



# Estudio experimental y computacional del perfil térmico en el interior del cilindro de un equipo de Altas Presiones Hidrostáticas

Tesis doctoral presentada por

Mg. Paula Ormando

ante la

Facultad de Ingeniería de la

Universidad Nacional de La Plata

para acceder al grado académico de

DOCTOR EN INGENIERÍA

Dirección de tesis:

Dr. Axel E. Larreteguy y Dr. Sergio R. Vaudagna

La Plata, 19 de Julio de 2019



## Dedicatoria

*A mis padres*

# Agradecimientos

*“Somos el tiempo que le dedicamos a nuestros sueños”...*

Si de algo estoy segura es que esta Tesis forma y formará parte de mi vida. También estoy convencida que a partir de ella nuevos sueños y desafíos me esperan. Por esto y más desearía agradecer todas esas personas que participaron en esta Tesis, acompañando en momentos difíciles y en momentos de felicidad.

*A mi director Axel Larreteguy, gracias por ser tan buen maestro, por enseñarme y acompañarme durante esta Tesis.*

*A mi co-director Sergio Vaudagna por permitirme ser parte del grupo de trabajo del Área de Procesamiento de Alimentos, por las sugerencias y correcciones de esta Tesis.*

*Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) y a la Universidad Argentina de la Empresa (UADE), por financiar mis estudios, ensayos y asistencia a eventos científicos.*

*A la Dra. Viviana Salvadori, por su acompañamiento, consejos y correcciones durante esta Tesis.*

*A mis compañeros del Laboratorio de Modelado y Simulación (MySLaB-UADE), a Pablo, por su gran ayuda en esta Tesis y a Soledad, Mariana, Maxi, Gerardo y Fran por acompañarme.*

*A mis compañeros de Área de Procesamiento de Alimentos (ITA), especialmente a Ma. Laura Vranic por su colaboración y trabajo en equipo durante esta Tesis.*

*Al Área de Bioquímica y Nutrición (ITA), a Adry Pazos por acompañarme y brindarme un espacio en el laboratorio. A Vanina y Silvina, por estar presentes en todo momento y a Sebastián y Sergio, por su gran amistad.*

*Finalmente a mi familia: a mis padres por su amor infinito, porque siempre sale el sol y por alentarme en cada sueño; a mi hermana Ma. Laura y a mi sobrina Lina por muchas más sonrisas compartidas.*



## Resumen

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se estudió a nivel experimental y computacional el perfil térmico en el cilindro de alta presión un equipo de Alta Presión Hidrostática (APH). En particular, se utilizó un equipo marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo High Pressure Iso-Lab System FPG9400:922 (Stansted, Reino Unido) de escala laboratorio y de configuración vertical y operación discontinua. Este equipo cuenta con un cilindro de 2 l de capacidad, el cual se encuentra rodeado por una camisa de intercambio de calor. La presión máxima de operación del equipo es de 900 MPa. El fluido de compresión utilizado es una mezcla de agua y propilenglicol (70:30 v/v).

La primera parte de esta Tesis se encuentra organizada en cuatro etapas experimentales que involucraron la medición de temperatura del fluido de compresión en tres posiciones (Superior, Central e Inferior a diferentes radios  $r=0$  y  $r= 35$  mm) de la canasta metálica dentro del cilindro de alta presión. Los ensayos se realizaron con y sin carga de producto durante el procesamiento a 200, 400 y 600 MPa en tres usos consecutivos (Uso I, II y III) del equipo. En las tres primeras etapas, se obtuvieron los parámetros  $\Delta T_1$ ,  $\Delta T_2$ ,  $\Delta T_3$  y  $\Delta T_4$  a partir del registro térmico de las termocuplas en diferentes posiciones durante las fases de compresión, mantenimiento de la presión y despresurización hasta presión atmosférica. Complementando lo anterior, y para validar la no homogeneidad térmica, se analizó el contenido de sulfhidrilos libres de la enzima amilasa fúngica (integrador de presión-temperatura-tiempo) en muestras ubicadas a diferentes posiciones en el interior del cilindro del equipo APH sólo a 600 MPa. La segunda parte de esta Tesis contempló el estudio computacional, donde se modificó el

código base de la aplicación *compressibleInterFoam* desarrollado en OpenFOAM<sup>®</sup> para simular un flujo multifásico compresible. El código se adaptó para modelar las paredes del cilindro del equipo como un fluido de muy alta viscosidad, y de esta manera simular el problema acoplado de transferencia térmica fluido-sólido. Para probar el código, y a manera de validación preliminar, se seleccionó un experimento publicado en la literatura (Hartmann y otros (2004)), utilizando agua como fluido de compresión y sin carga de alimento. En ese estudio se registró la evolución de la temperatura en tres posiciones (Superior, Central e Inferior) en el interior del cilindro del equipo de APH. Luego de la validación del caso de referencia, se diseñó mediante el software Gmsh<sup>®</sup> la canasta metálica y el cilindro del equipo Stansted Fluid Power Ltd.

Las simulaciones contemplaron el estudio computacional del tratamiento a 600 MPa, condiciones de canasta vacía y con carga, utilizando agua como fluido compresión en tres posiciones (Superior, Central e Inferior) y a diferentes radios  $r=0$ ,  $r=14$  y  $r=35$  mm. A su vez, se simuló un nuevo material de alta viscosidad pero con propiedades similares al ágar (condición con carga) para el primer uso del equipo y luego su régimen térmico.

A nivel de literatura abierta, no se encontraron referencias relacionadas con el estudio del uso consecutivo del equipo APH y su efecto sobre el perfil de temperatura. En el presente trabajo se observó que el equipo utilizado requiere como mínimo un uso sin carga de producto en la canasta metálica para su puesta en régimen térmico. Se observó que la temperatura del fluido que ingresa para el primer el uso del equipo resultó diferente en el Uso II.

Se destaca en la etapa experimental, la magnitud del efecto de los factores Presión y Posición y en menor medida el efecto de la Carga y del Uso. En el caso de la condición sin carga,

fue mayor la diferencia térmica para el fluido de compresión respecto a la condición con carga. Si bien no se midió experimentalmente la evolución térmica dentro de las muestras de ágar sólido, el efecto de homogenización en la temperatura de fluido se evidenció al graficar la influencia de los factores involucrados. Además, se evidenció experimentalmente que un incremento de la temperatura de fluido en la primera etapa del tratamiento con APH, luego se manifestará en un marcado descenso térmico. A su vez, en las posición cuyo radio correspondió al centro de la canasta ( $r= 0$  mm), se obtuvo un mayor incremento de temperatura frente a la posición lateral; debido al comportamiento del fluido por su proximidad a la pared metálica de la canasta y también por las pérdidas de calor respecto de la pared del cilindro de alta presión. En particular, a 600 MPa fue observado el máximo incremento de temperatura para en la zona Superior.

A su vez, la utilización de un integrador de presión-temperatura-tiempo y en combinación con la cuantificación de la concentración de sulfhidrilos libres de enzima amilasa fúngica no sólo permitió evaluar diferencias entre las muestras procesadas en cada posición fija, sino también variaciones del perfil térmico generado dentro del cilindro del equipo y sus diferencias entre los usos ensayados. Se demostró que es necesario para la validación al menos dos usos consecutivos al evidenciar que no se observaron diferencias significativas en las posiciones Superior y Central.

Si bien el estudio de modelado y simulación contempló un único nivel de presión (600 MPa) y agua como fluido de procesamiento, fue posible validar el modelo a partir de los literatura, y predecir la distribución de temperatura en el interior del cilindro de un equipo APH de alta presión. Asimismo, el modelo fue capaz de capturar el efecto del calentamiento por

compresión, la conducción en materiales sólidos (como la pared metálica y la carga de un alimento), y la convección natural debido a gradientes térmicos, implementando un código base -la aplicación *compressibleInterFoam*- del paquete open source OpenFOAM® desarrollada para simular flujo multifásico compresible. La labor realizada en esta etapa de modelado y simulación permitió comprender e interpretar el efecto observado a nivel experimental, a diferentes posiciones en el interior del cilindro, y carga durante su procesamiento por APH.

## Trabajos Publicados

- 2018

**Food Grade Enzyme Applied As Pressure Process Indicator.** *Autores: ORMANDO Paula, VRANIC Ma. Laura, GUIDI Silvina, AMBROSI Vanina IUFoST Mumbai World Congress, 23 al 27 de Octubre de 2018, Mumbai, India.*

**Free Sulphydryl Determination Evaluated as a High Pressure Process Indicator.**

*Autores: ORMANDO Paula, VRANIC Ma. Laura, GUIDI Silvina, AMBROSI Vanina. IFT Annual Meeting and Food Expo (AMFE18), 15 al 18 de Julio de 2018, Chicago, EE.UU.*

- 2017

**Perfil térmico en el cilindro de un equipo de altas presiones hidrostáticas a escala laboratorio.** *Autores: ORMANDO Paula, CUNZOLO Sebastián, SANOW Claudio, VRANIC Ma. Laura, VAUDAGNA Sergio R. CIBIA XI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, 22 al 27 de Octubre de 2017, Valparaíso, Chile.*

**Simulación hidrodinámica y térmica de un proceso a altas presiones hidrostáticas mediante OpenFOAM®.** *Autores: ORMANDO Paula, CARON Pablo, LARRETEGUY Axel E. CIBIA XI Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos, 22 al 27 de Octubre de 2017, Valparaíso, Chile.*

**Efecto de la alta presión hidrostática en la exposición del contenido de sulfhidrilos libres en amilasa fúngica.** *Autores: ORMANDO Paula, GUIDI Silvina, VRANIC Ma. Laura, AMBROSI Vanina INNOVA 2017, 8 Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, 27 al 29 de Septiembre de 2017, Montevideo, Uruguay.*

**Simulación de un proceso consecutivo de altas presiones hidrostáticas mediante OpenFOAM®.** *Autores: ORMANDO Paula, CARON Pablo, LARRETEGUY Axel E. INNOVA 2017, 8 Simposio Internacional de Innovación y Desarrollo de Alimentos, 27 al 29 de Septiembre de 2017, Montevideo, Uruguay.*

• **2016**

**Mapeo térmico durante el procesamiento por altas presiones hidrostáticas.** *Autores: ORMANDO Paula, SANOW Claudio, VRANIC Ma. Laura, VAUDAGNA Sergio R. CIIAL 2016, Congreso Iberoamericano de Ingeniería en Alimentos, 13 al 15 de Octubre de 2016, Punta del Este, Uruguay.*

**Image processing method applied on frozen and fresh meat pressurized samples.** *Autores: ORMANDO Paula, VRANIC Ma. Laura, NAGEL Martin, DELGADO Antonio. CIIAL 2016, Congreso Iberoamericano de Ingeniería en Alimentos, 13 al 15 de Octubre de 2016, Punta del Este, Uruguay.*

- 2015

**Incremento de la temperatura del fluido de presurización durante el ciclo de altas presiones hidrostáticas.** *Autores: ORMANDO Paula, SANOW Claudio, VRANIC Ma. Laura, LARRETEGUY Axel E, VAUDAGNA Sergio R. CyTAL 2015, XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 2 al 4 Noviembre, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.*

**Procesamiento con Altas Presiones Hidrostáticas: evaluación del incremento de temperatura del fluido en función del uso, nivel de presión y distribución dentro del equipo.** *Autores: ORMANDO Paula, SANOW Claudio, VRANIC Ma. Laura, LARRETEGUY Axel E, VAUDAGNA Sergio R. CyTAL 2015, XV Congreso Argentino de Ciencia y Tecnología de Alimentos, 2 al 4 Noviembre, Ciudad de Buenos Aires, Argentina.*

- 2014

**Application of the response surface methodology to the effect of high pressure conditions on physicochemical characteristics of meat.** *Autores: ORMANDO Paula, NAGEL Martin, VRANIC Ma. Laura and DELGADO Antonio. 2014 International Non-thermal Processing Workshop and Short Course, October 21-24 in Columbia, Ohio, USA.*

# Contenido

<b>Agradecimientos</b>	<b>IV</b>
<b>Resumen</b>	<b>VII</b>
<b>Trabajos Publicados</b>	<b>XI</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>2</b>
1.1. Aspectos teóricos de las Altas Presiones Hidrostáticas . . . . .	11
1.2. Equipos de APH con aplicación en alimentos . . . . .	13
1.3. Efecto combinado de presión y temperatura en alimentos . . . . .	19
1.4. Efecto de APH sobre la inactivación microbiana . . . . .	21
1.5. Efecto de las Altas Presiones sobre los componentes del alimento . . . . .	23
1.5.1. Agua . . . . .	23
1.5.2. Lípidos . . . . .	24
1.5.3. Hidratos de Carbono . . . . .	25
1.5.4. Proteínas . . . . .	26
1.6. Modelado y Simulación en APH . . . . .	33

---

1.6.1. Método de Volúmenes Finitos . . . . .	42
1.7. Aporte original y desarrollo de trabajo de investigación . . . . .	52
1.7.1. Hipótesis y objetivos del trabajo de investigación planteado . . . . .	53
<b>I</b>	<b>55</b>
<b>2. Estudio Experimental</b>	<b>56</b>
2.1. Descripción del equipo APH y condiciones operativas . . . . .	57
2.2. Aplicación general del tratamiento de APH ensayado . . . . .	62
2.2.1. Medición de temperatura del fluido de presurización en diferentes po- siciones . . . . .	65
2.3. Diseño y evaluación de ensayos experimentales . . . . .	69
2.3.1. Etapa 1: Evaluación de la puesta en régimen térmico de un equipo APH de escala laboratorio sin carga de producto en la canasta metálica	70
2.3.2. Etapa 2: Evaluación de la distribución de temperatura del fluido de presurización luego de la puesta en régimen térmico de un equipo de APH de escala laboratorio, sin carga de producto en la canasta metálica	90
2.3.3. Etapa 3: Comparación de la distribución de temperatura del fluido de presurización en el interior de la canasta metálica del equipo de APH con carga y sin carga . . . . .	106

2.3.4. Etapa 4: Validación de la distribución de temperatura en el interior del cilindro del equipo APH mediante la utilización enzima de la $\alpha$ -amilasa fúngica . . . . .	146
<b>II</b>	<b>158</b>
<b>3. Estudio de Modelado y Simulación</b>	<b>159</b>
3.1. Modelo matemático-numérico . . . . .	160
3.1.1. Análisis de un caso 0 Dimensional de parámetros concentrados . . . . .	160
3.1.2. Implementación y validación del Modelo Simplificado en OpenFOAM®	165
3.2. Diseño de la geometría de un equipo de APH marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo FPG9400:922 . . . . .	174
3.2.1. Estudio del caso Stansted Fluid Power Ltd. modelo FPG9400:922 . . . . .	174
<b>4. Conclusiones Generales</b>	<b>196</b>
<b>A. Anexo Experimental: Etapa 2 y Etapa 3</b>	<b>200</b>
A.1. Etapa 2: Distribución de temperatura del fluido de presurización luego de la puesta en régimen térmico, sin carga de alimento en la canasta metálica . . . . .	200
A.1.1. Etapa 3: Comparación de la distribución de temperatura del fluido de presurización en el interior de la canasta metálica del equipo de APH con carga y sin carga . . . . .	224
<b>B. Acta</b>	<b>229</b>

**Bibliografía**

**231**

# Lista de Figuras

1-1. Número de equipos de APH instalados desde el año 2004. Fuente: Hiperbaric (2016). . . . .	6
1-2. Productos cárnicos feteados y procesados por APH. Fuente: Avure (2019) . .	8
1-3. Esquema simple representando los principios isostático y de Le Chatelier . .	13
1-4. Esquema simplificado del procesamiento de Alta Presión Hidrostática en alimentos. Fuente: Parzanese (2010) . . . . .	15
1-5. Equipo de APH marca Standed Fluid Power Ltd (Stansted, UK) e interior de su cilindro, instalado en la planta piloto del Instituto Tecnología de Alimentos (INTA Castelar) . . . . .	16
1-6. Perfiles de presión y temperatura durante un proceso de APH. Fuente: Yordanov y Angelova (2010) . . . . .	19
1-7. Diagrama de fases sólido-líquido del agua en función de la presión y la temperatura. Fuente: Otero y Sanz (2003) . . . . .	25
1-8. Estructura tridimensional de la enzima $\alpha$ amilasa fúngica. Fuente: Sharifi-Rad y otros (2014) . . . . .	31

---

<b>1-9.</b> Reacción del reactivo DNTB con grupos SH. Fuente: Trivedi y otros (2009) .	32
<b>1-10.</b> Componentes de una malla . . . . .	43
<b>1-11.</b> Convención de nodos . . . . .	44
<b>1-12.</b> El algoritmo SIMPLE . . . . .	50
<b>2-1.</b> Esquema de equipo APH de escala laboratorio . . . . .	57
<b>2-2.</b> Cabezal móvil e ingreso de la canasta metálica: (a) Cabezal móvil y canasta metálica (b) Inserción de canasta metálica en el interior del cilindro encamisado	59
<b>2-3.</b> Módulo de servicio del equipo APH Stansted Fluid Power Ltd. modelo FPG9400:922	60
<b>2-4.</b> Módulo de refrigeración marca Euro Chiller acoplado al equipo APH . . . . .	61
<b>2-5.</b> Módulo de control del equipo APH marca Stansted Fluid Power Ltd. FPG9400:922	62
<b>2-6.</b> Vista de las conexiones de termocuplas de termocuplas Tipo K en el cabezal superior . . . . .	66
<b>2-7.</b> Conexión e ingreso de canasta metálica en el interior del equipo APH . . . . .	66
<b>2-8.</b> Posiciones radiales evaluadas . . . . .	67
<b>2-9.</b> Vista posterior de la canasta metálica perforada . . . . .	67
<b>2-10.</b> Posiciones axiales evaluadas en la canasta metálica . . . . .	68
<b>2-11.</b> Curvas experimentales a $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos y primer uso (Uso I) del equipo de APH . . . . .	72
<b>2-12.</b> Curvas experimentales a $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos y primer uso (Uso I) del equipo de APH . . . . .	73

<b>2-13.</b> Curvas experimentales correspondientes al primer uso (Uso I) y al tratamiento de 200 MPa $\pm$ 5 MPa durante 5 minutos . . . . .	76
<b>2-14.</b> Curvas experimentales correspondientes al segundo uso (Uso II) y al tratamiento 200 MPa $\pm$ 5 MPa durante 5 minutos . . . . .	76
<b>2-15.</b> Curvas experimentales correspondientes al tercer uso (Uso III) y al tratamiento 200 MPa $\pm$ 5 MPa durante 5 minutos . . . . .	77
<b>2-16.</b> Curvas experimentales correspondientes al primer uso (Uso I) y al tratamiento 600 MPa $\pm$ 5 MPa durante 5 minutos . . . . .	77
<b>2-17.</b> Curvas experimentales correspondientes al segundo uso (Uso II) y al tratamiento 600 MPa $\pm$ 5 MPa durante 5 minutos . . . . .	78
<b>2-18.</b> Curvas experimentales correspondientes al tercer uso (Uso III) y al tratamiento 600 MPa $\pm$ 5 MPa durante 5 minutos . . . . .	78
<b>2-19.</b> Interacción de los factores Presión y Posición evaluados en la Etapa 1 . . . . .	83
<b>2-20.</b> Influencia del factor Uso en las Posiciones evaluadas de la Etapa 1 . . . . .	84
<b>2-21.</b> Influencia del factor Uso y las Presiones evaluadas de la Etapa 1 . . . . .	85
<b>2-22.</b> Influencia y magnitud de los factores estudiados de la Etapa 1 sobre $\Delta T_1$ . . . . .	86
<b>2-23.</b> Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 200 MPa y en r= 0 mm para la Etapa 2 . . . . .	93
<b>2-24.</b> Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 200 MPa y en r= 35 mm para la Etapa 2 . . . . .	93
<b>2-25.</b> Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 400 MPa y en r= 0 mm para la Etapa 2 . . . . .	94

---

<b>2-26.</b> Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 400 MPa y en r= 35 mm para la Etapa 2 . . . . .	94
<b>2-27.</b> Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 600 MPa y en r= 0 mm para la Etapa 2 . . . . .	95
<b>2-28.</b> Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 600 MPa y en r= 35 mm para la Etapa 2 . . . . .	95
<b>2-29.</b> Interacción los factores Presión y Posiciones radiales para $\Delta T_1$ en la Etapa 2	98
<b>2-30.</b> Interacción los factores Presiones y las Posiciones axiales para $\Delta T_1$ en la Etapa 2	99
<b>2-31.</b> Interacción los factores Posiciones axiales y las Posiciones radiales para $\Delta T_1$ en la Etapa 2 . . . . .	100
<b>2-32.</b> Influencia y magnitud de los factores estudiados de la Etapa 2 sobre $\Delta T_1$ . .	101
<b>2-33.</b> Interacción de los factores Presión y Posiciones radiales estudiadas para $\Delta T_2$ en la Etapa 2 . . . . .	102
<b>2-34.</b> Interacción de los factores Presión y las Posiciones axiales estudiadas para $\Delta T_2$ en la Etapa 2 . . . . .	103
<b>2-35.</b> Posiciones axiales en función a las posiciones radiales estudiadas para $\Delta T_2$ en la Etapa 2 . . . . .	104
<b>2-36.</b> Valores medios de $\Delta T_2$ e influencia de los efectos principales evaluados en la Etapa 2 . . . . .	105
<b>2-37.</b> Cilindros de ágar nutritivo utilizados como carga de producto durante el procesamiento por APH . . . . .	107
<b>2-38.</b> Parámetros evaluados a 200 MPa durante el Uso I en condición sin carga . .	110

<b>2-39.</b> Parámetros evaluados a 200 MPa durante el Uso III en condición sin carga .	110
<b>2-40.</b> Parámetros evaluados a 200 MPa durante el Uso I en condición con carga . .	111
<b>2-41.</b> Parámetros evaluados a 200 MPa durante el Uso III en condición con carga .	111
<b>2-42.</b> Parámetros evaluados a 600 MPa durante el Uso I en condición sin carga . .	112
<b>2-43.</b> Parámetros evaluados a 600 MPa durante el Uso III en condición sin carga .	112
<b>2-44.</b> Parámetros evaluados a 600 MPa durante el Uso I en condición con carga . .	113
<b>2-45.</b> Parámetros evaluados a 600 MPa durante el Uso III en condición con carga .	113
<b>2-46.</b> Curvas experimentales comparadas a 200 MPa durante el Uso I en condición con y sin carga . . . . .	116
<b>2-47.</b> Curvas experimentales comparadas a 200 MPa durante el Uso III en condición con y sin carga . . . . .	117
<b>2-48.</b> Curvas experimentales comparadas a 600 MPa durante el Uso I en condición con y sin carga . . . . .	117
<b>2-49.</b> Curvas experimentales comparadas a 600 MPa durante el Uso III en condición con y sin carga . . . . .	118
<b>2-50.</b> Curvas experimentales comparadas a 200 MPa en condición con y sin carga para T-Superior . . . . .	118
<b>2-51.</b> Curvas experimentales comparadas a 200 MPa en condición con y sin carga para T-Proceso . . . . .	119
<b>2-52.</b> Curvas experimentales comparadas a 600 MPa en condición con y sin carga para T-Superior . . . . .	120

---

<b>2-53.</b> Curvas experimentales comparadas a 600 MPa en condición con y sin carga para T-Proceso . . . . .	120
<b>2-54.</b> Interacciones entre los factores Carga y Presión para el parámetro $\Delta T_1$ de la Etapa 3 . . . . .	122
<b>2-55.</b> Interacciones entre los factores Presión y Carga para el parámetro $\Delta T_1$ de la Etapa 3 . . . . .	123
<b>2-56.</b> Interacciones entre los factores Uso y Posición para el parámetro $\Delta T_1$ . . . .	124
<b>2-57.</b> Interacciones entre los factores Posición y Uso para el parámetro $\Delta T_1$ de la Etapa 3 . . . . .	125
<b>2-58.</b> Factores fijos estudiados para el parámetro $\Delta T_1$ de la Etapa 3 . . . . .	126
<b>2-59.</b> Interacciones entre los factores Posición y Uso para el parámetro $\Delta T_2$ de la Etapa 3 . . . . .	127
<b>2-60.</b> Interacciones entre los factores Uso y Posición para el parámetro $\Delta T_2$ de la Etapa 3 . . . . .	128
<b>2-61.</b> Interacciones entre los factores Presión y Posición para el parámetro $\Delta T_2$ de la Etapa 3 . . . . .	129
<b>2-62.</b> Interacciones entre los factores Posición y Presión para el parámetro $\Delta T_2$ de la Etapa 3 . . . . .	129
<b>2-63.</b> Factores fijos estudiados para el parámetro $\Delta T_2$ de la Etapa 3 . . . . .	130
<b>2-64.</b> Interacción Carga-Posición-Uso en la condición sin carga del parámetro $\Delta T_3$ de la Etapa 3 . . . . .	132

<b>2-65.</b> Interacción Carga-Posición-Uso en la condición con carga del parámetro $\Delta T_3$ de la Etapa 3 . . . . .	133
<b>2-66.</b> Interacción Carga-Presión-Uso en la condición sin carga del parámetro $\Delta T_3$ de la Etapa 3 . . . . .	134
<b>2-67.</b> Interacción Carga-Presión-Uso en la condición con carga del parámetro $\Delta T_3$ de la Etapa 3 . . . . .	134
<b>2-68.</b> Interacción Carga-Presión-Posición en la condición sin carga del parámetro $\Delta T_3$ de la Etapa 3 . . . . .	135
<b>2-69.</b> Interacción Carga-Presión-Posición en la condición con carga del parámetro $\Delta T_3$ de la Etapa 3 . . . . .	136
<b>2-70.</b> Interacción Presión-Posición-Uso en la condición de 200 MPa para el paráme- tro $\Delta T_3$ de la Etapa 3 . . . . .	137
<b>2-71.</b> Interacción Presión-Posición-Uso en la condición de 600 MPa para el paráme- tro $\Delta T_3$ de la Etapa 3 . . . . .	137
<b>2-72.</b> Influencia Factores fijos estudiados para el parámetro $\Delta T_3$ de la Etapa 3 . . .	138
<b>2-73.</b> Interacción Presión-Posición-Uso en la condición de 200 MPa para el paráme- tro $\Delta T_4$ de la Etapa 3 . . . . .	140
<b>2-74.</b> Interacción Presión-Posición-Uso en la condición de 600 MPa para el paráme- tro $\Delta T_4$ de la Etapa 3 . . . . .	140
<b>2-75.</b> Factores fijos estudiados para el parámetro $\Delta T_4$ de la Etapa 3 . . . . .	141
<b>2-76.</b> Comparación de los factores fijos Presión y Posición para los parámetros de la Etapa 3 . . . . .	145

---

2-77.Comparación de los factores fijos Uso y Carga para los parámetros de la Etapa 3145	
2-78.Enzima $\alpha$ -amilasa de <i>Aspergillus oryzae</i> , (A-9857, Sigma Aldrich, Alemania)	147
2-79.Visualización del armado del dispositivo antes del envasado al vacío . . . . .	148
2-80.Primer uso del equipo de APH a 600 MPa $\pm$ 5 MPa utilizado para procesar los extractos enzimáticos . . . . .	151
2-81.Segundo uso del equipo de APH a 600 MPa $\pm$ 5 MPa utilizado para procesar los extractos enzimáticos . . . . .	152
2-82.Tercer uso del equipo de APH a 600 MPa $\pm$ 5 MPa utilizado para procesar los extractos enzimáticos . . . . .	152
2-83.Valores medios del contenido sulfhidrilos libres vs. Posición . . . . .	153
2-84.Valores medios del contenido sulfhidrilos libres vs. Usos . . . . .	154
3-1. Evoluciones de las variables simuladas en función del tiempo . . . . .	164
3-2. Esquema del equipo, posición de termocuplas, ingreso de fluido y dominio utilizando 18000 volúmenes de control, Fuente:Hartmann y otros (2004) . . .	166
3-3. Geometría simple 2D representando el equipo evaluado por Hartmann y otros (2004) . . . . .	168
3-4. Resultados de la simulación a 500 MPa, Fuente: Hartmann y otros (2004) . .	170
3-5. Evolución obtenida en OpenFOAM <sup>®</sup> durante la compresión y fase de mante- nimiento del fluido a 500 MPa . . . . .	171
3-6. Conducción de calor en la pared metálica durante fase de mantenimiento del fluido a 500 MPa . . . . .	172

---

<b>3-7.</b> Validación de los resultados experimentales de Hartmann y otros (2004), los obtenidos mediante OpenFOAM <sup>®</sup> y la temperatura media del caso OD . . . . .	173
<b>3-8.</b> Vista de la posición radial de la canasta metálica utilizada en los ensayos experimentales . . . . .	174
<b>3-9.</b> Evolución de la presión del fluido (agua) durante el procesamiento a 600 MPa como condición impuesta y dato necesario para OpenFOAM <sup>®</sup> . . . . .	177
<b>3-10.</b> Inicio de la etapa de compresión para el primer uso simulado . . . . .	178
<b>3-11.</b> Tiempo 50 s desde el inicio del proceso de APH . . . . .	179
<b>3-12.</b> Tiempo 100 s desde el inicio del proceso de APH . . . . .	179
<b>3-13.</b> Tiempo 180 s desde el inicio del proceso de APH . . . . .	180
<b>3-14.</b> Inicio de la etapa de mantenimiento de la presión de 600 MPa, tiempo 181 s . . . . .	181
<b>3-15.</b> Tiempo 200 s desde el inicio del proceso de APH . . . . .	181
<b>3-16.</b> Tiempo 400 s desde el inicio del proceso de APH . . . . .	182
<b>3-17.</b> Tiempo 466 s desde el inicio del proceso de APH . . . . .	182
<b>3-18.</b> Tiempo 467 s desde el inicio del proceso de APH . . . . .	183
<b>3-19.</b> Tiempo 500 desde el inicio del proceso de APH . . . . .	183
<b>3-20.</b> Tiempo 560 s desde el inicio del proceso de APH . . . . .	184
<b>3-21.</b> Tiempo final del proceso de APH a 586 s . . . . .	184
<b>3-22.</b> Patrones de flujo observado sin y con carga de ágar simulados . . . . .	185
<b>3-23.</b> Evolución térmica del las posiciones superiores para el Uso I . . . . .	188
<b>3-24.</b> Evolución térmica del las posiciones centrales para el Uso I . . . . .	189
<b>3-25.</b> Evolución térmica del las posiciones inferiores para el Uso I . . . . .	190

---

<b>3-26.</b> Evolución térmica del las posiciones superiores durante el régimen térmico . . .	191
<b>3-27.</b> Evolución térmica del las posiciones centrales durante el régimen térmico . . .	192
<b>3-28.</b> Evolución térmica del las posiciones inferiores durante el régimen térmico . . .	193
<b>A-1.</b> Curvas experimentales con $r = 0$ mm correspondientes al Uso II del equipo APH y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	201
<b>A-2.</b> Curvas experimentales con $r = 0$ mm correspondientes al Uso III del equipo APH y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	201
<b>A-3.</b> Curvas experimentales con $r = 0$ mm correspondientes al Uso II del equipo APH y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	202
<b>A-4.</b> Curvas experimentales con $r = 0$ mm correspondientes al Uso III del equipo APH y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	202
<b>A-5.</b> Curvas experimentales con $r = 0$ mm correspondientes al Uso II del equipo APH y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	203
<b>A-6.</b> Curvas experimentales con $r = 0$ mm correspondientes al Uso III del equipo APH y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	203
<b>A-7.</b> Curvas experimentales con $r = 35$ mm correspondientes al Uso II del equipo APH y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	204
<b>A-8.</b> Curvas experimentales con $r = 35$ mm correspondientes al Uso III del equipo APH y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	205
<b>A-9.</b> Curvas experimentales con $r = 35$ mm correspondientes al Uso II del equipo APH y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	206

<b>A-10</b> Curvas experimentales con $r = 35$ mm correspondientes al Uso III del equipo APH y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	206
<b>A-11</b> Curvas experimentales con $r = 35$ mm correspondientes al Uso II del equipo APH y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	207
<b>A-12</b> Curvas experimentales con $r = 35$ mm correspondientes al Uso III del equipo APH y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	207
<b>A-13</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Superior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	208
<b>A-14</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Superior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	208
<b>A-15</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	209
<b>A-16</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	209
<b>A-17</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Inferior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	210

<b>A-18</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Inferior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	210
<b>A-19</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Superior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	211
<b>A-20</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Superior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	211
<b>A-21</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	212
<b>A-22</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	212
<b>A-23</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Inferior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	213
<b>A-24</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Inferior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	213

<b>A-25</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Superior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	214
<b>A-26</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Superior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	214
<b>A-27</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	215
<b>A-28</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	215
<b>A-29</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Inferior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	216
<b>A-30</b> Curvas experimentales con termocuplas T-Inferior en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos . . . . .	216
<b>A-31</b> Curvas experimentales con termocuplas en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos .	218
<b>A-32</b> Curvas experimentales con termocuplas en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos	219

<b>A-33</b> Curvas experimentales con termocuplas en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos .	220
<b>A-34</b> Curvas experimentales con termocuplas en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos	221
<b>A-35</b> Curvas experimentales con termocuplas en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos .	222
<b>A-36</b> Curvas experimentales con termocuplas en posiciones $r = 0$ y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$ durante 5 minutos	223
<b>A-37</b> Curvas comparadas a 600 MPa Uso I con y sin carga vs. 200 MPa sin carga .	224
<b>A-38</b> Curvas comparadas a 600 MPa Uso I con y sin carga vs. 200 MPa con carga	225
<b>A-39</b> Curvas comparadas a 600 MPa Uso I con y sin carga vs. 200 MPa Uso III sin carga . . . . .	225
<b>A-40</b> Curvas comparadas a 600 MPa Uso I con y sin carga vs. 200 MPa Uso III con carga . . . . .	226
<b>A-41</b> Curvas comparadas a 600 MPa Uso III con y sin carga vs. 200 MPa Uso I sin carga . . . . .	226
<b>A-42</b> Curvas comparadas a 600 MPa Uso III con y sin carga vs. 200 MPa Uso I con carga . . . . .	227
<b>A-43</b> Curvas comparadas a 600 MPa Uso III con y sin carga vs. 200 MPa Uso III sin carga . . . . .	227
<b>A-44</b> Curvas comparadas a 600 MPa Uso III con y sin carga vs. 200 MPa Uso III con carga . . . . .	228

**B-1.** Acta de Examen del día 2 de diciembre de 2019 . . . . . 230

# Lista de Tablas

1-1. Composición de aminoácidos de la enzima $\alpha$ amilasa. Fuente: Santa Cruz (1997)	30
2-1. ANOVA del parámetro $\Delta T_1$ de la Etapa 1	82
2-2. Comparación de valores medios de $\Delta T_1$ de la Etapa 1	83
2-3. ANOVA del parámetro $\Delta T_1$ de la Etapa 2	98
2-4. ANOVA del parámetro $\Delta T_2$ de la Etapa 2	102
2-5. ANOVA para el parámetro $\text{Ln } \Delta T_1$ de la Etapa 3	121
2-6. ANOVA para el parámetro $\text{Ln } \Delta T_2$ de la Etapa 3	127
2-7. ANOVA para el parámetro $\Delta T_3$ de la Etapa 3	131
2-8. ANOVA para el parámetro $\Delta T_4$ de la Etapa 3	139
2-9. ANOVA del contenido sulfhidrilos libres de la Etapa 4	153
3-1. Valores utilizados en la simulación del caso OD	163
3-2. Valores utilizados para la validación del trabajo de Hartmann y otros (2004)	167

# Capítulo 1

## Introducción

La inocuidad alimentaria y la estabilidad de los alimentos se encuentran relacionadas a la calidad microbiológica y otros fenómenos como las reacciones bioquímicas, las reacciones enzimáticas y los cambios estructurales. Tradicionalmente, los tratamientos térmicos son los métodos más utilizados en la preservación de alimentos e involucran la transferencia de calor debido a un gradiente térmico, desde un medio a mayor temperatura (medio calefactor) hacia un medio/cuerpo (alimento) a menor temperatura. Si bien los tratamientos térmicos son eficaces para la inactivación microbiana y enzimática y son en general de menor costo, pueden ocasionar cambios en la calidad nutricional y sensorial del producto, induciendo la generación de off-flavors, ablandamiento y destrucción de pigmentos (efecto sobre el color) y compuestos de interés nutricional (vitaminas, aminoácidos, etc.). Asimismo, la severidad de los tratamientos térmicos (nivel térmico, tiempo de procesamiento) dependen del tamaño y de la forma del alimento tratado. En este sentido, en los últimos 30 años se desarrollaron las llamadas “novel technologies” o “tecnologías emergentes” las cuales permiten preservar

los alimentos (asegurar inocuidad y extender estabilidad) con efecto mínimo sobre la calidad nutricional y sensorial de los alimentos. Las nuevas tecnologías pueden ser de naturaleza térmica o no térmica y en su desarrollo se contempló la reducción del tiempo de tratamiento y del consumo de agua y energía. En el caso de las nuevas tecnologías térmicas, el principal factor de preservación/procesamiento es la temperatura pero en éstas, el calor se genera en forma interna por lo que no depende de la existencia de un gradiente térmico. En el caso de las tecnologías no térmicas, el principal factor de preservación/procesamiento no es la temperatura sino otra variable física, como la presión, un campo eléctrico, un campo magnético, radiaciones ionizantes o no ionizantes, etc. En relación a las tecnologías no térmicas, la correspondiente a Altas Presiones Hidrostáticas (APH) constituye aquella que mayor aplicación industrial presenta a nivel internacional. APH asegura la inactivación de microorganismos patógenos y alteradores y también la inactivación de enzimas, con cambios mínimos en la textura, color, sabor y componentes de interés nutricional. La característica más importante del tratamiento con APH es la preservación de la frescura de los alimentos. Ello se debe a que la APH afecta principalmente los enlaces no covalentes (uniones puentes de hidrógeno, iónicas e hidrofóbicas) y algunas uniones covalentes, muy sensibles a los cambios de presión. Esto significa que componentes de los alimentos de bajo peso molecular (responsables de las características nutricionales y sensoriales) no son afectados, mientras que componentes de alto peso molecular (biopolímeros) son afectados por la alta presión Welti-Chanes y otros (2005).

