



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica
Y Medio Natural

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER DE GESTIÓN DE
LA CALIDAD Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

2013-2014

USO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS
ASISTIDOS POR ULTRASONIDOS
DE POTENCIA PARA LA
INACTIVACIÓN MICROBIANA EN
MATRICES CÁRNICAS

Autora del trabajo: RAQUEL FERRÍS GÓMEZ

Tutor del trabajo: JOSÉ JAVIER BENEDITO FORT

DEPARTAMENTO DE TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS

Localidad y fecha de presentación: Valencia, 5 de Septiembre de 2014

USO DE FLUIDOS SUPERCRÍTICOS ASISTIDOS POR ULTRASONIDOS DE POTENCIA PARA LA INACTIVACIÓN MICROBIANA EN MATRICES CÁRNICAS

Raquel Ferrís Gómez, José Javier Benedito Fort¹

RESUMEN

En este trabajo se estudió el efecto del uso de CO₂ en condiciones supercríticas (SC-CO₂) asistido por ultrasonidos de potencia (HPU) para la inactivación microbiana (*E. coli* inoculado y flora natural) en jamón curado. La inactivación de *E. coli* inoculado se estudió mediante la aplicación de SC-CO₂+HPU y de SC-CO₂+HPU+disolución isotónica (DI) a distintas condiciones de temperatura (41, 46 y 51°C), presión (150, 250 y 350 bar) y tiempo (5, 10 y 15 min), obteniéndose un nivel máximo de inactivación de 3.5 ciclos-log (51°C, 350 bar, 10 min) en el primer tratamiento, y de 3.7 ciclos-log (46°C, 250 bar y 10min), en el segundo. El análisis de los datos mediante la metodología de superficie de respuesta permitió encontrar el valor máximo de inactivación de *E. coli* tanto mediante SC-CO₂+HPU como empleando SC-CO₂+HPU+DI. Cada tipo de microorganismo de la flora natural presentó una resistencia a los tratamientos diferente. Se consiguió la inactivación completa de coliformes en todos los tratamientos, siendo los mesófilos los microorganismos más resistentes, presentando una reducción de 1.08, 1.37 y 1.55 ciclos-log para SC-CO₂, SC-CO₂+HPU y SC-CO₂+HPU+DI, respectivamente.

Los resultados mostraron que la aplicación simultánea de SC-CO₂ y HPU es adecuada para la inactivación microbiana en matrices cárnicas, además la adición de DI favoreció dicho efecto.

RESUM

En aquest treball es va estudiar l'efecte de l'ús de CO₂ en condicions supercrítiques (SC-CO₂) assistits per ultrasons de potència (HPU) per a la inactivació microbiana (*E. coli* inoculat i flora natural) en pernil curat. La inactivació d'*E. coli* inoculat es va estudiar mitjançant l'aplicació de SC-CO₂+HPU i de SC-CO₂+HPU+dissolució isotònica (DI) a diferents condicions de temperatura (41, 46 i 51°C), pressió (150, 250 i 350 bar) i temps (5, 10 i 15 min), obtenint-se un grau màxim d'inactivació de 3.5 cicles-log (51°C, 350 bar, 10 min) en el primer tractament i, de 3.7 cicles-log (46°C, 250 bar i 10 minuts) en el segon. L'anàlisi de les dades mitjançant la metodologia de superfície de resposta va permetre trobar el valor màxim d'inactivació d'*E. coli* aplicant tant SC-CO₂+HPU com SC-CO₂+HPU+DI. Cada tipus de microorganisme de la flora natural va presentar una resistència als tractaments diferent. Es va aconseguir la inactivació completa de coliformes en tots

¹ Grupo de Análisis y Simulación de Procesos Agroalimentarios, Departamento Tecnología de Alimentos, Universitat Politècnica de València, Camí de Vera s/n, E46022 Valencia, Spain.

els tractaments, sent els mesòfils els microorganismes més resistents, presentant una reducció de 1.08, 1.37 i 1.55 cicles-log per SC-CO₂, SC-CO₂+HPU i, SC-CO₂+HPU+DI, respectivament.

Els resultats van mostrar que l'aplicació simultània de SC-CO₂ i HPU és adequada per a la inactivació microbiana en matrius càrniques, a més, l'adició de DI va afavorir aquest efecte.

ABSTRACT

The effect of the use of CO₂ supercritical (SC-CO₂) assisted power ultrasound (HPU) for microbial inactivation (*E. coli* and inoculated natural flora) in dry-cured ham was studied. Inactivation of inoculated *E. coli* was studied by applying SC-CO₂+HPU and SC-CO₂+HPU+isotonic solution (DI) at different temperatures (41, 46 and 51°C), pressures (150, 250 and 350 bar) and times (5, 10 and 15 min), obtaining a maximum degree of inactivation of 3.5 log-cycles (51°C, 350 bar, 10 min) in the first treatment and, 3.7 log-cycles (46°C, 250 bar and 10 min) in the second one. Analysis of the data using a response surface methodology allowed finding a maximum value of inactivation of *E. coli*, using SC-CO₂+HPU and SC-CO₂+HPU+DI. Each type of microorganism from the natural flora presented different resistance to the treatment. Complete inactivation of coliforms was achieved in all treatments, being mesophilic the most resistant microorganism, showing a reduction of 1.08, 1.37 and 1.55 cycles-log for SC-CO₂, SC-CO₂+HPU and SC-CO₂+HPU+DI, respectively.

The results showed that simultaneous application of SC-CO₂ and HPU is suitable for microbial inactivation in meat matrices, moreover, the DI also favored this effect.

PALABRAS CLAVE

Fluidos supercríticos; ultrasonidos de potencia; inactivación microbiana; jamón curado.

Supercritical fluids; power ultrasound; microbial inactivation; dry-cured ham.

1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad los consumidores tienen una mayor preocupación por que los alimentos que consumen sean saludables y estén exentos de contaminantes tanto físicos, químicos, como biológicos. Por esta razón, se están desarrollando métodos de conservación que sean menos agresivos, es decir, que mantengan mejor las características nutricionales y organolépticas de los productos, sin que se vea comprometida la inocuidad de éstos, como es el caso de la utilización de los fluidos supercríticos para la inactivación microbiana (Ferrentino et al., 2013b).

En concreto, el uso de CO₂ en condiciones supercríticas (SC-CO₂) es uno de los métodos más prometedores para lograr la pasteurización y/o esterilización en frío de productos alimenticios, tanto líquidos como sólidos, y probablemente sea uno de los que reemplace, o sustituya parcialmente, los métodos térmicos aplicados en la actualidad con este fin (Choi et al., 2009; Galvanin et al., 2014).

