6) permite regresar el éter de petróleo + extracto (Figura 3.7-7) junto al resto de éter de petróleo que se encuentra en ebullición en el matraz balón.

El tiempo de extracción fue de 6 a 8 h. Finalmente, el éter de petróleo se eliminó en un evaporador rotatorio a 70 °C (VWR IKA® RV Digital 20-180 °C, Alemania), provisto con una bomba de vacío (VWR IKA® HB 20-270 rpm, Alemania). El contenido de grasa se determinó mediante la Ec. 3.13, por diferencia de peso del matraz balón, antes y después de la extracción.

$$\frac{g \text{ grasa}}{g \text{ m. s.}} = \frac{[(B - C) \times 100]}{A} \quad (\text{Ec. 3.13})$$

donde A es el peso de la muestra seca introducida inicialmente en el balón (g, m.s.), B es el peso del matraz balón + extracto seco libre de solvente y C es el peso del balón antes de la extracción.

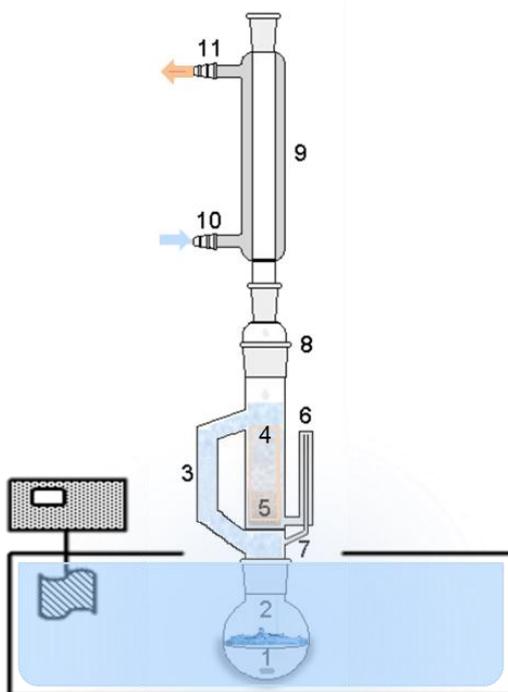


Figura 3.7. Esquema del equipo de extracción Soxhlet. **1.** Éter de petróleo en ebullición; **2.** Matraz balón; **3.** Cuerpo extractor; **4.** Cartucho. **5.** Muestra; **6.** Entrada-salida de sifón; **7.** Salida de solvente con extracto; **8.** Adaptador de unión; **9.** Cuerpo refrigerante (condensador); **10.** Entrada de fluido frío; **11.** Salida de fluido más caliente.

3.9.6. Microestructura

Para intentar justificar el efecto de los diferentes tratamientos sobre los parámetros fisicoquímicos de las muestras tratadas, así como para intentar elucidar los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la inactivación microbiana en matrices sólidas, se llevó a cabo un estudio para caracterizar la microestructura de las matrices cárnicas tratadas y compararlas con las muestras sin tratar. Para ello se empleó la técnica de Microscopia Electrónica de Barrido (SEM).

El protocolo de trabajo incluyó la preparación de la muestra, fijación, metalizado y finalmente su observación. La preparación de muestra consistió en cortar paralelepípedos de 2-3 mm³ con una cuchilla de acero inoxidable como se muestra en

la Figura 3.8. Se diferenció entre cortes superficiales y cortes centrales. Las muestras cortadas se envasaron y congelaron a $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ en viales de cristal previamente al proceso de desecación, en el que las muestras fueron liofilizadas en un liofilizador (Telstar Lioalfa-6, Barcelona, España) que trabaja a 10^{-3} mbar con condensador a $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 24-48 h.

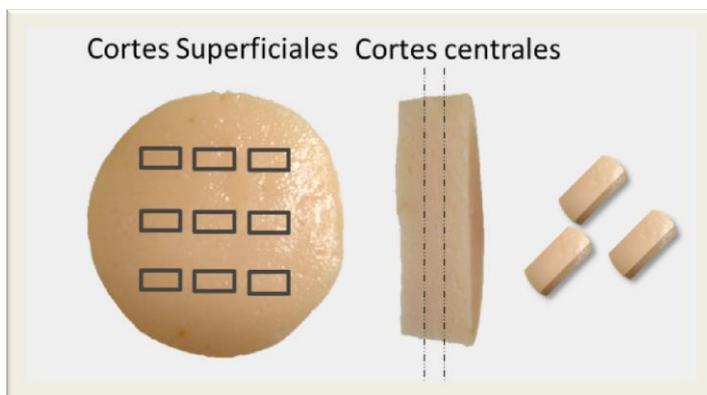


Figura 3.8. Cortes de las muestras de carne para el análisis de la microestructura mediante SEM.

El montaje de las muestras liofilizadas, se llevó a cabo sobre soportes metálicos con ayuda de una cinta de doble cara de grafito o mediante un adhesivo epoxi.

A continuación, las muestras fueron metalizadas en oro. La metalización se llevó a cabo en un recubridor a vacío (5-10 kPa), (BAL-TEC, SCD 005, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) con una corriente de ionización de 40 mA durante 90 s. Una vez metalizadas, las muestras fueron observadas a diferentes aumentos en el microscopio electrónico de barrido (JEOL, Modelo JSM6300, Japón) a 15 kV, ubicado en el Servicio de Microscopía de la Universitat Politècnica de València.

3.10. Almacenamiento

Para evaluar la vida útil de las muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU, para jamón de pavo y jamón curado y FSC-CO₂+HPU+DI, para pechuga de pollo, se realizó un estudio, tanto microbiológico como de parámetros fisicoquímicos, durante 30 días de almacenamiento tras un tratamiento llevado a cabo sobre cada tipo de muestra, en las condiciones de presión, temperatura y tiempo especificadas en la Tabla 3.4.

Para ello, justo tras el tratamiento, las muestras se envasaron en bolsas estériles de polipropileno y se guardaron en una nevera (Liebherr, Modelo GKv 5730, Barcelona, España), a 4 °C. Se tomó una muestra tratada y otra control a los 3, 10, 20 y 30 días de almacenamiento, para realizar los análisis fisicoquímicos y microbiológicos. Los análisis fisicoquímicos realizados fueron color, textura, pH y humedad, siguiendo los procedimientos detallados anteriormente. En el análisis microbiológico se determinó la microbiota presente en cada muestra cárnica siguiendo el procedimiento detallado en el Apartado 3.6 (mesófilos, psicrófilos, bacterias ácido-lácticas, coliformes, *E. coli*, hongos y levaduras). Los resultados del análisis microbiológico fueron expresados como la concentración de células presentes en la muestra cárnica (UFC/g).

CAPITULO 4

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Proceso de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂ sobre muestras
cárnicas

Capítulo 4.1

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Proceso de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂

Los fluidos supercríticos han sido ampliamente estudiados como una técnica no térmica eficaz para la inactivación microbiana en matrices alimentarias líquidas, como leche o zumos de frutas (Erkmen, 2012; Ortuño y col., 2014b; Cappelletti y col., 2014). Sin embargo, existen pocos estudios de inactivación mediante FSC-CO₂ sobre matrices sólidas, y particularmente sobre productos cárnicos. En el presente capítulo se aborda la inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂ sobre tres productos cárnicos con diferentes características, pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado, estudiándose el efecto de las variables del proceso sobre la inactivación microbiana.

4.1.1 Inactivación sobre pechuga de pollo

Efecto de la presión

La inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo (10⁶ UFC/g) mediante FSC-CO₂ (Figura 4.1) se estudió a diferentes presiones (150, 250, 350 y 450 bar, 41 °C). En la Figura 4.1 puede observarse como durante los primeros 20 min de tratamiento, la velocidad de inactivación a 150 bar fue significativamente ($p < 0.05$) menor que para el resto de presiones. Empleando 150 bar, tras 20 min de tratamiento, la población de *E. coli* se redujo en 0.6 ciclos-log, sin embargo para el resto de presiones se alcanzó una reducción de 1.3 ciclos-log tras el mismo periodo de tiempo. Transcurridos 30 min de proceso, no se observaron diferencias significativas en la reducción obtenida entre ninguna de las presiones estudiadas (1.3 ciclos-log). Sin embargo, al final del tratamiento, empleando 250 bar, se alcanzó una reducción de 2.1 ciclos-log, comparado con 1.4 ciclos-log alcanzados en el resto de presiones (150, 350 y 450 bar).

Por lo tanto, el análisis estadístico reveló que, no fueron necesarias presiones superiores a 250 bar para observar un aumento significativo ($p < 0.05$) de la inactivación de *E. coli*. Por otro lado, para todas las presiones seleccionadas, la tasa de inactivación si aumentó significativamente ($p < 0.05$) conforme avanzó el tiempo de tratamiento. En promedio para todas las presiones, el mayor incremento de la

inactivación se produjo durante los primeros 10 min, reduciéndose posteriormente la tasa de inactivación.

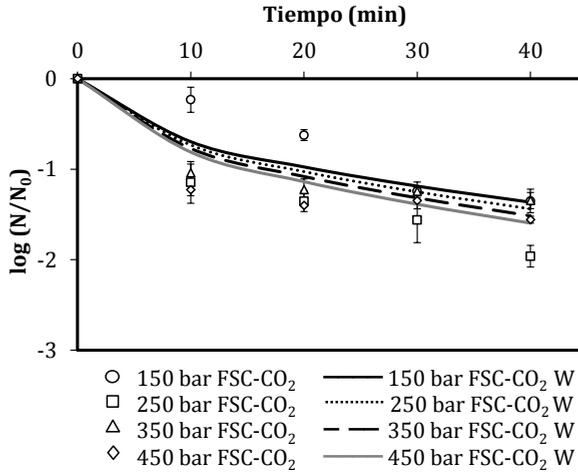


Figura 4.1. Cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO₂ a diferentes presiones (41 °C). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo de Weibull (líneas).

La presión controla la solubilidad del CO₂ en condiciones supercríticas, por lo que en general, un incremento de la presión del sistema aumenta la solubilidad del CO₂ y en consecuencia, la velocidad de inactivación gracias al mayor contacto entre el CO₂ y las células (Brunner, 2005). Este mayor contacto podría favorecer la expansión volumétrica de la doble capa de fosfolípidos de la membrana de los microorganismos, acelerando la extracción de componentes intracelulares (García-González y col., 2007; Galvanin y col., 2014). Para que se produzca un buen contacto entre el CO₂ y las células microbianas, se precisa de agua libre donde el CO₂ pueda disolverse (Erkmen, 2012). En este sentido, dado el bajo volumen de agua libre situada sobre la superficie de las muestras de pollo donde se encuentran los microorganismos, a cualquier presión de trabajo por encima de 150 bar y también a tiempos largos, ésta se saturaría fácilmente con una concentración de CO₂ que permita la máxima inactivación microbiana para ese tiempo, lo que hace que la presión no presente un efecto determinante. Por otro lado, el nivel máximo de inactivación alcanzado (2 ciclos- log)

es reducido a pesar de la fácil saturación del agua disponible. Esto podría ser debido a la compleja composición de la matriz cárnica, haciendo que compuestos como la grasa o las sales disueltas, pueden generar un efecto protector para los microorganismos, ligando el agua disponible y limitando el contacto directo entre el CO₂ y los microorganismos. Destacar que en el presente trabajo, a pesar de emplear presiones de 450 bar (41 °C), no se consiguió superar una reducción de 1.5 ciclos-log tras 40 min de tratamiento en muestras de pechuga de pollo.

Efecto de la temperatura

La Figura 4.2 muestra las cinéticas de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo tratada mediante FSC-CO₂ a diferentes temperaturas (36, 41, 46 y 51 °C) manteniendo la presión constante (350 bar). Puede observarse cómo tras 10 min de tratamiento, no existen diferencias significativas ($p > 0.05$) en el nivel de inactivación alcanzado (1.0 ciclo-log) a las diferentes temperaturas estudiadas. Utilizando temperaturas de 36 y 41 °C, tras los primeros 10 min, el nivel de inactivación no aumentó significativamente ($p > 0.05$), manteniéndose constante durante los 30 min restantes de tratamiento. Sin embargo, empleando 46 °C, se produjo una inactivación log-lineal, hasta alcanzar una reducción de 2.4 ciclos-log tras 40 min de tratamiento. Por otro lado, empleando la máxima temperatura de trabajo, 51 °C, se observó un aumento de la velocidad de inactivación de *E. coli* durante el tratamiento, alcanzándose la reducción total de la población (6.6 ciclos-log) tras 30 min de proceso. Para esta temperatura se produce un descenso log-lineal de la población de microorganismos hasta los 20 min de tratamiento (2.0 ciclos log) y posteriormente la tasa de inactivación aumenta notablemente (reduciendo 4.6 ciclos-log en 10 min) llegándose a la eliminación total de los microorganismos.

Los resultados del análisis estadístico revelaron que en promedio, la temperatura tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el nivel de inactivación, demostrando que es un factor clave para incrementar el nivel de inactivación de *E. coli* inoculada en las muestras de pollo. Por otra parte, es necesario emplear temperaturas superiores a 41 °C para observar una disminución significativa de la población con el transcurso del tiempo de tratamiento. Además, los resultados han revelado que para inactivar

totalmente una población inicial de *E. coli* de 1.51×10^6 UFC/g en muestras de pollo, son necesarios tratamientos a 51 °C durante al menos 30 min.

La disminución de la viabilidad de *E. coli* al aumentar la temperatura ya se ha descrito previamente (Choi y col., 2009a; Bae y col., 2011; Ferrentino y col., 2012a) en la inactivación microbiana sobre muestras de carne y se debería al efecto de la misma sobre las propiedades tanto del CO₂ en estado supercrítico como de la membrana celular. El uso de mayores temperaturas de proceso incrementa la fluidez de la membrana celular y aumenta la difusividad del CO₂, facilitando su penetración en las células y dando lugar a alteraciones metabólicas responsables de la inactivación celular (García-González y col., 2007; Valverde y col., 2010; Ferrentino y col., 2012c).

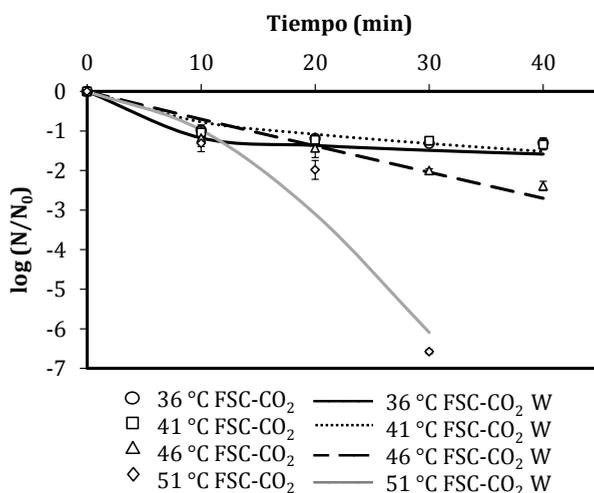


Figura 4.2. Cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO₂ a diferentes temperaturas (350 bar). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo de Weibull (líneas).

Efecto de la aplicación de HPU a los tratamientos con FSC-CO₂

En base a los resultados descritos anteriormente, en los que se necesitaron temperaturas elevadas y tiempos de tratamiento largos para reducir totalmente la población de *E. coli* en muestras de pollo tratadas con FSC-CO₂, se propuso aplicar

simultáneamente ultrasonidos de potencia durante el tratamiento (FSC-CO₂+HPU) para intentar acelerar el proceso de inactivación.

El análisis de varianza (ANOVA) multifactorial realizado para conocer el efecto de los distintos tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ (FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU, FSC-CO₂+DI, FSC-CO₂+HPU+DI) sobre el nivel de inactivación de *E. coli* ($\log(N/N_0)$) obtenido en muestras de pechuga de pollo (Figura 4.3), reveló que, la aplicación de HPU a los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ llevados a cabo a diferentes presiones (150, 250, 250 y 450 bar; 41 °C) y temperaturas (36, 41, 46 y 51 °C; 350 bar), dio lugar a un aumento significativo ($p < 0.05$) en el nivel de inactivación de *E. coli*. Se obtuvo una reducción promedio de 2.1 ciclos-log mediante el tratamiento combinado (FSC-CO₂+HPU), comparado con la reducción de 1.6 ciclos-log de *E. coli* obtenida mediante solo FSC-CO₂ bajo los mismos intervalos de presión y temperatura estudiados.

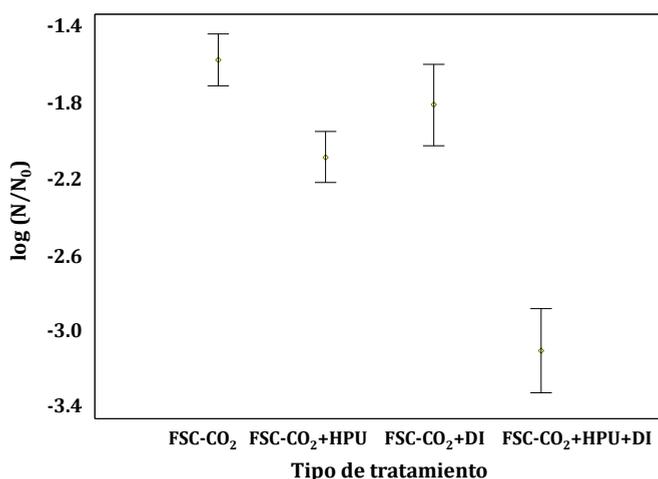


Figura 4.3 Influencia de la aplicación de HPU y de sumergir la muestra en una disolución salina en el tratamiento de inactivación de *E. coli* en muestras de pechuga de pollo mediante FSC-CO₂ a diferentes presiones (150, 250, 350, 450 bar) y temperaturas (36, 41, 46 y 51 °C). Valores promedio ± intervalos LSD.

En los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ a diferentes presiones (150, 250, 350 y 450 bar, manteniendo la temperatura constante de 41 °C), la aplicación de HPU permitió aumentar significativamente ($p < 0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli*, de 1.5 ciclos-log reducidos tras 40 min de tratamiento mediante FSC-CO₂ (Figura 4.1), hasta 2.4 ciclos-log usando FSC-CO₂+HPU (Figura 4.4-A) bajo las mismas condiciones de tratamiento.

En los tratamientos realizados mediante FSC-CO₂ a diferentes temperaturas (36, 41, 46 y 51 °C), manteniendo la presión constante (350 bar), los HPU permitieron obtener en los tratamientos a 36 y 41 °C (350 bar), una reducción de 2.0 ciclos-log usando FSC-CO₂+HPU tras 40 min de tratamiento (Figura 4.4-B), mientras que la reducción obtenida con FSC-CO₂ fue de 1.2 ciclos-log bajo las mismas condiciones de tratamiento (Figura 4.2). Usando 46 °C, el uso de HPU no aumentó significativamente ($p > 0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli*, obteniendo una reducción promedio de 2.5 ciclos-log tras 40 min de tratamiento con FSC-CO₂ tanto aplicando HPU (Figura 4.4-B) como sin aplicar (Figura 4.2). Sin embargo, a 51 °C, el uso de HPU permitió reducir a 20 min el tiempo necesario para alcanzar la inactivación total de *E. coli* (6.6 ciclos log) (Figura 4.4-B), frente a los 30 min necesarios empleando solo FSC-CO₂ (Figura 4.2). Por tanto, la aplicación simultánea de FSC-CO₂ y HPU, en general, aumentó significativamente ($p < 0.05$) la velocidad de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo comparado con los tratamientos de solo FSC-CO₂.

La Figura 4.4-A que describe las cinéticas de inactivación de *E. coli* obtenidas mediante el proceso combinado de FSC-CO₂+HPU bajo diferentes condiciones de presión (150, 250, 350 y 450 bar) a temperatura constante (41 °C) muestra que, tras 10 min de tratamiento se obtuvo en promedio una reducción de 1.3 ciclos-log para todas las presiones estudiadas. Después de este tiempo, la población se redujo significativamente ($p < 0.05$) hasta alcanzar una reducción promedio de 2.0 ciclos-log tras 40 min de tratamiento para todas las presiones, excepto para el tratamiento llevado a cabo a 450 bar en el cual se logró una reducción de 2.4 ciclos-log tras el mismo tiempo de tratamiento. Por tanto, al igual que en los tratamientos mediante FSC-CO₂, la presión mostró un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el nivel de

inactivación de *E. coli* en las muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO₂+HPU, aunque las diferencias no fueron muy grandes probablemente por la rápida saturación del agua situada sobre la superficie de las muestras cárnicas, a cualquiera de las presiones ensayadas.

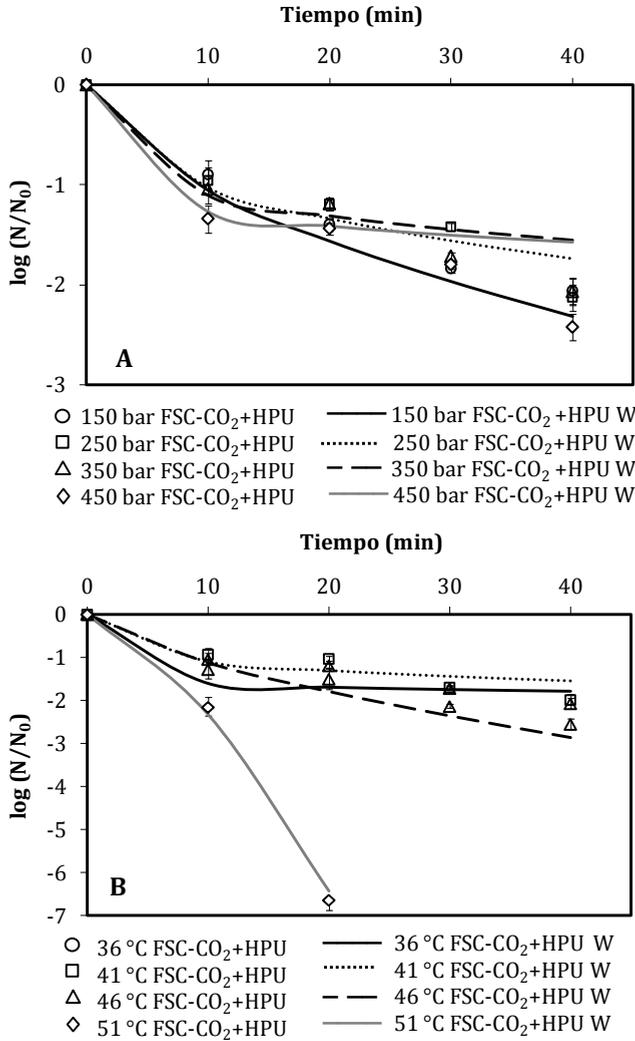


Figura 4.4. Cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO₂+HPU: **A.** diferentes presiones (41 °C) y **B.** diferentes temperaturas (350 bar). Datos experimentales (puntos); valores ajustados mediante el modelo de Weibull (líneas).

La Figura 4.4-B describe las cinéticas de inactivación de *E. coli* en muestras de pollo mediante FSC-CO₂+HPU bajo diferentes condiciones de temperatura (36, 41, 46 y 51 °C) a presión constante (350 bar). Las curvas de inactivación obtenidas a 36 y 41 °C mostraron un comportamiento similar y no se observaron diferencias significativas ($p>0.05$) entre ambas para ninguno de los tiempos de tratamiento estudiados. Para dichas temperaturas, la población se redujo en 1.0 ciclo-log tras 10 min de tratamiento y disminuyó progresivamente hasta 2.0 ciclos-log tras 40 min de tratamiento. Sin embargo, a 46 °C, a pesar de que tras 10 min de tratamiento la reducción microbiana fue similar a la obtenida a menores temperaturas, conforme avanzó el tiempo de tratamiento, el nivel de inactivación aumentó progresivamente hasta alcanzar una reducción de 2.5 ciclos-log tras 40 min. Empleando 51 °C, la población de *E. coli* disminuyó rápidamente, alcanzando una reducción de 2.1 ciclos-log y 6.6 ciclos-log (inactivación total) tras 10 y 20 min de tratamiento, respectivamente. Por lo tanto, en tratamientos con FSC-CO₂+HPU, la temperatura también afectó significativamente ($p<0.05$) al nivel de inactivación alcanzado.

Las reducciones alcanzadas en el presente trabajo mediante FSC-CO₂+HPU, en el que se han empleado matrices sólidas, son moderadas en comparación a las obtenidas empleando matrices líquidas (Ortuño y col., 2014b). Ortuño y col. (2014b) observaron un drástico aumento de la velocidad de inactivación al combinar FSC-CO₂+HPU en comparación con el uso de FSC-CO₂, que atribuyeron a la vigorosa agitación que producen los HPU así como a fenómenos de cavitación. Esta agitación, facilita la disolución del CO₂ en el agua del medio donde están suspendidas las células, y por tanto, favorece el contacto entre el CO₂ y los microorganismos. Asimismo la cavitación provoca daños en las paredes celulares de los microorganismos. En el presente trabajo se ha observado cómo, dada la complejidad y naturaleza de las matrices sólidas, junto con su bajo contenido en agua libre en superficie, el efecto mecánico producido por los HPU, no puede acelerar tan drásticamente la inactivación microbiana. En este sentido, únicamente se ha alcanzado la inactivación total de *E. coli* en muestras de pechuga de pollo empleando temperaturas de 51 °C (350 bar), y para tratamientos de al menos 20 min.

Efecto de sumergir la muestra de pechuga de pollo en disolución salina durante los tratamientos con FSC-CO₂

En el presente trabajo se ha observado que la aplicación simultánea de FSC-CO₂ y HPU para procesos de inactivación en matrices sólidas ha tenido menor efecto que el observado por otros autores en matrices con un elevado contenido en agua libre, como son los zumos (Ortuño y col., 2012b, 2013, 2014a). Teniendo esto en cuenta, se procedió a estudiar el efecto de la adición de una disolución salina (DI) en el depósito de inactivación sobre las cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en pechuga de pollo mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU, bajo diferentes presiones (150, 250 y 350 bar) a temperatura constante (46 °C). Cabe destacar que, la presión máxima de tratamiento (450 bar) utilizada en el apartado anterior, no fue usada en el presente estudio debido a que el análisis estadístico mostró que el aumento de la presión hasta valores tan elevados, que por otra parte encarecerían notablemente la aplicación de proceso a escala industrial, no tuvo un efecto relevante en el grado de inactivación.

El ANOVA multifactorial mostrado en la Figura 4.3, indica que, en general, la adición de la DI durante los tratamientos con FSC-CO₂ no supuso una mejora significativa ($p>0.05$) de los mismos, en comparación a los tratamientos sin DI.

Se podría pensar que la presencia de DI en el recipiente de inactivación permitiría conseguir niveles de reducción equivalentes a los obtenidos en matrices líquidas usando condiciones de tratamiento similares. El nivel de inactivación de *E. coli* (1.1 ciclo-log) obtenido por Ortuño y col. (2012b) tras los primeros 20 min de tratamiento mediante FSC-CO₂ (225 bar, 41 °C) en medio de cultivo LB, si es comparable al nivel de inactivación de *E. coli* (1.3 ciclos-log) obtenido en el presente trabajo mediante FSC-CO₂+DI tras el mismo tiempo de tratamiento pero a 250 bar y 46 °C; sin embargo después de este tiempo, Ortuño y col. (2012b) observaron que el nivel de inactivación de *E. coli* en el medio LB aumentó drásticamente hasta alcanzar la reducción total de la población tras 40 min de tratamiento, mientras que en el presente trabajo se obtuvo una reducción de 3.0 ciclos-log tras el mismo tiempo de tratamiento con FSC-CO₂ (Figura 4.5-B). Esto podría indicar que la velocidad y efectividad de los mecanismos

de inactivación propios del CO₂ supercrítico en matrices donde sólo está presente una disolución, como es el caso de los medios de cultivo o zumos de frutas (Ortuño y col., 2012b; Ortuño y col., 2014a) es mayor que en un medio líquido donde hay presente una matriz sólida como en el presente trabajo. Este comportamiento podría ser atribuido a que la compleja estructura y composición de la matriz cárnica (proteínas, grasa y sales, principalmente) donde se encuentran adheridos los microorganismos, podría tener un efecto protector, dificultando que los mismos entren en contacto con el CO₂. Por un lado, la matriz sólida representaría una barrera física que protege a los microorganismos del contacto con el FSC-CO₂, por otro lado los solutos presentes en el sólido, una vez disueltos, podrían interaccionar con el agua, reduciendo el volumen de agua disponible para que el CO₂ pueda disolverse.

La Figura 4.5 muestra las cinéticas de inactivación de *E. coli* en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU sumergidas o no en una DI a diferentes presiones (150, 250 y 350 bar; 46 °C). Cabría esperar que, al igual que ocurre en medios líquidos (Ortuño y col., 2012b), en presencia de DI, un aumento de presión favoreciera la disolución de CO₂ en el medio, y por tanto, se observara un incremento en la velocidad de inactivación conforme aumenta la presión. Sin embargo, la velocidad de inactivación en los tratamientos de FSC-CO₂+DI no aumentó significativamente ($p>0.05$) con la presión para ninguno de los tratamientos.

Como se explicó anteriormente, en una muestra sólida los microorganismos podrían encontrarse adheridos a la superficie de la misma o en su interior, ejerciendo la matriz cárnica una acción protectora frente a diferentes tipos de inactivación, como es el caso del FSC-CO₂. El aumento de presión del medio, daría lugar a un aumento de la concentración de dióxido de carbono disuelto en la DI, sin embargo, el efecto protector de la superficie del sólido podría hacer que esas diferencias de concentración no fueran suficientes para dar lugar a diferencias en la difusión del CO₂ en la membrana celular de las células y por lo tanto observar un efecto de la presión en el nivel de inactivación.

Una vez estudiado el efecto de la disolución salina en las muestras de pechuga de pollo sobre el nivel de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂, se evaluó el efecto combinado de la DI y los HPU.

Efecto de la aplicación de HPU a los tratamientos con FSC-CO₂+DI

Los resultados del ANOVA multifactorial mostrados en la Figura 4.3, revelaron que la aplicación de los HPU en los tratamientos de inactivación de *E. coli* donde las muestras de pechuga de pollo eran sumergidas en DI (FSC-CO₂+DI), aumentó significativamente ($p < 0.05$) el nivel de inactivación; obteniéndose una inactivación promedio de 1.8 ciclos-log de *E. coli* en muestras de pechuga de pollo sumergidas en DI y tratadas mediante FSC-CO₂ (FSC-CO₂+DI), en comparación con 3.1 ciclos-log de reducción promedio obtenida mediante el tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI (Figura 4.3).

Comparando la Figura 4.5-B y 4.5-C se observa que la aplicación de HPU, aceleró significativamente ($p < 0.05$) los mecanismos de inactivación para todas las presiones estudiadas. Este efecto fue observado desde el inicio del tratamiento, ya que en todas las presiones, tras 10 min de tratamiento, la población de *E. coli* se redujo en promedio, 1 y 2 ciclos-log para tratamientos de FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI, respectivamente. Además, para presiones de 150 y 250 bar se alcanzó una reducción de 6.5 ciclos-log (inactivación total) al final del tratamiento aplicando HPU (Figura 4.5-C), en comparación con una reducción de 2-3 ciclos-log en tratamientos sin HPU (Figura 4.5-B).

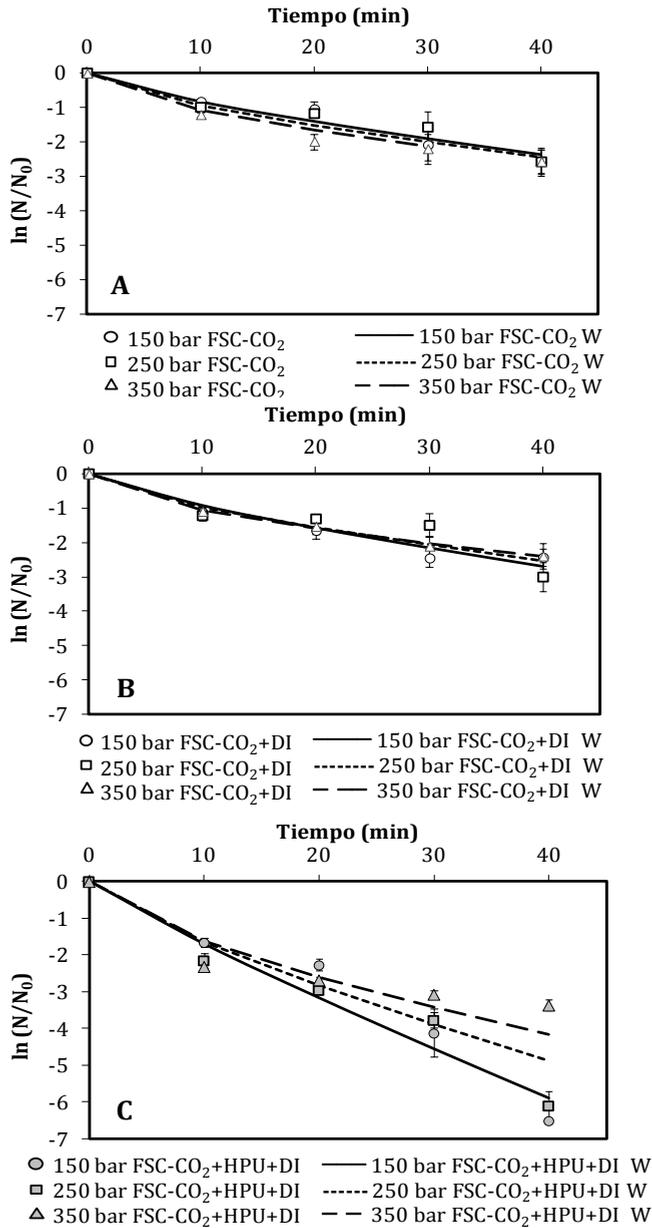


Figura 4.5. Cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante: **A.** FSC-CO₂, **B.** FSC-CO₂+DI y **C.** FSC-CO₂+HPU+DI bajo diferentes condiciones de presión (150, 250, y 350 bar) a temperatura constante (46 °C). Datos experimentales (puntos); valores ajustados mediante el modelo de Weibull (líneas).

Por otro lado, respecto al efecto de la adición de la disolución salina, el análisis estadístico (Figura 4.3), reveló también que la adición de DI en las muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU provocó en general un incremento significativo ($p < 0.05$) en el nivel de inactivación alcanzado en comparación con las muestras sin DI; obteniéndose una reducción promedio de 3.1 mediante el tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI, comparada con una reducción promedio de 2.1 ciclos-log obtenida mediante el tratamiento de inactivación sólo con FSC-CO₂+HPU en el mismo intervalo de presión estudiado (150, 250 y 350 bar), a temperatura constante (46 °C), para ambos tratamientos.

Estos resultados indican que, en presencia de DI, los HPU generan una agitación vigorosa del medio líquido que podría favorecer la disolución del CO₂ en el mismo, acelerando la saturación del medio con CO₂, lo que facilita el contacto con los microorganismos y los mecanismos de inactivación propios del CO₂ supercrítico. Adicionalmente, los HPU al desplazarse por un medio, provocan una serie de compresiones y descompresiones, este efecto mecánico puede afectar la estructura celular de los microorganismos, tal y como ha sido demostrado en matrices líquidas (Ortuño y col., 2014b). Así, el estrés mecánico provocado sobre la membrana celular de algunos microorganismos, da lugar a roturas y a la extracción de componentes vitales, responsables de su inactivación.

Asimismo, la cavitación producida por la aplicación de HPU en la disolución bajo condiciones supercríticas, provoca la formación de pequeñas burbujas de gas que se colapsan e implosionan sobre la superficie de la matriz sólida (Balachandran y col., 2006). En este sentido, la cavitación generada por los HPU, que es uno de los principales responsables de acelerar los mecanismos de inactivación microbiana, solo puede existir en medio líquido donde se pueden presentar condiciones frontera entre distintas fases (Piyasena y col., 2003; Cárcel y col., 2012). El fenómeno de cavitación podría favorecer la difusión del CO₂ en la carne, dando lugar a la inactivación de los microorganismos presentes en su interior, además, el efecto mecánico de los HPU sobre la superficie de la muestra, podría facilitar la separación de los

microorganismos de la matriz cárnica y su transporte hacia la DI, perdiendo los mismos la protección del sólido y facilitando la acción del CO₂.

Por lo anterior, cabe concluir que la aplicación simultánea de FSC-CO₂+HPU en presencia de una DI permitió acelerar notablemente los mecanismos de inactivación del CO₂ supercrítico sobre las células de *E. coli* presentes en muestras de pechuga de pollo.

4.1.2 Inactivación sobre jamón de pavo

Con el objetivo de evaluar la viabilidad de los distintos tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ sobre una muestra cárnica con características distintas a las muestras de pechuga de pollo estudiadas anteriormente, se eligió el jamón de pavo, como ejemplo de un producto cárnico formulado cocido (ElMasry y col., 2011).

Los resultados del análisis de varianza multifactorial revelaron que, el nivel de inactivación promedio de *E. coli*, obtenido mediante los distintos tratamientos de inactivación estudiados (FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU, FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI) sobre muestras de jamón de pavo fue de 4.0 ciclos-log, mientras que en las muestras de pechuga de pollo sólo se obtuvo una reducción promedio de 0.9 ciclos-log, bajo las mismas condiciones de presión y temperatura (150, 250 y 350 bar; 46 °C). Esto indica que, en las muestras de jamón de pavo se vieron favorecidos los mecanismos de inactivación mediante FSC-CO₂, obteniendo un efecto letal sobre las células de *E. coli* significativamente ($p < 0.05$) mayor que el efecto observado en las muestras de pechuga de pollo. A continuación se abordará el efecto de los parámetros del proceso sobre la inactivación de *E. coli*.

Efecto de la presión

Debido a que, en los procesos de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo, los análisis estadísticos revelaron que presiones superiores a 250 bar no supusieron un aumento significativo en la inactivación, en el presente apartado donde se evaluó la inactivación en muestras de jamón de pavo, la presión más alta estudiada en pollo (450 bar) fue descartada.

El análisis estadístico reveló que, en general, la presión tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el nivel de inactivación de *E. coli* obtenido mediante FSC-CO₂ para todos los tiempos de tratamiento estudiados sobre muestras de jamón de pavo. A 150 bar, se obtuvo la menor inactivación promedio (2.4 ciclos-log), sin embargo usando 250 y 350 bar, la inactivación aumentó significativamente ($p < 0.05$) alcanzándose una

reducción promedio de 3.2 y 3.4 ciclos-log, respectivamente, para todos los tiempos de tratamiento estudiados.

La Figura 4.6 muestra las cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de jamón de pavo, tratadas mediante FSC-CO₂ a diferentes presiones (150, 250 y 350 bar), manteniendo la temperatura constante (46 °C). Puede observarse que la velocidad de inactivación de *E. coli* aumentó significativamente ($p < 0.05$) con la presión desde los primeros 5 minutos de tratamiento. Esta diferencia fue más pronunciada tras 20 min de tratamiento, obteniéndose una reducción de 4.0, 5.6 y 6.6 ciclos-log empleando 150, 250 y 350 bar, respectivamente. Finalmente, la población de *E. coli* se redujo totalmente (6.5 ciclos-log) empleando 150 y 250 bar, tras 30 min de tratamiento.

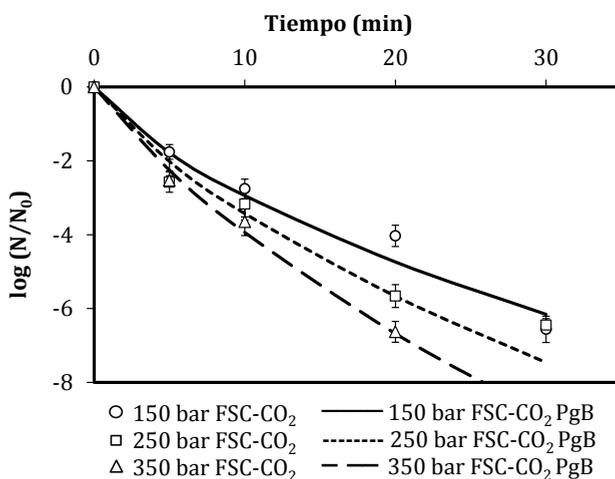


Figura 4.6. Cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO₂ a diferentes presiones (150, 250 y 350 bar; 46 °C). Datos experimentales, (puntos); valores calculados mediante el modelo de Peleg Tipo B (líneas).

En contraste con los resultados obtenidos en la inactivación de *E. coli* inoculada en pechuga de pollo tratada mediante FSC-CO₂, en los que no se observó un efecto significativo de la presión sobre la velocidad de inactivación; en jamón de pavo, un aumento de la presión del CO₂, si supuso un incremento significativo en la tasa de

inactivación de *E. coli*. Este hecho pone de manifiesto el efecto de la naturaleza y estructura de la matriz donde los microorganismos se encuentran inoculados, sobre el proceso de inactivación.

De manera que, a pesar de que la inactivación mediante FSC-CO₂ en matrices cárnicas se ve dificultada debido a naturaleza y composición propias de estas matrices, en comparación con la inactivación en alimentos líquidos (Ferrentino y col., 2010), en jamón de pavo el uso de mayores presiones durante el tratamiento con FSC-CO₂ pudo favorecer los mecanismos de inactivación propios del CO₂, alcanzando niveles de inactivación similares a los obtenidos en matrices líquidas, bajo condiciones similares de tratamiento (Ortuño y col., 2012b).

Efecto de la temperatura

El efecto de la temperatura de tratamiento sobre la inactivación de *E. coli* en jamón de pavo mediante FSC-CO₂ se estudió empleando tres temperaturas diferentes, 41, 46 y 51 °C (350 bar) (Figura 4.7). En general, la velocidad de inactivación aumentó significativamente ($p < 0.05$) conforme aumentó la temperatura del proceso. Empleando 41 °C se obtuvo una reducción máxima de 3.0 ciclos-log al final del tratamiento (30 min). Sin embargo, usando 46 y 51 °C, se produjeron cinéticas de inactivación log-lineal alcanzándose una reducción total de la población (6.6 ciclos-log) tras 20 y 10 min de proceso, respectivamente. Por tanto, los resultados revelaron que para inactivar totalmente la población de *E. coli* (6.6 ciclos-log) en las muestras de jamón de pavo mediante FSC-CO₂, pueden emplearse temperaturas moderadas (46 °C, 350 bar, 20 min). Así, estas condiciones de proceso, podrían minimizar el deterioro de las características de calidad en el producto tratado causado por el uso de altas temperaturas.

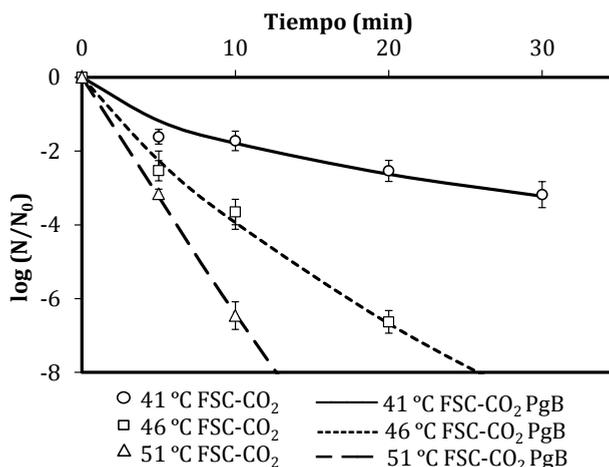


Figura 4.7. Cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO₂ a diferentes temperaturas (41, 46 y 51 °C; 350 bar). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo de Peleg Tipo B (líneas).

Efecto de la aplicación de HPU al tratamiento con FSC-CO₂

Al igual que en los tratamientos con pechuga de pollo, se planteó aplicar simultáneamente ultrasonidos de potencia durante el tratamiento con FSC-CO₂ sobre muestras de jamón de pavo, a fin de acelerar la velocidad de inactivación de *E. coli* en las muestras.

Los resultados obtenidos en el análisis de varianza multifactorial (Figura 4.8), revelaron que, en general, la aplicación simultánea de HPU durante los tratamientos con FSC-CO₂ bajo diferentes condiciones de presión (150, 250 y 350 bar; 46 °C) y temperatura (41, 46 y 51; 350 bar), permitieron obtener un nivel de inactivación de *E. coli* promedio (3.5 ciclos-log) significativamente mayor ($p < 0.05$) que el nivel promedio alcanzado usando sólo FSC-CO₂ (3.1 ciclos-log).

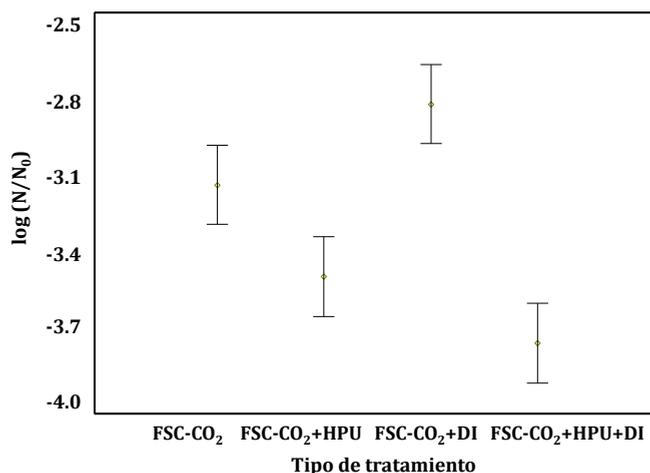


Figura 4.8 Influencia de la aplicación de HPU y de sumergir la muestra en una disolución salina en el tratamiento de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón de pavo mediante FSC-CO₂ a diferentes presiones (150, 250, 350 bar; 46 °C) y temperaturas (41, 46 y 51 °C; 350 bar). Valores promedio \pm intervalos LSD.

En la Figura 4.9, se describen las cinéticas de inactivación de *E. coli* en jamón de pavo usando FSC-CO₂+HPU bajo diferentes condiciones de presión (Figura 4.9-A) y temperatura (Figura 4.9-B). Cuando los tratamientos fueron llevados a cabo a diferentes presiones (150, 250 y 350 bar) manteniendo la temperatura constante (46 °C) se observó que tras 5 min de tratamiento, se obtuvo una reducción de 2.7 ciclos-log para todas las presiones estudiadas, sin embargo con el transcurso del tiempo de tratamiento, la velocidad de inactivación fue significativamente ($p < 0.05$) más lenta empleando 150 bar, en comparación con las otras dos presiones estudiadas, alcanzando la inactivación total de *E. coli* (6.6 ciclos-log) tras 30 min de tratamiento. En cambio, empleando 250 y 350 bar sólo fueron necesarios 20 min para reducir totalmente la población de *E. coli* en las muestras de jamón de pavo.

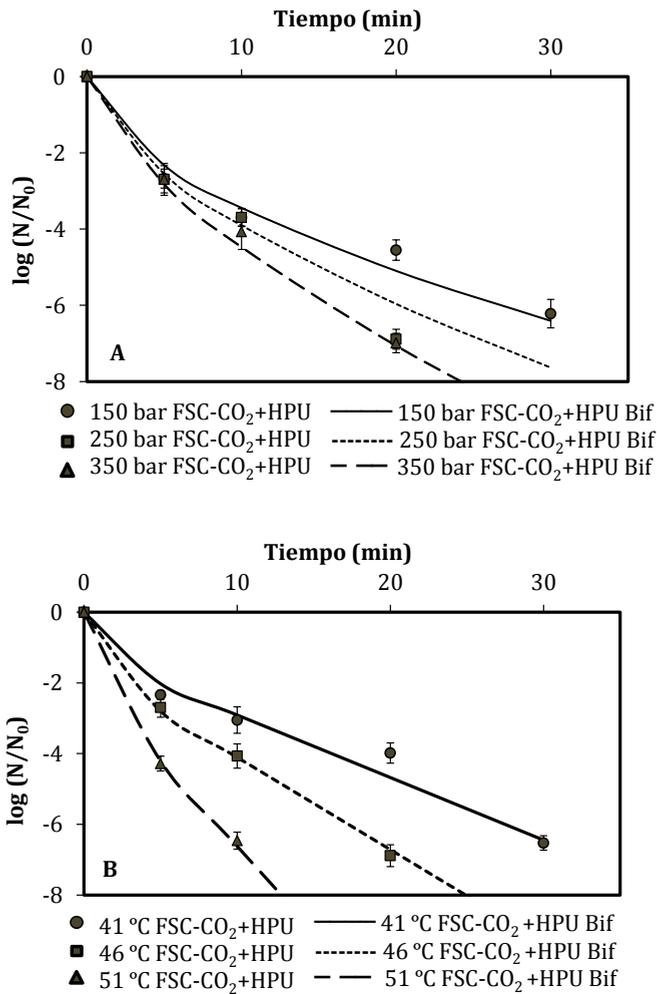


Figura 4.9. Cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO₂+HPU: **A.** diferentes presiones (46 °C) y **B.** diferentes temperaturas (350 bar). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo Bifásico (líneas).

Por otro lado, la temperatura tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre la velocidad de inactivación de *E. coli* en jamón de pavo tratado con FSC-CO₂+HPU (Figura 4.9-B). Las curvas muestran que conforme incrementa la temperatura del proceso, la velocidad de inactivación aumenta, alcanzándose la reducción total de la población de

E. coli (6.5 ciclos-log) tras 30, 20 y 10 min de tratamiento a 350 bar, usando 41, 46 y 51 °C, respectivamente.

Con el objetivo de evaluar detalladamente el efecto de los HPU sobre las cinéticas de inactivación de *E. coli* en las muestras de jamón de pavo, se compararon los resultados obtenidos con FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU. Cuando los tratamientos fueron llevados a cabo a diferentes presiones, se observó que la aplicación de HPU no aumentó significativamente ($p>0.05$) la velocidad de inactivación de *E. coli* (Figura 4.9-A), a excepción del tratamiento llevado a cabo a 250 bar (46 °C), donde los HPU lograron reducir a 20 min el tiempo necesario para alcanzar la inactivación total de *E. coli* (6.9 ciclos-log), comparado con los 30 min necesarios empleando sólo FSC-CO₂ (Figura 4.6).