APH también permite extender la estabilidad de los alimentos, logrando en algunos casos extender la vida útil x2, x4 ó x10, dependiendo del tipo de productos. Además, en el

tratamiento con APH la aplicación de la presión es uniforme (*principio isostático*) y cuasi instantáneo, por lo que el tratamiento es independientemente del tamaño y forma del material procesado, asegurando tiempos de procesamiento menores a los correspondientes a las tecnologías convencionales.

A su vez, el procesamiento con APH se ha extendido en las áreas de conservación de los alimentos más allá de la esterilización y pasteurización. La gama de posibilidades que ofrece la combinación de APH con temperaturas de refrigeración o subcero (siglas en inglés, High Pressure Low Temperatura- HPLT) brinda nuevos desafíos para la preservación y el desarrollo de alimentos. Por ejemplo, la utilización de la presión en combinación con los procesos de congelación, descongelación y almacenamiento bajo presión. A su vez, otras aplicaciones de las APH son el desarrollo de alimentos con textura diferenciada o alimentos modificados (por ejemplo reducidos en cloruro de sodio y/o lípidos) y la mejora de la funcionalidad de algunos ingredientes Hugas y otros (2002), Szerman y otros (2019).

También se puede aplicar APH en la optimización de procesos convencionales de la industria de los alimentos (por ejemplo, aceleración de curado, madurado, etc.) Como ejemplo de estas aplicaciones se puede indicar la maduración acelerada de quesos tratados con APH, Costabel y otros (2016) y la difusión asistida de sales en productos cárnicos o de azúcares en productos frutihortícolas. Los primeros trabajos de investigación sobre los efectos de la alta presión sobre la preservación de alimentos fueron publicados por Hite (1899) hacia finales del siglo XIX, quien logró tratar leche mediante la aplicación de altas presiones. El tratamiento que aplicó fue 700 MPa durante 10 minutos a temperatura ambiente y obtuvo como resultado una disminución significativa de la carga microbiana. Este mismo autor años

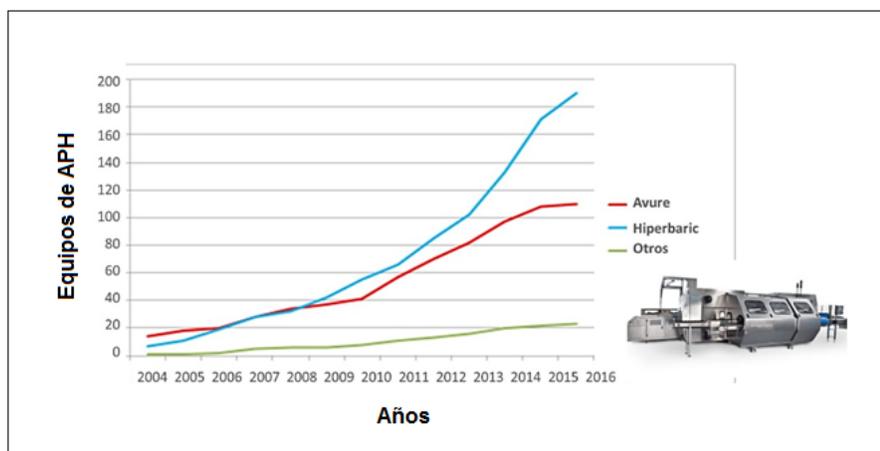
más tarde estudió las consecuencias de las altas presiones sobre la preservación de frutas y hortalizas, lo cual permitió la extensión del tiempo de almacenamiento de estos productos. Pese a que esos resultados fueron sumamente positivos, la difusión de la tecnología APH para la conservación de alimentos, se presentó a partir de 1980 y durante una década se trabajó fundamentalmente en investigación, estudiando principalmente el efecto sobre la inactivación de microorganismos. En el año 1990 salió a la venta en Japón el primer producto (mermeladas de kiwi, manzana, etc.) tratado mediante la tecnología APH.

Actualmente esta tecnología se encuentra establecida a nivel internacional, con una demanda de equipos por el valor de 600 millones de dólares y una producción anual de alimentos procesados por esta tecnología por una suma de 12 billones de dólares, Avure (2019). Por otro lado, ese crecimiento y asimilación de la tecnología APH se manifiesta en forma exponencial desde el año 2000. Avure Technologies, Avure (2019), una de las principales empresas productoras de equipos APH de escala industrial, indica que si bien la inversión inicial siempre ha sido un obstáculo para la implementación de esta tecnología, en los últimos años los costos de inversión se han reducido y los equipos se han adaptado a los productos y envases a procesar. A su vez, la FDA (Food Drug Administration, de EE.UU.) impulsa nuevas normativas sobre etiquetado para productos procesados con APH, diferenciando las palabras fresco o crudo en alimentos, FDA (2019).

Algunos proveedores de equipos APH de escala industrial son Avure (Ohio, EE.UU.) e Hiperbaric (Burgos, España), ver Figura 1-1. Existen en la actualidad más de 350 equipos de escala industrial instalados a nivel internacional. La distribución de equipos (expresada en porcentajes) que se encuentran en los distintos continentes es: América 57,5%; Europa

23,6 %; Asia 12,3 %; Oceanía 5,1 %; África 0,9 %, Hiperbaric (2016). A nivel comercial, las principales aplicaciones de los equipos industriales son: productos cárnicos (25 %), productos derivados de frutas y hortalizas (20 %), jugos y bebidas (20 %), servicio de procesamiento (23 %) y otros (12 %).

Actualmente, en el mercado existen más de 150 productos alimenticios tratados con APH. Esta tecnología se aplica a nivel industrial para pasteurizar diferentes productos como jugos de frutas o sus mezclas con hortalizas (jugo de naranja de marca Ultifruit en Francia; Freshafruit en Australia; Evolution Fresh, BluePrintJuices, Suja en EE.UU., etc.), mermeladas, jamón cocido/curado (España y Campofrío, España; Hormel, EE.UU., Vismara, Italia), carnes listas para consumir (Hormel, EE.UU.; Maple Leaf, Canadá), carnes listas para cocinar (Vuelta y Vuelta, Campofrío, España), hamburguesas y salchichas (Fressure, Cargill, EE.UU.), pescados y mariscos, guacamole, salsas y aderezos (Wholly Guacamole.; Verfruco, México), etc.



**Figura 1-1:** Número de equipos de APH instalados desde el año 2004. Fuente: Hiperbaric (2016).

Como éxito comercial y debido a la diversidad cultural e inmigración que presenta actualmen-

te Estados Unidos, la empresa AVOMEX<sup>®</sup> con su producto Wholly Guacamole, AVOMEX (2019), implementó el procesamiento del guacamole a presiones inferiores a los 600 MPa durante 1 minuto. Dicho producto obtuvo rápidamente la aceptación del público ya que previamente sólo se preparaba a nivel doméstico, obteniendo de esta manera un producto con mayor vida útil en anaquel, listo para utilizar y sin aditivos Velázquez y otros (2005).

Para productos cárnicos de alto valor agregado, la tecnología APH se aplica como tratamiento post-ensado de jamón crudo o cocido, fraccionados o enteros, salames y salamines, pechugas de pollo o pavo cocidas, embutidos y productos listos para consumir (ver Figura 1-2), entre otros, permitiendo reducir significativamente la microbiota (patógena y alteradora) presente en el producto y aumentar la vida útil del mismo, sin cambios apreciables en sus características sensoriales) y propiedades nutricionales (Hjelmqwis (2005), Masana y otros (2015)).

Sin embargo, en el caso de carnes rojas crudas y crudas marinadas, la aplicación de APH no ha presentado el mismo desarrollo (Sanz y otros (2007); Vaudagna y otros (2012)), aun cuando su utilización permitiría extender la vida útil y asegurar la inactivación de microorganismos patógenos relevantes (como E. coli O157:H7). En el caso de carnes frescas marinadas "listas para consumir" (productos tipo *carpaccio*) el principal problema vinculado con su comercialización es el riesgo de Enfermedades transmitidas por Alimentos (ETA's), debido a que en su preparación no se aplican tratamientos que aseguren reducciones significativas de microorganismos patógenos. En este sentido, la tecnología APH se presenta como una opción interesante para asegurar la inocuidad y extender la vida útil de ese tipo de productos, debido a que en los mismos no es posible aplicar tratamientos de pasteurización térmica por el

deterioro de los atributos sensoriales. A su vez, en el caso de carnes frescas marinadas "listas para cocinar" se pretende extender su vida útil, debido a que la estabilidad del producto se reduce por la contaminación que ocurre en las etapas de preparación del mismo.



**Figura 1-2:** Productos cárnicos feteados y procesados por APH. Fuente: Avure (2019)

La escasa aplicación comercial de APH en la pasteurización de carnes rojas frescas se debe a la decoloración que se produce en la carne en el rango de presiones necesarias para inactivar microorganismos patógenos y alteradores -mayores a 300 MPa- (Carlez y otros (1995), Jung y otros (2003)). En el rango 200-350 MPa se observa un aumento de la luminosidad, lo cual sería consecuencia de la desnaturalización de la globina y/o desplazamiento o pérdida del hierro hemínico, mientras que en el rango 300-600 MPa disminuye el parámetro  $a^*$  (verde-rojo, sistema CIELab), adquiriendo la carne cruda apariencia a jamón cocido. Esta decoloración resultaría de la oxidación de la mioglobina ferrosa a metamioglobina (Carlez y otros (1995), Jung y otros (2003)). En carne bovina picada, Carlez y otros (1995), incorporaron nitrito de sodio y observaron una minimización de la decoloración por oxidación, aunque no se produjo una disminución del efecto de la alta presión sobre la luminosidad. Otra alternativa estudiada, para minimizar el efecto de las altas presiones sobre la decoloración de carne vacuna fresca y fresca marinada, fue la aplicación de APH a temperatura subcero (Sanz y otros (2007); Vaudagna y otros (2009); Vaudagna y otros (2012)). En este caso las piezas se congelaron

mediante un sistema convencional (túnel de congelación) y posteriormente se les aplicó un tratamiento con APH a temperatura subcero ( $-30^{\circ}\text{C}$ ). Esta metodología permitió minimizar el efecto de la presión sobre la luminosidad y la reducción del color rojo. Este efecto también fue observado en el tratamiento APH a temperatura de refrigeración ( $0^{\circ}\text{C}$  y  $5^{\circ}\text{C}$ ) de *carpaccio* previamente congelado Szerman y otros (2011). Además, en este último estudio se observó que la congelación previa de las muestras de *carpaccio* permitió minimizar el efecto negativo de las altas presiones sobre la capacidad de retención de agua y la textura del producto. La aplicación de temperatura de refrigeración durante el tratamiento APH resulta posible en equipos APH de escala industrial, aunque no los tratamientos a temperatura subcero debido a que la mayoría de los sistemas utilizan agua como fluido de presurización.

Gómez-Estaca y otros (2009) evaluaron las propiedades físico-químicas y sensoriales de pescados como salmón, atún y bacalao, finamente rebanados, preparados como *carpaccio*, sometidos durante 15-min a niveles de presión en el rango 200-300 MPa a  $7^{\circ}\text{C}$ . En las muestras de *carpaccio* de salmón y atún, se evidenció un aumento en la resistencia al corte, una reducción de la retención del agua y de las propiedades de unión de lípidos y un aumento en la diferencia de color total. Si bien estos cambios también fueron detectados por el panel sensorial, los productos procesados por APH obtuvieron muy buena aceptación. El *carpaccio* de bacalao resultó más estable a alta presión, lo cual se confirmó mediante el análisis sensorial. La tecnología APH se utiliza en el sector correspondiente a frutos de mar para el tratamiento de moluscos como ostras, almejas, mejillones y crustáceos como langostas, camarones, langostinos. La aplicación de presiones desde 200 hasta 350 MPa sobre este tipo de moluscos provoca la desnaturalización de la proteína del músculo que mantiene cerrado el

caparazón protector, la cual pierde su actividad biológica y el músculo ya no cumple su función. De esta forma, el caparazón se abre facilitando la extracción del molusco, aumentando el rendimiento de recuperación de carne. Además esta tecnología inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos relevantes en esos productos, como *Salmonella*, *Campylobacter*, o *E. coli* y permite extender la vida útil de los productos. Es importante destacar que la aplicación de altas presiones no modifica las propiedades sensoriales y nutricionales de estos alimentos. Respecto al procesamiento de crustáceos, la tecnología con APH, a diferencia de los procedimientos convencionales (tratamiento térmico), permite separar toda la carne del caparazón, alcanzando rendimientos próximos al 100 %. Asimismo se logra optimizar tiempo y costos de mano de obra para llevar a cabo este proceso. A su vez, el producto obtenido mantiene sus características sensoriales y nutricionales, además de lograr una extensión de su vida útil.

En la industria de jugos de frutas o mezclas de frutas y hortalizas, uno de los mayores inconvenientes es la pérdida de la calidad nutricional, debido a la reducción del contenido de vitamina C y al deterioro de la calidad sensorial (fundamentalmente por el desarrollo del gusto a cocido) que se produce cuando estos productos son pasteurizados mediante tratamiento térmico. Una alternativa efectiva a este problema es la tecnología APH, la cual por ser un tratamiento no térmico permite obtener jugos de características similares a los recién exprimidos, pero con una mayor vida útil. Además puede evitarse el uso de aditivos o conservantes en la formulación.

La aplicación de esta tecnología a productos como la leche y derivados, se realiza una vez que se encuentran contenidos en su envase final. Se aplican con el objetivo asegurar inocuidad

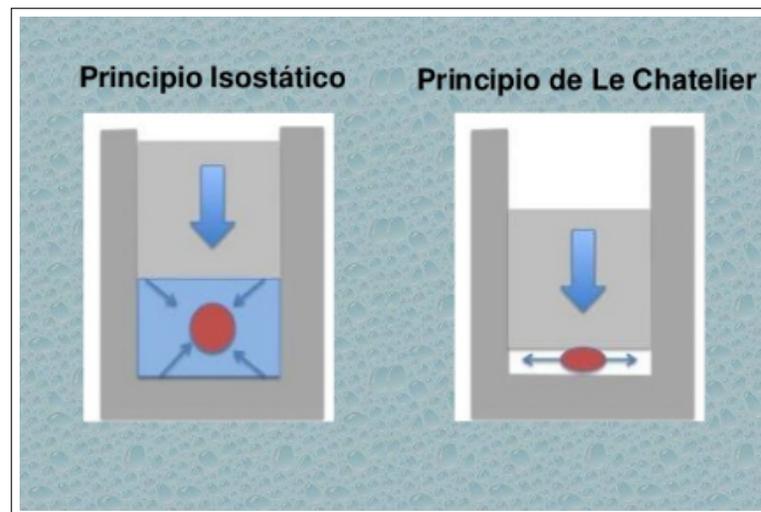
(inactivar microorganismos patógenos relevantes) y disminuir microbiota alteradora contaminante del producto, sin afectar la cepas probióticas que puedan estar presentes en los productos, Pega y otros (2018). Además, la aplicación de APH permite el desarrollo de nuevos productos lácteos que se distinguen por presentar texturas y sabores innovadores, como por ejemplo yogures y quesos. Asimismo este tratamiento logra aumentar de 3 a 10 veces la vida de los productos lácteos. En el caso del queso Cheddar, se observaron mejoras en el aspecto visual y textura al tacto, debido a la desnaturalización parcial de las proteínas lo que conlleva a la formación de una microestructura más continua Velázquez y otros (2005). A su vez, Costabel y otros (2016) informaron el incremento de la proteólisis durante el almacenamiento a 14 °C de queso Reggianito Argentino tratados con APH (100 ó 400 MPa durante 5 ó 10 min).

## **1.1. Aspectos teóricos de las Altas Presiones Hidrostáticas**

A nivel internacional existen dos formas de aplicar los tratamientos con APH: método directo (compresión del alimento líquido a granel) o método indirecto. En las diferentes escalas (laboratorio, piloto e industrial) el método predominante es el indirecto. Este consiste en compresión, mediante un fluido (agua, mezcla de agua y alcoholes, aceite de siliconas, etc.) del alimento (líquido o sólido) contenido en un envase flexible y hermético. El producto debe ocupar todo el envase pues la presencia de bolsas de aire reduce la eficacia del tratamiento y también puede inducir la ruptura del envase. Existen dos principios fundamentales en los

cuales se basa la aplicación de las APH (Cheftel (1995)), ver Figura 1-3. El primero es el *principio isostático*, según el cual una presión externa aplicada a un material confinado se transmite en forma uniforme e instantánea en todas las direcciones. La presión aplicada al sistema permitiría un tratamiento isostático y uniforme, independientemente del tamaño, forma y volumen del material procesado Yordanov y Angelova (2010). El segundo es el *principio de Le Chatelier*, el que establece que cualquier fenómeno (reacciones químicas, cambios moleculares, etc.) que involucre una modificación de volumen será afectado por el tratamiento con APH. Así, si las reacciones determinan una disminución del volumen, entonces serán aceleradas al aumentar la presión y viceversa. Por último, cabe mencionar el *principio de Pascal* que indica que la presión aplicada en un punto de un líquido contenido en un recipiente se transmite con el mismo valor a cada una de las partes del mismo (USDA (2000)). De este modo, es posible describir a la presión hidrostática como la fuerza por unidad de área que ejerce un líquido en reposo sobre las paredes del recipiente que lo contiene y sobre cualquier cuerpo que se encuentre sumergido. En el caso de un alimento con alto porcentaje de humedad y con poco aire en su interior, la presión no dañará el producto a nivel macroscópico, siempre y cuando la presión se aplique de manera uniforme en todas las direcciones. Esto se debe a que el agua como fluido de presurización resulta poco compresible aun a las máximas presiones de trabajo a nivel industrial, disminuyendo su volumen en un 15 % a 600MPa a 25°C Cheftel (1995). A su vez, durante la compresión se produce un aumento de la temperatura debido a la generación del calor de compresión. En el caso del agua, el incremento de temperatura es 3 °C cada 100 MPa para una temperatura inicial de 20 °C, por lo que durante un tratamiento a 600 MPa es esperable que el incremento térmico

sea de al menos 12 °C a 18 °C. Este incremento en el caso de los alimentos dependerá de su composición, de la capacidad calorífica del mismo, del nivel de presión aplicado y de la temperatura inicial del alimento y del fluido de compresión. Cuando se utilizan otro tipo de fluido de compresión, como solventes o aceites orgánicos, el aumento de temperatura será mayor que el correspondiente al agua, debido a su mayor compresibilidad, menor conductividad térmica y menor capacidad calorífica (Makita (1992)). A su vez, en el caso de los alimentos con alto contenido de lípidos, el incremento de temperatura puede llegar a 9 °C por cada 100 MPa.



**Figura 1-3:** Esquema simple representando los principios isostático y de Le Chatelier

## 1.2. Equipos de APH con aplicación en alimentos

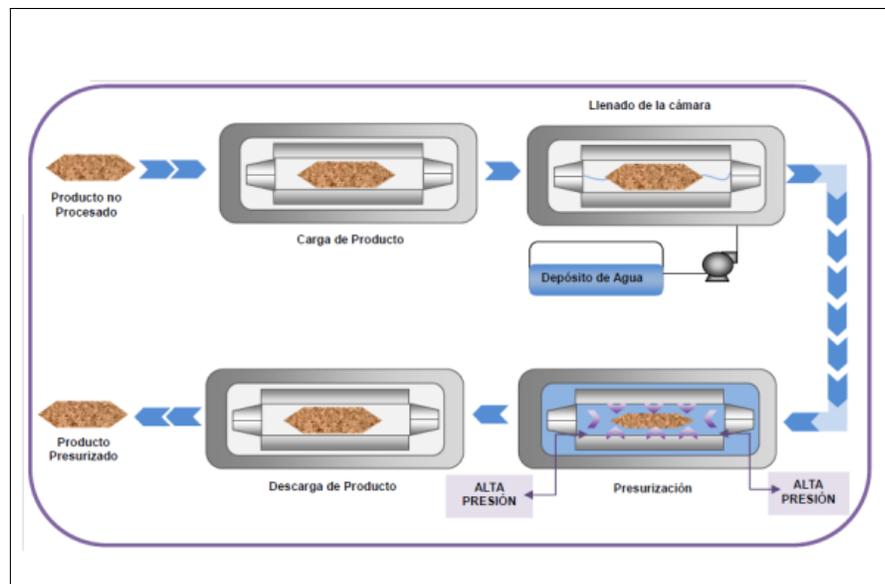
Los equipos de alta presión hidrostática están compuestos principalmente por una cámara de presurización (cilindro de acero de elevada resistencia), un generador de presión (bomba hidráulica y sistema multiplicador de presión –intensificadores de alta presión-) y un sistema

de control de los principales parámetros del proceso (nivel de presión, temperatura y tiempo). El tratamiento con altas presiones se realiza en dos tipos de equipos en función del producto a tratar: normalmente se utiliza de tipo discontinuo para productos sólidos o líquidos ya envasados y de tipo semicontinúo para líquidos no envasados. Ambos tipos de operación se corresponden a los sistemas indicados antes: sistema indirecto (operación discontinua) y sistema directo (operación semicontinua). A su vez, los equipos pueden presentar una configuración del cilindro de tipo horizontal o de tipo vertical. La tendencia actual es a instalar equipos de configuración horizontal porque resultan más adecuados para integrarlos a las líneas de procesamiento existentes.

Los equipos de alta presión discontinuos consisten en un cilindro que contiene en su interior fluido de presurización (agua, agua+alcohol, aceite de siliconas, etc.). La selección de fluidos de compresión se basa en la capacidad de transmisión de presión, el rango de presión y temperatura a aplicar y la viscosidad. El tipo de fluido se selecciona también para evitar la corrosión en la superficie interna del cilindro durante el procesamiento Balasubramanian y Balasubramanian (2003).

El primer paso para el tratamiento consiste en introducir dentro de un canasto el producto ya envasado y posteriormente introducir éste en el cilindro de alta presión (Figura 1-4). La relación de volumen de producto envasado respecto al volumen del cilindro puede ser de hasta 75 %. Luego de cerrar el cilindro de alta presión, se abren las válvulas que la conectan con el depósito del fluido de compresión y comienza a llenarse el cilindro de alta presión impulsado por una bomba de precarga. Una vez que el cilindro está lleno de fluido a presión normal, el sistema de bombas e intensificadores de presión continúan inyectando fluido de

compresión hacia su interior. Cuando el nivel de presión de trabajo fue alcanzado, ésta se mantiene durante el tiempo de manteamiento de la presión (a nivel industrial en general no supera los 10 min), para pasar finalmente a la descompresión cuasi instantánea. El cilindro puede contar con una camisa de intercambio de calor para regular la temperatura durante el tratamiento.



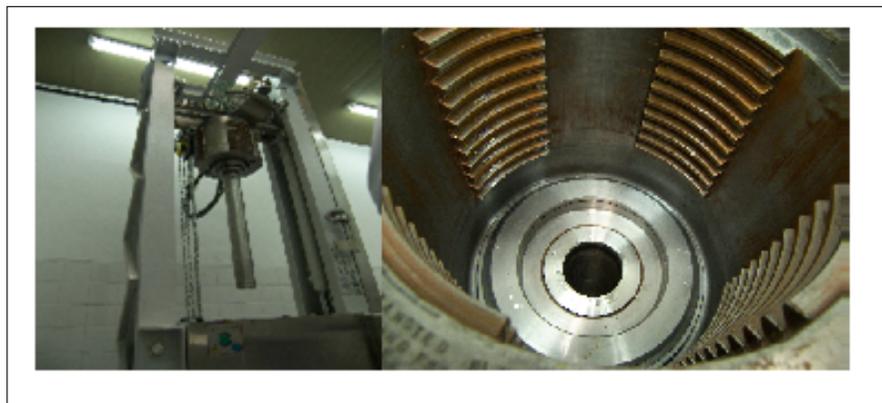
**Figura 1-4:** Esquema simplificado del procesamiento de Alta Presión Hidrostática en alimentos. Fuente: Parzanese (2010)

Los equipos de tipo semicontinuo poseen un mejor rendimiento volumétrico y mejor aprovechamiento de la energía utilizada. Pero estos equipos presentan la desventaja de la posibilidad de contaminación del alimento con aceite y con partículas metálicas y el mayor costo de inversión inicial. Los equipos semicontinuos para la compresión directa del alimento prácticamente no se aplican en la actualidad. En cambio, Hiperbaric ha desarrollado una aplicación para sus equipos discontinuos de configuración horizontal, mediante la cual se pueden tratar alimentos fluidos a granel, ingresándolos en una gran bolsa que es comprimida por el fluido

de compresión. Luego el producto tratado es envasado en envases individuales. El costo por volumen de alimento procesado depende de la productividad, disminuyendo a medida que aumenta el tamaño del cilindro del equipo de alta presión. Otro factor que influye es el tiempo total de procesamiento. En este caso, se busca disminuir el tiempo de mantenimiento, por lo que sí es posible, se prefiere aumentar el nivel de presión para disminuir el tiempo de mantenimiento y en consecuencia disminuir el tiempo total de proceso.

- **Módulo con cilindro de APH (módulo prensa)**

Esta es la unidad principal del equipo, ver Figura 1-5. Se trata de un cilindro metálico y dependiendo de la presión necesaria para el tratamiento puede ser de acero monocapa (para presiones entre 400 MPa y 600 MPa) o de aceros especiales multicapa (para presiones próximas a los 1000 MPa), siendo estos últimos significativamente más costosos. En equipos de operación discontinua, los productos son tratados por lotes y por lo tanto la capacidad de producción del equipo debe evaluarse teniendo en cuenta:



**Figura 1-5:** Equipo de APH marca Standed Fluid Power Ltd (Stansted, UK) e interior de su cilindro, en la planta piloto del Instituto Tecnología de Alimentos (INTA Castelar)

- **Número de ciclos que realiza el cilindro por unidad de tiempo**

El tiempo que requiere un ciclo completo se determina teniendo en cuenta los tiempos de: carga y descarga de los contenedores y del cilindro de alta presión, de cierre y apertura de este y de los tiempos de compresión y descompresión. El tiempo de compresión depende de la potencia del sistema de bombas e intensificadores de presión.

- **Capacidad de carga del cilindro (coeficiente de llenado)**

Depende del volumen interno del cilindro y de las características del producto y de su envase (tamaño, forma, etc.)

- **Número de cámaras del equipamiento**

Es posible aumentar la capacidad de producción del equipamiento si se multiplica el número de cilindros de alta presión. Sin embargo se debe tener en cuenta que esto aumenta significativamente los costos de inversión inicial, por lo tanto se debe hacer un análisis previo sobre la configuración óptima del equipo dependiendo de la capacidad de producción deseada.

- **Contenedor para carga de alimentos envasados**

Este componente es el que contiene en su interior a los productos envasados, ver Figura 1-5, su tamaño lo determina el tamaño del cilindro de alta presión, ya que el contenedor ingresa directamente al cilindro donde se lleva a cabo la presurización del producto, Knoerzer (2016).

- **Módulo de bombas e intensificadores de presión**

La potencia necesaria para operar durante el procesamiento con APH, debe determinarse según la presión que se deba alcanzar para un tratamiento eficaz del producto. Cuanto mayor es el nivel de presión a aplicar mayor deberá ser la potencia entregada por estos equipos.

- **Sistema de cierre electrónico**

Este sistema puede ser de rosca discontinua de apertura y cierre rápido, el cual es recomendable para tiempos de presurización cortos; o puede ser de rosca continua de menor costo y más lento, utilizado en procesos que presentan tiempos de presurización más largos.

- **Sistema de carga y descarga automatizado**

Es necesario que esté diseñado para que las dos operaciones se realicen de forma rápida y efectiva. Este sistema incluye las siguientes etapas de manipulación del producto:

- a)Recepción de los productos envasados sin tratar y disposición de estos en los contenedores.
- b)Transporte e ingreso de los contenedores hacia el cilindro de alta presión.
- c)Retiro de los contenedores del cilindro una vez finalizado el tratamiento APH y transporte de estos hacia el descargador.
- d)Descarga del producto de los contenedores y traslado hacia el área de envasado secundario del producto tratado.

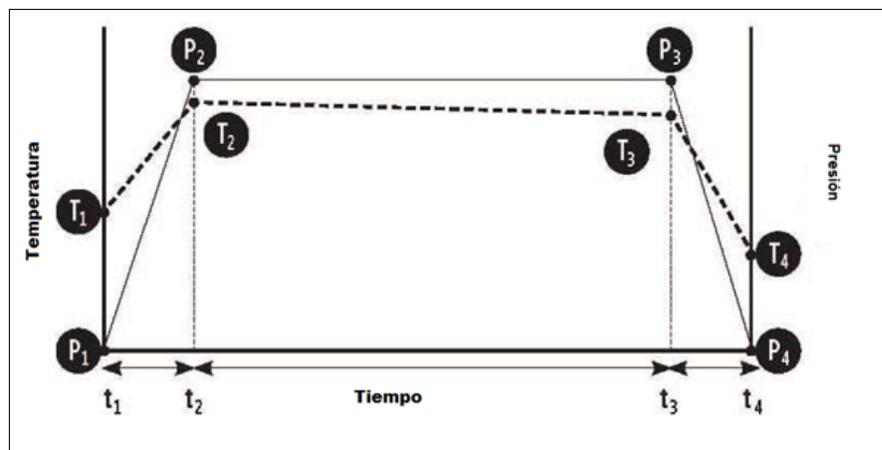
- **Panel de control**

Esta unidad es fundamental para programar los ciclos operativos (seleccionar principales variables del proceso: velocidad de compresión, nivel de presión, temperatura, tiempo de mantenimiento) y también para controlar, monitorear y registrar esas variables, Parzanese (2010), ver Figura 1-4.

### 1.3. Efecto combinado de presión y temperatura en alimentos

En general, las APH a temperaturas de refrigeración, ambiente y moderadas producen la inactivación de microorganismos vegetativos y enzimas, sin modificar en forma importante los atributos sensoriales y las propiedades nutricionales del producto. Sin embargo, para lograr la inactivación de microorganismos esporulados se requiere combinar el tratamiento con APH con altas temperaturas (superiores a 100 °C), debido a que a temperatura ambiente o moderada el tratamiento APH no es efectivo para lograr ese objetivo. Para lograr inactivar esporas bacterianas a temperatura ambiente, sería necesario alcanzar presiones del orden de 1000 MPa. Sin embargo, ese nivel de presión no se puede alcanzar en un equipo APH de escala industrial.

En la Figura 1-6 se presentan los perfiles de presión y temperatura durante el tratamiento con APH.



**Figura 1-6:** Perfiles de presión y temperatura durante un proceso de APH. Fuente: Yordanov y Angelova (2010)

Durante la fase de compresión (tiempos  $t_1-t_2$ ), los alimentos sufren una disminución en el volumen debido a la presión ejercida. Luego el producto se mantiene bajo presión durante un cierto tiempo, denominado tiempo de mantenimiento ( $t_2-t_3$ ) y posteriormente se realiza la descompresión (tiempos  $t_3-t_4$ ) y el producto se expandirá de nuevo a su volumen inicial. Durante la compresión y la descompresión puede ocurrir un cambio transitorio de temperatura en el fluido de compresión y en el producto. Por lo tanto, la temperatura del fluido de compresión y los alimentos ( $T_1-T_2$ ) aumenta como resultado del calor generado por compresión física ( $P_1-P_2$ ). La temperatura del fluido/producto ( $T_2-T_3$ ) a una presión de proceso constante ( $P_2-P_3$ ) se mantendrá constante si el intercambio de calor entre el fluido/producto y el entorno es despreciable. En un sistema perfectamente aislado (adiabático), el fluido/producto volverá a su temperatura inicial durante la descompresión ( $P_3-P_4$ ). En la práctica, sin embargo, el fluido/producto vuelve a una temperatura ( $T_4$ ) inferior a su temperatura inicial ( $T_1$ ) como resultado de la pérdida de calor durante la fase mantenimiento de la presión. La velocidad de calentamiento y enfriamiento resultante del tratamiento con APH ofrecen una forma única para aumentar la temperatura del producto durante el tratamiento y también que el producto se enfríe rápidamente. Se debe tener presente lo indicado en párrafos previos, que en el caso del agua, el incremento de temperatura es  $3\text{ }^\circ\text{C}$  cada 100 MPa para una temperatura inicial de  $20\text{ }^\circ\text{C}$  y en el caso de aceites o de alimentos con alto contenido de lípidos, el incremento de temperatura puede llegar a  $9\text{ }^\circ\text{C}$  por cada 100 MPa.

## 1.4. Efecto de APH sobre la inactivación microbiana

La inactivación de microorganismos es uno de los objetivos principales de la aplicación de la tecnología de alta presión. El grado de inactivación que se desea obtener mediante un tratamiento adecuado de alta presión depende del tipo y de la concentración de microorganismos, velocidad de compresión, nivel de presión, duración del tratamiento (tiempo de mantenimiento), temperatura del fluido, composición, pH y actividad de agua del alimento a procesar. A su vez, resulta importante su efecto sobre las macromoléculas como por ejemplo la desnaturalización de proteínas, la inactivación de enzimas y el cambio de estructura de la fase lipídica. Las APH provocan cambios en la morfología y en la membrana celular, afectan el metabolismo bioquímico y los mecanismos genéticos. Todos estos fenómenos se encuentran vinculados a la inactivación de los microorganismos. La alta presión hidrostática puede alterar las funcionalidades de la membrana, tales como el transporte activo o pasivo y la permeabilidad, pudiendo en consecuencia perturbar el equilibrio físico-químico de la célula, Hoover y otros (1989) y Farkas y Hoover (2000).

La inactivación de enzimas responsables de procesos metabólicos en los microorganismos también es clave, incluyendo aquellas implicadas en la replicación del ADN y la transcripción como un posible mecanismo de inactivación. La sensibilidad a la presión de los microorganismos puede variar entre especies y también entre cepas de una misma especie. Los microorganismos pueden clasificarse como aquellos que son relativamente sensibles a la presión y los que son más resistentes a ella. En general, las células viables bacterianas presentan una mayor sensibilidad en su fase exponencial de crecimiento. Las bacterias Gram positivas

son más resistentes que las de bacterias Gram negativas, hongos y levaduras. A su vez, las esporas Gram positivas son las que presentan la mayor resistencia a las APH. Sin embargo, la germinación de las esporas puede ser inducida a presiones de 100-300 MPa y las células vegetativas resultantes poseen sensibilidad a las condiciones ambientales.