La ventaja de usar SC-CO₂ en la industria alimentaria se debe a que es atóxico, no inflamable, no corrosivo, incoloro, no es costoso, se elimina fácilmente no dejando residuos; además, sus condiciones críticas son relativamente fáciles de alcanzar, y se puede trabajar a baja temperatura, evitando modificaciones no deseadas en componentes termolábiles de los productos tratados con él (Velasco et al., 2007).

Revisando la literatura científica se encuentran pocos artículos que informen de los efectos del tratamiento con SC-CO₂ en matrices sólidas, debido a su complejidad para alcanzar la acción bactericida del CO₂, y a la falta de información sobre el mecanismo de inactivación (Ferrentino et al., 2013a).

Respecto al mecanismo de inactivación, las pocas hipótesis abordadas hasta ahora, identifican el contacto del CO₂ con la membrana celular y sus consiguientes modificaciones físico-químicas como la etapa fundamental del tratamiento; las siguientes etapas, comunes a lo que ocurre con las matrices líquidas, podrían ser las siguientes: disminución del pH, inactivación de las enzimas clave del metabolismo celular o su inhibición; trastorno del equilibrio de electrolitos intracelular, y la eliminación de constituyentes vitales de las células y las membranas celulares (Choi et al., 2009; Ferrentino et al., 2013b).

Estos fenómenos están estrechamente relacionados con la presión y la temperatura aplicadas, controlando la transferencia de masa de CO₂, su solubilidad y la actividad biológica de las células microbianas. En general, un aumento de la temperatura es beneficioso para la inactivación microbiana, debido al aumento de la fluidez de las membranas celulares (lo que facilita la penetración del CO₂) y, para el aumento de la difusividad del CO₂. Sin embargo, es conveniente no hacer funcionar el proceso a temperatura muy por encima del valor crítico del SC-CO₂, porque la densidad del disolvente y su capacidad de solubilización disminuyen de manera bastante rápida a medida que aumenta la temperatura. Con respecto a la presión, su aumento mejora la solubilidad del CO₂, facilitando la acidificación, tanto extracelular como intracelular (disminuye el pH) y, al mismo tiempo, mejora su contacto con las células. El efecto de la presión del CO₂ está limitado por la saturación de la solubilidad del CO₂ en el agua contenida en el alimento matriz, las células microbianas y la bicapa de fosfolípidos microbiana (Galvanin et al., 2014).

Para conseguir que las propiedades de los alimentos se vean afectadas lo menos posible, así como conseguir la letalidad microbiana requerida, se está estudiando desde hace unos años la posibilidad de combinar SC-CO₂ con otras técnicas de conservación, intentando reducir al mínimo posible los requisitos de procesamiento con SC-CO₂ (Ortuño et al., 2012). Entre estas posibles combinaciones de tratamientos de conservación estudiadas se encuentra la sinergia creada al aplicar de forma simultánea SC-CO₂ y ultrasonidos de potencia (HPU).

La utilización de HPU resulta beneficioso debido a los efectos mecánicos producidos en el entorno supercrítico, a través de las vibraciones de gran amplitud, la presión de radiación, transmisión, agitación, etc (Riera et al., 2010). Esto provoca ciclos de expansión y compresión de forma alterna que dan lugar al fenómeno de cavitación (Villamiel, 2006).

Así pues, el efecto sinérgico de la aplicación de SC-CO₂ asistido por HPU (SC-CO₂+HPU) se basaría en que, se consigue un aumento de la tasa de solubilización del SC-CO₂ en el medio y de la transferencia de masa, debido a la agitación vigorosa producida por el campo ultrasónico, lo que permite la rápida saturación de CO₂ en el medio, acelerando los mecanismos de inactivación causados por el efecto del SC-CO₂ (García-González et al., 2007), además, gracias al efecto de cavitación que produce los HPU, se dañarían las paredes de las células, facilitando la extracción de componentes celulares por parte del SC-CO₂ (Ortuño et al., 2014).

La aplicación simultánea de SC-CO₂ y HPU se ha empleado para acelerar la muerte de *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) inoculado en diferentes medios. En este sentido, Ortuño et al. (2013) mostraron que la población de *E. coli* y *S. cerevisiae* inoculados en zumo de manzana, se inactivó completamente con tratamientos de 5 minutos (350 bar, 36°C) y 4 min (225 bar, 36°C), respectivamente. Mientras que tratando la muestra únicamente con SC-CO₂ bajo las mismas condiciones, no se observó reducción microbiana. Este tipo de tratamientos están bastante desarrollados en medios líquidos (Ortuño et al., 2013), pero no tanto en medios sólidos como pueden ser las matrices cárnicas, en concreto el jamón curado.

En este contexto, el objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de los fluidos supercríticos, concretamente el SC-CO₂, asistido por HPU sobre la inactivación microbiana (*E. coli* y flora natural) en jamón curado. El estudio se realizó evaluando el efecto de diversas variables del proceso (presión, temperatura, tiempo y contenido de agua en el sistema).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Preparación de la muestra

Para la preparación de las muestras inoculadas con *E. coli*, primero se preparó un starter a partir de una colonia aislada de *E. coli*, suspendiéndola en 50 mL de medio de cultivo LB Broth e incubándolo en una cámara (J.P. SELECTA, Modelo 3000957, Barcelona, Spain) a 37°C y agitación de 120 rpm durante 48 horas. Transcurridas las 48 horas, se cogieron 100 µL del starter y se resuspendieron en 50 mL de medio LB

Broth, incubándolos en una cámara a 37°C durante 18-24 horas. Al día siguiente, se cogieron 15 mL de la disolución que contenía las colonias de *E. coli* y se centrifugaron (J.P. SELECTA, modelo Medifriger BL-S, Barcelona, Spain), durante 4 minutos, a 4°C y 2600 g. A continuación, se recuperó el pellet obtenido y se redisolvió con 50 mL de solución salina (SS, 0.85% NaCl). Esta disolución se empleó para inocular la muestra de jamón curado.

Las muestras fueron obtenidas a partir de una lámina gruesa del jamón curado. Se cortaron piezas de 10±0.5 g usando un cilindro de acero inoxidable esterilizado a la llama para evitar una recontaminación. Para el tratamiento de inactivación de *E. coli*, las muestras fueron inoculadas superficialmente con 100 µL de la solución descrita anteriormente y se dejaron secar en una campana de flujo laminar (TELSTAR TECHNOLOGIES, modelo AH-100, Terrassa, Spain) hasta su posterior tratamiento. La concentración inicial de *E. coli* en la muestra fue de 10⁶ u.f.c/g.

Por otra parte, para la inactivación de la flora natural, las muestras se cortaron y reservaron en placas Petri sin inocular para su posterior tratamiento. Además, para comprobar el grado de inactivación de la flora natural, se prepararon muestras que no fueron tratadas (control).