En cuanto a la aplicación de HPU sobre los tratamientos de inactivación llevados a cabo a diferentes temperaturas, éstos tuvieron un efecto significativo únicamente empleando la menor temperatura de trabajo, 41 °C. Usando FSC-CO₂+HPU a 41 °C (350 bar), se alcanzó la reducción total de la población de *E. coli* (6.9 ciclos-log) tras 30 min de tratamiento (Figura 4.9-B), mientras que la reducción obtenida mediante sólo FSC-CO₂ (Figura 4.7) fue de 3.1 ciclos-log, bajo las mismas condiciones de tratamiento. Estos resultados demuestran que, aunque la aplicación de HPU a los tratamientos con FSC-CO₂ en jamón de pavo permitió acelerar los mecanismos de inactivación, el efecto de los mismos depende de las condiciones del proceso empleadas.

Efecto de sumergir la muestra de jamón de pavo en disolución salina durante los tratamientos con FSC-CO₂

De forma similar a los tratamientos realizados con pechuga de pollo, se estudió el efecto de sumergir en DI la muestra de jamón de pavo, inoculada con *E. coli* (10⁶ UFC/g), sobre la velocidad de inactivación obtenida mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU bajo diferentes condiciones de presión (150, 250 y 350 bar, 46 °C) y temperatura (41, 46 y 51 °C, 350 bar) para intentar acelerar los mecanismos de inactivación mediante FSC-CO₂.

El análisis de varianza multifactorial mostró que, el nivel de inactivación obtenido mediante el tratamiento con FSC-CO₂ en el cual las muestras de jamón de pavo se encontraban sumergida en DI (FSC-CO₂+DI), con una reducción de 2.8 ciclos-log, fue significativamente menor ($p < 0.05$) que la inactivación alcanzada mediante FSC-CO₂ en las muestras sin sumergir (reducción promedio de 3.1 ciclos-log) en el mismo intervalo de presión (150, 250 y 350 bar; 46 °C) y temperatura (41, 46 y 51 °C; 350 bar) estudiado (Figura 4.8).

Al igual que en los resultados con las muestras de pechuga de pollo, la adición de DI no supuso un mejora significativa del nivel de inactivación. Este fenómeno puede ser debido a que, como se ha explicado anteriormente, los microorganismos se encuentran adheridos a la matriz cárnica, que los protege, y la adición de DI no parece ser suficiente para generar un gradiente de concentraciones que permita acelerar la penetración del CO₂ en estado supercrítico en el interior de los microorganismos.

En la Figura 4.10-A puede observarse que, para tratamientos con FSC-CO₂+DI, la velocidad de inactivación aumentó significativamente ($p < 0.05$) con la presión. Tras 20 min de tratamiento se obtuvo una reducción de 2.5, 3.8 y 6.4 ciclos-log empleando 150, 250 y 350 bar, respectivamente. Comparando estos resultados con los mostrados anteriormente en las muestras de jamón de pavo sin DI, se observa que en general, la presencia de DI alrededor de las muestras, no solo no aumentó el nivel de inactivación de *E. coli* sino que fue ligeramente menor. Tras 20 min de tratamiento con FSC-CO₂ se obtuvo una reducción de 4, 5,6 y 6.6 ciclos-log a 150, 250 y 350 bar (46 °C) (Figura 4.6), mientras que en las muestras sumergidas en DI (FSC-CO₂+DI) se obtuvieron reducciones de 2.5, 3.8 6.4 ciclos-log bajo las mismas condiciones de tratamiento (Figura 4.10-A).

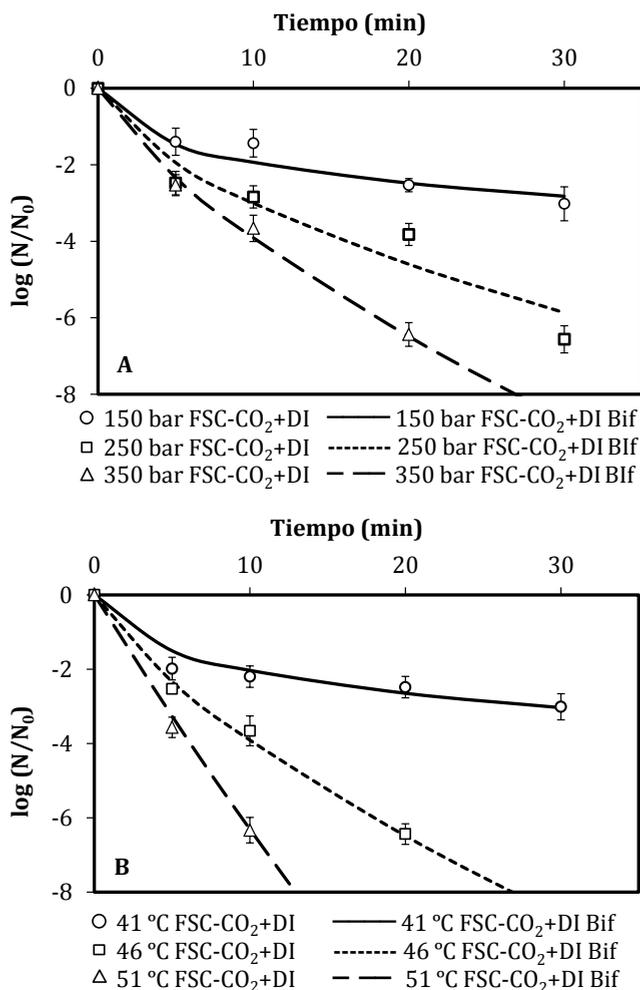


Figura 4.10. Cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO₂+DI: **A.** diferentes presiones (46 °C) y **B.** diferentes temperaturas (350 bar). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo Bifásico (líneas).

Por otro lado, la Figura 4.10-B muestra las cinéticas de inactivación obtenidas mediante FSC-CO₂+DI a diferentes temperaturas. La tasa de inactivación de *E. coli* aumentó significativamente ($p < 0.05$) conforme aumentó la temperatura del tratamiento. Usando 41 °C se alcanzó una reducción de 3 ciclos-log tras 30 min de tratamiento, sin embargo, empleando 46 y 51 °C, se logró inactivar totalmente

(6.5 ciclos-log) la población de *E. coli* tras 20 y 10 min de tratamiento, respectivamente. Comparando estos resultados con los obtenidos mediante FSC-CO₂ sin DI (Figura 4.7), se ha observado que la adición de DI no mostró un incremento significativo ($p>0.05$) en el nivel de inactivación de *E. coli* alcanzado para todos los tiempos de tratamiento y temperaturas de trabajo estudiadas.

Como se explicó anteriormente, aunque la adición de la DI proporciona un volumen mayor de agua donde el CO₂ puede disolverse y actuar inactivando los microorganismos, el tratamiento se lleva a cabo en un depósito sin agitación lo cual limita la formación de gradientes de concentración que favorezcan la disolución del CO₂, haciendo necesario el uso de tiempos de tratamiento excesivamente largos para que la disolución se sature y permita la difusión del CO₂ al interior de la células. Además la estructura y composición de la matriz cárnica crean un efecto protector que interfiere en el contacto de las células con el CO₂ supercrítico.

Por tanto, si bien la adición de DI a la matriz cárnica no aumentó el grado de inactivación microbiana, el aumento en la presión o temperatura del CO₂ si fueron factores determinantes. Un incremento de la presión o temperatura del proceso permitió cambiar las propiedades del CO₂ y de la membrana celular, favoreciendo los mecanismos de inactivación. Estos efectos también han sido descritos en matrices líquidas por Ortuño y col. (2012b) y Ortuño y col. (2014b) en medio de cultivo LB y zumo de naranja, respectivamente. Estos autores observaron bajos niveles de inactivación de *E. coli* (promedio de 1 ciclo-log) tras 20 min de tratamiento mediante FSC-CO₂ (100 - 350 bar; 36 °C) en ambas matrices, identificando la etapa de solubilización del CO₂ y penetración del mismo en la célula, como la limitante de la velocidad de inactivación.

Efecto de los HPU en los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂+DI

Así pues, para favorecer el contacto entre el CO₂ y las células microbianas y ejercer un efecto mecánico disruptivo adicional, reduciendo de esa forma los tiempos de proceso, se estudió la aplicación de HPU en el tratamiento con FSC-CO₂+DI en las muestras de jamón de pavo, bajo las mismas condiciones de presión y temperatura que las muestras sin HPU.

Los resultados del ANOVA multifactorial revelaron que la aplicación de los HPU en los tratamientos de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂+DI, provocó un aumento significativo ($p < 0.05$) en el nivel de inactivación, logrando reducir en promedio 3.8 ciclos-log la población de *E. coli* en las muestras de jamón de pavo, en comparación a la reducción obtenida (2.8 ciclos-log) con los tratamientos mediante FSC+DI sin HPU (Figura 4.8).

La Figura 4.11-A muestra que empleando FSC-CO₂+HPU+DI se redujo totalmente la población de *E. coli* tras 20 min de tratamiento para todas las presiones estudiadas entre las cuales no se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) en la velocidad de inactivación; mientras que, empleando FSC-CO₂+DI, únicamente se obtuvo una reducción similar tras 20 min de tratamiento empleando la máxima presión de trabajo, 350 bar (Figura 4.10-A). Estos resultados demuestran que, aplicando HPU al tratamiento de FSC-CO₂+DI no es necesario usar una presión de trabajo superior a 150 bar para reducir totalmente la población de *E. coli* y alcanzar la máxima velocidad de inactivación del sistema.

La Figura 4.11-B, muestra los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU+DI llevados a cabo a diferentes temperaturas (41, 46 y 51 °C; 350 bar). La aplicación de HPU al proceso de FSC-CO₂+DI tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) en los tratamientos llevados a cabo a 41 y 51 °C. Empleando la menor temperatura de trabajo, 41 °C, se alcanzó una reducción total de la población (6.5 ciclos-log) tras 30 min de proceso, mientras que sin HPU la reducción alcanzada fue de 3.0 ciclos-log, tras el mismo periodo de tiempo (Figura 4.10-B). Empleando la máxima temperatura de

trabajo (51 °C), el tiempo para alcanzar la inactivación total se redujo a 5 min, comparado con los 10 min requeridos en tratamientos sin HPU (Figura 4.10-B).

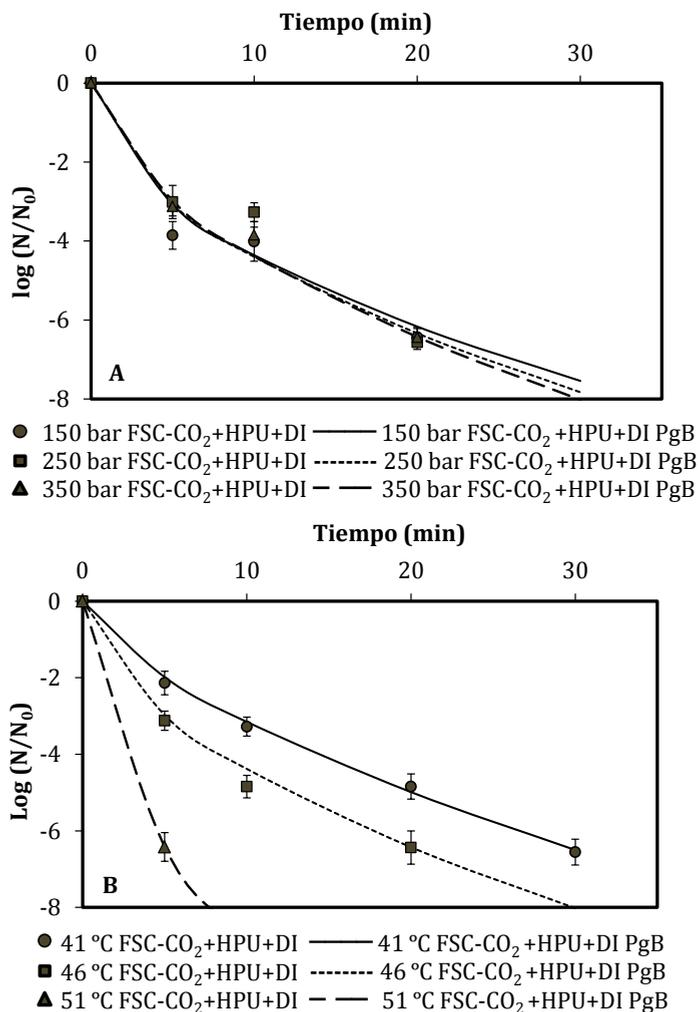


Figura 4.11. Cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI: **A.** diferentes presiones (46 °C) y **B.** diferentes temperaturas (350 bar). Datos experimentales (puntos); valores calculados mediante el modelo de Peleg Tipo B (líneas).

Estos resultados indican que, al aplicar HPU al tratamiento con FSC-CO₂+DI, los efectos mecánicos que generan los HPU en presencia de un medio líquido, mejoran el contacto entre los microorganismos presentes en la muestra cárnica y el CO₂ supercrítico. Así, el aumento en la tasa de inactivación puede ser atribuida a la agitación vigorosa descrita en los tratamientos de inactivación microbiana en zumos de frutas mediante FSC-CO₂+HPU (Ortuño y col., 2014a) y a la cavitación provocada por los HPU en el medio líquido, la cual aumenta considerablemente la microagitación del CO₂ en la DI, acelerando los mecanismos de inactivación (Spilimbergo y col., 2014). El fenómeno de cavitación también podría llevar aparejado la ruptura de las paredes celulares de los microorganismos por el estrés mecánico al que se ven sometidas (Ortuño y col., 2014a). Sin embargo, se ha observado también que el efecto letal del CO₂ depende además, de las condiciones de presión y temperatura a la que éste se encuentre.

Por otra parte, respecto al efecto de la adición de la disolución salina, el análisis de varianza (Figura 4.8) reveló que sumergir las muestras en DI durante el tratamiento con FSC-CO₂+HPU no provocó en general un incremento significativo ($p>0.05$) en el nivel de inactivación de *E. coli* alcanzado, en comparación con las muestras sin DI, obteniéndose una reducción promedio de 3.8 ciclos-log mediante FSC-CO₂+HPU+DI, y 3.5 ciclos-log mediante sólo FSC-CO₂+HPU. La única excepción fue observada para el tratamiento llevado a cabo a 150 bar (46 °C), reduciendo el tiempo necesario para alcanzar la inactivación total a 20 min (Figura 4.11-A), en comparación con los 30 min necesarios en los tratamientos sin DI (Figura 4.9-A)

Aunque la adición de DI no provocó un aumento significativo ($p<0.05$) en el inactivación de *E. coli* durante los tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU (Figura 4.11), comparado con el nivel de inactivación alcanzado en los tratamientos sin disolución (Figura 4.9), la temperatura sí mostró ser un factor determinante en los tratamientos con FSC-CO₂+HPU+DI. El aumento de la temperatura del CO₂, incrementó significativamente la velocidad de inactivación. Este efecto es atribuido a un cambio en las propiedades del CO₂, principalmente en la difusividad, la cual aumenta con la temperatura del proceso y facilita la entrada del CO₂ supercrítico en materiales

porosos (Tomasula, 2003). Además, el uso de mayores temperaturas de tratamiento puede provocar una mayor fluidez de las membranas celulares, que facilita la entrada del CO₂ al interior de las células (García-González y col., 2007) provocando distintas alteraciones metabólicas responsables de la muerte celular (Ferrentino y col., 2014; Ortuño y col., 2014b).

Efecto sinérgico de la aplicación de HPU en el proceso de FSC-CO₂+DI

Para identificar si el grado de inactivación observado en los diferentes tratamientos descritos previamente, son debidos a los mecanismos de inactivación propios del CO₂ usando sólo FSC-CO₂, a los efectos de los HPU, o bien, al efecto sinérgico provocado por la combinación de ambas técnicas; se realizaron experiencias de inactivación de *E. coli* en jamón de pavo sumergido en DI y aplicando HPU (HPU+DI), comparándose con los tratamientos de FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU+DI.

La Figura 4.12-A, B y C muestra las curvas de inactivación de *E. coli* en jamón de pavo tratadas mediante tres sistemas de tratamiento diferentes: FSC-CO₂+DI (350 bar), FSC-CO₂+HPU+DI (350 bar; 42 W ± 5 W) y HPU+DI (42 W ± 5 W), a 41, 46 y 51 °C. Los resultados muestran que, en general, la aplicación simultánea de HPU a los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂+DI bajo las tres condiciones de temperatura estudiadas (41, 46 y 51 °C; 350 bar), permitió obtener una tasa de inactivación de *E. coli* significativamente ($p < 0.5$) mayor que con el tratamiento llevado a cabo solo con HPU+DI a la misma condición de temperatura. Usando FSC-CO₂+HPU+DI se obtuvo una reducción de 6.6 ciclos-log (inactivación total) en la población de *E. coli* tras 30 min de tratamiento para todas las temperaturas estudiadas, mientras que, empleando HPU+DI se obtuvo una reducción promedio de 1.4 ciclos-log para las tres condiciones de temperatura estudiadas tras el mismo tiempo de tratamiento.

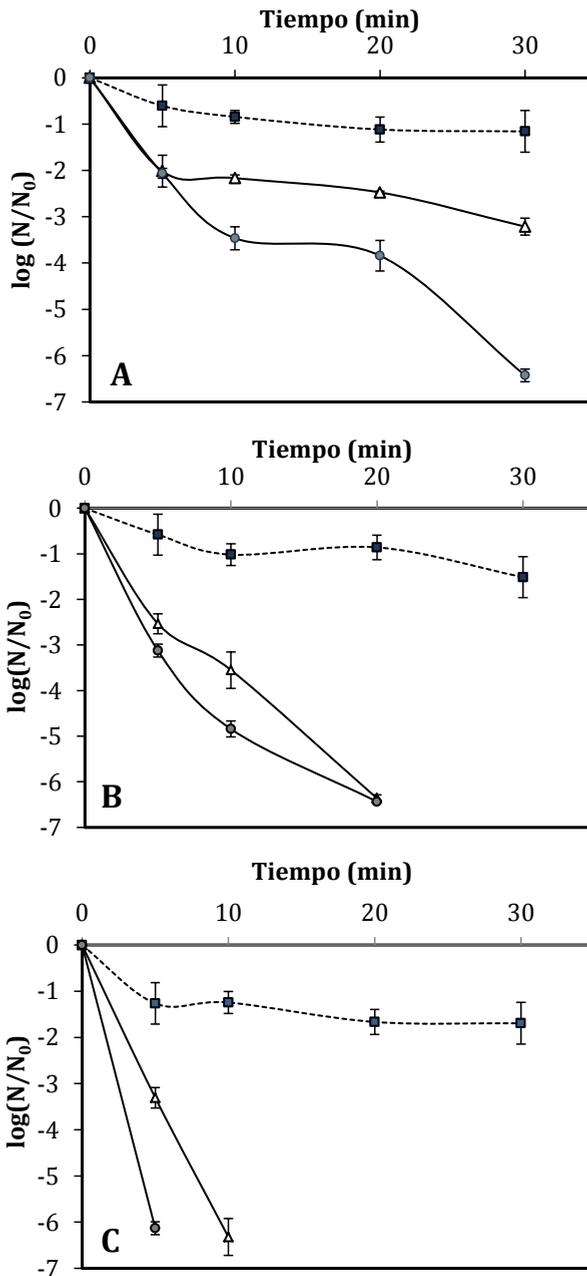


Figura 4.12. Curvas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de jamón de pavo obtenidas mediante ■ HPU+DI, Δ FSC-CO₂+DI y ● FSC-CO₂+HPU+DI usando una presión de CO₂ constante (350 bar) bajo diferentes condiciones de temperatura: **A.** 41 °C **B.** 46 °C y **C.** 51 °C.

A 41 °C, la combinación de FSC-CO₂+HPU+DI permitió obtener un mayor efecto sobre la inactivación de *E. coli* que la suma de los efectos individuales obtenidos con FSC-CO₂+DI y HPU+DI (Figura 4.12-A). Tras 30 min de tratamiento empleando únicamente FSC-CO₂+DI o HPU+DI, se obtuvo una reducción de 3.2 y 1.2 ciclos-log, respectivamente; sin embargo, cuando ambos tratamientos fueron aplicados simultáneamente (FSC-CO₂+HPU+DI), se alcanzó una reducción de 6.4 ciclos-log de *E. coli* (inactivación total), siendo este nivel de inactivación un 45% mayor al alcanzado tomando en cuenta la suma de los efectos de los tratamientos FSC-CO₂+DI y HPU+DI aplicados individualmente (4.4 ciclos-log). Por lo tanto, las cinéticas de inactivación mostraron un efecto sinérgico significativo ($p < 0.05$) al combinar ambas tecnologías.

En la Figura 4.12-B se observa que empleando una temperatura de 46 °C, la aplicación de HPU al tratamiento de FSC-CO₂+DI (350 bar) dio lugar a un aumento significativo ($p < 0.05$) de la inactivación de *E. coli* tras 10 min de tratamiento, obteniendo una reducción de 1, 3.5 y 4.8 ciclos-log mediante HPU+DI, FSC+DI y FSC-CO₂+HPU+DI, respectivamente. Sin embargo, tras 20 min, se logró inactivar toda la población de *E. coli* (6.4 ciclos-log) tanto con FSC-CO₂+DI como aplicando FSC-CO₂+HPU+DI. Este fenómeno puede deberse a que usando 46 °C, se incrementa la difusividad del CO₂ y la fluidez de las membranas celulares y en consecuencia, se facilita el contacto de éste con las células de *E. coli* provocando su inactivación. Estos resultados revelan que en los tratamientos a 46 °C, se puede lograr la inactivación total de la población de *E. coli* en muestras de jamón de pavo, tras 20 min de tratamiento con FSC-CO₂+DI (350 bar) tanto aplicando como sin aplicar HPU.

Empleando la máxima temperatura de trabajo (51 °C), la combinación de FSC-CO₂+HPU+DI mostró un nivel de inactivación de *E. coli* significativamente ($p < 0.05$) mayor que el alcanzado mediante los tratamientos aplicados individualmente (Figura 4.12-C). Tras 5 min de tratamiento, se alcanzó una reducción de 3.3 y 1.2 ciclos-log mediante FSC-CO₂+DI y HPU+DI, respectivamente, mientras que aplicando FSC-CO₂+HPU+DI se alcanzó una reducción de 6.1 ciclos-log (inactivación total) de *E. coli*. Este resultado refleja que la aplicación combinada de FSC-CO₂+DI y HPU provoca un

nivel de inactivación un 35 % mayor al alcanzado considerando la suma de los efectos mediante los tratamientos aplicados individualmente (4.5 ciclos-log).

Los resultados descritos previamente, sugieren que los mecanismos bajo los cuales el efecto sinérgico tiene lugar podrían deberse principalmente a los HPU. La aplicación de HPU al tratamiento con FSC-CO₂, como se ha explicado anteriormente, podría provocar una agitación vigorosa de la DI, favoreciendo los mecanismos de inactivación propios del tratamiento con FSC-CO₂ (Ortuño y col., 2014b). Dicha agitación acelera principalmente la disolución y saturación del CO₂ en el medio y favorece el contacto con las células de *E. coli* presentes en la fase acuosa. Una vez que el CO₂ se encuentra disuelto en la DI, el uso de temperaturas superiores a 41 °C podría modificar la fluidez de la membrana celular y acelerar la difusión del CO₂ al interior de las células microbianas, y en consecuencia, reducir el tiempo necesario para lograr la inactivación total de la población de *E. coli* presente en las muestras de carne.

No obstante, no solo la agitación vigorosa y microcorrientes de alta intensidad son las únicas causas a las cuales se puede atribuir un aumento en la tasa de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU; algunos autores han demostrado recientemente que el fenómeno de cavitación, generado por los HPU, está asociado a los principales mecanismos de inactivación de la técnica combinada, aumentando significativamente la velocidad de inactivación en comparación a la tasa de inactivación observada en los tratamientos de inactivación mediante solo FSC-CO₂ (Cappelletti y col., 2014; Ortuño y col., 2014b; Spilimbergo y col., 2014; Ferrentino y Spilimbergo 2015), o la aplicación de sólo HPU (Piyasena y col., 2003; Chemat y col., 2011). La cavitación puede dañar drásticamente la envoltura celular (incluyendo la membrana citoplasmática y pared celular en bacterias y membrana externa si ésta existe como en el caso de las células Gram-negativas). Este daño en los microorganismos puede contribuir a la extracción del contenido intracelular, acelerando la muerte de los microorganismos (Chemat y col., 2011).

4.1.3. Inactivación sobre jamón curado

Los resultados descritos previamente han mostrado como el uso de FSC-CO₂ y HPU aplicados de forma simultánea, permiten la inactivación de células de *E. coli* (10⁶ UFC/g) inoculadas en muestras de carne con características diferentes. Además, la incorporación de una disolución salina donde las muestras queden sumergidas, ha logrado favorecer los mecanismos de inactivación mediante FSC-CO₂ gracias a los efectos provocados por los HPU en presencia de un medio líquido. Por otro lado, se ha observado que cuando las muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo han sido tratadas en condiciones similares de presión y temperatura mediante los distintos tratamientos con FSC-CO₂, la estructura y composición que presentan las muestras de pechuga de pollo han influido significativamente en el nivel de inactivación de *E. coli*, obteniéndose niveles de inactivación menores en comparación a los observados en las muestras de jamón de pavo.

En base a estos resultados, se propuso estudiar la viabilidad de los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+HPU+DI, sobre muestras de jamón curado inoculadas con células de *E. coli* (10⁶ UFC/g), usando un intervalo de presión (150, 25 y 350 bar), temperatura (41, 46 y 51 °C) y tiempo (5, 10 y 15 min) similares a los usados en las muestras cárnicas estudiadas previamente. Para esta matriz, se aplicó la metodología de superficie de respuesta con un diseño central compuesto para determinar las condiciones óptimas de cada tratamiento, así como para determinar el efecto de las tres variables independientes consideradas, presión, temperatura y tiempo, sobre el proceso de inactivación llevado a cabo con cada tratamiento.

Los resultados del diseño central compuesto, llevado a cabo para estudiar el efecto de las tres variables independientes: presión (P), temperatura (T) y tiempo (t) sobre la inactivación microbiana de *E. coli* en jamón curado, se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1 Diseño experimental empleado en la metodología de superficie de respuesta para evaluar los efectos de las tres variables independientes (P, T y t) sobre la inactivación microbiana, en cada uno de los tratamientos (FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+HPU+DI). Valores experimentales y calculados de inactivación microbiana.

Orden	Variables de proceso				FSC-CO ₂ +HPU		FSC-CO ₂ +HPU+DI	
	Ejecutado	P (bar)	T (°C)	t (min)	log (N/N ₀) experimental	log (N/N ₀) calculado	log (N/N ₀) experimental	log (N/N ₀) calculado
1	3	150	51	10	-1.63±0.13	-2.19	-2.62±0.11	-2.64
2	4	150	46	5	-1.79±0.18	-1.19	-2.49±0.12	-2.45
3	6	150	41	10	-0.33±0.03	-0.98	-1.02±0.18	-1.51
4	11	150	46	15	-2.86±0.53	-2.23	-3.45±0.26	-2.99
5	1	250	46	10	-1.67±0.01	-1.91	-3.60±0.12	-3.62
6	5	250	41	5	-1.36±0.39	-1.30	-2.50±0.01	-2.05
7	7	250	51	5	-2.77±0.09	-2.80	-2.71±0.38	-2.73
8	15	250	46	10	-2.30±0.02	-1.91	-3.61±0.36	-3.62
9	14	250	51	15	-3.07±0.77	-3.13	-3.14±0.05	-3.59
10	12	250	41	15	-1.90±0.18	-1.87	-1.35±0.04	-1.33
11	8	250	46	10	-1.76±0.07	-1.91	-3.66±0.12	-3.62
12	2	350	41	10	-1.85±0.31	-1.28	-1.03±0.21	-1.01
13	9	350	46	5	-1.62±0.08	-2.25	-2.31±0.10	-2.77
14	10	350	46	15	-1.52±0.10	-2.11	-2.34±0.29	-2.37
15	13	350	51	10	-3.49±0.17	-2.83	-3.32±0.05	-2.83

Modelo de optimización de superficie de respuesta para el tratamiento de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂+HPU en jamón curado

En la Tabla 4.2 se muestran los coeficientes de regresión (β) y sus correspondientes valores de p, encontrados al ajustar la ecuación polinomial del modelo de superficie de respuesta (mostrada en Metodología: Ec. 3.4) a los datos experimentales mediante Matlab. El valor de p, se usó para determinar la significancia de los coeficientes lineales (β_1 , β_2 y β_3), cuadráticos (β_{11} , β_{22} y β_{33}) y de interacción del modelo (β_{12} , β_{13} y β_{23}), siendo los coeficientes significativos cuando $p < 0.05$.

Tabla 4.2 Coeficientes de regresión estimados mediante el modelo polinomial que describe la inactivación de *E. coli* en jamón curado usando FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+HPU+DI.

FSC-CO ₂ +HPU			FSC-CO ₂ +HPU+DI		
Parámetro	coeficiente	p-valor	Parámetro	coeficiente	p-valor
β_0	-1.91*	<0.01	β_0	-3.62*	0.01
β_1	-0.23	0.06	β_1	0.07	0.34
β_2	-0.69*	<0.01	β_2	-0.74*	<0.01
β_3	-0.23	0.06	β_3	-0.03	0.66
β_{11}	0.21	0.25	β_{11}	0.70*	<0.01
β_{12}	-0.09	0.61	β_{12}	-0.17	0.13
β_{13}	0.29	0.09	β_{13}	0.23*	0.04
β_{22}	-0.12	0.50	β_{22}	0.92*	<0.01
β_{23}	0.05	0.72	β_{23}	-0.40*	<0.01
β_{33}	-0.24	0.18	β_{33}	0.27*	0.02

* Valores significativos ($p < 0.05$)

En la tabla 4.2 se observa que usando FSC-CO₂+HPU, sólo la temperatura tuvo un efecto significativo ($p < 0.01$) en su término lineal ($\beta_2 = -0.69$), además el signo negativo indicó que, un aumento en la temperatura del proceso mediante FSC-CO₂+HPU aumentó el nivel de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón curado tratadas bajo las condiciones de presión (15, 250 y 350 bar) y temperatura (41, 46 y 51 °C) estudiados. El coeficiente de determinación $R^2=0.58$ obtenido para las

experiencias de FSC-CO₂+HPU, mostró que el modelo cuadrático propuesto, no logró ajustar adecuadamente las respuestas observadas sobre el nivel de inactivación de *E. coli* en jamón curado.

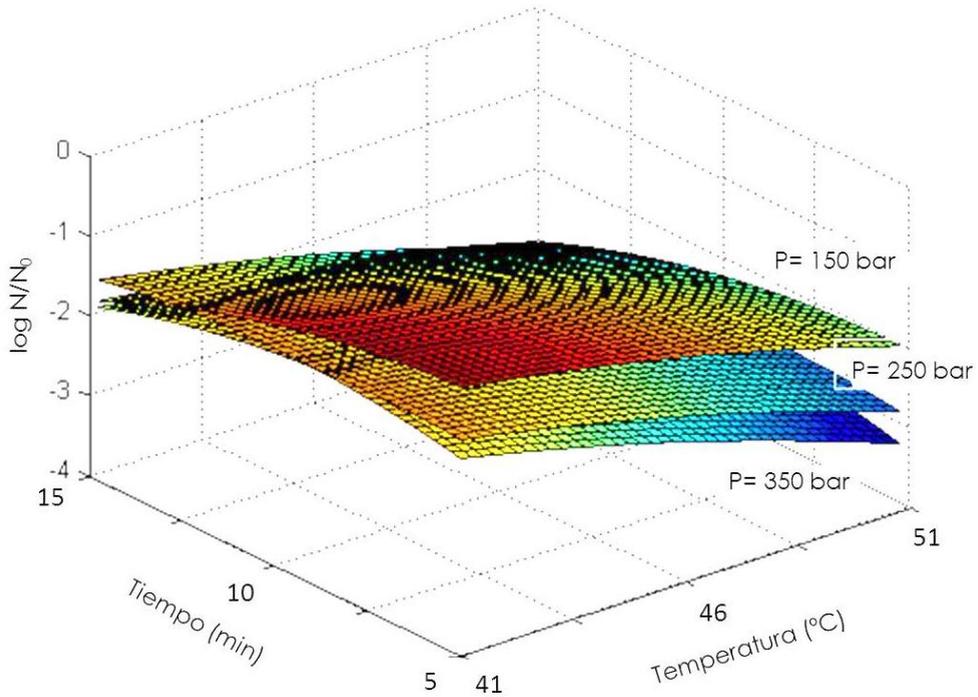


Figura 4.13. Efecto de la presión, temperatura y tiempo de proceso sobre la inactivación de *E. coli* en jamón curado mediante el tratamiento de FSC-CO₂+HPU.

En la Figura 4.13 se muestran las superficies de respuesta obtenidas para el tratamiento de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU en las muestras de jamón curado. La forma de las superficies manifiesta la falta de significancia en los coeficientes que corresponden a los efectos lineales de la presión (β_1) y tiempo (β_3) de proceso descritos previamente; además, la forma plana de las mismas, confirma que el efecto cuadrático de la presión, temperatura y tiempo de tratamiento, indicado por el valor de los coeficientes β_{11} , β_{22} y β_{33} , respectivamente (Tabla 4.2), no ha mostrado tener un efecto significativo ($p > 0.05$) sobre el nivel de inactivación.

Análisis de superficie de respuesta

Para conocer la reducción máxima y mínima de *E. coli* predicha por el modelo, se calcularon los valores mínimos y máximos de la región en estudio, respectivamente, mediante la herramienta Solver de Microsoft Excel™. El algoritmo de optimización consiste en sustituir dentro del modelo polinomial, los valores de los coeficientes β obtenidos mediante Matlab y distintos valores para X_1 , X_2 y X_3 , que permitan obtener el valor mínimo o máximo de la respuesta (y_{\min} y y_{\max} , respectivamente). Finalmente los valores codificados de las variables independientes calculados, son sustituidos en las ecuaciones normalizadas (mostradas en Metodología: Ec. 3.1 - Ec. 3.3) para obtener las condiciones de inactivación óptimas que permiten encontrar la respuesta máxima y mínima de inactivación, calculada por el modelo.

Los valores mínimos calculados para el tratamiento con FSC-CO₂+HPU llevado a cabo a diferentes condiciones de presión (150, 250 y 350 bar), temperatura (41, 46 y 51 °C) y tiempo (5, 10 y 15 min), sobre muestras de jamón curado fueron $X_{1\min}=1$, $X_{2\min}=1$ y $X_{3\min}=-1$. Sustituyendo dichos valores y los coeficientes de regresión dados en la Tabla 4.2, se obtuvo la respuesta de $y_{\min}=-3.20$ ciclos-log, que corresponde al máximo nivel de inactivación de *E. coli*. Finalmente, las condiciones óptimas de inactivación calculadas fueron 350 bar, 51 °C y 5 min para la presión, temperatura y tiempo, respectivamente, permitiendo reducir mediante FSC-CO₂+HPU, 3.2 ciclos-log la población de *E. coli* en muestras de jamón curado.

Asimismo, para conocer la reducción mínima de microorganismos mediante FSC-CO₂+HPU, que corresponden a los valores máximos de la superficie, se calcularon los valores de las variables $X_{1\max}$, $X_{2\max}$ y $X_{3\max}$ usando el algoritmo de optimización Solver. Los valores calculados fueron $X_{1\max}=1$, $X_{2\max}=-1$ y $X_{3\max}=0.02$. Sustituyendo dichos valores y los coeficientes de la Tabla 4.2 en la Ec. 4, se obtuvo el valor de $y_{\max}=-1.28$ ciclos-log, que correspondió a la respuesta de inactivación mínima calculada por el modelo cuadrático propuesto. Las condiciones de tratamiento calculadas que dieron lugar a este nivel de inactivación fueron 350 bar, 41 °C y 10 min para la presión, temperatura y tiempo de tratamiento, respectivamente.

Al igual que en los resultados obtenidos con pechuga de pollo, la presión no mostró un efecto significativo sobre la respuesta de inactivación observada mediante FSC-CO₂+HPU. Esto puede estar asociado a que, además del efecto protector de la estructura y composición de las muestras de jamón curado, el alto contenido de sales presentes, liga moléculas de agua y en consecuencia hay menos agua libre para solubilizar adecuadamente el CO₂ y observar el efecto que tiene la presión sobre la solubilidad del mismo. Además, a pesar de la agitación y el mezclado del medio supercrítico que podría generarse por los HPU, facilitando el contacto del CO₂ con los microorganismos, no se genera un gradiente de concentración suficiente que favorezca la difusión del CO₂ en las células, provocando solo ligeros niveles de inactivación. Por lo tanto, el efecto mecánico disruptor de los HPU es más efectivo en presencia de un medio líquido donde se pueda presentar cavitación y en consecuencia favorecer los mecanismos de inactivación atribuidos a los FSC-CO₂.

Por otra parte, la temperatura del proceso, como ya fue observado en los tratamientos con pechuga de pollo y jamón de pavo, mostró ser un factor clave para aumentar significativamente ($p < 0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón curado tratadas mediante FSC-CO₂+HPU.

Modelo de optimización de superficie de respuesta para el tratamiento de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂+HPU+DI en jamón curado

Al igual que en los estudios de inactivación llevados a cabo en muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo descritos previamente, se propuso adicionar 60 ml de DI al recipiente de inactivación, para intentar aumentar el nivel de inactivación obtenido mediante FSC-CO₂+HPU.

Empleando FSC-CO₂+HPU+DI, en la Tabla 4.2 se observa que también la temperatura tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el nivel de inactivación alcanzado, tanto en su efecto lineal ($\beta_2 = -0.74$), como en su coeficiente cuadrático ($\beta_{22} = 0.92$). Asimismo, aunque los coeficientes de la presión ($\beta_1 = 0.07$) y el tiempo ($\beta_3 = -0.03$) del proceso no tuvieron un efecto lineal significativo ($p > 0.05$) sobre la respuesta, los coeficientes cuadráticos, $\beta_{11} = 0.70$ y $\beta_{33} = 0.27$ para la presión y el tiempo, respectivamente, si

presentaron un efecto significativo ($p < 0.05$). Por lo anterior, se deduce que, las variables del proceso (presión, temperatura y tiempo) tuvieron en general, un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el nivel de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂+HPU+DI, en muestras de jamón curado. Además, se encontró que el modelo cuadrático propuesto, se ajustó adecuadamente ($R^2=0.88$) a los datos experimentales bajo las condiciones de proceso estudiadas.

Análisis de superficie de respuesta

La Figura 4.14 muestra las superficies de respuesta obtenidas para el tratamiento de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón curado usando FSC-CO₂+HPU+DI. Así, para conocer el valor máximo y mínimo de la respuesta se procedió de igual forma que anteriormente. El valor mínimo absoluto para el tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI en muestras de jamón curado correspondió con las coordenadas $X_{1min} = -0.06$, $X_{2min} = 0.49$ y $X_{3min} = 0.44$, ofreciendo un valor mínimo de la respuesta $y_{min} = -3.88$ ciclos-log, que corresponde con el valor máximo de inactivación predicho mediante el modelo cuadrático. Sustituyendo los valores codificados de las variables independientes en las ecuaciones normalizadas (Ec. 3.1 a Ec. 3.3) se obtuvieron las condiciones de tratamiento óptimas en 243.3 bar, 48.4 °C y 12.2 min para la presión, temperatura y tiempo, respectivamente.

El valor máximo de la región en estudio correspondió con las coordenadas $X_{1max}=1$, $X_{2max}=-1$ y $X_{3max}=1$ que proporcionó un valor de $y_{max}=-0.14$ ciclos-log y que corresponde a la respuesta de inactivación mínima predicha por el modelo cuadrático para el tratamiento de inactivación de *E. coli* con FSC-CO₂+HPU+DI. Sustituyendo los valores de las variables independientes codificadas en las ecuaciones normalizadas (Ec. 3.1 a Ec. 3.3) se obtuvieron los valores de 350 bar, 41 °C y 15 min para la presión, temperatura y tiempo de tratamiento, respectivamente.

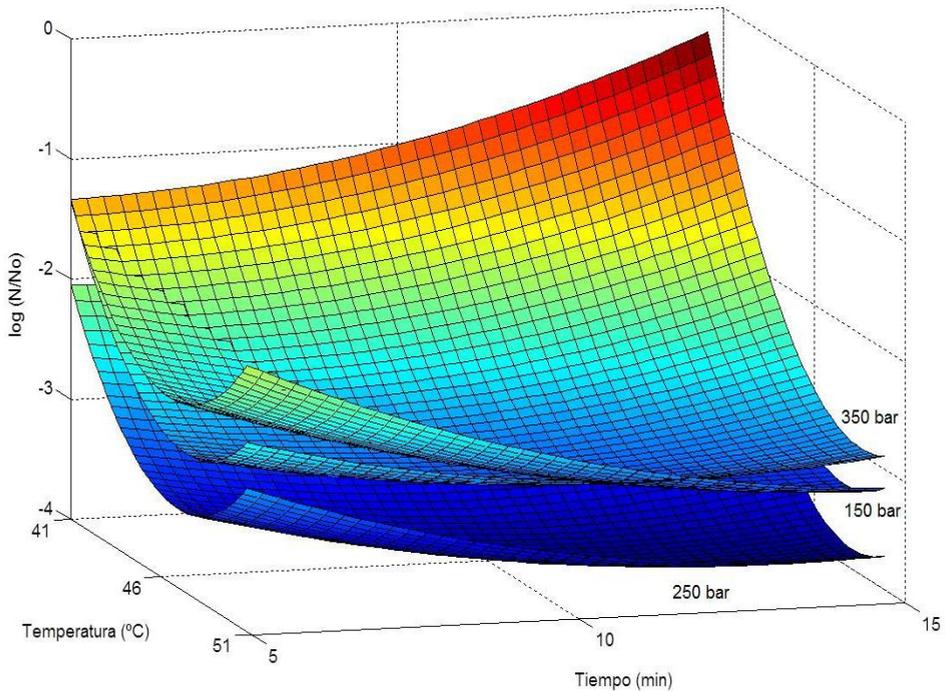


Figura 4.14. Efecto de la presión, temperatura y tiempo sobre la inactivación de *E. coli* mediante el tratamiento de FSC-CO₂+HPU+DI.

El efecto general de la presión, temperatura y tiempo de tratamiento sobre el nivel de inactivación de *E. coli* obtenido en las muestras de jamón curado tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI, ha sido observado igualmente en el estudio de inactivación con jamón de pavo, en el cual, las tres variables de proceso tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el nivel de inactivación. Además, la adición de DI en las muestras de jamón curado, supuso un aumento significativo ($p < 0.05$) en el nivel de inactivación de *E. coli*, como también ha sido observado en los estudios con jamón de pavo y pechuga de pollo en condiciones similares de tratamiento.

Efecto de las variables de proceso (presión, temperatura y tiempo) en el nivel de inactivación de *E. coli* en jamón curado

Para conocer los efectos individuales y la interacción de las variables independientes (P, T y t) sobre el nivel de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+HPU+DI, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) empleando Statgraphics Plus Centurion XVI (StatPoint Technologies, Inc.) En ambos tratamientos, un aumento en la presión no supuso un efecto significativo ($p>0.05$) en el grado de inactivación; sin embargo, la temperatura incrementó significativamente ($p<0.05$) el grado de inactivación. Empleando FSC-CO₂+HPU, la reducción microbiana aumentó de 1.85 a 3.49 ciclos-log al aumentar la temperatura de 41 a 51 °C (350 bar, 10 min), respectivamente. Utilizando FSC-CO₂+HPU+DI, la reducción microbiana aumentó de 1.35 a 3.14 ciclos-log al aumentar la temperatura de 41 a 51 °C (250 bar) tras 15 min de tratamiento.

Un aumento en la temperatura del proceso, como se ha explicado anteriormente, permite la modificación de las propiedades del CO₂, aumentando su difusividad y acelerando el transporte del mismo a través de la matriz cárnica, para favorecer el contacto con las células de *E. coli* adheridas a la superficie y en su interior. Una vez que el CO₂ se ha puesto en contacto con las células, el aumento de la temperatura provoca mayor fluidez de las membranas celulares y en consecuencia, se acelera la difusión del CO₂ al interior de las mismas, desencadenando un desequilibrio en el balance biológico de las células y la extracción de sustancias intracelulares responsables de su inactivación (García-González y col., 2007; Ortuño y col., 20014b). Por lo tanto, la temperatura permitió aumentar significativamente ($p<0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂+HPU en las muestras de jamón curado sumergidas en DI y en las muestras sin sumergir.

Por otro lado, los resultados obtenidos muestran que el tiempo de exposición al FSC-CO₂+HPU de las muestras de jamón curado sumergidas o no en DI, no tiene un efecto significativo ($p>0.05$) sobre el grado de inactivación de *E. coli*. Esto indica que no es

necesario usar un tiempo de proceso de 15 min, ya que en 5 min se logra conseguir el mismo nivel de inactivación de *E. coli* bajo las mismas condiciones de tratamiento.

Los resultados del ANOVA indicaron que la adición de disolución salina en el recipiente de inactivación, en general, tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el grado de inactivación de *E. coli* alcanzado. Usando FSC-CO₂+HPU en muestras de jamón curado, el mayor nivel de reducción obtenido fue 3.7 ciclos-log, tras 10 min de tratamiento usando la máxima presión y temperatura de trabajo (350 bar y 51 °C). Sin embargo, cuando la muestra de jamón curado fue sumergida en disolución salina (FSC-CO₂+HPU+DI), la mayor inactivación se obtuvo bajo condiciones de tratamiento de 46 °C, 250 bar y 10 min, con una inactivación de aproximadamente 3.7 ciclos-log. Por lo tanto, se logró un nivel de inactivación similar en ambos tratamientos pero usando condiciones menos severas para las muestras que fueron sumergidas en DI.

4.1.4. Discusión

La aplicación de FSC-CO₂ a procesos de inactivación de microorganismos ha sido ampliamente estudiada, y aplicada mayoritariamente sobre matrices alimentarias líquidas (García-González y col., 2007; Liao y col., 2008; Ferrentino y col., 2010; Ortuño y col., 2013). Estos estudios han mostrado resultados prometedores que permitirían la extrapolación de dicha tecnología para aplicaciones industriales (Spilimbergo y Bertucco, 2003; Damar y Balaban, 2006). Sin embargo, existen escasas referencias bibliográficas sobre la aplicación de FSC-CO₂ como técnica de inactivación sobre matrices alimentarias sólidas (Ferrentino y Spilimbergo, 2011; Ferrentino y col., 2013b; Galvanin y col., 2014; Tamburini y col., 2014).

Entre los trabajos llevados a cabo para inactivar microorganismos mediante FSC-CO₂ en matrices alimentarias sólidas, se puede diferenciar los elaborados con carne fresca (Choi y col., 2008), carne sumergida en disoluciones (Choi y col., 2009a, 2009b), productos cárnicos cocidos (Ferrentino y col., 2013a) y productos cárnicos curados (Ferrentino y col., 2013b). En todos estos trabajos mencionados, los investigadores resaltan que, de los mecanismos de inactivación propios del CO₂, el contacto del mismo con las células microbianas es el factor fundamental para lograr un nivel de

inactivación aceptable, y que a diferencia de un medio líquido, esta primera etapa es difícil de lograr debido a la propia composición del medio (Ferrentino y Spilimbergo, 2011).

En el presente trabajo, en el que se ha estudiado la inactivación de la bacteria *E. coli* mediante FSC-CO₂ sobre tres matrices cárnicas diferentes, se ha evaluado el efecto de las condiciones del proceso: presión, temperatura, tiempo y contenido de agua, así como el efecto de la aplicación simultánea de HPU.

Efecto de la presión sobre la inactivación microbiana en matrices cárnicas mediante FSC-CO₂

Para determinar el efecto de la presión (150, 250, 350 y 450 bar, 41-46 °C) sobre el proceso de inactivación mediante FSC-CO₂, se estudiaron las cinéticas de inactivación de *E. coli* sobre dos matrices diferentes: pechuga de pollo y jamón de pavo.

Los resultados han mostrado que la presión no tuvo un efecto significativo ($p > 0.05$) sobre la inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂ en pechuga de pollo. En promedio se obtuvo una reducción de 1.5 y 2.5 ciclos-log tras 40 min de tratamiento, para todas las presiones estudiadas a 41 y 46 °C, respectivamente. Sin embargo, en las cinéticas de inactivación llevadas a cabo en jamón de pavo mediante FSC-CO₂, un aumento de presión de 150 a 350 bar, supuso un aumento significativo ($p < 0.05$) del nivel de inactivación de *E. coli* alcanzando la reducción total de la población (6.6 ciclos-log) tras 20 min de tratamiento a 350 bar (46 °C), en comparación a 4.03 ciclos-log obtenidos a 150 bar (46 °C).

De forma similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo con pollo tratado mediante FSC-CO₂, Choi y col. (2009a) no lograron disminuir la población de *E. coli* en muestras de cerdo marinado (1.08 ciclos-log) al aumentar la presión del CO₂ de 120 a 140 bar (45 °C). Además, Ferrentino y col. (2013b), encontraron que al aumentar la presión del tratamiento con FSC-CO₂ desde 80 a 120 bar (35 °C), la población de *L. monocytogenes* en jamón curado tras 30 min de tratamiento, no mostró cambios

significativos, logrando una reducción aproximada de 3 ciclos-log, para ambas presiones.

Por otro lado, Bae y col. (2011) observaron resultados similares a los obtenidos en el presente trabajo empleando jamón de pavo. Los autores encontraron que tras 30 min de tratamiento mediante FSC-CO₂ (40 °C), el nivel de inactivación de *E. coli* en muestras de cerdo fresco a 80 bar (1.5 ciclos-log), aumentó a 2.5 ciclos-log usando 120 bar bajo las mismas condiciones de tratamiento.

La presión controla la velocidad de solubilización del CO₂ en el medio, por tanto, a medida que aumenta la presión, aumenta la cantidad de CO₂ disuelto en el medio, provocando una disminución del pH extracelular debido a la formación y disociación de H₂CO₃ (García-González y col., 2007), lo cual contribuye a un incremento en la permeabilidad de la membrana celular y la penetración del CO₂ en las células microbianas (García-González y col., 2009). Una vez el CO₂ penetra en las células, interactúa con el citoplasma de la célula (Ortuño y col., 2013a) y provoca la inactivación de enzimas claves en su metabolismo (Hong y Pyun, 2001; Spilimbergo, 2002), además de extraer componentes intracelulares. Este efecto podría provocar un desequilibrio celular que desencadenaría en la inactivación microbiana (Watanabe y col., 2007; Liao y col., 2006). En el presente trabajo, el efecto de la presión sobre el nivel de inactivación de *E. coli* sólo fue observado en las muestras de jamón de pavo.