Smelt (1998) informó que la resistencia a la presión puede deberse a la acumulación de componentes de la célula que reducen el efecto de la alta presión. Matrices alimenticias tales como la carne pueden reforzar la resistencia de los microorganismos a las APH. A su vez, los hidratos de carbono, las proteínas y los lípidos también otorgan un efecto protector. Este efecto de protección se potencia si la actividad de agua del alimento se encuentra por debajo de 0.95, en estos casos el tratamiento con APH resultará poco efectivo sobre la inactivación de los microorganismos. El nivel de presión y el tiempo de mantenimiento de la presión también influyen sobre el nivel de inactivación bacteriana. En general, a presiones superiores a 300 MPa, el incremento en el nivel de presión determinará un aumento en las reducciones decimales. En relación al tiempo de mantenimiento, un aumento del mismo también determinará un incremento en las reducciones decimales de los microorganismos. Sin embargo, para cada tiempo existe una presión umbral más allá del cual no se registran efectos al incrementar el tiempo de mantenimiento. Como se mencionó anteriormente, la respuesta a los tratamientos de alta presión depende del tipo de microorganismo de interés. La temperatura utilizada durante el tratamiento también influye sobre inactivación de las células bacterianas. Carlez y otros (1993), Carlez y otros (1994) y Cheftel (1995) informaron que la resistencia a la presión es máxima a temperaturas en el rango 15-30 °C y disminuye significativamente a temperaturas fuera de ese rango. Por lo general, el tratamiento de pas-

teurización corresponde al rango de presiones 300-600 MPa durante tiempos cortos, desde segundos a minutos, posibilitando la inactivación de células vegetativas patógenas y microorganismos alteradores. En el caso del tratamiento de esterilización, en cambio se requiere aplicar niveles de presión mayores a 600 MPa y la combinación con temperaturas superiores a 100 °C, debido a la mayor resistencia de los microorganismos esporulados. Cheftel (1995) informó que se requiere aplicar niveles de presión mayores a 1000 MPa cuando la temperatura no supera 45-75 °C para lograr la inactivación de esporas. La mayoría de las levaduras son inactivadas a 300-400 MPa a 25 °C en algunos minutos, pudiendo las ascosporas requerir un tratamiento a mayor presión. Para la inactivación de mohos, el modelo de inactivación es similar al indicado para las levaduras, Smelt (1998).

## **1.5. Efecto de las Altas Presiones sobre los componentes del alimento**

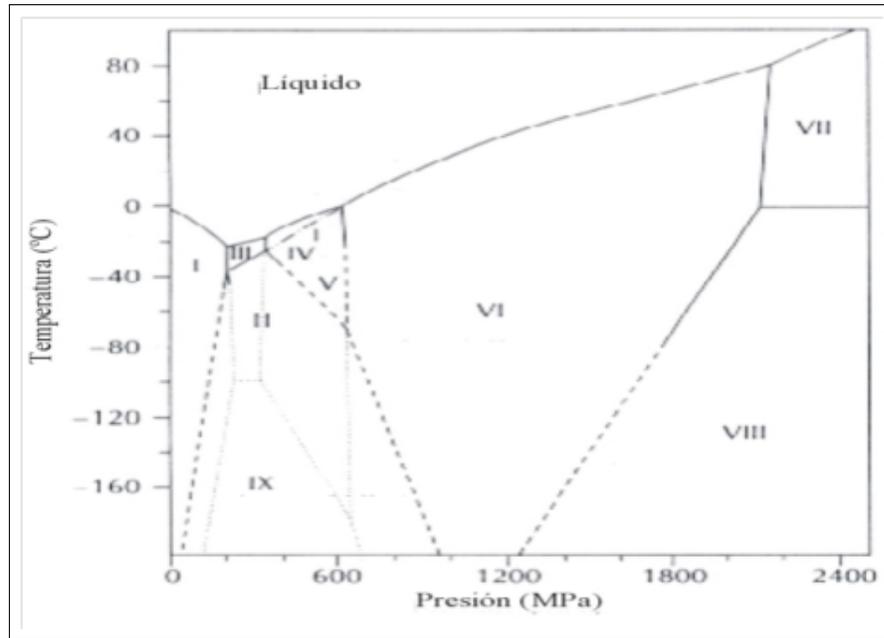
### **1.5.1. Agua**

El aumento de la presión ocasiona cambios en las propiedades fisicoquímicas del agua. Se puede indicar la disminución de un 4% del volumen a 100 MPa y un 15% a 600 MPa a una temperatura de 22°C, Cheftel (1995). Los alimentos con alta humedad y escaso aire ocluido reaccionan a la compresión en forma similar a la del agua. La compresión adiabática del agua causa un aumento de 2 a 3 °C por cada 100 MPa, incremento que depende de la temperatura inicial del agua, de la velocidad de compresión y del nivel de presión alcanzado.

Este cambio es reversible, ya que durante la descompresión se produce una disminución de la temperatura de igual magnitud, Cheftel y Culioli (1997). El pH del agua también es afectado por la presión, disminuyendo su valor de 7 a 6,27 cuando la presión incrementa de 0,1 MPa a 1000 MPa. La temperatura necesaria para pasar de hielo I a líquido disminuye cuando incrementa la presión, al contrario de lo que ocurre en la mayoría de las sustancias. Ello se debe a que el agua disminuye de volumen al pasar de hielo I a líquido. Al aumentar la presión se debilita la estructura cristalina del hielo, requiriendo así temperaturas menores para el cambio de fase, pues parte del trabajo necesario para alcanzar la estructura del agua líquida ya fue ejercido por la presión. La aplicación de presión conduce a una disminución de la temperatura de fusión hasta las coordenadas  $P = 209,9$  MPa y  $T = -21,995$  °C, punto triple donde se encuentran el agua líquida y los hielos I y III. A presiones mayores de 1000 MPa y a temperatura ambiente, se produce la formación de hielo, ver Figura 1-7.

### 1.5.2. Lípidos

La temperatura de fusión de los lípidos, especialmente de los triglicéridos, aumenta de forma reversible a más de 10°C por cada 110 MPa. Es por ello, que en estado líquido a temperatura ambiente pueden cristalizar al incrementar la presión. El tratamiento con APH induce la formación de cristales densos y estables, los que tienen alta temperatura de fusión. Esto explicaría la inactivación de algunos microorganismos por efecto de la presión, debido al cambio de fase (cristalización) los fosfolípidos de la membrana celular, afectando la fluidez y permeabilidad de la misma, Cheftel (1995). El aumento de presión puede ocasionar un incremento en la oxidación de los lípidos insaturados, por ejemplo en alimentos con alto



**Figura 1-7:** Diagrama de fases sólido-líquido del agua en función de la presión y la temperatura. Fuente: Otero y Sanz (2003)

contenido de lípidos como carne y pescado. Esto se debería a la desnaturalización de las proteínas por efecto del tratamiento con APH, lo cual expondría iones metálicos que catalizarían las reacciones de oxidación.

### 1.5.3. Hidratos de Carbono

Los tratamientos con altas presiones no producen cambios sobre los hidratos de carbono de bajo peso molecular. Sin embargo, el almidón sufre modificaciones debido al tratamiento con APH; principalmente se altera la estructura del gránulo y se produce su gelatinización. La magnitud de estos cambios depende directamente de la cantidad de agua presente en la matriz del alimento. Además, las reacciones químicas o enzimáticas que involucran hidratos de carbono también se ven afectadas por el tratamiento con APH, tal es el caso de la

reacción de Maillard. Estas reacciones son inhibidas a presiones en el rango 50-200 MPa y como consecuencia no se originan en el alimento el sabor y olor típico vinculados a los productos de dicha reacción. Esto puede resultar en un efecto benéfico o no, dependiendo del tipo de producto, Cheftel (1995).

#### **1.5.4. Proteínas**

Presiones superiores a 100-200 MPa a temperatura ambiente produce disociación, despliegue y desnaturalización de estructuras monoméricas y de los complejos proteicos, debilitando las interacciones hidrofóbicas, separación de puentes salinos inter o intramolecular. El efecto de la presión sobre la estructura y las propiedades funcionales de las proteínas, pueden generalizarse en que sus cambios se originan debido a interacciones intra e inter moleculares entre los grupos funcionales de los aminoácidos. Se destacan efectos de aumento de interacciones hidrofóbicas a presiones de 300 y 400 MPa, debido a la alta compresibilidad del agua libre comparada con la de los puentes hidrógeno. Por otra parte, los grupos sulfhidrilo pueden oxidarse dando lugar a puentes disulfuro en presencia de oxígeno. En el caso de concentraciones elevadas de proteínas, el incremento de la presión induce que las proteínas adopten una estructura más compacta, aunque la pérdida de su estructura secundaria es un fenómeno que solamente se manifiesta a presiones extremas. En general, los efectos que sufren las estructuras cuaternarias y terciarias pueden ser reversibles, aunque dependen de los factores como la temperatura y el pH, Cheftel (1995). La combinación de APH y baja temperatura inducen la gelificación, obteniéndose geles de características distintas de los obtenidos por calor.

Las enzimas son sustancias que aceleran notablemente la velocidad de reacción, en ellas existe una zona o sitio catalítico que comparte cierta complementariedad tridimensional con el sustrato. Este sitio se encuentra determinado por la cantidad y secuencia de aminoácidos, los cuales responden a una organización en cadenas, con pliegues y giros inducidos por atracciones y repulsiones entre los aminoácidos más cercanos, dando como resultado una estructura con un mínimo de contenido energético, Sanger (1959). La reacción enzimática sucede gracias a la interacción del sitio catalítico de la enzima y el sustrato, formando un complejo enzima-sustrato seguido por la formación del producto. La velocidad máxima de la reacción se produce a pH específico, temperatura y concentración salina referentes a sus condiciones óptimas de reacción.

Bajo ciertas condiciones, la actividad enzimática puede modificarse de modo de ser utilizada en el campo industrial. Sin embargo, el principal inconveniente es que presenta altos costos y baja estabilidad enzimática, limitando el rango de aplicación. Sin embargo, las enzimas y su implementación durante el proceso poseen la ventaja de comportarse en forma similar al los microorganismos. De este modo, es posible evaluar el efecto del proceso mediante la determinación de la actividad enzimática post tratamiento. A presiones comprendidas entre 300 y 400 MPa, se destacan efectos de aumento de interacciones hidrofóbicas debido a la alta compresibilidad del agua libre comparada con la de los puentes hidrógeno. Por otra parte, los grupos sulfhidrilo pueden oxidarse dando lugar a puentes disulfuro en presencia de oxígeno, Funtenberger y otros (1995).

Una de las ventajas que posee la utilización de enzimas (proteínas), es que su actividad biológica es cuantificable mediante ensayos espectrofotométricos luego de la aplicación de

un tratamiento determinado. Sumado a ello, es necesario aclarar también que un cambio observado en el comportamiento de una proteína puede no ser la actividad enzimática pero sí una reacción específica y detectable.

Denys y otros (2000b), fueron pioneros en la utilización de proteínas integradoras de presión, temperatura y tiempo de procesamiento (siglas en inglés pTTI's) para la detección de gradientes de temperatura dentro de la cámara de un equipo de APH. Posteriormente, Grauwet y otros (2009); Grauwet y otros (2010b) y Grauwet (2010c) continuaron trabajando en el desarrollo y la investigación de estos dispositivos utilizando un sistema de enzimas  $\alpha$  amilasa bacterianas de *Bacillus amyloliquefaciens*. Mediante este sistema, los autores lograron evidenciar una alta sensibilidad, detectando heterogeneidades térmicas en equipos de APH a escala industrial bajo condición de pasteurización fría y de esterilización. Estos autores observaron que en el fondo del cilindro de APH el efecto de la inactivación era menor respecto de la parte central o superior del cilindro.

### **Enzima seleccionada para el Trabajo de Tesis Doctoral**

Uno de los interrogantes que se presentó en este Trabajo de Tesis Doctoral y de acuerdo a las evidencias experimentales de los autores antes mencionados, es la utilización de los pTTI's y su propio límite de detección. Es importante destacar, que la reacción de inactivación enzimática es suficiente como para dar un valor significativo de modo de hallar una diferencia térmica o si el método posee una alta sensibilidad térmica o barométrica de acuerdo a la estructura de la enzima y su posible reversibilidad.

La posibilidad de detectar estas diferencias térmicas, es dependiente de las condiciones de

procesamiento (tipo de procesos e intensidad como el caso de la pasteurización fría o esterilización bajo APH). Para el uso de estos indicadores, es necesario contar con el registro de las curvas cinéticas, rangos utilizados de presión y temperatura de los procesos, carga de producto a procesar pero no del tipo de producto, etc. Los autores Infante y otros (2009) destacaron la importancia del tipo de producto vinculado a la inactivación enzimática y la no homogeneidad térmica en tratamientos de APH. Cuando la enzima es incorporada a un alimento de tipo sólido aparece una distribución no homogénea de la actividad final luego de aplicado el tratamiento de APH. Más aún, para las enzimas estudiadas como la  $\alpha$  amilasa de *Bacillus subtilis* (BSAA), Lipoxigenasa (LOX) y Pectin-Metil-Esterasa (PME), en los rangos de presión comprendidos entre 360 a 600 MPa y temperatura moderada. Infante y otros (2009), señalan y destacan que la temperatura media temporal está relacionada con la distribución de la actividad final: cuanto más alta la temperatura de trabajo y más presión (y su temperatura media temporal), menor es la actividad final en ella. No obstante este comportamiento puede no reproducirse en todas las enzimas estudiadas o en otros rangos de presión y temperatura. El comportamiento de la enzima en un alimento sólido no es el mismo que si fuera líquido. Para el alimento líquido se observa una mayor homogeneidad de la actividad enzimática final, debida al fenómeno de transferencia de masa.

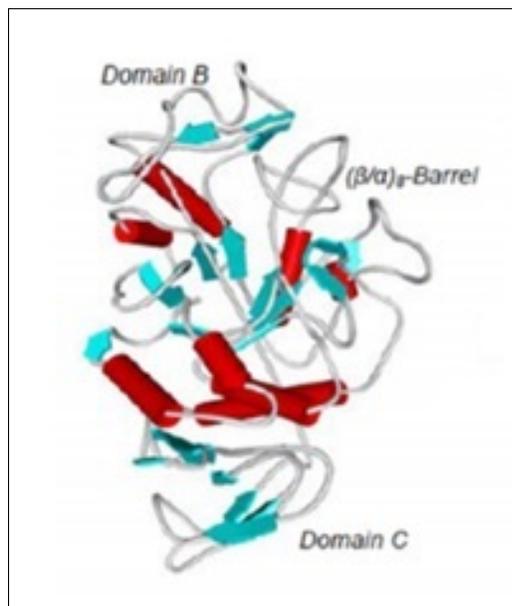
En el presente estudio de Tesis Doctoral, fue seleccionada la enzima  $\alpha$  amilasa de *Aspergillus oryzae*. Esta enzima es una proteína monomérica: endo 1,4  $\alpha$  d glucanglucohidrolasa (EC 3.2.1.1). Consiste de una sola cadena polipeptídica de 478 aminoácidos con cuatro puentes disulfuro intracatenarios (ver Tabla 1-1) y un peso molecular de 51-53 kDa. El contenido de residuos aminoácidos alcalinos es bajo por lo que su naturaleza es ácida. Es una

metaloenzima que mantiene unidos 10 átomos de calcio por molécula; sin embargo, sólo un átomo de calcio se encuentra fuertemente unido y es esencial para la actividad catalítica. La Figura 1-8 muestra la estructura 3D de esta enzima, compuesta por un dominio mayor que contiene el sitio activo y un dominio C-terminal de menor tamaño. Ambos dominios se encuentran unidos por una sola cadena polipeptídica, Fogarty y Kelly (1983), Terebiznik (1998) y Sharifi-Rad y otros (2014).

Aminoácidos	Composición
Alanina	37
Arginina	10
Asparragina	26
ácido Aspártico	44
Cisteína	10
Glutamina	18
ácido glutámico	12
Glicina	41
Histidina	6
Isoleucina	27
Leucina	34
Lisina	20
Metionina	9
Fenilalanina	14
Prolina	21
Serina	37
Treonina	40
Triptófano	9
Tirosina	34
Valina	29
Total	478

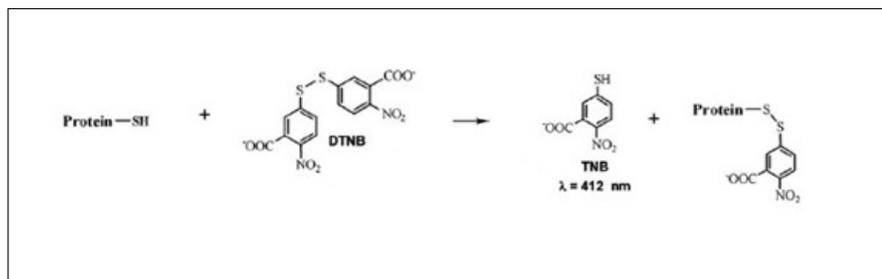
**Tabla 1-1:** Composición de aminoácidos de la enzima  $\alpha$  amilasa. Fuente: Santa Cruz (1997)

La cisteína contiene un grupo tiol (-SH) en su cadena lateral, que hace que este aminoácido sea considerado como polar e hidrofílico. La parte tiol de la cadena suele participar en reacciones enzimáticas, actuando como nucleófilo. El tiol es susceptible a la oxidación para



**Figura 1-8:** Estructura tridimensional de la enzima  $\alpha$  amilasa fúngica. Fuente: Sharifi-Rad y otros (2014)

dar lugar a puentes disulfuros derivados de las cisteína que tienen un importante papel estructural en muchas proteínas. La cistina corresponde a un dímero de dos cisteínas unidas mediante un puente disulfuro. El análisis de grupos tiol y disulfuros proporciona información importante sobre la estructura conformacional de las proteínas, dado el papel relevante que desempeñan estos grupos en su estabilidad. La teoría clásica sugiere que los enlaces disulfuro estabilizan las proteínas al reducir la entropía conformacional, Betz (1993). Generalmente, los grupos SH de las proteínas nativas se encuentran en regiones de la cadena polipeptídica de difícil acceso. Por consiguiente, si un tratamiento es capaz de modificar la estructura conformacional de la proteína, este cambio podría exponer los grupos SH libres y los mismos podrían, en consecuencia, ser detectados químicamente. De este modo, el aumento en la cantidad de grupos SH libres producido por un tratamiento, sería una forma de medir o indicar el desplegamiento o eventual desnaturalización de la proteína. El contenido de cis-



**Figura 1-9:** Reacción del reactivo DNTB con grupos SH, Fuente: Trivedi y otros (2009)

teína (grupos SH) puede ser determinado en la proteína intacta a través de la reacción con reactivos SH, medida espectrofotométricamente, por titulación, o alquilación adecuada en presencia de un agente desnaturizante (sin reducción previa) seguida de hidrólisis ácida. Para determinar grupos SH en proteínas intactas, el método más adecuado es el que utiliza ácido disulfuro 5,5' ditiobis (2-nitrobenzoico; DNTB o reactivo de Ellman) en exceso. La Figura 1-9 presenta la reacción de DNTB con grupos -SH presentan alta especificidad y sensibilidad. A pH levemente alcalino, ocurre una reacción de intercambio de disulfuros entre la proteína y el DTNB, el cual produce un tiofenolato de color intenso en cantidad equimolar a la del tiol presente en la proteína. El producto de la reacción, el 3-carboxi-4-nitro-tiofenolato mesoamérico, es determinado espectrofotométricamente a 412 nm. Debido a que los grupos SH son fácilmente oxidables por oxígeno, se usa EDTA para prevenir la oxidación a través del secuestro de trazas de metales pesados que actúan como catalizadores. Los grupos SH “superficiales” también pueden ser estimados por el DTNB usando la muestra nativa (no desnaturizada).

El contenido de cistina (uniones disulfuro) normalmente se calcula a partir de la diferencia entre media-cistina total, determinada a través de un analizador de aminoácidos y el contenido de cisteína. Alternativamente, puede basarse en la determinación de grupos SH

antes y después de la reducción de S-S a SH. En este caso, también son requeridos agentes desnaturalizantes para garantizar la reducción completa de todos los grupos disulfuros. La determinación de grupos SH después de su reducción completa permite la determinación del contenido total de media-cistina sin necesidad de hidrolizar la proteína.

Robyt y otros (1971), utilizaron el mismo método de reactivo de DNTB y esta misma enzima -de *Aspergillus oryzae*- con un número ya conocido de grupos sulfhidrilos y disulfuro. Ellos observaron que este método resultó rápido y conveniente para determinar la cantidad de sulfhidrilos y grupos disulfuro en proteínas sin necesidad de recurrir a una complicada serie de separaciones o análisis de aminoácidos.

## 1.6. Modelado y Simulación en APH

La presión (P), el tiempo (t) y la temperatura (T) son los parámetros del procesos más importantes, considerando su efecto sobre la inocuidad, los atributos de calidad y la extensión de la vida útil de los alimentos. En particular, el tratamiento de los alimentos e ingredientes alimentarios con altas presiones de hasta 1000 MPa es siempre acompañado por un cambio de la temperatura dentro del volumen tratado debido a una conversión de la energía mecánica en energía interna. El intercambio de calor entre el fluido de presurización ( agua+ alcohol, aceite de siliconas) y de las paredes del cilindro o cámara de alta presión conduce a una distribución de temperatura espacial y temporal. El campo de temperaturas produce un perfil de densidades, el que actúa como fuerza impulsora para el desarrollo de un campo de velocidades en el fluido, originando el fenómeno de convección natural durante la etapa de

mantenimiento. De este modo el transporte difusivo y convectivo del calor pueden generar condiciones no uniformes de proceso.

Una alternativa para realizar el mapeo térmico experimental, es la utilización de simulaciones numéricas. Una simulación es una representación aproximada del problema, resuelta por un software utilizando el poder de cálculo de uno o más procesadores. Para una mejor representación del fenómeno, mayor será el tiempo y capacidad de cálculo requerido para su resolución. El resultado, aunque aproximado, proporciona valiosa información sobre el comportamiento del problema y permite probar diferentes diseños y soluciones a un bajo costo para luego validarlo experimentalmente o adquirir una mayor interpretación de los datos experimentales. En este sentido, las simulaciones en APH permiten evaluar el efecto de parámetros tales como la velocidad de compresión/descompresión, el tamaño del cilindro del equipo APH, la viscosidad del fluido de compresión, las propiedades de los materiales de los envases en alimentos fluidos o la posición relativa dentro del cilindro del equipo APH. Hartmann y otros (2004), Denys y otros (2000a), desarrollaron modelos numéricos de transferencia de calor por conducción, capaz de predecir la evolución de la temperatura en el cilindro del equipo APH durante procesos discontinuos sin el estudio correspondiente de la dinámica de fluidos durante la etapa de compresión. La validación de cada modelo numérico fue llevada a cabo en un primer caso con ágar ágar y luego con alimentos semilíquidos, como salsa de manzana y de tomate. En el caso de los alimentos sólidos tratados con APH, éstos son afectados también por la convección libre inducida en el fluido de compresión luego de la etapa de presurización, si bien existen muy pocos estudios publicados. Otero y Sanz (2003), desarrollaron un modelo matemático teniendo en cuenta la transferencia de calor y de masa.

Tanto la validación como el registro de las temperaturas en la superficie y centro de muestras de geles durante el proceso de APH a 350 MPa a 20 °C durante 90 minutos. A través de este modelo, se evidenció el comportamiento y la influencia de las corrientes de convección en el medio de presurización, durante la evolución térmica de las muestras procesadas especialmente cuando el nivel de llenado en el cilindro de APH es bajo. Para garantizar la inocuidad, es necesario identificar la región más fría, dentro del cuerpo que recibe el tratamiento de alta presión. Es de destacar además, la influencia en la no homogeneidad térmica de otras dos variables, la temperatura de fluido de compresión en la entrada del cilindro y las pérdidas de calor en la pared de la cámara externa al cilindro de APH. Es posible entonces utilizar modelos computacionales a fin de predecir la distribución de temperatura en el interior de la cámara de presurización durante el tratamiento con alta presión hidrostática.

La Dinámica de Fluidos Computacional (en inglés CFD) es una de las ramas de la mecánica de fluidos que usa métodos numéricos y algoritmos para estudiar y analizar problemas que involucran fluidos en movimiento, mediante la solución de las ecuaciones de Navier-Stokes, de transferencia de calor y otras.

Desde la década de los 90, el uso de la CFD se ha expandido de forma importante a distintas aplicaciones y procesos industriales en los que interviene transferencia de calor, reacciones químicas, flujos bifásicos, cambios de fase, transferencia de masa y esfuerzos al interactuar con sólidos, entre otros. Actualmente el uso de esta herramienta ha cambiado radicalmente. Ha pasado de ser una metodología empleada sólo a nivel de investigación a ser utilizada en la solución de problemas de ingeniería a escala industrial. Si se cuenta con un dispositivo o el diseño de un sistema que presenta dificultades de prototipado o en el cual es difícil de

realizar pruebas experimentales para comprobar y verificar su diseño, el uso de la herramienta CFD permite virtualmente estimar el comportamiento del funcionamiento interior. Existen muchos fenómenos que se pueden evidenciar a través de CFD, que son muy difíciles de apreciar mediante otros métodos.

Las principales ventajas que tienen las herramientas de CFD, cuando son bien utilizadas por usuarios expertos, son:

- Predicen el flujo con gran detalle en el dominio estudiado.
- Ayudan al diseño y al prototipado y proveen soluciones relativamente rápidas evitando experimentos costosos.
- Permiten una visualización y animación del proceso en términos de las variables de flujo (presiones, velocidades y temperaturas), lo que ayuda a la interpretación de los resultados.

Las principales desventajas que tiene el uso de la herramienta CFD son:

- Requiere usuarios con amplia experiencia y formación especializada.
- Consume recursos de hardware y software que requieren inversiones iniciales significativas para problemas grandes.
- En algunos casos, el costo computacional es elevado, lo que puede llevar al tiempo de cálculo inaceptablemente largo.

Los códigos CFD están estructurados alrededor de algoritmos numéricos para la resolución de problemas de flujo. A fin de permitir un uso rápido y sencillo, los paquetes CFD suelen incluir

una serie de interfaces que permiten llevar el problema físico a una representación virtual.

Un paquete de códigos y aplicaciones CFD se puede dividir en 3 elementos principales: (I) Pre-procesamiento, (II) Resolvedor, (III) Post-procesamiento.

El Pre-procesamiento consiste en alimentar los datos del problema real a un programa CFD a través de una interfase y la subsiguiente transformación de dichos datos a la forma que utilizaría luego el programa para la resolución de dicho problema. El usuario deberá realizar una serie de actividades para definir el problema a resolver como:

- Definición de la geometría del dominio (fronteras o límites del problema).
- Subdivisión del dominio en pequeños subdominios, llamados celdas, que juntos componen la malla del problema.
- Selección del fenómeno físico/químico que se desea modelar.
- Especificación de condiciones iniciales y/o de borde del problema y
- Elección del modelo, los esquemas de interpolación y los algoritmos de resolución de matrices a utilizar.

La calidad de la solución dependerá de la densidad de la malla, y su costo computacional. Cuanto más densa sea una malla, los sistemas de ecuaciones serán más grandes, lo cual se traducirá en mayores requerimientos de hardware, tiempos de simulación más largos y mayor capacidad de almacenamiento. Por esto, una solución CFD se obtiene de un compromiso entre la capacidad de cálculo (hardware) disponible, el grado de precisión buscado y el tiempo disponible para obtener un resultado.

El resolvidor (solver) es el código que se encarga de resolver el problema indicado en el pre-procesamiento. Para lograrlo deberá resolver las ecuaciones algebraicas que aproximan las ecuaciones de gobierno del problema. Existen tres corrientes principales de métodos de soluciones numéricas: diferencias

finitas, elementos y volúmenes finitos.

El resolvidor deberá efectuar una serie de pasos:

1. Aproximar las variables del flujo mediante funciones simples.
2. Discretizar las ecuaciones de gobierno mediante la incorporación de dichas aproximaciones. y posterior manipulación matemática y
3. Resolver las ecuaciones algebraicas resultantes.

La diferencia entre los distintos métodos reside en cómo realizar la aproximación de variables y la discretización de las ecuaciones de gobierno.

En última instancia, la etapa de post-procesamiento engloba a todas las aplicaciones que se utilizarán para la visualización y el análisis de los resultados. Estas aplicaciones permitirán visualizar el comportamiento de las variables del problema mediante representaciones, por ejemplo:

- Visualización de la grilla o malla con las correspondientes herramientas para manipulación de vistas y modos de renderizado.
- Representación de gráficos vectoriales.
- Representación de variables en 2D y 3D.

- Simulación de trayectorias de partículas.

Es importante resaltar que el modelado de tratamientos con APH es un área de trabajo de reciente aparición, ya que la mayoría de los trabajos relevantes en la materia corresponden a publicaciones publicadas desde el 2000, Hartmann y otros (2004). En general, el enfoque en el modelado de APH se ha orientado hacia la distribución no homogénea de temperaturas en líquidos y en alimentos semisólidos con niveles de presión desde los 100 a 900 MPa. En este sentido, diferentes y conocidos autores como: Denys y otros (2000a); Otero y otros (2000); Denys y otros (2000b); Hartmann y Delgado (2002a); Otero y Sanz (2003); Baars y otros (2007); Juliano y otros (2008); Knoerzer y otros (2010b) y Knoerzer y otros (2010c), han dirigido sus investigaciones hacia el campo de las propiedades termofísicas (conductividad térmica, densidad, calor específico, expansión térmica) y su dependencia de la presión y temperatura, con la finalidad de aportar datos para el diseño de equipos y la optimización de los procesos. Entre las sustancias y alimentos estudiados se encuentran: agua, soluciones acuosas de sacarosa y productos semisólidos como salsas de manzana, jugos de frutas, miel y yema de huevo, puré de tomate, geles de ágar. Es imprescindible entonces, evaluar la homogeneidad del proceso debido a que su efecto puede invalidar ensayos experimentales, así como afectar la calidad del producto y su seguridad alimentaria, Hartmann y Delgado (2002a) y Baars y otros (2007). Existen diferentes métodos numéricos y algoritmos que resuelven de distinta forma las ecuaciones fundamentales. En otras palabras, la CFD es la herramienta que permite reemplazar los sistemas de ecuaciones diferenciales en derivadas parciales que describen el movimiento de un fluido en un cierto dominio por un sistema

algebraico aproximado de ecuaciones que pueden ser resueltas usando computadoras.

Las siguientes ecuaciones representan el comportamiento termodinámico y fluidinámico del agua como fluido a comprimir es descrito por las ecuaciones de conservación de masa, momento y energía.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho U) = 0 \quad (1-1)$$

$$\frac{\partial(\rho U)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho U U) = -\nabla p + \nabla(\mu \nabla U) + S_U \quad (1-2)$$

$$\frac{\partial(\rho C_p T)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho U C_p T) = \nabla \cdot (k \nabla T) + S_T \quad (1-3)$$

siendo  $U$  el campo de velocidad,  $\mu$  la viscosidad dinámica,  $S_U$  el término de fuerza flotante,  $S_T$  la fuente interna de calor,  $\rho$  es un escalar o vector de cantidad como la densidad;  $C_p$  es el calor específico,  $T$  temperatura y  $k$  conductividad térmica. El tiempo se denota por  $t$  y el gradiente operador es denotado por  $\nabla$ .

Entre las herramientas disponibles para resolver problemas de CFD ha cobrado mucha importancia el llamado OpenFOAM<sup>®</sup> (Open Field Operation and Manipulation, 2011-2014), un paquete abierto capaz de simular flujos complejos que involucren reacciones químicas, turbulencia, transferencia de calor, dinámica del sólido y problemas de electromagnetismo, entre otras capacidades. La parte central de OpenFOAM<sup>®</sup> es un conjunto de módulos escritos en C++. El código es libre y bajo licencia GNU (General Public Licence). OpenFOAM<sup>®</sup> usa el método de volúmenes finitos para resolver sistemas de ecuaciones en derivadas parciales

y trabaja con redes 3D no estructuradas, cuyas celdas son poliedros.

El paquete de librerías y aplicaciones OpenFOAM<sup>®</sup> incluye utilitarios simples para el pre-procesamiento (la generación de la malla o red de cálculo), pero su poder reside principalmente en el procesamiento, es decir, en las herramientas para la resolución de las ecuaciones generadas. El post-procesamiento de los resultados, por otro lado, puede realizarse con otras herramientas, como por ejemplo el software ParaView, Henderson (2007), una aplicación open-source multiplataforma, adaptada con el nombre de paraFOAM para trabajar con los resultados de OpenFOAM<sup>®</sup>.

OpenFOAM<sup>®</sup> posee numerosos resolvers pre-configurados, utilidades y librerías que pueden utilizarse como cualquier paquete de simulación. Si bien, existen distintas aplicaciones en OpenFOAM<sup>®</sup>, por ejemplo para utilizar redes no uniformes, zonas con distinto tipo de geometrías, distintos materiales, etc., en la mayoría de los casos el usuario debe realizar modificaciones en estas librerías-utilidades.

Asimismo, el usuario de OpenFOAM<sup>®</sup> puede intervenir operando en:

- Los módulos existentes para construir sus propios resolvers, para simular un problema específico.
- Las utilidades disponibles para realizar pre y post-procesamiento de datos.
- Las librerías para crear herramientas a las que pueda acceder los resolvers.

En particular, OpenFOAM<sup>®</sup> utiliza el método de los volúmenes finitos el cual desarrollaremos a continuación.

### 1.6.1. Método de Volúmenes Finitos

El método de volúmenes finitos esencialmente permite resolver las ecuaciones diferenciales de un problema físico mediante una aproximación algebraica. Para lograr esto, divide el espacio en pequeños volúmenes y el tiempo en intervalos discretos. De esta forma, el método resuelve un problema similar aproximado, a expensas de no poder conocer el valor de las variables en cualquier punto del dominio y en cualquier momento sino tan sólo en algunos puntos y momentos determinados. A esta discretización del espacio se la conoce como malla y está formada por celdas, o pequeños volúmenes disjuntos de dominio. El tiempo se discretizará dividiéndolo en saltos o pasos temporales. Cualquier valor que se desee conocer y que no sea un valor calculado en una celda en un paso temporal determinado, deberá ser interpolado entre valores conocidos.

A modo de ejemplo, desarrollamos una aproximación por volúmenes finitos para estudiar el comportamiento de una variable  $\theta$  en un proceso bidimensional puramente difusivo, sin fuentes, dentro de un dominio  $\Omega$  de frontera  $\Gamma$ . La ecuación que describe dicho fenómeno es:

$$\frac{\partial \theta}{\partial t} - \nabla \cdot \nabla \theta = 0 \tag{1-4}$$

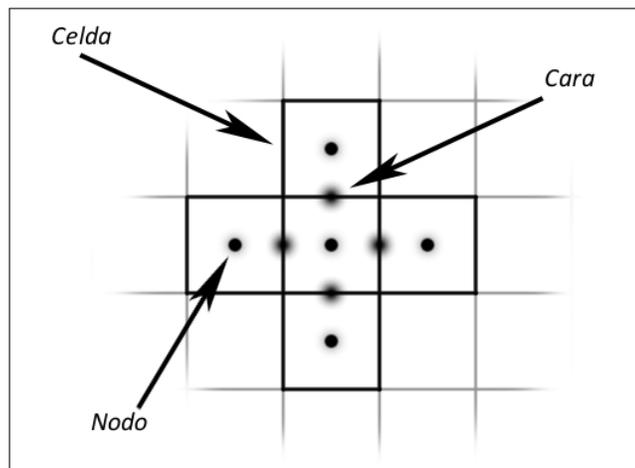
El método de volúmenes finitos trabajará para llevar esta ecuación diferencial a un sistema lineal de ecuaciones algebraicas:

$$[A] \cdot \boldsymbol{\theta} = \mathbf{b} \quad (1-5)$$

donde  $\boldsymbol{\theta}$  es el vector que contiene las incógnitas de las celdas,  $[A]$  es una matriz de coeficientes y  $\mathbf{b}$  el término independiente. Para lograr esto el método requiere una serie de pasos.