2.2. Sistema de inactivación

El tratamiento de las distintas muestras de jamón curado se realizó en la planta de SC-CO₂, cuyo esquema general se muestra en la FIGURA 1. El sistema incluye un equipo de ultrasonidos, incrustado en el depósito extractor que contiene el SC-CO₂. El equipo de ultrasonidos consiste en un transductor piezoeléctrico de alta potencia, un sistema de aislamiento y una unidad generadora de energía (40 W ± 5 W). El transductor se inserta en el interior del recipiente de inactivación e incluye dos cerámicas comerciales (35 mm de diámetro exterior, 12,5 mm diámetro interno; 5 mm de espesor; frecuencia de resonancia de 30 kHz) y un sonotrodo, para concentrar la mayor cantidad de energía acústica en el punto de aplicación (Ortuño et al., 2012).

Los tratamientos de inactivación consistieron en cuatro etapas: (1) lavado del sistema de inactivación, (2) preparación de la muestra (3) presurización (4) despresurización y (5) extracción de muestra (sólida y líquida).

Antes de cada experimento, se realizaron lavados del recipiente de inactivación con una solución desinfectante (20% v/v), agua destilada y agua estéril; posteriormente se introdujeron las muestras de jamón curado preparadas. Para los tratamientos llevados a cabo con la muestra sumergida en disolución isotónica (DI, 0.9% NaCl), se añadieron 60 mL dentro del recipiente. Posteriormente, se procedió a presurizar el sistema para llevar a cabo los distintos tratamientos. Transcurrido el tiempo de proceso, se despresurizó el sistema y, finalmente, se extrajo la muestra de jamón y se introdujo en una bolsa estéril. Por otra parte, en los tratamientos que se llevaron a cabo con la muestra sumergida, se recogió el líquido en un tubo estéril.

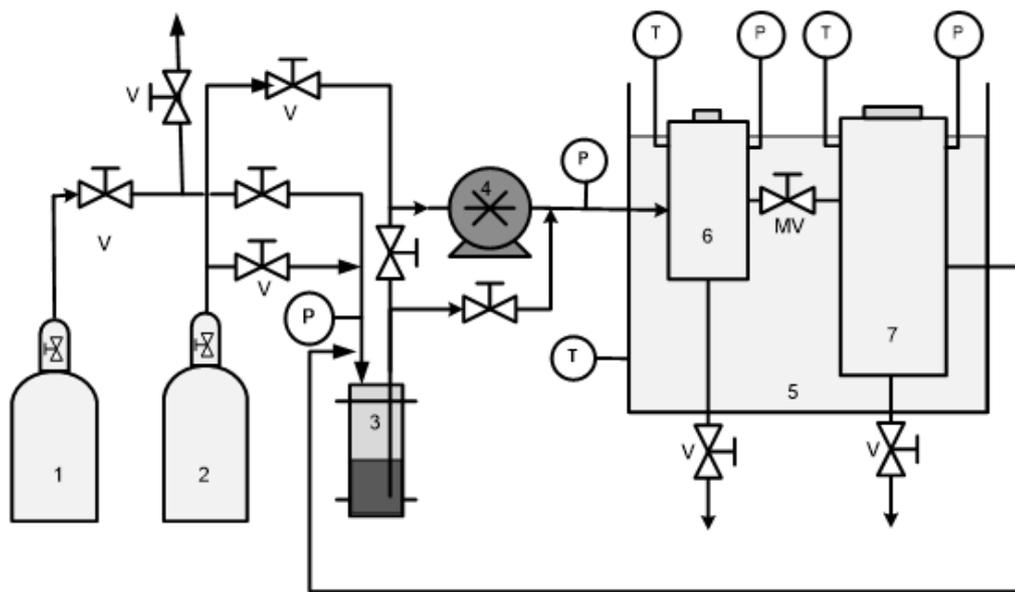


FIGURA 1. Esquema general de la planta de SC-CO₂. 1- Tanque de N₂; 2- tanque de CO₂; 3- reserva de CO₂; 4- bomba; 5- baño termostático; 6- extractor; 7- separador; 8- cerámicas; 9- sistema de aislamiento; 10- transductor; 11- cartucho de extracción; 12- generador de UHP; V- válvulas; P- manómetros; T- sondas de temperatura.

2.3. Diseño experimental

Se utilizó Statgraphics Plus (Statistical Graphics Corp. 5.1. Warrenton, USA) para realizar el diseño experimental, mediante Box-Behnken, donde se obtuvo un plan de 15 tratamientos distintos con 3 puntos centrales (-1, 0 y 1), realizando 3 réplicas de cada tratamiento.

En la TABLA 1 se detallan las condiciones de presión (P), temperatura (T) y tiempo (t), de cada uno de los tratamientos aplicados para estudiar la inactivación del *E. coli* en las muestras de jamón curado, mediante SC-CO₂+HPU y SC-CO₂+HPU+DI.

Por otra parte, para evaluar la inactivación de la flora natural del jamón curado se aplicaron 3 tipos de tratamientos diferentes: SC-CO₂, SC-CO₂+HPU y SC-CO₂+HPU+DI, todos ellos a una temperatura de 46°C, una presión de 250 bar y durante 10 min; comprobando de esta forma cuál era el tratamiento más efectivo. Se realizaron 3 réplicas de cada uno.

TABLA 1. Tratamientos aplicados para evaluar el efecto de las variables de proceso sobre la inactivación de *E. coli* en muestras de jamón curado mediante SC-CO₂+HPU y SC-CO₂+HPU+DI.

N° tratamiento	Parámetros Codificados			Parámetros evaluados		
	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

2.4. Análisis microbiológico

Para realizar el análisis microbiológico de las muestras, se adicionaron 90 mL de SS a la muestra contenida en una bolsa con filtro estéril y se homogenizó en un Stomacher (IUL INSTRUMENTS, modelo 1000475/2510) durante 2 minutos. Si eran necesarias diluciones, se prepararon a partir de la anterior.

Seguidamente, en una campana de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones, se procedió con la siembra de las muestras. Se sembraron 100 µL de la disolución obtenida al homogenizar la muestra, y de la DI recogida en el tubo después del tratamiento, en placas Petri. En el caso de las muestras inoculadas con *E. coli*, las placas contenían medio LB Agar, y en el caso de las muestras sin inóculo (flora natural), se emplearon distintos medios, específicos para cada tipo de microorganismo propio de la flora, según la TABLA 2. Cada siembra se hizo por duplicado.

TABLA 2. Medios de cultivo para el estudio de flora natural en jamón curado.