El diferente efecto de la presión sobre la inactivación de microorganismos en diferentes matrices sólidas ha sido observado por otros autores (Spilimbergo y col., 2014; Ferrentino y Spilimbergo, 2015). Estos autores sugieren que si bien la presión no es un factor determinante para acelerar los mecanismos de inactivación propios del CO₂ en matrices sólidas, la naturaleza de la matriz y composición del medio donde las células se encuentran dispersas sí lo es (Cappelletti y col., 2014). Por ejemplo, altas concentraciones de sales en las muestras tratadas son capaces de ligar moléculas de agua y disminuir la cantidad de agua libre donde el CO₂ puede disolverse, como en el caso de las muestras de carne de cerdo marinado (Choi y col., 2009a). Por lo tanto, aunque cabría esperar que un aumento en la presión del CO₂ pudiera modificar las

propiedades físicas del mismo y facilitar la solubilización en el medio, la naturaleza y composición de la muestra podría afectar dicho efecto.

Efecto de la temperatura sobre la inactivación microbiana en matrices cárnicas mediante FSC-CO₂

De forma similar a la presión, en el presente trabajo se estudió el efecto de la temperatura (36, 41, 46 y 51 °C, 350 bar) sobre las cinéticas de inactivación mediante FSC-CO₂ de *E. coli* inoculada en dos matrices cárnicas diferentes: pechuga de pollo y jamón de pavo. Los resultados revelaron que la temperatura tuvo un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre las cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en pechuga de pollo y en jamón de pavo, tratadas mediante FSC-CO₂.

Empleando pechuga de pollo, el nivel de inactivación aumentó de 1 a 2.4 ciclos-log al incrementar la temperatura de 36 a 46 °C, tras 40 min de tratamiento; además, usando la máxima temperatura de tratamiento (51 °C), la población de *E. coli* se redujo totalmente (6.58 ciclos-log) tras 30 min de tratamiento.

En jamón de pavo, empleando 41 °C se obtuvo una reducción máxima de 3 ciclos-log al final del tratamiento (40 min), sin embargo, al aumentar la temperatura a 46 y 51 °C, se alcanzó una reducción de 6.6 ciclos-log (inactivación total) tras 20 y 10 min de proceso, respectivamente.

De forma similar a los resultados obtenidos en el presente trabajo, Choi y col. (2009a) observaron que el nivel de inactivación de *E. coli* en cerdo marinado aumentó con la temperatura. Estos autores aumentaron en 1.0 ciclo-log, el nivel de inactivación al incrementar la temperatura de 40 a 45 °C (120 bar, 40 min). Igualmente, Ferrentino y col. (2013b), redujeron 7.0 ciclos-log una población de *L. monocytogenes* inoculada superficialmente en muestras de jamón curado a 45 °C tras 30 min de proceso, tiempo que se redujo a 15 min, al aumentar la temperatura a 50 °C.

Por lo tanto, en procesos de inactivación mediante FSC-CO₂ sobre las matrices cárnicas estudiadas, se demostró que la temperatura es un factor clave. Así, el uso de

temperaturas superiores a 41 °C podrían modificar las propiedades del CO₂ y de la membrana celular, haciéndola más fluida, y en consecuencia, acelerar la difusión del CO₂ al interior de las células favoreciendo su inactivación (García-González y col., 2007; Valverde y col., 2010; Ortuño y col., 2012b).

En cuanto a los diferentes niveles de inactivación de *E. coli* obtenidos mediante FSC-CO₂ entre las muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo en el presente trabajo, se observa que bajo una misma condición de tratamiento (250 bar, 46 °C, 10 min), en el jamón de pavo se obtuvo un nivel de inactivación (3.2 ciclos-log) significativamente ($p < 0.05$) mayor que el obtenido en las muestras de pechuga de pollo (1.2 ciclos-log). Esto indica que la naturaleza y composición de la matriz es un factor fundamental en el tratamiento de inactivación mediante FSC-CO₂. El grado de inactivación alcanzado mediante FSC-CO₂ en pechuga de pollo es comparable al obtenido por Choi y col. (2009a) en las muestras de carne de cerdo marinadas. Estos autores obtuvieron ligeras reducciones, 0.5 y 1.2 ciclos-log, tras 20 y 40 min de tratamiento a 40 °C y 140 bar, respectivamente. Sin embargo, al aumentar la temperatura a 45 °C, observaron un incremento en el nivel de inactivación, alcanzando reducciones de 1.2 y 2.1 ciclos-log tras 20 y 40 min de tratamiento. Igualmente, en muestras de pollo tratadas con FSC-CO₂ a 41 °C (150 bar) se alcanzaron reducciones de 0.6 y 1.3 ciclos-log, tras 20 y 40 min, respectivamente. Mientras que, usando 46 °C (150 bar) el grado de inactivación aumentó hasta 1.0 y 2.5 ciclos-log, para tratamientos de 20 y 40 min, respectivamente. Así, a pesar de haberse demostrado el efecto positivo de la temperatura sobre las cinéticas de inactivación de *E. coli* en matrices cárnicas mediante FSC-CO₂, y que es un factor clave para facilitar los mecanismos de inactivación propios del CO₂, el aumento de temperatura está limitado, ya que el uso de altas temperaturas podría convertir a los tratamientos de FSC-CO₂ en procesos térmicos, con el consiguiente efecto sobre las características de calidad de los productos tratados (Choi y col., 2009a).

Los resultados han demostrado que, para alcanzar niveles de inactivación aceptables mediante FSC-CO₂ sobre muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo, se requiere de tiempos de tratamiento largos, como ya fue observado bajo condiciones de

tratamiento similares, en matrices líquidas (Ortuño y col., 2012b) y otras muestras cárnicas (Ferrentino y col., 2013b).

Por lo tanto, con el objetivo de mejorar el contacto entre el CO₂ y las células microbianas y acelerar los mecanismos de inactivación propios del tratamiento con FSC-CO₂, sin comprometer la calidad del producto, se propuso estudiar la aplicación simultánea de HPU al tratamiento con FSC-CO₂ en las muestras cárnicas. La aplicación de HPU a procesos de inactivación con FSC-CO₂ ha demostrado acelerar drásticamente los procesos de inactivación de *E. coli* y *S. cerevisiae* en matrices líquidas como medios de cultivo y zumos de frutas (Ortuño y col., 2013a, 2014a).

Efecto de la aplicación de HPU al tratamiento de inactivación microbiana en matrices cárnicas con FSC-CO₂

Para intentar superar las limitaciones encontradas en el proceso de inactivación de *E. coli* en matrices cárnicas mediante FSC-CO₂, se adaptó el sistema de FSC-CO₂+HPU desarrollado y patentado junto con el procedimiento de inactivación (Benedito y col., 2011) por la UPV, para la inactivación de microorganismos en matrices líquidas, para su aplicación sobre matrices sólidas. Dicha adaptación consistió en el desarrollo de un soporte para la colocación de las muestras cárnicas acoplado al sistema de HPU.

En el presente trabajo se ha evaluado el efecto de los HPU sobre las cinéticas de inactivación de *E. coli* obtenidas mediante FSC-CO₂, en pechuga de pollo y jamón de pavo, en comparación a los tratamientos de sólo FSC-CO₂. Los resultados han mostrado en general un efecto significativo ($p < 0.05$) de los HPU sobre la tasa de inactivación de *E. coli* alcanzada, respecto a las muestras tratadas solo con FSC-CO₂.

En muestras de pechuga de pollo, se logró aumentar significativamente ($p < 0.05$) el nivel de inactivación promedio de 1.6 ciclos-log obtenido mediante FSC-CO₂, a 2.1 ciclos-log alcanzado mediante FSC-CO₂+HPU en el intervalo de presión (150, 250, 350 bar y 450 bar), temperatura (36, 41, 46 y 51 °C) y tiempo (10, 20, 30 y 40 min) estudiados.

Por otro lado, en muestras de jamón de pavo, la aplicación de HPU al tratamiento de FSC-CO₂, aumentó significativamente ($p < 0.05$) el nivel de inactivación promedio en comparación con el tratamiento sin HPU, logrando reducir 3.5 ciclos-log la población de *E. coli* mediante la técnica combinada (FSC-CO₂+HPU) en comparación a 3.1 ciclos-log reducidos en los tratamientos de inactivación usando solo FSC-CO₂ para todas las condiciones de presión (150, 250 y 350 bar), temperatura (41, 46 y 51 °C) y tiempo (5, 10, 20, 30 y 40 min) estudiados.

La aplicación de HPU a los tratamientos con FSC-CO₂ permitió acelerar el proceso de inactivación de *E. coli* en matrices cárnicas, sin embargo la reducción obtenida en los diferentes tratamientos es menor comparada con la obtenida en otros trabajos realizados sobre matrices líquidas (Ortuño y col., 2012b, 2013a), en los que se emplearon además tiempos de tratamiento mucho más cortos (2-5 min). En este sentido, no existen muchos estudios que evalúen el efecto de aplicar HPU a tratamientos de inactivación con FSC-CO₂. En matrices líquidas, Ortuño y col. (2012b) demostraron que la aplicación simultánea de FSC-CO₂+HPU aceleró drásticamente la velocidad de inactivación de *E. coli* en zumos, alcanzando una reducción de 8 ciclos-log tras 2 min de tratamiento (36 °C; 350 bar; 40 W \pm 5 W) en zumo de naranja, mientras que bajo las mismas condiciones de tratamiento, aplicando sólo FSC-CO₂, no se obtuvo ninguna reducción.

La combinación de FSC-CO₂ y HPU sobre matrices sólidas, ha sido estudiada principalmente para procesos de extracción (Balachandran y col., 2006; Riera y col., 2010; Rodríguez y col., 2014). Riera y col. (2010) aumentaron en un 20 % el rendimiento del proceso de extracción de aceite de almendra combinando FSC-CO₂+HPU en comparación con el proceso realizado solo con FSC-CO₂. Sin embargo, el uso del tratamiento combinado como técnica de inactivación microbiana en matrices sólidas solo ha sido estudiado recientemente por Spilimbergo y col., (2014) y Ferrentino y Spilimbergo (2015), quienes han evaluado la inactivación de *L. monocytogenes* sobre jamón curado y la inactivación de *E. coli* y la microbiota en zanahoria, respectivamente. En ambos trabajos los autores revelan que la aplicación de HPU aceleró los mecanismos de inactivación asociados a los FSC-CO₂. Spilimbergo y

col. (2014) lograron inactivar totalmente la población de *L. monocytogenes* (7 ciclos-log) en jamón curado tras 5 min de tratamiento combinado (120 bar; 35 °C; 10 W ± 2 W), mientras que usando sólo FSC- CO₂ obtuvieron una reducción de 3.7 ciclos-log bajo las mismas condiciones de tratamiento. Ferrentino y Spilimbergo (2015) redujeron 8 ciclos-log la población de *E. coli* en muestras de zanahoria mediante el tratamiento con FSC-CO₂+HPU (100 bar y 35 °C; 10 W) en solo 3 min, mientras que empleando sólo FSC-CO₂ se necesitaron 10 min de tratamiento para alcanzar un nivel de inactivación similar. Estos autores atribuyeron el efecto sinérgico de los HPU sobre la inactivación microbiana a la cavitación, la cual afecta sustancialmente a la microagitación y el mezclado del fluido supercrítico que rodea a la muestra sólida, provocando un mejor contacto entre el CO₂ y la superficie de la célula.

La discrepancia entre los niveles de inactivación obtenidos en las distintas matrices cárnicas en la presente tesis y en los estudios realizados por Spilimbergo y col. (2014) en jamón curado; muestra que la resistencia al tratamiento con FSC-CO₂ y la magnitud del efecto sinérgico de los HPU, dependerá de factores intrínsecos como la estructura y naturaleza de la matriz alimentaria y el tipo de microorganismo o bien, de factores extrínsecos como presión, temperatura del proceso o tamaño de muestra, siendo estos factores determinantes en el proceso de inactivación.

En este sentido, la relación superficie/volumen de la muestra de jamón curado usada por Spilimbergo y col. (2014) (10 cm⁻¹), es casi 10 veces más grande que la relación usada en el presente trabajo (1.2 cm⁻¹). Esto indica que hay una mayor superficie en contacto con el volumen CO₂ supercrítico y expuesta al efecto mecánico de los HPU, lo cual podría conducir a un nivel de inactivación mayor.

Efecto de la presión sobre la inactivación microbiana en matrices cárnicas mediante FSC-CO₂+HPU

Adicionalmente al efecto de los HPU sobre el proceso de inactivación mediante FSC-CO₂, en el presente trabajo se evaluó el efecto de la presión (150, 250, 350 y 450 bar, 46 °C) sobre las cinéticas de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado.

Para tratamientos con FSC-CO₂+HPU, la presión no mostró un efecto significativo ($p>0.05$) en el nivel de inactivación de *E. coli* sobre pechuga de pollo y jamón curado. Se alcanzó una reducción promedio para las diferentes presiones estudiadas de 1.3 y 1.6 ciclos-log tras 40 min de tratamiento, en pechuga de pollo y en jamón curado, respectivamente.

Sin embargo, en las muestras de jamón de pavo, un aumento en la presión del tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU (46 °C) sí supuso un aumento significativo en el nivel de inactivación de *E. coli*. La reducción aumentó de 4.5 a 6.9 ciclos-log al aumentar la presión de 150 a 350 bar (46 °C), respectivamente, tras 20 min de tratamiento. De forma similar, Spilimbergo y col. (2014), observaron que con el tratamiento combinado de FSC-CO₂+HPU sobre muestras de jamón curado, un aumento de la presión de 60 a 120 bar, redujo el tiempo necesario para alcanzar la inactivación total de *L. monocytogenes* (7.5 ciclos-log) de 8 a 5 min de tratamiento, respectivamente.

El efecto de la presión sobre procesos de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU ha sido estudiado también sobre matrices líquidas. Ortuño y col. (2012b, 2014a) evaluaron el efecto de la presión (100-350 bar, 36°C) sobre las cinéticas de inactivación de *E. coli* en medios de cultivo y en zumo de naranja mediante FSC-CO₂+HPU. Estos autores observaron que, empleando medios de cultivo, la velocidad de inactivación fue tan elevada que no se observó efecto de la presión del tratamiento, ya que se redujeron 8 ciclos-log en 1.5 min. Sin embargo, empleando zumo de naranja se observó que tras 1 min de tratamiento la reducción alcanzada fue de 2.5, 4.6 y 5.4 ciclos-log a 100, 225 y 350 bar (36 °C), respectivamente. Estos autores atribuyeron esta diferencia al distinto contenido de azúcar del medio y la solubilización del CO₂ en el mismo. El azúcar se liga al agua del medio, por tanto, la cantidad de agua disponible donde el CO₂ puede disolverse es menor en el zumo de naranja (11.6 °Brix) que en el medio de cultivo (2 °Brix). La mayor concentración de azúcar del zumo de naranja evita que éste se sature rápidamente de CO₂ en los tratamientos con FSC-CO₂+HPU como sí ocurre con los medios de cultivo, de manera que un incremento de presión puede facilitar la solubilización del CO₂.

Así pues, el efecto de la matriz donde se lleva a cabo la inactivación de los microorganismos es un factor crítico. En este sentido, la complejidad de la matriz cárnica dificulta el proceso de inactivación, el CO₂ podría interactuar con diferentes compuestos (grasas, proteínas y sales) presentes en la matriz cárnica, además de penetrar en el interior de la misma, haciendo que su efecto letal sobre los microorganismos situados en superficie se vea reducido. De igual forma, Ortuño y col. (2014a) observaron que cuando el contenido en sólidos solubles aumentó en una matriz líquida, la interacción de éstos con el CO₂, restó capacidad de inactivación al FSC-CO₂, requiriéndose de mayores tiempos de inactivación (bajo las mismas condiciones de presión y temperatura) conforme el contenido en sólidos solubles aumentó. Por otra parte, la topografía de la superficie del sólido proporciona una protección física a los microorganismos adheridos sobre su superficie.

Comparando la inactivación alcanzada en las tres muestras cárnicas mediante FSC-CO₂+HPU bajo las mismas condiciones de tratamiento (250 bar, 46 °C, 10 min), se observaron niveles de inactivación diferentes, logrando una reducción de 1.2, 3.7 y 1.9 ciclos-log de *E. coli* en las muestras de pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado respectivamente. Esto indica la gran influencia de la composición y estructura de la matriz cárnica, sobre los mecanismos de inactivación asociados al FSC-CO₂.

Efecto de la temperatura sobre la inactivación microbiana en matrices cárnicas mediante FSC-CO₂+HPU

De forma similar a la presión, en el presente trabajo se ha estudiado el efecto de la temperatura (36, 41, 46 y 51 °C, 350 bar) sobre las cinéticas de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado mediante FSC-CO₂+HPU. Los resultados han mostrado que la temperatura aceleró significativamente los procesos de inactivación de *E. coli* en los tres tipos de muestra estudiadas.

Empleando pechuga de pollo, el nivel de inactivación aumentó de 1.1 a 6.8 ciclos-log al aumentar la temperatura de tratamiento de 41 a 51 °C (350 bar), respectivamente, tras 20 min de tratamiento. En los tratamientos realizados con jamón de pavo, la reducción de toda la población de *E. coli* (6.8 ciclos-log) se alcanzó tras 10 min de tratamiento a

51 °C (350 bar), en comparación a una reducción de 2.8 ciclos-log alcanzada tras el mismo tiempo de tratamiento a 41 °C. En cuanto a las muestras de jamón curado tratadas mediante FSC-CO₂+HPU, se observó que la temperatura aumentó significativamente ($p < 0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli*, obteniendo tras 10 min de tratamiento (350 bar) una reducción de 1.8 y 3.5 ciclos-log usando 41 y 51 °C, respectivamente.

Spilimbergo y col. (2014), observaron un efecto de la temperatura sobre las cinéticas de inactivación de *L. monocytogenes* en jamón curado tratado con FSC-CO₂+HPU similar al descrito en el presente trabajo. Estos autores redujeron a 5 min el tiempo de tratamiento necesario para reducir 5 ciclos-log la población de *L. monocytogenes* mediante FSC-CO₂+HPU empleando 35 °C, en comparación a los 30 min de tratamiento necesarios utilizando 22 °C de temperatura en un tratamiento similar.

Como se ha descrito anteriormente, la temperatura del proceso está íntimamente relacionada con las propiedades físico-químicas del CO₂ y con los mecanismos de inactivación asociados a éste. Un aumento en la temperatura del proceso incrementa la difusividad del CO₂ así como la fluidez de la membrana celular, facilitando la transferencia del CO₂ hacia el interior de la célula, alterando su metabolismo celular y desencadenando la inactivación de los microorganismos (Choi y col., 2009a; Ortuño y col., 2012b; Ferrentino y col., 2013b; Ferrentino y col., 2013c; Spilimbergo y col., 2014).

Descrito el efecto de los HPU sobre el proceso de inactivación mediante FSC-CO₂ sobre matrices cárnicas, así como el efecto de las condiciones del proceso, presión y temperatura, se puede concluir en el presente apartado que la aplicación de FSC-CO₂+HPU es una técnica eficaz para reducir el contenido de *E. coli* presente en muestras cárnicas. Además, se ha observado que un aumento de la presión (para jamón de pavo) y temperatura del proceso favorecen los mecanismos de inactivación propios del tratamiento con FSC-CO₂ y que la aplicación de HPU, permite incrementar el nivel de inactivación alcanzado, mejorando el transporte del CO₂ en el medio supercrítico y permitiendo un mejor contacto del CO₂ con la superficie de las células.

Sin embargo, a pesar de los efectos mecánicos generados por los HPU, para conseguir reducir totalmente la población de *E. coli* se requieren tratamientos excesivamente largos, en comparación a tratamientos similares sobre matrices líquidas (Ortuño y col., 2012b, 2013a), o el uso de temperaturas extremas de proceso que podrían dañar o alterar las propiedades características de cada matriz. Estas limitaciones han sido atribuidas principalmente al bajo contenido en agua disponible sobre la superficie de las muestras, lo que reduciría el efecto mecánico de los ultrasonidos. Por otra parte, la compleja estructura y composición de la matriz cárnica ejercería un efecto protector al interaccionar el FSC-CO₂ con diferentes compuestos presentes en la matriz cárnica, además de tener que penetrar en el interior de la misma, haciendo que su efecto letal sobre los microorganismos situados en superficie se vea reducido. El efecto limitado de la aplicación de los HPU sobre la inactivación microbiana podría deberse a la falta de cavitación en un medio formado únicamente por FSC-CO₂, lo que daría lugar a una menor agitación del mismo y a que los daños mecánicos sobre la envoltura celular de los microorganismos no fuera tan intensa como en los medios donde se combina el FSC-CO₂ con una disolución acuosa.

Efecto de sumergir en DI muestras cárnicas durante los tratamientos de inactivación con FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU

Con el objetivo de favorecer los mecanismos de inactivación asociados al FSC-CO₂, cuyo primer paso es la disolución del CO₂ en el medio para favorecer el contacto con las células presentes en la muestras de carne, se ha estudiado el efecto de sumergir la muestra cárnica inoculada con *E. coli* en 60 ml de disolución salina (DI) estéril durante los tratamientos de FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU.

Efecto de sumergir muestras de carne en DI durante el tratamiento con FSC-CO₂

En pechuga de pollo, el efecto de sumergir las muestras en una DI fue estudiado a diferentes presiones (150, 250 y 350 bar), manteniendo una temperatura constante (46 °C). A partir de los tratamientos llevados a cabo, se observó que sumergir las muestras de pollo en una DI no aumentó significativamente ($p > 0.05$) la velocidad de inactivación de *E. coli* empleando FSC-CO₂, en comparación con las muestras sin

sumergir. La presencia de DI no mejoró el contacto entre el FSC-CO₂ y las células de *E. coli*. Se alcanzó una reducción promedio de 2.6 ciclos-log en ambos tratamientos (FSC-CO₂ y FSC-CO₂+DI) para todas las presiones estudiadas (150, 250 y 350 bar), entre las cuales, no hubo diferencias significativas ($p > 0.05$).

En cuanto a los tratamientos de inactivación sobre jamón de pavo, el efecto observado fue similar que para las muestras de pechuga de pollo, es decir, no se observó un aumento en la velocidad de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂ al sumergir la muestra de jamón de pavo en una DI, incluso se obtuvo un nivel de inactivación promedio inferior (2.7 ciclos-log), comparado con la inactivación obtenida (3.1 ciclos-log) en las muestras de jamón de pavo tratadas con FSC-CO₂ sin sumergir en DI.

Los resultados obtenidos mediante los tratamientos de inactivación con FSC-CO₂ sobre las muestras sumergidas en la DI, pueden compararse a los obtenidos por Choi y col. (2009) en muestras de cerdo marinado, sumergidas en distintos tipos de salsa y tratadas mediante FSC-CO₂ (140 bar, 45 °C) bajo condiciones de tratamiento similares al presente trabajo. Estos autores obtuvieron una reducción de 2.0 y 1.5 ciclos-log de *E. coli* tras 40 min de tratamiento en muestras de cerdo marinado en salsa de soya y salsa picante, respectivamente. Los autores señalan que la inactivación microbiana no solo se ve afectada por la temperatura, presión y tiempo de tratamiento, sino que hay otros factores que influyen sobre el nivel de inactivación como son, el contenido de agua y la estructura y composición del alimento. Calvo y col. (2010) estudiaron la inactivación de la microbiota en paprika en polvo con distintos valores de humedad inicial (20 a 35 % b. h.) bajo diferentes condiciones de presión (60 – 300 bar) y temperatura (60 – 90 °C). Los autores observaron que un aumento en el % de humedad de la paprika en polvo y la presión del proceso aumentaron significativamente el nivel de inactivación, aunque sólo mostraron ligeras reducciones (de 0.8 a 1.6 ciclos-log). Además, para obtener un nivel de inactivación mayor, fueron necesarias temperaturas de proceso muy altas y por lo tanto similares a las temperaturas usadas mediante un tratamiento térmico. Los autores atribuyeron estas bajas reducciones microbianas a las interacciones que se crean entre el contenido de agua presente en las partículas de paprika y la oleoresina, formando entre sí

aglomerados, que podrían evitar que el CO₂ se ponga en contacto con las células microbianas, limitando su inactivación.

Al comparar los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ en un mismo intervalo de presión (150 - 350 bar), temperatura (41 - 51 °C) y tiempo de tratamiento (5 - 30 min) sobre las muestras de jamón de pavo y pechuga de pollo, se observa que, en general, en las muestra de jamón de pavo se alcanza un nivel de inactivación (3.5 ciclos-log) significativamente ($p < 0.05$) mayor que el obtenido en las muestras de pechuga de pollo (1.8 ciclos-log). Esto resultados confirman que la naturaleza y composición de la matriz cárnica influyó significativamente en el grado de inactivación.

Dado que el contenido de humedad en las muestras de pechuga de pollo (75 % b. h.) es similar a las muestras de jamón de pavo (73 % b. h.), las diferencias en el nivel de inactivación se deberían a otros factores composicionales y de estructura de la matriz.

El jamón de pavo es un producto cárnico en el cual, la carne de pavo es prensada e inyectada con salmuera lo que garantiza una distribución uniforme de los ingredientes, constituyentes y aditivos que son necesarios para lograr el color y la textura adecuados a las especificaciones de calidad (Iqbal y col., 2013). Asimismo, el jamón de pavo es sometido a un tratamiento térmico que da lugar a una desnaturalización de las proteínas, algo que no sucede con las muestras de pechuga de pollo. Esa desnaturalización proteica podría dar lugar a una menor interacción del FSC-CO₂ con la matriz, así como a una menor protección de la estructura cárnica ante la penetración del CO₂.

Efecto de la presión en tratamientos mediante FSC-CO₂+DI

En cuanto al efecto de la presión en los tratamientos de FSC-CO₂ llevados a cabo con las muestras sumergidas en una DI, empleando pechuga de pollo, la presión no mostró un aumento significativo ($p > 0.05$) en la inactivación de *E. coli*, sin embargo, en las muestras de jamón de pavo, la velocidad de inactivación aumentó significativamente ($p < 0.05$) con el aumento de la presión.

Efecto de la temperatura en tratamientos mediante FSC-CO₂+DI

Un aumento en la temperatura del tratamiento mediante FSC-CO₂+DI, incrementó significativamente ($p < 0.05$) la velocidad de inactivación de *E. coli* en las muestras de pavo sumergidas en DI, alcanzando la inactivación total de la población tras 10 min de tratamiento a 51 °C (350 bar), comparado con 2.0 ciclos-log obtenidos a 41 °C. Esto demuestra que la temperatura del proceso, como se ha descrito anteriormente, permite acelerar los mecanismos de inactivación mediante FSC-CO₂.

Una vez estudiado el efecto de sumergir las muestras de carne en DI durante el tratamiento con FSC-CO₂, se propuso estudiar la adición de DI al tratamiento combinado de FSC-CO₂ y HPU a fin de comparar el nivel de inactivación de *E. coli* obtenido en los tres tipos de muestras cárnicas respecto al nivel de inactivación alcanzado sólo con FSC-CO₂+HPU.

Efecto de sumergir muestras de carne en DI durante el tratamiento con FSC-CO₂+HPU

Los resultados indicaron que la adición de disolución salina a los tratamientos con FSC-CO₂+HPU mostraron en general, un efecto significativo ($p < 0.05$) sobre el nivel de inactivación para los tres tipos de muestras cárnicas estudiadas.

En las muestras de pechuga de pollo, se observó que la adición de DI al tratamiento con FSC-CO₂+HPU supuso un aumento significativo ($p < 0.05$) en la velocidad de inactivación para todas las presiones y tiempos estudiados. Por ejemplo, en el tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI, se obtuvo una reducción de 6.5 ciclos-log (inactivación total) tras 40 min de tratamiento (150 bar; 46 °C), mientras que en el tratamiento con solo FSC-CO₂+HPU bajo las mismas condiciones de presión y temperatura, el máximo nivel de inactivación alcanzado al final del tratamiento fue de 3.1 ciclos-log.

Por otro lado, en las muestras de jamón de pavo, la aplicación de DI al tratamiento con FSC-CO₂+HPU no provocó en general un aumento significativo ($p > 0.05$) en nivel de

inactivación de *E. coli*, obteniendo una reducción promedio de 3.8 ciclos-log mediante FSC-CO₂+HPU sobre las muestras sumergidas en DI, comparado con 3.5 ciclos-log de *E. coli* reducidos en muestras sin sumergir.

En jamón curado, la adición de DI durante el tratamiento con FSC-CO₂+HPU permitió obtener reducciones similares a las obtenidas mediante los tratamientos sin DI, pero bajo condiciones menos severas. El máximo nivel de inactivación observado mediante FSC-CO₂+HPU fue 3.7 ciclos-log tras 10 min de tratamiento empleando 150 bar y 46 °C; sin embargo, para conseguir este mismo nivel de inactivación en los tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU sobre muestras sin sumergir, se usaron condiciones de 350 bar y 51 °C tras el mismo tiempo de tratamiento.

Estos resultados sugieren que, en general, al aumentar el volumen de agua en el sistema, los efectos mecánicos de los ultrasonidos (microagitación, cavitación, compresiones y descompresiones) en el medio compuesto por la disolución acuosa y el FSC-CO₂ son más intensos que los producidos únicamente cuando las muestras están rodeadas por FSC-CO₂.

Comparando el nivel de inactivación de *E. coli* obtenido en los tres tipos de muestras cárnicas tras los tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU+DI en un mismo intervalo de presión (150 - 350 bar), temperatura (41 - 51 °C) y tiempos de tratamiento (5 - 30 min), se observa que al igual que en los tratamientos mediante FSC-CO₂ en las muestras sin sumergir, el jamón de pavo mostró el mayor nivel de inactivación (4.0 ciclos-log), seguido de la pechuga de pollo (3.1 ciclos-log) y el jamón curado (1.9 ciclos-log). Esto puede indicar que, al igual que sucedía en los tratamientos sin sumergir las muestras en DI, el efecto de inactivación depende de la naturaleza de la matriz donde se encuentren los microorganismos a inactivar.

La menor inactivación en las muestras de jamón curado podría atribuirse a que éste es un producto que sufre un proceso de salado y deshidratación (Arnau y col., 1995), presentando un menor contenido de agua (46 % b.h.) en comparación a la pechuga de pollo y al jamón de pavo (75 y 73 % b. h., respectivamente). Este bajo contenido en agua disponible junto con su elevado contenido de sales (7.7 % b. h.) (Monin y col.,

1997), las cuales ligan el agua disponible en la muestra (Fennema, 2010), son factores que pueden limitar la solubilización del CO₂ supercrítico en la matriz, disminuyendo su capacidad de inactivación.

Efecto de la presión en tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU+DI

En las muestras de pechuga de pollo sumergidas en DI y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU a 46 °C, se observó un aumento significativo ($p < 0.05$) en la tasa de inactivación de *E. coli* con el aumento de la presión. Sin embargo, este efecto no fue observado en los tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU en muestras sin sumergir.

En las muestras de jamón de pavo, tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI un aumento en la presión del proceso no mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) en la velocidad de inactivación de *E. coli*, reduciendo la población total (6.5 ciclos-log) tras 20 min de tratamiento para todas las presiones estudiadas (150 – 350 bar; 46 °C). Este resultado demuestra que, aplicando HPU al tratamiento de FSC-CO₂+DI no es necesario usar una presión de trabajo superior a 150 bar para reducir totalmente la población de *E. coli* en las muestras de jamón de pavo.

En muestras de jamón curado sumergidas en DI, un incremento en la presión, aumentó significativamente ($p < 0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli*. Usando 150 bar (51 °C, 10 min), la población de *E. coli* se redujo 2.6 ciclos-log, mientras que empleando la mayor presión de proceso (350 bar) la población sufrió una reducción significativamente ($p < 0.05$) mayor (3.3 ciclos-log) bajo las mismas condiciones de tratamiento.

Efecto de la temperatura en tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU+DI

Con el fin de estudiar detalladamente el efecto de la temperatura de tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU+DI, se analizaron las cinéticas de inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de jamón de pavo y los niveles de inactivación obtenidos en tratamientos de inactivación sobre muestras de jamón curado analizados mediante la

metodología de superficie de respuesta, llevados a cabo bajo condiciones de presión (150 – 350 bar), temperatura (41 – 51 °C) y tiempo (5 – 30 min) similares.

El tratamiento de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂+HPU+DI realizado a diferentes temperaturas (41, 46 y 51 °C; 350 bar), sobre muestras de jamón de pavo, mostró un incremento significativo ($p<0.05$) en el nivel de inactivación conforme aumentó la temperatura del proceso. Empleando 51 °C, se obtuvo una reducción de 6.4 ciclos-log (inactivación total) de *E. coli* tras 5 min, mientras que empleando 46 °C se obtuvo una reducción de 3.1 ciclos-log.

Al igual que en las muestras de jamón de pavo, en las muestras de jamón curado se observó un aumento significativo ($p<0.05$) en la inactivación de *E. coli* conforme aumentó la temperatura del proceso. Empleando 41 °C (350 bar) se obtuvo una inactivación de 1.0 ciclos-log tras 10 min de tratamiento. Mientras que usando la máxima temperatura (51 °C) se alcanzó una reducción de 3.3 ciclos-log bajo las mismas condiciones de tratamiento. Esto demuestra que la temperatura acelera los mecanismos de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU, favoreciendo la entrada de CO₂ a la membrana celular de los microorganismos, etapa limitante durante los mecanismos de inactivación característicos del CO₂.

En resumen, la adición de DI mejoró el tratamiento de inactivación microbiana mediante FSC-CO₂+HPU debido sustancialmente a los efectos generados por los HPU en la disolución, que pueden ser atribuidos a la cavitación, a movimientos de contracción y rarefacción o a microcorrientes de alta intensidad producidas en el medio, los cuales aceleran la solubilidad del CO₂ en la DI, favorecen los mecanismos de transporte del líquido o difusión de CO₂ hacia el interior de la muestra, o bien, facilitan la salida de las células desde el interior de la matriz hacia la DI. Todos estos efectos provocan un mejor contacto del CO₂ con las células de *E. coli*, desencadenando los mecanismos de inactivación característicos de los FSC-CO₂. Además, los efectos mecánicos anteriormente comentados pueden dar lugar a la ruptura de las paredes celulares de los microorganismos tratados.

Efecto de aplicar HPU al tratamiento con FSC-CO₂+DI

La aplicación de HPU al tratamiento con FSC-CO₂+DI, en general aumentó significativamente ($p<0.05$) el nivel de inactivación alcanzado en las muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo. En las muestras de jamón curado, el efecto de los HPU sobre los tratamientos con FSC-CO₂+DI no fue analizado.

En muestras de pechuga de pollo se observó que la aplicación de HPU al tratamiento de FSC-CO₂+DI aumentó significativamente ($p<0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli*, obteniendo una reducción promedio de 1.8 ciclos-log cuando las muestras fueron tratadas mediante FSC-CO₂+DI, mientras que, usando FSC-CO₂+HPU+DI se obtuvo una reducción en la población de *E. coli* promedio de 3.2 ciclos-log.

En muestras de jamón de pavo, la aplicación de HPU al tratamiento de FSC-CO₂+DI, aumentó significativamente ($p<0.05$) el nivel de inactivación de *E. coli* en 1.0 ciclo-log, logrando una reducción promedio de 3.8 ciclos-log mediante los tratamientos con FSC-CO₂+HPU+DI, comparado con 2.8 ciclos-log reducidos en las muestras de jamón de pavo sumergidas en DI tratadas solo con FSC-CO₂, para todas las condiciones de presión, temperatura y tiempo estudiados. Además, se observó que empleando la menor temperatura (41 °C) mediante FSC-CO₂+HPU+DI, se alcanzó la reducción total de *E. coli* (6.5 ciclos-log) tras 30 min de tratamiento, en comparación a 3.0 ciclos-log obtenidos tras el mismo periodo de tiempo sin HPU (FSC-CO₂+DI).

Estos resultados revelaron el efecto sinérgico de aplicar HPU al tratamiento de FSC-CO₂ sobre las muestras cárnicas sumergidas en DI. El tratamiento combinado de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU+DI, incrementó un 45 y 35 % la reducción de *E. coli* en muestras de jamón de pavo, en comparación a la suma de las reducciones obtenidas mediante las técnicas individuales (FSC-CO₂+DI y HPU+DI) a 41 °C y 51 °C, respectivamente.

En base a lo anteriormente expuesto, el efecto sinérgico de los HPU sobre la inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂+DI observado en el presente trabajo, puede ser comparado con el efecto sinérgico encontrado en muestras líquidas (Ortuño y col.,

2014b; Ferrentino y col., 2014), en las cuales dicho efecto es atribuido como se explicó anteriormente, a la agitación vigorosa y las burbujas de cavitación, principal causa de la inactivación microbiana mediante la aplicación de HPU en matrices alimentarias líquidas (Piyasena y col., 2003, Alzamora y col., 2009; Ortuño, 2014b; Cappelletti y col., 2014) y sistemas alimentarios sólido-líquido (Cabeza y col., 2004). En la presente tesis doctoral, dichos efectos, aumentaron significativamente ($p < 0.05$) la velocidad de inactivación de *E. coli* en los tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU+DI, donde las muestras cárnicas estaban sumergidas en DI, resultados que no fueron observados en los tratamientos de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂+HPU en muestras de carne sin sumergir.

Puede concluirse que, los mecanismos de inactivación descritos en los tratamientos mediante FSC-CO₂+HPU+DI, sobre las muestras estudiadas en la presente tesis doctoral, podría relacionarse con los mecanismos de inactivación observados por Ortuño y col. (2012b, 2013a, 2014b) quienes mostraron una drástica disminución en el tiempo necesario para alcanzar la completa inactivación de *E. coli* en matrices líquidas mediante la aplicación de HPU, en comparación con la inactivación alcanzada solo con FSC-CO₂. Ortuño y col (2012b) observaron que en medio LB, la inactivación total de *E. coli* (7.5 ciclos-log) fue alcanzada tras 40 min de tratamiento mediante FSC-CO₂ (41 °C, 225 bar); sin embargo, aplicando HPU, el tiempo necesario para alcanzar la reducción total fue reducido a 2 min empleando las mismas condiciones de tratamiento. Estos autores observaron un efecto similar empleando zumos de manzana y naranja como medios de tratamiento. En ambos zumos, la población de *E. coli* se redujo totalmente (8 ciclos-log) tras 5 min de tratamiento con FSC-CO₂+HPU (36 °C y 350 bar), mientras que, empleando solo FSC-CO₂, se alcanzó una reducción de 0.5 y 1.0 ciclo-log tras 25 min de tratamiento en zumo de manzana y naranja, respectivamente.

Estos resultados muestran que, a pesar de que los HPU aceleran los mecanismos de inactivación del CO₂, se ha observado que la naturaleza del medio puede influir en la efectividad de los HPU, afectando también al efecto que la presión y temperatura tienen sobre el nivel de inactivación alcanzado en el proceso. Por lo tanto para cada

tratamiento es necesario conocer el efecto de las variables de proceso y la mejor combinación de temperatura/presión que garanticen una inactivación suficiente, aplicando condiciones de tratamiento menos severas.

Para intentar elucidar los fenómenos que tienen lugar durante la inactivación microbiana mediante FSC-CO₂ y conocer la razón por la cual la aplicación simultánea de los HPU (FSC-CO₂+HPU) acelera la inactivación microbiana, Ortuño y col. (2014b) llevaron a cabo recientemente, un estudio para conocer el daño celular generado en células de *E. coli* y *S. cerevisiae* tras 5 min de tratamiento con FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU usando técnicas de microscopía electrónica. Los autores demostraron que tras 5 min de tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU (350 bar, 36°C) se generaron mayores cambios morfológicos en las células de *E. coli* que los producidos por un tratamiento de FSC-CO₂ en similares condiciones. Estos cambios fueron atribuidos al efecto mecánico producido por los HPU sobre las membranas celulares, produciendo degradación y ruptura de la membrana, lo cual facilita la entrada del CO₂ y la salida de constituyentes celulares.

Por lo tanto, tal y como se ha comentado anteriormente, uno de los factores importantes que permitiría acelerar los mecanismos de inactivación microbiana podría ser atribuido a las fuerzas físicas generadas por los HPU en el medio supercrítico, como se ha demostrado en matrices líquidas. Sin embargo, en base a la bibliografía existente, no está claro si el efecto de la cavitación es posible en sistemas donde una matriz sólida está inmersa en el FSC-CO₂. En este sentido, en procesos de extracción supercrítica, algunos autores atribuyen la mejora de la transferencia de materia a la turbulencia acústica y fenómenos de compresión y rarefacción (Riera y col., 2004; Balachandran y col., 2006), descartando el fenómeno de cavitación. No obstante, Spilimbergo y col. (2014) y Ferrentino y Spilimbergo, (2015) indicaron que el efecto sinérgico de los HPU sobre el tratamiento de inactivación microbiana mediante FSC-CO₂ en muestras de jamón curado y zanahoria, respectivamente, es atribuido al efecto de cavitación. Por lo tanto, para conocer la tipología de las fuerzas físicas que intervienen durante los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ y

HPU estudiados en la presente tesis doctoral, se propuso usar una técnica descrita por Balachandran y col. (2006), empleando láminas de papel de aluminio.

Prueba de cavitación

La prueba consistió en introducir una lámina de papel de aluminio de forma circular, con el mismo diámetro de las muestras de carne (3.3 cm), en el colector de la muestra cárnica, y colocarlo en el recipiente de inactivación a la misma distancia del sonotrodo que se encuentra la muestra cárnica (2.7 cm) durante los tratamientos de inactivación. Empleando 150 bar, 46 °C y 42 ± 5 W, se llevaron a cabo los diferentes tratamientos estudiados en la presente tesis (FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU, FSC-CO₂+DI, FSC-CO₂+HPU+DI) durante 5 min. Adicionalmente, se realizó un tratamiento mediante HPU+DI a 46 °C, para conocer el efecto producido sólo por los HPU sobre la muestra sumergida en la disolución a presión atmosférica (1.01 bar).

La Figura 4.15-A muestra la lámina de papel de aluminio que no recibió ningún tratamiento. Las Figuras 4.15-B y 4-15-C, corresponden a las láminas tratadas mediante FSC-CO₂ (150 bar, 46 °C, 5 min) que fueron sumergidas en 60 ml de disolución salina y las láminas sin sumergir, respectivamente. La Figura 4.15-D muestra la lámina de papel de aluminio sumergida en DI y tratada mediante HPU (42 ± 5 W, 5 min). Finalmente, las Figuras 4.15-F y 4.15-E, corresponden a las láminas de papel de aluminio tras 5 min de tratamiento con FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C; 42 ± 5 W) sumergidas en DI y las láminas sin sumergir, respectivamente.

Las Figuras 4.15-B y 4.15-C, no mostraron efectos aparentes sobre la superficie, respecto a la lámina de papel de aluminio sin tratamiento. Mientras que, en la lámina tratada mediante HPU (Figura 4.15-D), la superficie muestra una serie orificios distribuidos a lo largo de la sección central de dicha lámina (Figura 4.15-D. Flechas negras). Estos orificios están asociados al efecto de la cavitación (Balachandran y col., 2006; Jayasooriya y col., 2007; Esclapez y col., 2011), producida por los HPU en un medio líquido.

La cavitación es generada por ondas ultrasónicas que se propagan por un medio, generalmente líquido, mediante una serie de compresiones y descompresiones las cuales provocan desplazamientos moleculares de dicho medio. Los ciclos de compresión ejercen una presión positiva sobre el líquido y las moléculas del mismo se aproximan. En contraste, los ciclos de descompresión inducen un efecto contrario, el cual genera una presión negativa que tiende a separar a las moléculas del medio. Cuando la intensidad de los ultrasonidos es suficientemente elevada, las presiones negativas producidas durante el ciclo de descompresión, vence las fuerzas de atracción que mantienen unidas las moléculas del medio, generándose la burbuja de cavitación (Cárcel, 2003).

Durante la cavitación, se puede producir la implosión asimétrica de las burbujas sobre la superficie de la muestra sólida, y generar micro-corrientes de líquido que se desplazan a gran velocidad y colisionan sobre la muestra, produciendo la formación de orificios afilados, grietas o roturas sobre la superficie de la misma (Esclapez y col., 2011; Chandrapala y col., 2012). Este efecto ha mostrado ser responsable de producir erosiones en las fibras de carne (Ozuna y col., 2013) durante su aplicación en el proceso de salado.

La Figura 4.15-E que corresponde a la lámina de papel de aluminio tratada mediante FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C; 42 ± 5 W) no muestra orificios, sin embargo, se dibujan líneas sobre la superficie del aluminio (Figura 4.15-E. Flechas rojas) atribuidas posiblemente a micro-agitaciones o micro-corrientes de alta intensidad producidos por los HPU en el medio supercrítico.

Los efectos de los HPU en un medio supercrítico han sido estudiados en procesos de extracción. El proceso de extracción supercrítica asistido con ultrasonidos (USAE) ha demostrado resultados favorables en los procesos de extracción de compuestos naturales y aceites (Riera y col., 2004; Balachandran y col., 2006; Rodríguez y col., 2014). En todos los trabajos, los autores han obtenido un incremento en el rendimiento del extracto y en la velocidad de extracción. Dicho aumento es atribuido principalmente a una disminución en la resistencia interna a la transferencia de masa

debida a los efectos provocados por los HPU sobre las matrices sólidas y a la turbulencia del medio supercrítico (Balachandran y col., 2006). No obstante, los efectos producidos por los HPU dependen de la potencia aplicada. A intensidades de potencia bajas, se ve afectada la resistencia externa a la transferencia y posiblemente la interna, aunque la estructura del sólido permanece intacta (Esclapez y col., 2011). Una intensidad de potencia intermedia, puede afectar la estructura del sólido y entonces afectar tanto la resistencia externa como la resistencia interna a la transferencia. En consecuencia, el rendimiento del extracto aumenta considerablemente y se reduce el tiempo de extracción (Riera y col., 2004). A intensidades mayores se produce incluso desintegración celular. En consecuencia, en algunos estudios usando USAE (Balachandran y col., 2006; Rodríguez y col., 2014), los autores han observado la presencia de fisuras sobre muestras estudiadas.

Finalmente, la Figura 4.15-F muestra además de líneas provocadas por la posible micro-agitación, fisuras y orificios de forma irregular y de mayor tamaño que los orificios encontrados en superficie de la lámina tratada solo con HPU (Figura 4.15-D). La forma menos esférica de dichos orificios encontrados en la lámina de aluminio, coincide con las observaciones realizadas por Balachandran y col. (2006), quienes relacionaron efectos similares sobre la superficie de una lámina de aluminio al fenómeno de cavitación.

Balachandran y col. (2006) explican que, la cavitación bajo condiciones supercríticas, (condiciones en las cuales podría parecer imposible la cavitación debido a la ausencia de una capa límite que defina las fases líquida-gaseosa), no es producida por la clásica expansión de una cámara de aire y formación de burbujas de gas dentro de un líquido a presión atmosférica; sino que la cavitación en un fluido supercrítico puede ocurrir mediante la formación y consecuente colapso de pequeñas burbujas de gas sub-critico, provocando este tipo de orificios de forma irregular.

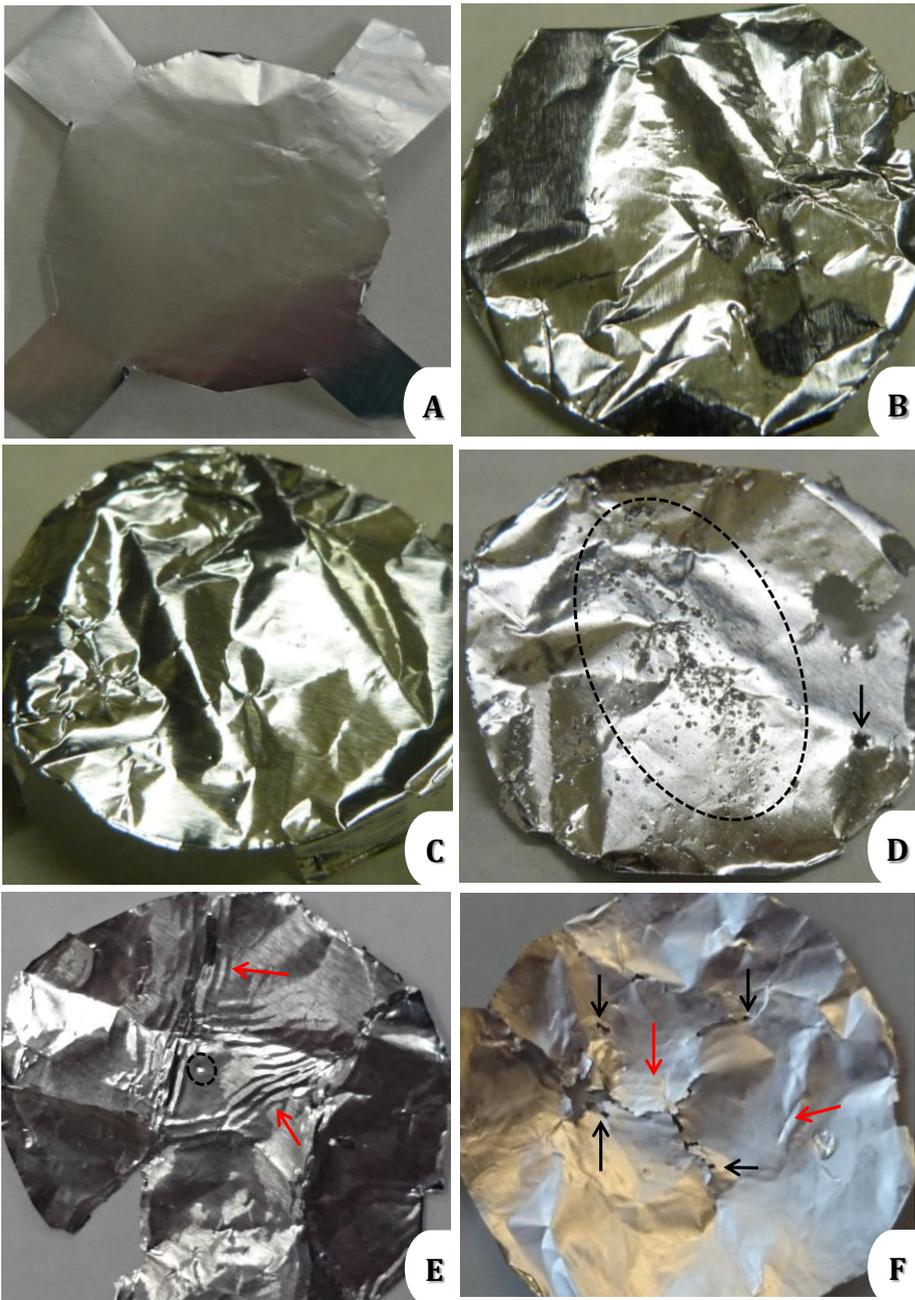


Figura 4.15. Lámina de papel de aluminio **A.** control (sin tratar); lámina de papel de aluminio tratada mediante: **B.** FSC-CO₂+DI; **C.** FSC-CO₂; **D.** HPU+DI; **E.** FSC-CO₂+HPU y **F.** FSC-CO₂+HPU+DI. Condiciones de FSC-CO₂: 150 bar, 46 °C, 5 min. HPU: 42 ± 5 W.