Primer Paso: Discretización espacial

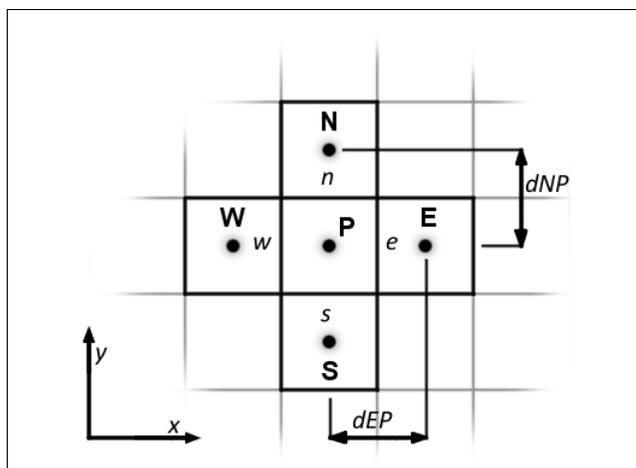
El primer paso en el método de volúmenes finitos es dividir el dominio en volúmenes de control discretos y disjuntos (no se superponen). Cada uno de estos volúmenes encapsula un nodo y se lo conoce como celda. La frontera que delimita una celda se conoce como cara. De esta forma, todo el dominio queda descrito por una malla de celdas, cada una con su respectivo nodo y cada una limitada por las caras de su volumen. Por ejemplo, tomaremos celdas cuadradas.



**Figura 1-10:** Componentes de una malla

Sea  $P$  un nodo cualquiera de la malla, definimos por convención a sus nodos vecinos en función

de su posición relativa a P. Llamamos nodo N (Norte) al nodo ubicado inmediatamente arriba, nodo S (Sur) al nodo inmediatamente abajo, nodo E (Este) al nodo inmediatamente a la derecha y nodo W (Oeste) al nodo inmediatamente a la izquierda de P. También definimos la superficie de celda que separa al nodo P del nodo N como la cara 'n', y de igual manera el resto de las caras 'w', 'e' y 's'. Utilizando un sistema de coordenadas X-Y, donde X representa la dirección horizontal e Y representa la dirección vertical, podemos escribir la distancia entre nodos como la diferencia entre las posiciones X-Y de cada uno:



**Figura 1-11:** Convención de nodos

Segundo Paso: Aplicación de las ecuaciones de gobierno

El segundo paso es discretizar las ecuaciones de gobierno. Debido a que las mismas, en general, no se pueden resolver de forma analítica, no se puede garantizar que las mismas se cumplan en todo punto del dominio. En lugar de eso, se integran las ecuaciones dentro de volúmenes de control, que son las celdas de la malla. De esta forma, el modelo busca garantizar que las ecuaciones se cumplirán en pasos de tiempo determinados, a nivel integral

dentro de cada uno de los volúmenes de control.

$$\int_{v_p} \frac{\partial \theta}{\partial t} dV - \int_{v_p} (\nabla \cdot \nabla \theta) dV = 0 \quad (1-6)$$

Aplicando el Teorema de la Divergencia, se lleva la integral de volumen a una integral de área:

$$\int_{v_p} \frac{\partial \theta}{\partial t} dV - \int_A (\nabla \theta \cdot \mathbf{n}) dA = 0 \quad (1-7)$$

donde  $\mathbf{n}$  es la normal a la superficie.

La integral de área se puede escribir como la sumatoria de flujos que entran o salen por cada cara de la celda, es decir:

$$\int_{v_p} \frac{\partial \theta}{\partial t} dV - \sum_{i=1}^n \left. \frac{d\theta}{dn} \right|_i A_i = 0 \quad (1-8)$$

A modo de aproximar el término temporal, se supone que el valor de la variable  $\theta$ , para un dado paso temporal, es uniforme en todo punto de la celda por lo que se puede sacar de la

integral de volumen,

$$\left. \frac{\partial \theta}{\partial t} \right|_p V_P - \sum_{i=1}^n \left. \frac{d\theta}{dn} \right|_i A_i = 0 \quad (1-9)$$

donde  $V_p = \int_{v_p} dV$ .

Se define el paso temporal  $\Delta t$  como el salto discreto de tiempo entre los cuales se resuelven las ecuaciones. De esta forma discreta, la derivada de la variable en función del tiempo queda como la diferencia entre valores de la variable antes y después de transcurrido el  $\Delta t$ . También se define la forma de calcular el valor de la variable en función del tiempo. Para este ejemplo, se utilizó la forma de Euler Implícito, en el cual el valor de la variable en un paso temporal  $k$  se despeja del valor de la variable y los gradientes en cada cara en el paso temporal  $k + 1$ .

$$\frac{\theta_P^{k+1} - \theta_P^k}{\Delta t} V_P - \sum_{i=1}^n \left. \frac{d\theta}{dn} \right|_i^{k+1} A_i = 0 \quad (1-10)$$

Por último, se definen los gradientes de las caras de la celda como la diferencia entre los valores de la variable en los nodos que comparten dicha cara dividido la distancia entre esos nodos, es decir, utilizando interpolación lineal, quedando:

$$\frac{\theta_P^{k+1} - \theta_P^k}{\Delta t} V_P - \left[ \frac{\theta_P^{k+1} - \theta_N^{k+1}}{y_P - y_N} A_n + \frac{\theta_P^{k+1} - \theta_E^{k+1}}{x_P - x_E} A_e + \frac{\theta_P^{k+1} - \theta_S^{k+1}}{y_P - y_S} A_s + \frac{\theta_P^{k+1} - \theta_W^{k+1}}{x_P - x_W} A_w \right] = 0 \quad (1-11)$$

Para llevar la ecuación a la forma  $[A] \cdot \boldsymbol{\theta} = \mathbf{b}$  se despeja la variable  $\boldsymbol{\theta}$  en el nodo al tiempo  $k + 1$  en función del valor de  $\boldsymbol{\theta}$  en los nodos P, E, N, W y S en el paso de tiempo anterior  $k$  :

$$\begin{aligned} \frac{V_P}{\Delta t} \theta_P^{k+1} + \left( \frac{A_n}{y_P - y_N} \right) \theta_N^{k+1} + \left( \frac{A_e}{x_P - x_E} \right) \theta_E^{k+1} + \left( \frac{A_s}{y_P - y_S} \right) \theta_S^{k+1} + \left( \frac{A_w}{x_P - x_W} \right) \theta_W^{k+1} \\ - \left[ \frac{A_s}{y_P - y_S} + \frac{A_w}{x_P - x_W} + \frac{A_s}{y_P - y_S} + \frac{A_w}{x_P - x_W} \right] \theta_P^{k+1} = \frac{V_P}{\Delta t} \theta_P^k \quad (1-12) \end{aligned}$$

Renombrando los coeficientes para facilitar su representación, la ecuación que describe el valor de la variable  $\theta$  en un nodo P para un paso temporal cualquiera queda expresada como:

$$- [a_N + a_E + a_S + a_W + a_P] \theta_P^{k+1} + a_N \theta_N^{k+1} + a_E \theta_E^{k+1} + a_S \theta_S^{k+1} + a_W \theta_W^{k+1} + a_P \theta_P^k = a_P \theta_P^k \quad (1-13)$$

Tercer paso: Resolver el sistema lineal de ecuaciones algebraicas

El tercer y último paso en el método de volúmenes finitos es resolver las ecuaciones obtenidas.

La ecuación discreta, planteada para un nodo P cualquiera se deberá plantear para cada uno de los nodos de la malla. Esto genera un sistema de ecuaciones que puede acomodarse a modo de operación matricial de la forma:

$$[A] \cdot \boldsymbol{\theta}^{k+1} = \mathbf{b}^k \tag{1-14}$$

Este sistema de ecuaciones se deberá resolver en cada paso temporal.

### **El algoritmo de resolución SIMPLE**

La convección de una variable escalar cualquiera  $\phi$  depende de la magnitud y la dirección local del campo de velocidades. Sin embargo este campo es una de las incógnitas y su valor se obtiene a través del proceso de solución, junto con las demás variables.

Considérese las ecuaciones de Navier-Stokes,

$$\rho \frac{du}{dt} = \rho g_x - \frac{\partial p}{\partial x} + \mu \left( \frac{\partial^2 u}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 u}{\partial z^2} \right)$$

$$\rho \frac{dv}{dt} = \rho g_y - \frac{\partial p}{\partial y} + \mu \left( \frac{\partial^2 v}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 v}{\partial z^2} \right) \quad (1-15)$$

$$\rho \frac{dw}{dt} = \rho g_z - \frac{\partial p}{\partial z} + \mu \left( \frac{\partial^2 w}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 w}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 w}{\partial z^2} \right)$$

que junto con la ecuación de continuidad forman el conjunto de las ecuaciones de gobierno.

La resolución de estas ecuaciones presenta dos problemas:

- El término convectivo en las ecuaciones de Navier-Stokes contiene cantidades no lineales, es decir, flujos que dependan de la propia solución.
- Las cuatro ecuaciones están intrincadamente ligadas entre sí debido a que cada componente de la velocidad aparece en ellas. El problema principal es el papel que juega la presión en estas ecuaciones. Aparece en las ecuaciones de momento pero no existe ninguna otra ecuación para ella. Si el gradiente de presiones es conocido, el proceso de resolución de estas ecuaciones no difiere mucho de aquel para cualquier escalar. Sin embargo, la presión suele ser parte de la solución del flujo y no es conocida de antemano.

Para fluidos compresibles, la ecuación de continuidad se puede utilizar como ecuación de transporte de  $\rho$  y junto con la ecuación de transporte de la energía, que también es ecuación

de transporte para la temperatura  $T$ , se puede obtener la presión a través de una ecuación de estado  $p = p(\rho, T)$ . No obstante, para flujos incompresibles la densidad es constante y por ende no está ligada a la presión. Esto impone una restricción a la solución: si el campo de presiones es correcto, el campo de velocidades resultante debe satisfacer la ecuación de continuidad.

Estos dos problemas, la no linealidad del término convectivo y la correlación entre presión y velocidad, se pueden resolver implementando un algoritmo de solución iterativa, como el SIMPLE (Semi-Implicit Method for Pressure-Linked Equations) creado por Patankar y Spalding (1972).

El algoritmo SIMPLE es un procedimiento iterativo de estimación y corrección.

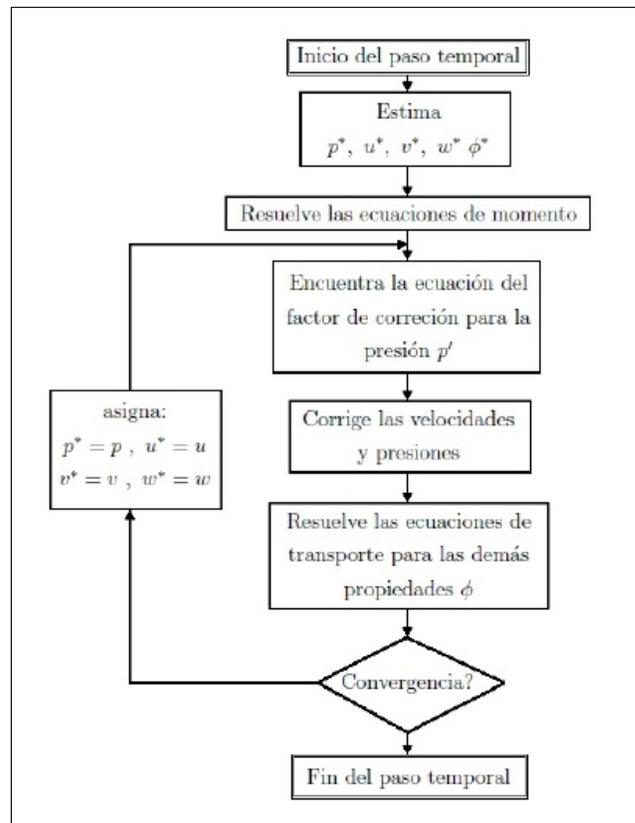


Figura 1-12: El algoritmo SIMPLE

El procedimiento comienza “adivinando” o estimando un campo de presiones  $p^*$  con el que resuelven las ecuaciones mencionadas anteriormente, dando como resultado las velocidades  $u^*$ ,  $v^*$  y  $w^*$ . Luego se define la corrección  $p'$  como la diferencia entre el campo correcto  $p$  y el campo estimado  $p^*$  y de igual manera para las velocidades:

$$p = p^* + p' \quad u = u^* + u' \quad v = v^* + v' \quad w = w^* + w' \quad (1-16)$$

Reemplazando estas definiciones en las ecuaciones de gobierno se obtiene como resultado las ecuaciones de corrección a ser aplicadas a la velocidad, en función de la velocidad estimada y del factor de corrección de la presión:

$$u = f(u^*, p') \quad v = f(v^*, p') \quad w = f(w^*, p') \quad (1-17)$$

La ecuación de continuidad presenta una restricción entre el campo de  $p$  y de  $u, v, w$ . Aplicando el mismo método a esta ecuación da como resultado la ecuación de corrección de  $p$ :

$$p' = f(u^*, v^*, w^*) \quad (1-18)$$

Debido a que esta ecuación es susceptible a diverger a menos que este sub relajada se aplica

un factor de relajación  $\alpha_p$  a la corrección  $p'$  y a las velocidades.

$$p^{nuevo} = p^* + \alpha_p p' \quad 0 < \alpha_p < 1 \tag{1-19}$$

Para un valor de  $\alpha_p = 0$  no se aplican correcciones y el campo de  $p$  utilizado es el estimado.

Un  $\alpha_p = 1$  aplicaría la totalidad de la corrección. Sin embargo, debido a que en general el campo de presiones estimado  $p^*$  está muy lejos de la solución real  $p$ , la corrección  $p'$  a secas sería demasiado grande y daría lugar a inestabilidades en la simulación. El valor de  $\alpha_p$  será entonces lo suficientemente bajo como para mantener las correcciones en un nivel estable pero lo suficientemente alto como para no retrasar demasiado el proceso iterativo.

El proceso iterativo continúa hasta que el campo de presiones  $p$  sea tal que el campo de velocidades  $u, v, w$  satisfaga la ecuación de continuidad dentro de un grado de error aceptado.

## 1.7. Aporte original y desarrollo de trabajo de investigación

El perfil de temperatura que se desarrolla durante el tratamiento con APH en el interior cilindro del equipo puede producir un efecto heterogéneo en la inactivación de microorganismos y de enzimas y, como también puede afectar la calidad nutricional y sensorial del alimento. Esto cobra especial relevancia en el caso de tratamientos en los que se combina presión con temperatura (pasteurización o esterilización asistidas por APH). Por lo tanto, es

primordial evaluar la uniformidad del tratamiento con APH, mediante la determinación de la temperatura en diferentes posiciones del cilindro de compresión del equipo APH, durante el procesamiento de los alimentos.

Para evaluar la distribución de temperatura en el cilindro en esta Tesis Doctoral se utilizaron diferentes estrategias: a) Una manera efectiva fue la utilización de sensores de temperatura como termocuplas (tipo K) ubicadas en diferentes posiciones del cilindro, b) implementación de metodología pTTI's (enzima amilasa fúngica) combinado con la cuantificación de grupos sulfhidrilos libres como medida del efecto indirecto del tratamiento de APH y c) Simulación y modelado mediante CFD del fluido de presurización en el interior del equipo de APH, incorporación de la conducción de calor en la pared metálica y alimento sólido a procesar en el modelo desarrollado.

### **1.7.1. Hipótesis y objetivos del trabajo de investigación planteado**

Los gradientes térmicos que se generan en el interior del cilindro de alta presión podrán ser simulados utilizando la metodología CFD y validados experimentalmente a través de la medición de temperatura y de un indicador presión-temperatura-tiempo.

#### **• Objetivo General**

Predecir la distribución de temperatura en el interior del cilindro de alta presión de un equipo APH de escala laboratorio marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo High Pressure Iso-Lab System FPG9400922 (Stansted, Reino Unido) mediante un estudio experimental y de modelado y simulación computacional.

- **Objetivos Específicos**

- Estudiar a nivel experimental la distribución de temperatura mediante el registro térmico en diferentes posiciones (Superior-Central-Inferior) del cilindro de alta presión del equipo APH disponible en el Instituto Tecnología de Alimentos de INTA Castelar, para tres niveles de presión (200, 400 y 600 MPa) y tres usos consecutivos del equipo. Determinar parámetros que permitan comparar las evoluciones de temperatura durante el tratamiento con APH.
- Evaluar el efecto de llenado (carga completa y vacía) del cilindro de alta presión, utilizando un cilindro de ágar sólido. Determinar parámetros que permitan comparar las evoluciones de temperatura del fluido durante el tratamiento a 200 y 600 MPa.
- Estudiar el efecto de la distribución de temperatura sobre la exposición de los grupos sulfhidrilos y validar la no homogeneidad térmica durante el proceso (sólo a 600 MPa).
- Simular mediante CFD, el flujo del fluido de compresión, la condición de carga de un producto sólido y la conducción de calor en la pared del cilindro de alta presión hidrostática del equipo Stansted Fluid Power Ltd. modelo High Pressure Iso-Lab System FPG9400922 (Stansted, Reino Unido). Aplicar un modelo simple desarrollado mediante el software libre OpenFOAM<sup>®</sup>, adaptando las aplicaciones ya disponibles para su utilización en el problema a estudiar.

# Parte I

## Capítulo 2

### Estudio Experimental

*En este capítulo se hará un especial énfasis en la descripción del equipo Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System, modelo FPG9400:922 (Stansted, Reino Unido) de escala laboratorio y de configuración vertical, el cual se encuentra rodeado por una camisa de intercambio de calor. La organización del capítulo cuenta con cuatro etapas experimentales que involucraron el registro térmico del fluido de compresión compuesto por una mezcla de agua destilada y propilenglicol (70:30 v/v) en diferentes posiciones de la canasta metálica con y sin carga de producto durante el procesamiento a 200, 400 y 600 MPa. Asimismo, se evaluó la performance de la enzima  $\alpha$  amilasa fúngica para validar resultados obtenidos sólo a 600 MPa. Lamentablemente durante el período de Tesis el equipo de APH salió fuera de servicio en forma anticipada por lo cual no fue posible realizar todos los ensayos experimentales.*

## 2.1. Descripción del equipo APH y condiciones operativas

En el presente trabajo de Tesis Doctoral se utilizó un equipo Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System, modelo FPG9400:922 (Stansted, Reino Unido) de escala laboratorio y de configuración vertical que opera en forma discontinua. Este equipo cuenta con un cilindro de 2 l de capacidad, el cual se encuentra rodeado por una camisa de intercambio de calor. La presión máxima de operación del equipo es de 900 MPa. En la Figura 2-1 se representa al equipo integrado por diferentes módulos.

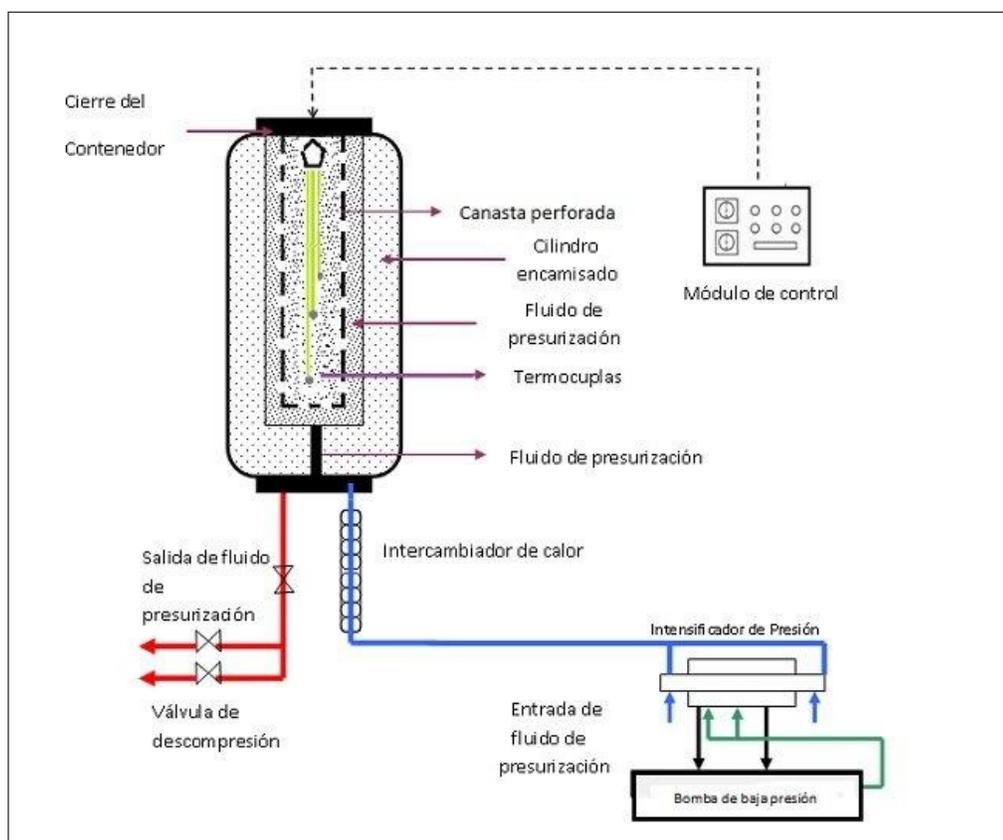


Figura 2-1: Esquema de equipo APH de escala laboratorio

A continuación se describen los módulos del equipo APH:

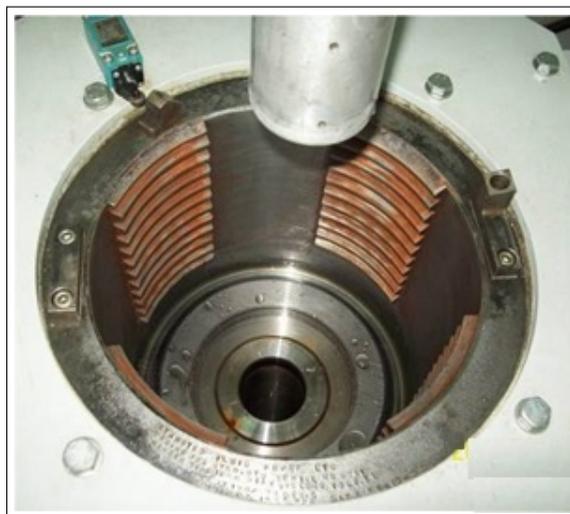
- **Módulo prensa**

El módulo prensa dispone de un cilindro encamisado en el cual ingresa el fluido de presurización (agua, aceite de siliconas, mezclas de agua y alcoholes o agua y aceites). En el caso del equipo APH utilizado en este Trabajo de Tesis, el fluido de presurización aplicado fue una mezcla de agua destilada y propilenglicol (70:30 v/v). En la camisa de intercambio de calor también circula una mezcla de agua y propilenglicol. En el interior del cilindro se coloca la canasta metálica de paredes perforadas de dimensiones: 520 mm de altura x 70 mm diámetro interno. Allí se introduce el alimento tanto sólido o líquido envasado en un envase flexible (ver Figura **2-2** (a)). Para procesar cualquier alimento o muestra dentro del equipo, un cabezal móvil y externo al cilindro es utilizado para insertar esta canasta en el interior del cilindro. A su vez, el cabezal contiene cuatro posiciones para insertar termocuplas Tipo K, las cuales sólo tres se encuentran habilitadas para registrar la temperatura durante el procesamiento por APH. En particular, estas termocuplas permiten registrar la temperatura tanto en las muestras (alimento envasado) como en el fluido de presurización en el interior de la canasta insertada en el cilindro de alta presión. La introducción de la canasta previo a la ejecución del procesamiento con APH, puede observarse en la Figura **2-2** (b), donde se observa el ingreso de la canasta metálica en la parte superior del cilindro. A su vez, en este modelo, una termocupla Tipo K registra la temperatura del fluido de presurización en el ingreso del mismo la parte inferior del equipo APH. Esta termocupla no se encuentra en forma centrada en la base del cilindro de APH sino próxima y externa a la pared del cilindro

de alta presión.



(a)



(b)

**Figura 2-2:** Cabezal móvil e ingreso de la canasta metálica: (a) Cabezal móvil y canasta metálica y (b) Inserción de canasta metálica en el interior del cilindro encamisado

- **Módulo de servicio**

Este módulo contiene las distintas bombas de precarga y elevación de la presión, los intensificadores de presión, las válvulas de descompresión y el tanque de acondicionamiento térmico del cilindro de alta presión (Figura 2-3). Además, en este módulo se encuentran ubicados los tanques de almacenamiento del fluido de compresión y del aceite que se introduce en los intensificadores de alta presión para comprimir el fluido mediante el sistema émbolo-pistón.



**Figura 2-3:** Módulo de servicio del equipo APH Stansted Fluid Power Ltd. modelo FPG9400:922

- **Módulo de refrigeración y sistema de calefacción**

El módulo de refrigeración permite acondicionar la temperatura del cilindro a temperaturas de refrigeración o subcero (hasta - 10 °C). En la Figura 2-4 se presenta el módulo por el

cual recircula una mezcla de agua y etilenglicol, la cual refrigera a través de un serpentín, el fluido de intercambio de calor (mezcla de agua y propilenglicol) almacenado en el tanque de acondicionamiento térmico ubicado en el módulo de servicio del sistema. A su vez, el fluido de intercambio circula dentro de un circuito cerrado entre el tanque de acondicionamiento y la camisa de intercambio del cilindro de alta presión. Para trabajar a temperaturas superiores a la ambiental, el fluido de intercambio es calentado mediante una resistencia ubicada en el tanque de acondicionamiento.



**Figura 2-4:** Módulo de refrigeración marca Euro Chiller acoplado al equipo APH

- **Módulo de control**

El módulo de control consta de una computadora y un Controlador Lógico Programable (PLC) integrado al software SCADA para el control automático del equipo (Figura 2-5). En la interfase del sistema SCADA se ingresan las condiciones de operación (velocidad de compresión, presión de trabajo, tiempo de mantenimiento a la presión de trabajo, temperatura del fluido de compresión) y datos de la muestra a procesar. Mediante este sistema también es

posible controlar la operación de los módulos de refrigeración y de calefacción, permitiendo regular la temperatura del cilindro ya que el equipo dispone de una camisa de intercambio de calor y de un intercambiador de calor de doble tubo que acondiciona la temperatura del fluido de presurización antes de ingresar al cilindro.



**Figura 2-5:** Módulo de control del equipo APH marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo FPG9400:922

## 2.2. Aplicación general del tratamiento de APH ensayado

En el caso del sistema APH utilizado en el presente Trabajo de Tesis, se colocan las termocuplas en las posiciones deseadas dentro de la canasta metálica y también se introduce el alimento o muestra a tratar siempre envasado en un material flexible (Figura 2-2 (a)). Luego, la canasta es insertada en el cabezal móvil y deslizada mediante la intervención del operario con un sistema hidráulico, guiando la canasta en el interior del cilindro encamisado,

según lo indicado en la Figura 2-2 (b)). Posteriormente, se desliza lateralmente el cabezal y de este modo se cierra el contenedor del cilindro, trabando el cabezal con una llave electrónica. El cilindro se llena de fluido y luego comienza a elevarse la presión. Para ello, las bombas de baja presión presurizan el aceite que ingresa a los intensificadores, en los cuales se eleva la presión del fluido que se introduce en el cilindro de alta presión, hasta alcanzar la presión de trabajo.

Esta etapa de elevación de la presión se denomina etapa de presurización o compresión y el tiempo que demanda se lo denomina tiempo de presurización, de compresión o *come up time*. El tiempo de compresión debe ser introducido por el operador en la interfase del software SCADA correspondiente del módulo de control del equipo APH. Una vez que se alcanza la presión de trabajo se mantiene ese valor durante el tiempo establecido (tiempo de mantenimiento o *holding time*). Una vez finalizada esta etapa, el equipo comienza a vaciar el líquido del cilindro descomprimiendo en dos o más etapas, hasta alcanzar la presión atmosférica. Luego, cuando el sistema SCADA habilita la apertura del contenedor del cilindro, se puede retirar la llave electrónica, elevar el cabezal con la canasta metálica y retirar la misma con el alimento envasado ya tratado. El tiempo total del proceso comprende: el tiempo de compresión o presurización, el tiempo de mantenimiento de la presión y el tiempo de descompresión.

La operación discontinua o en batch puede ser resumida en una secuencia de nueve etapas:

- **Carga del alimento envasado en la canasta del sistema APH**
- **Inserción de termocuplas conectadas al cabezal superior**

- **Carga del alimento envasado en la canasta metálica**
- **Desplazamiento del cabezal y cierre**
- **Inicio del procesamiento desde el panel de control**
- **Etapas de compresión o presurización hasta la presión de trabajo**
- **Mantenimiento de la presión de trabajo**
- **Descompresión hasta presión atmosférica**
- **Descarga de canasta y obtención de muestra procesada**

Durante los ensayos experimentales, el fluido de presurización ingresó al cilindro por la parte inferior del equipo a 20 °C y la camisa de intercambio de calor se acondicionó a 18 °C. Se establecieron como condiciones operativas del equipo APH: el uso de la canasta metálica sin carga y con carga, evaluando 3 niveles de presión (200, 400 y 600 MPa  $\pm$  5 MPa), velocidad de compresión de 300 MPa/min y tiempo de mantenimiento de la presión de trabajo de 5 minutos. Se destaca que todos los ensayos fueron realizados a primera hora de cada día (sin corridas previas del equipo APH), con el ambiente de la sala donde se encuentra ubicado el equipo a 20 °C.

En los casos en los que se trabajó en la condición de canasta llena, la carga de la misma se realizó mediante la incorporación de un cilindro sólido (360 mm de altura x 40 mm diámetro interno) de ágar nutritivo marca Britannia (6 % p/v, compuesto por peptona, extracto de carne, cloruro de sodio y ágar como agente solidificante) envasado al vacío en doble bolsa de tipo cook-in (Cryovac CN-640, Sealed Air), a 20 °C.

### 2.2.1. Medición de temperatura del fluido de presurización en diferentes posiciones

En el presente estudio, se utilizaron termocuplas Tipo K calibradas previamente. Esta calibración se realizó en la zona central de un baño de agua a 20 °C (marca Linberg Blue, Modelo RWB3220CY2), utilizando como referencia un termómetro de mercurio en vidrio (marca MIV Serie A No 0682) con una precisión de  $\pm 0,5$  °C y rango de medición desde -10 hasta 150 °C. Para el registro de los curvas de calibración se utilizó un multímetro digital (marca Fluke, Modelo Hydra 2625A), aplicando un intervalo de scan de 10 segundos y una precisión de  $\pm 0,1$  °C. Luego de la calibración, las termocuplas fueron dispuestas en forma longitudinal y conectadas desde el cabezal del equipo APH y posteriormente se introduce la canasta metálica (ver Figuras **2-6** y **2-7**).

Para el registro de las mediciones de temperatura durante el proceso APH, se consideró el radio ( $r$ ) con dos valores,  $r = 0$  mm para las lecturas en el centro de la canasta y  $r = 35$  mm para la lectura lateral, próxima a la pared de la canasta (Figuras **2-8** y **2-9**). Para la variable altura ( $L$ ) se consideraron tres niveles: Superior, Central e Inferior (Figura **2-10**). Estas tres posiciones fueron consideradas a lo largo de las diferentes etapas del estudio experimental como puntos donde las termocuplas registraron la evolución térmica del fluido de presurización dentro de la canasta: 390 mm (Superior), 270 mm (Central), 20 mm (Inferior), respectivamente.



**Figura 2-6:** Vista de las conexiones de termocuplas Tipo K en el cabezal superior



**Figura 2-7:** Conexión e ingreso de canasta metálica en el interior del equipo APH



**Figura 2-8:** Posiciones radiales evaluadas



**Figura 2-9:** Vista posterior de la canasta metálica perforada



Figura 2-10: Posiciones axiales evaluadas en la canasta metálica

## 2.3. Diseño y evaluación de ensayos experimentales

La realización de los ensayos experimentales y su análisis estadístico, demandó cuatro instancias las cuales se mencionan en forma de Etapas: **1)** *Evaluación de la puesta en régimen térmico de un equipo APH de escala laboratorio sin carga de producto en la canasta metálica,* **2)** *Evaluación de la distribución de temperatura del fluido de presurización luego de la puesta en régimen térmico de un equipo de APH de escala laboratorio, sin carga de producto en la canasta metálica,* **3)** *Comparación de la distribución de temperatura en el interior del fluido de presurización del equipo de APH con carga y sin carga y finalmente* **4)** *Validación de la distribución de temperatura en el interior del cilindro del equipo APH mediante la utilización de un integrador de presión-temperatura-tiempo (enzima  $\alpha$  amilasa fúngica).*

### **2.3.1. Etapa 1: Evaluación de la puesta en régimen térmico de un equipo APH de escala laboratorio sin carga de producto en la canasta metálica**

El objetivo de esta etapa fue evaluar el incremento de temperatura del fluido de presurización en el cilindro de alta presión, en función de la posición espacial dentro de la canasta metálica ubicada en el interior del mismo, del uso consecutivo del equipo y del nivel de presión (200 MPa y 600 MPa  $\pm$  5 MPa), en una condición de trabajo sin carga de alimento en la canasta metálica. Independientemente de la presión elegida (200 ó 600 MPa), para cada uso se realizó la compresión del fluido hasta alcanzar la presión de trabajo y luego se mantuvo durante 5 minutos y posteriormente se realizó la descompresión hasta presión atmosférica (0,1 MPa). Luego, se procedió a la apertura del equipo, se retiró la canasta y se colocaron nuevamente las termocuplas. Una vez finalizado el primer uso (Uso I), se contempló el mismo tiempo y las mismas maniobras de carga, es decir de carga de productos o muestras y se volvió a repetir para los siguientes usos (Usos II y III).

Se detallan a continuación las ubicaciones de cada una de las termocuplas Tipo K dentro de la canasta metálica del equipo APH (sin carga de alimento) y de la ubicación de la termocupla de proceso, estableciéndose la codificación para cada ubicación:

**T-Superior r= 0 mm**

**T-Inferior r= 0 mm**

**T-Inferior r= 35 mm**

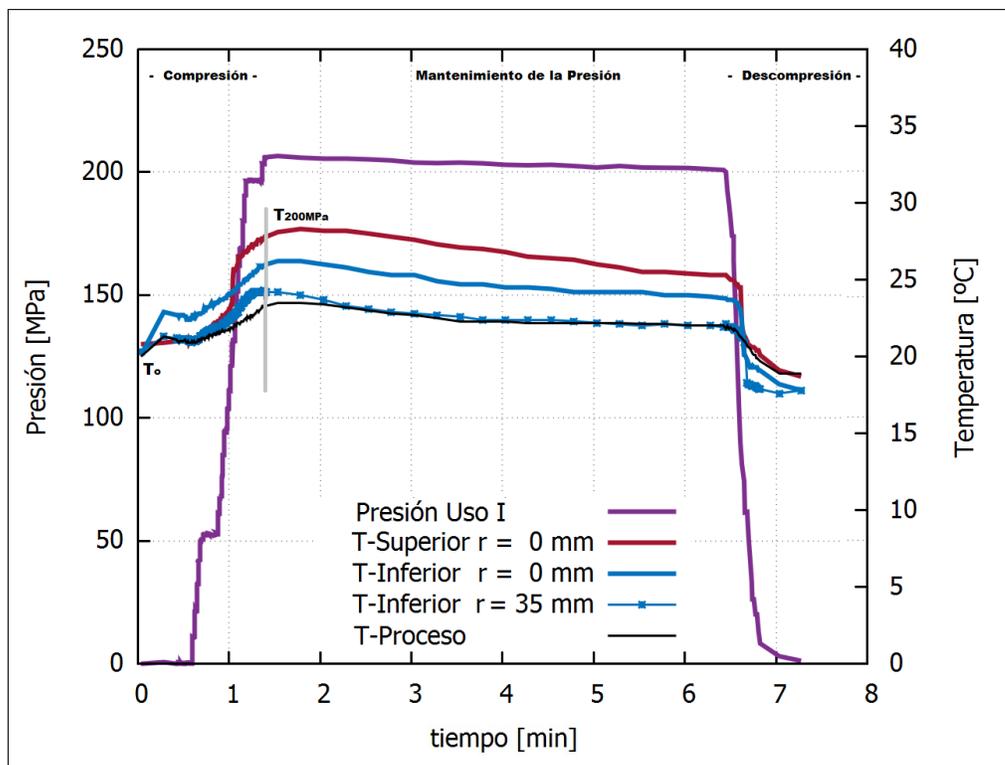
**T-Proceso = externa y próxima a la pared de la base del cilindro de APH**

**Cálculo del parámetro  $\Delta T_1$  [°C]**

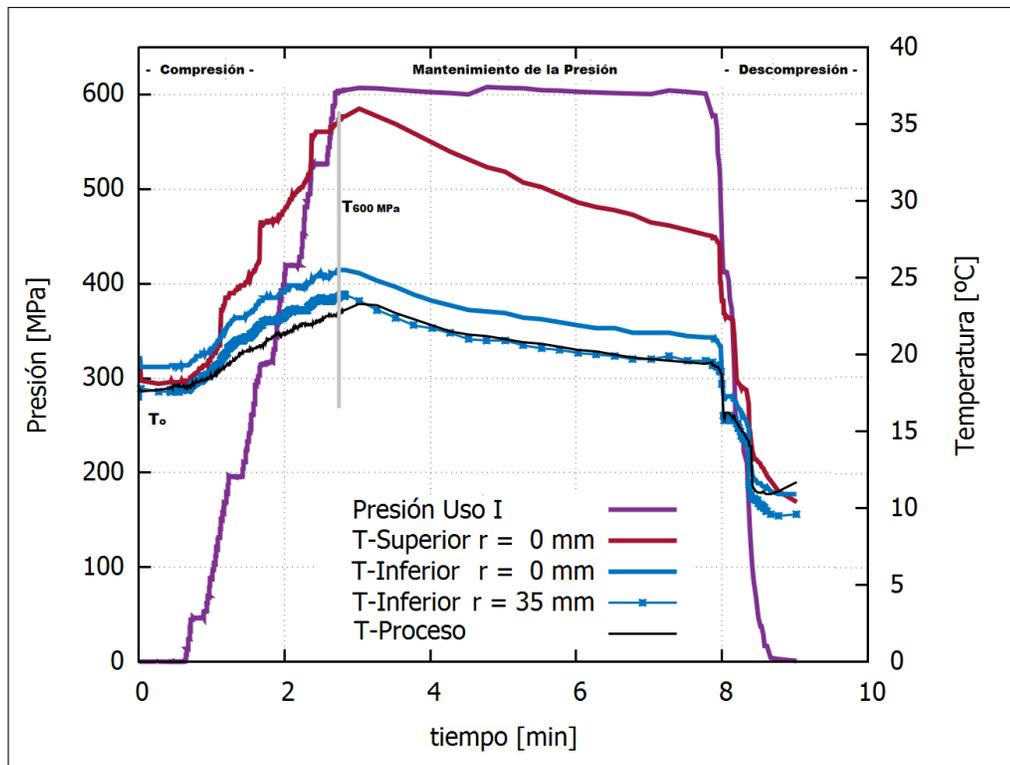
A partir de las curvas de evolución térmica del fluido de presurización para las diferentes posiciones evaluadas se calculó el siguiente parámetro para las dos presiones estudiadas (200 y 600 MPa):

$$\Delta T_1 \text{ [°C]} = T_{200/600MPa} - T_o \quad (2-1)$$

donde:  $T_{200/600MPa}$  es la temperatura del fluido de presurización al alcanzar el nivel de presión de 200 ó 600 MPa y  $T_o$  es la temperatura inicial del mismo, (Figuras **2-11** y **2-12**).