Microorganismo	Medio de cultivo	Condiciones de incubación
Mesófilos	PCA	35°C – 24 h
Psicrófilos	PCA	4°C – 7 días
Hongos y levaduras	YGC	25°C – 5 días
Bacterias ácido lácticas	MRS	35°C – 3 días
Coliformes	VRB	35°C – 24 h

Realizadas las siembras, las placas se incubaron en estufa o refrigerador, durante el tiempo y a la temperatura adecuada en cada caso (TABLA 2). Las placas sembradas con las muestras inoculadas con *E. coli*, se incubaron en una estufa a 35°C durante 24 horas.

2.5. Análisis estadístico

Se utilizó el paquete estadístico Statgraphics Plus para llevar a cabo un ANOVA multifactorial y LSD, con el fin de evaluar el efecto de la presión, la temperatura y el tiempo en el grado de inactivación microbiana (Ortuño et al., 2014).

Además, usando Matlab R2011b versión 7.13.0.564 (Mathworks Inc., Massachusetts, USA), se aplicó la metodología de superficie de respuesta para determinar por un lado, cuáles fueron los efectos de cada factor estudiado (P, T y t) sobre la respuesta ($\log N/N_0$), y por otro lado, las condiciones óptimas en los distintos tratamientos aplicados en las muestras de jamón curado inoculadas con *E. coli*. Para realizar este análisis se emplearon las ecuaciones de la 1 a la 5.

$$y_i = b_0 + b_1x_{i1} + b_2x_{i2} + b_3x_{i3} + b_{11}x_{i1}x_{i1} + b_{12}x_{i1}x_{i2} + b_{13}x_{i1}x_{i3} + b_{22}x_{i2}x_{i2} + b_{23}x_{i2}x_{i3} + b_{33}x_{i3}x_{i3} \quad (1)$$

Donde:

$$y_i = \ln\left(\frac{N}{N_0}\right) \quad (2)$$

$$x_{i1} = \frac{P_i - 250}{100} \quad (3)$$

$$x_{i2} = \frac{T_i - 46}{5} \quad (4)$$

$$x_{i3} = \frac{t_i - 10}{5} \quad (5)$$

En la ecuación 2, N y N_0 son el número de células viables en la muestra después de diferentes tiempos de tratamiento y el número inicial de células presente en la muestra control (sin tratar), respectivamente. La ecuación 3 se utilizó para calcular la P óptima; la ecuación 4, para calcular la T óptima y la ecuación 5, el tiempo óptimo de tratamiento. i indica el número de experimento dentro de los recogidos en la TABLA 1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Efecto de las condiciones de proceso en la inactivación de *E. coli* mediante SC-CO₂+HPU y SC-CO₂+HPU +DI

En la TABLA 3 se muestra el nivel de inactivación de *E. coli* inoculado en las muestras de jamón curado, al ser tratadas con SC-CO₂+HPU y FSC+HPU+DI bajo las diferentes condiciones de presión, temperatura y tiempo estudiadas.

TABLA 3. Inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de jamón curado tratadas con SC-CO₂+HPU y SC-CO₂+HPU+DI.

P (bar)	T (°C)	t (min)	Inactivación (log N/N ₀)	
			FSC+HPU	FSC+HPU+DI
150	41	10	-0.33 ± 0.03	-1.02 ± 0.18
150	46	5	-1.79 ± 0.18	-2.49 ± 0.12
150	46	15	-2.86 ± 0.53	-3.45 ± 0.26
150	51	10	-1.63 ± 0.13	-2.62 ± 0.11
250	41	5	-1.36 ± 0.39	-2.50 ± 0.01
250	41	15	-1.90 ± 0.18	-1.35 ± 0.02
250	46	10	-1.67 ± 0.01	-3.60 ± 0.12
250	46	10	-2.30 ± 0.02	-3.61 ± 0.36
250	46	10	-1.76 ± 0.07	-3.66 ± 0.12
250	51	5	-2.77 ± 0.09	-2.71 ± 0.38
250	51	15	-3.07 ± 0.77	-3.14 ± 0.05
350	41	10	-1.85 ± 0.31	-1.03 ± 0.21
350	46	5	-1.62 ± 0.08	-2.31 ± 0.10
350	46	15	-1.52 ± 0.10	-2.36 ± 0.29
350	51	10	-3.49 ± 0.17	-3.32 ± 0.00

Los resultados del ANOVA realizados a los datos mostrados en la TABLA 3, indican que al aplicar SC-CO₂+HPU a 51°C, 350 bar, durante 10 min, se consiguió el mayor grado de inactivación, de aproximadamente 3.5 ciclos-log. Mientras que cuando la muestra de jamón es sumergida en disolución isotónica (SC-CO₂+HPU+DI), la mayor inactivación se obtuvo a 46°C, 250 bar, durante 10 min, alcanzando una inactivación de aproximadamente 3.7 ciclos-log.

Este comportamiento indica que la adición de agua en el medio (muestra cárnica-SC-CO₂), favoreció el proceso de inactivación de *E. coli*, pudiendo alcanzar niveles máximos de inactivación similares, pero usando condiciones menos severas.

En productos sólidos, el CO₂ entra en contacto directo con el microorganismo sin necesidad de solubilizarse antes en el medio líquido y saturarlo (etapa limitante en la inactivación) por lo tanto, el tiempo de exposición requerido depende esencialmente de la resistencia específica de las cepas microbianas diana (Ferrentino et al., 2013a). Esto podría ser una ventaja importante para hacer la tecnología atractiva para las empresas interesadas en procesos rápidos y eficientes (Valverde et al., 2010).

La eficiencia del proceso de inactivación depende de muchos factores y de cómo estos pueden ser modificados durante el proceso de inactivación mediante fluidos supercríticos (Ortuño et al., 2014). Los factores de mayor importancia que pueden generar variaciones en las respuestas de inactivación microbiana mediante fluidos supercríticos son: la naturaleza del medio, el tipo de microorganismo, el estado físico del CO₂, la presión, la temperatura, el tiempo de proceso y el modo de operación (García-González et al., 2009; Ortuño et al., 2014). Además, se ha demostrado que estos mismos factores pueden influir en la efectividad de los mecanismos de inactivación cuando se aplican sólo HPU (Chemat et al., 2011).

En el presente trabajo, los factores estudiados fueron la presión, temperatura y tiempo y, su influencia en la inactivación mediante SC-CO₂+HPU y SC-CO₂+HPU+DI.