Así, según la prueba de cavitación y los efectos observados en algunas muestras de pechuga de pollo que fueron tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI, las cuales presentaban una erosión del tejido superficial y pequeñas fisuras y hundimientos circulares en forma de orificios sobre la superficie de la muestra, hace pensar que los efectos principales llevados a cabo durante el tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI, son la cavitación y las micro-corrientes de alta intensidad. La cavitación vendría favorecida por la coexistencia de DI y FSC-CO₂ que permite la existencia de interfases, condición necesaria para la aparición del fenómeno de cavitación.

Así pues, el tratamiento de inactivación mediante FSC-CO₂ asistido por HPU donde las muestras cárnicas son sumergidas en DI (FSC-CO₂+HPU+DI), permitió alcanzar mayores niveles de inactivación de *E. coli*, en comparación a la inactivación obtenida mediante sólo FSC-CO₂ o FSC-CO₂+HPU en muestras sin sumergir. Este hecho se debería a que, cuando los HPU son aplicados sobre las muestras de carne estando presente sólo el CO₂ supercrítico (FSC-CO₂+HPU), los HPU no son capaces de originar burbujas de cavitación, debido a la ausencia de interfases (líquido:gas), produciéndose únicamente microcorrientes de alta intensidad sobre la superficie de la muestra, lo que aumentó ligeramente la transferencia de CO₂, mejorando la solubilidad y difusión del mismo al interior de la muestra.

Los efectos mecánicos producidos por los HPU facilitan la inactivación tanto de los microorganismos adheridos sobre la muestra, como de aquellos que han sido transportados por efecto de los HPU hacia la DI.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Modelización de las cinéticas de inactivación de *E. coli* sobre
muestras cárnicas mediante FSC-CO₂

Capítulo 4.2

4.2. Modelización de las cinéticas de inactivación de *E. coli* sobre muestras cárnicas mediante FSC-CO₂

4.2.1. Modelización primaria

Las cinéticas de inactivación de *E. coli* sobre muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo, mostradas en el apartado 4.1, se ajustaron a diferentes modelos matemáticos: modelo de Weibull (Buzrul, 2008), Modelo Bifásico (Ortuño y col., 2014a) y modelo de Peleg Tipo A (Peleg, 2006) y Tipo B (Peleg, 2006).

Al ajustar cada uno de los modelos citados a cada una de las cinéticas de inactivación obtenidas, en unas determinadas condiciones de presión y temperatura para cada tipo de tratamiento, se obtuvieron los valores de las constantes de cada modelo para cada cinética. Es decir, se obtuvo un valor específico de b y n empleando el modelo de Weibull; un valor de f , k_{\max_1} y k_{\max_2} utilizando el modelo Bifásico; los valores de k_1 , k_2 y k_3 al usar el modelo de Peleg Tipo A y los valores de m , a_1 y a_2 empleando el modelo de Peleg Tipo B, para cada cinética ajustada.

Las Tablas 4.3 y 4.5 muestran los parámetros estadísticos (RMSE y R^2) calculados al ajustar las ecuaciones de cada modelo matemático a los datos experimentales obtenidos mediante los distintos tratamientos llevados a cabo (FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU, FSC-CO₂+DI, y FSC-CO₂+HPU+DI) bajo diferentes condiciones de procesado. El valor de las constantes obtenidas tras ajustar cada modelo a las cinéticas llevadas a cabo en muestras de pechuga de pollo y en muestras de jamón de pavo, se presentan en las Tablas 4.4 y 4.6, respectivamente.

Pechuga de pollo

Los valores mostrados en la Tabla 4.3 indican que, en general, los cuatro modelos se ajustaron adecuadamente ($R^2 > 0.93$) a los datos experimentales, para las diferentes condiciones de presión y temperatura estudiadas, en los distintos tratamientos de inactivación aplicados sobre muestras de pechuga de pollo.

Tabla 4.3 Parámetros estadísticos obtenidos al ajustar diferentes modelos matemáticos a las cinéticas de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo bajo diferentes condiciones de tratamiento.

Tratamiento	T	P	Weibull		Bifásico		Peleg Tipo A		Peleg Tipo B	
	(°C)	(bar)	RMSE	R ²	RMSE	R ²	RMSE	R ²	RMSE	R ²
FSC-CO ₂	41	150	0.13	0.93	0.12	0.94	0.17	0.88	0.11	0.94
	41	250	0.14	0.96	0.09	0.98	0.11	0.95	0.11	0.97
	41	350	0.13	0.99	0.08	0.97	0.08	0.98	0.08	0.97
	41	450	0.07	0.98	0.07	0.99	0.07	0.99	0.07	0.99
	46	150	0.08	0.99	0.19	0.96	0.15	0.97	0.19	0.96
	46	250	0.21	0.94	0.19	0.95	0.22	0.93	0.21	0.94
	46	350	0.19	0.96	0.11	0.98	0.06	0.99	0.08	0.99
	36	350	0.44	0.96	0.10	0.96	0.09	0.97	0.09	0.97
	51	350	0.09	0.99	0.69	0.92	0.27	0.97	0.58	0.95
	Promedio		0.16	0.97	0.18	0.96	0.14	0.96	0.17	0.96
FSC-CO ₂ +HPU	41	150	0.10	0.98	0.12	0.97	0.11	0.96	0.11	0.98
	41	250	0.17	0.93	0.15	0.95	0.16	0.91	0.16	0.94
	41	350	0.17	0.93	0.14	0.96	0.16	0.99	0.16	0.94
	41	450	0.20	0.93	0.14	0.97	0.17	0.90	0.17	0.95
	46	150	0.17	0.98	0.37	0.90	0.34	0.95	0.17	0.98
	46	250	0.31	0.97	0.44	0.94	0.44	0.94	0.48	0.93
	46	350	0.12	0.99	0.12	0.98	0.14	0.99	0.14	0.99
	36	350	0.14	0.96	0.14	0.96	0.20	0.99	0.15	0.95
	51	350	0.16	0.99	0.16	0.99	0.16	0.99	0.16	0.99
	Promedio		0.17	0.96	0.20	0.96	0.21	0.96	0.19	0.96
FSC-CO ₂ +DI	46	150	0.14	0.98	0.19	0.96	0.13	0.98	0.05	0.99
	46	250	0.36	0.86	0.34	0.88	0.36	0.86	0.36	0.86
	46	350	0.05	0.99	0.05	0.99	0.06	0.99	0.19	0.96
	Promedio		0.18	0.94	0.19	0.94	0.18	0.94	0.20	0.94
FSC-CO ₂ +HPU+DI	46	150	0.19	0.99	0.06	0.99	0.25	0.99	0.33	0.98
	46	250	0.37	0.98	0.41	0.98	0.43	0.97	0.42	0.98
	46	350	0.03	0.99	0.19	0.99	0.11	0.99	0.06	0.99
	Promedio		0.20	0.99	0.22	0.99	0.26	0.99	0.27	0.99

Tras el ajuste de los cuatro modelos seleccionados a los datos experimentales, se observó que, para los tratamientos con FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU, se obtuvo el mismo valor de coeficiente de determinación promedio ($R^2=0.96$), mientras que los valores del error promedio en la estimación fueron $RMSE=0.16$ ciclos-log, para los tratamientos de FSC-CO₂ y $RMSE=0.19$ ciclos-log para FSC-CO₂+HPU. El tratamiento de FSC-CO₂+DI presentó el coeficiente de determinación promedio más bajo ($R^2=0.94$) en comparación al resto de los tratamientos y, el más alto, fue el coeficiente obtenido para el tratamiento de FSC-CO₂+HPU+DI ($R^2=0.99$).

El parámetro b (Tabla 4.4), en el modelo de Weibull, está relacionado con la velocidad del tratamiento de inactivación. Los valores obtenidos para el parámetro n (Tabla 4.4), al cual se atribuye la forma de la curva, indican que, en general, las curvas de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo obtenidas mediante los distintos tratamientos presentan un comportamiento cóncavo hacia arriba ($n<1$). Una concavidad hacia arriba puede indicar que las células presentes durante el tratamiento tienen la posibilidad de adaptarse al estrés aplicado, incrementando el tiempo necesario para ser inactivadas (Peleg, 2006).

En este sentido, según Buzrul y col. (2005), conforme n disminuye, la cola de la curva es más pronunciada. Por esta razón, en el presente estudio, la mayoría de las curvas presentan valores de $n<1$, lo cual revela que posiblemente el tiempo de tratamiento estudiado no ha sido suficiente para lograr la inactivación total de la población de *E. coli* en las muestras cárnicas. Las curvas de inactivación con una forma cóncava hacia abajo ($n>1$) indican que, en un tiempo determinado aún hay células que sobreviven y que el tratamiento no es suficientemente severo para inactivarlas completamente, por lo que son consideradas células vivas, pero dañadas, cuyo daño aumenta con el tiempo de tratamiento y finalmente mueren, momento en el cual la curva decae drásticamente en forma log-lineal (Van Boekel, 2002). En este sentido, los tratamientos de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo que han mostrado dicho comportamiento, fueron llevados a cabo bajo condiciones de temperatura y presión más severas (51 °C y 350 bar), con $n=2.47$ usando FSC-CO₂ y $n=1.88$ mediante FSC-CO₂+HPU.

Tabla 4.4. Constantes cinéticas obtenidas al ajustar los modelos primarios a las curvas de inactivación experimentales de *E. coli* inoculadas en pechuga de pollo tratadas mediante diferentes condiciones de tratamiento.

Tratamiento	T (°C)	P (bar)	WEIBULL			BIFÁSICO			PELEG TIPO A			PELEG TIPO B		
			b	n	f	kmax ₁	kmax ₂	k ₁	k ₂	k ₃	m	a ₁	a ₂	
FSC-CO ₂	150	41	0.03	1.06	-0.35	25.16	5.00 x 10 ⁻⁴	20.95	-3.91 x 10 ⁻⁴	629.30	1.54	2.67	272.16	
	250	41	0.44	0.38	0.86	37.66	5.00 x 10 ⁻⁴	122.72	8.95 x 10 ⁻²	625.88	0.40	113.09	265.02	
	350	41	0.71	0.17	0.80	106.84	5.00 x 10 ⁻⁴	157.19	3.30 x 10 ⁻¹	621.28	0.17	145.33	204.80	
	450	41	0.88	0.15	0.93	106.76	5.00 x 10 ⁻⁴	383.59	4.73 x 10 ⁻¹	555.29	0.15	224.64	255.55	
	150	46	0.41	0.50	0.94	16.29	4.39 x 10 ⁻²	40.81	1.41 x 10 ⁻³	636.22	0.51	27.18	269.31	
	250	46	0.10	0.85	0.49	19.42	1.39 x 10 ⁻¹	42.44	4.24 x 10 ⁻³	640.31	0.51	27.18	269.31	
	350	46	0.10	1.06	0.88	23.89	4.02 x 10 ⁻¹	121.36	5.49 x 10 ⁻²	635.09	0.58	100.27	260.00	
FSC-CO ₂ +HPU	350	36	0.63	0.21	0.90	93.54	5.00 x 10 ⁻⁴	437.28	2.15 x 10 ⁻¹	1409.05	0.21	157.25	212.64	
	350	51	0.00	2.47	-132.43	3.70	4.00 x 10 ⁻¹	14.37	-2.43 x 10 ⁻²	270.98	1.89	30.55	2523.28	
	150	41	0.24	0.59	0.73	25.42	5.00 x 10 ⁻⁴	75.32	3.62 x 10 ⁻²	632.22	0.61	58.57	254.61	
	250	41	0.19	0.64	0.68	25.06	5.00 x 10 ⁻⁴	63.05	2.68 x 10 ⁻²	633.41	0.66	48.43	257.82	
	350	41	0.19	0.64	0.75	27.75	5.00 x 10 ⁻⁴	75.71	3.92 x 10 ⁻²	632.20	0.58	72.50	293.59	
	450	41	0.39	0.48	0.86	27.67	5.00 x 10 ⁻⁴	111.95	6.14 x 10 ⁻²	626.46	0.48	93.88	243.67	
	150	46	0.19	0.64	0.94	16.29	1.00 x 10 ⁻¹	72.49	1.07 x 10 ⁻²	635.74	0.88	44.62	311.71	
FSC-CO ₂ +DI	250	46	0.19	0.64	0.94	16.29	1.00 x 10 ⁻¹	34.61	-1.40 x 10 ⁻²	642.74	1.46	25.52	967.48	
	350	46	0.31	0.56	0.82	22.49	5.00 x 10 ⁻⁴	42.17	3.54 x 10 ⁻²	626.48	0.62	97.99	259.87	
	350	36	0.24	0.59	0.64	26.12	5.00 x 10 ⁻⁴	20.75	2.59 x 10 ⁻¹	76.18	0.68	45.42	268.64	
	350	51	0.02	1.88	-645.40	2.23	4.00 x 10 ⁻¹	9.59	-2.75 x 10 ⁻²	89.37	2.08	36.62	2522.53	
	150	46	0.27	0.59	0.94	22.38	1.00 x 10 ⁻¹	96.35	3.90 x 10 ⁻²	631.39	0.62	89.10	294.48	
	250	46	0.11	0.86	0.58	18.05	1.00 x 10 ⁻¹	41.31	1.10 x 10 ⁻⁴	640.33	1.46	35.91	309.32	
	350	46	0.10	1.06	0.78	16.29	1.00 x 10 ⁻¹	86.40	3.62 x 10 ⁻²	633.00	0.60	79.75	297.10	
FSC-CO ₂ +HPU+DI	150	46	1.20	0.28	0.74	7.89	1.00 x 10 ⁻¹	69.63	-5.75 x 10 ⁻³	636.45	1.24	32.24	442.58	
	250	46	0.23	0.87	0.74	7.89	1.00 x 10 ⁻¹	99.86	4.31 x 10 ⁻³	630.71	0.90	93.55	427.43	
	350	46	0.10	1.06	0.99	28.19	1.00 x 10 ⁻¹	347.58	1.69 x 10 ⁻¹	584.76	0.28	265.07	220.59	

El modelo de Weibull ha sido empleado por diversos autores para describir las cinéticas de inactivación de diferentes microorganismos, entre otros, *Clostridium botulinum*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus cereus*, *Listeria innocua* y *Lactobacillus lactis* (Mafart y col., 2002; Fernández y col., 2002; Corridini y Peleg, 2007; Buzrul y col., 2007; González y col., 2009; Galvanin y col., 2013), por su versatilidad para describir diferentes comportamientos microbianos. A pesar de emplear únicamente dos parámetros, la mayoría de los autores indican que las curvas de inactivación obtenidas mediante tratamientos no térmicos con patrones semi-logarítmicos pueden ser descritas adecuadamente por el modelo de Weibull (Peleg y Cole, 1998; Van-Boekel, 2002; Mafart y col., 2002; Peleg, 2003, 2006). Además, numerosos autores han estudiado la dependencia de sus parámetros, b y n , con las condiciones del tratamiento de inactivación como pH, presión o temperatura (Heinz y Knorr, 1996; Buzrul y col., 2005; Ortuño y col., 2014b).

Así, con el objetivo de reducir el número de parámetros necesarios para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli* obtenidas bajo diferentes condiciones de tratamiento, se seleccionó el modelo de Weibull para relacionar los parámetros del mismo, b y n , con las condiciones de presión y temperatura de cada tratamiento llevado a cabo sobre muestras de pechuga de pollo. Además de su simplicidad, en promedio, el modelo de Weibull fue el que ofreció un mejor ajuste de los datos experimentales ($R^2=0.97$ y $RMSE=0.17$), para todas las combinaciones de presión y temperatura estudiadas, así como para todos los tipos de tratamiento.

Jamón de pavo

La Tabla 4.5 muestra los valores de R^2 y $RMSE$ calculados tras ajustar los cuatro modelos considerados a las cinéticas de inactivación de *E. coli* en jamón de pavo. En general, los cuatro modelos mostraron un buen ajuste individual ($R^2>0.91$) excepto el modelo de Peleg Tipo A ($R^2=0.88$ y $RMSE=0.73$) que ajustó los datos experimentales obtenidos mediante FSC-CO₂+HPU+DI.

En promedio, el tratamiento con FSC-CO₂ obtuvo el mejor ajuste ($R^2=0.97$ y $RMSE=0.28$), en comparación al resto de los tratamientos. Por contra, el tratamiento

mediante FSC-CO₂+DI presentó el peor ajuste ($R^2=0.95$ y $RMSE=0.47$) de los cuatro modelos estudiados.

Tabla 4.5 Parámetros estadísticos obtenidos al ajustar diferentes modelos matemáticos a las cinéticas de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón de pavo bajo diferentes condiciones de tratamiento.

Tratamiento	T	P	Weibull		Bifásico		Peleg Tipo A		Peleg Tipo B	
	(°C)	(bar)	RMSE	R ²	RMSE	R ²	RMSE	R ²	RMSE	R ²
FSC-CO ₂	41	350	0.15	0.98	0.12	0.99	0.20	0.95	0.15	0.97
	46	350	0.42	0.97	0.17	0.99	0.33	0.97	0.22	0.99
	51	350	0.09	0.99	0.12	0.99	0.28	0.98	0.12	0.99
	46	150	0.66	0.88	0.57	0.92	0.18	0.99	0.22	0.99
	46	250	0.33	0.97	0.38	0.98	0.41	0.97	0.37	0.97
	Promedio		0.33	0.95	0.27	0.98	0.28	0.98	0.22	0.98
FSC-CO ₂ +HPU	41	350	0.62	0.89	0.53	0.92	0.798	0.82	0.62	0.89
	46	350	0.29	0.98	0.29	0.99	0.393	0.97	0.337	0.98
	51	350	0.07	0.99	0.10	0.99	0.650	0.94	0.100	0.99
	46	150	0.43	0.95	0.38	0.97	0.581	0.92	0.431	0.96
	46	250	0.40	0.96	0.38	0.97	0.513	0.94	0.450	0.96
	Promedio		0.36	0.96	0.33	0.96	0.58	0.92	0.38	0.96
FSC-CO ₂ +DI	41	350	0.21	0.95	0.17	0.98	0.29	0.93	0.21	0.96
	46	350	0.21	0.99	0.19	0.99	0.29	0.98	0.24	0.99
	51	350	0.08	0.99	0.11	0.99	0.25	0.99	0.11	0.99
	46	150	0.55	0.91	0.45	0.95	0.68	0.89	0.55	0.92
	46	250	0.62	0.87	0.56	0.90	0.73	0.85	0.65	0.90
	Promedio		0.33	0.95	0.30	0.96	0.45	0.93	0.35	0.95
FSC-CO ₂ +HPU+DI	41	350	0.48	0.94	0.43	0.95	0.57	0.92	0.48	0.94
	46	350	0.25	0.99	0.17	0.99	0.40	0.97	0.25	0.99
	51	350	0.46	0.96	0.73	0.92	1.46	0.69	0.28	0.99
	46	150	0.29	0.98	0.35	0.96	0.74	0.87	0.29	0.98
	46	250	0.42	0.95	0.35	0.97	0.46	0.96	0.45	0.95
	Promedio		0.38	0.96	0.41	0.96	0.73	0.88	0.35	0.97

La Tabla 4.5 muestra que el modelo Bifásico y el modelo de Peleg tipo B, presentaron los mismos parámetros estadísticos promedio ($R^2=0.97$ y $RMSE=0.33$) y ofrecieron el mejor ajuste para todas las combinaciones de presión y temperatura estudiadas, y para todos los tipos de tratamiento. En cambio, el modelo de Peleg tipo A fue el modelo que, en promedio, peor ajustó los datos experimentales ($R^2=0.93$ y $RMSE=0.51$).

El modelo bifásico, es un modelo de tres parámetros (Ec. 3.7), que ha sido usado por otros investigadores para describir curvas de viabilidad de microorganismos de comportamiento no lineal con concavidad hacia arriba (Peleg, 2006), tras tratamientos de inactivación no térmicos como ultrasonidos (Lee y col., 2009) y FSC-CO₂+HPU (Ortuño y col., 2014a). Dicho modelo asume que, la población microbiana está constituida por una mezcla de subpoblaciones de diferente resistencia al tratamiento: población resistente y población sensible, lo cual se expresa mediante dos tasas de inactivación diferentes (Geeraerd y col., 2000; Lee y col., 2009).

Los dos parámetros del modelo Bifásico, k_{max1} y k_{max2} (Tabla 4.6), son una medida de la tasa de mortalidad de la población sensible y la población resistente, respectivamente, de las células de *E. coli* presentes en las muestras de jamón de pavo e indica el tiempo necesario para inducir su inactivación.

En la Tabla 4.6, se observa que población más sensible (k_{max1}) disminuye con el incremento de temperatura (de 41 a 51 °C), manteniendo la presión constante (350 bar) en los sistemas de tratamiento considerados. Este mismo comportamiento fue observado por Lee y col. (2009) durante los tratamientos de inactivación empleando manosonicación (3 bar, 20 kHz) sobre células de *E. coli* inoculadas en soluciones de tampón fosfato (10 mM, pH 7, 50 ml). Estos autores observaron que, para un aumento en la temperatura del tratamiento de 40 a 60 °C, el valor de k_{max1} , disminuyó significativamente de 0.40 a 0.13.

Tabla 4.6. Constantes cinéticas obtenidas al ajustar los modelos primarios a las curvas de inactivación experimentales de *E. coli* inoculadas en jamón de pavo tratadas mediante diferentes condiciones de tratamiento.

Tratamiento	T (°C)	P (bar)	WEIBULL			BIFÁSICO			PELEG TIPO A			PELEG TIPO B		
			b	n	f	kmax ₁	kmax ₂	k ₁	k ₂	k ₃	m	a ₁	a ₂	
FSC-CO₂	41	350	0.74	0.41	0.94	16.29	0.10	-2.65 x 10 ⁴	0.11	-6.50E x 10 ⁴	0.42	132.26	178.78	
	46	350	1.05	0.57	0.91	3.70	0.40	-2.65 x 10 ⁴	0.01	-6.50E x 10 ⁴	0.76	218.24	315.70	
	51	350	0.48	1.12	0.13	0.13	0.13	-2.65 x 10 ⁴	-0.04	-6.50E x 10 ⁴	1.15	218.14	462.76	
	46	150	0.63	0.65	0.95	6.68	0.40	-1.74 x 10 ⁷	0.09	-3.24E x 10 ⁷	0.81	148.67	364.67	
	46	250	0.42	0.79	0.91	3.70	0.40	-2.88 x 10 ⁴	0.02	-6.49 x 10 ⁴	0.79	199.78	328.95	
FSC-CO₂+HPU	41	350	0.52	0.71	0.92	6.35	0.30	-1.74 x 10 ⁷	0.07	-3.24 x 10 ⁷	0.71	239.02	460.65	
	46	350	0.63	0.63	0.87	3.37	0.40	-1.74 x 10 ⁷	0.03	-3.24 x 10 ⁷	0.81	272.08	437.01	
	51	350	1.40	0.79	0.98	2.11	0.00	-1.74 x 10 ⁷	-0.02	-3.24 x 10 ⁷	0.67	450.45	323.88	
	46	150	1.29	0.66	0.94	4.04	0.40	-1.74 x 10 ⁷	0.05	-3.24 x 10 ⁷	0.46	357.00	277.19	
	46	250	0.73	0.45	0.94	4.04	0.40	-1.74 x 10 ⁷	0.04	-3.24 x 10 ⁷	0.72	276.12	381.76	
FSC-CO₂+DI	41	350	1.22	0.27	0.98	21.38	0.10	-1.74 x 10 ⁷	0.14	-3.24 x 10 ⁷	0.27	427.69	350.19	
	46	350	0.73	0.72	0.93	3.86	0.40	-1.74 x 10 ⁷	0.04	-3.24 x 10 ⁷	0.73	276.91	384.86	
	51	350	0.73	0.94	0.49	1.66	0.10	-1.74 x 10 ⁷	-0.02	-3.24 x 10 ⁷	0.95	343.35	473.19	
	46	150	0.71	0.62	0.96	6.65	0.40	-1.74 x 10 ⁷	0.06	-3.24 x 10 ⁷	0.63	272.72	386.03	
	46	250	0.64	0.62	0.94	7.33	0.60	-1.74 x 10 ⁷	0.08	-3.24 x 10 ⁷	0.62	256.77	399.79	
FSC-CO₂+HPU+DI	41	350	0.75	0.61	0.96	6.37	0.40	-1.74 x 10 ⁷	0.06	-3.24E x 10 ⁷	0.62	288.75	389.21	
	46	350	0.94	0.65	0.99	4.45	0.60	-1.74 x 10 ⁷	0.03	-3.24E x 10 ⁷	0.58	325.11	288.00	
	51	350	1.65	0.82	0.98	1.50	0.40	-1.94 x 10 ⁷	-0.01	-3.04E x 10 ⁷	0.25	443.80	120.11	
	46	150	1.80	0.41	0.99	5.00	0.10	-1.74 x 10 ⁷	0.03	-3.24E x 10 ⁷	0.41	397.52	220.45	
	46	250	0.93	0.63	0.97	4.32	0.40	-1.74 x 10 ⁷	0.04	-3.24 x 10 ⁷	0.69	305.17	386.69	

Así pues, en los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU+DI, el modelo de Peleg tipo B, presentó el mejor ajuste de los datos experimentales, por lo que fue seleccionado para estudiar la dependencia de los parámetros del modelo con las condiciones de presión y temperatura en ambos tratamientos. Por otro lado, el modelo Bifásico fue seleccionado para evaluar la dependencia de sus parámetros cinéticos con la presión y temperatura, en los tratamientos con FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+DI.

4.2.2. Modelización secundaria

Aunque el ajuste de los modelos primarios a los datos experimentales es adecuado, éstos tienen dos desventajas fundamentales: se genera un número elevado de parámetros, ya que es preciso conocer los diferentes valores para cada condición de presión y temperatura seleccionada en cada tipo tratamiento, y además, los modelos que se obtienen no permiten su generalización en un rango de condiciones de proceso, sino que son específicos para cada condición. Por esta razón, algunos autores han desarrollado modelos secundarios que relacionan el valor de los parámetros de los modelos primarios con las condiciones del proceso (temperatura, presión, pH, etc.) (Peleg y Pechina, 2000; Peleg y col., 2002; Peleg, 2006; Ferrentino y col., 2010; Ortuño y col., 2014a), permitiendo así reducir el número de parámetros y la generalización del modelo a un rango de condiciones.

En el presente trabajo, partiendo de los modelos primarios seleccionados y de la influencia de la presión y la temperatura, determinada mediante los ANOVAS llevados a cabo sobre las cinéticas de inactivación, se han desarrollado diferentes modelos secundarios.

De los ANOVAS realizados sobre las cinéticas de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂ en pechuga de pollo y en jamón de pavo, se determinó que tanto la presión como la temperatura afectaron significativamente a la velocidad de inactivación. Así pues, se seleccionó la expresión desarrollada por Ortuño y col. (2014a) para indicar la dependencia de los parámetros de los modelos primarios (f_p) con la temperatura y presión del proceso, de acuerdo a la Ec. 4.1.

$$fp(T, P) = \ln \left(1 + \exp(a_f(T - T_c) + b_f(P - P_c)) \right) \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde, T y P simbolizan el nivel de temperatura y presión, respectivamente; a_f y b_f representan constantes de velocidad (respecto de la temperatura y presión, respectivamente), a las cuales los parámetros cinéticos del modelo primario pueden aumentar a medida que lo hace la temperatura y la presión, hasta un nivel máximo de T_c y P_c , respectivamente (Peleg, 2006).

Para las cinéticas de inactivación llevadas a cabo en muestras de pechuga de pollo, como se indicó previamente, el modelo de Weibull ofreció en promedio, el mejor ajuste ($R^2=0.97$ y $RMSE=0.17$) para todos los tratamientos de inactivación estudiados (Tabla 4.3). Por ello, fue usado en todos los tratamientos, para incluir la dependencia de la presión y la temperatura en la modelización.

En los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU, llevados a cabo a diferentes condiciones de presión (150 – 450 bar; 41 °C) y temperatura (36 – 51 °C; 350 bar), los parámetros del modelo primario de Weibull, fueron descritos mediante las Ecs. 4.2 y 4.3, las cuales indican la dependencia simultánea de b y n, respectivamente, con la temperatura y presión del proceso.

$$b(T, P) = \ln \left(1 + \exp \left(k_{i1b}(T - T_{Cw}) + k_{i2b}(P - P_{Cw}) \right) \right) \quad (\text{Ec. 4.2})$$

$$n(T, P) = \ln \left(1 + \exp \left(k_{i1n}(T - T_{Cw}) + k_{i2n}(P - P_{Cw}) \right) \right) \quad (\text{Ec. 4.3})$$

donde, T y P simbolizan el nivel de temperatura y presión, respectivamente; k_{1b} , k_{2b} , k_{1n} y k_{2n} son las constantes de velocidad características de *E. coli*, a las cuales b y n aumentan conforme se incrementa la temperatura y la presión, hasta un valor máximo de T_{Cw} y P_{Cw} , respectivamente. El subíndice i hace referencia al tipo de tratamiento estudiado: FSC-CO₂ (1) o FSC-CO₂+HPU (2).

Los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI en pechuga de pollo fueron llevados a cabo a diferentes condiciones de presión (150, 250

y 350 bar) manteniendo la temperatura constante (46 °C). Por tanto, la dependencia de los parámetros cinéticos, b y n , del modelo de Weibull primario fue descrita usando el modelo log-logístico (Peleg y col., 2002b) de acuerdo a las Ecs. 4.4 y 4.5, respectivamente.

$$b(P) = \ln \left(1 + \exp(k_{ib}(P - P_{cw})) \right) \quad (\text{Ec. 4.4})$$

$$n(P) = \ln \left(1 + \exp(k_{in}(P - P_{cw})) \right) \quad (\text{Ec. 4.5})$$

donde, k_{ib} y k_{in} son las constantes de velocidad características de *E. coli* a las cuales b y n , respectivamente, aumentan conforme se incrementa la presión hasta un valor máximo de P_{cw} . El subíndice i hace referencia al tipo de tratamiento estudiado: FSC-CO₂+DI (3) o FSC-CO₂+HPU+DI (4).

Con respecto a las cinéticas de inactivación de *E. coli* en jamón de pavo, el modelo de Peleg Tipo B ofreció en promedio ($R^2=0.98$; $RMSE=0.29$), el mejor ajuste a los datos experimentales obtenidos mediante los tratamientos con FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU+DI (Tabla 4.5), bajo diferentes condiciones de presión (150 - 350 bar; 46 °C) y temperatura (41 - 51 °C; 350 bar). Por lo tanto, para incluir la dependencia de la presión y la temperatura en su expresión, los parámetros, m , a_1 y a_2 , de dicho modelo fueron descritos mediante las ecuaciones: Ecs. 4.6, 4.7 y 4.8, respectivamente.

$$m(T, P) = \ln \left(1 + \exp \left(k_{i1m} (T - T_{cpg}) + k_{i2m} (P - P_{cpg}) \right) \right) \quad (\text{Ec. 4.6})$$

$$a_1(T, P) = \ln \left(1 + \exp \left(k_{i1a1} (T - T_{cpg}) + k_{i2a1} (P - P_{cpg}) \right) \right) \quad (\text{Ec. 4.7})$$

$$a_2(T, P) = \ln \left(1 + \exp \left(k_{i1a2} (T - T_{cpg}) + k_{i2a2} (P - P_{cpg}) \right) \right) \quad (\text{Ec. 4.8})$$

donde, k_{1m} , k_{2m} , k_{1a1} , k_{2a1} , k_{1a2} y k_{2a2} , son las constantes de velocidad características de la población de *E. coli* a las cuales m , a_1 y a_2 aumentan conforme se incrementa la temperatura y la presión hasta un valor máximo de T_{cpg} y P_{cpg} , respectivamente. El

subíndice i hace referencia al tipo de tratamiento estudiado en este apartado: FSC-CO₂ (1) y FSC-CO₂+HPU+DI (4).

Igualmente, en el caso de los tratamientos con FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+DI, el modelo primario Bifásico, mostró en promedio ($R^2=0.97$; $RMSE=0.32$), el mejor ajuste a los datos experimentales para ambos tratamientos (Tabla 4.5); por ello, los parámetros cinéticos, f , k_{max_1} y k_{max_2} fueron expresados mediante las ecuaciones: Ecs. 4.9, 4.10 y 4.11, respectivamente.

$$f(T, P) = \ln \left(1 + \exp \left(k_{i1f}(T - T_{C_{bf}}) + k_{i2f}(P - P_{C_{bf}}) \right) \right) \quad (\text{Ec. 4.9})$$

$$k_{max_1}(T, P) = \ln \left(1 + \exp \left(k_{i1m1}(T - T_{C_{bf}}) + k_{i2m1}(P - P_{C_{bf}}) \right) \right) \quad (\text{Ec. 4.10})$$

$$k_{max_2}(T, P) = \ln \left(1 + \exp \left(k_{i1m2}(T - T_{C_{bf}}) + k_{i2m2}(P - P_{C_{bf}}) \right) \right) \quad (\text{Ec. 4.11})$$

donde, k_{1f} , k_{2f} , k_{1m1} , k_{2m1} , k_{1m2} y k_{2m2} , son las constantes de velocidad características de la población de *E. coli* a las cuales f , k_{max_1} y k_{max_2} aumentan conforme se incrementa la temperatura y la presión hasta un valor máximo de $T_{C_{bf}}$ y $P_{C_{bf}}$, respectivamente. El subíndice i hace referencia al tipo de tratamiento estudiado en este apartado: FSC-CO₂+HPU (2) y FSC-CO₂+DI (3).

Substituyendo las ecuaciones de los parámetros cinéticos (Ec. 4.2 a Ec. 4.11) en los correspondientes modelos primarios descritos en la metodología (Ec. 3.6 a 3.9), se obtuvieron las expresiones generales de los modelos secundarios que describen las cinéticas de inactivación de *E. coli* en muestras de pechuga de pollo y jamón de pavo en función de las condiciones del proceso, presión, temperatura y tiempo.

El valor de los diferentes parámetros fue calculado mediante la minimización de la suma de las diferencias cuadráticas entre los datos experimentales y los datos calculados, para todas las condiciones de temperatura y presión estudiadas, usando la herramienta Solver de Microsoft Excel®.

Pechuga de pollo*FSC-CO₂* y *FSC-CO₂+HPU*

La Tabla 4.7 muestra los valores de las constantes cinéticas del modelo de Weibull generalizado, usado para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli* llevadas a cabo mediante los tratamientos con FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU, en las muestras de pechuga de pollo, a diferentes condiciones de presión (150, 250, 350 y 450 bar; 41 °C) y temperatura (36, 41, 46 y 51 °C; 350 bar).

Tabla 4.7. Estimación de los parámetros del modelo de Weibull generalizado para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli* en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU a diferentes condiciones de presión y temperatura

Parámetro	FSC-CO ₂	RMSE	R ²	FSC-CO ₂ +HPU	RMSE	R ²
k_{1b}	5.55 x 10 ⁻⁴	0.30	0.90	1.70 x 10 ⁻⁴	0.28	0.92
k_{2b}	-2.60 x 10 ⁻¹			-2.19 x 10 ⁻¹		
k_{1n}	1.99 x 10 ⁻⁵			1.10 x 10 ⁻⁵		
k_{2n}	1.92 x 10 ⁻¹			2.30 x 10 ⁻¹		
T_{cw}	43.08			45.68		
P_{cw}	3586.05			7427.78		

El valor de los parámetros estadísticos obtenidos en los tratamientos con FSC-CO₂ (RMSE=0.30, R²=0.90) y FSC-CO₂+HPU (RMSE=0.28, R²=0.92), empleando el modelo generalizado de Weibull, demuestra un peor ajuste de las cinéticas de inactivación de *E. coli* de ambos tratamientos, en comparación a los parámetros estadísticos promedio de los ajustes individuales realizados a cada curva de inactivación para cada condición de temperatura y presión estudiada, mostrados en la Tabla 4.3 (RMSE=0.16, R²=0.97 para FSC-CO₂ y RMSE=0.17, R²=0.96 para FSC-CO₂+HPU).

Las curvas de inactivación experimental y predicha mediante la ecuación generalizada del modelo de Weibull para los tratamientos de inactivación en pechuga de pollo,

están representadas en las Figuras 4.1 a 4.5, en la sección 4.1 de la presente Tesis Doctoral

La Figura 4.16 muestra la relación entre los valores de reducción (ciclos-log) experimental y calculado por el modelo de Weibull generalizado, en los tratamientos de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU.

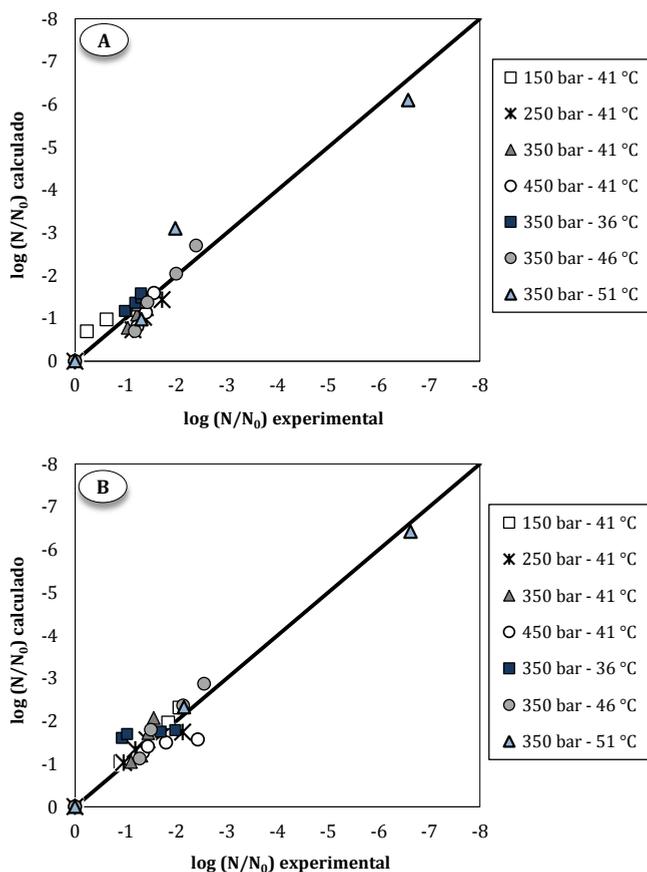


Figura 4.16. Inactivación de *E. coli* experimental frente a calculada mediante el modelo de Weibull generalizado, durante el tratamiento de **A.** FSC-CO₂ y **B.** FSC-CO₂+HPU a diferentes condiciones de presión (150 – 450 bar) y temperatura (36 – 51 °C).

En general, se observaron errores bajos de predicción y distribuidos aleatoriamente alrededor de la diagonal (Figura 4.16). Con un valor de $R^2 \geq 0.90$ se podría concluir que el modelo de Weibull generalizado propuesto, describe adecuadamente las cinéticas de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo. Además, el número de parámetros se redujo de 24 a 6, usados para describir las curvas de inactivación experimental mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU para cualquier condición dentro del intervalo de temperatura entre 36 y 51 °C y de presión entre 150 y 450 bar.

FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI

La Tabla 4.8 muestra las constantes cinéticas del modelo de Weibull generalizado usado para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli* mediante los tratamientos con FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI, llevados a cabo bajo diferentes condiciones de presión (150, 250, 350 bar), a temperatura constante (46 °C).

Tabla 4.8. Estimación de los parámetros del modelo de Weibull generalizado para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli* en muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI, bajo diferentes condiciones de presión (150, 250 y 350 bar), a temperatura constante (46 °C).

Parámetro	FSC-CO ₂ +DI	RMSE	R ²	FSC-CO ₂ +HPU+DI	RMSE	R ²
k_{1b}	3.06 x 10 ⁻³	0.21	0.93	2.54 x 10 ⁻³	0.48	0.90
P_{cw}	486.86			521.26		
k_{1n}	-1.83 x 10 ⁻³			-1.97 x 10 ⁻³		

De igual forma, los valores de los parámetros estadísticos (RMSE=0.21, R²= 0.93) para el tratamiento de FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI (RMSE=0.48, R²=0.90), obtenidos tras el ajuste del modelo de Weibull generalizado, mostraron un peor ajuste de las cinéticas de inactivación de *E. coli*, en comparación al ajuste promedio de las cinéticas individuales mediante FSC-CO₂+DI (RMSE=0.18, R²=0.94) y FSC-CO₂+HPU+DI (RMSE=0.20, R²=0.99).

La Figura 4.17, muestra la comparación entre la reducción de *E. coli* (ciclos-log) experimental y calculada por el modelo de Weibull generalizado, con errores de predicción bajos y distribuidos aleatoriamente alrededor de la diagonal para los tratamientos de inactivación de FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU+DI.

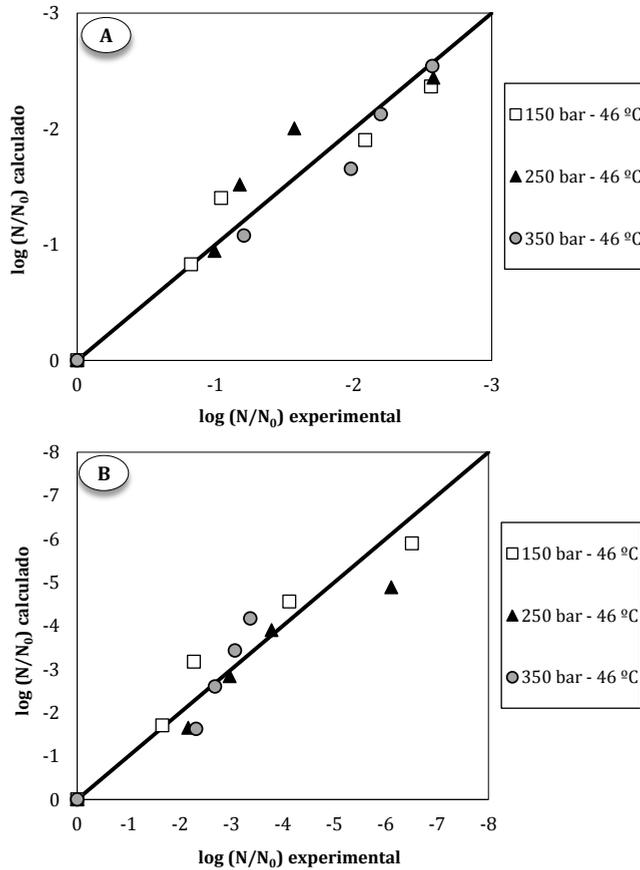


Figura 4.17. Inactivación de *E. coli* experimental frente a calculada mediante el modelo de Weibull generalizado, durante el tratamiento de **A.** FSC-CO₂+DI y **B.** FSC-CO₂+HPU+DI a diferentes condiciones de presión (150 – 350 bar) y temperatura constante (46 °C).

Similares resultados fueron observados por Ferrentino y col. (2008), quienes usaron la ecuación logística de Peleg para indicar la dependencia de los parámetros del modelo de Weibull, b y n , con la presión y temperatura durante el tratamiento con FSC-CO₂ a diferentes condiciones de presión (70 - 160 bar) y temperatura (35 - 60 °C). Estos autores observaron que el modelo de Weibull generalizado, predijo adecuadamente la inactivación de la microbiota en zumo de manzana tratado mediante FSC-CO₂.

De acuerdo a los valores de R^2 y RMSE obtenidos en el presente trabajo, puede concluirse que el modelo de Weibull generalizado, describe adecuadamente las cinéticas de inactivación experimental de *E. coli*, en muestras de pechuga de pollo que han sido sumergidas en DI y tratadas mediante FSC-CO₂ (FSC-CO₂+DI) y FSC-CO₂+HPU (FSC-CO₂+HPU+DI) para cualquier condición de presión a temperatura constante (150, 250 y 350 bar; 46 °C), Además, el número de parámetros del modelo usados con el modelo de Weibull generalizado se redujo a 4 en lugar de los 6 parámetros usados mediante el modelo primario para describir los datos experimentales en cada condición de presión y temperatura, para ambos tratamientos.

En general, los parámetros estadísticos obtenidos tras el ajuste de los modelos generalizados fueron peores que el ajuste con los modelos primarios (Tabla 4.3). El error en la estimación, en la mayoría de los casos incrementa: para el caso de FSC-CO₂ de 0.16 a 0.30 ciclos-log; para FSC-CO₂+HPU de 0.17 a 0.28 ciclos-log; para FSC-CO₂+DI de 0.18 a 0.21 ciclos-log y para FSC-CO₂+HPU+DI de 0.20 a 0.48 ciclos-log. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por Ortuño y col. (2014a), quienes encontraron un aumento del error tras el ajuste con el modelo generalizado de las curvas de inactivación de *E. coli* en zumo de naranja usando FSC-CO₂+HPU de 0.10 ciclos-log. No obstante, los valores de RMSE=0.31 y $R^2=0.91$ promedio obtenidos para los cuatro tratamientos de inactivación estudiados en la presente Tesis, indican que el modelo de Weibull generalizado, permitió describir adecuadamente las cinéticas de inactivación de *E. coli* en muestras de pechuga de pollo, cuando se llevan a cabo en el intervalo de presión (150 - 450 bar) y temperatura (36 - 51 °C) estudiados.

Jamón de pavo*FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU+DI*

Por otra parte, la Tabla 4.9 muestra los valores de las constantes cinéticas del modelo de Peleg Tipo B generalizado, incluyendo las ecuaciones Ec. 4.6, 4.7 y 4.8 en los parámetros m , a_1 y a_2 , del modelo primario, usado para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli*, llevadas a cabo mediante los tratamientos con FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU+DI en las muestras de jamón de pavo, a diferentes condiciones de presión (150, 250, 350 bar) y temperatura (41, 46 y 51 °C).

Tabla 4.9. Estimación de parámetros del modelo de Peleg Tipo B generalizado, para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU+DI a diferentes condiciones de presión (150, 350, 450 bar) y temperatura (41, 46 y 51 °C)

Parámetro	FSC-CO ₂	RMSE	R ²	FSC-CO ₂ +HPU+DI	RMSE	R ²
k_{1m}	6.596	0.28	0.98	-2.384	0.38	0.96
k_{2m}	0.064			-0.118		
k_{1a1}	0.060			-0.013		
k_{2a1}	0.001			0.000		
k_{1a2}	9.818			-9.083		
k_{2a2}	0.081			-0.062		
T_{cpg}	33.59			49.47		
P_{cpg}	950.06			950.18		

Los valores de los parámetros estadísticos obtenidos para el tratamiento con FSC-CO₂ (RMSE= 0.28, R²=0.98) y FSC-CO₂+HPU+DI (RMSE= 0.38, R²=0.96), revelan que los ajustes llevados a cabo mediante el modelo generalizado de Peleg tipo B en ambos tratamientos, son comparables con el ajuste individual promedio del modelo primario a cada condición de temperatura y presión, en los tratamientos con FSC-CO₂ (RMSE=0.22, R²=0.98) y FSC-CO₂+HPU+DI (RMSE=0.35, R²=0.97) mostrados en la Tabla 4.5.

Las curvas de inactivación experimental y predicha por el modelo para los tratamientos de inactivación en jamón de pavo, se representan en las Figuras 4.6 a 4.11 en el apartado 4.1 de la presente Tesis Doctoral.

La Figura 4.18 muestra la correlación entre los valores de reducción (ciclos-log) experimental y calculada por el modelo de Peleg Tipo B generalizado, en los tratamientos de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU+DI.

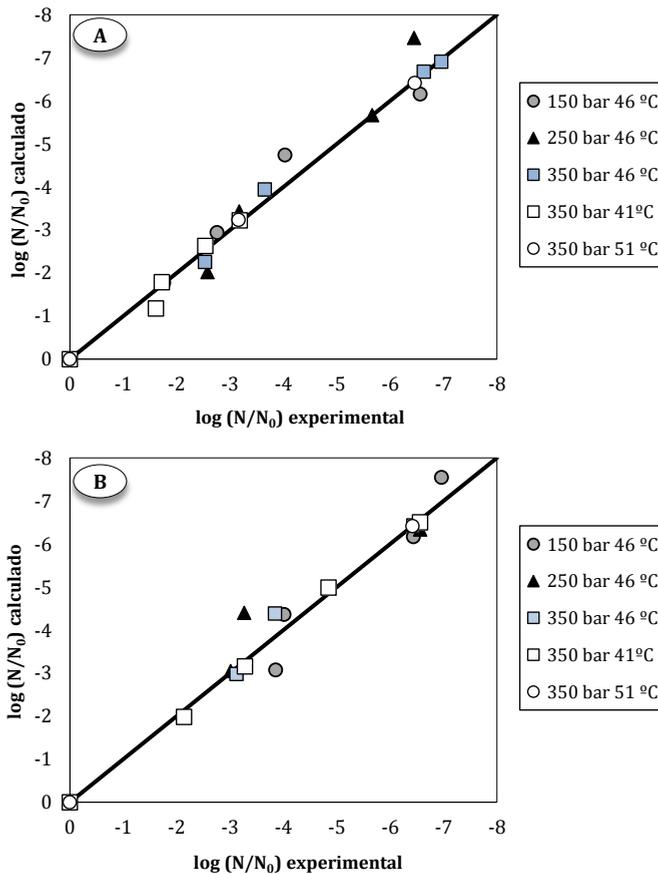


Figura 4.18. Inactivación de *E. coli* experimental frente calculada mediante el modelo de Peleg Tipo B generalizado, durante el tratamiento de **A.** FSC-CO₂ y **B.** FSC-CO₂+HPU+DI a diferentes condiciones de presión (150 – 350 bar) y temperatura (41 – 51 °C).