**Figura 2-11:** Curvas experimentales a 200 MPa  $\pm$  5 MPa durante 5 minutos y primer uso (Uso I) del equipo de APH



**Figura 2-12:** Curvas experimentales a 600 MPa  $\pm$  5 MPa durante 5 minutos y primer uso (Uso I) del equipo de APH

### Descripción del diseño experimental y análisis estadístico de la Etapa 1

Se utilizó un diseño factorial 2x3x3 Montgomery (2003), con los siguientes factores y niveles: presión (dos niveles: 200 y 600 MPa), posición de la canasta del equipo APH (tres niveles: T-Superior r= 0 mm, T-Inferior r= 0 mm y T-Inferior r= 35 mm) y el uso consecutivo del equipo APH (tres niveles: I,II y III). Se realizaron dos repeticiones del diseño factorial completo. Se implementó el programa R, CRAN- PROYECT Team (2013), para realizar un ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) sobre  $\Delta T_1$ , considerándose los efectos principales, las interacciones dobles y triples. En el modelo estadístico asociado a un diseño factorial 2x3x3, el incremento de la temperatura, respuesta Y, puede describirse mediante el modelo de efectos dados por:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \epsilon_{ijkl} \quad (2-2)$$

$\mu$ , es la media general

$\alpha_i$ , es el efecto del nivel i-ésimo del factor Presión

$\beta_j$ , es el efecto del nivel j-ésimo del factor Posición en la canasta del equipo APH

$\gamma_k$ , es el efecto del nivel k-ésimo del factor Uso consecutivo del equipo APH

$(\alpha\beta)_{ij}$ ,  $(\alpha\gamma)_{ik}$ ,  $(\beta\gamma)_{jk}$ , representan las interacciones dobles (de dos factores) entre los niveles  $ij$ ,  $ik$ ,  $jk$  respectivamente

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$  es el efecto de la interacción de la combinación de  $ijk$

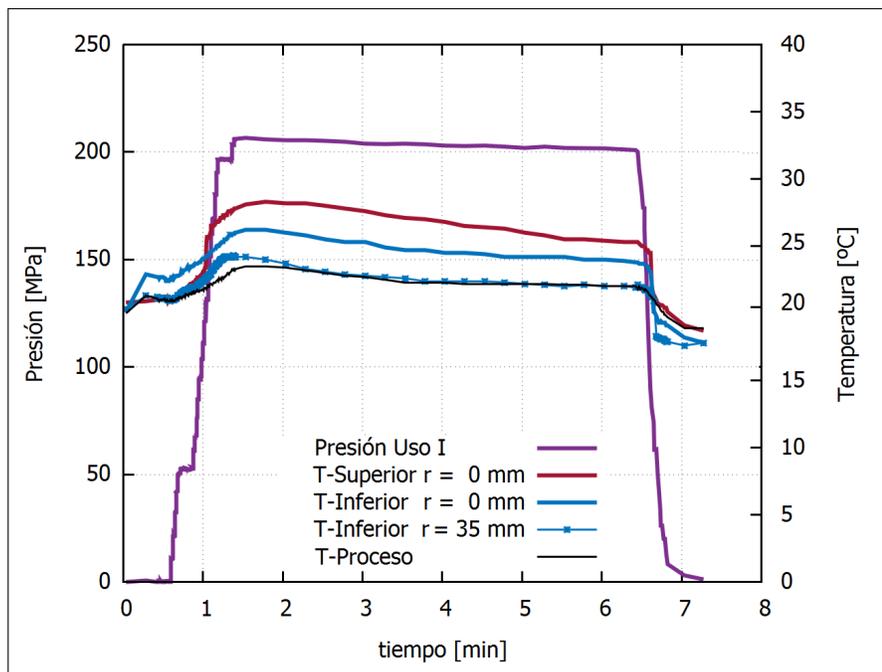
$\epsilon_{ijkl}$ , es el error aleatorio en la combinación  $ijkl$ , con  $i = 1,2$ ;  $j=1,2,3$ ;  $k=1,2,3$

siendo  $l= 1,..,n$ , y  $n=$  número de observaciones (36)

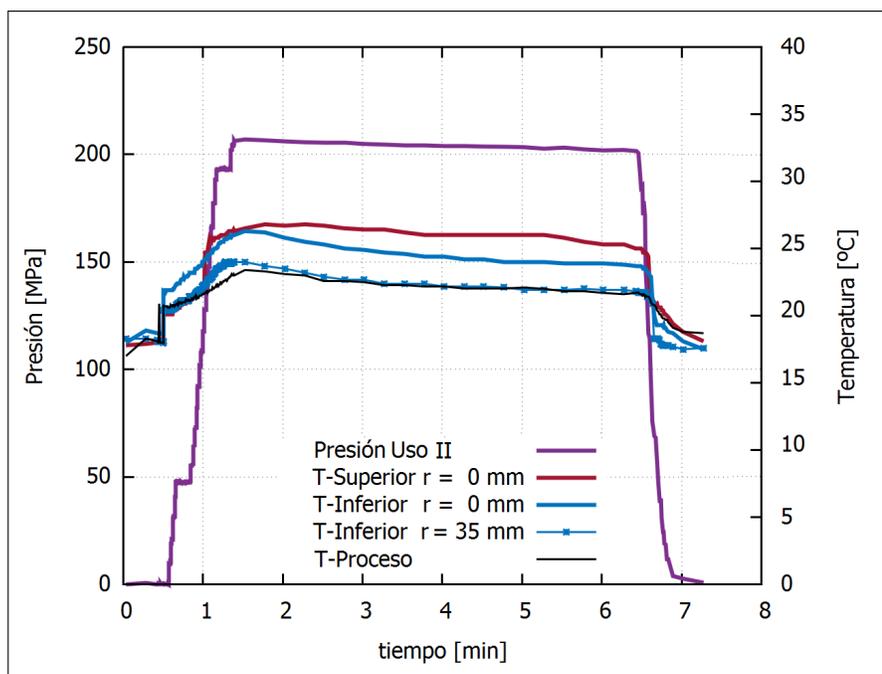
**Resultados correspondientes a la evaluación de la puesta en régimen térmico de un equipo APH de escala laboratorio sin carga de producto en la canasta metálica**

El objetivo de esta etapa fue determinar a partir de qué uso consecutivo el equipo APH ingresa en régimen térmico. Considerando las siguientes condiciones de proceso a) sin carga de producto en la canasta metálica, b) a una mayor y menor presiones de trabajo evaluadas con un span de  $\pm 5$  MPa: 600 MPa y 200 MPa. Para ello, se evaluó el incremento de temperatura del fluido de presurización,  $\Delta T_1$ , [°C], en función del nivel de presión, de la posición espacial dentro de la canasta ubicada en el cilindro del equipo APH y del uso consecutivo del mismo para una condición de trabajo sin carga de producto a procesar por APH.

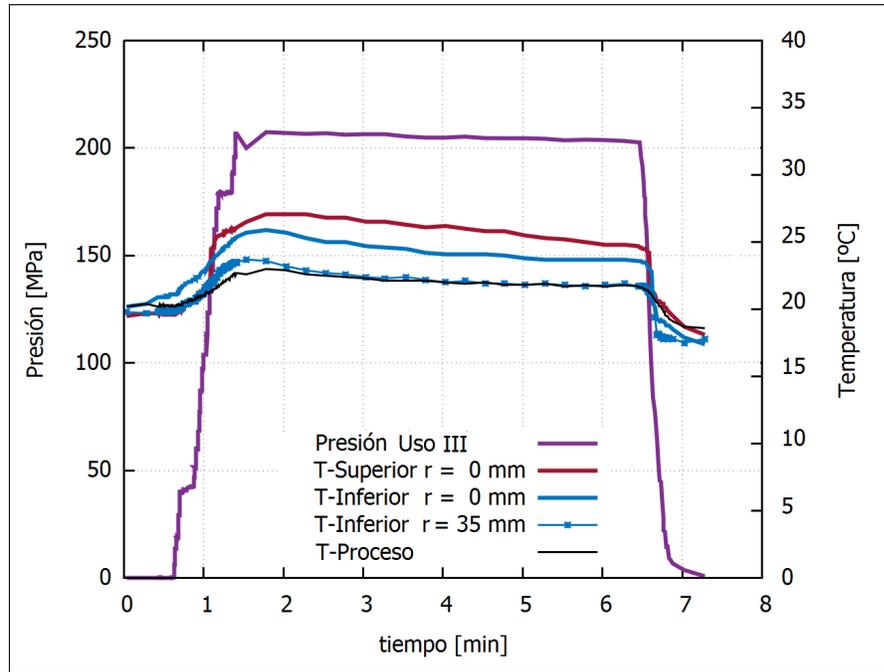
Para los tres usos consecutivos del equipo y sin carga de producto dentro de la canasta metálica, las Figuras **2-13**, **2-14**, **2-15**, **2-16**, **2-17** y **2-18** representan las curvas experimentales correspondientes a los tratamientos cuyas presiones de trabajo fueron 200 y 600 MPa. Los perfiles térmicos de las tres posiciones evaluadas: T-Superior  $r = 0$  mm, T-Inferior  $r = 0$  mm y T-Inferior  $r = 35$  mm presentaron el mismo comportamiento (individual) en todos los usos y repeticiones del ensayo.



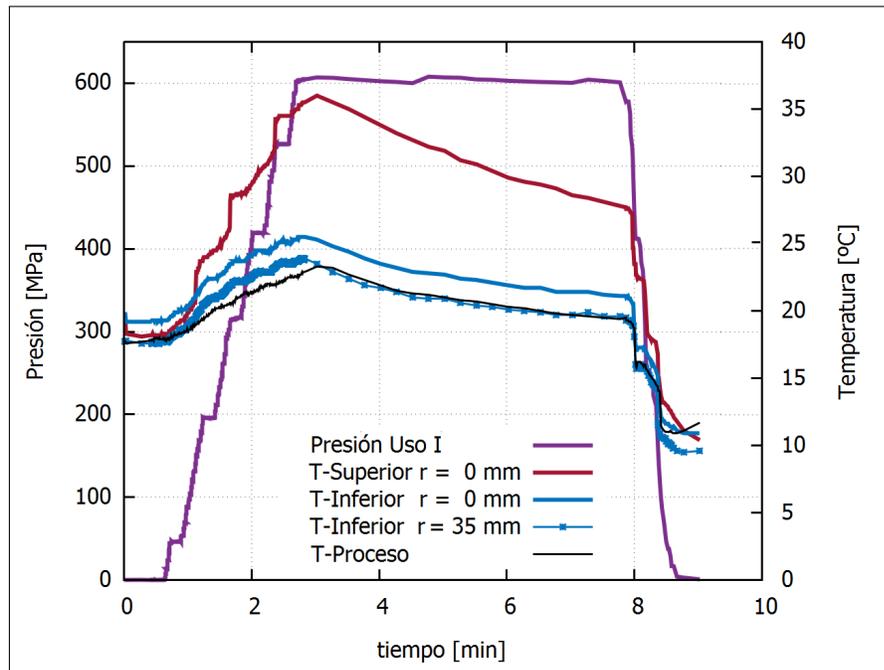
**Figura 2-13:** Curvas experimentales correspondientes al primer uso (Uso I) y al tratamiento de 200 MPa  $\pm$  5 MPa durante 5 minutos



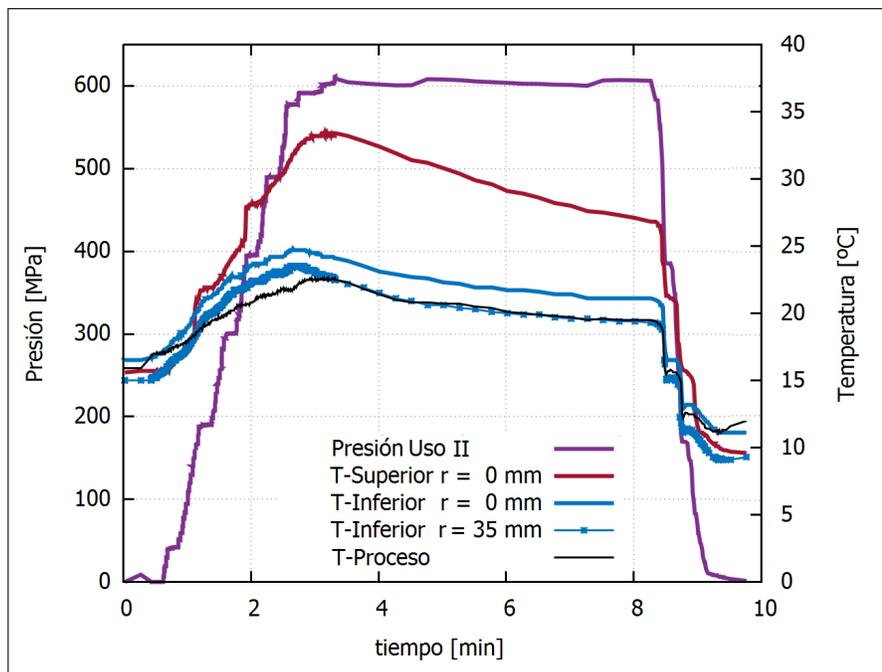
**Figura 2-14:** Curvas experimentales correspondientes al segundo uso (Uso II) y al tratamiento 200 MPa  $\pm$  5 MPa durante 5 minutos



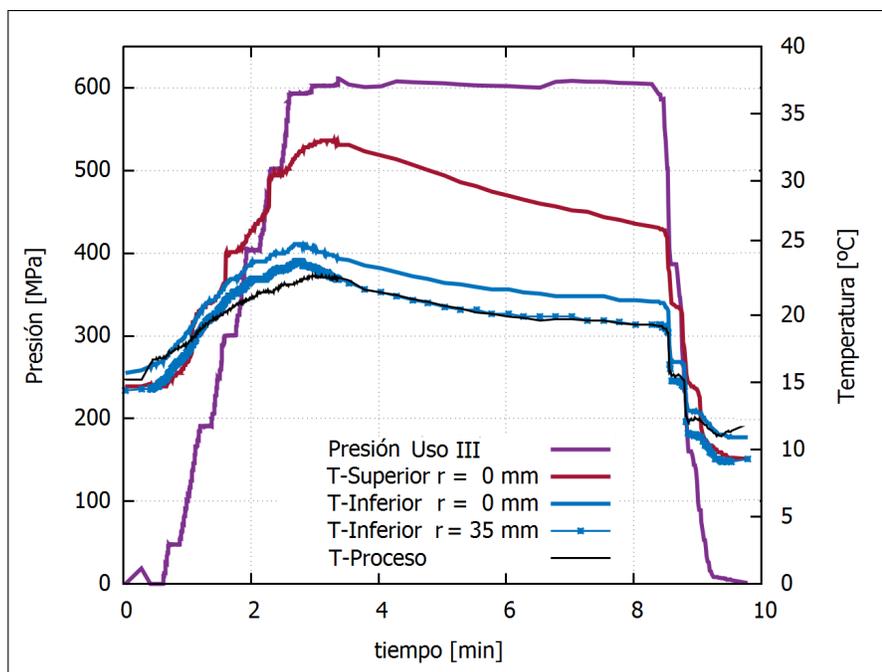
**Figura 2-15:** Curvas experimentales correspondientes al tercer uso (Uso III) y al tratamiento  $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



**Figura 2-16:** Curvas experimentales correspondientes al primer uso (Uso I) y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



**Figura 2-17:** Curvas experimentales correspondiente al segundo uso (Uso II) y al tratamiento 600 MPa  $\pm$  5 MPa durante 5 minutos



**Figura 2-18:** Curvas experimentales correspondientes al tercer uso (Uso III) y al tratamiento 600 MPa  $\pm$  5 MPa durante 5 minutos

La temperatura del fluido inicialmente ingresó al cilindro del equipo a 20 °C, incrementando su temperatura hasta alcanzar la temperatura máxima al finalizar la etapa de compresión. Para los tres usos ensayados y las dos presiones de trabajo evaluadas, la temperatura más alta se observó en la zona superior del cilindro. Por otro lado, la evolución térmica en la posición T-Inferior para  $r= 35$  mm fue similar a la evolución térmica correspondiente al fluido de compresión medida por la termocupla Tipo K ubicada en la base del cilindro (T-Proceso). Es importante destacar que el ingreso del fluido al cilindro de alta presión y la termocupla que mide su temperatura se ubican en posición lateral del cilindro, es por ello la similitud en su evaluación térmica.

Estas diferencias de temperatura se deben al intercambio de calor entre el fluido de presurización, entre la pared de la canasta metálica y la pared del cilindro del equipo APH, existiendo entre las dos paredes un pequeño haz de luz ocupado por fluido de compresión. Esto, conduce a la aparición de un campo de temperaturas heterogéneo y consecuentemente a un campo de densidad heterogénea. Debido a ello, las corrientes convectivas forzadas que ocurren durante las etapas de compresión y descompresión, se suman a las corrientes de convección natural, de carácter dominante durante la etapa de mantenimiento con mayor duración. De este modo, se generan condiciones térmicas no uniformes que pueden el procesamiento del alimento, particularmente en el caso de tratamientos.

Al finalizar la fase de compresión, se observó una marcada diferencia entre las temperaturas de la parte superior e inferior del cilindro para un misma posición ( $r= 0$  mm) como consecuencia de la convección natural antes mencionada, evidenciando de este modo, la estratificación térmica del fluido. Luego, en la etapa de mantenimiento de la presión, se observó un des-

censo de temperatura para las tres posiciones registradas dentro de la canasta sin carga de producto como así también el fluido de proceso, debido a corrientes de convección natural y la pérdida de calor con las paredes metálicas mencionadas.

Tal como se mencionó en la sección referente a la aplicación general del tratamiento de APH ensayado, el fluido en la camisa de intercambio se acondicionó a 18 °C. Esta pérdida de calor, hubiese sido menos pronunciada si se hubiese acondicionado a una temperatura mayor a la propuesta, ejemplo una temperatura máxima alcanzada por el fluido al finalizar la etapa de compresión. Otra opción, a evaluar es adicionar un material aislante térmico como el teflón a la pared de la canasta metálica para disminuir este efecto.

En la última etapa del proceso APH (despresurización hasta presión atmosférica) y dada la velocidad de descompresión sugerida por el fabricante del equipo, el fluido de presurización presentó una temperatura inferior a la temperatura inicial (20 °C), partiendo desde el Uso I y así sucesivamente para los dos usos posteriores (II y III). Esto motivó a realizar el análisis de los usos consecutivos durante los ensayos llevados a cabo realizados de este equipo a escala laboratorio iniciando el primer uso (Uso I) a una temperatura ambiente de 20 °C. El segundo uso (Uso II), la temperatura inicial del fluido de presurización correspondió a la temperatura final del primer ciclo de trabajo (Uso I). Es importante indicar que el inicio del Uso II fue operando de igual manera que el ciclo anterior: con la apertura, descarga de la canasta como si contuviese muestras y cierre del equipo.

A su vez, la temperatura final del fluido de presurización monitoreada por la termocupla externa y en la base del cilindro (T-Proceso) también resultó inferior a la temperatura inicial para todos los usos consecutivos evaluados, dependiendo del ensayo de presión evaluada. En

particular, para los tratamientos a 600 MPa, la diferencia fue más pronunciada para las temperaturas de partida en los usos II y III. De este modo, se observó que el fluido utilizado luego del primer uso reingresaba a menor temperatura, encontrándose por debajo de los 18 °C, indicando que es necesario una estabilización térmica previa del equipo APH y del fluido de presurización para realizar los ensayos en iguales condiciones. Entonces se puede afirmar que las temperaturas luego de cada uso posterior al Uso I dependen fuertemente de la temperatura inicial del fluido ( $T_o$ ).

Por otra parte, la naturaleza de la mezcla de fluido de presurización (mezcla de agua destilada y propilenglicol (70:30 v/v)) puede afectar el comportamiento térmico. Esto mismo fue informado también por los autores Balasubramanian y Balasubramaniam (2003), quienes destacaron la importancia de conocer las propiedades termofísicas de las mezclas utilizadas para cada equipo APH. Ellos observaron experimentalmente que una mezcla del fluido de presurización compuesta por un 75 % de agua y un 25 % de propilenglicol produjo un efecto de mayor enfriamiento. Esto también fue observado en este trabajo debido a la composición similar del fluido de presurización utilizado. La incorporación de propilenglicol contribuye a un descenso mucho más rápido de la temperatura en la fase de descompresión, esto se debe al efecto de la composición de alcohol sobre el calor específico de la mezcla. En las figuras antes presentadas, evidencian este comportamiento para el caso de 600 MPa y entre el Uso I y los otros dos usos consecutivos (Usos II y III); sin embargo a 200 MPa este efecto fue menor.

Como se indicó previamente, se utilizó el programa R, CRAN- PROYECT Team (2013), para realizar un ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) sobre  $\Delta T_1$ , [°C], considerándose los efectos principales,

las interacciones dobles y la interacción triple, ver Tabla **2-1**.

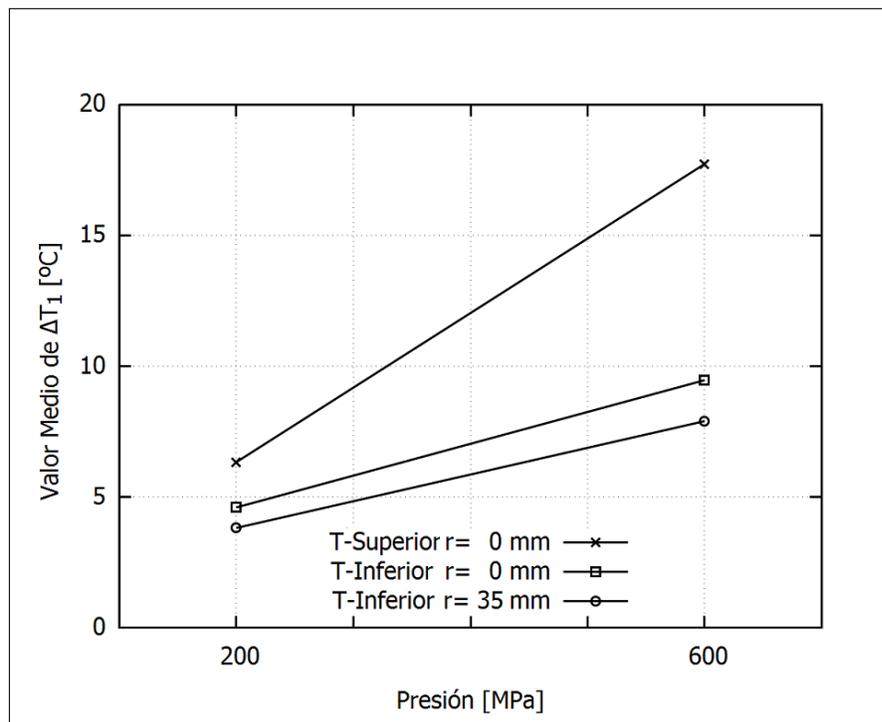
**Tabla 2-1:** ANOVA del parámetro  $\Delta T_1$ , [°C] de la Etapa 1

Factores	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrática	Valor F	P-Valor
Presión	1	414,100	414,100	434,268	$4,730 \times 10^{-14}$
Posición	2	258,000	129,000	135,299	$1,430 \times 10^{-11}$
Uso	2	22,300	11,200	11,709	$5,530 \times 10^{-4}$
Presión:Posición	2	96,800	48,400	50,771	$3,980 \times 10^{-8}$
Presión:Uso	2	4,700	2,400	2,465	0,113
Posición:Uso	4	11,100	2,800	2,921	0,051
Presión:Posición:Uso	4	0,4	0,1	0,112	0,977
Residuos	18	17,200	1,000		

En relación al nivel de presión y su interacción (Presión\*Posición), se observó que el incremento en el valor medio del parámetro  $\Delta T_1$ , [°C] fue mayor a una presión de trabajo de 600 MPa que a 200 MPa. A su vez, se observaron diferencias significativas para el valor  $\Delta T_1$  obtenido para la posición T-Superior  $r=0$  mm ( $12,0 \pm 5,9$ ) superando a T-Inferior  $r=0$  mm ( $7,0 \pm 3,2$ ) y a la T-Inferior  $r=35$  mm ( $5,8 \pm 2,4$ ), ver Figura **2-19** y Tabla **2-2**. Entre dos últimas, la posición  $r=0$  mm superó a la posición con  $r=35$  mm, recordando además que esta última posición se asemeja en su comportamiento térmico a la curva de temperatura del proceso registrada por una termocupla Tipo K ubicada en la base del cilindro del equipo APH.

La siguiente Tabla **2-2** expresa los valores promedios y sus desvíos estándares (DE) correspondiente al incremento de temperatura para los factores evaluados pertenecientes al diseño experimental aplicado en esta primera etapa del estudio del perfil térmico en el cilindro de

un equipo de escala de laboratorio.



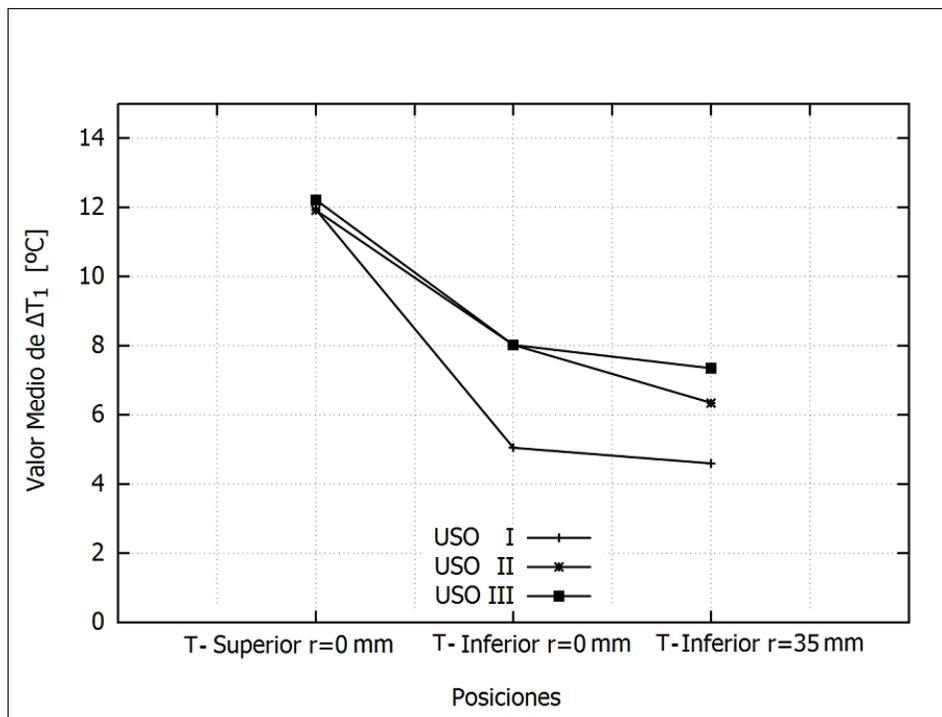
**Figura 2-19:** Interacción de los factores Presión y Posición evaluados en la Etapa 1

**Tabla 2-2:** Comparación de valores medios de  $\Delta T_1$  de la Etapa 1

Factores	Niveles	Promedios y desvíos
		$\Delta T + DE$
Presión	200	$4,91 \pm 1,3$ <sup>a</sup>
	600	$11,7 \pm 4,7$ <sup>b</sup>
Posición en canasta	T-Superior r = 0 mm	$12,0 \pm 5,9$ <sup>a</sup>
	T-Inferior r = 0 mm	$7,0 \pm 3,2$ <sup>b</sup>
	T-Inferior r = 35 mm	$5,8 \pm 2,4$ <sup>b</sup>
Uso consecutivo	I	$7,2 \pm 5,0$ <sup>a</sup>
	II	$8,7 \pm 4,8$ <sup>b</sup>
	III	$8,9 \pm 4,9$ <sup>b</sup>

DE: Desvío Estándar. Letras distintas indican diferencias significativas.

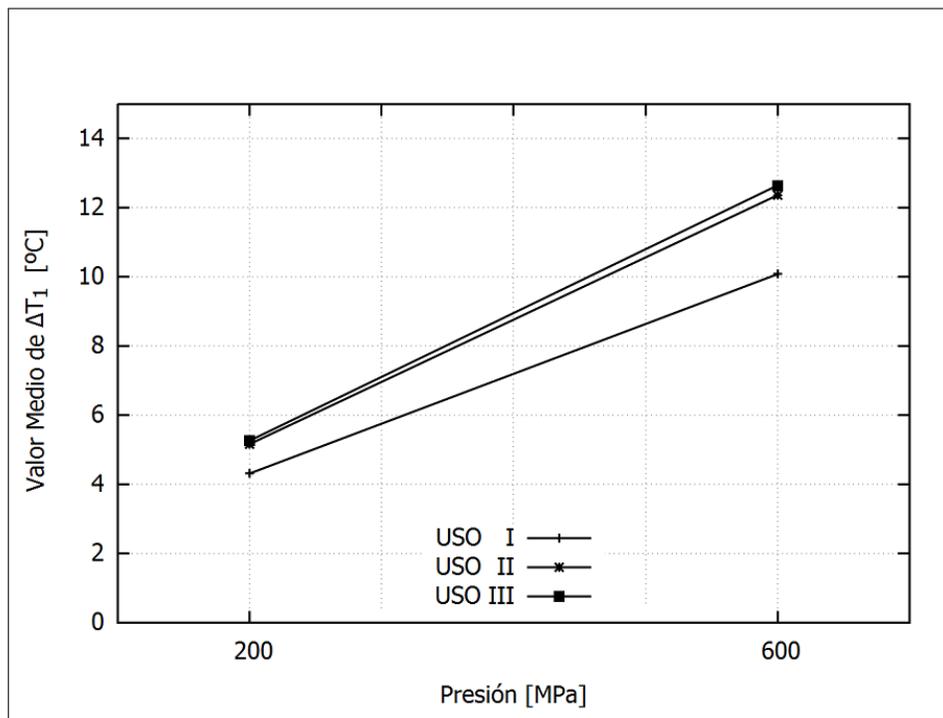
En la Figura 2-20 se presenta el efecto de los usos en función de las posiciones, observándose que la posición T-Superior  $r=0$  mm para todos los usos posee el mismo incremento térmico. A su vez, el  $\Delta T_1$  para el Uso I resultó menor frente a las posiciones T-Inferior  $r=0$  mm y  $r=35$  mm que durante los Usos II y III para esas mismas posiciones. La posición T-Inferior  $r=0$  mm no presentó diferencias estadísticamente significativas para los incrementos de temperatura evaluados en las instancias de los Usos II y III, mientras que para  $r=35$  mm, si se observaron diferencias significativas para esos usos, lo cual se debió a su cercanía con la pared metálica (zona de menor temperatura), además de recibir el fluido descendente desde la zona superior.



**Figura 2-20:** Influencia del factor Uso en las Posiciones evaluadas de la Etapa 1

Finalmente, en la Figura 2-21, se muestran los valores medios del parámetro  $\Delta T_1$  para el factor uso consecutivo en función de presiones aplicadas, sin efecto de interacción entre

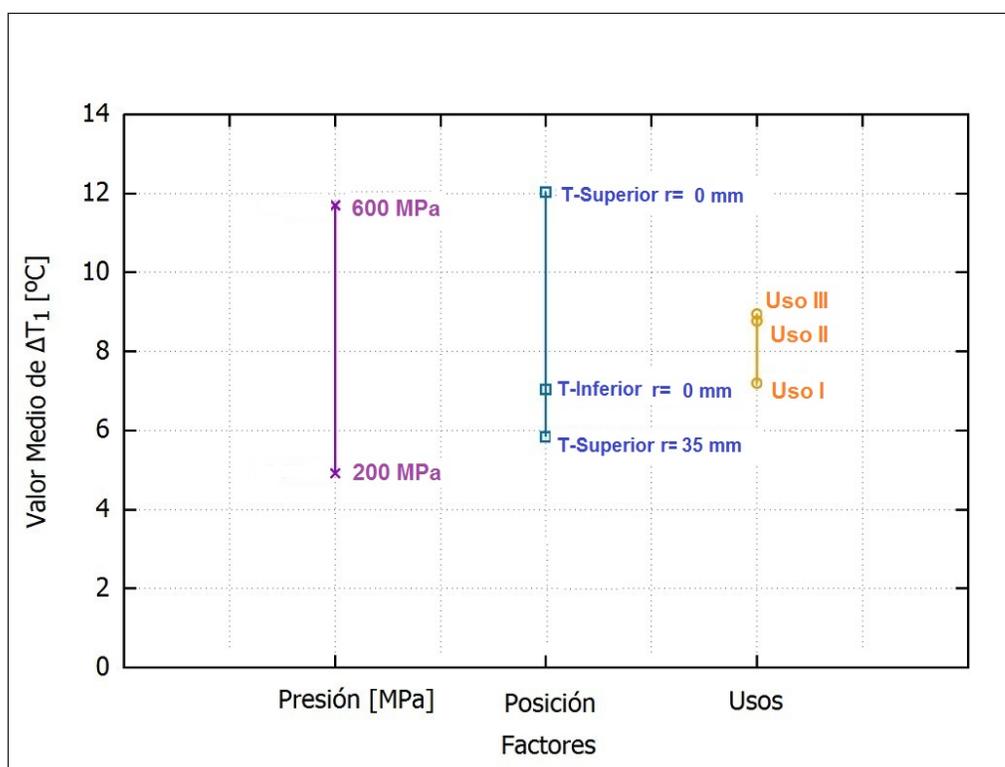
ambos. Los mismos fueron comparados mediante el método de Tukey. Para todos los usos, se obtuvo un mayor valor de  $\Delta T_1$  a 600 MPa respecto a 200 MPa, siendo  $\Delta T_1$  mayor para el Uso II y III ( $12,4 \pm 4,4$  °C) y ( $12,6 \pm 4,5$  °C) que para el Uso I ( $10,1 \pm 5,7$  °C) a 600 MPa. En particular y a través de la misma Figura 2-21 donde se presentan los valores medios del parámetro  $\Delta T_1$ , Uso I se diferenció estadísticamente respecto de los usos consecutivos (Uso II y III). Para estos dos últimos no se encontraron diferencias entre sí.