EFFECTO DE LA PRESIÓN

Para evaluar el efecto de los parámetros (P, T y t) sobre la inactivación de *E. coli* en las muestras de jamón curado se realizó un ANOVA (modelo lineal generalizado; MLG). Los resultados del análisis mostraron que, cuando las muestras de jamón curado fueron tratadas mediante SC-CO₂+HPU, la presión y la temperatura tuvieron un efecto significativo ($p < 0.05$) en la inactivación. Sin embargo, cuando las muestras fueron sumergidas en disolución isotónica (SC-CO₂+HPU+DI), tanto la temperatura como el tiempo mostraron un efecto significativo en la inactivación microbiana; mientras que la presión no ($p > 0.05$).

Los efectos individuales de la presión, la temperatura y el tiempo se cuantificaron mediante superficies de respuesta, como se detalla en la sección 3.2.

En la TABLA 3 se observa un efecto significativo evidente de la presión ($p < 0.05$) sobre la inactivación de *E. coli* en las muestras tratadas mediante SC-CO₂+HPU (a 41°C, durante 10 min); así, reducciones de 0.33, y 1.85 ciclos-log fueron obtenidas al aumentar la presión del proceso de 150 a 350 bar, respectivamente. Mientras, en las muestras sumergidas en disolución isotónica (SC-CO₂+HPU+DI), al aumentar de 150 bar a 350 bar (46°C, 5 min) no se encontraron diferencias significativas en la inactivación ($p < 0.05$), obteniéndose una reducción promedio de 2.4 ciclos-log.

El efecto de la presión en la inactivación microbiana solo con SC-CO₂ ha sido estudiado por varios autores, encontrándose resultados contrapuestos. Por ejemplo, coincidiendo con los resultados obtenidos en la presente investigación (usando SC-CO₂+HPU), Galvanin et al. (2014) observaron en zanahoria fresca inoculada con *E. coli*, que a 26°C, un incremento de la presión de 80 a 120 bar produjo un aumento de

2.5 ciclos-log en la inactivación microbiana. Mientras que Ferrentino et al. (2013b) encontraron que a 35°C, un aumento de la presión de 80 a 120 bar no aumentó significativamente la tasa de inactivación de *L. monocytogenes* en jamón curado.

Otros autores han evaluado el efecto de la presión mediante el tratamiento combinado de SC-CO₂+HPU. Un ejemplo de ello fue Ortuño et al. (2014), quienes encontraron que al tratar zumo de manzana inoculado con *E. coli*, el aumento de la presión no mostró un efecto significativo en el nivel de inactivación de *E. coli*; obteniéndose reducciones de 3.3, 5.1 y 4.2 ciclos-log después de 1 min de tratamiento a 36°C y 100, 225 y 350 bar, respectivamente.

En general, un incremento de la presión del sistema beneficia la velocidad de inactivación, gracias al aumento de la densidad del CO₂ y su poder de solvatación (Brunner, 2005). Esto puede favorecer el contacto del CO₂ con las células en matrices sólidas, lo que conlleva a un daño en la membrana y la extracción de constituyentes vitales (Galvanin et al, 2014; Garcia-Gonzalez et al., 2007).

EFFECTO DE LA TEMPERATURA

En cuanto al efecto de la temperatura, los resultados mostrados en la TABLA 3 desvelan que la temperatura fue un factor clave para incrementar la inactivación de *E. coli* en las muestras de jamón curado, tanto las que fueron tratadas usando SC-CO₂, como las que se sumergieron en DI. En el primer caso, se encontraron reducciones de 1.90, 2.30 y 3.07 ciclos-log cuando el tratamiento de SC-CO₂ se llevó a cabo a 41, 46 y 51°C, respectivamente, manteniendo constante la presión (250 bar) y tiempos de proceso de 10 – 15 minutos.

Por otra parte, para el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU+DI, a 41°C (250 bar, 15 min), se consiguió una reducción de 1.35 ciclos-log, mientras que a 51°C, fue de 3.14 ciclos-log, demostrando un incremento significativo ($p < 0.05$) en el grado de inactivación.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Galvanin et al. (2014), quienes encontraron que en jamón curado inoculado con *L. monocytogenes* y tratado sólo con SC-CO₂, al aumentar la temperatura de 35 a 50°C (120 bar, 10 min), se consiguió un incremento en la inactivación de aproximadamente 3 ciclos-log.

El efecto de la temperatura en la inactivación microbiana mediante el tratamiento combinado de SC-CO₂+HPU ha sido estudiado por otros autores, sin embargo muestran resultados discordantes. Por un lado, Ortuño et al. (2012) encontraron que un incremento de la temperatura de 31 a 41°C no mostró un efecto significativo, obteniendo una reducción promedio de 5.5 ciclos-log de *E. coli* inoculada en medio LB. Por otro lado, Ortuño et al. (2014) encontraron que al tratar zumo de manzana inoculado con *E. coli*, el aumento de la temperatura mostró un efecto significativo en el grado de inactivación; obteniendo reducciones de 4.6, 5.1 y 5.6 ciclos-log después de 1 min de tratamiento a 225 bar y temperaturas de 31, 36 y 41°C, respectivamente.

Estos resultados demuestran que un aumento de la temperatura puede inducir un incremento en la fluidez de las membranas celulares y facilitar la penetración de CO₂ (segunda etapa en los mecanismos de inactivación) y en consecuencia, aumentar el grado de inactivación (Galvanin et al., 2014; Garcia-Gonzalez et al., 2007). Sin

embargo, cuando el proceso se lleva a cabo en la región cercana al punto crítico (P_c), la variación de la densidad del medio (debida al incremento de temperatura) puede contrarrestar el efecto en la membrana y disminuir la solubilidad del CO_2 dentro del medio. En este momento, la complejidad y naturaleza del medio, tales como contenido de agua, azúcares, grasas, entre otros, serían, los factores limitantes en el grado de inactivación del proceso (García-González et al., 2007; Ortuño et al., 2014).

EFFECTO DEL TIEMPO DE PROCESO

El tiempo de exposición de las muestras de jamón curado al tratamiento mediante $\text{SC-CO}_2+\text{HPU}$ no mostró un efecto significativo ($p<0.05$) en el grado de inactivación de *E. coli*. La reducción promedio obtenida a 250 bar y 41°C después de 5 y 15 min, de proceso fue de 1.6 ciclos-log, mientras que a 250 bar y 51°C , las reducciones obtenidas durante 5 y 15 min fueron de 2.77 ± 0.09 y 3.07 ± 0.77 ciclos-log, respectivamente (TABLA 3), sin mostrar diferencias significativas ($p<0.05$) en el grado de inactivación.

Un comportamiento similar fue observado por Ferrentino et al. (2013a) quienes no encontraron diferencias significativas en el efecto del tiempo sobre la inactivación de la flora natural de jamón cocido; ya que tanto a 5 como a 15 min de tratamiento con $\text{SC-CO}_2+\text{HPU}$ (120 bar, 50°C), obtuvieron alrededor de 1.2 ciclos-log (u.f.c./g) de mesófilos.