Las gráficas de la Figura 4.18, confirman que los errores de predicción obtenidos durante el tratamiento con FSC-CO₂ son más bajos y muestran estar mejor distribuidos alrededor de la diagonal, siendo más bajos en el tratamiento con FSC-CO₂ (Figura 4.18-A) que en el de FSC-CO₂+HPU+DI (Figura 4.18-B).

Además, con valores de $R^2 > 0.95$ obtenidos tras el ajuste con el modelo generalizado, se puede concluir que el modelo de Peleg Tipo B generalizado, describe adecuadamente las curvas de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón de pavo para ambos tratamientos, en el intervalo de temperatura (41 a 51 °C) y presión (150 a 350 bar) estudiados.

Ortuño y col (2014) usaron el mismo modelo Peleg tipo B generalizado, mediante la ecuación logística, para ajustar las cinéticas de inactivación de *S. cerevisiae* en zumo de naranja, mediante FSC-CO₂+HPU a diferentes condiciones de presión (100 – 350 bar; 36 °C) y temperatura (31 – 41 °C; 225 bar). Sin embargo, a diferencia del presente trabajo, estos autores observaron que para los valores de reducción microbiana más bajos, entre 0 y 3 ciclos-log, el modelo mostró valores de error más altos. Además, obtuvieron parámetros estadísticos (RMSE y R²) peores que los obtenidos por el modelo primario para cada condición de presión y temperatura.

FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+DI

Igualmente, la Tabla 4.10 muestra los parámetros estadísticos obtenidos tras el ajuste del modelo generalizado Bifásico, usado para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+DI sobre muestras de jamón de pavo, bajo las mismas condiciones de presión y temperatura que los tratamientos anteriores. Los valores de dichos parámetros revelan que el ajuste de los tratamientos con FSC-CO₂+HPU (RMSE=0.52, R²=0.94) y FSC-CO₂+DI (RMSE=0.61, R²=0.90), en general fue peor, comparado con los ajustes individuales del modelo Bifásico primario en FSC-CO₂+HPU (RMSE=0.33, R²=0.96) y FSC-CO₂+DI (RMSE=0.30, R²=0.96) mostrados en la Tabla 4.5.

En general, los errores obtenidos tras la estimación de los datos experimentales por el modelo generalizado de Peleg tipo B y Bifásico, incrementaron para todos los tratamientos, respecto de las estimaciones individuales. Para el caso del FSC-CO₂, el error en la predicción promedio aumentó de 0.22 a 0.28 ciclos-log; para FSC-CO₂+HPU de 0.33 a 0.52 ciclos-log; para FSC-CO₂+DI de 0.30 a 0.61 ciclos-log y para FSC-CO₂+HPU+DI de 0.35 a 0.38 ciclos-log. Se observa que los errores obtenidos en la estimación de las cinéticas de los tratamientos de FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU+DI son menores, en comparación al error obtenido para los tratamientos de FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+DI.

Sin embargo, Ortuño y col. (2014a), quienes estudiaron las cinéticas de inactivación de *E. coli* en zumo de naranja durante el tratamiento con FSC-CO₂ a varias presiones (150 – 350 bar) y temperaturas (31 – 41 °C), observaron que, tras el ajuste del modelo Bifásico generalizado sobre los datos de inactivación experimental, los errores de predicción obtenidos fueron similares a los errores mostrados tras el ajuste individual a cada condición estudiada.

Tabla 4.10. Estimación de los parámetros del modelo Bifásico generalizado, para describir las cinéticas de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón de pavo tratadas mediante FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+ DI a diferentes condiciones de presión (150, 350, 450 bar) y temperatura (41, 46 y 51 °C)

Parámetro	FSC-CO ₂ +HPU	RMSE	R ²	FSC-CO ₂ +DI	RMSE	R ²
k_{1f}	-0.167	0.52	0.94	-0.911	0.61	0.90
k_{2f}	0.112			0.412		
k_{1m1}	0.005			-0.111		
k_{2m1}	-0.020			-0.031		
k_{1m2}	-0.369			-0.265		
k_{2m2}	-0.415			-0.323		
T_{cbf}	36.99			52.12		
P_{cbf}	950.46			382.65		

La Figura 4.19, muestra la comparación entre los valores de reducción de *E. coli* (ciclos-log) experimental y calculada por el modelo Bifásico generalizado, con errores de predicción distribuidos aleatoriamente alrededor de la diagonal, durante los tratamientos con FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+DI. Las desviaciones más altas se encuentran para 250 bar y 46 °C en ambos tratamientos.

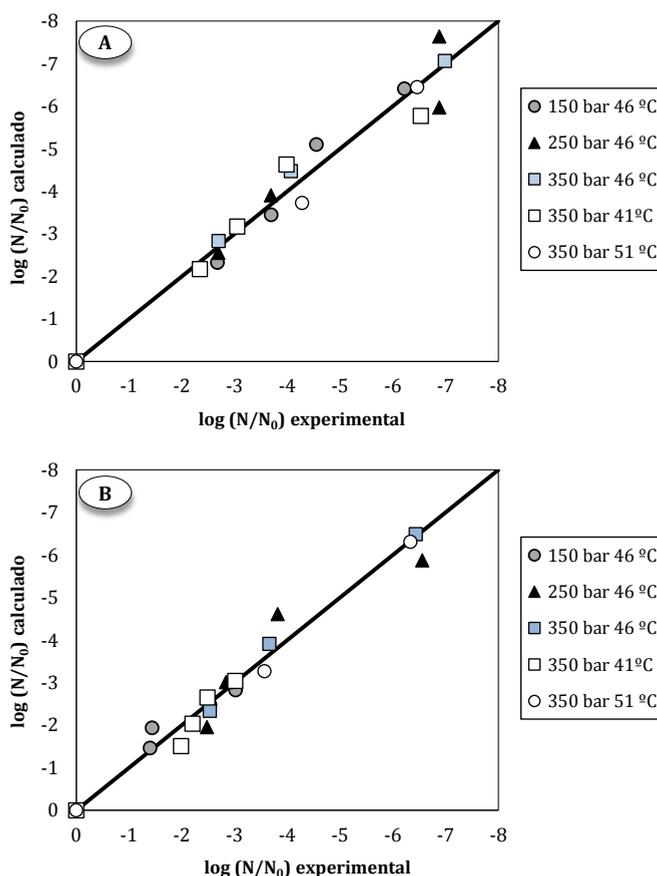


Figura 4.19. Inactivación de *E. coli* experimental frente a calculada mediante el modelo Bifásico generalizado, durante el tratamiento de **A.** FSC-CO₂+HPU y **B.** FSC-CO₂+DI a diferentes condiciones de presión (150 – 350 bar) y temperatura (41 – 51 °C)

No obstante, siendo que los valores de correlación obtenidos en el presente trabajo para ambos tratamientos, fueron de $R^2 \geq 0.90$, se puede concluir que modelo Bifásico generalizado, describe adecuadamente las curvas de inactivación de *E. coli* en muestras de jamón de pavo tras el tratamiento con FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+DI en el intervalo de temperatura (41 a 51 °C) y presión (150 a 350 bar) estudiados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del tratamiento de inactivación sobre los parámetros de calidad
de las muestras cárnicas

Capítulo 4.3

4.3. Efecto de los tratamientos de inactivación mediante FSC-CO₂ sobre los parámetros de calidad de las matrices cárnicas

Una vez conocido el efecto de los diferentes tratamientos (FSC-CO₂; FSC-CO₂+HPU; FSC-CO₂+DI; FSC-CO₂+HPU+DI) sobre la inactivación de *E. coli* en las distintas matrices cárnicas, se llevó a cabo un estudio para evaluar el efecto de dichos tratamientos sobre algunos de los atributos más importantes relacionados con la calidad de las matrices cárnicas: color, textura, humedad, grasa y microestructura. Para ello, se seleccionaron las menores condiciones de presión, temperatura y tiempo de tratamiento, que ofrecieran un nivel de inactivación de *E. coli* aceptable, al menos de 3 ciclos-log, para cada una de las matrices estudiadas.

Se seleccionaron como condiciones de tratamiento: 250 bar, 46 °C y 20 min en las muestras de pechuga de pollo; 150 bar, 46 °C y 10 min en jamón de pavo y 250 bar, 46 °C y 10 min, en los tratamientos con jamón curado. Dichas condiciones fueron usadas para los distintos sistemas de tratamiento mediante FSC-CO₂ estudiados: FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU, FSC-CO₂+DI, FSC-CO₂+HPU+DI. En los tratamientos donde se aplicaron HPU, la potencia suministrada fue de 42 W ± 5 W. Además, para evaluar el efecto de aplicar sólo ultrasonidos, se llevó a cabo un tratamiento con HPU (42 W ± 5 W) a 46 °C, sobre las muestras cárnicas sumergidas en la disolución salina (HPU+DI).

A continuación se describe el efecto de los distintos tratamientos sobre las propiedades fisicoquímicas: color, humedad, grasa, textura y microestructura de las tres matrices cárnicas.

4.3.1. Color

El color es el factor que afecta mayoritariamente a la apariencia de la carne y de otros productos cárnicos durante su proceso de transformación y almacenamiento (Pérez y Fernández, 2009), e influye directamente en las preferencias de los consumidores, de ahí la importancia por minimizar los cambios de color de los productos cárnicos.

Para evaluar el cambio de color de las matrices cárnicas debido a los distintos tratamientos de inactivación descritos previamente, se midieron las coordenadas CIE Lab sobre la superficie de las muestras de carne, antes y después del tratamiento. La Tabla 4.11 muestra los valores promedio de las coordenadas cromáticas L^* , a^* y b^* , que indican el grado de luminosidad, índice de rojo y amarillo, respectivamente, medidas en la superficie de las muestras cárnicas. Además, la Tabla 4.11 muestra el valor de la diferencia de color (ΔE) obtenida entre las muestras antes y después de cada tratamiento.

Pechuga de Pollo

En primer lugar, hay que destacar que la pechuga de pollo, tras cualquier tipo de tratamiento llevado a cabo, mostro una apariencia superficial con aspecto a cocinado, adquiriendo un aspecto blanquecino, comparado con el tono rosa de la pechuga de pollo fresca (muestra control).

El análisis estadístico de los datos reveló que la luminosidad de las muestras de pechuga de pollo aumentó significativamente ($p < 0.05$) tras todos los tratamientos aplicados, respecto de la muestra control ($L^* = 51.80$). No se encontraron grandes diferencias en el valor de L^* entre las muestras tratadas, oscilando sus valores entre 73.50 en el caso de las muestras tratadas mediante FSC-CO₂ y 82.02 para FSC-CO₂+HPU+DI, siendo este último el proceso que dio lugar a una mayor luminosidad de las muestras tras el tratamiento.

Respecto al valor de a^* , éste no cambió significativamente ($p > 0.05$) tras ningún tipo de tratamiento, respecto de las muestras sin tratar, excepto para el tratamiento mediante

HPU+DI, para el cual el valor de a^* (1.34) aumentó significativamente ($p < 0.05$), comparado con las muestras control.

Por otra parte, se observó que el valor de b^* de todas las muestras tratadas aumentó significativamente ($p < 0.05$), indicando una mayor tonalidad de amarillo, respecto de la muestra control. Este cambio puede estar relacionado con la apariencia de cocinado que adquirieron las muestras tras todos los tratamientos aplicados.

Con el objetivo de cuantificar los cambios de color, se determinó la variación global de color (ΔE) entre las coordenadas cromáticas medidas en la muestra control y tratada. La escala de clasificación mostrada por Mokrzycki y col. (2012) indica que, para un valor de $\Delta E < 2$, no es posible apreciar la diferencia de color entre dos muestras, para $2 < \Delta E < 3.5$, es posible apreciar diferencias de color, valores entre $3.5 < \Delta E < 5$ revelan claras diferencias de color y un $\Delta E > 5$ indica que las muestras presentan dos colores diferentes.

En base a esta escala, se puede observar que todos los tratamientos aplicados sobre pechuga de pollo provocaron cambios de color significativos en dichas muestras. El tratamiento que generó un mayor cambio de color fue el llevado a cabo mediante FSC-CO₂+HPU+DI ($\Delta E = 30.49$), mientras que el tratamiento que generó una menor variación de color fue el realizado con FSC-CO₂ ($\Delta E = 22.74$).

Jamón de pavo

Para las muestras de jamón de pavo, ninguno de los tratamientos aplicados generó cambios significativos ($p > 0.05$) en ninguna de las coordenadas CIE Lab estudiadas (Tabla 4.11). Además, la diferencia global de color (ΔE), mostró que ninguno de los tratamientos aplicados causó cambios de color apreciables sobre la superficie de las muestras de jamón de pavo (Tabla 4.11), respecto de las muestras control. Los valores ΔE obtenidos oscilaron entre 0.08 para FSC-CO₂+HPU y 2.11 para FSC-CO₂+HPU+DI.

Tabla 4.11 Parámetros de color en las muestras cárnicas sometidas a diferentes tratamientos de inactivación.

Tratamiento	L*	a*	b*	ΔE
<i>Pechuga de pollo</i>				
Control	51.80±3.90 ^a	-0.03±0.66 ^e	10.02±1.49 ^j	
FSC-CO ₂	73.50±7.44 ^b	1.06±1.70 ^{ef}	17.44±3.21 ^{kl}	22.74
FSC-CO ₂ +HPU	79.21±2.20 ^{cd}	1.16±0.90 ^{ef}	17.44±2.32 ^l	28.42
FSC-CO ₂ +DI	76.14±2.62 ^{bc}	1.10±0.80 ^{ef}	17.78±2.15 ^l	25.57
FSC-CO ₂ +HPU+DI	82.02±3.91 ^d	0.17±0.35 ^{ef}	14.07±2.69 ^k	30.49
HPU+DI	77.3±0.50 ^{bcd}	1.34±0.70 ^f	15.83±1.63 ^{kl}	26.19
<i>Jamón de Pavo</i>				
Control	74.45±0.75 ^a	4.10±0.21 ^e	13.95±0.60 ^j	
FSC-CO ₂	74.52±0.87 ^a	3.99±0.24 ^e	13.96±0.69 ^j	1.73
FSC-CO ₂ +HPU	74.93±0.87 ^a	4.34±0.24 ^e	14.46±0.69 ^j	0.08
FSC-CO ₂ +DI	76.76±0.84 ^a	4.01±0.24 ^e	12.55±0.69 ^j	0.73
FSC-CO ₂ +HPU+DI	76.23±0.55 ^a	3.85±0.16 ^e	13.28±0.45 ^j	2.11
HPU+DI	75.68±0.86 ^a	4.08±0.24 ^e	15.39±0.69 ^j	1.53
<i>Jamón curado</i>				
Control	46.25±2.80 ^a	7.18±1.05 ^e	13.96±1.38 ^j	
FSC-CO ₂	48.62±4.11 ^a	13.24±1.36 ^g	16.48±1.78 ^{jk}	6,99
FSC-CO ₂ +HPU	47.95±2.55 ^a	10.22±0.96 ^{fg}	16.80±1.26 ^{jk}	4,50
FSC-CO ₂ +DI	46.54±3.61 ^a	8.84±1.36 ^{ef}	18.34±1.79 ^{jk}	4,69
FSC-CO ₂ +HPU+DI	48.56±2.55 ^a	11.45±2.96 ^{fg}	19.63±1.26 ^k	7,46
HPU+DI	42.70±3.62 ^a	8.64±1.36 ^{ef}	14.41±1.79 ^j	3,88

Los superíndices a, b, c, d (en L*); e, f, g (en a*) y j, k, l (en b*) muestran grupos homogéneos establecidos mediante los intervalos LSD (least significance difference) para p<0.05, para cada tipo de producto cárnico. ΔE corresponde a la diferencia global de color.

Jamón curado

La Tabla 4.11 muestra que, la coordenada cromática a^* de las muestras de jamón curado tratadas, mostró un aumento significativo ($p < 0.05$) respecto al valor de las muestras control ($a^* = 7.18$) para los tratamientos con FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU y FSC-CO₂+HPU+DI. Sin embargo, el parámetro de luminosidad no cambió significativamente ($p > 0.05$) tras ninguno de los tratamientos aplicados y, el cambio del parámetro b^* , solo fue significativo para el tratamiento de FSC-CO₂+HPU+DI. La diferencia global de color (ΔE) obtenida para todos los tratamientos aplicados, muestra que las diferencias generadas son apreciables por el ojo humano. El tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI provocó el mayor cambio de color en las muestras de jamón curado ($\Delta E = 7.46$); por otro lado, el tratamiento mediante HPU+DI presentó la menor variación de color ($\Delta E = 3.88$), en comparación a la muestra control.

Discusión sobre los cambios de color en las diferentes muestras cárnicas

Las muestras de **pechuga de pollo** fueron las que mostraron mayor cambio de color, tras cualquier tipo de tratamiento, en comparación con las muestras control.

De la literatura revisada, solo un estudio evalúa el efecto del FSC-CO₂ y los HPU aplicados de forma simultánea, sobre el color de matrices cárnicas, en el resto, se evalúa el efecto sobre el color, tras la aplicación individual de las técnicas. En este sentido, Choi y col. (2008) aplicaron FSC-CO₂ (152 bar y 31.1 °C) sobre muestras de carne de cerdo fresca (*longissimus dorsi*), y observaron que tras 10 min de tratamiento, éstas presentaron una apariencia más pálida que la carne sin tratar. Estos autores también observaron un aumento significativo en los valores de luminosidad de la carne tratada, $L^* = 59.97$, con respecto al valor en la carne control, $L^* = 46.94$, tal y como sucede en las muestras de pechuga de pollo en el presente trabajo. Choi y col. (2008) atribuyeron este cambio de color a la desnaturalización de proteínas que puede tener lugar durante el tratamiento; ya que, aunque el tratamiento con FSC-CO₂ no afecta la solubilización de las proteínas miofibrilares, sí mostró la desnaturalización de las proteínas sarcoplasmáticas (fosforilasa b, creatinina cinasa triosafosfato isomerasa, entre otras) las cuales enmascaran el color rojo del

sarcoplasma, causando, por tanto, mayor palidez en el músculo. Esta desnaturalización proteica, debida al descenso del pH del medio al solubilizarse el CO₂, sería la causante de la apariencia de carne cocinada que adquirieron las muestras de pollo tras todos los tratamientos aplicados. En este sentido, Young y col. (1996) observaron que muestras de pechuga de pollo tratadas térmicamente, empleando un baño entre 70 y 95 °C, aumentaron significativamente el valor de L* de 49.30 a 78.00 y el valor de b* de 6.48 a 11.38, manteniéndose el valor de a* prácticamente constante, tras el proceso de desnaturalización proteica.

En bibliografía se encuentran trabajos en los que otras tecnologías como la radiación gamma (Liu y col., 2003) o altas presiones (Del Olmo y col., 2010), se han empleado para llevar a cabo procesos de inactivación microbiana sobre pechuga de pollo, evaluándose el efecto de dichas tecnologías sobre el color de muestras de pollo. Liu y col. (2003) demostraron los cambios estructurales y de color en pechuga de pollo irradiada mediante rayos gamma (0.18 a 4.57 kGy). Estos autores observaron tras la radiación, un aumento de la luminosidad, al igual que en el presente trabajo, aunque el valor de la variación global de color en las muestras de pollo irradiadas ($\Delta E=3.6$) fue menor que la variación de color global obtenida mediante FSC-CO₂ y HPU, en cualquiera de los sistemas de tratamiento estudiados en el presente trabajo.

Por otro lado, Del Olmo y col. (2010), observaron también que tras el tratamiento con altas presiones (4000 bar, 5 °C) los valores de L* y b* de las muestras de pechuga de pollo, fueron significativamente más altos que en las muestras control. Los autores asociaron los efectos en las coordenadas de color, a la desnaturalización de las proteínas de forma similar al proceso de cocción, en el cual los cambios moleculares en las proteínas de pollo inducidos por el calentamiento, siguen una secuencia de desdoblamiento de la estructura de las proteínas, asociación molecular y formación de redes de gel.

Respecto al efecto de los HPU sobre el color de las muestras de pechuga de pollo, el tratamiento con HPU+DI (18 W/cm²), generó cambios significativos en comparación a las muestras control (Tabla 4.11). En este sentido, Pohlman y col. (1997b), encontraron diferencias significativas ($p<0.05$) en el color de muestras frescas de

bovino tratadas durante 10 min mediante HPU (22 W/cm², 20 kHz). Estos autores observaron que, la aplicación de altas intensidades de ultrasonidos, puede conducir a un incremento de la temperatura del músculo en ciertos puntos, produciendo una desnaturalización de las proteínas por efecto térmico, con el consecuente cambio de color en las muestras tratadas comparado con las muestras control. Por contra, Jayasooriya y col. (2007), observaron que, la aplicación de HPU (12 W/cm² y 24 kHz) durante 4 min de tratamiento, no afectó significativamente a los parámetros de color de músculos de ternera. La discrepancia entre los resultados puede deberse principalmente a las diferencias en la intensidad de la potencia aplicada, el tiempo de tratamiento y el tamaño de muestra.

En resumen, el cambio de color en las muestras de pechuga de pollo en la presente Tesis, puede ser atribuido a la desnaturalización de las proteínas musculares, lo que cambia las propiedades de la superficie de la muestra, como en el caso de la cocción, y en consecuencia se modifica la proporción de la luz que es absorbida y reflejada, creando un color blanquecino (Kruk y col., 2011). No obstante, dicho efecto fue más evidente mediante tratamientos con FSC-CO₂+HPU sobre muestras sumergidas o no en DI. Siendo el tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU+DI, el que provocó la mayor diferencia de color. Esto puede indicar que, la aplicación de HPU mejoró la difusión del CO₂ supercrítico en la matriz cárnica, lo que resulta un factor clave para la desnaturalización proteica y el cambio de coloración de las muestras de pechuga de pollo.

Los resultados obtenidos en las muestras de **jamón de pavo** son comparables a los obtenidos por Ferrentino y col. (2013c) en muestras de jamón cocido. Estos autores observaron que los parámetros de color de las muestras no mostraron diferencias significativas tras el tratamiento mediante FSC-CO₂ (120 bar, 50 °C, 5 min), respecto de las muestras sin tratar. La variación global de color obtenida por estos autores fue de $\Delta E=3.6$, mayor que el valor obtenido en las muestras de jamón de pavo en la presente tesis ($\Delta E=1.73$) mediante el tratamiento con FSC-CO₂ (150 bar, 46 °C, 10 min). Esta pequeña diferencia entre trabajos podría atribuirse al tipo de carne

empleada y a la mayor temperatura del CO₂ empleada en las muestras de jamón cocido.

A pesar de las pequeñas diferencias observadas en las coordenadas cromáticas tras los tratamientos ensayados en la presente Tesis, los parámetros de color obtenidos, se encuentran dentro del intervalo de color mostrado por otros autores para jamón de pavo ($L^*=70.14 \pm 3.56$, $a^*= 3.49 \pm 3.44$ y $b^*=5.179 \pm 1.79$) (Iqbal y col., 2013). Lo cual demuestra que aunque los tratamientos afectan al color de las muestras, el efecto es mínimo y el tratamiento da lugar a jamón de pavo con un color dentro de lo normal para este tipo de producto. Además, hay que destacar que, en general, los jamones de pavo presentan amplias diferencias en los atributos de calidad como el color; lo que se debe a la heterogeneidad en la materia prima, composición y cantidad de salmuera inyectada y a las diferencias en las condiciones de procesamiento (ElMasry y col., 2011).

Los cambios de color en los productos cárnicos varía en función de su contenido de mioglobina, siendo más drástico en carnes rojas (Solomon y col., 2006), que en las carnes blancas (Chan y col., 2011) y carnes curadas (De Alba y col., 2013). La mayoría de los estudios realizados acerca del efecto de tratamientos no térmicos sobre el color de muestras de **jamón curado**, se han llevado a cabo aplicando tratamientos con altas presiones (HPP) (Hugas y col., 2002; Andrés y col., 2009; Cava y col., 2009; Fuentes y col., 2010; De Alba y col., 2013). De hecho, el cambio de color de las muestras tratadas con HPP representa la principal desventaja de esta técnica. En este sentido, los estudios llevados a cabo empleando HPP sobre muestras de jamón curado, han mostrado que la decoloración del jamón curado aumenta con la presión del tratamiento (Cava y col., 2009) y se lleva a cabo como resultado de un incremento de metamioglobina (Carlez y col., 1995; Andrés y col., 2004; De Alba y col., 2013). En algunos productos curados, esta reacción puede prevenirse con la adición de nitritos para formar nitrosomioglobina, que es más resistente a la oxidación.

Recientemente, se ha estudiado el efecto de aplicar FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU sobre muestras de jamón curado. En este sentido, Ferrentino y col. (2013b), analizaron el cambio de color del jamón curado mediante una técnica espectrofotométrica on-line,

antes, durante y después del tratamiento con FSC-CO₂ (120 bar, 45 °C, 30 min). Los autores encontraron variaciones de color apreciables por el ojo humano ($\Delta E > 4$).

Por otra parte, Spilimbergo y col. (2014), observaron que tras 5 min de tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU (120 bar, 35 °C, 5 min) no se observaron cambios visibles en las muestras de jamón curado, en comparación a las muestras control. Los valores más bajos de ΔE obtenidos por estos autores, en comparación a los valores observados en las muestras de jamón curado en el presente trabajo, pueden ser debidos a las condiciones de tratamiento más severas (250 bar, 46 °C y 10 min) empleadas en la presente Tesis.

Así pues, el tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU sobre las muestras de jamón curado mostró que, además de reducir el recuento microbiano (Apartado 4.1), presenta cambios de color menores que los señalados por algunos investigadores para el tratamiento no-térmico de altas presiones.

4.3.2. Textura

La textura en los productos cárnicos es uno de los parámetros clave que influye directamente en la aceptación de los mismos por parte del consumidor (Chang y col., 2012). La textura en las carnes procesadas depende directamente del tipo de carne escogida, de las fibras que constituyen el músculo, del estado del rigor o tiempo post-mortem en el que se encuentren en el momento del procesado y sobre todo, de las condiciones de presión y temperatura aplicadas durante su tratamiento (Hugas y col., 2002).

Para evaluar el efecto de los distintos tratamientos sobre la textura de las tres matrices cárnicas seleccionadas, se analizó el valor de fuerza máxima (F. máxima), obtenida tal y como se especifica en el Apartado 3.9 de Materiales y Métodos.

Pechuga de pollo

La Tabla 4.12 muestra que la dureza (F. máxima) de las muestras de pechuga de pollo, en general disminuyó significativamente ($p < 0.05$) en comparación a la dureza de la muestra control (4.26 N), con excepción del tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU+DI. Las muestras tratadas mediante FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU, presentaron la menor dureza (2.49 N y 2.53 N, respectivamente). En el caso del tratamiento con FSC-CO₂, la adición de DI dio lugar a una disminución significativa ($p < 0.05$) de la dureza de la muestra de pechuga de pollo.

Jamón de pavo

La dureza de las muestras de jamón de pavo control fue de 0.76 N, de forma que teniendo en cuenta los datos de la Tabla 4.12, se observa que el tratamiento que redujo en mayor medida la dureza del jamón de pavo fue el llevado a cabo mediante HPU+DI (0.50 N). El resto de tratamientos no produjeron una modificación significativa ($p > 0.05$) de la dureza de las muestras, en comparación con las muestras control. Esto indica que los HPU aplicados en DI a presión atmosférica, donde la cavitación es máxima, fueron los responsables del reblandecimiento de las muestras de jamón de pavo.

Jamón curado

Los resultados de textura en jamón curado mostrados en la Tabla 4.12, revelaron que, todos los tratamientos considerados, produjeron una disminución significativa ($p < 0.05$) de la dureza de las muestras de jamón curado, en comparación con la F. máxima de la muestra control (4.97 N). Las muestras de jamón curado tratadas mediante FSC-CO₂+DI presentaron, en promedio, la menor dureza (3.04 N); no obstante, el análisis estadístico no reveló una diferencia significativa ($p > 0.05$) entre este tratamiento y los tratamientos mediante FSC-CO₂ (3.60 N), HPU+DI (3.72 N) y FSC-CO₂+HPU+DI (3.52 N). Estos resultados indican que la combinación de FSC-CO₂ y DI es la que produce un mayor reblandecimiento en las muestras de pechuga de pollo y jamón curado. Esto sería debido al contacto de la DI sobre la superficie de la muestra

que favorecería su reblandecimiento. Este efecto no es apreciable en los tratamientos de FSC-CO₂+HPU+DI dado que la agitación producida por los HPU hace que la muestra esté fundamentalmente en contacto con una mezcla de FSC-CO₂ y DI.

Tabla 4.12 Valores de Fuerza máxima (F. máxima) de las matrices cárnicas sin tratar (control) y tratadas mediante diferentes tipos de tratamiento.

Tipo de Tratamiento	Pechuga de pollo (N)	Jamón de pavo (N)	Jamón curado (N)
Control	4.26±0.17 ^d	0.76±0.05 ^{bc}	4.97±0.24 ^c
FSC-CO ₂	3.84±0.16 ^c	0.63±0.05 ^{ab}	3.60±0.26 ^{ab}
FSC-CO ₂ +HPU	2.53±0.16 ^a	0.72±0.05 ^{bc}	3.78±0.24 ^b
FSC-CO ₂ +DI	2.49±0.16 ^a	0.80±0.05 ^c	3.04±0.24 ^a
FSC-CO ₂ +HPU+DI	3.94±0.20 ^{cd}	0.75±0.05 ^{bc}	3.52±0.24 ^{ab}
HPU+DI	3.26±22 ^b	0.50±0.08 ^a	3.72±0.24 ^{ab}

Los superíndices (a, b, c, d) muestran grupos homogéneos establecidos de intervalos LSD (least significance difference) para p<0.05, para cada tipo de producto cárnico.

Discusión sobre los cambios de textura en las diferentes muestras cárnicas

Los estudios llevados a cabo para analizar el efecto de los FSC-CO₂ y los HPU sobre la textura de matrices alimentarias sólidas, se pueden diferenciar de acuerdo a los efectos generados por cada técnica de forma individual y mediante la aplicación simultánea de ambas técnicas.

Empleando FSC-CO₂ destacan los estudios realizados en productos vegetales como pera, coco y zanahoria (Valverde y col., 2010; Ferrentino y col., 2013a; Spilimbergo y col., 2013); en carne fresca (Choi y col., 2008) y productos cárnicos (Ferrentino y col., 2013c). En todos ellos, la mayoría de los investigadores resaltan que la aplicación de FSC-CO₂ afecta significativamente la textura de las matrices, a excepción del estudio realizado por Choi y col. (2008), quienes no observaron un reblandecimiento en la textura de la muestra de carne de cerdo tras el tratamiento con FSC-CO₂.

En cuanto al efecto mecánico de los HPU sobre los atributos de calidad en muestras sólidas, hay varios estudios llevados a cabo en muestras cárnicas, con el objetivo primordial de reblandecer el tejido muscular, mejorar su calidad y desarrollar propiedades sensoriales particulares (Pohlman y col., 1997a; Got y col., 1999; Jayasooriya y col., 2007).

Respecto a la aplicación del tratamiento combinado mediante FSC-CO₂ y HPU solo hay un estudio realizado por Ferrentino y Spilimbergo, (2015), en el cual los autores observaron una disminución de 92% en la dureza de muestras de zanahoria tras el tratamiento con FSC-CO₂+HPU (120 bar, 40 °C, 5 min; 10 W); no obstante, los resultados obtenidos por estos autores son de difícil comparación con los de este trabajo, debido a la diferente naturaleza de las matrices.

Los resultados de textura en las muestras de **pechuga de pollo** revelaron que los tratamientos mediante FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU, FSC-CO₂+DI y aplicación de sólo HPU+DI, redujeron significativamente ($p<0.05$) la dureza de las muestras de pollo control.

Las características de la textura de la carne fresca puede ser atribuida a dos componentes principales en el músculo: la fracción miofibrilar y la fracción de tejido conectivo (Pohlman y col., 1997a). La desnaturalización de las proteínas miofibrilares, está influenciada por cambios causados por métodos mecánicos, como el uso de HPU, o métodos químicos, en los cuales se regula la actividad enzimática, principalmente calpaína, modificando la concentración de iones de calcio en el retículo sarcoplasmático y favoreciendo la disminución de la dureza de la carne. Por otra parte, el tejido conectivo, contiene principalmente colágeno y elastina, siendo la concentración de colágeno el constituyente principal, ya que su solubilidad por calentamiento, y conversión a gelatina, promueve una menor dureza de la carne (Torrescano y col., 2003; Lepetit y col., 2008; Chang y col., 2012)

Respecto al efecto de los FSC-CO₂, la mayoría de los estudios realizados sobre la textura de muestras sólidas, se han llevado a cabo sobre matrices vegetales, en las cuales, la presión ha mostrado ser un factor determinante para disminuir

significativamente su firmeza (Valverde y col., 2010; Spilimbergo y col., 2013). Sin embargo, los estudios encontrados sobre la aplicación de FSC-CO₂ en matrices cárnicas, no han mostrado resultados concluyentes sobre el efecto en la textura de la muestra.

Estudios realizados con carne refrigerada en atmósferas ricas en CO₂ como técnica de conservación, indican que una disminución del pH debido a la disociación del CO₂ (Jacobsen y Bertelsen, 2002), está asociada a la obtención de un producto con menor dureza (Huff-Lonergan y col., 2002; Meurehg, 2006). Sin embargo, Choi y col., (2008), quienes estudiaron la aplicación de FSC-CO₂ (152 bar 31.1 °C, 10 min) sobre lomo de cerdo, no observaron una disminución significativa en la dureza de la carne.

Tal y como se ha descrito en el Apartado 1 de resultados, empleando FSC-CO₂ sobre las muestras cárnicas a temperaturas superiores de 41 °C, el CO₂ puede difundirse con mayor facilidad, interactuar con los componentes afines, solubilizarse en el agua disponible y bajar el pH. Esta disminución del pH, puede ser asociada entre otros efectos, a una desnaturalización proteica debido a la ruptura de los enlaces covalentes del colágeno unidos a péptidos específicos (Lepetit y col. 2008), que conlleva una disminución en la textura de la carne (Ji y col., 2012).

Asimismo, los tratamientos con FSC-CO₂ pueden afectar a la textura de la muestra por el efecto de la presurización y despresurización de la carne, que conlleva una entrada de FSC-CO₂ y la salida rápida de CO₂ gas de la muestra, pudiendo afectar a la estructura de la misma.

Por otra parte, cuando los HPU son aplicados por sí solos (HPU+DI), la dureza de la muestras cárnicas (3.26 N) disminuye significativamente. No obstante, los efectos generados por los HPU sobre las muestras de pechuga de pollo en el presente estudio, dependen del tipo de medio de propagación considerado, medio líquido o medio supercrítico.

Los efectos de los HPU en un medio supercrítico, han sido estudiados principalmente en procesos de extracción, y están relacionados con un efecto esponja, ejerciendo una

compresión y descompresión de la matriz que puede terminar en una ruptura de los tejidos (Rodríguez y col., 2014). En consecuencia, puede provocar una disminución en la dureza, como es el caso del presente estudio. La disminución en la dureza de la carne observada en el presente estudio podría deberse también a una mayor penetración del FSC-CO₂ en la matriz cárnica, como consecuencia de la agitación mecánica producida por los HPU, lo que daría lugar a una mayor desnaturalización proteica.

Cuando los HPU se propagan en un medio líquido, como en el caso de los tratamientos mediante HPU+DI en la presente Tesis, los efectos generados por los HPU sobre la matriz cárnica como por ejemplo la disminución de la dureza, son atribuidos a efectos mecánicos. El fenómeno principal es la cavitación transitoria (Jayasooriya y col., 2007), en la cual se forman burbujas de larga duración y cavidades, que crecen lentamente y oscilan dentro del medio y matriz cárnica, ocasionando grandes esfuerzos de corte y cizallamiento sobre el tejido de la muestra, en consecuencia, se generan elevaciones de temperatura y presión puntuales. Estos puntos de calentamiento sobre la muestra, pueden disociar enlaces moleculares (Dickens y col., 1991), solubilizar fracciones de miosina (Zayas, 1997), producir radicales libres y tras el colapso producido por la burbuja de cavitación, pueden dañar la integridad de las fibras musculares y provocar el reblandecimiento de la carne (Got y col., 1999).

Asimismo, se ha estudiado que la aplicación de HPU sobre distintos tipos de músculos de carne de ternera, mejora sus parámetros tecnológicos, como son, el color, la textura y la capacidad de retención de agua, lo que conlleva una menor pérdida tras el cocinado (Jayasooriya y col., 2007).

A partir de los efectos descritos previamente, se puede concluir que la muestra de pechuga de pollo, tratada mediante FSC-CO₂+HPU+DI puede ser una alternativa para la elaboración de nuevos productos cárnicos pre-cocinados y listos para consumo, donde la aplicación de FSC-CO₂+HPU ofrezca efectos sobre las proteínas similares al proceso de cocción, sin necesidad de emplear temperaturas tan altas que disminuyan la calidad organoléptica y nutricional del producto cárnico.

A diferencia de la pechuga de pollo, el jamón de pavo es un producto procesado que ha recibido un tratamiento térmico previo durante su elaboración. Esto le confiere una estructura más homogénea y compacta. La textura del **jamón de pavo** depende en general, de su composición, tiempo de calentamiento/enfriamiento durante su elaboración, contenido de humedad final, grado de proteólisis alcanzado y el contenido de tejido conectivo. Además, el tipo de almidón añadido puede variar en su grado de pre-gelatinización como emulsionante y formar retículos que impartirán una determinada estabilidad a la estructura del jamón durante su procesamiento y en consecuencia, afectará a los principales parámetros tecnológicos del producto final, como son la textura, el grado de retención de agua y la sensación en boca durante su consumo (Toldrá y col., 2010).

En este sentido, los resultados obtenidos en el presente trabajo, mostraron que ninguno de los sistemas de tratamiento mediante FSC-CO₂, afectaron significativamente la dureza del jamón de pavo. Por tanto, se puede concluir que, el FSC-CO₂ no produce un cambio textural en las muestras, al igual que sucedía con el color, ya que al ser un producto cocido, donde ya se ha producido una desnaturalización proteica inducida por el tratamiento térmico, la posible disminución del pH producida por el contacto con el FSC-CO₂ disuelto, no tiene efecto sobre la matriz cárnica. Estos resultados son comparables a los obtenidos por Ferrentino y col. (2013c), quienes tampoco observaron diferencias texturales en muestras de jamón cocido tras 5 min de tratamiento mediante FSC-CO₂ (120 bar, 50 °C)

Por otro lado, los HPU afectan a la textura únicamente en DI y sin FSC-CO₂, lo que es debido al mayor efecto de la cavitación en estas condiciones que cuando se aplican en un medio con únicamente FSC-CO₂ o FSC-CO₂+DI, como ya se demostró en el Apartado 1 de resultados, mediante los ensayos sobre papel de aluminio. En este sentido, Dolatowski y col. (1989) observaron que la aplicación de HPU durante el proceso de elaboración de un producto cocido a base de carne de caballo inmerso en una salmuera, disminuyó significativamente la dureza, aportando mayor jugosidad del producto final, respecto al producto elaborado por un método de salado tradicional.

Estos autores atribuyeron este efecto a la disrupción de células del tejido muscular y la subsecuente extracción de una fracción de las proteínas miofibrilares y otros elementos estructurales. Asimismo, la aplicación de HPU puede acelerar la actividad de las enzimas proteolíticas en respuesta a las vibraciones generadas y la cavitación dentro de la matriz (Dolatowski y col., 1989; Balachandran y col., 2006; Zhang y col., 2009).

Respecto a las muestras de **jamón curado**, se observó que todos los sistemas de tratamiento estudiados, disminuyeron significativamente, la dureza de la muestra control.

Los resultados de textura en jamón curado obtenidos en el presente trabajo, tras el tratamiento con FSC-CO₂, son comparables con los obtenidos por Ferrentino y col. (2013b) quienes encontraron que la dureza observada en muestras de jamón curado tratadas mediante FSC-CO₂ (120 bar, 45 °C, 30 min) fue menor que en las muestras que no recibieron tratamiento (muestras control), asociando esta disminución en la dureza del jamón curado, a los cambios generados durante la presurización y despresurización del CO₂. Por contra, Spilimbergo y col. (2014), observaron que muestras de jamón curado tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (120 bar, 35 °C, 5 min, 10 W) presentaron una mayor dureza que la muestra control.

Las diferencias entre el efecto obtenido en el presente trabajo, por la aplicación de FSC-CO₂+HPU (250 bar, 46 °C, 10 min; 42±5 W), sobre la textura de las muestras de jamón curado, y el efecto observado por Spilimbergo y col. (2014), puede deberse tanto a factores del tratamiento, temperatura y potencias usadas, como a los parámetros intrínsecos del jamón curado, como tipo de músculo y composición.

Por otra parte, existe discrepancia en cuanto al efecto de los HPU sobre la calidad de la carne. Por un lado se ha evaluado que el uso de HPU a baja frecuencia y alta potencia (24 kHz, 12 W/cm²) tiene la capacidad de inducir una alteración en las membranas de las células del tejido muscular (fibras musculares) y contribuir a la “tenderización” de la carne (Pohlman y col., 1997b; Got y col., 1999; Jayasooriya y col., 2007). Sin embargo, otros investigadores han llegado a concluir que los HPU no provocan

reblandecimiento de la carne, lo cual puede atribuirse al uso de una baja intensidad de ultrasonidos (1.5 W/cm²) (Pohlman y col., 1997a) o bien, al uso de alta intensidad de ultrasonidos (62 W/cm²), en tiempos tan cortos, que son insuficientes para inducir la tenderización (Lyng y col., 1997).

En el presente trabajo dado que la textura de los tratamientos mediante FSC-CO₂ es similar a la de FSC-CO₂+HPU, se puede concluir que el efecto de reblandecimiento es debido a los efectos del FSC-CO₂ y no tanto al efecto mecánico producido por los HPU en el medio supercrítico. Esto sería debido a que los efectos de los HPU, tales como la cavitación, se ven limitados en presencia de un medio supercrítico como es el FSC-CO₂, tal y como se demostró en el apartado 4.1 con las pruebas sobre papel de aluminio.

4.3.3. Humedad

La Tabla 4.13 muestra la humedad (% b. h.) de las muestras cárnicas, tanto para las muestras control, como para las muestras procesadas mediante los diferentes tratamientos ensayados.

Pechuga de pollo

El contenido de agua promedio en la muestra control fue de 75.35% (b. h.). Todos los tratamientos, excepto los llevados a cabo con FSC-CO₂+DI y HPU+DI, generaron una disminución significativa ($p < 0.05$) de la humedad. Los tratamientos que generaron una mayor disminución de la humedad fueron mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU con un contenido de humedad de 68.29 % (b. h.) y 67.95 % (b. h.), respectivamente, sin mostrar diferencia significativa ($p > 0.05$) entre ambos tratamientos.

Jamón de pavo

El análisis estadístico reveló que el único tratamiento que provocó una variación significativa de la humedad de las muestras de jamón de pavo fue el llevado a cabo mediante FSC-CO₂+HPU+DI, el cual aumentó significativamente ($p < 0.05$) el contenido de agua de las muestras (76.55%, en comparación a 73.44 % de las muestras control).

Jamón curado

Empleando jamón curado como matriz cárnica, únicamente se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de la humedad de las muestras tras el tratamiento con FSC-CO₂; el resto de tratamientos, no modificaron significativamente el contenido de agua de las muestras control.

Tabla 4.13 Contenido de agua en las muestras cárnicas sin tratar (control) y muestras tratadas mediante los distintos tratamientos.

Tipo de Tratamiento	Pechuga de pollo* % humedad (b. h.)	Jamón de pavo* % humedad (b. h.)	Jamón curado* % humedad (b. h.)
Control	75.35±1.17 ^c	73.44±0.53 ^{ab}	47.36±1.22 ^b
FSC-CO ₂	68.29±0.74 ^a	73.49±0.49 ^{ab}	43.46±1.46 ^a
FSC-CO ₂ +HPU	67.95±1.35 ^a	72.54±0.53 ^a	44.03±1.46 ^{ab}
FSC-CO ₂ +DI	72.62±1.35 ^{bc}	74.55±0.49 ^b	46.56±2.74 ^{ab}
FSC-CO ₂ +HPU+DI	72.13±0.74 ^b	76.55±0.53 ^c	45.25±1.46 ^b
HPU+DI	73.13±1.04 ^{bc}	74.66±0.44 ^b	44.82±1.53 ^{ab}

* g agua/100 g de carne húmeda. Los superíndices (a, b, c, d) muestran grupos homogéneos establecidos de intervalos LSD (least significance difference) para $p < 0.05$, para cada tipo de producto cárnico.

Discusión sobre los cambios de humedad en las diferentes muestras cárnicas

El contenido de agua en la carne es un factor de calidad que indica jugosidad, por tanto mantener el contenido de agua de la carne fresca durante su procesamiento es un factor primordial (Toldrá, 2010).

En las muestras de **pechuga de pollo**, todos los tratamientos disminuyeron el contenido de humedad promedio de la muestra control. Estas diferencias fueron significativamente ($p < 0.05$) mayores, tras los tratamientos con FSC-CO₂, FSC-CO₂+HPU. Estos resultados indican que el uso de FSC-CO₂ favorece el proceso de deshidratación de las muestras.

Se ha demostrado que la aplicación de FSC-CO₂ provoca la reducción en el contenido de agua en muestras de carne fresca, debido a la desnaturalización de las proteínas de

la carne. No obstante, las proteínas claves durante la desnaturalización difieren de un estudio a otro. Choi y col. (2008) demostraron que la aplicación de FSC-CO₂ (152 bar, 31.1 °C, 10 min) sobre muestras de lomo de cerdo, provocan una pérdida de peso del 5.7 % tras el tratamiento. Estos autores asociación la pérdida de agua en las muestras, a un alto grado de desnaturalización en las proteínas sarcoplasmáticas, las cuales se solubilizaron y precipitaron tras 10 min de tratamiento con FSC-CO₂, sin observar diferencias entre las diferentes condiciones de presión usadas, 74 y 152 bar (31.1 °C). Sin embargo, otros autores indican que, siendo que la miosina constituye el 45% de las proteínas miofibrilares y es la principal proteína estructural del músculo (Choi y col., 2006), su desnaturalización podría contribuir en cierta medida a la exudación y pérdida de agua.

En este sentido, Szerman y col. (2014) observaron una pérdida de agua en salchichas de cordero tras 30 min de tratamiento mediante FSC-CO₂ (200 bar, 60 °C). Estos autores atribuyeron la pérdida de agua, a modificaciones en la conformación de las proteínas miofibrilares durante el tratamiento.

Por tanto, la disminución de la humedad de las muestras de pechuga de pollo observada en el presente trabajo tras los distintos tratamientos con FSC-CO₂ estudiados, está en la línea de los trabajos encontrados en bibliografía, que atribuyen la pérdida de agua a la desnaturalización de las proteínas, que también afectaron al color y la textura de la carne.

Por otra parte, se observó que la humedad en las muestras de **jamón de pavo** sólo varió significativamente tras el tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI (150 bar, 46 °C, 10 min) provocando un ligero aumento del 1.6 % respecto al valor de la muestra control.

Este aumento en el contenido de agua en la muestra de jamón de pavo, está en la línea de lo encontrado por Pohlman y col. (1997b), quienes sumergieron trozos de carne en un baño con ultrasonidos (70 °C, 24 kHz) con el objetivo de asistir su proceso de cocción. Estos autores encontraron un aumento en el peso de las muestras tras el tratamiento y una mayor capacidad de retención de agua en las mismas, en comparación a la muestra cocinada sin HPU.

En este sentido, se ha evaluado que, la concentración de la disolución donde las muestras son sumergidas y la intensidad de ultrasonidos aplicada durante los procesos osmóticos, son factores clave que pueden determinar la dirección del flujo de agua, provocando la deshidratación o hidratación de la muestra. Ozuna y col. (2014b), quienes estudiaron la aplicación de HPU a presión atmosférica y temperatura ambiente (37.5 W/dm^3 , 40 kHz, 120 min) sobre láminas de lomo de cerdo sumergidas en salmuera, observaron que las muestras ganaban agua. Estos autores atribuyeron esta retención de agua a que, dada la baja concentración de sal en la solución (<5 % NaCl) aumenta la repulsión electrostática entre los filamentos miofibrilares, causando una expansión del entramado filamentosos, atrapando el agua en su interior.

Al igual que en las muestras de pechuga de pollo, la humedad en las muestras de **jamón curado**, disminuyó significativamente ($p < 0.05$), tras la aplicación de FSC-CO₂, lo que podría deberse a la capacidad extractiva del FSC-CO₂.

4.3.4. Grasa

La Tabla 4.14 muestra el contenido de grasa (% b. h.) de las muestras cárnicas antes y después de cada tipo de tratamiento.

Pechuga de pollo

El contenido de grasa de las muestras de pechuga de pollo control fue de 6.09% (b. h.). De todos los tratamientos aplicados, únicamente el llevado a cabo con FSC-CO₂+HPU (Tabla 4.14) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el contenido de grasa a 2.46% (b. h.), en comparación a la muestra control. El resto de tratamientos no redujo significativamente el contenido en grasa de las muestras de pollo.

Jamón de pavo

Los resultados mostrados en la Tabla 4.14 revelan que ninguno de los tratamientos aplicados mostró un efecto significativo ($p > 0.05$) sobre el contenido de grasa en las muestras de pavo control (2.25 % b. h.).

Jamón curado

La Tabla 4.14 revela que, en general, los tratamientos aplicados sobre el jamón curado redujeron significativamente ($p < 0.05$) el contenido de grasa promedio de la muestra, en comparación al % de grasa que presentó la muestra control (9.89 %).

Tabla 4.14 Contenido en grasa en las muestras cárnicas sin tratar y muestras tratadas mediante los diferentes tratamientos.