**Figura 2-21:** Influencia del factor Uso y las Presiones evaluadas de la Etapa 1

En Figura 2-22 se presentan los valores medios del parámetro  $\Delta T_1$ , [°C] obtenidos para cada uno de los factores estudiados. A partir de esa figura se observó: a) la existencia de un efecto positivo del factor nivel de presión  $\Delta T_1$ , el cual se incrementa a la mayor presión de trabajo (600 MPa), b) para la posición T-Superior  $r=0$  mm, el incremento de temperatura resultó mayor respecto a las demás posiciones evaluadas y c) el valor del parámetro  $\Delta T_1$  aumentó

con el uso consecutivo del equipo APH, particularmente entre el Uso I y Uso II. Sin embargo, para los Usos II y III, el  $\Delta T_1$  no se diferenció entre sí (ver además Tabla 2-2). A partir de este ensayo, se concluye que será necesario al menos realizar un ciclo operativo del equipo APH y sin carga de producto en la canasta metálica para que este alcance la condición de régimen térmico.



**Figura 2-22:** Influencia y magnitud de los factores estudiados de la Etapa 1 sobre  $\Delta T_1$

En referencia al incremento de temperatura en la fase de compresión, se encontró un comportamiento similar a lo informado en trabajos previos. Para el fluido de presurización utilizado, mezcla de agua y propilenglicol (70:30 v/v) cuya temperatura inicial fue 20 °C, con una velocidad de compresión de 300 MPa/min, se observó un incremento de temperatura de 4,91 °C cuando la presión aplicada fue 200 MPa ( $\pm 5$  MPa) y 11,7 °C a 600 MPa ( $\pm 5$  MPa) (ver

Tabla 2-2). Los autores Rasanayagam y otros (2003), utilizaron un equipo APH de volumen menor (54 ml) que el utilizado en el presente trabajo y obtuvieron para un único uso del equipo, valores de  $\Delta T_1$ , [ °C] de hasta 5,8 °C por cada 100 MPa para la posición central del cilindro de alta presión, aunque estos autores utilizaron como fluido de presurización propilenglicol puro ( $T_o = 25$  °C). A su vez, autores como Buzrul y otros (2008), emplearon etilenglicol como fluido de presurización ( $T_o = 20$  °C) para un único uso, en un equipo de 3 l de capacidad y observaron un incremento de temperatura de 3,9 °C a 200 MPa con una rampa de 300 MPa/min. El incremento de temperatura depende del máximo nivel presión alcanzado en el proceso, de la temperatura inicial, del tipo de fluido de presurización elegido de la compresibilidad y de la capacidad calorífica del fluido de compresión y del alimento tratado con APH (en ambos influye en forma marcada la composición), Rasanayagam y otros (2003). En el caso del agua y de alimentos de alta humedad, el incremento de temperatura es de 2 a 3 °C por cada 100 MPa; sin embargo, cuando se utilizan mezclas con solventes orgánicos y/o aceites como fluido de presurización o en el caso de alimentos con alto contenido lipídico, el aumento de temperatura es mayor, alcanzado en algunos casos 9°C por cada 100 MPa. Ello se debe a que, éstos poseen un mayor valor de compresibilidad y una menor conductividad térmica y capacidad calorífica con respecto al agua (Makita (1992) y Balasubramanian y Balasubramaniam (2003)).

### **Principales conclusiones de la Etapa 1**

El perfil heterogéneo de temperaturas registrado en el interior del cilindro de nuestro equipo APH coincide con los resultados de perfiles térmicos y ensayos realizados a escala similar de

equipos por los autores Kitsubun y otros (2005) y Hartmann y otros (2003). Si observamos las Figuras **2-13**, **2-14**, **2-15**, **2-16**, **2-17** y **2-18**, en los diferentes usos del equipo APH, la parte superior de la canasta del equipo presentó un mayor incremento de temperatura frente a las dos posiciones inferiores de la canasta y del cilindro de APH. En este sentido, Hartmann y otros (2003) y Hartmann y otros (2004) informaron que durante la compresión se desarrolla un campo de velocidades del fluido por efecto de la convección forzada, mientras que durante la fase de mantenimiento de la presión se produce el fenómeno de convección natural. El movimiento del fluido de presurización genera condiciones térmicas no uniformes, especialmente cuando el fluido es altamente viscoso, ya que disminuye el movimiento convectivo. A su vez, en la posición cuyo radio corresponde al centro de la canasta ( $r=0$  mm), se obtuvo un mayor incremento de temperatura que en la posición lateral; esto puede deberse al comportamiento del fluido por su proximidad a la pared metálica de la canasta y también por las pérdidas de calor respecto de la pared del cilindro de alta presión.

En un sistema adiabático ideal, luego de la descompresión, la temperatura del fluido debería volver a su valor inicial; en la práctica la temperatura final es ligeramente inferior, debido a las propiedades termodinámicas del fluido y a la velocidad de compresión y de despresurización. Un aumento rápido en la temperatura del fluido tiene como contrapartida un descenso rápido de la misma durante el procesamiento con APH, Balasubramanian y Balasubramanian (2003).

Si bien en la bibliografía consultada no se encontraron referencias relacionadas con el estudio del uso consecutivo de APH, en el presente trabajo se observó que el equipo utilizado requiere como mínimo un uso sin carga de producto en la canasta metálica para su puesta en régimen

térmico.

### **2.3.2. Etapa 2: Evaluación de la distribución de temperatura del fluido de presurización luego de la puesta en régimen térmico de un equipo de APH de escala laboratorio, sin carga de producto en la canasta metálica**

En esta etapa se evaluó el incremento de temperatura del fluido de presurización en función del nivel de presión (200, 400 y 600 MPa  $\pm$  5 MPa) y en diferentes posiciones internas de la canasta metálica y del cilindro del equipo APH operando sin carga de producto y en condición de régimen térmico, es decir luego de haber realizado el Uso I, respetando para cada uso la etapa de compresión del fluido hasta alcanzar la presión de trabajo, la cual luego fue mantenida durante 5 minutos y posteriormente se realizó la descompresión hasta presión atmosférica (0,1 MPa). Luego, se procedió a la apertura del equipo, se retiró la canasta y se colocaron nuevamente las termocuplas. Una vez finalizado el primer uso (Uso I), se contempló el mismo tiempo y las mismas maniobras de carga de alimentos, es decir de carga de muestras y se volvió a repetir para los siguientes usos (Usos II y III).

El monitoreo de la temperatura del fluido de presurización (propilenglicol:agua: 70:30 v/v) se realizó en las posiciones radiales en  $r= 0$  mm y  $r= 35$  mm y axiales (L) en tres posiciones: T-Superior, T-Central e T-Inferior (consideradas desde la base de la canasta metálica; indicada en la Figura **2-10**) y la evolución térmica del fluido de presurización (T-Proceso), siendo su temperatura inicial de 20 °C.

A diferencia del ensayo presentado en la Etapa 1, en esta instancia se evaluaron más posiciones espaciales incrementando el número de ensayos para este nuevo estudio.

Se detallan a continuación las ubicaciones de cada una de las termocuplas Tipo K en el interior de la canasta metálica del equipo APH (sin carga de producto) y de la ubicación de la termocupla de proceso estableciéndose la codificación para cada caso:

**T-Superior r= 0 mm**

**T-Central r= 0 mm**

**T-Inferior r= 0 mm**

**T-Superior r= 35 mm**

**T-Central r= 35 mm**

**T-Inferior r= 35 mm**

**T-Proceso = externa y próxima a la pared de la base del cilindro de APH**

**Cálculo del parámetro  $\Delta T_1$  [ °C]**

$$\Delta T_1 \text{ [}^\circ\text{C]} = T_{200/400/600\text{MPa}} - T_o \quad (2-3)$$

donde:  $T_{200/400/600\text{MPa}}$  es la temperatura del fluido de presurización al alcanzar 200, 400 ó 600 MPa y  $T_o$  es la temperatura inicial del mismo, ambas indicadas en las Figuras **2-23**, **2-25**, **2-27**, **2-24**, **2-26** y **2-28**.

**Cálculo del parámetro  $\Delta T_2$  [ ° C]**

$$\Delta T_2 \text{ [}^\circ\text{C]} = T_{Max} - T_o \quad (2-4)$$

donde:  $T_{Max}$  es la máxima temperatura del fluido de presurización registrada durante el procesamiento y  $T_o$  es la temperatura inicial del mismo, ambas indicadas en las Figuras **2-23**, **2-25**, **2-27**, **2-24**, **2-26** y **2-28**

Las siguientes Figuras **2-23**, **2-25**, **2-27**, se representan a modo de ejemplo y las demás figuras se presentan en el Anexo Experimental.

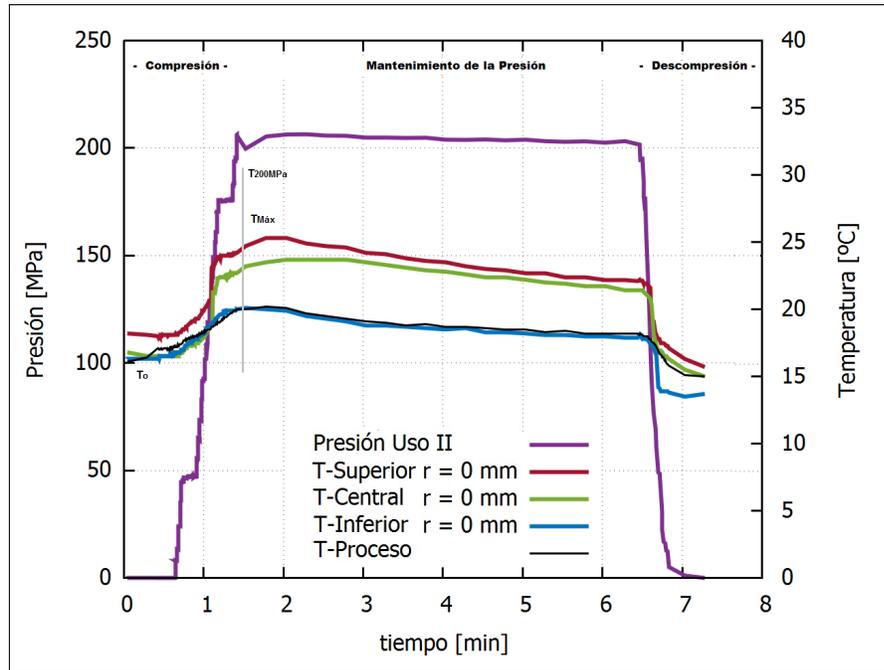


Figura 2-23: Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 200 MPa y en  $r=0$  mm para la Etapa 2

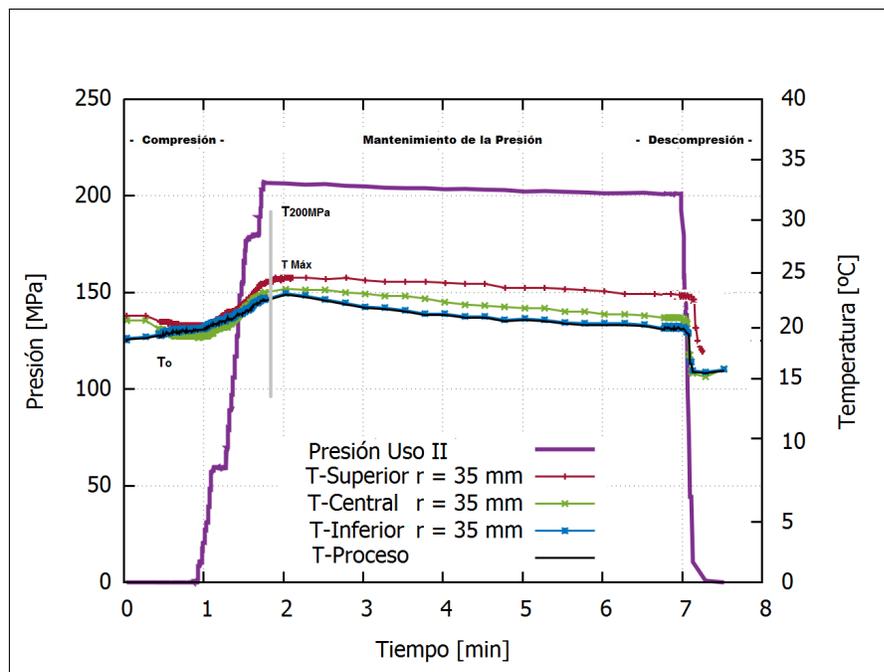
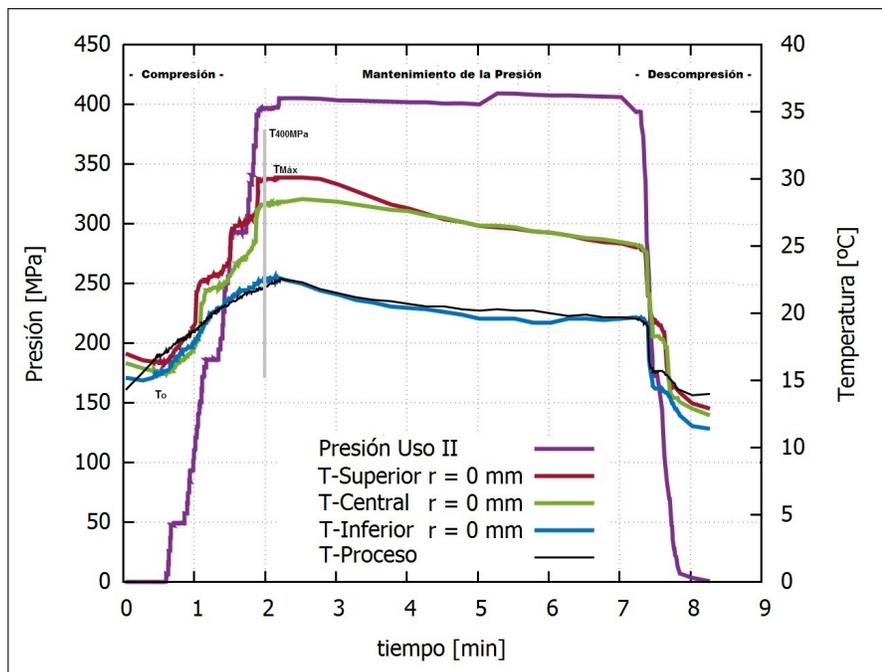
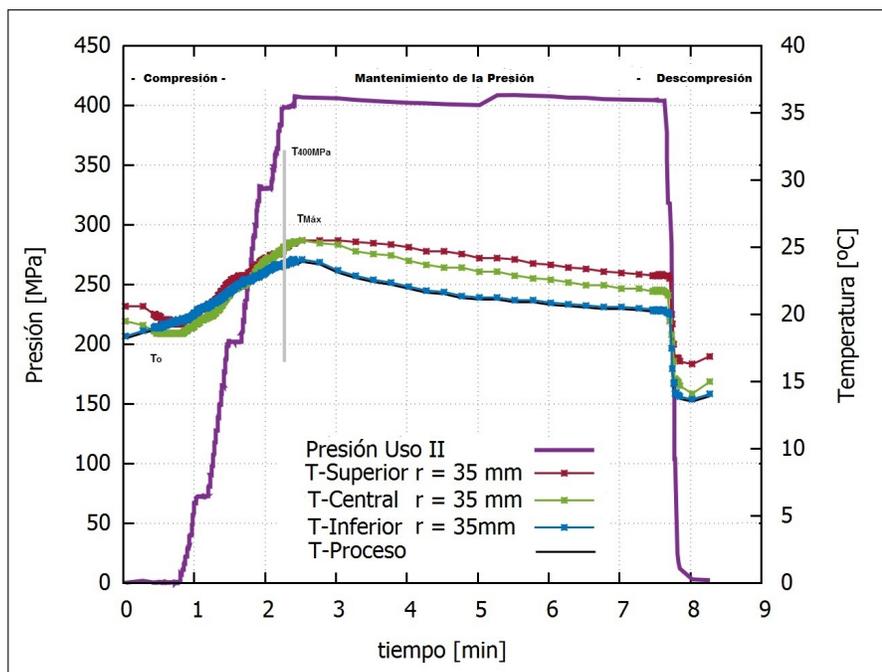


Figura 2-24: Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 200 MPa y en  $r=35$  mm para la Etapa 2



**Figura 2-25:** Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 400 MPa y en  $r=0$  mm para la Etapa 2



**Figura 2-26:** Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 400 MPa y en  $r=35$  mm para la Etapa 2

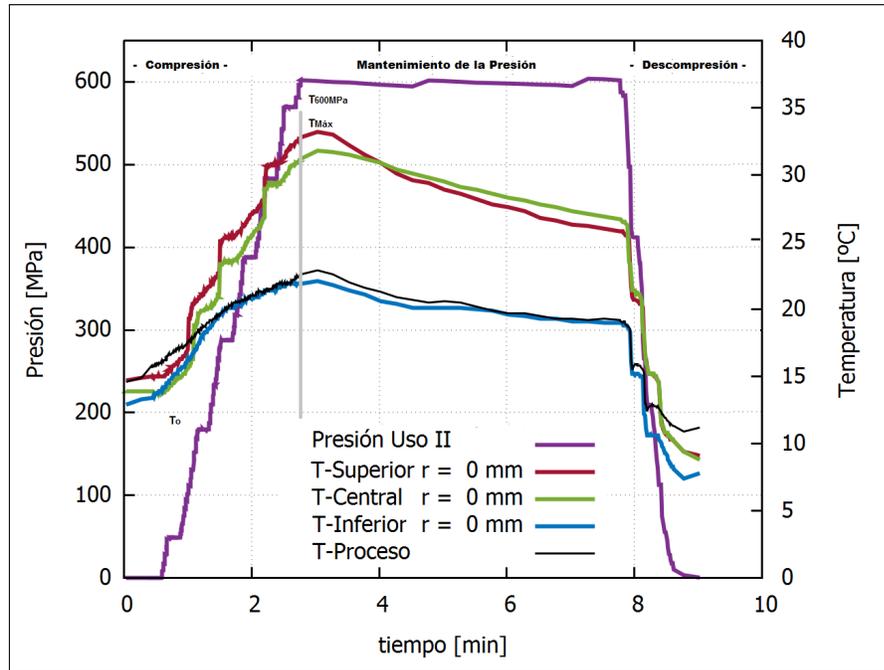


Figura 2-27: Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 600 MPa y en  $r=0$  mm para la Etapa 2

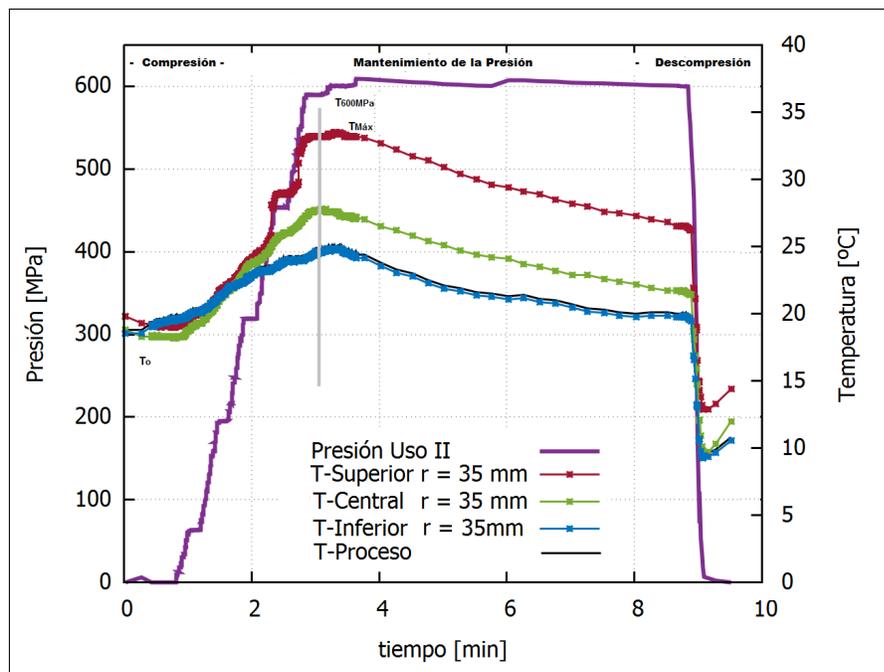


Figura 2-28: Curvas experimentales del segundo uso (Uso II) evaluadas a 600 MPa y en  $r=35$  mm para la Etapa 2

## Descripción del diseño experimental y análisis estadístico de la Etapa 2

Para el diseño experimental se utilizó un diseño factorial 3x2x3 Montgomery (2003), con los siguientes factores y niveles: presión tres niveles: (200, 400 y 600 MPa), posición radial de la termocupla (r) con dos niveles: 0 mm para la termocupla colocada en el centro de la canasta y 35 mm para la termocupla ubicada próxima a la pared de la canasta metálica y finalmente para la posición axial de la termocupla (L) con tres niveles: T-Superior, T-Central y T-Inferior. Tal como se mencionó en la sección referente a la aplicación general del tratamiento de APH , el fluido en la camisa de intercambio se acondicionó a 18 °C. Se realizaron 6 repeticiones del diseño factorial completo. Se implementó el programa R, CRAN-PROYECT Team (2013), para realizar un ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) sobre  $\Delta T_1$  y  $\Delta T_2$  [ °C] considerándose los efectos principales, las interacciones dobles y triples.

En el modelo estadístico asociado al diseño factorial aplicado, la respuesta Y correspondió a los dos parámetros relativos al incremento de la temperatura del fluido:  $\Delta T_1$  [ °C] y  $\Delta T_2$  [ °C]. El modelo de efectos utilizado se presenta en la siguiente expresión:

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\beta\gamma)_{jk} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \epsilon_{ijkl} \quad (2-5)$$

$\mu$ , es la media general

$\alpha_i$ , es el efecto del nivel i-ésimo del factor Presión

$\beta_j$ , es el efecto del nivel j-ésimo del factor Posición Radial

$\gamma_k$ , es el efecto del nivel k-ésimo del factor Posición Axial

$(\alpha\beta)_{ij}$ ,  $(\alpha\gamma)_{ik}$ ,  $(\beta\gamma)_{jk}$ , representan las interacciones dobles (de dos factores) entre los niveles  $ij$ ,  $ik$ ,  $jk$  respectivamente

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$  es el efecto de la interacción de la combinación de  $ijk$

$\epsilon_{ijkl}$ , es el error aleatorio en la combinación  $ijkl$ ,

con  $i = 1,2,3$ ;  $j=1,2$ ;  $k=1,2,3$

siendo  $l = 1,..n$ , y  $n =$  número de observaciones (108)

### **Resultados a la evaluación de la distribución de temperatura del fluido de presurización luego de la puesta en régimen térmico, sin carga de producto en la canasta metálica**

Los resultados de esta instancia de estudio incluyen los registros de temperaturas acorde a las posiciones registradas y presiones de trabajo para los Usos II y III, las mismas son presentadas en el Anexo Experimental.

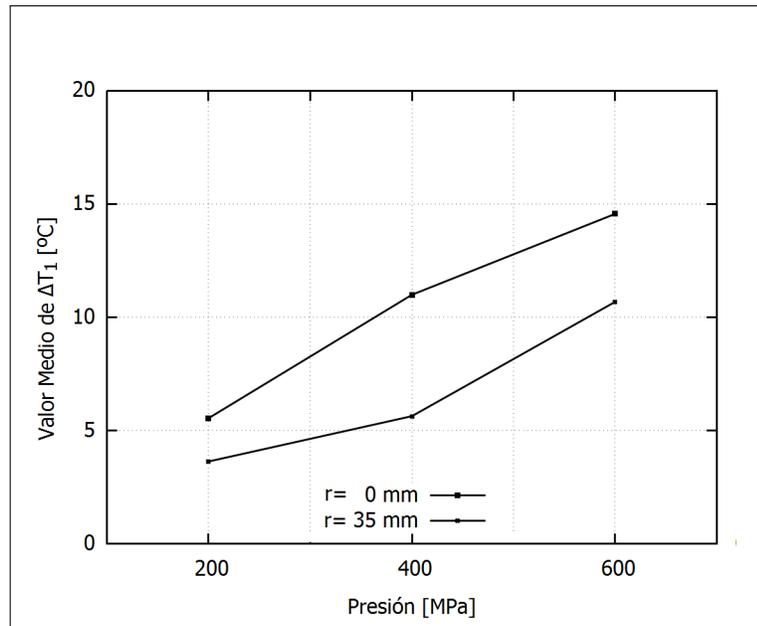
El análisis estadístico de los resultados correspondiente al parámetro  $\Delta T_1$  [ °C] indicó que resultaron significativas ( $\alpha = 0,05$ ) los tres efectos de las interacciones dobles y los efectos principales de las tres variables (Presión (P), Posición radial (r) y Posición axial (L: Superior, Central, Inferior) (ver Tabla **2-3**).

En la Figura **2-29** y para las posiciones radiales, se observó que la posición correspondiente a  $r = 0$  mm presentó el mayor incremento de temperatura del parámetro  $\Delta T_1$  [ °C] para las distintas presiones estudiadas, mientras las posiciones próximas a la pared de la canasta metálica presentaron el menor incremento. Esto se debería a que el fluido descendente,

**Tabla 2-3:** Análisis ANOVA para  $\Delta T_1$ , [°C] de la Etapa 2

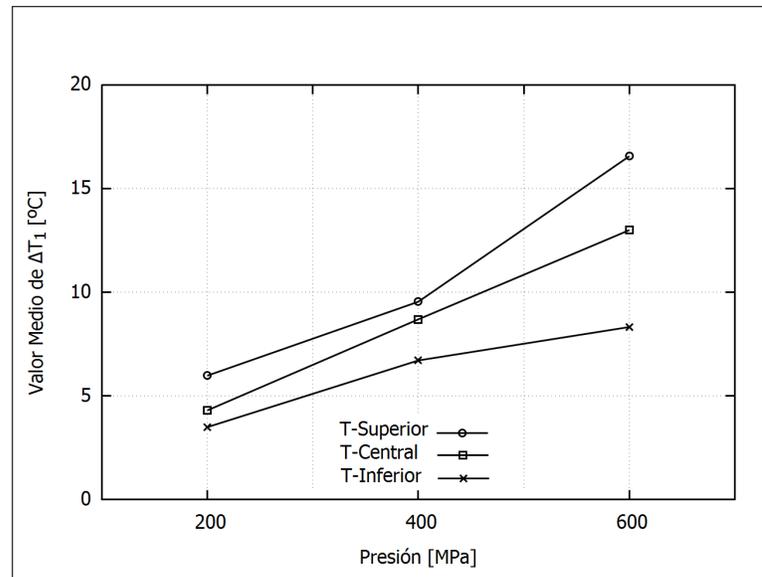
Factores	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrática	Valor F	p-Valor
Presión	2	1164,588	582,294	150,053	$\leq 1 \times 10^{-8}$
Posición radial (r)	1	373,386	373,386	96,219	$\leq 1 \times 10^{-8}$
Posición axial (L)	2	368,855	184,427	47,5257	$\leq 1 \times 10^{-8}$
Presión:r	2	53,930	26,9650	6,949	$1,562 \times 10^{-4}$
Presión:L	4	130,275	32,569	8,393	$8,440 \times 10^{-7}$
L:r	2	125,356	62,678	16,152	$1 \times 10^{-7}$
Presión:L:r	4	31,335	7,834	2,019	$9,85 \times 10^{-3}$
Residuos	90	349,253	3,881		

próximo a la pared del cilindro de alta presión, se enfriaría por la pérdida de calor del mismo (efecto observado en la etapa de modelado y simulación). Se observó que conforme aumenta la presión estudiada también se incrementa este parámetro en la posición radial con  $r= 35$  mm aunque en menor medida que en  $r= 0$  mm.

**Figura 2-29:** Interacción los factores Presión y Posiciones radiales para  $\Delta T_1$  en la Etapa 2

En la Figura 2-30, es posible observar que para las presiones estudiadas en función a las

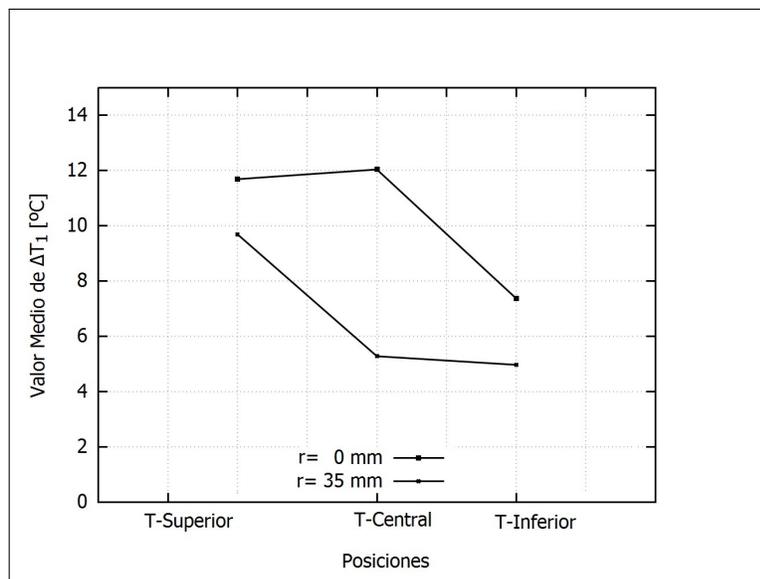
posiciones axiales, donde la T-Superior corresponde a la posición con mayor incremento de temperatura  $\Delta T_1$  [°C], siguiendo en importancia la posición axial T-Central y finalmente la T-Inferior. Este comportamiento es dependiente del nivel de presión y en particular a 600 MPa los incrementos de temperatura se separan en forma marcada. A 600 MPa fue observado el máximo incremento de temperatura para este parámetro.



**Figura 2-30:** Interacción los factores Presiones y las Posiciones axiales para  $\Delta T_1$  en la Etapa 2

En el análisis de las posiciones axiales en función radiales, se observó a la posición central como la posición con mayor incremento de temperatura  $\Delta T_1$  [°C], esto podría interpretarse como una zona central aislada, protegida de las corrientes de fluido que se irían enfriando desde el sector superior lateral (cercano a la pared) y luego descendería lateralmente enfrentándose con la zona inferior de menor temperatura. Luego, el fluido mezclado desde esta zona ingresa ascendiendo hacia el interior con una temperatura media. Además se observa la disminución del incremento de temperatura  $\Delta T_1$  conforme aumenta la posición radial, ver

Figura 2-31.



**Figura 2-31:** Interacción los factores Posiciones axiales y las Posiciones radiales para  $\Delta T_1$  en la Etapa 2

Finalmente, a través de la Figura 2-32 se evidencia la influencia de todos los efectos principales estudiados para el parámetro  $\Delta T_1$ , [°C]. En este sentido, la amplitud de la variable presión indica la importancia por sobre las demás variables estudiadas.

Para el parámetro  $\Delta T_2$ , [°C], también se realizó un ANOVA, ( $\alpha = 0,05$ ) considerándose un diseño factorial  $3 \times 2 \times 3$ , resultando significativos las interacciones dobles y los efectos principales (Tabla 2-4).

En la Figura 2-33, se observó que la posición radial ( $r = 0$  mm) muestra el mayor incremento de temperatura para el parámetro  $\Delta T_2$ , [°C] para las distintas presiones estudiadas, mientras que para las posiciones próximas a la pared de la canasta metálica presentaron el menor incremento. Similarmente, a lo que ocurrió con  $\Delta T_1$ , se observó a la posición radial con  $r = 35$  mm mostró un incremento de temperatura menor para todas las presiones aplicadas.

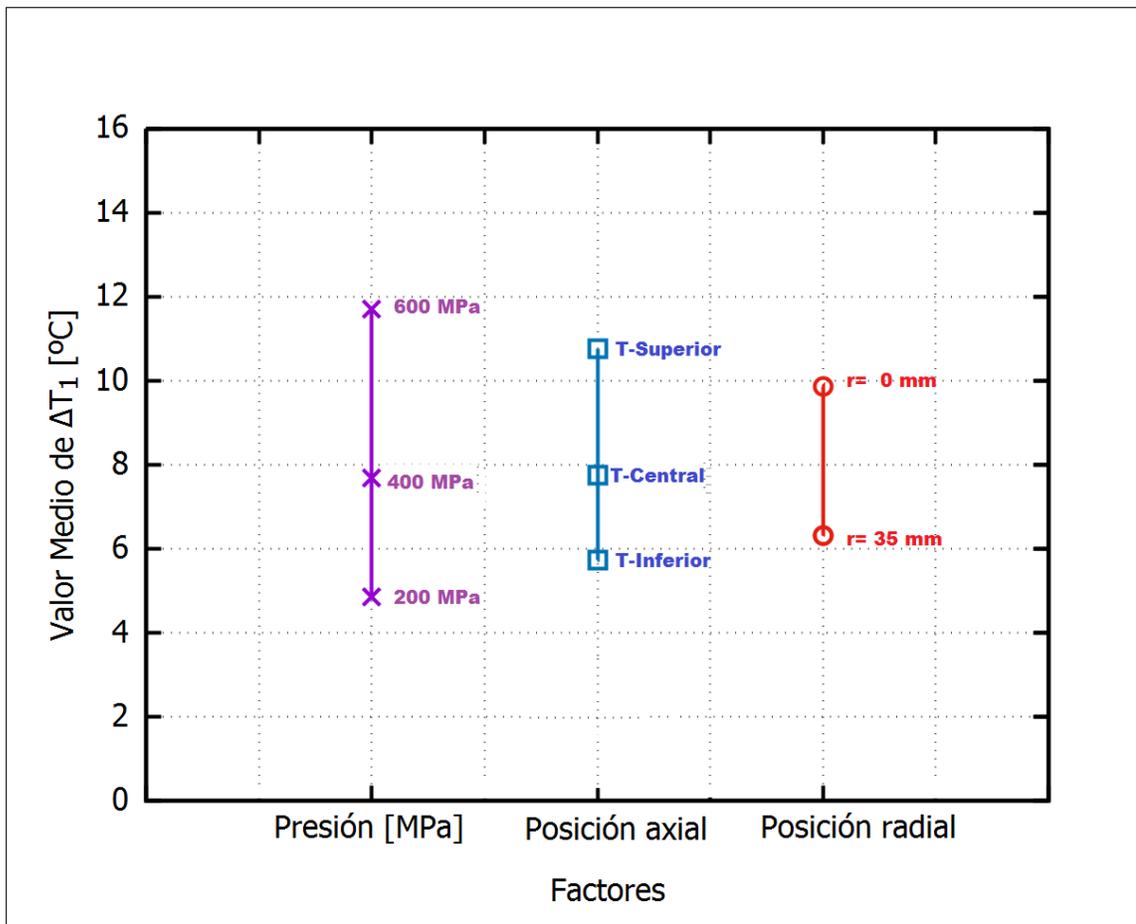
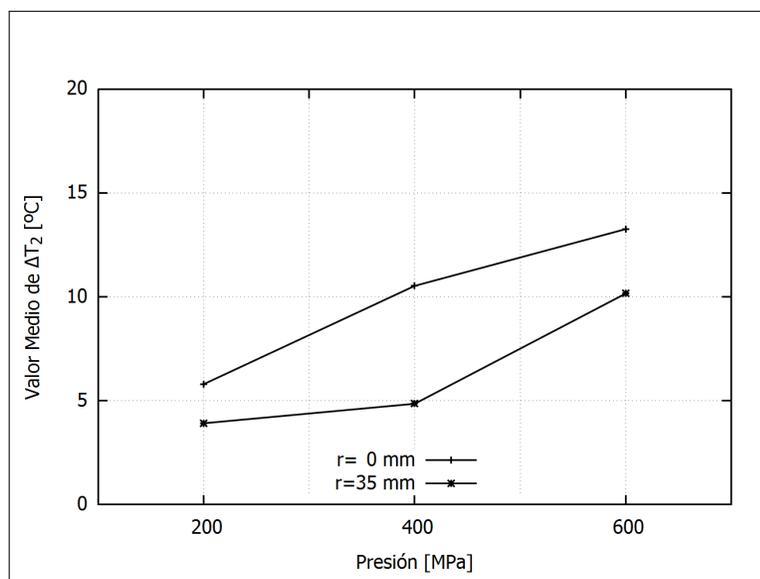


Figura 2-32: Influencia y magnitud de los factores estudiados de la Etapa 2 sobre  $\Delta T_1$

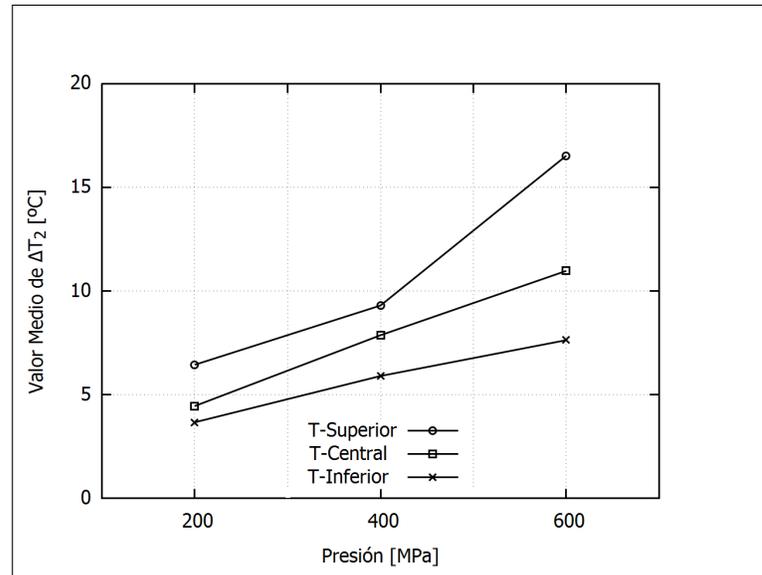
**Tabla 2-4:** Análisis ANOVA del parámetro  $\Delta T_2$ , [°C] de la Etapa 2

Factores	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrática	Valor F	p-Valor
Presión	2	854,559	427,279	69,516	$\leq 1 \times 10^{-8}$
Posición radial (r)	1	341,0667	341,0667	55,48936	$\leq 1 \times 10^{-8}$
Posición axial (L)	2	459,952	229,976	37,416	$\leq 1 \times 10^{-8}$
Presión:r	2	67,5577	33,7789	5,49561	$5,601 \times 10^{-4}$
Presión:L	4	143,9470	35,9867	5,85481	$3,12 \times 10^{-5}$
L:r	2	177,6765	88,8382	14,45341	$3,60 \times 10^{-7}$
Presión:L:r	4	56,2858	14,0714	2,28933	0,066
Residuos	90	553,1872	6,1465		

**Figura 2-33:** Interacción de los factores Presión y Posiciones radiales estudiadas para  $\Delta T_2$  en la Etapa 2

En la Figura 2-34, se muestran las presiones estudiadas en función a las posiciones axiales, donde nuevamente la T-Superior corresponde a la posición con mayor incremento térmico para  $\Delta T_2$ , siguiendo en importancia la posición axial T-Central y finalmente la T-Inferior. Este comportamiento es dependiente del nivel de presión y al igual que en el estudio del parámetro anterior, a 600 MPa se presentó el máximo incremento de temperatura para las

posiciones evaluadas, diferenciándose en forma marcada.