Cuando las muestras de jamón curado fueron tratadas mediante $\text{SC-CO}_2+\text{HPU}+\text{DI}$ (150 bar, 46°C) el tiempo sí tuvo un efecto significativo ($p>0.05$) en el grado de inactivación de *E. coli*; ya que durante 5 min se consiguió una reducción de 2.49 ciclos-log; mientras que al aplicar las mismas condiciones durante 15 min, la reducción alcanzada fue de 3.45 ciclos-log. Dichos resultados coinciden con Ortuño et al. (2014) quienes mostraron que, aplicando $\text{SC-CO}_2+\text{HPU}$, existían diferencias significativas en la inactivación de *E. coli* inoculada en zumo de naranja con respecto al tiempo, para todas las presiones y temperaturas evaluadas. Después del primer minuto de tratamiento (36°C , 225 bar), alcanzaron una reducción de 4.12 ciclos-log y, finalmente, 7.5 ciclos-log después de 7 min.

En los trabajos anteriormente descritos puede observarse que, cuando los microorganismos son inoculados en una matriz sólida, el grado de inactivación microbiana no se ve favorecida al aumentar el tiempo de exposición al CO_2 supercrítico; ya que una vez que éste se pone en contacto con el microorganismo, inicia la inactivación de aquellos que son más sensibles. Después de un tiempo, la posible acumulación de células dañadas o muertas y unido a la complejidad del medio donde han penetrado los microorganismos, son factores que pueden causar una acción protectora para el resto de las células y frenar la velocidad de inactivación (Ferrentino et al., 2013; Galvanin et al., 2014).

Por otra parte cuando los microorganismos inoculados o presentes de forma natural en la muestra alimenticia, se encuentran inmersos en una fase líquida donde el CO_2 pueda difundirse, como es el caso de las muestras de jamón curado sumergidas en disolución ($\text{SC-CO}_2+\text{HPU}+\text{DI}$) y el zumo de naranja (Ortuño et al., 2014); la aplicación simultánea de $\text{SC-CO}_2+\text{HPU}$ produce un aumento en el grado de inactivación microbiana con el tiempo del proceso. Este comportamiento podría ser

atribuido, principalmente, a los efectos provocados por los HPU, cuyos mecanismos de inactivación principales son: el fenómeno de cavitación, la formación de radicales libres, turbulencia, esfuerzo cortante y fenómenos de compresión y rarefacción (Knorr et al., 2004; Piyasena et al., 2003), que se producen con mayor intensidad en un medio líquido.

3.2. Optimización de la inactivación de *E. coli* mediante superficies de respuesta

INACTIVACIÓN MEDIANTE SC-CO₂+HPU

Los valores obtenidos (TABLA 4) mostraron que sólo la temperatura tuvo un efecto significativo en su término principal (b_1) con un valor $p < 0.05$. Esto indica que la variabilidad de los datos, es mayor que el efecto de la presión o del tiempo (TABLA 4; b_2 y b_3 , respectivamente). Aunque según el valor p que corresponde a la presión ($p = 0.06$), ésta tuvo mayor probabilidad de tener efecto sobre la inactivación de *E. coli* que en el caso del tiempo. Esto no indica que la presión no tuviera un efecto, sino que tal vez la variabilidad experimental haya podido enmascarar el efecto. Debido a esta variabilidad, el modelo planteado resulta en un bajo valor de r^2 .

El modelo cuadrático representado en la ecuación 1, fue resuelto usando Matlab y se aplicó con el objetivo de encontrar los efectos independientes y las interacciones de las variables del proceso (T, P, t).

Los valores mínimos y máximos de la región en estudio pueden observarse en la FIGURA 2a y fueron cuantificados mediante la herramienta SOLVER de Microsoft ExcelTM.

Los valores óptimos (máxima inactivación) fueron de 51°C, 350 bar y 5 min. Al sustituir dichos valores en la ecuación 1, junto con los valores de los parámetros de la TABLA 4, se obtuvo el valor máximo de inactivación, que fue de -3.207 ciclos-log.

Dichos resultados podrían resultar incongruentes al encontrar el máximo de inactivación al menor tiempo (5 min); sin embargo es posible esperar este comportamiento ya que los parámetros estadísticos indican que el tiempo no tuvo un efecto significativo en el grado de inactivación.

El valor máximo (mínima inactivación) de la región en estudio puede ser observado en la FIGURA 2a, cuyos valores fueron de 41°C, 350 bar y 10 minutos.

INACTIVACIÓN MEDIANTE SC-CO₂+HPU+DI

Los valores obtenidos mostraron que todos los factores tienen un efecto significativo sobre la respuesta (TABLA 4), pues si bien en algunos casos el factor presión no tuvo efecto significativo lineal (el caso de b_1 con $p > 0.1$), sí tuvo efecto significativo cuadrático (b_{11} con $p < 0.01$). En base a lo anterior se concluyó que el modelo representa adecuadamente los datos.

Los valores óptimos de las variables del proceso (P, T y t) (máxima inactivación) fueron 243.28 bar; 48.44°C y 12.2 min (FIGURA 2b). Posteriormente, al sustituir dichos valores en la ecuación 1, junto con los valores de los parámetros de la TABLA 4, se obtuvo el valor máximo de inactivación ($y = -3.881$ ciclos-log).

TABLA 4. Parámetros del modelo de superficie de respuesta en la inactivación de *E. coli* en jamón curado aplicando SC-CO₂+HPU y SC-CO₂+HPU+DI.

<i>SC-CO₂+HPU</i>			<i>SC-CO₂+HPU+DI</i>		
Parámetro	valor	p	Parámetro	valor	p
β_0	-1.91	<0.01	β_0	-3.62	0
β_1	-0.69	<0.01	β_1	0.07	0.34
β_2	-0.23	0.06	β_2	-0.74	3.22E-11
β_3	-0.23	0.07	β_3	-0.03	0.66
β_{11}	-0.12	0.5	β_{11}	0.70	5.21E-07
β_{12}	-0.09	0.6	β_{12}	-0.17	0.13
β_{13}	0.06	0.7	β_{13}	0.23	0.04
β_{22}	0.21	0.25	β_{22}	0.92	1.64E-09
β_{23}	0.30	0.09	β_{23}	-0.40	9.77E-04
β_{33}	-0.24	0.18	β_{33}	0.27	0.022