Tipo de Tratamiento	Pechuga de pollo* % grasa (b. h.)	Jamón de pavo* % grasa (b. h.)	Jamón curado* % grasa (b. h.)
Control	6.09±2.96 ^b	2.25±0.11 ^a	9.89±3.66 ^c
FSC-CO ₂	3.025±0.90 ^{ab}	2.08±0.12 ^a	5.89±0.97 ^{ab}
FSC-CO ₂ +HPU	2.46±1.14 ^a	2.04±0.13 ^a	5.30±1.92 ^a
FSC-CO ₂ +DI	4.92±1.13 ^{ab}	2.07±0.12 ^a	5.09±1.46 ^{ab}
FSC-CO ₂ +HPU+DI	6.20±3.12 ^b	2.11±0.12 ^a	8.32±1.74 ^{bc}
HPU+DI	4.22±3.45 ^{ab}	2.26 ±0.15 ^a	5.39±0.85 ^{ab}

* g grasa/100 g carne húmeda. Las distintas condiciones usadas en los tratamientos con FSC-CO₂ variaron de acuerdo al tipo de muestra.

Los superíndices (a, b, c) muestran grupos homogéneos establecidos de intervalos LSD (least significance difference) para $p < 0.05$, en cada tipo de producto cárnico.

Discusión sobre los cambios de contenido graso en las diferentes muestras cárnicas

Inicialmente se partió de tres matrices diferentes con distintos % de grasa, 6.09, 2.25 y 9.89 % para la pechuga de pollo, jamón de pavo y jamón curado, respectivamente. Los resultados mostrados en la Tabla 4.14 muestran que en general, el tratamiento de FSC-CO₂+HPU es el que genera mayor reducción del contenido de grasa tanto en pechuga de pollo como en jamón curado.

En muestras de pechuga de pollo, la aplicación de sólo FSC-CO₂ redujo el contenido de grasa promedio de 6.09 % presente en la muestra control, a 3.025 % en la muestra tratada. Sin embargo, empleando FSC-CO₂+HPU, el contenido de grasa obtenido fue significativamente ($p < 0.05$) menor (2.46 %).

La disminución de grasa mediante los tratamientos con FSC-CO₂ podría estar asociado a la gran capacidad del CO₂ en estado supercrítico para extraer grasas y compuestos apolares. Este efecto ha sido estudiado por Ferrentino y col. (2013) sobre muestras de coco. Estos autores redujeron un 2 % el contenido en grasa de las muestras tras un tratamiento con FSC-CO₂ (120 bar, 40°C, 30 min), en comparación al contenido de grasa en la muestra control. Los autores atribuyeron este comportamiento a la alta afinidad del CO₂ por sustancias lipofílicas y al alto poder de extracción que presenta en su fase supercrítica. De hecho, los primeros estudios sobre la aplicación de FSC-CO₂ en matrices cárnicas se llevaron a cabo con el objetivo principal de la extracción de grasas. Chao y col. (1991), encontraron que el empleo de una alta presión (310 bar) y temperatura (50 °C) de tratamiento mediante FSC-CO₂ sobre carne de cerdo molida, permitía obtener una disminución de grasa significativa, siendo la presión un factor clave para aumentar la extracción lipídica.

En el presente trabajo, todos los tratamientos con FSC-CO₂ permitieron reducir el % de grasa de las muestras de pechuga de pollo y jamón curado, sin embargo no consiguieron disminuir el % de grasa del jamón de pavo. Esto podría deberse al bajo contenido en grasa del jamón de pavo, lo que dificultaría los mecanismos por los cuales el CO₂ podría interaccionar con la grasa de las muestras y extraerlas.

Por otro lado, al aplicar HPU al tratamiento con FSC-CO₂, la reducción del % de grasa se incrementó tanto para las muestras de pechuga de pollo como de jamón curado, lo que sería debido a la mejora en los fenómenos de transferencia de materia, permitiendo al CO₂ difundirse más rápidamente en la matriz y favoreciendo la salida de los compuestos grasos. En este sentido, se ha demostrado que los HPU generan un efecto esponja, que puede favorecer la salida de compuestos de las matrices sometidas al campo acústico (Cárcel y col., 2007).

Además, cabe destacar que en los tratamientos en los que se adicionó DI, se observó una reducción del % de grasa menor que la de los tratamientos sin DI. Esto podría ser debido a que la presencia de la DI obstaculiza la capacidad de extracción del CO₂ presente en el sistema por la falta de afinidad entre el agua de la DI y la grasa.

El efecto del tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU sobre el contenido en grasa de matrices cárnicas no ha sido estudiado hasta la fecha. Sin embargo, si se ha aplicado en otras matrices alimentarias para procesos de extracción. En dichos procesos, el CO₂ es usado como solvente por su alta capacidad de extracción de grasas o sustancias lipofílicas de interés y con polaridad similar al CO₂. Un ejemplo de ello, es el estudio realizado por Rodríguez y col. (2014) quienes compararon la extracción de manteca en muestras de cacao, mediante FSC-CO₂ (450 – 550 bar; 40 °C), asistido o no con HPU (58±9 W). Los autores encontraron que al aplicar HPU se aumentó significativamente el rendimiento de la extracción, obteniendo 0.26 g de manteca de cacao/g s.s. mediante FSC-CO₂, comparado con 0.32g de manteca de cacao/g s.s. mediante FSC-CO₂+HPU. Los autores atribuyeron este alto rendimiento a que la aplicación de HPU durante el proceso de extracción con FSC-CO₂, provoca una mayor ruptura de las estructuras celulares que favorece tanto la difusión del CO₂ al interior de matriz, como la extracción del componente de interés.

Por otro lado, los resultados mostraron que cuando el tratamiento combinado de FSC-CO₂+HPU fue aplicado sobre las muestras sumergidas en DI, se obtuvo la menor extracción de grasa. En este sentido, los primeros estudios sobre la extracción de lípidos y colesterol mediante FSC-CO₂ realizados por King y col. (1989) y Chao y col. (1991) revelaron que la eficiencia en el proceso de extracción de grasa en músculos de carne frescos, es muy limitada, debido principalmente al alto contenido de humedad, lo cual es una barrera a la penetración del CO₂.

Dada la importancia que hoy en día tiene una alimentación sana, el hecho de reducir el contenido de grasa en productos cárnicos puede ser de gran interés para la industria cárnica.

4.3.5. Microestructura

Se realizó un estudio de la microestructura de las matrices cárnicas consideradas (controles y tratadas) mediante microscopia electrónica de barrido (SEM), con el objetivo de analizar el efecto de los distintos sistemas de tratamiento con FSC-CO₂ y HPU sobre la estructura del producto, y su posible repercusión sobre la textura del mismo.

Pechuga de pollo

Para el caso de las muestras de pechuga de pollo, se analizó el efecto de los tratamientos con FSC-CO₂, HPU+DI y la técnica combinada FSC-CO₂+HPU+DI. Los tratamientos mediante FSC-CO₂ fueron llevados a cabo durante 20 min a 250 bar y 46 °C. En los tratamientos que incluyen HPU, las condiciones empleadas fueron (24 kHz, 40 W ± 5 W).

La Figura 4.20 muestra un corte de la zona superficial de las pechugas de pollo. La Figura 4.20-A, se corresponde con la muestra sin tratar, en la cual se puede observar como el tejido conectivo cubre totalmente las fibras musculares, tal y como sucede en la carne fresca de pollo (Wattanachant y col., 2005). El diámetro de las fibras en la muestra control es de 46±0.6 µm. Este diámetro coincide con el observado por otros autores el cual varía entre 32 µm (Smith y col., 1993) y 38 a 46 µm (Smith y Fletcher, 1988). Esta variación en el diámetro de las fibras puede ser debida a la edad de los animales y al grado de retracción de los sarcómeros de acuerdo a la velocidad de rigor-mortis (Smith y Fletcher, 1988).

El resto de las micrográficas revelan las alteraciones en la estructura del tejido conectivo provocadas por el tratamiento aplicado.

La Figura 4.20-B se corresponde a la muestra tratada mediante FSC-CO₂. En ella se observa la alteración y dispersión de la estructura del tejido conectivo. Esto puede estar asociado a la presión de FSC-CO₂ (250 bar) a la que fue sometida la muestra. El FSC-CO₂ penetra en el tejido cárnico, que es sometido a una alta presión;

posteriormente, al liberarse la presión, el CO₂ abandona rápidamente el tejido lo que puede provocar tensiones en la estructura muscular que den lugar a las alteraciones observadas en la micrografía. Por otro lado, el diámetro de las fibras musculares aumentó un 29 % respecto a las muestras control, observándose un diámetro promedio de las fibras de 59.4±1.6 µm tras el tratamiento con FSC-CO₂, lo que estaría asociado a la desnaturalización de las proteínas y a los efectos de la despresurización y liberación del CO₂. La alteración del tejido conectivo y la desnaturalización de las fibras son las que dan lugar a la pérdida de dureza de las muestras encontrada en el presente estudio (Tabla 4.12).

Algunos autores indican que el grado de deformación de las fibras musculares del pollo dependerá de la fuerza de compresión aplicada por las fibras de colágeno y la resistencia de las fibras musculares a dicha compresión, además del contenido de colágeno presente y su grado de solubilidad (Lepetit y col., 2000). En la raza de pollo broiler, como es el caso del pollo usado en la presente tesis, los músculos presentan un contenido de colágeno bajo y con un grado de solubilidad alto, por tanto, muestran una mayor facilidad para la expansión transversal de las fibras (Wattanachant y col., 2005a), lo que conlleva a un aumento en el diámetro de las mismas. En este sentido, Wattanachant y col. (2005a) observaron que, durante el proceso de cocinado de pechuga de pollo, las fibras musculares, aumentaban su diámetro hasta un 12.4%, debido principalmente a una desnaturalización parcial de las proteínas miofibrilares.

La Figura 4.20-C, representa la microestructura de muestras de pollo sometidas a HPU+DI (46 °C, 24 kHz, 42 W ± 5 W). El tratamiento mediante HPU+DI fue realizado con el fin de observar los efectos individuales provocados por los HPU en las propiedades estructurales de las muestras sin la presencia de FSC-CO₂. Tras el tratamiento con HPU+DI, se observó la desnaturalización del tejido conectivo provocando un entramado formado por las miofibrillas además de rupturas en las fibras musculares (Figura 4.20-C; b). Asimismo, se observó una disminución de un 21 % en el diámetro de las fibras, alcanzando un valor promedio de 36.4±13.9 µm tras el tratamiento con HPU y la pérdida de la estructura ordenada de las fibras unidas por el

tejido conectivo que presentaba la muestra control, mostrando un espacio entre fibras promedio de $23.7 \pm 8.2 \mu\text{m}$.

En este sentido, Ozuna y col. (2013) estudiaron los efectos tras 120 min de tratamiento con HPU (40 kHz, 37.5 W/dm^3), sobre la microestructura de muestras de carne de cerdo (*longissimus dorsi*), sumergidas en una solución salina (5 % de NaCl w/v; 5 °C). Los autores observaron que, los principales efectos causados por los HPU se centraban en las miofibrillas y la alteración y dispersión del tejido conectivo, al igual que en el presente trabajo (Figura 4.20-C). Estos autores indicaron que, los cambios ocasionados a nivel de miofibrilar podrían explicarse por la serie de compresiones y descompresiones (efecto esponja), inducidas por los HPU. Además, señalaron que la erosión mostrada en las fibras de carne, fue debida al fenómeno de cavitación, en el cual, la implosión de las burbujas cercanas a la superficie de la muestra sólida provocan microcorrientes de alta intensidad que colisionan violentamente sobre la superficie de la muestra.

En el caso de las muestras de pechuga de pollo del presente estudio, la cavitación intensa mostrada en el apartado 4.1 de resultados, da lugar a un cambio importante en la estructura de las fibras cárnicas (Figura 4.20-C), lo que a su vez puede relacionarse con la disminución de la dureza en las muestras de pollo tratadas con HPU+DI (Tabla 4.12).

La Figura 4.20-D. corresponde a la microestructura de las muestras de pollo que han sido sometidas al tratamiento de FSC-CO₂+HPU+DI. En ella se puede observar una degradación total del tejido conectivo, la formación de un entramado miofibrilar y la ruptura de algunas fibras (Figura 4.20-D). Además, se encontró un aumento del 15.4 % en el diámetro de las fibras (Figura 4.20-D; f) con respecto al diámetro de la muestra control (Figura 4.20-A; f), alcanzando un valor promedio de $53.1 \pm 4.4 \mu\text{m}$ tras el tratamiento. Este aumento es comparable al obtenido en las fibras tras el tratamiento con FSC-CO₂ (Figura 4.20-B; f) y es fundamentalmente debido a la expansión de las fibras provocada por el FSC-CO₂.

Así, el grado de daño sobre la estructura de la muestra puede estar asociado al tipo de tratamiento, ya sea el efecto individual provocado el FSC-CO₂ o por los HPU, o bien por el efecto asociado a la combinación de ambas técnicas.

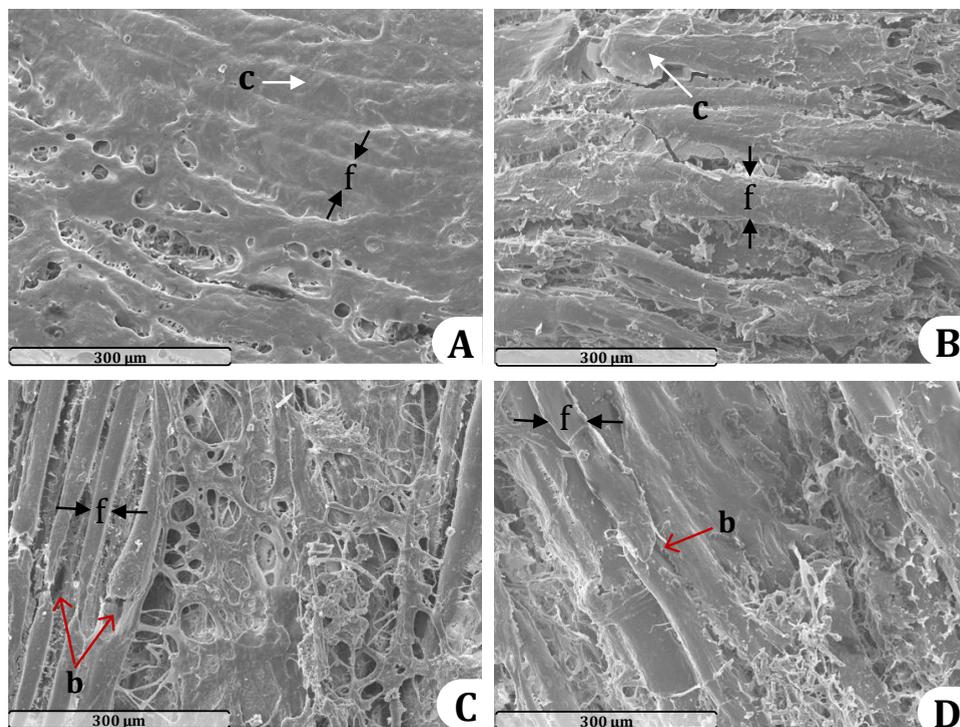


Figura 4.20 Microscopía electrónica de barrido de una sección longitudinal de muestras de pechuga de pollo. A. Muestra Control; B. Muestra tratada con FSC-CO₂; C. Muestra tratada con HPU+DI y D. Muestra tratada con FSC-CO₂+HPU+DI. b. Fisuras; c. Tejido conectivo. f. Fibras musculares.

Jamón de pavo

La Figura 4.21 muestra las micrografías obtenidas para las muestras control del jamón de pavo (Figuras 4.21-A y B) y las tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI (150 bar, 46 °C, 10 min; 42±5 W) obtenidas en dos cortes diferentes en la superficie de la muestra: la zona central (Figuras 4.21-C y D) donde se concentra la mayor parte de energía acústica proveniente del sonotrodo y la zona del extremo de la muestra (Figuras 4.21-E y F).

Las muestras control (Figuras 4.21-A y B), presentan una estructura de gel característica de las formulaciones cárnicas de este tipo (Carballo y col., 1996), con un espacio de red de $51.4 \pm 2.1 \mu\text{m}$. Esta red está formada por filamentos de colágeno que son entrelazados entre sí durante el tratamiento térmico que se lleva a cabo en la elaboración del jamón de pavo.

Por otro lado, la muestra de la zona central tratada con FSC-CO₂+HPU+DI (Figuras 4.21-C y D), presentó una estructura más cerrada con respecto a la estructura observada en la muestra control. Esto puede estar relacionado con el colapso parcial de la estructura del gel producido por los ciclos de compresión-descompresión generados por los HPU, de gran intensidad en la zona central de la muestra.

Por otro lado, las Figuras 4.21-E, y F, muestran la microestructura del gel de jamón de pavo formado tras el tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI en la periferia del cilindro de la muestra cárnica. Esta estructura, es menos compacta que las muestras de la zona central y presenta un gel con una matriz cárnica más hinchada, lo que sería debido a la expansión de la matriz por el efecto de la despresurización del CO₂. Además, a diferencia de las muestras control, se pueden observar una gran cantidad de agregados (Figura 4.21-a) sobre las cavidades del gel.

Durante el calentamiento, los gránulos de almidón se expanden ejerciendo presión sobre la matriz (Tabilo y Barbosa, 2004). Estos gránulos de almidón se hinchan formando gránulos esféricos y cristalinos, los cuales pueden ser percibidos fácilmente durante los estudios de microestructura ya que se mantienen separados de la matriz y en muchos casos se depositan en las cavidades del gel (Fernández y col., 1998). En este sentido, en la Figura 4.21-F, puede observarse claramente un gránulo de almidón expandido tras el tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI separado del resto de la matriz.

Finalmente, puede concluirse que los efectos asociados a los HPU como la cavitación pueden ser los responsables de los cambios en la estructura del gel en la zona central de las muestras, la expansión del gel estaría relacionada con la despresurización y salida del CO₂ de la matriz cárnica. Sin embargo estos cambios estructurales no fueron

suficientes para tener un efecto significativo sobre la textura de las muestras tratadas (Tabla 4.12).

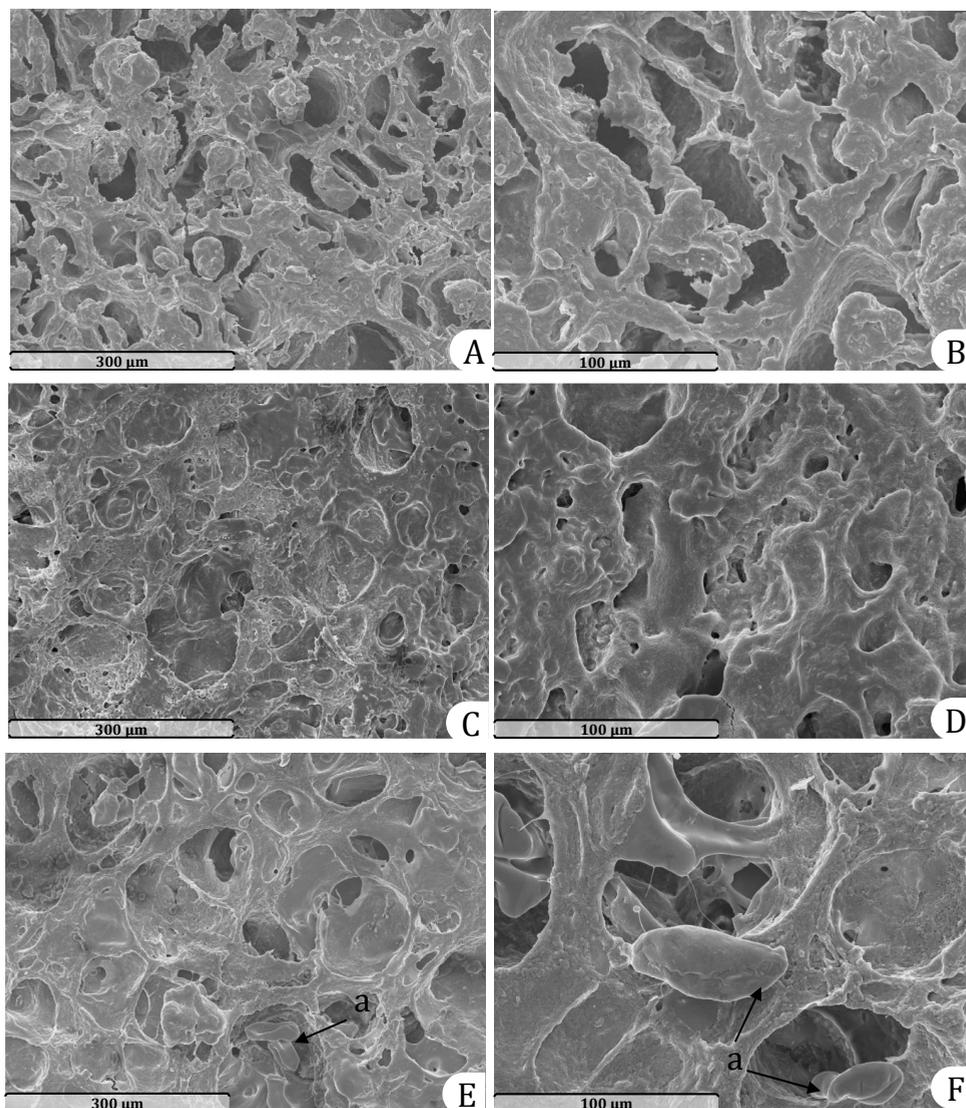


Figura 4.21 Muestras de jamón de pavo observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). A. 200x, Muestras control-sección central; B. 500x, Muestra control-sección central; C. 200x, Muestra tratada FSC-CO₂+HPU+DI-sección central; D. 500x, Muestra tratada FSC-CO₂+HPU+DI-sección central; E. 200x, Muestra tratada FSC-CO₂+HPU+DI-extremo y F. 500x, Muestra tratada FSC-CO₂+HPU+DI-extremo. a. Gránulo de almidón.

Jamón curado

La Figura 4.22 muestra las micrografías observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM), de una sección longitudinal de muestras de jamón curado control (Figura 4.22-A) y muestras tratadas mediante FSC-CO₂ (Figura 4.22-B), FSC-CO₂+HPU (Figura 4.22-C) y FSC-CO₂+HPU+DI (Figura 4.22-D). Las condiciones del FSC-CO₂ usadas en todos los tratamientos fueron 250 bar, 46 °C durante 10 min. Las condiciones de los tratamientos que incluyeron HPU fueron: 24 kHz, 42±5 W.

El diámetro promedio de las fibras en la muestra control fue de 47.3±5.3 µm. La estructura del jamón curado consiste en un paquete de fibras estrechamente unidas, rodeadas de un tejido conectivo endomisial que apenas es apreciable. Este grado de compactación de las fibras musculares, dependerá del tipo de musculo, siendo más compacto para el tejido semimembranoso, debido al mayor nivel de deshidratación, en comparación al musculo *bicep femoris*. Las proteínas miofibrilares en el jamón curado, tienen una apariencia característica de un gel proteico, que es atribuida al proceso de proteólisis en las últimas etapas de la elaboración del jamón curado. Este proceso conlleva la pérdida de agua, y en consecuencia un encogimiento de la estructura y menor espacio interfibrilar (Vestergaard y col., 2005).

La Figura 4.22-B presenta la micrografía de muestras de jamón curado tras 10 min de tratamiento mediante FSC-CO₂ (250 bar, 46 °C). El paquete de fibras musculares muestra un alto grado de compactación, similar al de la muestras control, mostrando un diámetro promedio de 43.3±4.3 µm.

Sin embargo, empleando FSC-CO₂+HPU (Figura 4.22-C), se observa que el tejido conectivo se ve afectado, perdiendo el nivel de compactación de las muestras control. En consecuencia, se observan fibras más hinchadas y un mayor espacio interfibrilar. El diámetro promedio de las fibras (56.3±1.03 µm) aumentó significativamente (p<0.05) en comparación al diámetro promedio observado en la muestra control. Esto puede estar relacionado con la alternancia de compresiones y descompresiones inducidas por los HPU en materiales sólidos, mediante el fenómeno denominado “efecto esponja” (Ozuna y col. 2013) y a la salida rápida del CO₂ tras la despresurización. El

efecto de hinchamiento en las fibras de jamón curado es menor que en el caso del pollo ya que en este último caso, al efecto mecánico de los HPU se une la desnaturalización de las proteínas de la carne fresca debido a la disminución del pH.

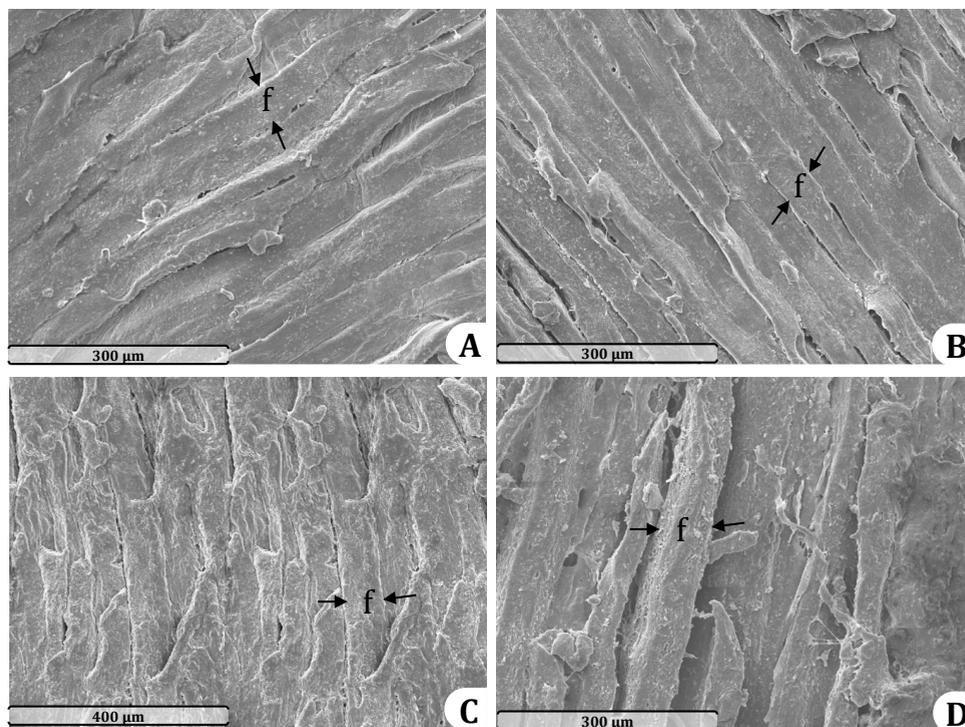


Figura 4.22 Sección longitudinal de la superficie de muestras de jamón curado observadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). A. 200x, Muestra Control; B. 200x, Muestras tratadas mediante FSC-CO₂ (250 bar, 46 °C, 10 min); C. 150x Muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU y D. 200x, Muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI. f. Fibras musculares.

Por otra parte, cuando se aplica FSC-CO₂+HPU+DI (Figura 4.22-D), el paquete de fibras musculares se expandió, presentando un diámetro promedio de $53.8 \pm 5.3 \mu\text{m}$. El tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU+DI puede ser comparable, con los trabajos realizados por algunos autores en procesos de salado y desalado de carne (Ozuna y col., 2013; Ozuna y col., 2014b). En este sentido, Ozuna y col. (2013) observaron que el proceso de salado de lomo de cerdo asistido por HPU, empleando soluciones diluidas de salmuera (5 % de NaCl), provocó la hidratación de la muestra y expansión de las

miofibrillas. Por tanto, el aumento del diámetro de las fibras, hace pensar que los tratamientos afectan a la estructura del tejido muscular, lo que resulta en una disminución de la dureza, tal y como se refleja en la Tabla 4.12. En este sentido, Ozuna y col. (2014b) también observaron un aumento en el diámetro de las fibras de bacalao tras 180 min de tratamiento de desalado asistido mediante HPU (40 kHz, 750 W). Estos autores señalaron que este hinchamiento fue generado por el estrés mecánico inducido por los HPU sobre el tejido conectivo lo que provocó una estructura más reblandecida.

Así pues, la técnica de SEM permitió observar el efecto provocado por los tratamientos aplicados (FSC-CO₂ y HPU) sobre la estructura del tejido conectivo y las miofibrillas de las muestras de carne.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estudio del almacenamiento de muestras cárnicas tratadas mediante
FSC-CO₂

Capítulo 4.4

4.4 Estudio del almacenamiento de muestras cárnicas

Los productos cárnicos, por su alto contenido en nutrientes, son un medio propicio para el crecimiento de microorganismos. Además, a pesar de las buenas prácticas de fabricación durante su elaboración, la manipulación y preparación en pequeñas porciones de productos listos para consumo (RTE), o bien, alimentos con tiempos mínimos de cocinado, pueden involucrar un alto riesgo de contaminación (Hierro y col., 2011).

El tiempo de vida útil de la mayoría de los productos cárnicos viene establecido por una combinación de parámetros fisicoquímicos como pH, actividad de agua, color, textura, y microbiológicos. En estos últimos, se incluye el contenido de la microbiota inicial, y el control del crecimiento de la misma durante el tiempo de vida útil del alimento.

A partir de los datos obtenidos en los Apartados 1 y 3 del capítulo de Resultados y Discusión en la presente Tesis, se seleccionó para cada matriz de trabajo, el tratamiento combinado de FSC-CO₂+HPU con o sin DI, más adecuado en cada caso, mediante el cual se alcanzara un nivel de reducción de *E. coli* aceptable, al menos 3 ciclos-log (Apartado 1), sin alterar en exceso los parámetros físico-químicos de las matrices (Apartado 3).

Para muestras de pechuga de pollo se seleccionó el tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU+DI, con unas condiciones de tratamiento de 250 bar, 46 °C y 20 min. En el caso de las muestras de jamón de pavo y jamón curado, se usó el tratamiento de FSC-CO₂+HPU durante 10 min a 46 °C, empleando 150 y 250 bar para pavo y jamón, respectivamente. Tras cada tratamiento, las muestras se envasaron en bolsas estériles y se mantuvieron a 4 °C durante todo el almacenamiento hasta la fecha de análisis.

4.4.1. Color

Pechuga de pollo

La Figura 4.23 muestra la evolución de las coordenadas cromáticas (CIELab): L^* , a^* y b^* , analizadas sobre la superficie de las muestras de pechuga de pollo durante 30 días de almacenamiento a 4 °C. Los resultados muestran que, los parámetros de color de las muestras de pollo tratada con FSC-CO₂+HPU+DI, justo tras el tratamiento ($L^*=83.9$, $a^*=-0.9$ y $b^*=13.4$), aumentaron significativamente en comparación a las coordenadas de la muestra control ($L^*=64.6$, $a^*=-2.6$ y $b^*=5.7$), tal y como se observó en el estudio sobre el efecto del procesado con FSC-CO₂ sobre la calidad de las muestras (apartado 3). Este fenómeno fue atribuido a la desnaturalización de las proteínas sarcoplasmáticas, debida a la solubilización del CO₂ en la carne, lo que enmascara el color rojo del sarcoplasma y da la apariencia de carne cocinada.

Durante el estudio de almacenamiento, el valor de L^* (luminosidad) en las muestras control disminuyó significativamente ($p<0.05$) tras 10 días (55.3), Figura 4.23-A, manteniéndose constante hasta el final del almacenamiento (30 días). En las muestras tratadas se observó una disminución significativa ($p<0.05$) del valor de L^* tras 20 días de almacenamiento (80.7), manteniendo dicho valor durante todo el almacenamiento.

Durante el almacenamiento, el valor de a^* (Figura 4.23-B) de las muestras control aumentó significativamente ($p<0.5$), mientras que, el valor de a^* en la muestra tratada, se mantuvo sin cambios significativos ($p>0.05$). Por otro lado, el valor de b^* en las muestras control (Figura 4.23-C), aumentó significativamente ($p<0.05$) tras 20 días de almacenamiento (9.3). En cambio, el valor de b^* , medido en la muestra de pollo tratada, no mostro diferencias significativas ($p>0.05$) durante el almacenamiento.

Con el objetivo de evaluar si el tratamiento generó cambios visualmente apreciables, se determinó la variación global de color (ΔE) entre las coordenadas cromáticas medidas el primer día de almacenamiento (día 0) y las obtenidas el día seleccionado de análisis.

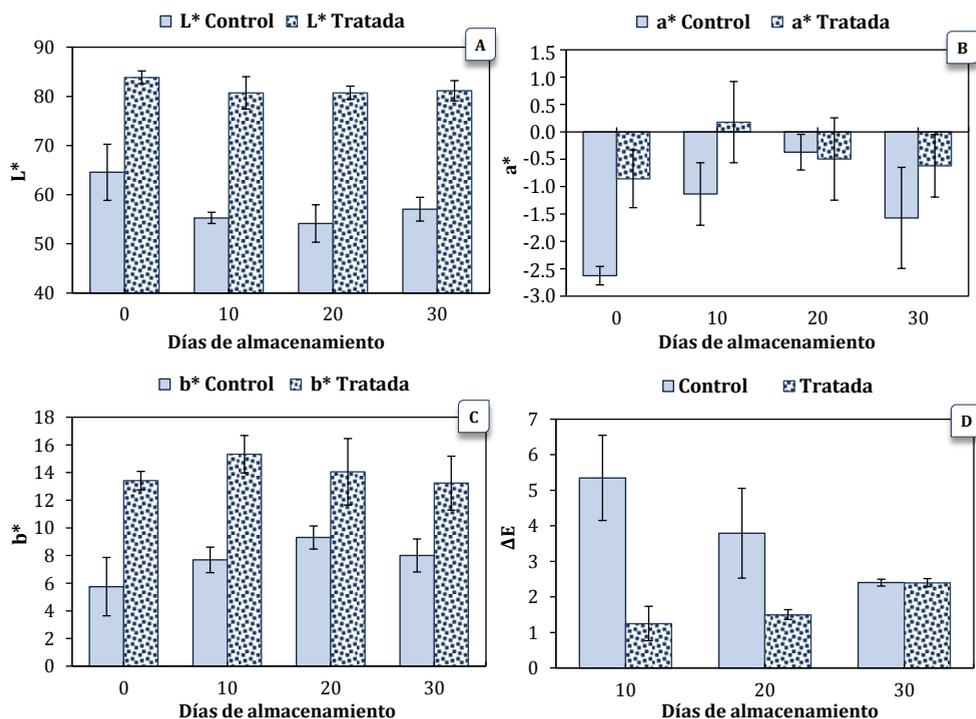


Figura 4.23 Evolución de los parámetros de color analizados en la superficie de muestras de pechuga de pollo sin tratar (control) y tratadas mediante FSC- CO_2 +HPU+DI (250 bar, 46 °C, 20 min; 42 W \pm 5 W), durante 30 días de almacenamiento a 4 °C. A. Valores de L^* ; B. Valores de a^* ; C. Valores de b^* y D. Diferencia global de color (ΔE).

En base a la escala definida por Mokrzycki y col. (2012), en el presente estudio se observó que, la muestra control presentó una clara diferencia de color después de 10 días (5.3), con respecto al color de la muestra de pollo al inicio del almacenamiento (día 0) (Figura 4.23-D). Sin embargo, estas diferencias disminuyeron durante el tiempo de almacenamiento, hasta alcanzar un valor de $\Delta E=2.4$ tras 30 días del mismo.

Los resultados mostraron que, en general, el tratamiento mediante FSC- CO_2 +HPU+DI sobre muestras de pechuga de pollo, permite mantener el color de las muestras estable durante 20 días de almacenamiento ($\Delta E < 2$, Figura 4.23-D), en contraste con

los cambios de color que experimentan las muestras sin tratamiento tras 10 días de almacenamiento. Además, se observó que la variación de color tras 30 días de almacenamiento fue similar para ambas muestras.

No existen referencias bibliográficas que recopilen el efecto del FSC-CO₂ y los HPU, sobre el color de muestras de pechuga de pollo fresca. La mayoría de los estudios sobre muestras de pollo se han llevado a cabo usando irradiación y altas presiones como técnicas de inactivación no térmica (Liu y col., 2003; Del Olmo y col., 2010; Kruk y col., 2011). En estos estudios, los autores demuestran que tanto la irradiación como las altas presiones aplicadas sobre las muestras de pechuga de pollo, afectan significativamente la apariencia y el color de las mismas. Sin embargo, solo Liu y col. (2003) estudiaron la vida útil de piezas de pechuga de pollo tras el tratamiento de irradiación. Estos autores observaron que durante el tratamiento y el almacenamiento (0 °C), el parámetro a* aumentó significativamente, tal y como se observó en el presente trabajo; respecto a los valores de L* y b*, Liu y col. (2003) no encontraron un cambio significativo tras el tratamiento, ni durante 20 días de almacenamiento, al igual que en el presente trabajo durante el mismo tiempo de almacenamiento.

Por tanto, el tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU+DI, además de ser una herramienta eficaz de inactivación (Apartado 4.1), permite mantener el color de la pechuga de pollo tras 20 días de almacenamiento en refrigeración, siendo pequeño el cambio tras 30 días de almacenamiento.

Jamón de pavo

La Figura 4.24 muestra la evolución de los parámetros de color de muestras de jamón de pavo control y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C, 10 min; 42±5 W), durante 30 días de almacenamiento.

En general, las coordenadas cromáticas de las muestras de pavo control (L*=75.9, a*=4.2 y b*=17.0), no mostraron cambios significativos ($p < 0.05$) durante los 30 días de almacenamiento (Figura 4.24). Por otro lado, los parámetros de color analizados en la superficie de las muestras de jamón de pavo tras su tratamiento (L*=76.5, a*=4.3 y

$b^*=17.3$), no mostraron diferencias significativas ($p>0.05$) con las muestras sin tratar, ni durante todo el tiempo de almacenamiento (Figura 4.24). Además, las variaciones de color obtenidas tras los diferentes periodos de almacenamiento estudiados indican que, los cambios de color promedio, no son apreciables a simple vista ($\Delta E < 2$, Figura 4.24-D).

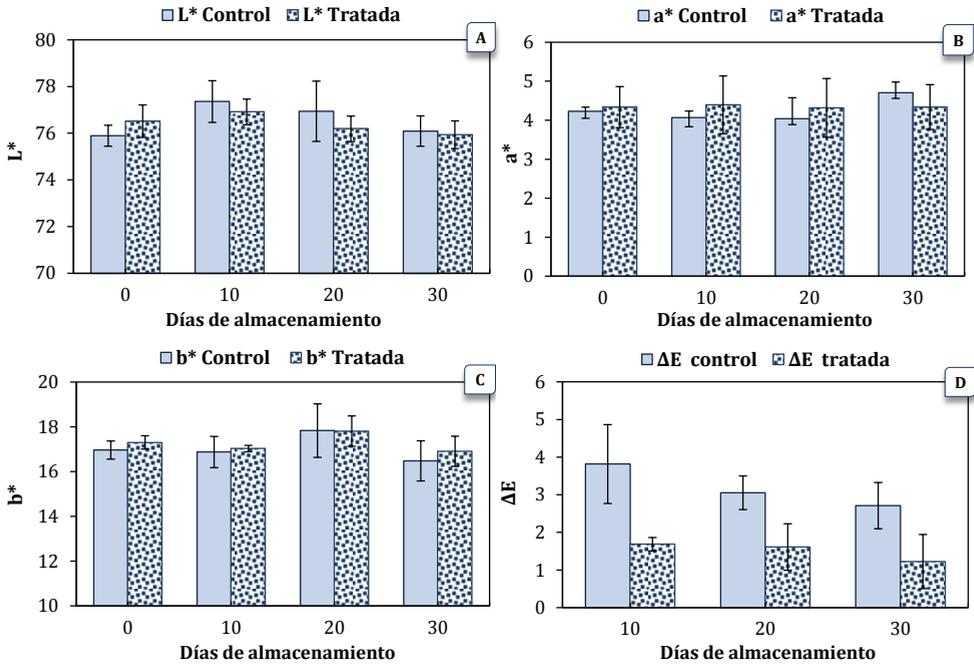


Figura 4.24 Evolución de los parámetros de color analizados en la superficie de muestras de jamón de pavo sin tratar (control) y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C, 10 min; 42 W ± 5 W), durante 30 días de almacenamiento a 4 °C. A. Valores de L*; B. Valores de a*; C. Valores de b* y D. Diferencia global de color (ΔE).

En este sentido, Ferrentino y col. (2013c) estudiaron el efecto del FSC-CO₂ (120 bar, 50 °C, 5 min) sobre el color de muestras de jamón cocido durante 4 semanas de almacenamiento. Estos autores observaron que los parámetros de color ($L^*=64.6$, $a^*=10.4$ y $b^*=2.8$) de la muestra control, no mostraron un cambio significativo ni tras su tratamiento, obteniendo una $\Delta E=1.3$, ni durante el almacenamiento.

Jamón curado

En la Figura 4.25 se observan los parámetros de color de las muestras de jamón curado control ($L^*= 46.21$; $a^*=8.42$ y $b^*=10.04$), y de las muestras tratadas con FSC-CO₂+HPU (250 bar, 46 °C, 10 min), tras el tratamiento ($L^*= 48.49$; $a^*=10.44$ y $b^*=14.49$) y durante 30 días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

Justo tras el tratamiento, las coordenadas cromáticas no cambiaron significativamente en comparación a las muestras control. Sin embargo, el tiempo de almacenamiento, en general, sí afectó a los parámetros de color en ambas muestras (tratadas y control). La luminosidad (L^*) de ambas muestras se mantuvo sin cambios significativos durante todo el tiempo de almacenamiento (Figura 4.24-A). Sin embargo, se observó que el índice a^* , tanto de las muestras tratadas como control, disminuyó significativamente ($p<0.05$) tras 30 días de almacenamiento (Figura 4.24-B).

De igual forma, el valor de b^* , también disminuyó significativamente ($p<0.05$) con el tiempo de almacenamiento, tanto en las muestras control como en las tratadas tras 30 días de almacenamiento (Figura 4.24-C).

De esta forma, la diferencia de color en las muestras control tras 10 días de almacenamiento (5.7) continuó aumentando hasta el final del mismo (9.7), mientras que la variación de color en las muestras tratadas con FSC-CO₂+HPU se mantuvo en 5.7 tras 10 y 20 días de almacenamiento, alcanzando un valor de 9.6 a los 30 días.

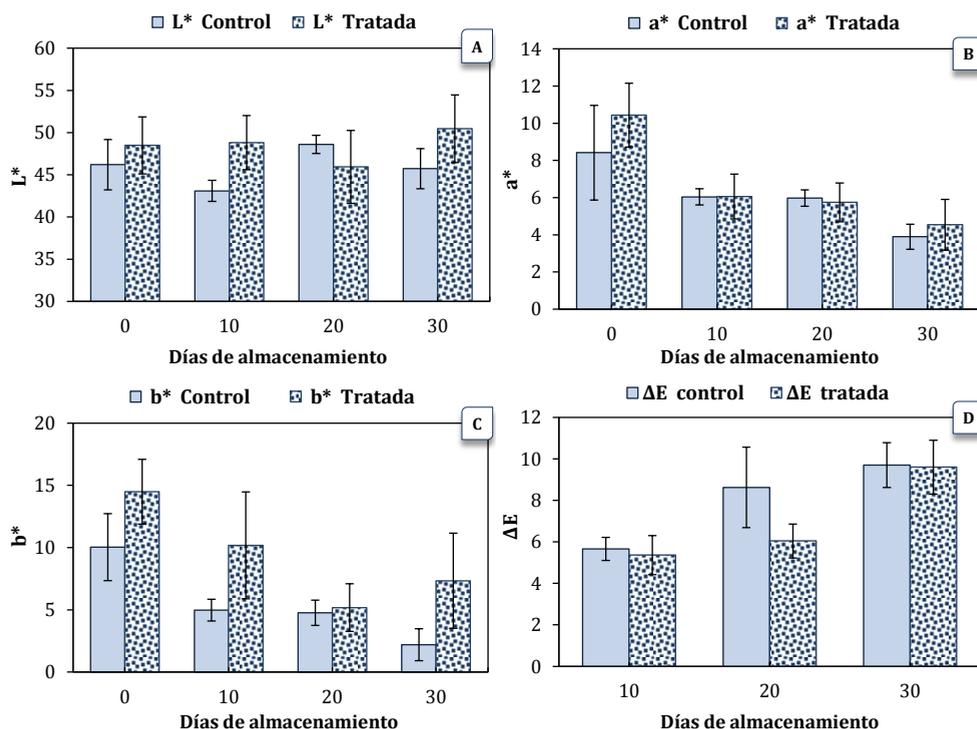


Figura 4.25 Evolución de los parámetros de color analizados en la superficie de muestras de jamón curado sin tratar (control) y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (250 bar, 46 °C, 10 min; 42 W ± 5 W), durante 30 días de almacenamiento a 4 °C. A. Valores de L*; B. Valores de a*; C. Valores de b* y D. Diferencia global de color (ΔE).

La disminución en la tonalidad rojiza de la carne que se observa durante el almacenamiento, podría ser debida a la oxidación del grupos ferrosos de la mioglobina a férricos, y a un incremento en el contenido de metamioglobina (Carlez y col., 1995; Del Alba y col., 2013), además la presurización de la carne y el almacenamiento en refrigeración han demostrado intensificar estos efectos (Carlez y col., 1995; Cava y col., 2009).

Respecto a los efectos del FSC-CO₂ y los HPU sobre los atributos de calidad de productos cárnicos durante su almacenamiento, la mayoría de trabajos han sido llevados a cabo aplicando ambas técnicas de forma individual (Pohlman y col., 1997; Ferrentino y col., 2013c). Sin embargo, Spilimbergo y col. (2014), estudiaron el efecto

del tratamiento combinado (FSC-CO₂+HPU) sobre los atributos de calidad de jamón curado. Estos autores encontraron un ΔE tras el tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU (120 bar, 35 °C, 5 min, 10 W) de 4.4, valor que se mantuvo durante 30 días de almacenamiento). Las diferencias encontradas entre los valores de ΔE obtenidos por Spilimbergo y col. (2014) y el presente trabajo, pueden ser atribuidas a las condiciones de presión y temperatura más suaves, usadas por estos autores.

Se puede concluir que, los tratamientos seleccionados produjeron variaciones de color mínimas durante el almacenamiento, tanto en las muestras de pechuga de pollo como en las muestras de jamón de pavo, que no son apreciables a simple vista, durante 20 y 30 días de almacenamiento, respectivamente. En las muestras de jamón curado la variación de color observada tras 10 días se mantuvo estable hasta el final del almacenamiento.

4.4.2. Textura

Además del color, la textura es uno de los parámetros tecnológicos más importantes que influyen sobre la comercialización de un producto cárnico. La Figura 4.26, muestra la dureza de las muestras cárnicas control y tratadas, durante 30 días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C.

Pechuga de pollo

La Figura 4.26-A muestra que, la dureza de las muestras de pechuga de pollo control (3.8 N) no varió significativamente ($p>0.05$) justo tras el tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI (3.5 N). Además, tanto la dureza de las muestras control como de las muestras tratadas, no mostraron variaciones significativas con el tiempo de almacenamiento.

Esto indica que el tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI realizado sobre muestras de pechuga de pollo fresca, permite obtener un producto cárnico con una textura estable durante toda su vida útil.

Jamón de pavo

La Figura 4.26-B muestra la dureza de las muestras de jamón de pavo, control y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C, 10 min; 45±5 W), durante 30 días de almacenamiento. La dureza inicial de las muestras de jamón de pavo fue de 0.8 N, valor que no cambió significativamente ($p>0.05$) durante todo el periodo de almacenamiento (Figura 4.26-B). Por otro lado, la dureza de las muestras tras el tratamiento con FSC-CO₂+HPU (0.6 N) no mostró un cambio significativo ($p>0.05$) con respecto a la muestra control. Además, este valor se mantuvo sin diferencias significativas ($p<0.05$) durante todo el tiempo de almacenamiento.

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Ferrentino y col. (2013c), quienes analizaron la textura de muestras de jamón cocido control y tras el tratamiento con FSC-CO₂ (120 bar, 50 °C, 5 min), durante 30 días de almacenamiento. Estos autores observaron que la dureza de las muestras control y tratadas, no mostraron diferencias significativas durante todo el tiempo de almacenamiento en refrigeración.

Dado que durante la elaboración del jamón de pavo, el tratamiento térmico provoca una desnaturalización de proteínas miofibrilares y del tejido conectivo de la carne de pavo, y modificaciones estructurales en la emulsión cárnica, que llevan a la formación de una estructura de gel firme y flexible, el tratamiento con FSC-CO₂ y HPU no afecta significativamente a los constituyentes de la matriz cárnica, manteniéndose la firmeza durante todo el periodo de almacenamiento.

Jamón curado

La Figura 4.26-C muestra como varía la dureza de las muestras de jamón curado control y las muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (250 bar, 46 °C, 10 min) durante 30 días de almacenamiento en refrigeración (4 °C). Los resultados indican que la dureza de las muestras de jamón curado justo tras el tratamiento (3.09 N), no varió significativamente ($p<0.05$) en comparación a la muestra control (3.95 N). Además,

estos valores se mantuvieron sin cambios significativos ($p>0.05$) durante todo el tiempo de estudio (30 días).

En este sentido, Spilimbergo y col. (2014) estudiaron el efecto de aplicar FSC-CO₂+HPU (120 bar, 35 °C, 5 min, 10 W), sobre los atributos de calidad en muestras de jamón curado tras el tratamiento y su evolución durante 4 semanas de almacenamiento. Estos autores encontraron que la dureza de las muestras aumentó tras el tratamiento, sin embargo, al igual que en el presente trabajo, la textura no se vio modificada durante el almacenamiento.

Esto indica que, el tratamiento con FSC-CO₂+HPU, aplicado sobre muestras de jamón curado, en las condiciones seleccionadas en el presente trabajo (250 bar, 46 °C, 10 min, 42 W \pm 5 W), además de garantizar un nivel mínimo de inactivación microbiana, como se describió en el Apartado 4.1 de la presente Tesis, permite obtener un producto cárnico con menor alteración textural que el obtenido por otros autores, manteniendo dichas condiciones durante todo el tiempo de almacenamiento refrigerado.