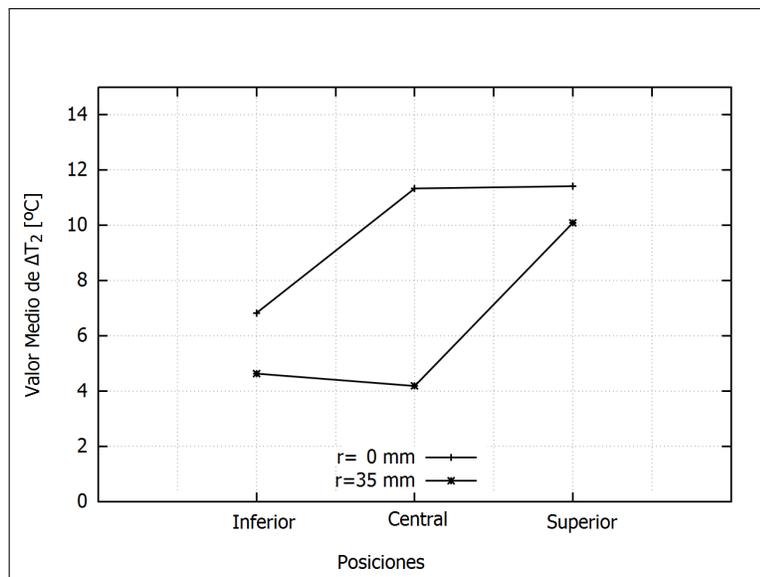


**Figura 2-34:** Interacción de los factores Presión y las Posiciones axiales estudiadas para  $\Delta T_2$  en la Etapa 2

Nuevamente, para las posiciones axiales frente a las radiales, se observó a la posición central como la posición con mayor incremento de temperatura  $\Delta T_2$  y la disminución del mismo conforme aumenta la posición radial, ver Figura **2-35**.

La Figura **2-36** presenta la influencia de todos los efectos principales estudiados para el parámetro  $\Delta T_2$ . En este sentido, la amplitud de la variable presión indica la importancia por sobre las demás variables estudiadas. En general, lo observado para el parámetro  $\Delta T_2$  coincide con lo observado para  $\Delta T_1$  ya que ambas variables aumentan en función a una mayor presión y mayor posición axial, mientras que se observa su disminución conforme aumenta la posición radial.

El efecto de la presión sobre el incremento de temperatura también fue observado por Balasubramanian y Balasubramaniam (2003), quienes que la historia de temperatura alcanzada

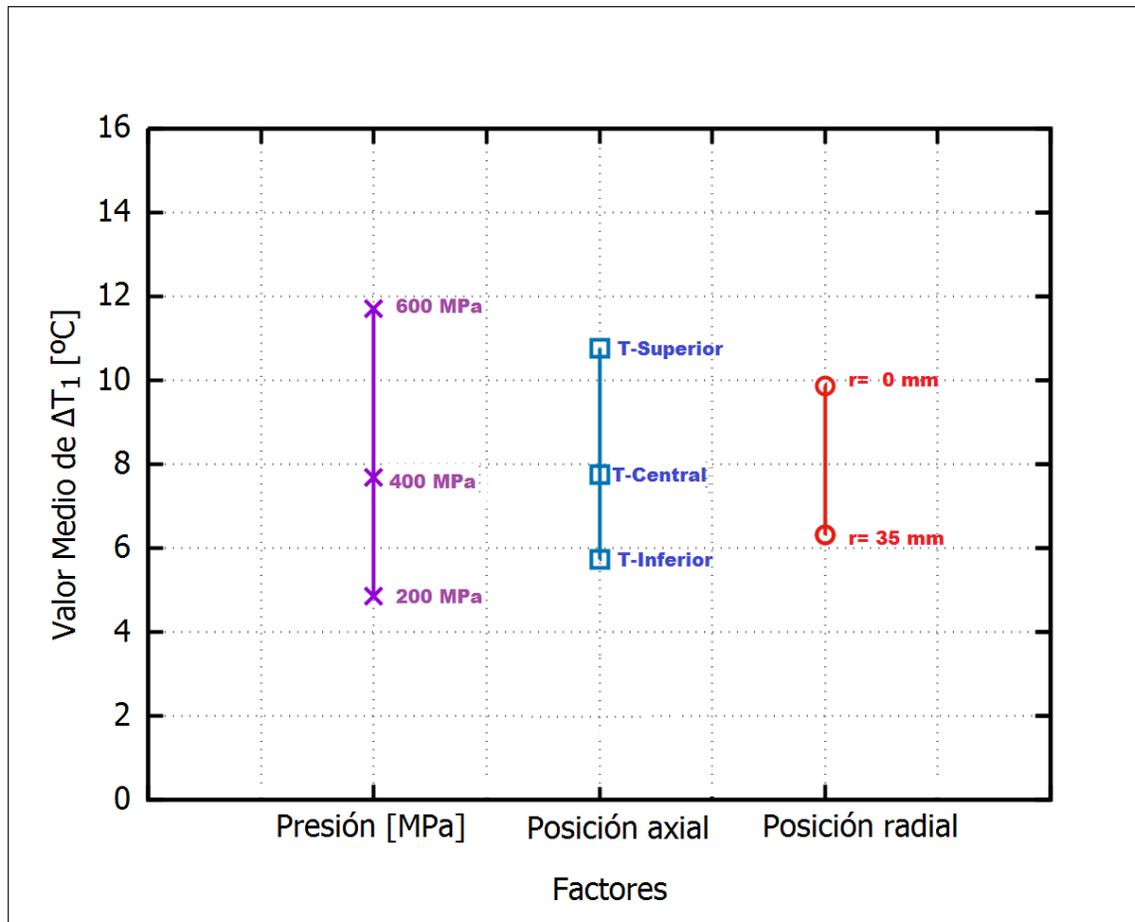


**Figura 2-35:** Posiciones axiales en función a las posiciones radiales estudiadas para  $\Delta T_2$  en la Etapa 2

refleja las condiciones experimentales utilizadas. Una vez que la presión deseada se alcanza, el trabajo en la compresión adicional del fluido se detiene y el gasto de energía sólo involucra el mantenimiento de la presión durante el tiempo de procesamiento. Los perfiles de temperatura obtenidos para fluidos de compresión representan el aumento aparente de la temperatura (es decir, la diferencia entre el verdadero aumento de temperatura debido a la compresión, al aumento por la calefacción y por la pérdida de calor al entorno).

### Principales conclusiones de la Etapa 2

Cualquier variación en las características de transferencia de calor del cilindro de alta presión (como la relación área / volumen del cilindro, ubicación del sensor de temperatura en el interior del mismo y las propiedades del material de aislamiento del cilindro de presión) determinará diferencias en el perfil de temperatura.



**Figura 2-36:** Valores medios de  $\Delta T_2$  e influencia de los efectos principales evaluados en la Etapa 2

Durante la etapa de mantenimiento, la transferencia de calor tiene lugar entre el fluido de compresión, muestra/alimento y ambiente externo (a través de las paredes del cilindro de APH). El tiempo en que la presión deseada se alcanza depende en parte de la compresibilidad del fluido compresión y del alimento procesado, la relación alimento/fluido en el cilindro de APH presión y en los parámetros de diseño del equipo, como el tipo de bomba/instantificadores utilizados. El aumento aparente de la temperatura del fluido de compresión depende de la presión y del tiempo de mantenimiento, de la compresibilidad del producto, sus propiedades termofísicas temperatura inicial y la tasa de pérdida de calor al

entorno.

### **2.3.3. Etapa 3: Comparación de la distribución de temperatura del fluido de presurización en el interior de la canasta metálica del equipo de APH con carga y sin carga**

El objetivo de la siguiente etapa consistió en evaluar el efecto carga de la canasta metálica del equipo de APH sobre el incremento de temperatura del fluido de compresión operado a 200 y 600 MPa para el primer y tercer Uso del equipo. En este sentido se utilizó como carga de alimento cilindros de ágar. En este estudio se utilizó, para cada Uso del equipo de APH un cilindro de ágar (6 % p/v, marca Britania) envasado al vacío en forma independiente con doble bolsa (marca Cryovac CN-640 Sealed Air, Buenos Aires, Argentina). Las dimensiones de cada uno de los cilindros fueron 360 mm de altura y 40 mm de diámetro (ver Figura 2-37). La temperatura inicial de los cilindros de ágar fue de 20 °C. Se destaca que si bien se evaluaron primer y tercer uso del equipo, se realizó el segundo uso (en ambas condiciones de carga) para continuar con el régimen de trabajo. Lamentablemente no fue posible registrar la evolución de las temperaturas en el interior de los cilindros de ágar debido a que el equipo de APH sufrió un desperfecto técnico y se encuentra en reparación al día de la fecha.

La evolución térmica se registró mediante termocuplas Tipo (K) en el cabezal superior. Las mediciones se realizaron en las posiciones: T-Superior  $r=0$  mm y T-Proceso (externa y próxima a la pared de la base del cilindro de APH).



**Figura 2-37:** Cilindros de ágar nutritivo utilizados como carga de producto durante el procesamiento por APH

**Cálculo de parámetros  $\Delta T_1$ ,  $\Delta T_2$ ,  $\Delta T_3$  y  $\Delta T_4$**

A partir de las evoluciones térmicas del fluido de compresión medidas se obtuvieron los siguientes parámetros para los dos niveles de presión (200 y 600 MPa):

$$\Delta T_1 [^{\circ}\text{C}] = T_{200/600\text{MPa}} - T_o \quad (2-6)$$

donde:  $T_{200/600MPa}$  es la temperatura del fluido de presurización al alcanzar el nivel de presión de 200 ó 600 MPa y  $T_o$  es la temperatura inicial del mismo, (Figuras **2-38,2-39, 2-40, 2-41 y 2-42,2-43, 2-44 y 2-45**)

$$\Delta_2[^\circ\text{C}] = T_{Max} - T_o \quad (2-7)$$

donde:  $T_{Max}$  es la máxima temperatura del fluido de presurización registrada durante el procesamiento y  $T_o$  es la temperatura inicial del mismo, ambas indicadas en las Figuras **2-38,2-39, 2-40, 2-41 y 2-42,2-43, 2-44 y 2-45**.

$$\Delta T_3[^\circ\text{C}] = T_1 - T_{200/600MPa} \quad (2-8)$$

donde:  $T_1$  es la temperatura al finalizar de compresión y  $T_{200/600MPa}$  es la temperatura del fluido de presurización al alcanzar la presión de 200 ó 600 MPa, ( Ver Figuras **2-38,2-39, 2-40, 2-41 y 2-42,2-43, 2-44 y 2-45**)

$$\Delta T_4[^\circ\text{C}] = T_1 - T_{Max} \quad (2-9)$$

donde:  $T_1$  es la temperatura al finalizar compresión y  $T_{Max}$  es la máxima temperatura del fluido de presurización registrada durante el mantenimiento de la presión, (Figuras **2-38,2-**

39, 2-40, 2-41 y 2-42,2-43, 2-44 y 2-45)

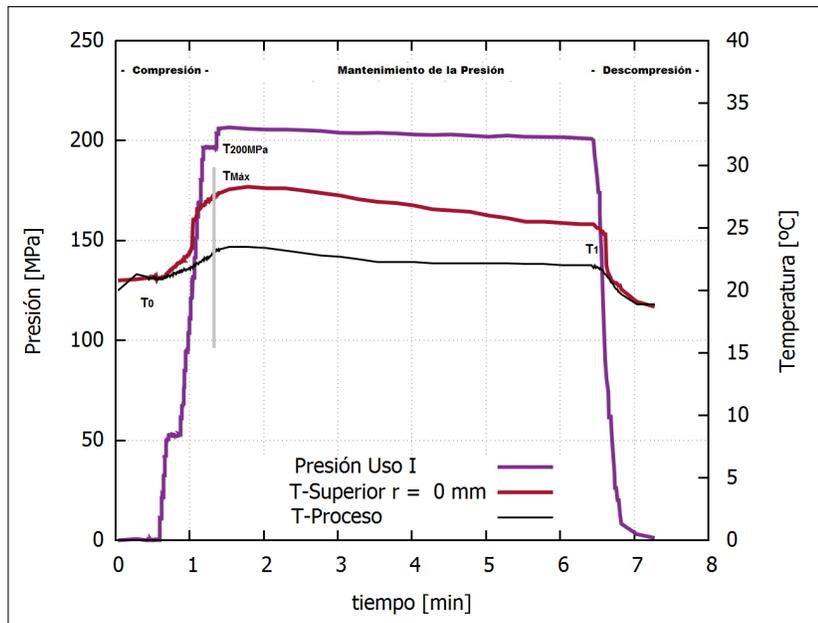


Figura 2-38: Parámetros evaluados a 200 MPa durante el Uso I en condición sin carga

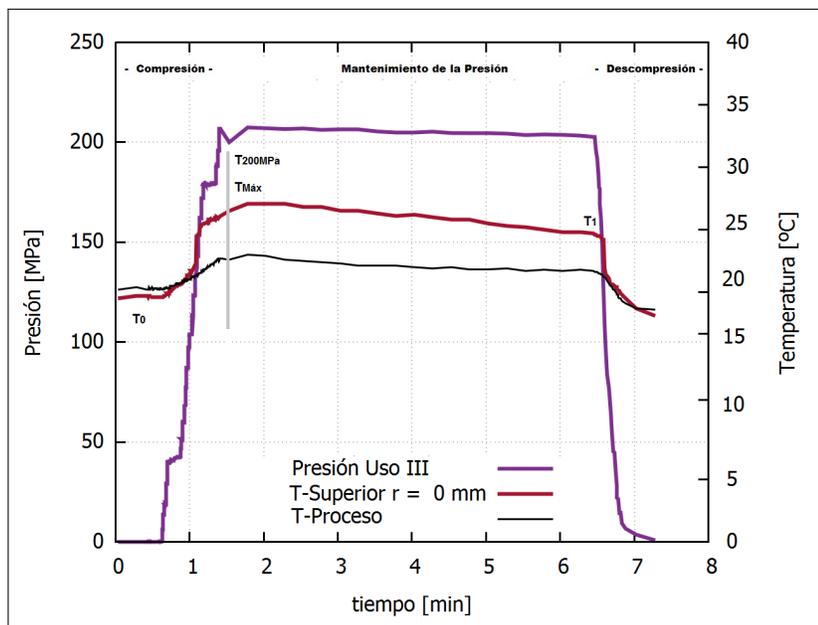


Figura 2-39: Parámetros evaluados a 200 MPa durante el Uso III en condición sin carga

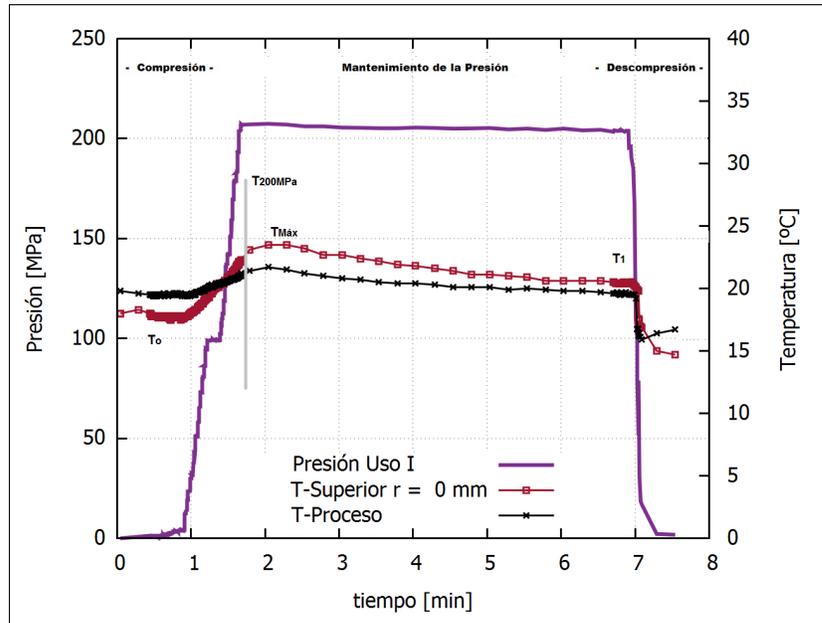


Figura 2-40: Parámetros evaluados a 200 MPa durante el Uso I en condición con carga

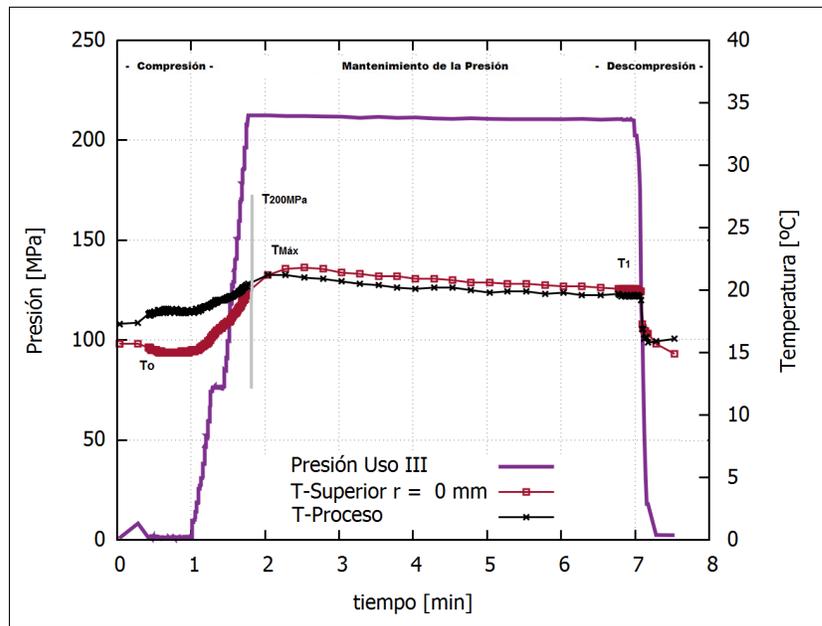
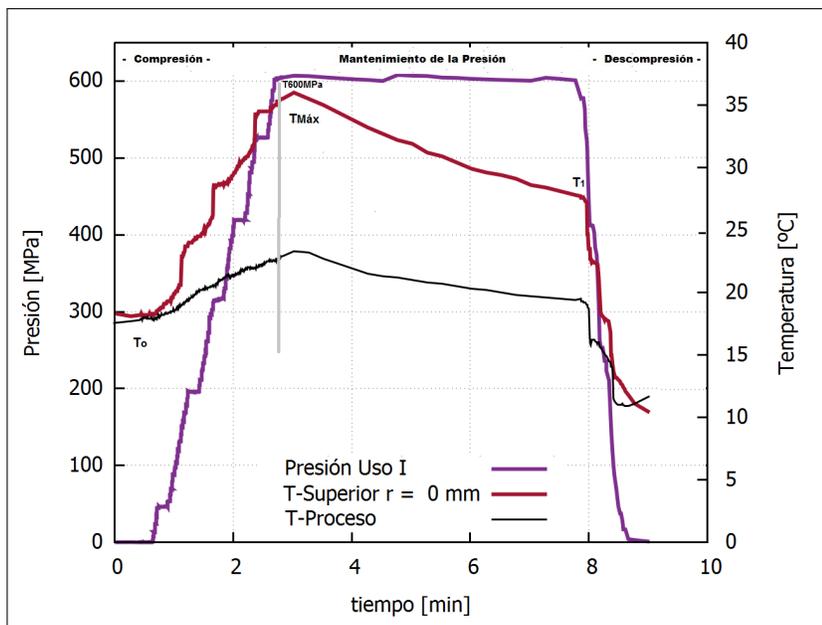
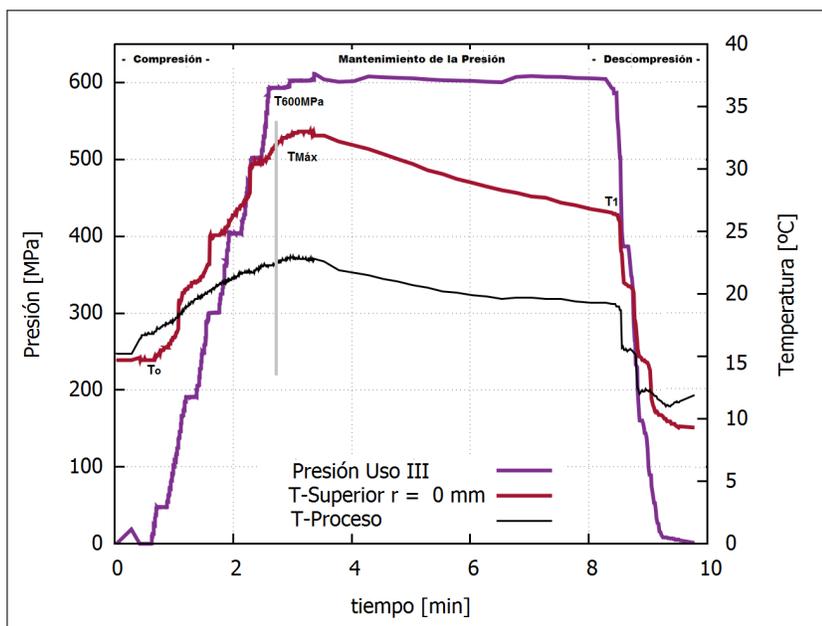


Figura 2-41: Parámetros evaluados a 200 MPa durante el Uso III en condición con carga



**Figura 2-42:** Registro de temperaturas y parámetros evaluados durante el Uso I a 600 MPa sin carga



**Figura 2-43:** Registro de temperaturas y parámetros evaluados durante el Uso III a 600 MPa sin carga

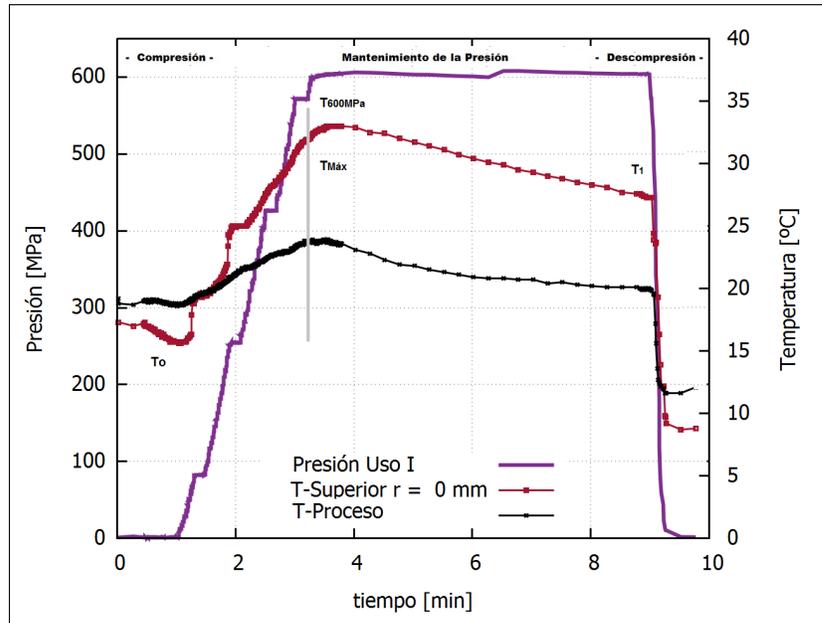


Figura 2-44: Parámetros evaluados a 600 MPa durante el Uso I en condición con carga

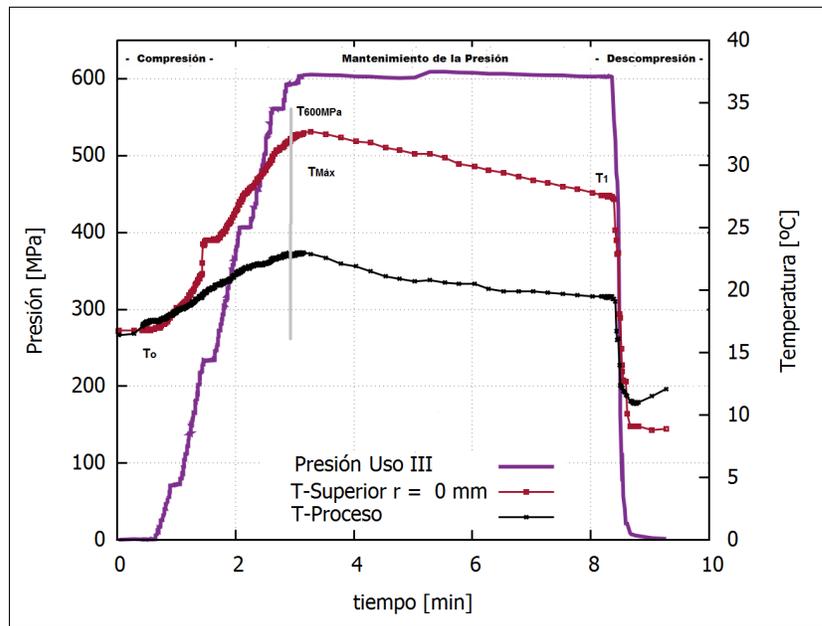


Figura 2-45: Parámetros evaluados a 600 MPa durante el Uso III en condición con carga

### Descripción del diseño experimental y análisis estadístico de la Etapa 3

Se utilizó un diseño factorial  $2^k$  completamente aleatorizado, (Montgomery (2003)), con los siguientes cuatro factores fijos y respectivos niveles: presión (200 y 600 MPa), posición (T-Superior  $r = 0$  mm y Termocupla de Proceso), Uso (Uso I y III) y carga (con y sin carga). Se realizaron  $2^4 = 16$  corridas con tres repeticiones del diseño factorial completo. Asimismo, se realizó un ANOVA ( $\alpha = 0,05$ ) de los siguientes parámetros  $\Delta T_1$ ,  $\Delta T_2$ ,  $\Delta T_3$  y  $\Delta T_4$  considerándose los efectos principales, las interacciones dobles, triples y cuádruples. El modelo estadístico asociado a un diseño factorial  $2^k$ , dónde el incremento de la temperatura, respuesta  $Y$ , puede describirse mediante el modelo de efectos dados por:

#### Modelo estadístico:

$$\begin{aligned}
 Y_{ijklm} = & \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + \delta_m + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ik} + (\alpha\delta)_{im} + (\beta\gamma)_{jk} + \\
 & (\beta\delta)_{jm} + (\gamma\delta)_{km} + \\
 & (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + (\beta\gamma\delta)_{jkm} + \\
 & (\alpha\beta\delta)_{ijm} + (\alpha\gamma\delta)_{ikm} + \\
 & (\alpha\beta\gamma\delta)_{ijklm} + \epsilon_{ijklm}
 \end{aligned} \tag{2-10}$$

$\mu$ , es la media general

$\alpha_i$ , es el efecto del nivel  $i$ -ésimo del factor Presión

$\beta_j$ , es el efecto del nivel  $j$ -ésimo del factor Posición

$\gamma_k$ , es el efecto del nivel  $k$ -ésimo del factor Uso

$\delta_m$ , es el efecto del nivel  $m$ -ésimo del factor Carga

$(\alpha\gamma)_{ik}, (\alpha\delta)_{im}, (\beta\gamma)_{jk}, (\beta\delta)_{jm}$ , representan las interacciones dobles (de dos factores) entre los niveles  $ij, im, jk, jm$  respectivamente

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}, (\beta\gamma\delta)_{jkm}, (\alpha\beta\delta)_{ijm}, (\alpha\gamma\delta)_{ikm}$  representan las interacciones triples (de tres factores) entre los niveles  $ijk, jkm, ijm, ikm$  respectivamente

$(\alpha\beta\gamma\delta)_{ijkl}$  es el efecto de la interacción de la combinación de  $ijkl$

$\epsilon_{ijkl}$ , es el error aleatorio en la combinación  $ijkl$

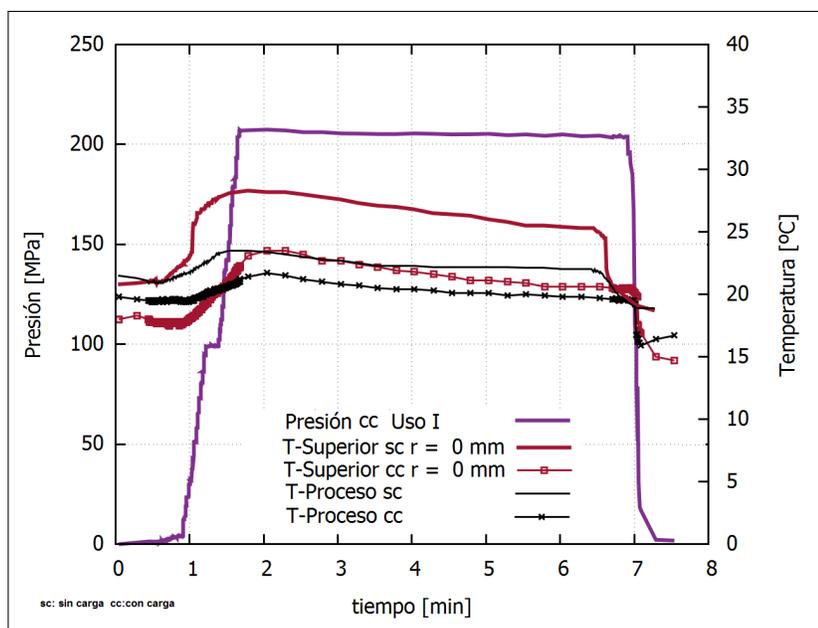
con  $i=1;2, j=1;2, k=1;2, m=1;2$

$l = (1;..n)$ , y  $n$  el número de observaciones (48)

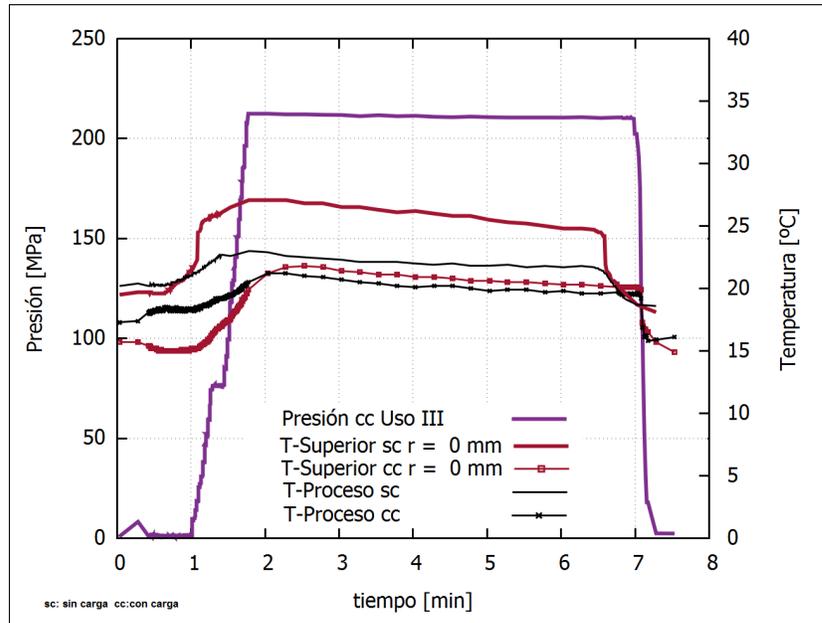
Resultados correspondientes de la distribución de temperatura del fluido de presurización en el interior de la canasta del equipo de APH con carga y sin carga

### Evaluación de curvas experimentales

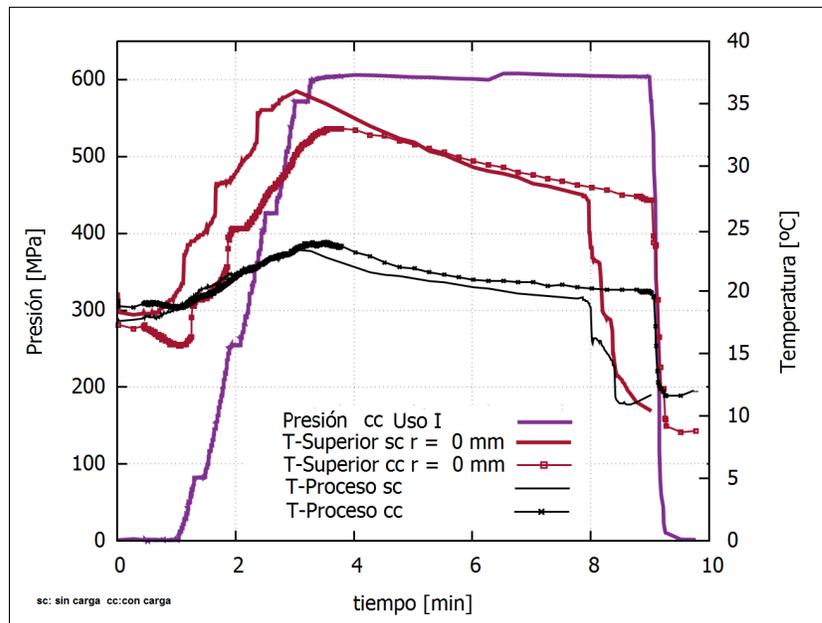
A partir de las curvas obtenidas de evolución térmica del fluido de presurización según las diferentes posiciones evaluadas, se estimaron los parámetros para las dos presiones evaluadas (200 y 600 MPa) para el Uso I y III del equipo de APH. Se muestran a continuación las curvas comparadas y ensambladas para 200 MPa y 600 MPa bajo las condiciones ensayadas sin carga y con carga en la canasta metálica interna del equipo. Las curvas complementarias se encuentran en el Anexo Experimental.