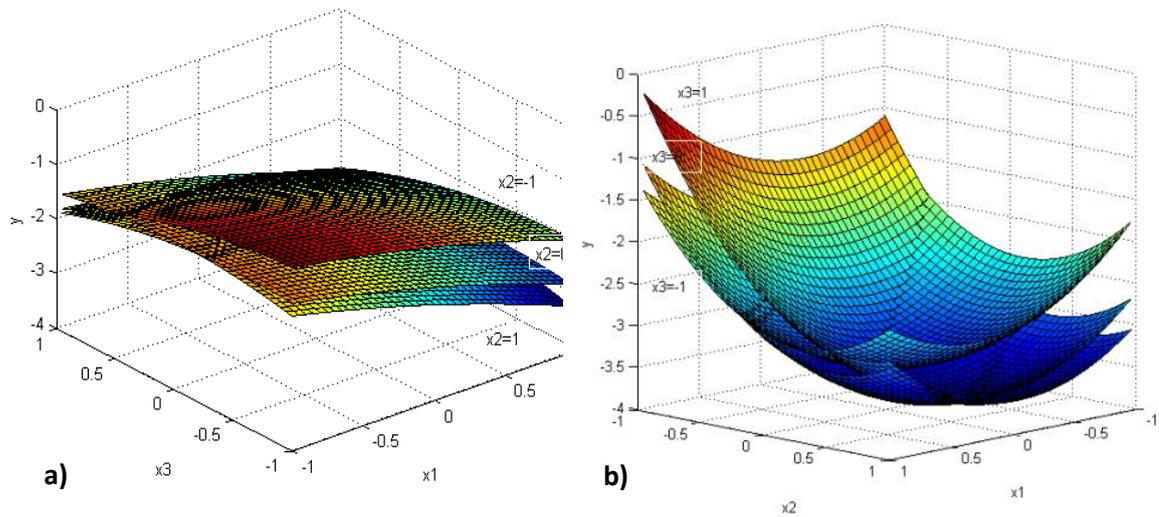


FIGURA 2. Representación gráfica de la superficie de respuesta obtenida en la optimización del tratamiento de SC-CO₂+HPU (a) y SC-CO₂+HPU+DI (b).

3.3. Inactivación de la flora natural del jamón curado

En la TABLA 5 se muestran los resultados que se obtuvieron de los análisis microbiológicos de las muestras de jamón curado control (sin tratar).

TABLA 5. Contaminación inicial de las muestras de jamón curado.

Microorganismo	log N ₀ (u.f.c./g)*
Mesófilos	3.63 ± 0.14
Psicrófilos	2.96 ± 0.16
Coliformes	3.20 ± 0.47
Hongos y levaduras	4.97 ± 0.12
Bacterias ácido lácticas	4.08 ± 0.13

* Valores promedio ± sd

Se realizó un ANOVA para conocer el efecto de los distintos tratamientos y el tipo de microorganismo en el grado de inactivación alcanzado. En general, los resultados mostraron que los tipos de tratamiento y la estructura celular de los microorganismos tuvieron un efecto significativo en el grado de inactivación alcanzado ($p < 0.05$).

Respecto al tipo de tratamiento, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) cuando se aplicaron HPU, tanto en la inactivación sobre las muestras expuestas directamente al SC-CO₂ como las que fueron sumergidas en disolución isotónica (SC-CO₂+HPU+DI) en el caso concreto de hongos y levaduras. Mientras que en el caso de las bacterias ácido lácticas, todos los tratamientos aplicados mostraron diferencias significativas ($p < 0.05$) en el grado de inactivación (TABLA 6).

Cappelletti et al. (2014) encontraron que al tratar agua de coco inoculada con *Salmonella enterica* únicamente con SC-CO₂ (120 bar, 40°C y 10 min) se redujeron 2 ciclos-log, mientras que tratándola con SC-CO₂+HPU (mismas condiciones) se alcanzaron reducciones de 9 ciclos-log. Los resultados indicaron claramente un efecto sinérgico del SC-CO₂ y los HPU, en comparación con los tratamientos individuales.

Cuando los microorganismos inoculados o presentes de forma natural en la muestra alimenticia, se encuentran inmersos en una fase líquida donde el CO₂ pueda difundirse, como pueda ser zumo de naranja (Ortuño et al., 2014), o las muestras de jamón curado sumergidas en disolución (como se estudió en el presente trabajo, SC-CO₂+HPU+DI); la aplicación simultánea de SC-CO₂+HPU produce un aumento en el grado de inactivación provocados por los HPU, cuyos mecanismos de inactivación tales como el fenómeno de cavitación, la formación de radicales libres, turbulencia, esfuerzo cortante y fenómenos de compresión y rarefacción, entre otros (Knorr et al., 2004; Piyasena et al., 2003), mejora tanto la solubilización de CO₂ y como su transferencia a través de la membrana celular

En cuanto al efecto del tipo de microorganismo, los resultados mostraron que los microorganismos más sensibles a los tratamientos aplicados fueron, en primer lugar, los coliformes, alcanzándose la inactivación total en todos los tratamientos; seguidos

de las bacterias ácido lácticas y los psicrófilos, en los cuales la inactivación máxima alcanzada fue de 2.87 y 2.76 ciclos-log (TABLA 6).

TABLA 6. Grado de inactivación ($\log(N/N_0)$) de la flora natural en las muestras de jamón curado.

Microorganismo	Tipo de tratamiento		
	SC-CO ₂	SC-CO ₂ + HPU	SC-CO ₂ + HPU + DI
Mesófilos	-1.08 ± 0.16 ^a	-1.37 ± 0.43 ^a	-1.55 ± 0.24 ^a
Psicrófilos	-2.96 ± 0.00 ^a	-2.96 ± 0.00 ^a	-2.96 ± 0.00 ^a
Coliformes	-3.20 ± 0.00 ^a	-3.20 ± 0.00 ^a	-3.20 ± 0.00 ^a
Hongos y levaduras	-1.65 ± 0.66 ^a	-2.99 ± 0.01 ^b	-2.99 ± 0.03 ^b
Bacterias ácido lácticas	-2.42 ± 0.28 ^a	-2.10 ± 0.00 ^b	-4.08 ± 0.00 ^c

^{a,b,c} indica los grupos homogéneos respecto al tipo de tratamiento.

Los mesófilos fueron los microorganismos más resistentes, en todos los tratamientos, alcanzándose una inactivación máxima (SC-CO₂+HPU+DI) de 1.55 ciclos-log. En el caso de las bacterias ácido lácticas, se consiguió la total inactivación (SC-CO₂+HPU+DI), partiendo de una contaminación inicial de 4.08 log (u.f.c./g) (TABLA 6).

Estudios en sustratos líquidos tratados mediante SC-CO₂, demuestran que los coliformes, levaduras y mohos pueden ser más sensibles que los mesófilos y las bacterias ácido lácticas (Ferrentino et al., 2012).