Así pues, se puede concluir que, los tratamientos seleccionados para las tres matrices cárnicas estudiadas producen cambios mínimos en las propiedades texturales, tanto justo tras el tratamiento, como durante un almacenamiento en refrigeración de 30 días

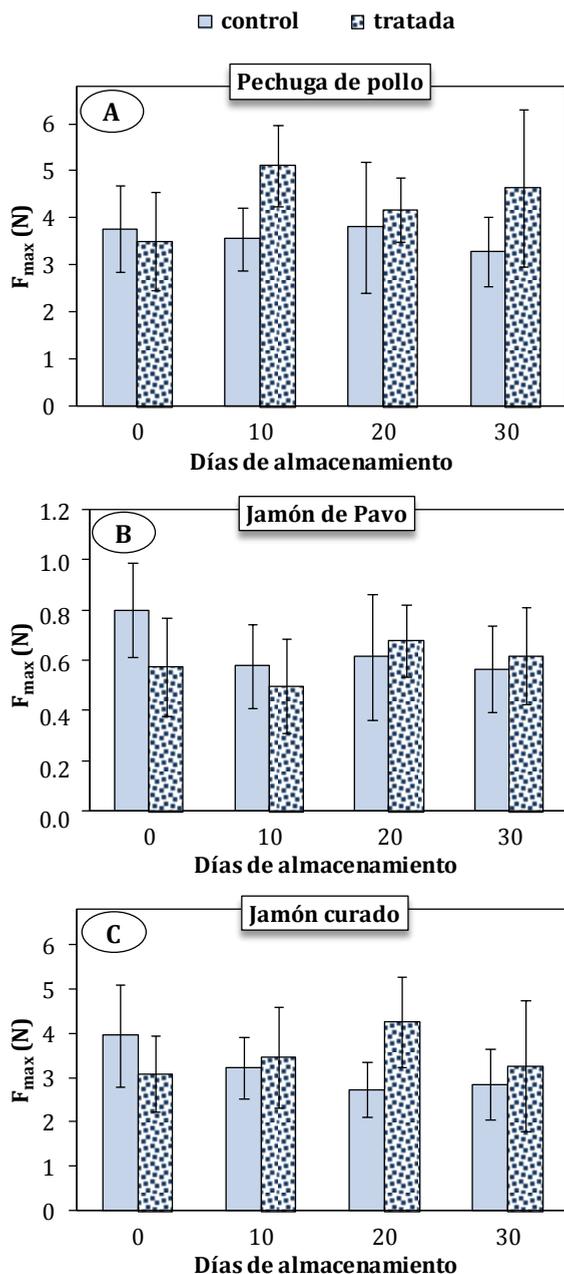


Figura 4.26 Evolución de la dureza de muestras cárnicas control y tratadas: (A) Pechuga de pollo (FSC-CO₂+HPU+DI: 250 bar, 46 °C, 20 min); (B) Jamón de pavo (FSC-CO₂+HPU: 150 bar, 46 °C, 10 min); (C) Jamón curado (FSC-CO₂+HPU: 250 bar, 46 °C, 10 min); durante 30 días de almacenamiento a 4 °C.

4.4.3. Humedad

La Figura 4.27 muestra el contenido de agua (g agua/g m. h.) de las muestras cárnicas, control y tratadas mediante FSC-CO₂ y HPU, durante 30 días de almacenamiento en refrigeración (4 °C).

Pechuga de pollo

La Figura 4.27-A, presenta la evolución de la humedad (g agua/100 g m. h.) de las muestras de pollo control y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI (250 bar, 46 °C, 10 min), durante su almacenamiento a 4 °C. El análisis estadístico reveló que, el contenido de agua en las muestras control (74.9 g agua/100 g m. h.), no mostró cambios significativos ($p < 0.05$) durante todo el tiempo de almacenamiento.

Justo tras el tratamiento, la humedad de las muestras tratadas fue significativamente ($p < 0.05$) menor (73.0 g agua/100 g m. h.) en comparación a la muestra sin tratar. En general, la humedad de las muestras tratadas permaneció sin variaciones durante todo el almacenamiento, lo que muestra su estabilidad y mantenimiento de la capacidad de retención de agua, no existiendo pérdidas por goteo.

La pequeña pérdida de agua en las muestras tratadas mediante FSC-CO₂ y HPU, ya fue descrita anteriormente en el Apartado 3 de la sección de Resultados y Discusión en la presente Tesis, asociándose dicha disminución al efecto de desnaturalización proteica inducido por el FSC-CO₂.

Jamón de pavo

La Figura 4.27-B muestra el contenido de agua (g agua/100 g m. h.) en muestras de jamón de pavo control y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C, 10 min), durante 30 días de almacenamiento. El análisis estadístico reveló que, la humedad en la muestra de jamón de pavo control (74.0 g agua/100 g m. h.) se mantuvo sin cambios significativos ($p > 0.05$) durante todo el tiempo de almacenamiento estudiado (30 días). Además, el contenido de agua de las muestras tras su tratamiento (73.9 g

agua/100 g m. h.), no mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) con la muestra control, ni durante los 30 días de almacenamiento estudiados.

Estos resultados muestran que, el tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU aplicado sobre muestras de jamón de pavo, además de lograr niveles de inactivación de *E. coli* aceptables (Apartado 4.1), permite mantener la humedad del producto estable durante un periodo de almacenamiento en refrigeración de al menos 30 días.

Jamón curado

La Figura 4.27-C presenta la evolución de la humedad de las muestras de jamón curado control (46.3 g agua/100 g m. h.) y tratadas (44.9 g agua/100 g m. h.), durante 30 días de almacenamiento. El contenido de agua en las muestras control, se mantuvo sin cambios significativos ($p > 0.05$) durante todo el tiempo de almacenamiento. El tratamiento no generó un cambio significativo ($p > 0.05$) en la humedad de jamón curado, manteniéndose constante durante el almacenamiento (excepto para el análisis realizado a los 10 días de almacenamiento).

Así pues, los resultados mostraron que la técnica combinada de FSC-CO₂+HPU, seleccionada para el tratamiento de las muestras cárnicas, permitió mantener el contenido de agua de las mismas estable durante 30 días de almacenamiento en refrigeración a 4 °C; lo que significa que se minimizan las pérdidas por goteo, característica importante que presentan los productos cárnicos refrigerados.

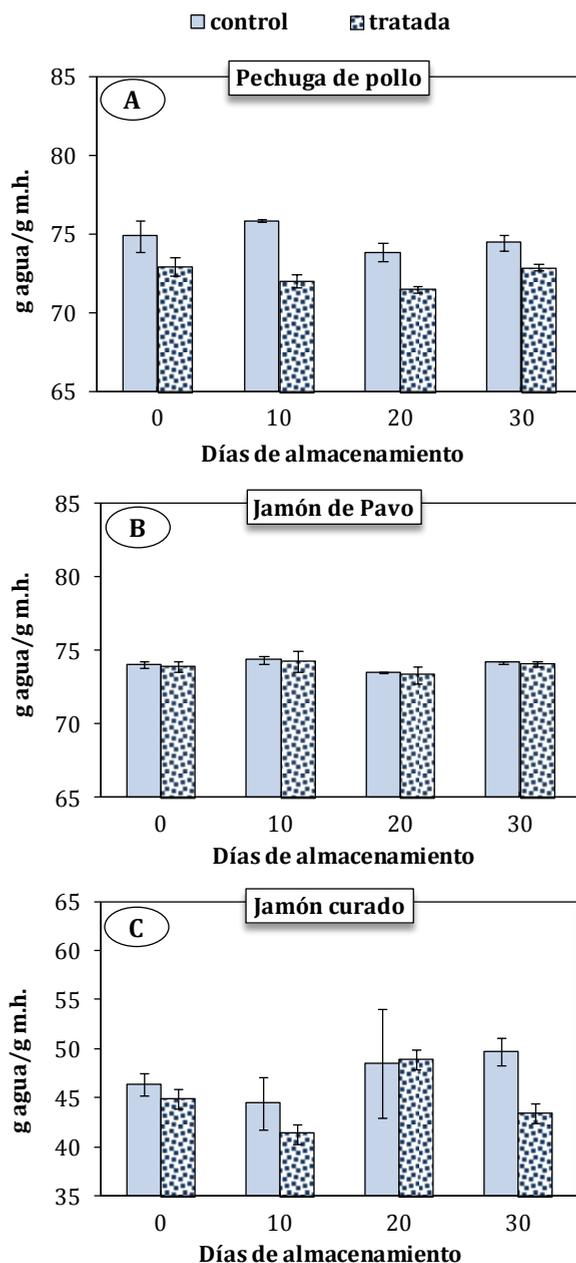


Figura 4.27 Evolución del contenido de agua (g agua/100 g m. h.) en muestras cárnicas control y tratadas: (A) Pechuga de pollo (FSC-CO₂+HPU+DI: 250 bar, 46 °C, 20 min); (B) Jamón de pavo (FSC-CO₂+HPU: 150 bar, 46 °C, 10 min); (C) Jamón curado (FSC-CO₂+HPU: 250 bar, 46 °C, 10 min); durante 30 días de almacenamiento a 4 °C.

4.4.4. pH

El valor del pH de los productos cárnicos durante el almacenamiento, es un parámetro importante que ayuda a identificar su vida útil; ya que una modificación significativa del pH, puede estar relacionada con la presencia de microorganismos alterantes.

La Figura 4.28 muestra la evolución del pH medido en las muestras cárnicas control y tratadas mediante FSC-CO₂ y HPU, durante 30 días de almacenamiento a 4 °C.

Pechuga de pollo

La Figura 4.28-A presenta los cambios de pH generados en muestras de pechuga de pollo control (5.84) y tratadas (5.97) mediante FSC-CO₂+HPU+DI (250 bar, 46 °C, 10 min, 42 W ± 5 W) durante el almacenamiento en refrigeración a 4 °C. El análisis estadístico reveló que el pH de las muestras control aumentó significativamente (p<0.05) tras 20 y 30 días de almacenamiento hasta 6.10 y 6.27, respectivamente.

Respecto al pH de las muestras tratadas, éste no varió significativamente de la muestra control, además durante el almacenamiento, la tendencia fue similar al de las muestras control, aumentando significativamente tras 20 y 30 días de almacenamiento hasta 6.10 y 6.47, respectivamente.

El incremento del pH de la carne durante su almacenamiento ha sido observado por otros autores empleando distintas técnicas de conservación. Moore y Gil (1989), analizaron el efecto del almacenamiento (2 °C) de lomos de cordero envasados en una atmosfera de CO₂, sobre el pH del tejido. Los autores observaron un incremento en el pH de la carne de 5.61 a 6.09 tras 8 semanas de almacenamiento y señalaron que este aumento pudo ser debido al incremento de compuestos de carácter básico, como resultado de la degradación del tejido muscular además del consumo de ácido láctico y otros metabolitos ácidos. En la misma línea, Grajales y col. (2012) estudiaron los parámetros de calidad de muestras de carne de cerdo sumergida en soluciones de ácido láctico, tras su almacenamiento en refrigeración (4 °C). Estos autores encontraron que el pH de las muestras tratadas aumentó de 4.96 a 5.89, tras 7 días de almacenamiento.

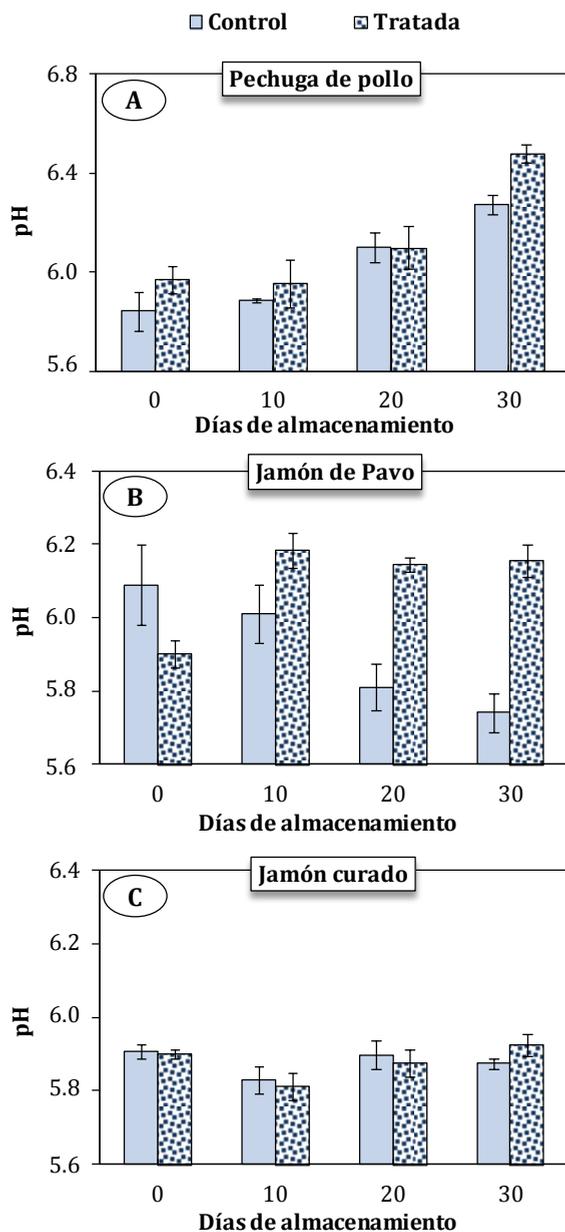


Figura 4.28 Evolución del pH en muestras cárnicas control y tratadas: (A) Pechuga de pollo (FSC-CO₂+HPU+DI: 250 bar, 46 °C, 20 min); (B) Jamón de pavo (FSC-CO₂+HPU: 150 bar, 46 °C, 10 min); (C) Jamón curado (FSC-CO₂+HPU: 250 bar, 46 °C, 10 min); durante 30 días de almacenamiento a 4 °C.

El aumento del pH de las muestras de pechuga de pollo durante el almacenamiento, está en la línea de los resultados observados por otros autores empleando carne tratada con distintos métodos de inactivación. El aumento del pH a los 30 días de almacenamiento podría ser más acusada en las muestras tratadas que en las control (Figura 4.28 A), debido a la desnaturalización proteica causada por el tratamiento de FSC-CO₂ +HPU, que podría facilitar la degradación del tejido muscular.

Recientemente, Szerman y col. (2014) analizaron el efecto del FSC-CO₂ (100 bar, 55 °C, 25 min) sobre el pH de longanizas elaboradas a base de carne de cordero fresca. Estos autores observaron que las muestras tratadas mediante FSC-CO₂ incrementaron significativamente el pH, relacionando este efecto con la desnaturalización de las proteínas, que provoca la ionización de grupos proteicos e incrementos en el valor del pH.

Jamón de pavo

En la Figura 4.28-B se presenta la evolución del pH en las muestras de jamón de pavo control y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C, 10 min) durante 30 días de almacenamiento. El análisis estadístico reveló que el pH en la muestra de jamón de pavo fresco (6.09) disminuyó significativamente ($p < 0.05$) con el tiempo de almacenamiento, lo que podría ser debido a un crecimiento bacteriano, con producción de ácido láctico.

El pH inicial de la muestra tratada (5.90), aumento significativamente ($p < 0.05$) tras 10 días de almacenamiento, sin embargo, este valor se mantuvo sin cambios significativos ($p > 0.05$) hasta los 30 días.

Ferrentino y col. (2013c), observaron que el pH del jamón cocido, no cambió significativamente tras un tratamiento con FSC-CO₂ con respecto a la muestra control. Además, durante el almacenamiento, el pH de la muestra de jamón tratada, permaneció sin cambios significativos, mientras que el pH de la muestra control disminuyó significativamente, debido al crecimiento bacteriano.

Jamón curado

En la Figura 4.28-C, se muestra la evolución del pH medido en las muestras de jamón curado control y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (250 bar, 46 °C, 10 min), durante su almacenamiento en refrigeración (4 °C).

En general, el pH de las muestras, se mantuvo estable durante el almacenamiento, tanto en las muestras tratadas como en las control, no observándose un efecto del tratamiento sobre el pH de las mismas.

En la misma línea, Spilimbergo y col. (2014), empleando FSC-CO₂+HPU (120 bar, 35 °C, 5 min) sobre muestras de jamón curado, encontraron que el pH de las muestras no varió significativamente tras el tratamiento. Sin embargo, estos autores observaron una disminución del pH durante el almacenamiento en refrigeración (tras 4 semanas), lo que atribuyeron a la contaminación microbiana presente.

Así pues, las diferentes muestras cárnicas tratadas presentan una mayor estabilidad del pH durante el almacenamiento, factor necesario para una adecuada comercialización de los productos tratados con esta tecnología.

4.4.5. Microbiota

En las Figuras 4.29 a 4.31, se muestra la evolución de la microbiota presente en las muestras cárnicas, sin tratar (control) y las muestras tratadas mediante los distintos tratamientos con FSC-CO₂ y HPU seleccionados. El análisis de la microbiota realizado en el presente estudio mediante la técnica de recuento directo en placa (TPC), incluye el contenido de mesófilos, psicrófilos, bacterias ácido-lácticas, hongos y levaduras, coliformes y *E. coli*, expresados en UFC/g.

Pechuga de pollo

La Figura 4.29 muestra la evolución de la microbiota presente en muestras de pechuga de pollo control y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI (250 bar, 46 °C, 20 min) durante 30 días de almacenamiento.

El recuento de la microbiota en las muestras de pechuga de pollo fresco (control) fue de 3.4, 2.8, 2.6, 2.7, 3.4 y 3.4 log (UFC/g) para mesófilos, psicrófilos, bacterias ácido-lácticas, hongos y levaduras, coliformes y *E. coli*, respectivamente.

Durante el tiempo de almacenamiento, la microbiota aumentó significativamente ($p < 0.05$) en todos los tipos de microorganismos analizados, hasta alcanzar niveles de 7.0, 7.3, 7.3, 6.9, 5.7 y 7.1 log UFC/g para mesófilos, psicrófilos, bacterias ácido-lácticas, hongos y levaduras, coliformes y *E. coli*, respectivamente, tras 30 días de almacenamiento.

Al inicio del almacenamiento (justo tras el tratamiento), las muestras de pechuga de pollo tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI (250 bar, 46 °C, 20 min), no mostraron crecimiento microbiano. Sin embargo, tras 10 días del estudio, se observó un recuento microbiano similar, aunque inferior, a la microbiota de la muestra control, que continuó aumentando hasta obtener tras 30 días de almacenamiento, un recuento de 6.8, 7.8, 6.8, 5.9, 7.0 y 6.4 log UFC/g en el contenido de mesófilos, psicrófilos, bacterias ácido-lácticas, hongos y levaduras, coliformes y *E. coli*, respectivamente. Así pues, aunque los recuentos son en general, menores en las muestras tratadas que en el control, durante los primeros 10 días de almacenamiento se produce un crecimiento microbiano importante que hace que las diferencias sean en general menores de 1 log UFC/g.

Estos resultados indican que los microorganismos presentes de manera natural en las muestras de pollo fresco, fueron inactivados tras el tratamiento con FSC-CO₂+HPU+DI, sin embargo, el daño causado no fue irreversible. En consecuencia, durante el tiempo de almacenamiento, los microorganismos lograron recuperarse y crecer exponencialmente durante el almacenamiento. No obstante, otra causa del alto recuento microbiano podría ser la recontaminación de las muestras durante la manipulación para su envasado.

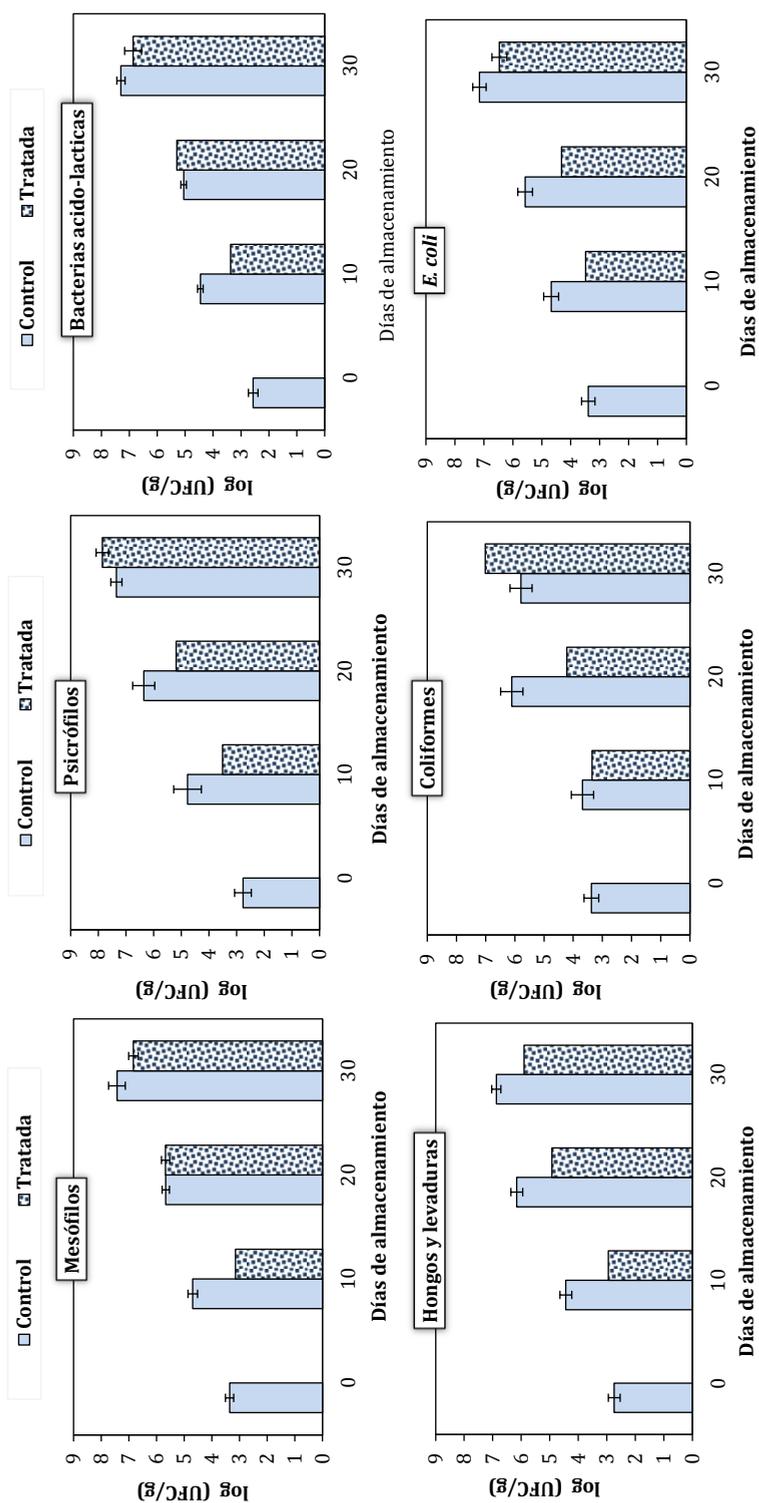


Figura 4.29 Microbiota presente en muestras de pechuga de pollo, tratadas mediante FSC-CO₂+HPU+DI (250 bar, 46 °C, 20 min) y muestras control, durante su almacenamiento a 4 °C.

El uso de la técnica de FSC-CO₂ ha mostrado resultados positivos en la inactivación microbiana en matrices cárnicas, gracias a la rápida absorción del CO₂ en la carne. En este sentido, Szerman y col. (2014) realizaron un estudio acerca del efecto del FSC-CO₂ sobre la calidad microbiológica, encontrando que el tratamiento mediante FSC-CO₂ (100 bar, 55 °C, 14 min) tuvo un efecto letal significativo sobre el recuento de la microbiota aeróbica y enterobacterias, reduciendo su población 1.31 y 6.70 log UFC/g, respectivamente. Mientras que, las bacterias ácido lácticas y micrococcos mostraron ser más resistentes al efecto del tratamiento con CO₂.

Cabe resaltar que el tratamiento con FSC-CO₂+HPU, en el presente trabajo, permitió retrasar el crecimiento de la microbiota de forma que, tras 10 días de almacenamiento en refrigeración (4 °C), el recuento de los distintos tipos de microorganismos analizados presentaron un valor similar al de la muestra fresca sin tratar, al inicio del almacenamiento.

El crecimiento microbiano observado en las muestras de pechuga de pollo tras 20 y 30 días de almacenamiento, puede estar relacionado con el incremento en el pH de las muestras tras esos periodos de almacenamiento, descrito previamente en la sección 4.4.4 del presente apartado. Es probable que durante el metabolismo de alguno de los microorganismos presentes en la microbiota de la pechuga de pollo, la producción de algún metabolito secundario de carácter básico provoque un aumento en los valores del pH de la carne.

Jamón de pavo

La microbiota presente en las muestras de jamón de pavo control fue de 3.4, 3.5, 3.6, 3.6, 2.6 y 3.3 log (UFC/g) de mesófilos, psicrófilos, bacterias ácido-lácticas, hongos y levaduras, coliformes y *E. coli*, respectivamente (Figura 4.30). Durante el tiempo de almacenamiento, se observó que la microbiota de la muestra control aumentó significativamente ($p < 0.05$) en todos los tipos de microorganismos analizados, hasta alcanzar, tras 30 días de almacenamiento valores de: 5.4, 6.8, 6.5, 6.4, 5.2 y 6.5 log UFC/g en mesófilos, psicrófilos, bacterias ácido-lácticas, hongos y levaduras, coliformes y *E. coli*, respectivamente.

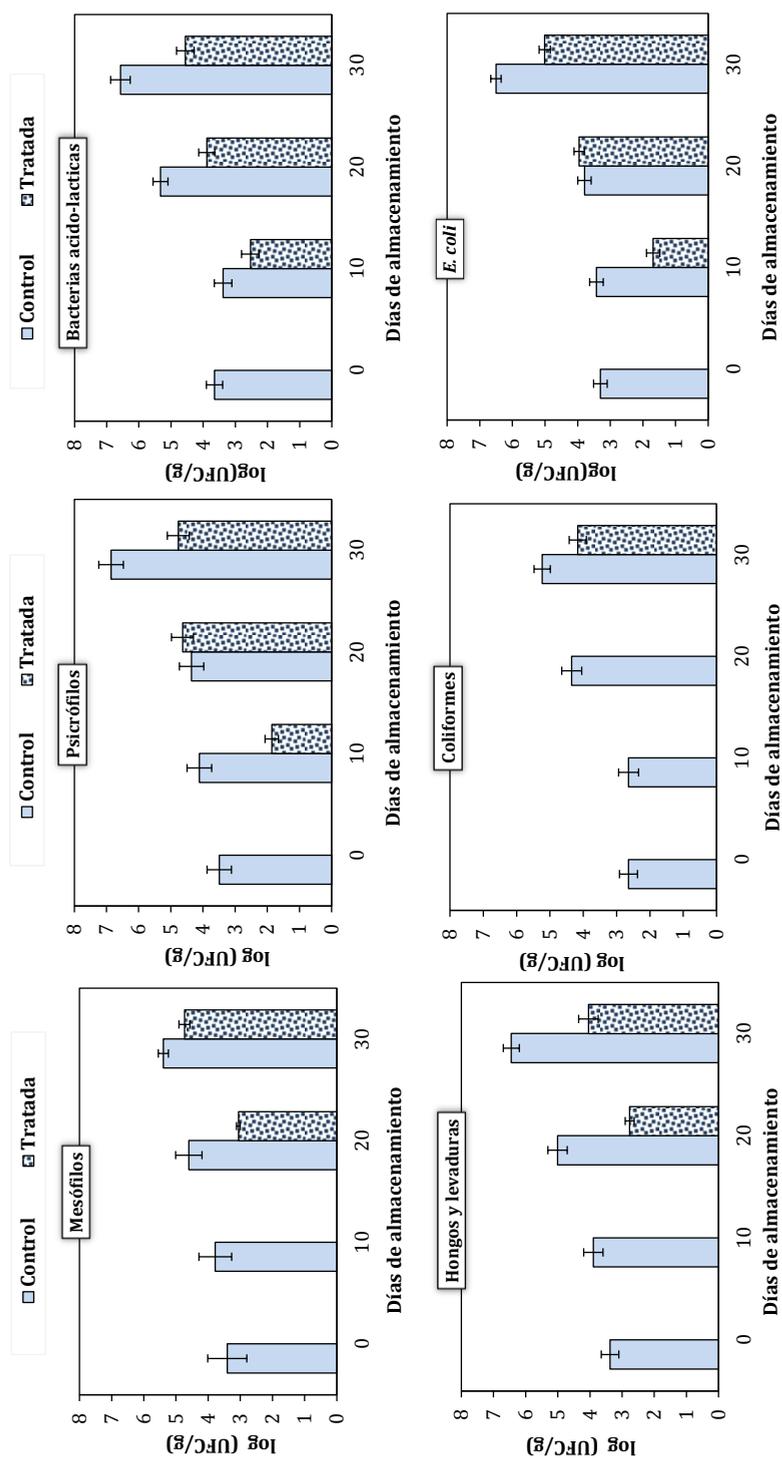


Figura 4.30 Microbiota presente en muestras de jamón de pavo, tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C, 10 min) y muestras control, durante su almacenamiento a 4 °C.

Por otro parte, al inicio del almacenamiento, las muestras tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C, 10 min), no mostraron crecimiento microbiano. Tras 10 días de almacenamiento, el recuento de microorganismos psicrófilos, bacterias ácido-lácticas y de *E. coli* fue de 1.8, 2.5 y 1.6 log UFC/g, valores significativamente ($p < 0.05$) menores que el recuento en las muestras control al inicio del almacenamiento. El resto de microorganismos que conforman la microbiota, no mostraron crecimiento en este periodo de almacenamiento.

Después de los 10 días de almacenamiento, se observó que los microorganismos mesófilos, hongos y levaduras y los coliformes, mostraron mayor sensibilidad al tratamiento con FSC-CO₂+HPU aplicado, siendo los coliformes los microorganismos más sensibles, no observándose crecimiento a los 20 días de almacenamiento y alcanzando un recuento de 4.1 log UFC/g tras 30 días de almacenamiento. Los mesófilos y hongos y levaduras, alcanzaron un recuento de 3.05 y 2.7 log UFC/g, respectivamente, tras 20 días de almacenamiento, recuento similar al observado en la muestra de jamón de pavo control.

Al igual que sucedía en el caso de la pechuga de pollo, el tratamiento con FSC-CO₂+HPU provocó un daño sobre la microbiota que no fue irreversible, recuperando los microorganismos su capacidad reproductora tras un periodo de almacenamiento. Sin embargo, al igual que se vio en el apartado 4.1, el tipo de matriz influye sobre el efecto del tratamiento. En particular en el capítulo 4.1 se observó como el jamón de pavo proporcionaba una menor protección a los microorganismos frente a los tratamientos con FSC-CO₂, dando lugar a una mayor inactivación microbiana que en los tratamientos sobre pechuga de pollo. En este caso también se ha constatado que el tratamiento es más efectivo y duradero en jamón de pavo que en pechuga de pollo, llegando a transcurrir hasta 20 días sin que los microorganismos coliformes puedan recuperar su viabilidad.

Ferrentino y col. (2013c) mostraron que el uso de FSC-CO₂ a 120 bar, 50 °C y 15 min, permitió disminuir significativamente el contenido inicial de mesófilos, psicrófilos y bacterias ácido-lácticas en muestras de jamón cocido, logrando una reducción de 2.8,

1.6 y 2.5 log UFC/g, respectivamente. Además, al igual que en el presente trabajo lograron reducir el contenido de coliformes y de hongos y levaduras a niveles no detectables tras el tratamiento. Durante el almacenamiento, los autores observaron que el contenido de la microbiota de las muestras tratadas al inicio del estudio, se mantuvo tras 10 días de almacenamiento y aumentó significativamente al final del estudio de almacenamiento (30 días).

El tratamiento de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU, empleado en el presente trabajo de Tesis, logró inactivar en su totalidad la microbiota presente en las muestras de jamón de pavo, por tanto, mostró resultados más efectivos que los encontrados por Ferrentino y col. (2013c). Esto puede ser debido a que la aplicación simultánea de FSC-CO₂+HPU produce un aumento en la agitación del CO₂ supercrítico, turbulencia del medio, esfuerzo cortante, fenómenos de compresión y rarefacción y microcorrientes de alta intensidad (Piyasena et al., 2003; Knorr et al., 2004), que mejora tanto la solubilización de CO₂, como su difusión en la matriz cárnica y su transferencia a través de la membrana celular.

El uso de la tecnología combinada de FSC-CO₂+HPU, que retrasa notablemente el crecimiento microbiano en condiciones de refrigeración, representa una alternativa eficaz como técnica de conservación pre-ensado en productos cárnicos como el jamón de pavo.

Jamón curado

La Figura 4.31 muestra la evolución de la microbiota presente en las muestras de jamón curado control y tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (250 bar, 46 °C, 10 min). La microbiota del jamón curado control al inicio del almacenamiento está conformada por 2.5, 1.8, 2.6, 3.0, 1.2 y 1.5 log (UFC/g) de mesófilos, psicrófilos, bacterias ácido-lácticas, hongos y levaduras, coliformes y *E. coli*, respectivamente. Tras 30 días de almacenamiento, la microbiota del jamón curado control aumentó, hasta alcanzar un recuento de 3.7, 4.3, 3.3, 4.3, 2.0 y 4.4 log (UFC/g) de los mismos microorganismos citados previamente. Dado el bajo nivel de a_w (menor a 0.92) y alto contenido de sal (mayor del 4 %) en el jamón curado, el crecimiento de los microorganismos es

limitado (Toldrá, 2004), lo que se constata en los resultados obtenidos en la Figura 4.31.

Por otro lado, se observó que tras el tratamiento con FSC-CO₂+HPU (150 bar, 46 °C, 10 min), el crecimiento microbiano en las muestras de jamón curado durante el almacenamiento se vio ralentizado. Al igual que en las muestras de jamón de pavo, los microorganismos más sensibles al tratamiento fueron los coliformes y los hongos y levaduras, cuyo recuento se mantuvo en niveles no detectables durante todo el almacenamiento (30 días). Asimismo, dada la baja actividad de agua en el jamón curado y alto nivel de sal del mismo, la recuperación de los microorganismos que mostraron más resistencia al tratamiento fue limitada. En este sentido, los microorganismos mesófilos, psicrófilos, bacterias ácido-lácticas y *E. coli*, mostraron un recuento de 2.2, 3.2, 2.9 y 2.2 ciclos-log (UFC/g) respectivamente, en las muestras tratadas tras 30 días de almacenamiento. Estos resultados confirman que la matriz no solo tiene influencia sobre como el tratamiento afecta a las células microbianas, reduciendo su viabilidad, sino también a la recuperación de su viabilidad durante el almacenamiento refrigerado.

El estudio realizado por Spilimbergo y col. (2014) sobre la aplicación de FSC-CO₂+HPU (120 bar, 35 °C, 5 min, 10 W) en muestras de jamón curado, reveló que durante el almacenamiento, en las muestras tratadas no se detectó crecimiento microbiano ni de la microbiota natural, ni de *L. monocytogenes* inoculada previamente, lo cual indica que bajo las condiciones de tratamiento usadas, se logró inactivar de forma irreversible el contenido de microorganismos.

Estos resultados indicaron que el tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU (250 bar, 46 °C, 10 min) aplicado sobre muestras de jamón curado en el presente trabajo, puede representar una alternativa eficaz para reducir la microbiota del jamón curado, proveniente de su manipulación y corte para su venta en envases individuales, que representa el mayor riesgo de contaminación, garantizando la vida útil del producto al menos 30 días de almacenamiento en condiciones domésticas de refrigeración (4 °C).

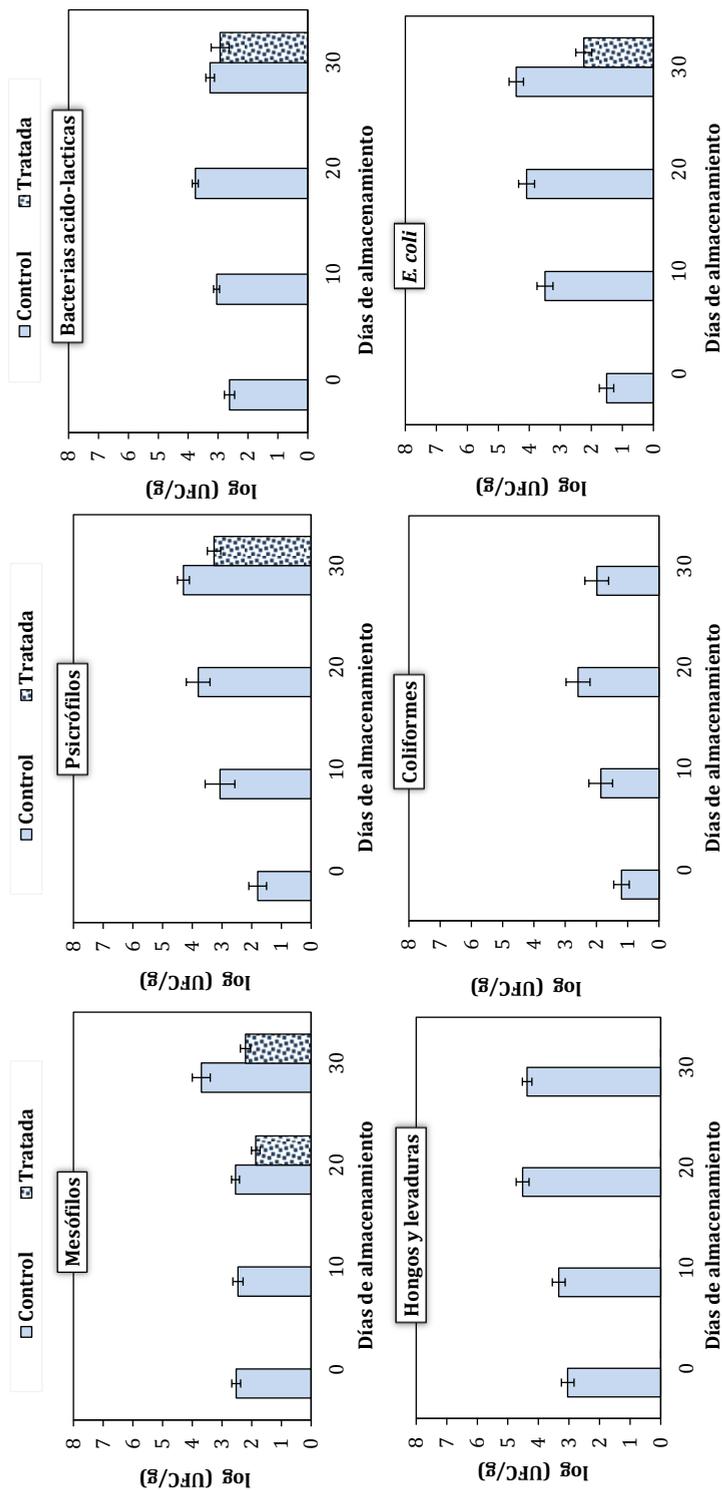


Figura 4.31 Microbiota presente en muestras de jamón curado, tratadas mediante FSC-CO₂+HPU (250 bar, 46 °C, 10 min) y muestras control, durante su almacenamiento a 4 °C.

En general, se observó que los microorganismos más sensibles al tratamiento aplicado fueron los coliformes y los hongos y levaduras. Por otro lado, se observó que la resistencia al tratamiento, y la recuperación de la viabilidad de los microorganismos está determinada no sólo por el tipo de microorganismo (Ferrentino y col. 2013c), sino por factores intrínsecos de la matriz.

Así pues, los resultados observados en la presente Tesis Doctoral, mostraron que el grado de letalidad microbiana provocada por los tratamientos con FSC-CO₂+HPU varía en función de la resistencia intrínseca de los microorganismos al tratamiento y de la naturaleza de la matriz alimentaria. En este sentido, este tipo de tratamientos en alimentos líquidos da lugar a mayores niveles de inactivación microbiana con efectos irreversibles (Ortuño y col., 2014a). En las matrices cárnicas estudiadas en la presente Tesis, el mayor grado de reducción se obtuvo en jamón de pavo, seguido de pechuga de pollo y jamón curado. Por el contrario, el grado de recuperación de los microorganismos viene dado por la naturaleza y composición de la matriz donde se encuentren, siendo la pechuga de pollo la matriz que mostró la mayor recuperación microbiana, seguida del jamón de pavo y jamón curado. Por ello, podría ser interesante estudiar si el envasado al vacío o el uso de una atmósfera modificada tras el tratamiento con FSC-CO₂+HPU, podrían retrasar o incluso detener el crecimiento microbiano durante el almacenamiento en refrigeración.

CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral, las conclusiones han sido agrupadas de acuerdo a los Apartados descritos en el capítulo de Resultados y Discusión, y de los factores estudiados en los distintos tratamientos de inactivación mediante fluidos supercríticos.

Apartado 1. Proceso de inactivación de *E. coli* mediante FSC-CO₂.

- En los tratamientos mediante FSC-CO₂, la presión no mostró un efecto significativo sobre la velocidad de inactivación de *E. coli* en las muestras de pechuga de pollo, pero si lo hizo en jamón de pavo donde un aumento en la presión aceleró los procesos de inactivación.
- Para tratamientos con solo FSC-CO₂, la temperatura aumentó significativamente la velocidad de inactivación de *E. coli* tanto en pechuga de pollo como en jamón de pavo, mostrando ser un factor clave en los mecanismos de inactivación, favoreciendo la difusión del CO₂ y el contacto con las células de *E. coli*.
- En general, la inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo y jamón de pavo, incrementó con el tiempo de tratamiento.
- La metodología de superficie de respuesta, fue una herramienta eficaz para determinar el efecto de las variables de proceso, presión, temperatura y tiempo de tratamiento, sobre el nivel de inactivación alcanzado en muestras de jamón curado empleando FSC-CO₂, además, permitió conocer las condiciones de tratamiento mediante las cuales se maximiza el nivel de inactivación.
- La naturaleza de la matriz cárnica fue determinante en el proceso de inactivación, generando un efecto protector y limitando el contacto directo del CO₂ con la membrana celular, siendo la pechuga de pollo la matriz que mayor protección ofreció a los microorganismos frente al tratamiento, seguida del jamón curado y el jamón de pavo. En general los tratamientos en las tres matrices son mucho más lentos que los llevados a cabo en matrices líquidas como zumos.

- La aplicación de HPU a los tratamientos mediante FSC-CO₂ incrementó la velocidad de inactivación de *E. coli* y permitió alcanzar un mayor nivel de inactivación, en comparación a los tratamientos sin HPU, bajo las mismas condiciones de tratamiento.
- Los HPU aplicados a los tratamientos con FSC-CO₂ mejoraron la mezcla entre el fluido supercrítico y la matriz cárnica, generando micro-corrientes de alta intensidad sobre la superficie de las muestras cárnica, incrementando la difusión del CO₂ a la matriz y facilitando por tanto la inactivación de *E. coli*.
- La aplicación conjunta de FSC-CO₂ y HPU presentó un efecto sinérgico sobre el nivel de inactivación de *E. coli*, permitiendo alcanzar una reducción superior a la alcanzada con la suma de las reducciones obtenidas de forma individual con ambas técnicas.
- Sumergir las muestras cárnica en una disolución salina, permitió aumentar el nivel de inactivación de *E. coli*, sólo en los tratamientos mediante FSC-CO₂ asistidos con HPU (FSC-CO₂+HPU+DI).
- La aplicación de HPU a los tratamientos mediante FSC-CO₂+DI provocó un drástico incremento de la velocidad de inactivación de *E. coli*, que aumentó con la temperatura del proceso, en comparación a los tratamientos con solo FSC-CO₂+DI. Este aumento podría ser debido al fenómeno de cavitación en la disolución salina, que permitió acelerar los fenómenos de transferencia de materia y disminuyó la resistencia a la difusión del CO₂ supercrítico en la muestra, facilitando que éste se ponga en contacto con las células microbianas.
- Los ensayos realizados con papel de aluminio, confirmaron que en los tratamientos con FSC-CO₂+HPU+DI se genera cavitación, no siendo esta apreciable cuando solo se emplea FSC-CO₂.

Apartado 2. Modelización de las cinéticas de inactivación de *E. coli* sobre muestras cárnica mediante FSC-CO₂.

- Los modelos primarios de Weibull, Bifásico, Peleg Tipo A y Peleg Tipo B, describieron adecuadamente las cinéticas de inactivación de pechuga de pollo

y jamón de pavo obtenidas mediante los distintos sistemas de tratamiento con FSC-CO₂ y HPU estudiados.

- Las cinéticas de inactivación de *E. coli* en pechuga de pollo, fueron ajustadas adecuadamente usando el modelo generalizado de Weibull, el cual fue adaptado incluyendo la presión y temperatura como parámetros del modelo a través de la ecuación logística de Peleg.
- Las cinéticas de inactivación de *E. coli* en jamón de pavo, llevadas a cabo mediante FSC-CO₂ y FSC-CO₂+HPU+DI fueron ajustadas adecuadamente usando el modelo generalizado de Peleg Tipo B, el cual fue adaptado incluyendo la presión y temperatura como parámetros del modelo a través de la ecuación de Peleg.
- Las cinéticas de inactivación de *E. coli* en jamón de pavo, llevadas a cabo mediante FSC-CO₂+DI y FSC-CO₂+HPU fueron ajustadas adecuadamente usando el modelo generalizado de Bifásico, el cual fue adaptado incluyendo la presión y temperatura como parámetros del modelo a través de la ecuación de Peleg.
- Los modelos generalizados permitieron describir el comportamiento de las cinéticas de inactivación en un intervalo amplio de condiciones de presión y temperatura de tratamiento, reduciendo el número de parámetros cinéticos.

Apartado 3. Efecto del tratamiento de inactivación sobre los parámetros de calidad de las muestras cárnicas.

- La variación global de color (ΔE) obtenida en las muestras cárnicas, tras los distintos tratamientos con FSC-CO₂ estudiados, indicó un cambio de color significativo respecto a la muestra control, con excepción de las muestras de jamón de pavo, las cuales no presentaron cambios de color apreciables a simple vista. Los cambios de color en la pechuga de pollo fueron asociados a la desnaturalización proteica, causada por la bajada del pH al disolverse el FSC-CO₂ en la matriz cárnica.
- Los valores de textura (F_{max}) de las muestras cárnicas revelaron que sólo la dureza de las muestras de jamón de pavo se mantuvo sin cambios

significativos, sin embargo, la dureza de las muestras de pechuga de pollo y jamón curado, en general, disminuyeron significativamente tras la aplicación de los distintos tratamientos con FSC-CO₂.

- La microestructura de las muestras de pechuga de pollo y jamón curado, mostraron en general roturas en las fibras musculares y afección del tejido conectivo, lo cual corrobora los cambios texturales observados.
- El contenido de humedad de las muestras cárnicas, disminuyó significativamente tras la aplicación de los distintos tratamientos mediante FSC-CO₂, con excepción de las muestras de jamón de pavo que no mostró cambios tras ninguno de los tratamientos estudiados.
- Los tratamientos con FSC-CO₂+HPU provocaron la mayor reducción de humedad en las muestras tratadas, siendo el tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU+DI el único que provocó una ganancia de agua en las muestras de jamón de pavo y jamón curado.
- El contenido de grasa de las muestras cárnicas disminuyó significativamente tras el tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU, con excepción de la muestras de jamón de pavo que no mostraron un cambio significativo en el contenido de grasa, tras ninguno de los tratamientos estudiados. Esto demostró el gran poder extractor del FSC-CO₂ de compuestos apolares y podría ser una alternativa para la elaboración de productos cárnicos más saludables con un contenido reducido de grasa.

Aparatado 4. Estudio del almacenamiento de muestras cárnicas tratadas mediante FSC-CO₂.

- Las tres matrices cárnicas mostraron variaciones de color mínimas durante 20 días de almacenamiento.
- Los cambios texturales en las tres matrices cárnicas fueron mínimos, durante todo el tiempo de almacenamiento (30 días).
- El contenido de humedad de las muestras cárnicas se mantuvo sin cambios significativos durante todo el tiempo de almacenamiento, limitando las pérdidas por goteo.

- El pH de las muestras de pechuga de pollo aumentó significativamente con el tiempo de almacenamiento, debido a la posible degradación del tejido muscular. En el caso del jamón curado, el pH se mantuvo estable durante todo el estudio.
- La microbiota de las muestras cárnicas fue inactivada totalmente tras todos los tratamientos; sin embargo, en la mayoría de los microorganismos y matrices el daño provocado por el tratamiento fue reversible, pudiendo los microorganismos recuperar su capacidad reproductiva.
- El periodo de recuperación varió en función de la resistencia del propio microorganismo al tratamiento y del tipo de matriz cárnica donde se encuentra. En este sentido, el alto contenido en sales y la baja actividad de agua del jamón curado, hace que sobre esta matriz la recuperación fuera más limitada, que en pechuga de pollo, donde la recuperación fue muy rápida.

CONCLUSIÓN GENERAL

El uso de ultrasonidos de potencia durante los tratamientos de inactivación con FSC-CO₂, permiten disminuir la viabilidad de los microorganismos, sin afectar en exceso los atributos de calidad de las muestras cárnicas justo tras su tratamiento y durante su almacenamiento refrigerado. La matriz que mejor se adaptó a los tratamientos fue el jamón de pavo donde la inactivación microbiana fue máxima y el efecto sobre sus propiedades físico-químicas mínimo. En el caso del jamón curado, los efectos sobre su calidad son también reducidos, presentado la mayor estabilidad durante su almacenamiento de las tres matrices ensayadas. En la pechuga de pollo, el producto se ve afectado, produciéndose una desnaturalización proteica, por lo que la técnica debería aplicarse en la elaboración de productos preparados tipo cocidos.

CAPÍTULO 6

RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente Tesis, y con el objetivo de aprovechar el potencial de la tecnológica combinada mediante FSC-CO₂ y HPU en la industria alimentaria, se recomienda desarrollar los siguientes aspectos:

Desarrollo de la tecnología

- Introducir en el equipo de fluidos supercríticos, un sistema de medición y registro de temperatura que permita monitorizar los incrementos de la misma en el interior de la muestra durante el tratamiento.
- Estudiar el efecto de la intensidad del campo acústico y de la frecuencia del mismo, así como del uso de la tecnología en forma de pulsos.