Esto puede ser de gran interés para la industria alimentaria, ya que este tipo de microorganismos son indicadores de alteraciones en la calidad de algunos productos cárnicos, como es el caso del jamón curado (Ferrentino et al., 2013b).

Sin embargo, estudios en matrices sólidas revelan comportamientos diferentes como en el caso de la presente investigación y los resultados encontrados por Ferrentino et al. (2013a), quienes observaron que al tratar jamón cocido con SC-CO₂ (120 bar, 50°C y 5 min), conteniendo una flora inicial de mesófilos (4.1±0.5 log(u.f.c./g)), psicrófilos (2.5±0.75 log(u.f.c./g)) y, bacterias ácido lácticas (4.2±0.5 log(u.f.c./g)); se redujo hasta 3.0, 1.6 y 2.5 log(u.f.c./g), respectivamente.

La influencia del tipo de microorganismo ha sido estudiada también en la inactivación mediante el tratamiento combinado de SC-CO₂+HPU en zumo de naranja por Ortuño et al. (2014). Los resultados mostraron que a 31°C y 225 bar se obtuvo una reducción de 7 y 4 ciclos-log para *E. coli* y *S. cerevisiae*, respectivamente, a los 6 min de tratamiento. Estas observaciones apoyan la hipótesis de la relación que existe entre la resistencia a la inactivación y el espesor de la pared celular ya que la pared de *S. cerevisiae* es similar a las gram positivas, es decir, más gruesa que la de *E. coli* (gram negativa) (Garcia-Gonzalez et al., 2009).

4. CONCLUSIONES

En la inactivación de *E. coli* inoculada en muestras de jamón curado, la temperatura del proceso fue clave tanto en el tratamiento mediante SC-CO₂+HPU como con SC-CO₂+HPU+DI. En cambio, la presión no mostró un efecto significativo ($p < 0.05$), ya fuesen sumergidas en la disolución o expuestas directamente al SC-CO₂+HPU. El tiempo de proceso afectó significativamente la inactivación de *E. coli* en el tratamiento que incluyó la disolución isotónica (SC-CO₂+HPU+DI).

La metodología de superficie de respuesta es una herramienta eficaz que permite conocer las condiciones de proceso óptimas para conseguir la máxima inactivación microbiana aplicando SC-CO₂+HPU y SC-CO₂+HPU+DI en jamón curado.

La presencia de una fase acuosa en el sistema de inactivación mediante SC-CO₂+HPU permitió la utilización de condiciones de tratamiento (presión, temperatura y tiempo) menos severas y permitió un mayor grado de inactivación de la flora natural del jamón curado; dentro de estos microorganismos, los coliformes fueron los más sensibles a la acción del CO₂ y, los mesófilos los más resistentes.

Cabe mencionar que SC-CO₂+HPU es una tecnología de conservación que podría representar un medio alternativo a los métodos de conservación térmicos, aumentando la vida útil de los alimentos, utilizando condiciones de proceso más suaves.

4. REFERENCIAS

- Brunner, G. 2005. Supercritical fluids: technology and application to food processing. *J Food Eng*, 67:21–33.
- Cappelletti, M.; Ferrentino, G.; 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.
- Chemat, F.; Zill-e-Huma, M.; Kamran, K. 2011. Applications of ultrasound in food technology: processing, preservation and extraction. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18(4):813–835.
- Choi, Y.M.; Bae, Y.Y.; Kim, K.H.; Kim, B.C.; Rhee, M.S. 2009. 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(4):419-424.
- Ferrentino, G.; Balzan, S.; Dorigato, A.; Pegoretti, A.; Spilimbergo, S. 2012. Effect of supercritical carbon dioxide pasteurization on natural microbiota, texture, and microstructure of fresh-cut coconut. *Journal of food science*, 77(5):E137-E143.
- Ferrentino, G.; Balzan, S.; Spilimbergo, S. 2013a. 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.; Balzan, S.; 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.
- Galvanin, F.; De Luca, R.; Ferrentino, G.; Barolo, M.; Spilimbergo, S.; Bezzo, F. 2014. Bacterial inactivation on solid food matrices through supercritical CO₂: A correlative study. *Journal of Food Engineering*, 120:146-157.
- Gao, Y.; Nagy, B.; Liu, X.; Simandi, B.; Wang, Q. 2009. Supercritical CO₂ extraction of luteinesters from marigold (*Tagetes erecta* L.) enhanced by ultrasound. *J. Supercritical Fluids*, 49(3):345–350.
- Garcia-Gonzalez, L.; Geeraerd, A.H.; Spilimbergo, S.; Elst, K.; Van Ginneken, L.; Debevere, J.; Van Imper, J.F.; 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):1-28.
- Garcia-Gonzalez, L.; Geeraerd, A. H.; Elst, K.; Van Ginneken, L.; Van Impe, J. F.; 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(3):253-263.
- Knorr, D.; Zenker, M.; Heinz, V.; Lee, D. 2004. Applications and potential of ultrasonics in food Processing. *Trends in Food Science & Technology*, 15(5):261-266.
- Ortuño, C.; Martínez-Pastor, M.T.; Mulet, A.; Benedito, J. 2012. An ultrasound-enhanced system for microbial inactivation using supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 15:477-484.
- Ortuño, C.; Martínez-Pastor, M.T.; Mulet, A.; Benedito, J. 2013. Application of high power ultrasound in the supercritical carbon dioxide inactivation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Research International*, 51(2):474-481.

- Ortuño, C.; Quiles, A.; Benedito, J. 2014. Inactivation kinetics and cell morphology of *E. coli* and *S. cerevisiae* treated with ultrasound-assisted supercritical CO₂. *Food Research International*, 62:955-964.
- Piyasena, P.; Mohareb, E.; McKellar, R.C. 2003. Inactivation of microbes using ultra-sound: a review. *International J. Food Microbiology* 87(3):207–216.
- Riera, E.; Blanco, A.; García, J.; Benedito, J.; Mulet, A.; Gallego-Juárez, J.A.; Blasco, M. 2010. High-power ultrasonic system for the enhancement of mass transfer in supercritical CO₂ extraction processes. *Ultrasonics*, 50(3):306-309.
- Valverde, M.; T., Marín-Iniest, F.; 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(4):421–428.
- Velasco, R. J; Villada, H. S.; Carrera, J. E. 2007. Aplicaciones de los Fluidos Supercríticos en la Agroindustria. *Información Tecnológica*, 18(1):53-66.
- Villamiel, M. “Aplicación de ultrasonidos en alimentos”, [en línea]. 10 de Mayo de 2006. *Eroski Consumer*. Dirección URL: < <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2006/05/10/23462.php>> [Consulta: 20 Jul. 2014].