Microorganismos

- Evaluar el efecto de la tecnología combinada mediante FSC-CO₂+HPU sobre los microorganismos patógenos característicos de los alimentos en su formas vegetativa y esporulada.
- Estudiar mediante microscopía el daño causado en los microorganismos tras los diferentes tipos de tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU.
- Determinar el efecto de la concentración inicial de microorganismos sobre las cinéticas de inactivación.

Matriz alimentaria y desarrollo de nuevos productos

- Evaluar el uso de la técnica en productos que contengan matrices cárnicas junto con otros elementos como salsas, vegetales, etc.
- Determinar el efecto del tratamiento de inactivación mediante FSC-CO₂+HPU en matrices alimentarias como pastas y purés.
- Evaluar la viabilidad de la combinación de FSC-CO₂ y HPU en otro tipo de productos no-cárnicos como las especias y productos en polvo, donde su esterilización es muy compleja.
- Estudiar diferentes condiciones del tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU que permitan, además de inactivar la microbiota presente en el alimento,

desarrollar un producto precocinado, listo para consumo y con características organolépticas y nutricionales atractivas para el consumidor.

- Estudio de la adición de compuestos antimicrobianos naturales durante el tratamiento. La elevada difusividad del FSC-CO₂, junto con la ayuda de los HPU permitiría una penetración de los mismos en la matriz, lo que contribuiría a su estabilización microbiológica.
- Comprobar si el envasado al vacío o el uso de una atmosfera modificada tras el tratamiento con FSC-CO₂+HPU, podrían retrasar o incluso detener el crecimiento microbiano durante el almacenamiento en refrigeración.

Propiedades del producto final

- Evaluar el efecto de la oxidación lipídica y la desnaturalización de proteínas tras el tratamiento y durante su almacenamiento en refrigeración.
- Estudiar los efectos del tratamiento mediante FSC-CO₂+HPU, llevado a cabo en carne fresca para la obtención de un producto precocinado, o listo para consumo (RTE), sobre sus parámetros de calidad (color, textura, pH, humedad, capacidad de retención de agua, pérdida de nutrientes, contenido de grasa y oxidación lipídica, microbiología, etc.), y compararlo con un tratamiento de cocción convencional.

CAPITULO 7

REFERENCIAS

- Abid, M., Jabbar, S., Hu, B., Hashim, M. M., Wu, T., Lei, S. y Zeng, X. (2014). Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(3), 984-990.
- Ahmad-Qasem, M. H., Cánovas, J., Barraón-Catalán, E., Micol, V., Cárcel, J. A. y García-Pérez, J. V. (2013). Kinetic and compositional study of phenolic extraction from olive leaves (var. Serrana) by using power ultrasound. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 17, 120-129.
- Alzamora, S. M., Guerrero, S. N., López-Malo, A., Palou, E., Char, C. D. y Raffellini, S. (2009). 4. Models for Microorganism Inactivation: Application in Food Preservation Design. *Processing Effects on Safety and Quality of Foods*, 87-115
- Andrés, A. I., Moller, J. K. S., Adamsen, C. E. y Skibsted, L. H. (2004). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on radical formation, lipid oxidation and colour. *European Food Research and Technology*, 219, 205-210.
- Andrés, A. I., Adamsen, C. E., Moller, J. K. S., Ruiz, J. y Skibsted, L. H. (2006). High pressure treatment of dry-cured Iberian ham. Effect on colour and oxidative stability during chill storage packed in modified atmosphere. *European Food Research and Technology*, 222, 486-491.
- AOAC. (1990). AOAC. 1990. Official methods of analysis (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA
- AOAC (1997). AOAC. 1997. Official methods of analysis of AOAC international (16th ed., 3rd revision).
- Aragao, G. M., Corradini, M. G., Normand, M. D. y Peleg, M. (2007). Evaluation of the Weibull and log normal distribution functions as survival models

- of *Escherichia coli* under isothermal and non isothermal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 119(3), 243-257.
- Bae, Y. Y., Choi, Y. M., Kim, M. J., Kim, K. H., Kim, B. C. y Rhee, M. S. (2011). Application of supercritical carbon dioxide for microorganism reductions in fresh pork. *Journal of Food Safety*, 31(4), 511 - 517.
- Balachandran, S., Kentish, S. E., Mawson, R. y Ashokkumar, M. (2006). Ultrasonic enhancement of the supercritical extraction from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(6), 471-479.
- Barbosa-Cánovas, G. y Bermúdez-Aguirre, D. (2010). Procesamiento no térmico de alimentos. *Scientia Agropecuaria*, 1(1), 81-93.
- Bello J. (2008). Jamón curado. Aspectos científicos y tecnológicos. Perspectiva desde la Unión Europea. Ed. Díaz de Santos. España. 605 p.
- Bendicho, S., Barbosa-Cánovas, G. V. y Martín, O. (2002). Milk processing by high intensity pulsed electric fields. *Trends in Food Science y Technology*, 13(6), 195-204.
- Benedito, J. J., Martínez-Pastor, M. T., Mulet, A., Ortuño, C., y Peña, R. (2011). Procedure of inactivation microorganisms by combination of supercritical fluids and ultrasound. Spain. Patent, (P201131099).
- Bermúdez-Aguirre, D., y Barbosa-Cánovas, G. V. (2011). Recent advances in emerging nonthermal technologies. In *Food engineering interfaces* (pp. 285-323). Springer New York.
- Brewer, M. S. (2009). Irradiation effects on meat flavor: A review. *Meat science*, 81(1), 1-14.
- Brunner, G. (2005). Supercritical fluids: technology and application to food processing. *Journal of Food Engineering*, 67(1), 21-33.

- Buzrul, S., Alpas, H. y Bozoglu, F. (2005). Use of Weibull frequency distribution model to describe the inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* by high pressure at different temperatures. *Food Research International*, 38(2), 151-157.
- Buzrul, S., Alpas, H., Largeteau, A. y Demazeau, G. (2008). Modeling high pressure inactivation of *Escherichia coli* and *Listeria innocua* in whole milk. *European Food Research and Technology*, 227(2), 443-448.
- Cabeza, M. C., Ordóñez, J. A., Cambero, I., De la Hoz, L. y García, M. L. (2004). Effect of thermoultrasonication on *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in distilled water and intact shell eggs. *Journal of Food Protection*, 67(9), 1886-1891.
- Calvo, L., Muguerra, B. y Cienfuegos-Jovellanos, E. (2007). Microbial inactivation and butter extraction in a cocoa derivative using high pressure CO₂. *Journal of Supercritical Fluids*, 42, 80 - 87.
- Calvo, L. y Torres, E. (2010). Microbial inactivation of paprika using high-pressure CO₂. *The Journal of Supercritical Fluids*, 52, 134 - 141.
- Cappelletti, M., Ferrentino, G. y Spilimbergo, S. (2014). Supercritical carbon dioxide combined with high power ultrasound: An effective method for the pasteurization of coconut water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 257-263.
- Carballo, J., Fernandez, P., Barreto, G., Solas, M. T. y Colmenero, F. J. (1996). Morphology and texture of bologna sausage as related to content of fat, starch and egg white. *Journal of Food Science*, 61(3), 652-665.
- Cárcel, J. A. (2003). Influencia de los ultrasonidos de potencia en procesos de transferencia de materia. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de Valencia, España.

- Cárcel, J. A., Benedito, J., Bon, J. y Mulet, A. (2007). High intensity ultrasound effects on meat brining. *Meat Science*, 76(4), 611-619.
- Cárcel, J. A., García-Pérez, J. V., Benedito, J., y Mulet, A. (2012). Food process innovation through new technologies: Use of ultrasound. *Journal of Food Engineering*, 110(2), 200-207.
- Carlez, A., Veciana-Nogues, T. y Cheftel J. C. (1995). Changes of colour and myoglobin of minced beef meat due to high pressure processing. *LWT-Food Science and Technology*, 28, 528-538.
- Casiraghi, E., Alamprese, C. y Pompei, C. (2007). Cooked ham classification on the basis of brine injection level and pork breeding country. *LWT-Food Science and Technology*, 40(1), 164-169.
- Cava, R., Ladero, L., González, S., Carrasco, A. y Ramírez, M. R. (2009). Effect of pressure and holding time on colour, protein and lipid oxidation of sliced dry-cured Iberian ham and loin during refrigerated storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10, 76-81.
- Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S. y Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing. *Ultrasonics sonochemistry*, 19(5), 975 -983.
- Chang, H. J., Xu, X. L., Zhou, G. H., Li, C. B. y Huang, M. (2012). Effects of characteristics changes of collagen on meat physicochemical properties of beef semitendinosus muscle during ultrasonic processing. *Food and Bioprocess Technology*, 5(1), 285-297.
- Chao, R. R., Mulvaney, S. J., Bailey, M. E. y Fernando, L. N. (1991). Supercritical CO₂ conditions affecting extraction of lipid and cholesterol from ground beef. *Journal Food Science*, 56, 183 - 187.
- Chemat, F., y Khan, M. K. (2011). Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4), 813-835.

- Choi, Y. M., Ryu, Y. C., Lee, S. H., Go, G. W., Shin, H. G. y Kim, K. H. (2008). Effects of supercritical carbon dioxide treatment for sterilization purpose on meat quality of porcine *longissimus dorsi* muscle. *LWT-Food Science and Technology* 1, 317–322.
- Choi, Y. M., Bae Y. Y., Kim K. H., Kim B. C, y Rhee M. S. (2009a) Effects of supercritical carbon dioxide treatment against generic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, and *E. coli* O157:H7 in marinades and marinated pork. *Meat Science* 82, 419–424.
- Choi, Y. M., Kim, O. Y, Kim KH, Kim B. C, Rhee, M. S (2009b) Combined effect of organic acids and supercritical carbon dioxide treatments against nonpathogenic *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *E. coli* O157:H7 in fresh pork. *Letters in Applied Microbiology*, 49, 510–515.
- Cocero, M. J., Martín, Á., Mattea, F. y Varona, S. (2009). Encapsulation and coprecipitation processes with supercritical fluids: fundamentals and applications. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(3), 546 - 555.
- Collignan, A., Bohuon, P., Deumier, F., y Poligné, I. (2001). Osmotic treatment of fish and meat products. *Journal of Food Engineering*, 49(2), 153-162.
- Colmenero, F. J. (2002). Muscle protein gelation by combined use of high pressure/temperature. *Trends in Food Science and Technology*, 13(1), 22-30.
- Corona, E. (2013). Caracterización de la calidad de productos cárnicos crudo-curados mediante la aplicación de ultrasonidos de señal. Tesis Doctoral. Universitat Politècnica de València, España.

- Coronel, C. P., Jiménez, M. T., López-Malo, A. y Palou, E. (2011). Modelling thermosonication inactivation of *Aspergillus flavus* combining natural antimicrobial at different pH. *Procedia Food Science*, 1, 1007-1014.
- Corradini, M. G. y Peleg, M. (2007). A Weibullian model for microbial injury and mortality. *International Journal of Food Microbiology*, 119(3), 319-328.
- Corradini, M.G. y Peleg, M. (2012). The kinetics of microbial inactivation by carbon dioxide under high pressure, in M. O. Balaban y G. Ferrentino (Eds.). *Dense phase carbon dioxide: food and pharmaceutical applications*, (pp. 135-155). USA, Blackwell Publishing Professional.
- Crehan, C. M., Troy, D. J. y Buckley, D. J. (2000). Effects of salt level and high hydrostatic pressure processing on frankfurters formulated with 1.5 and 2.5% salt. *Meat Science*, 55(1), 123-130.
- Damar, S. y Balaban, M. O. (2006). Review of dense phase CO₂ technology: microbial and enzyme inactivation, and effects on food quality. *Journal of Food Science*, 71, 1-11.
- Daniels, J. A., Krishnamurthi, R. y Rizvi, S. S. H. (1985). A review of the effects of carbon dioxide on microbial growth and food quality. *Journal Food Protection*, 48, 532-537.
- De Alba, M., Montiel, R., Bravo, D., Gaya, P. y Medina, M. (2012). High pressure treatments on the inactivation of *Salmonella Enteritidis* and the physicochemical, rheological and color characteristics of sliced vacuum-packaged dry-cured ham. *Meat Science*, 91(2), 173-178.
- De Alba, M., Bravo, D. y Medina, M. (2013). Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 in dry-cured ham by high-pressure treatments combined with biopreservatives. *Food Control*, 31(2), 508-513.

- Del Olmo, A., Morales, P., Ávila, M., Calzada, J. y Nuñez, M. (2010). Effect of single-cycle and multiple-cycle high-pressure treatments on the colour and texture of chicken breast fillets. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 11(3), 441-444.
- Dickens, J. A.; Lyon, C. E. y Wilson, R. L. (1991). Effect of ultrasonic radiation on some physical characteristics of broiler breast muscle and cooked meat. *Poultry Science*, 70, 389-396.
- Dillow, A. K., Dehghani, F., Hrkach, J. S., Foster, N. R. y Langer, R. (1999). Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 10344-10348.
- Dolatowski Z. J, (1989). Ultrasonics 3. Influence of ultrasonics on the production technology and quality of cooked ham. *Fleischwirtschaft* 69 (1), 106-111.
- ElMasry, G., Iqbal, A., Sun, D. W., Allen, P., y Ward, P. (2011). Quality classification of cooked, sliced turkey hams using NIR hyperspectral imaging system. *Journal of Food Engineering*, 103(3), 333-344.
- Erkmen, O. (2000). Antimicrobial effect of pressurized carbon dioxide on *Enterococcus faecalis* in physiological saline and foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 465-470.
- Erkmen, O. (2000). Effect of carbon dioxide pressure on *Listeria monocytogenes* in physiological saline and foods. *Food Microbiology*, 17(6), 589-596.
- Erkmen, O. (2012). *Effects of dense phase carbon dioxide on vegetative cells*, in M. O. Balaban y G. Ferrentino (Eds.). *Dense phase carbon dioxide: food and pharmaceutical applications*, (pp. 67-97). USA, Blackwell Publishing Professional.

- Esclapez, M. D., García-Pérez, J. V., Mulet, A. y Cárcel, J. A. (2011). Ultrasound-assisted extraction of natural products. *Food Engineering Reviews*, 3(2), 108-120.
- Evrendilek, G. A., Tok, F. M., Soyly, E. y Soyly, S. (2008). Inactivation of *Penicillium expansum* in sour cherry juice, peach and apricot nectars by pulsed electric fields. *Food microbiology*, 25(5), 662-667.
- FAO y WHO. Food and Agriculture Organisation, World Health Organisation. (2006). The Use of Microbiological Risk Assessment Outputs to Develop Practical Risk Management Strategies: Metrics to improve food safety. Report of a Joint Expert Meeting, Kiel, Germany, 3 – 7 April 2006. FAO, Rome
- Farber, J. M. (1991). Microbiological aspects of modified-atmosphere packaging technology-a review. *Journal of Food Protection*, 54(1), 58-70.
- Fennema, O. (2010). *Química de los Alimentos [Food Chemistry]*. Zaragoza, Spain: Editorial Acribia, SA.
- Fernandez, P., Cofrades, S., Solas, M. T., Carballo, J. y Colmenero, F. J. (1998). High Pressure-Cooking of Chicken Meat Batters with Starch, Egg White, and Iota Carrageenan. *Journal of food science*, 63(2), 267-271.
- Fernández-Molina, J. J., Barbosa-Cánovas, G. V. y Swanson, B. G. (2001). Tecnologías emergentes para la conservación de alimentos sin calor. *Arbor*, 168(661), 155-170.
- Ferrentino, G. y Spilimbergo, S. (2011). High pressure carbon dioxide pasteurization of solid foods: current knowledge and future outlooks. *Trends in Food Science y Technology*, 22(8), 427-441.
- Ferrentino, G. y Spilimbergo, S. (2015). High pressure carbon dioxide combined with high power ultrasound pasteurization of fresh cut carrot. The

Journal of Supercritical Fluids, <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2014.12.014>

- Ferrentino, G., Plaza, M. L., Ramírez-Rodríguez, M., Ferrari, G. y Balaban, M. O. (2009). Effects of dense phase carbon dioxide pasteurization on the physical and quality attributes of a red grapefruit juice. *Journal of Food Science*, 74(6), 333-341.
- Ferrentino, G., Balaban, M. O., Ferrari, G. y Poletto, M. (2010). Food treatment with high pressure carbon dioxide: *Saccharomyces cerevisiae* inactivation kinetics expressed as a function of CO₂ solubility. *The Journal of Supercritical Fluids*, 52(1), 151-160.
- Ferrentino, G., Balzan, S., Pegoretti, A. y Spilimbergo, S. (2012a). Effect of Supercritical CO₂ Pasteurization on natural microflora and quality attributes Of Fresh-Cut Coconut. *Journal of Food Science*. 77, 137-143.
- Ferrentino, G., Balzan, S. y Spilimbergo, S. (2012b). On-line color monitoring of solid foods during supercritical CO₂ pasteurization. *Journal of Food Engineering*, 110(1), 80-85.
- Ferrentino, G., Calix, T., Poletto, M., Ferrari, F. and Balaban, M. (2012c). *Experimental Measurement of Carbon Dioxide Solubility*, in M. O. Balaban and G. Ferrentino (Eds.). *Dense phase carbon dioxide: food and pharmaceutical applications*, (pp. 37-66). USA, Blackwell Publishing Professional.
- Ferrentino, G., Belscak-Cvitanovic, A., Komes, D. y Spilimbergo, S. (2013a). Quality Attributes of Fresh-Cut Coconut after Supercritical Carbon Dioxide Pasteurization. *Journal of Chemistry*.
- Ferrentino, G., Balzan, S. y Spilimbergo, S. (2013b). Supercritical carbon dioxide processing of dry cured ham spiked with *Listeria monocytogenes*:

inactivation kinetics, color, and sensory evaluations. *Food and Bioprocess Technology*, 6(5), 1164-1174.

Ferrentino, G., Balzan, S. y Spilimbergo, S. (2013c). Optimization of supercritical carbon dioxide treatment for the inactivation of the natural microbial flora in cubed cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*, 161(3), 189-196.

Ferrentino, G., Calliari, N., Bertucco, A. y Spilimbergo, S. (2014). Validation of a mathematical model for predicting high pressure carbon dioxide inactivation kinetics of *Escherichia coli* spiked on fresh cut carrot. *The Journal of Supercritical Fluids*, 85, 17-23.

Foster, J. W., Cowan, R. M. y Maag, T. A. (1962). Rupture of bacteria by explosive decomposition. *Journal of Bacteriology*, 83, 330-334.

Fraser, D. (1951). Bursting bacteria by release of gas pressure. *Nature*, 167, 33-34.

Fuentes, V., Ventanas, J., Morcuende, D., Estévez, M. y Ventanas, S. (2010). Lipid and protein oxidation and sensory properties of vacuum-packaged dry-cured ham subjected to high hydrostatic pressure. *Meat Science*, 85(3), 506-514.

Galvanin, F., De Luca, R., Ferrentino, G., Barolo, M., Spilimbergo, S. y Bezzo, F. (2014). Bacterial inactivation on solid food matrices through supercritical CO₂: A correlative study. *Journal of Food Engineering*, 120, 146 - 157.

García-González, L., Geeraerd, A.H., Spilimbergo, S. Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J.F. y Devlieghere, F. (2007). High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*, 117, 1-28.

- García-González, L., Geeraerd, A.H., Elst, K., Van Ginneken, L., Van Impe, J.F. y Devlieghere, F. (2009). Influence of type of microorganism, food ingredients and food properties on high-pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms. *International Journal of Food Microbiology* 129, 253-263.
- García-González, L., Geeraerd, A. H., Mast, J., Briers, Y., Elst, K., Van Ginneken, L., Van Impe, J. F. y Devlieghere, F. (2010). Membrane permeabilization and cellular death of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Saccharomyces cerevisiae* as induced by high pressure carbon dioxide treatment. *Food Microbiology*, 27, 541-549.
- García-Pérez, J. V., Cárcel, J. A., Benedito, J. y Mulet, A. (2007). Power ultrasound mass transfer enhancement in food drying. *Food and Bioproducts Processing*, 85(3), 247-254.
- García-Pérez, J. V., Ortuño, C., Puig, A., Carcel, J. A. y Perez-Munuera, I. (2012). Enhancement of water transport and microstructural changes induced by high-intensity ultrasound application on orange peel drying. *Food and Bioprocess Technology*, 5(6), 2256-2265.
- Geeraerd, A. H., Herremans, C. H. y Van Impe, J. F. (2000). Structural model requirements to describe microbial inactivation during a mild heat treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 59(3), 185-209.
- Gómez, V. M., Ragaert, P., Debevere, J. y Devlieghere, F. (2007). Pulsed light for food decontamination: A review. *Trends in Food Science y Technology*, 18(9), 464-473.
- Got, F., Culioli, J., Berge, P., Vignon, X., Astruc, T., Quideau, J. M. y Lethiecq, M. (1999). Effects of high-intensity high-frequency ultrasound on ageing rate, ultrastructure and some physico-chemical properties of beef. *Meat Science*, 51(1), 35-42.

- Grajales, A., Rivera, C., Ruiz, M., González, R., Ramírez J. y Abud M. (2012). Effect of lactic acid on the meat quality properties and taste of pork *Serratus ventralis* muscle. *Agricultural and Food Science*, 21, 171-181.
- Halpin, R.M., Cregenzán-Alberti, O., Whyte, P., Lyng, J. G. y Noci, F. (2013). Combined treatment with mild heat, manothermosonication and pulsed electric fields reduces microbial growth in milk. *Food Control*, 34, 364-371.
- Han, I. H. y Baik, B. K. (2006). Oligosaccharide content and composition of legumes and their reduction by soaking, cooking, ultrasound, and high hydrostatic pressure. *Cereal Chemistry*, 83(4), 428-433.
- Hartmann, C. y Delgado, A. (2004). Numerical simulation of the mechanics of a yeast cell under high hydrostatic pressure. *Journal of Biomechanics*, 37, 977-987
- Haughton, P. N., Lyng, J. G., Cronin, D. A., Morgan, D. J., Fanning, S. y Whyte, P. (2012). Efficacy of pulsed electric fields for the inactivation of indicator microorganisms and foodborne pathogens in liquids and raw chicken. *Food Control*, 25(1), 131-135.
- Hereu, A., Dalgaard, P., Garriga, M., Aymerich, T. y Bover-Cid, S. (2012). Modeling the high pressure inactivation kinetics of *Listeria monocytogenes* on RTE cooked meat products. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 16, 305-315.
- Herrero, M., Cifuentes, A. y Ibanez, E. (2006). Sub-and supercritical fluid extraction of functional ingredients from different natural sources: Plants, food-by-products, algae and microalgae: A review. *Food Chemistry*, 98(1), 136-148.
- Hierro, E., Barroso, E., la Hoz, L. D., Ordóñez, J. A., Manzano, S. y Fernández, M. (2011). Efficacy of pulsed light for shelf-life extension and

- inactivation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat cooked meat products. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 12(3), 275-281.
- Hong, S. I. y Pyun, Y. R. (2001). Membrane damage and enzyme inactivation of *Lactobacillus plantarum* by high pressure CO₂ treatment. *International Journal of Food Microbiology*, 63(1), 19 - 28.
- Hong, S. I., Park, W. S. y Pyun, Y. R. (1997). Inactivation of *Lactobacillus* sp. from *Kimchi* by High Pressure Carbon Dioxide. *LWT-Food Science and Technology*, 30(7), 681-685.
- Hong, S.I. y Pyun, Y.R. (1999). Inactivation kinetics of *Lactobacillus plantarum* by high pressure carbon dioxide. *Journal of Food Science*, 64, 728-733.
- Hongmei, L., Zhong, K., Liao, X., y Hu, X. (2014). Inactivation of microorganisms naturally present in raw bovine milk by high-pressure carbon dioxide. *International Journal of Food Science y Technology*, 49(3), 696-702.
- Huff-Lonergan, E. J., Baas, T. J., Malek, M., Dekkers, J., Prusa, K. J. y Rothschild, M. F. (2002). Correlations among selected pork quality traits. *Journal of Animal Science*, 80(3), 617.
- Hugas, M., Garriga, M. y Monfort, J. M. (2002). New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat science*, 62, 359-371.
- Iqbal, A., Sun, D. W. y Allen, P. (2013). Prediction of moisture, color and pH in cooked, pre-sliced turkey hams by NIR hyperspectral imaging system. *Journal of Food Engineering*, 117(1), 42-51.

- Jakobsen, M. y Bertelsen, G. (2002). The use of CO₂ in packaging of fresh red meats and its effect on chemical quality changes in the meat: A review. *Journal of Muscle Foods*, 13(2), 143-168.
- Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Herceg, Z., y Herceg, I. L. (2008). Effect of ultrasound treatment on solubility and foaming properties of whey protein suspensions. *Journal of Food Engineering*, 86(2), 281-287.
- Jayasooriya, S. D., Bhandari, B. R., Torley, P. y D'Arcy, B. R. (2004). Effect of high power ultrasound waves on properties of meat: A review. *International Journal of Food Properties*, 7(2), 301-319.
- Jayasooriya, S. D., Torley, P. J., D'Arcy, B. R. y Bhandari, B. R. (2007). Effect of high power ultrasound and ageing on the physical properties of bovine *semitendinosus* and *longissimus* muscles. *Meat Science*, 75, 628-639.
- Ji, H., Zhang, L., Liu, S., Qu, X., Zhang, C. y Gao, J. (2012). Optimization of microbial inactivation of shrimp by dense phase carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 156(1), 44-49.
- Joyce, E. M. y Mason, T. J. (2008). Sonication used as a biocide A review: Ultrasound a greener alternative to chemical biocides?. *Chimica Oggi-Chemistry Today*, 26(6), 22.
- Jung, J. y Perrut, M. (2001). Particle design using supercritical fluids: literature and patent survey. *The Journal of Supercritical Fluids*, 20(3), 179-219.
- Kanatt, S. R., Chander, R. y Sharma, A. (2005). Effect of radiation processing on the quality of chilled meat products. *Meat science*, 69(2), 269-275.
- Kiang, W. S., Bhat, R., Rosma, A. y Cheng, L. H. (2013). Effects of thermosonication on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and

- Salmonella Enteritidis* in mango juice. Letters in applied microbiology, 56(4), 251-257.
- Kim, S.R., Rhee, M.S., Kim, B.C., Lee, H. y Kim, K. H. (2007). Modeling of the inactivation of *Salmonella typhimurium* by supercritical carbon dioxide in physiological saline and phosphate-buffered saline. Journal of Microbiological Methods, 70, 132-141.
- Knorr, D., Ade-Omowaye, B. y Heinz, V. (2002). Nutritional improvement of plant foods by non-thermal processing. Proceedings of the Nutrition Society, 61(02), 311-318.
- Knorr, D., Zenker, M., Heinz, V. y Lee, D. (2004). Applications and potential of ultrasonics in food processing. Trends in Food Science y Technology, 15 (5), 261-266.
- Koutchma, T., and Murakami, E. (2005). *Effect of Carbon Dioxide and Pressure Processing on Microbial and Enzyme Inactivation in Food and Beverages*. Chicago: National Center in Food Safety and Technology. <http://www.foodtechinternational.com/papers/effectofcarbondi-oxide.htm>
- Kruk, Z. A., Yun, H., Rutley, D. L., Lee, E. J., Kim, Y. J. y Jo, C. (2011). The effect of high pressure on microbial population, meat quality and sensory characteristics of chicken breast fillet. Food Control, 22(1), 6-12.
- Lee, H., Zhou, B., Liang, W., Feng, H. y Martin, S.E. (2009). Inactivation of *Escherichia coli* cells with sonication, manosonication, thermosonication, and manothermosonication: Microbial responses and kinetics modeling. Journal of Food Engineering, 93, 354-364.
- Lepetit, J., Grajales, A. y Favier, R. (2000). Modelling the effect of sarcomere length on collagen thermal shortening in cooked meat: consequence on meat toughness. Meat Science, 54(3), 239-250.

- Lepetit, J. (2008). Collagen contribution to meat toughness: Theoretical aspects. *Meat Science*, 80(4), 960-967.
- Li, H., Deng, L., Chen, Y. y Liao, X. (2012a). Inactivation, morphology, interior structure and enzymatic activity of high pressure CO₂-treated *Saccharomyces cerevisiae*. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 14, 99-106.
- Li, W., Pan, J., Xie, H., Yang, Y., Zhou, D., y Zhu, Z. (2012b). Pasteurization of Fruit Juices of Different pH Values by Combined High Hydrostatic Pressure and Carbon Dioxide. *Journal of Food Protection*, 75(10), 1873-1877.
- Li, K., Kang, Z. L., Zhao, Y. Y., Xu, X. L. y Zhou, G. H. (2014). Use of high-intensity ultrasound to improve functional properties of batter suspensions Prepared from PSE-like Chicken Breast Meat. *Food and Bioprocess Technology*, 7(12), 3466-3477.
- Liao, H., Hu, X., Liao, X., Chen, F. y Wu, J. (2006). Inactivation of *Escherichia coli* inoculated into cloudy apple juice exposed to dense phase carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 118, 126-131.
- Liao, H., Zhang, Y., Hu, X., Lao, Z. y Wu, J. (2008). Behavior of inactivation kinetics of *Escherichia coli* by dense phase carbon dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 126, 93-97.
- Liao, H., Zhang, L., Hu, X. y Liao, X. (2010). Effect of high pressure CO₂ and mild heat processing on natural microorganisms in apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 137, 81-87.
- Liu, Y., Fan, X., Chen, Y. R. y Thayer, D. W. (2003). Changes in structure and color characteristics of irradiated chicken breasts as a function of dosage and storage time. *Meat Science*, 63(3), 301-307.

- Lyng J. G., Allen P. y McKenna B. M. (1997). The influence of high intensity ultrasound baths on aspects of beef tenderness. *Journal of Muscle Foods* 8(3), 237-249.
- Mafart, P., Couvert, O., Gaillard, S. y Leguérinel, I. (2002). On calculating sterility in thermal preservation methods: application of the Weibull frequency distribution model. *International Journal of Food Microbiology*, 72(1), 107-113.
- MARM (2010): Consumo Alimentario en España, Ministerio de Medio Ambiente, y Medio Rural y Marino e Instituto Cerdá, Madrid. www.marm.es
- Mason, T. J. y Lorimer, J. P. (2002). The uses of power ultrasound in chemistry and processing, *Applied Sonochemistry*. 1-48.
- Mason, T. J., Linde, B. B., Paczkowski, J. y Ponikwicki, N. (2012). Trends in sonochemistry and ultrasonic processing. In *AIP Conference Proceedings-American Institute of Physics*, 1433(1), 21.
- Matsufuji, H., Furukawa, S., Teranishi, K., Kawaharada, K., Chino, M. y Yamagata, K. (2009). Effects of nonthermal processes on the inactivation of microorganisms and antioxidants in minimally processed vegetables. *Food Science Technology Research*, 15, 153 - 162.
- Messens, W., Van Camp, J. y Huyghebaert, A. (1997). The use of high pressure to modify the functionality of food proteins. *Trends in Food Science and Technology*, 8(4), 107-112.
- Meujo, D. A. F., Kevin, D. A., Peng, J., Bowling, J. J., Liu, J. y Hamann, M. T. (2010). Reducing oyster-associated bacteria levels using supercritical fluid CO₂ as an agent of warm pasteurization. *International Journal of Food Microbiology*, 138, 63 - 70.
- Meurehg, T.C.A. (2006). Control of *Escherichia coli* O157:H7, generic *Escherichia coli*, and *Salmonella* spp. on beef trimmings prior to grinding using a

- controlled phase carbon dioxide (cpCO₂) system. PhD Thesis, Manhattan, Kansas: Kansas State University.
- Mokrzycki, W. S. y Tatol, M. (2012). Color difference $\Delta E-A$ survey. *Machine Graphic & Vision*, 8.
- Monin, G., Marinova, P., Talmant, A., Martin, J. F., Cornet, M., Lanore, D. y Grasso, F. (1997). Chemical and structural changes in dry-cured hams (Bayonne hams) during processing and effects of the dehairing technique. *Meat Science*, 47(1), 29-47.
- Montgomery, D. C. (2008). Design and analysis of experiments. John Wiley and Sons.
- Moore, V. J. y Gill, C. O. (1989). The pH and display life of chilled lamb after prolonged storage under vacuum or under CO₂. *New Zealand Journal of Agricultural Research*, 30, 449-452.
- Mulet, A., Cárcel, J. A., Sanjuan, N., García-Pérez, J. V. y Delgado, J. M. P. Q. (2010). Food dehydration under forced convection conditions. *Current Trends in Chemical Engineering*, 153-177.
- Muralidhara, H. S., Ensminger, D., y Putnam, A. (1985). Acoustic dewatering and drying (low and high frequency): State of the art review. *Drying Technology*, 3(4), 529-566.
- Nummer, B. A., Harrison, J. A., Harrison, M. A., Kendall, P., Sofos, J. N. y Andres, E. L. (2004). Effects of preparation methods on the microbiological safety of home-dried meat jerky. *Journal of Food Protection*, 67(10), 2337-2341.
- O'donnell, C. P., Tiwari, B. K., Bourke, P. y Cullen, P. J. (2010). Effect of ultrasonic processing on food enzymes of industrial importance. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 358-367.

- Ortuño Cases, C. (2014). Aplicación de ultrasonidos de potencia para la mejora de procesos de inactivación con fluidos supercríticos. Tesis Doctoral, Universitat Politècnica de Valencia, España.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M. T., Mulet, A. y Benedito, J. (2012a). Supercritical carbon dioxide inactivation of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* in different growth stages. *The Journal of Supercritical Fluids*, 63, 8-15.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M. T., Mulet, A. y Benedito, J. (2012b). An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 15, 31-37.
- Ortuño, C., Martínez-Pastor, M. T., Mulet, A. y Benedito, J. (2013a). Application of high power ultrasound in the supercritical carbon dioxide inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 51(2), 474-481.
- Ortuño, C., Duong, T., Balaban, M. y Benedito, J. (2013b). Combined high hydrostatic pressure and carbon dioxide inactivation of pectin methylesterase, polyphenol oxidase and peroxidase in feijoa puree. *The Journal of Supercritical Fluids*, 82, 56-62.
- Ortuño, C., Balaban, M., y Benedito, J. (2014a). Modelling of the inactivation kinetics of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *pectin methylesterase* in orange juice treated with ultrasonic-assisted supercritical carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 90, 18-26.
- Ortuño, C., Quiles, A. y Benedito, J. (2014b). Inactivation kinetics and cell morphology of *E. coli* and *S. cerevisiae* treated with ultrasound-assisted supercritical CO₂. *Food Research International*, 62, 955-964.

- Oulé, M. K., Tano, K., Bernier, A. M., y Arul, J. (2006). *Escherichia coli* inactivation mechanism by pressurized CO₂. Canadian Journal of Microbiology, 52(12), 1208-1217.
- Ozuna López, C. (2014). Estudio de la aplicación de ultrasonidos de alta intensidad en sistemas sólido-líquido y sólido-gas. Influencia en la cinética de transporte de materia y en la estructura de los productos Tesis Doctoral, Editorial Universitat Politècnica de València, España.
- Ozuna, C., Puig, A., García-Pérez, J. V., Mulet, A. y Cárcel, J. A. (2013). Influence of high intensity ultrasound application on mass transport, microstructure and textural properties of pork meat *Longissimus dorsi* brined at different NaCl concentrations. Journal of Food Engineering, 119(1), 84-93.
- Ozuna, C., Gómez Álvarez-Arenas, T., Riera, E., Cárcel, J. A. y García-Pérez, J. V. (2014a). Influence of material structure on air-borne ultrasonic application in drying. Ultrasonics Sonochemistry, 21(3), 1235-1243.
- Ozuna, C., Cárcel, J. A., Walde, P. M. y García-Perez, J. V. (2014b). Low-temperature drying of salted cod (*Gadus morhua*) assisted by high power ultrasound: Kinetics and physical properties. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 23, 146-155.
- Park, S.J., Lee, J. I. y Park, J. (2002). Effects of a combined process of high-pressure carbon dioxide and high hydrostatic pressure on the quality of carrot juice. Journal of Food Science, 67, 1827-1834.
- Parton, T., Bertucco, A., Elvassore, N., y Grimolizzi, L. (2007). A continuous plant for food preservation by high pressure CO₂. Journal of food engineering, 79(4), 1410-1417.

- Pataro, G., Ferrentino, G., Ricciardi, C. y Ferrari, G. (2010). Pulsed electric fields assisted microbial inactivation of *S. cerevisiae* cells by high pressure carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids*, 54, 120-128.
- Peleg, M. (2003). Microbial survival curves: interpretation, mathematical modeling, and utilization. *Comments on Theoretical Biology*, 8(4-5), 357-387.
- Peleg, M. (2006). *Advanced Quantitative Microbiology for Foods and Biosystems*. Florida, EE.UU: CRC Boca Ratón.
- Peleg, M. y Cole, M. B. (1998). Reinterpretation of microbial survival curves. *Critical Reviews in Food Science*, 38(5), 353-380.
- Peleg, M. y Pechina, C. M. (2000). Modeling microbial survival during exposure to a lethal agent with varying intensity. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(2), 159-172.
- Peleg, M., Engel, R., Gonzalez-Martinez, C. y Corradini, M. G. (2002). Non-Arrhenius and non-WLF kinetics in food systems. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 82(12), 1346-1355.
- Pérez-Álvarez, J. A. y Fernández-López, J. (2009). Color characteristics of meat and poultry processing. *Handbook of processed meats and poultry analysis*, 355-373.
- Perrut, M. (2012). Sterilization and virus inactivation by supercritical fluids (a review). *Journal of Supercritical Fluids*, 66, 359-371.
- Pingret, D., Fabiano-Tixier, A. S., y Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31(2), 593-606.

- Piyasena, P., Mohareb, E. y McKellar, R. C. (2003). Inactivation of microbes using ultrasound: a review. *International Journal of Food Microbiology*, 87(3), 207-216.
- Pohlman, F. W., Dikeman, M. E. y Zayas, J. F. (1997a). The effect of low-intensity ultrasound treatment on shear properties, color stability and shelf-life of vacuum-packaged beef *semitendinosus* and *biceps femoris* muscles. *Meat Science*, 45(3), 329-337.
- Pohlman, F. W., Dikeman, M. E. y Kropf, D. H. (1997b). Effects of high intensity ultrasound treatment, storage time and cooking method on shear, sensory, instrumental color and cooking properties of packaged and unpackaged beef *pectoralis* muscle. *Meat Science*, 46(1), 89-100.
- Pohlman, F. W., Dikeman, M. E., Zayas, J. F. y Unruh, J. A. (1997c). Effects of ultrasound and convection cooking to different end point temperatures on cooking characteristics, shear force and sensory properties, composition, and microscopic morphology of beef *longissimus* and *pectoralis* muscles. *Journal of Animal science*, 75(2), 386-401.
- Puig, A., Perez-Munuera, I., Cárcel, J. A., Hernando, I. y Garcia-Pérez, J. V. (2012). Moisture loss kinetics and microstructural changes in eggplant (*Solanum melongena* L.) during conventional and ultrasonically assisted convective drying. *Food and Bioproducts Processing*, 90(4), 624-632.
- Raso, J., Alvarez, I., Condón, S., y Sala Trepas, F. J. (2000). Predicting inactivation of *Salmonella senftenberg* by pulsed electric fields. *Innovative Food Science y Emerging Technologies*, 1(1), 21-29.
- Rendueles, E., Omer, M. K., Alvseike, O., Alonso-Calleja, C., Capita, R. y Prieto, M. (2011). Microbiological food safety assessment of high hydrostatic

- pressure processing: A review. *LWT-Food Science and Technology*, 44(5), 1251-1260.
- Ricke, S. C., Diaz, I. Z., Keeton, J. T., Doyle, M. P. y Beuchat, L. R. (2007). Fermented meat, poultry and fish products. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, (Edn. 3), 795-815.
- Riera, E., Gallego-Juárez, J. A. y Mason, T. J. (2006). Airborne ultrasound for the precipitation of smokes and powders and the destruction of foams. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(2), 107-116.
- Riera, E., Blanco, A., García, J., Benedito, J., Mulet, A., Gallego-Juárez, J. A. y Blasco, M. (2010). High-power ultrasonic system for the enhancement of mass transfer in supercritical CO₂ extraction processes. *Ultrasonics*, 50(2), 306-309.
- Riera, E., García-Pérez, J. V., Acosta, V. M., Carcel, J. A. y Gallego-Juárez, J. A. (2011). Computational study of ultrasound-assisted drying of food materials. *Innovative Food Processing Technologies: Advances in Multiphysics Simulation*. John Wiley and Sons Ltd, 265-301.
- Riera, E., Golas, Y., Blanco, A., Gallego, J. A., Blasco, M. y Mulet, A. (2004). Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound. *Ultrasonics Sonochemistry*, 11(3), 241-244.
- Rodríguez, J., Mulet, A. y Bon, J. (2014). Influence of high-intensity ultrasound on drying kinetics in fixed beds of high porosity. *Journal of Food Engineering*, 127, 93-102.
- Rodríguez, Ó., Ortuno, C., Simal, S., Benedito, J., Femenia, A. y Rosselló, C. (2014). Acoustically assisted supercritical CO₂ extraction of cocoa butter: Effects on kinetics and quality. *The Journal of Supercritical Fluids*, 94, 30-37.

- Ryu, Y. C., Lee, S. H., Go, G. W., Shin, H. G., Kim, K. H. y Kim, B. C. (2008). Effects of supercritical carbon dioxide treatment for sterilization purpose on meat quality of porcine *longissimus dorsi* muscle. *LWT-Food Science Technology* 41(2), 317-322. 41:317-322.
- Sanders, N. (1993). *Food legislation and the scope for increased use of near-critical fluid extraction operations in the food, flavouring and pharmaceutical industries*. In *Extraction of natural products using near-critical solvents*, pp. 34-49. Springer Netherlands.
- Sánchez, E. S., Simal, S., Femenía, A. y Rosselló, C. (2000). Effect of acoustic brining on the transport of sodium chloride and water in Mahon cheese. *European Food Research and Technology*, 212, 39-43.
- Schössler, K., Thomas, T. y Knorr, D. (2012). Modification of cell structure and mass transfer in potato tissue by contact ultrasound. *Food Research International*, 49(1), 425-431.
- Señorans, F. J., Ibáñez, E. y Cifuentes, A. (2003). New trends in food processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 43(5), 507-526.
- Shigehisa, T., Ohmori, T., Saito, A., Taji, S. y Hayashi, R. (1991). Effects of high hydrostatic pressure on characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 12, 207 - 215.
- Sims, M. y Estigarribia, E. (2003). Membrane carbon dioxide sterilization of liquid foods: Scale up of a commercial continuous process. *Proceedings of the 6th International Symposium on Supercritical Fluids*, pp. 1457-1460. Versailles, France.
- Sirisee, U., Hsieh, F. y Huff, H. E. (1998). Microbial safety of supercritical carbon dioxide processes. *Journal of Food Processing and Preservation*, 22, 387-403.

- Siró, I., Vén, C., Balla, C., Jónás, G., Zeke, I. y Friedrich, L. (2009). Application of an ultrasonic assisted curing technique for improving the diffusion of sodium chloride in porcine meat. *Journal of Food Engineering*, 91(2), 353-362.
- Smith, D. P., Fletcher, D. L., Buhr, R. J. y Beyer, R. S. (1993). Pekin duckling and broiler chicken *pectoralis* muscle structure and composition. *Poultry Science*, 72(1), 202-208.
- Smith, D. P. y Fletcher, D. L. (1988). Chicken breast muscle fiber type and diameter as influenced by age and intramuscular location. *Poultry science*, 67(6), 908-913.
- Solomon, M. B., Liu, M. N., Patel, J. R., Bowker, B. C. y Sharma, M. (2006). Hydrodynamic pressure processing to improve meat quality and safety. *Advanced Technologies for Meat Processing*, 219-244.
- Soria, A. C. y Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science y Technology*, 21(7), 323-331.
- Spilimbergo, S. (2002). A study about the effect of dense CO₂ on microorganisms. Tesis Doctoral, University of Padova, Italy.
- Spilimbergo, S., Elvassore, N. y Bertucco, A. (2002). Microbial inactivation by high-pressure. *The Journal of Supercritical Fluids*, 22(1), 55-63.
- Spilimbergo, S. y Bertucco, A. (2003). Non-thermal bacterial inactivation with dense CO₂. *Biotechnology and Bioengineering*, 84(6), 627-638.
- Spilimbergo, S., Elvassore, N. y Bertucco, A. (2003). Inactivation of microorganisms by supercritical CO₂ in a semi-continuous process. *Italian Journal of Food Science*, 15, 15-24.

- Spilimbergo, S., Mantoan, D., Quaranta, A. y Mea, G. D. (2009). Real-time monitoring of cell membrane modification during supercritical CO₂ pasteurization. *Journal of Supercritical Fluids*, 48, 93-97.
- Spilimbergo, S., Komes, D., Vojvodic, A., Levaj, B. y Ferrentino, G. (2013). High pressure carbon dioxide pasteurization of fresh-cut carrot. *Journal of Supercritical Fluids*, 79, 92-100.
- Spilimbergo, S., Cappelletti, M. y Ferrentino, G. (2014). High pressure carbon dioxide combined with high power ultrasound processing of dry cured ham spiked with *Listeria monocytogenes*. *Food Research International*, 66, 264-273.
- Starmans, D. A. y Nijhuis, H. H. (1996). Extraction of secondary metabolites from plant material: A Review. *Trends in Food Science and Technology*, 7(6), 191-197.
- Szerman, N., Rao, W. L., Li, X., Yang, Y., Vaudagna, S. R. y Zhang, D. Q. (2014). Effects of the Application of Dense Phase Carbon Dioxide Treatments on Technological Parameters, Physicochemical and Textural Properties and Microbiological Quality of Lamb Sausages. *Food Engineering Reviews*, 1-9.
- Tabilo-Munizaga, G. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2004). Color and textural parameters of pressurized and heat-treated surimi gels as affected by potato starch and egg white. *Food Research International*, 37(8), 767-775.
- Tamburini, S., Ballarini, A., Ferrentino, G., Moro, A., Foladori, P., Spilimbergo, S. y Jousson, O. (2013). Comparison of quantitative PCR and flow cytometry as cellular viability methods to study bacterial membrane permeabilization following supercritical CO₂ treatment. *Microbiology*, 159 (6), 1056-1066.

- Toldrá, F., Mora, L. y Aristoy, C. (2010). Dry-Cured Ham. Handbook of meat processing New York: John Wiley and Sons, 351-366.
- Toldrá, F., Mora, L. y Flores, M. (2010). Cooked ham. Handbook of meat processing New York: John Wiley and Sons, 301-311.
- Tomasula, P. M. (2003). Supercritical fluid extraction of foods, en D. Heldman (Ed.). Encyclopedia of Agricultural, Food, and Biological Engineering. New York: Taylor y Francis.
- Tornberg, E. (2005). Effects of heat on meat proteins–Implications on structure and quality of meat products. *Meat science*, 70(3), 493-508.
- Torrescano, G., Sánchez-Escalante, A., Gimenez, B., Roncales, P. y Beltrán, J. A. (2003). Shear values of raw samples of 14 bovine muscles and their relation to muscle collagen characteristics. *Meat Science*, 64(1), 85-91.
- Valverde, M. T., Marín-Iniesta, F. y Calvo, L. (2010). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in conference pear with high pressure carbon dioxide and effects on pear quality. *Journal of Food Engineering*, 98, 421-428.
- Van Boekel, M. A. (2002). On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*, 74(1), 139-159.
- Vercet, A., Sánchez, C., Burgos, J., Montañés, L. y López, P. (2002). The effects of manothermosication on tomato pectic enzymes and tomato paste rheological properties. *Journal of Food Engineering*, 53, 273-278.
- Vestergaard, C., Erbou, S. G., Thauland, T., Adler-Nissen, J. y Berg, P. (2005). Salt distribution in dry-cured ham measured by computed tomography and image analysis. *Meat Science*, 69(1), 9-15.

- Watanabe, T., Furukawa, S., Kawarai, T., Wachi, M., Ogihara, H. y Yamasaki, M. (2007). Cytoplasmic acidification may occur in high-pressure carbon dioxide-treated *Escherichia coli* K12. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(10), 2522-2526.
- Wattanachant, S., Benjakul, S. y Ledward, D. A. (2004). Composition, color, and texture of Thai indigenous and broiler chicken muscles. *Poultry Science*, 83(1), 123-128.
- Wattanachant, S., Benjakul, S. y Ledward, D. A. (2005a). Effect of heat treatment on changes in texture, structure and properties of Thai indigenous chicken muscle. *Food Chemistry*, 93(2), 337-348.
- Wattanachant, S., Benjakul, S. y Ledward, D. A. (2005b). Microstructure and thermal characteristics of Thai indigenous and broiler chicken muscles. *Poultry Science*, 84(2), 328-336.
- Wei, C. I., Balaban, M. O., Fernando, S. Y., y Peplow, A. J. (1991). Bacterial effect of high pressure CO₂ treatment on foods spiked with *Listeria* or *Salmonella*. *Journal of Food Protection*, 54(3), 189-193.
- Whiting, R. C., y Buchanan, R. L. (1993). A classification of models in predictive microbiology-reply. *Food Microbiology*, 10(2), 175-177.
- Yao, C., Li, X., Bi, W. y He, S. (2013). Comparison of inactivation effects of pressurized CO₂. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, 11(2), 767-772.
- Yuk, H. G., Geveke, D. J. y Zhang, H. Q. (2010). Efficacy of supercritical carbon dioxide for nonthermal inactivation of *Escherichia coli* K12 in apple cider. *International Journal of Food Microbiology*, 138(1), 91-99.
- Zahn, S., Schneider, Y. y Rohm, H. (2006). Ultrasonic cutting of foods: Effects of excitation magnitude and cutting velocity on the reduction of cutting

work. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 7(4), 288-293

Zayas, J. F. (1997). Solubility of proteins. In *Functionality of proteins in food* (pp. 6-75). Springer Berlin Heidelberg.

Zhang, J., Davis, T. A., Matthews, M. A., Drews, M. J., LaBerge, M. y An, Y. H. (2006). Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*, 38(3), 354-372.

Zhong, Q., Black, D. G., Davidson, P. M. y Golden, D. A. (2008). Nonthermal inactivation of *Escherichia coli* K-12 on spinach leaves, using dense phase carbon dioxide. *Journal of Food Protection*, 71, 1015-1017.