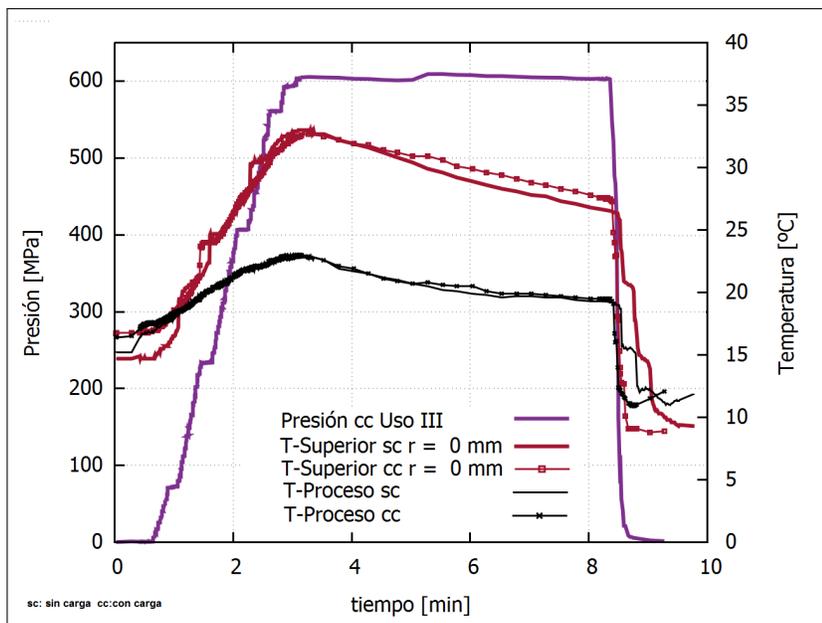
**Figura 2-46:** Curvas experimentales comparadas a 200 MPa durante el Uso I en condición con y sin carga



**Figura 2-47:** Curvas experimentales comparadas a 200 MPa durante el Uso III en condición con y sin carga

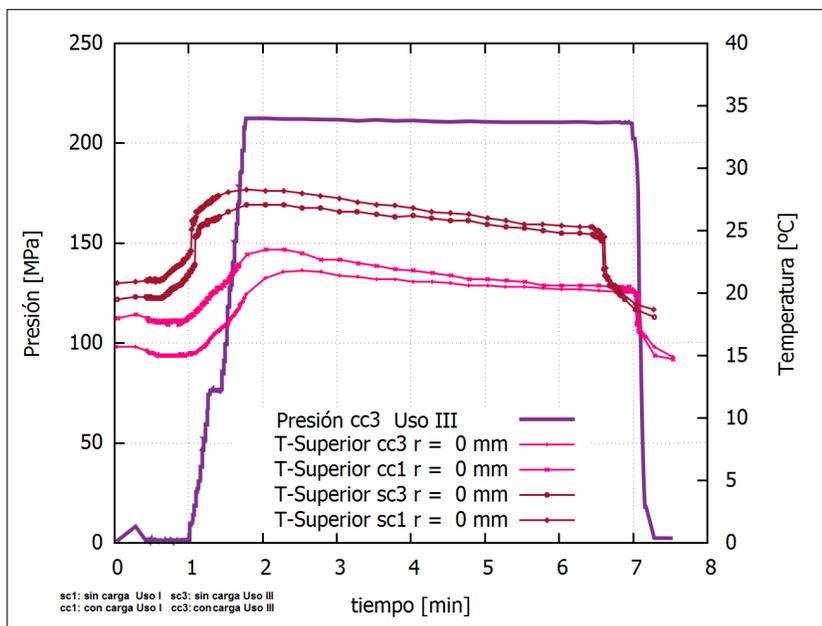


**Figura 2-48:** Curvas experimentales comparadas a 600 MPa durante el Uso I en condición con y sin carga

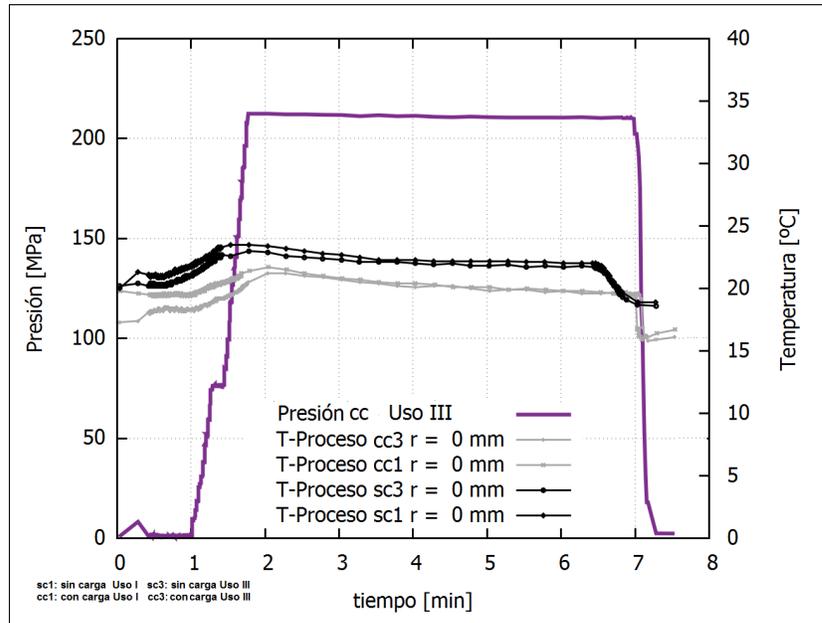


**Figura 2-49:** Curvas experimentales comparadas a 600 MPa durante el Uso III en condición con y sin carga

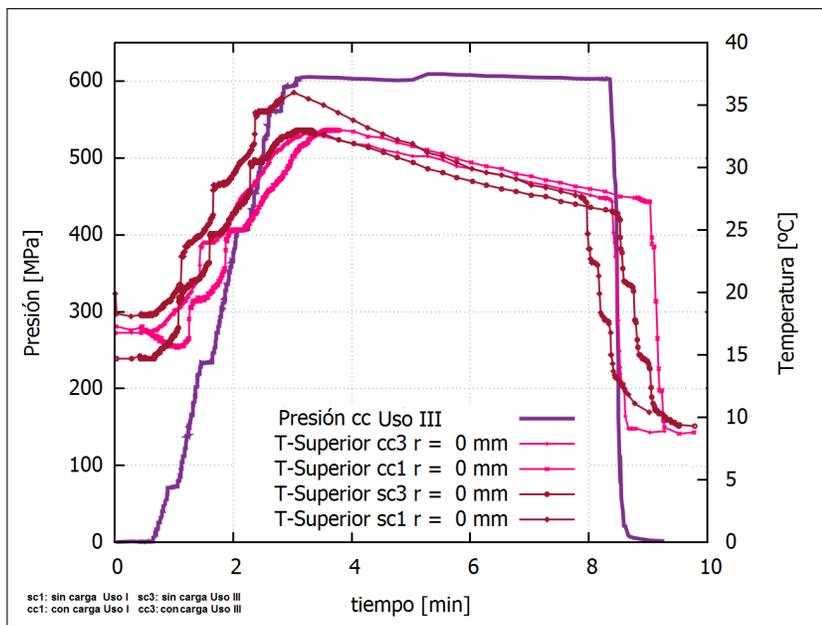
En esta instancia, se graficaron en forma ensamblada de las posiciones T-Superior  $r=0$  mm y T-Proceso en cada presión evaluada y para diferentes usos del equipo de APH.



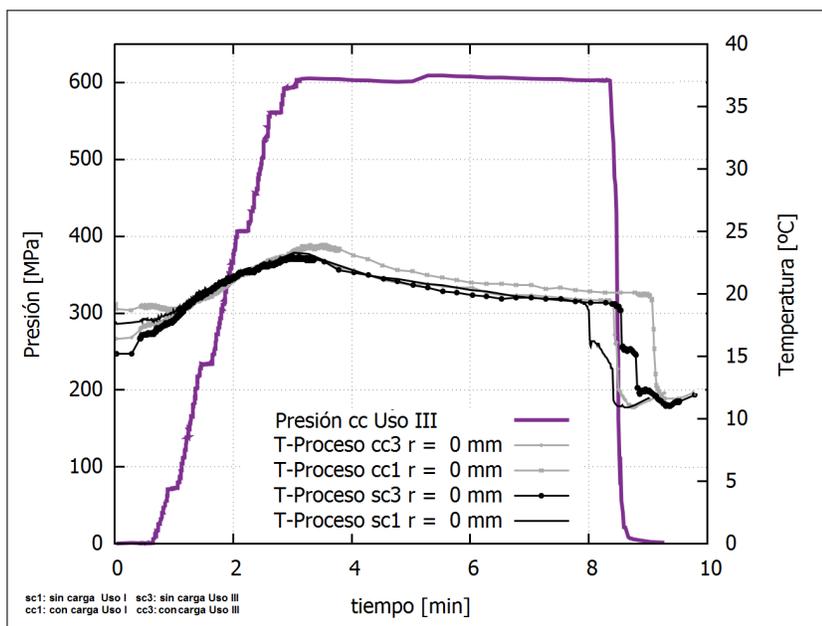
**Figura 2-50:** Curvas experimentales comparadas a 200 MPa en condición con y sin carga para T-Superior



**Figura 2-51:** Curvas experimentales comparadas a 200 MPa en condición con y sin carga para T-Proceso



**Figura 2-52:** Curvas experimentales comparadas a 600 MPa en condición con y sin carga para T-Superior



**Figura 2-53:** Curvas experimentales comparadas a 600 MPa durante en condición con y sin carga para T-Proceso

**Cálculo del incremento de temperatura en el fluido de presurización  $\Delta T_1$** 

Los resultados del ANOVA, ( $\alpha = 0,05$ ), se presentan en la Tabla **2-5**, resultando estadísticamente significativas a las interacciones dobles y los factores principales: Presión, Posición, Uso y Carga.

**Tabla 2-5:** ANOVA para el parámetro  $\text{Ln } \Delta T_1$  \* de la Etapa 3

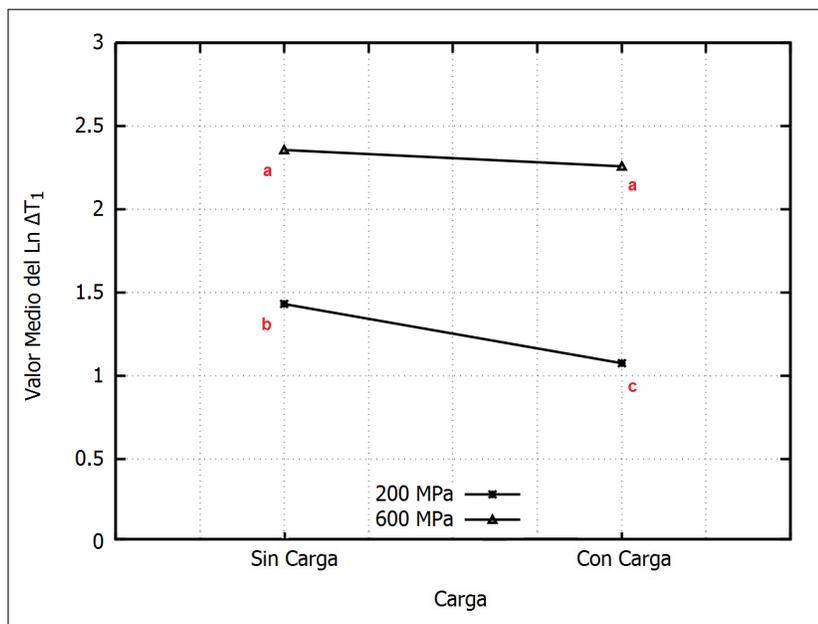
Factores	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrática	Valor F	p - Valor
Presión	1	13,152	13,152	378,353	$\leq 2 \times 10^{-16}$
Posición	1	8,880	8,880	255,45	$\leq 2 \times 10^{-16}$
Uso	1	0,411	0,411	11,816	$1,60 \times 10^{-4}$
Carga	1	0,580	0,580	16,695	$2,75 \times 10^{-4}$
Presión:Posición	1	0,006	0,006	0,172	0,681
Presión:Uso	1	0,047	0,047	1,345	0,254
Posición:Uso	1	0,683	0,683	19,636	$1,03 \times 10^{-4}$
Carga:Presión	1	0,219	0,219	6,297	$1,733 \times 10^{-4}$
Carga:Posición	1	0,068	0,068	1,963	0,171
Carga:Uso	1	0,018	0,018	0,514	0,479
Presión:Posición:Uso	1	0,07	0,07	2,021	0,164
Carga:Presión:Posición	1	0,003	0,003	0,079	0,781
Carga:Presión:Uso	1	0,007	0,007	0,189	0,667
Carga:Posición:Uso	1	0,05	0,05	1,429	0,241
Carga:Presión:Posición:Uso	1	0,093	0,093	2,663	0,112
Residuos	32	1,112	0,035		

\*Se interpreta como incremento de temperatura.

Los datos del parámetro  $\Delta T_1$ , [°C] debieron ser transformados por el logaritmo natural para satisfacer los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianza. Se destaca que dentro de cada figura han sido señaladas las distintas letras las cuales indican diferencias significativas.

La incorporación de un cilindro de ágar en la canasta metálica por cada uso consecutivo del equipo APH representó a la carga de la canasta y del cilindro. En relación al efecto de

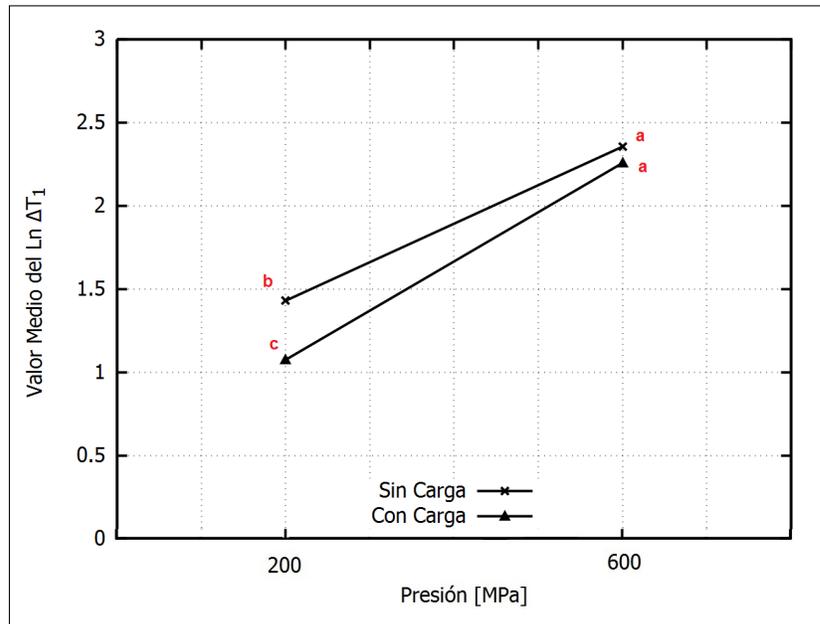
la carga de la canasta metálica del equipo APH, al mayor nivel de presión evaluado (600 MPa) no se encontraron diferencias significativas respecto de la carga (Figura 2-54). En el caso del tratamiento a 200 MPa, se observa en la misma Figura 2-54, que los incrementos de temperatura en el fluido fueron inferiores a las correspondientes a 600 MPa (ver Figuras del Anexo Experimental correspondiente a la Etapa 3). A su vez, se observa que a 200 MPa el incremento de temperatura en la condición sin carga resultó superior a la condición con carga, (ver Figuras 2-46 y 2-47 de evoluciones térmicas como ejemplo de lo mencionado). La diferencia en el efecto observado a 200 MPa respecto a 600 MPa se debería a que el factor presión tiene al nivel más alto (600 MPa) una mayor preponderancia frente al factor carga.



**Figura 2-54:** Interacciones entre los factores Carga y Presión para el parámetro  $\Delta T_1$  de la Etapa 3

La Figura 2-55 representa la interacción del factor Presión y del factor Carga. Nuevamente, se evidenció que el incremento de temperatura aumentó con el nivel de presión de trabajo. A 600 MPa no se encontraron diferencias significativas del incremento de temperatura respecto

de la carga. A su vez, en el caso del tratamiento a 200 MPa, el incremento de temperatura del fluido en la condición sin carga resultó superior al correspondiente a la condición con carga, (ver Figuras 2-46 y 2-47 de evoluciones térmicas como ejemplo de lo mencionado).

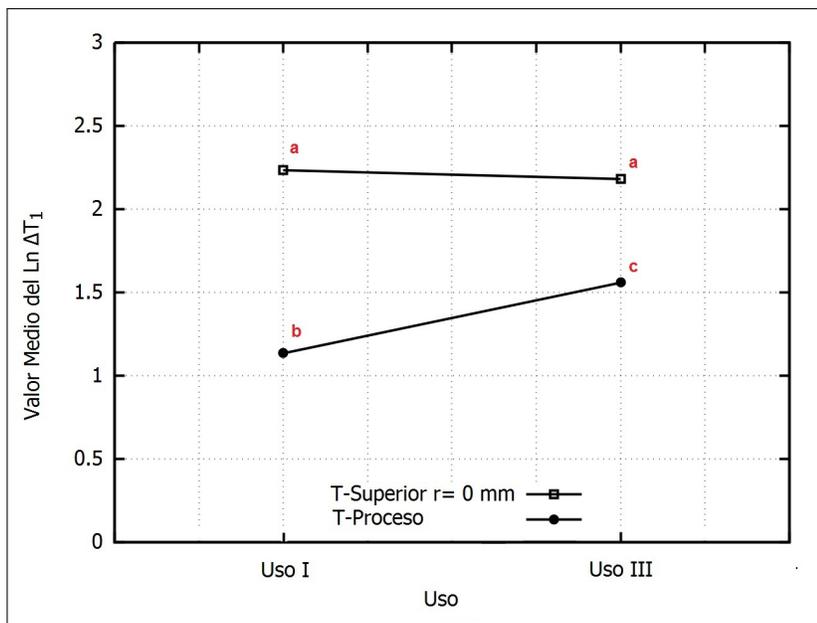


**Figura 2-55:** Interacciones entre los factores Presión y Carga para el parámetro  $\Delta T_1$  de la Etapa 3

En las siguientes Figuras 2-56 y 2-57 se presentan el estudio de los factores Uso y Posición y su interacción.

En particular, se observó para el factor Uso dentro del factor Posición (Figura 2-56) que el incremento de temperatura del fluido aumentó conforme al Uso, indicando un mayor valor para el Uso III en la posición evaluada de ingreso del fluido (T-Proceso).

Mientras que para la posición T-Superior  $r=0$  mm no se observaron diferencias significativas respecto al mismo factor. Para el equipo APH utilizado en estos estudios, este resultado confirmaría que la posición superior centrada siempre presentará el mayor incremento de temperatura al igual de lo demostrado en la Etapa 1 (para la condición sin carga).

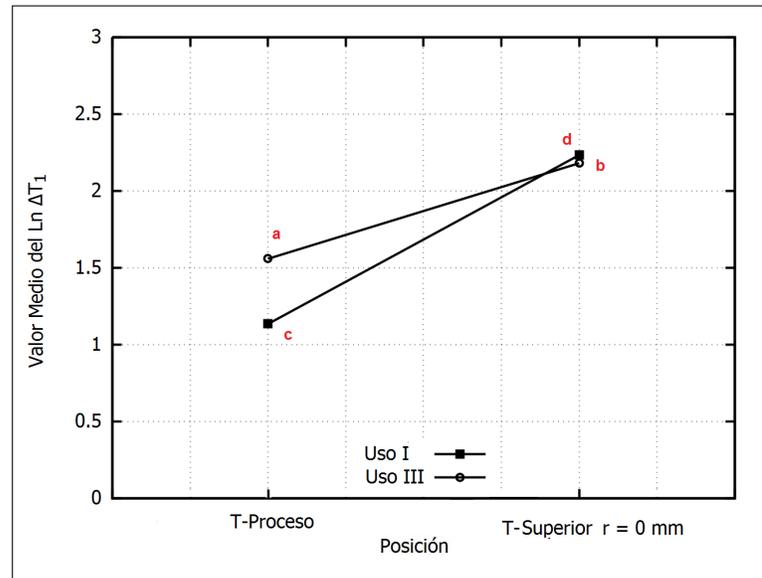


**Figura 2-56:** Interacciones entre los factores Uso y Posición para el parámetro  $\Delta T_1$

A su vez cuando se analizó el factor Posición dentro del factor Uso (Figura 2-57), la posición T-Superior  $r= 0$  mm se comportó como la ubicación evaluada que mayor valor de incremento de temperatura presentó frente a la posición inferior de ingreso del fluido (T-Proceso). Es importante destacar, que el ingreso de fluido de proceso (mezcla de agua destilada y propilenglicol (70:30 v/v)) a lo largo de los usos consecutivos del equipo presentó una condición térmica inferior a  $20$  °C, además de presentarse como una zona de menor temperatura por la influencia del fluido que se enfriará a medida que desciende por la canasta metálica. Sin embargo, a medida que el equipo de APH ingresa en régimen, todo el equipo incrementa su temperatura por lo cual la diferencia térmica resultará mayor en el último Uso.

Si bien se observa el Uso III mayor al Uso I en la Figura 2-57, se destaca que el más importante el incremento de temperatura desde la posición T-Proceso hasta T-Superior durante el uso I dada su pendiente y en particular, la interacción (intrecruzamiento de

líneas), se destaca a la posición superior como relevante respecto del incremento térmico durante el procesamiento por APH en este equipo vertical de escala laboratorio, siendo mayor su incremento térmico en el Uso I respecto del III.

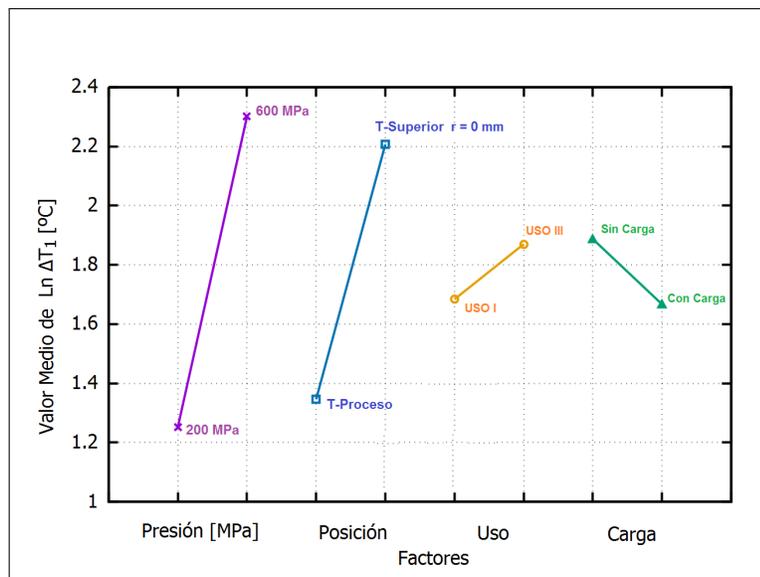


**Figura 2-57:** Interacciones entre los factores Posición y Uso para el parámetro  $\Delta T_1$  de la Etapa 3

En la Figura 2-58 se observa que los factores fijos con mayor amplitud representan una mayor influencia dentro de este estudio y en el siguiente orden: Presión, Posición, Uso y Carga del equipo, destacándose el comportamiento del factor presión. Por otro lado y recordando que el registro de temperatura correspondió al fluido de compresión, si se observan las magnitudes de los factores Uso y Carga, éstos no difieren entre sí pero si el cambio de su pendiente.

#### Cálculo del incremento de temperatura en el fluido de presurización $\Delta T_2$

En la Tabla 2-6 se presentan los resultados del análisis de varianza considerando un valor de  $\alpha = 0,05$ . Según se observa, resultaron significativas las interacciones dobles Posición\*Uso,



**Figura 2-58:** Factores fijos estudiados para el parámetro  $\Delta T_1$  de la Etapa 3

Presión\*Posición y también los efectos principales de todos los factores evaluados: Presión, Posición, Uso y Carga.

Para el análisis estadístico de los datos de  $\Delta T_2$ , [°C] debieron ser transformados por el logaritmo natural para satisfacer los supuestos de distribución normal y homogeneidad de varianza. Se destaca que dentro de cada figura han sido señaladas las distintas letras las cuales indican diferencias significativas.

Cuando se analizó el factor Posición dentro del factor Uso (Figura 2-59), para la posición T-Superior r = 0 mm se observó el mayor valor de incremento de temperatura  $\Delta T_2$  en relación a la posición inferior de ingreso del fluido (T-Proceso). Este mismo efecto se evidenció en el parámetro antes analizado  $\Delta T_1$  dentro de esta misma Etapa 3.

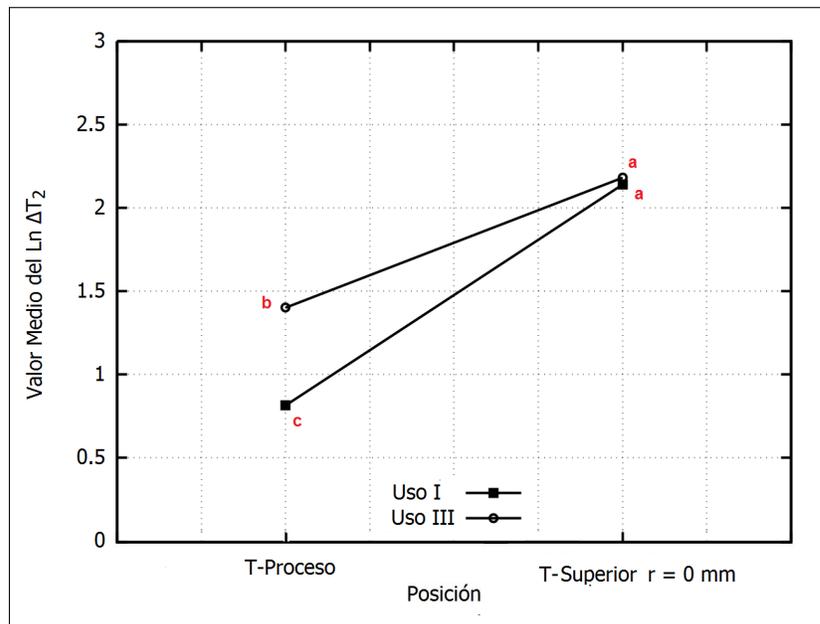
El incremento de temperatura para el caso del Uso III fue mayor que el incremento para el Uso I, se destaca nuevamente la importancia de la pendiente para el Uso I y el incremento de temperatura desde la posición T-Proceso hasta T-Superior, donde el incremento de

**Tabla 2-6:** ANOVA para el parámetro  $\text{Ln } \Delta T_2^*$  de la Etapa 3

Factores	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrática	Valor F	p Valor
Presión	1	5,606	5,606	103,242	$1,53 \times 10^{-11}$
Posición	1	14,244	14,244	262,343	$\leq 2 \times 10^{-16}$
Uso	1	1,475	1,475	27,170	$1,07 \times 10^{-5}$
Carga	1	0,433	0,433	7,976	$8,09 \times 10^{-4}$
Presión:Posición	1	0,250	0,250	4,613	0,0394
Presión:Uso	1	0,094	0,094	1,736	0,197
Posición:Uso	1	1,155	1,155	21,281	$6,10 \times 10^{-5}$
Carga:Presión	1	0,007	0,007	0,126	0,725
Carga:Posición	1	0,202	0,202	3,711	0,062
Carga:Uso	1	0,098	0,098	1,806	0,188
Presión:Posición:Uso	1	0,063	0,063	1,164	0,289
Carga:Presión:Posición	1	0,215	0,215	3,962	0,055
Carga:Presión:Uso	1	0,077	0,077	1,427	0,242
Carga:Posición:Uso	1	0,002	0,002	0,033	0,856
Carga:Presión:Posición:Uso	1	0,026	0,026	0,476	0,495
Residuos	32	1,738	0,054		

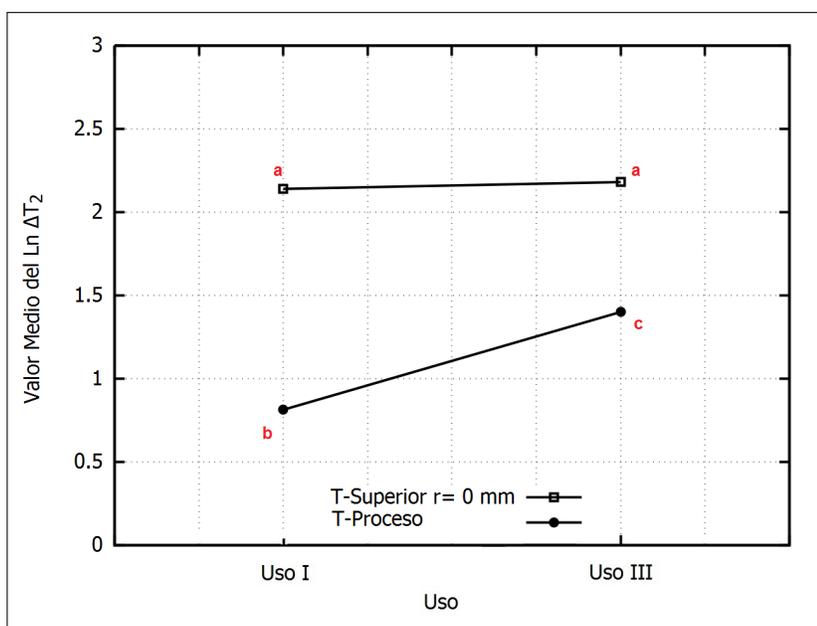
\*Se interpreta como incremento de temperatura.

temperatura para ambos Usos fue similar.



**Figura 2-59:** Interacciones entre los factores Posición y Uso para el parámetro  $\Delta T_2$  de la Etapa 3

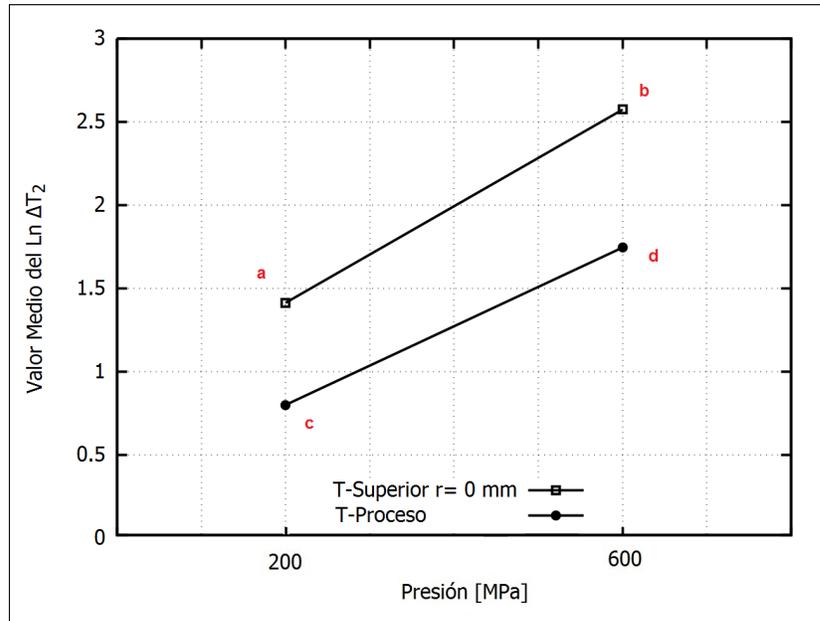
Como en el caso del parámetro  $\Delta T_1$ , se observó que para el factor Uso dentro del factor Posición (Figura 2-60) el incremento  $\Delta T_2$  aumentó conforme al Uso, presentando un valor significativamente mayor para el Uso III en la posición correspondiente al ingreso del fluido (T-Proceso). Mientras que para la posición T-Superior  $r = 0$  mm no se observaron diferencias significativas respecto al factor Uso. Como se concluyó para el parámetro  $\Delta T_1$ , en el caso del equipo APH utilizado en estos estudios, este resultado confirmaría que la posición superior centrada siempre presentará el mayor incremento de temperatura.



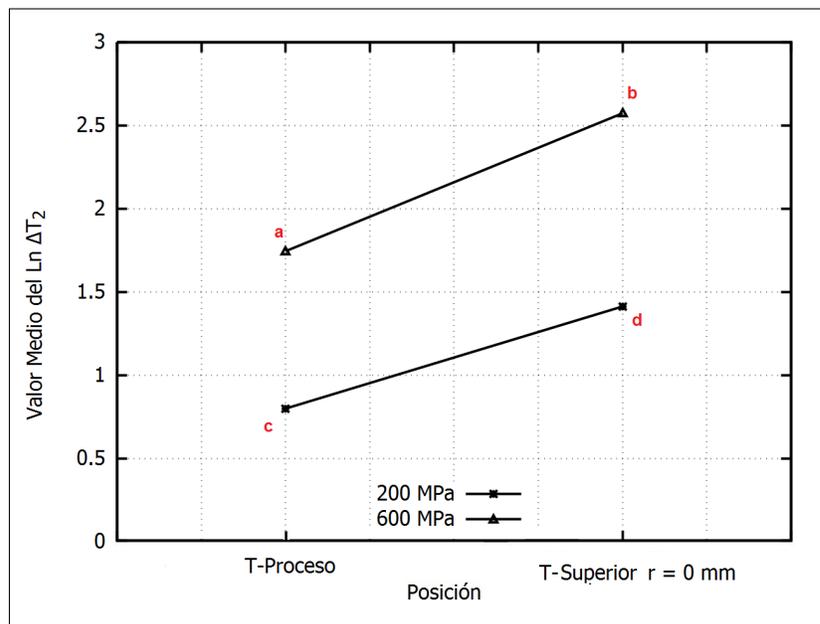
**Figura 2-60:** Interacciones entre los factores Uso y Posición para el parámetro  $\Delta T_2$  de la Etapa 3

En las Figuras 2-61 y 2-62, correspondientes a la interacción Presión\*Posición en ambos Usos, se observó que el aumento del nivel de presión determinó el aumento del parámetro  $\Delta T_2$ , destacándose la posición T-Superior  $r = 0$  mm como aquella en la cual se produce el mayor incremento de temperatura en el fluido.

En la Figura 2-63 se observa que los factores fijos con mayor amplitud representan una mayor



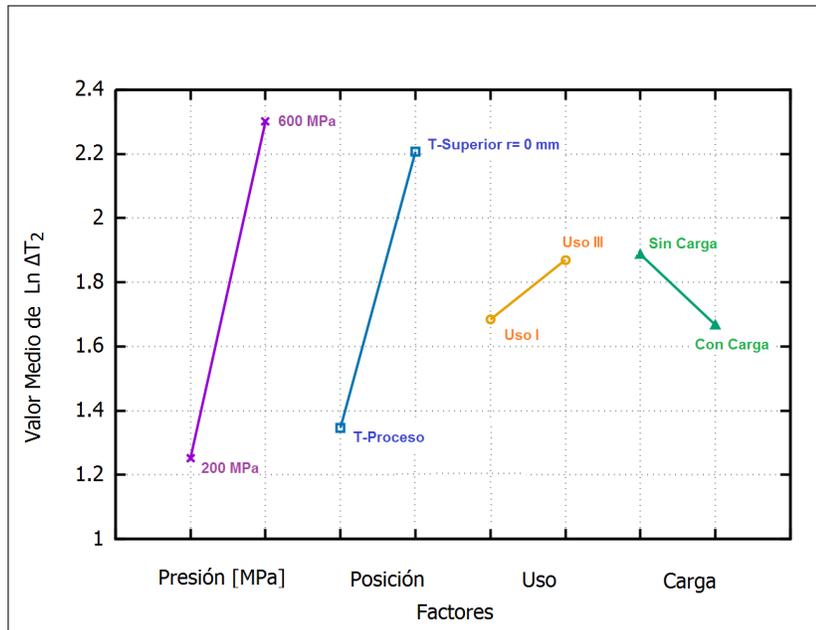
**Figura 2-61:** Interacciones entre los factores Presión y Posición para el parámetro  $\Delta T_2$  de la Etapa 3



**Figura 2-62:** Interacciones entre los factores Posición y Presión para el parámetro  $\Delta T_2$  de la Etapa 3

influencia sobre el parámetro  $\Delta T_2$  y en el siguiente orden: Presión, Posición, Uso y Carga del equipo. Su efecto sobre  $\Delta T_2$  se incrementa conforme aumenta su magnitud, destacándose el

comportamiento de los factores Presión y Posición. Por otro lado y recordando que el registro de temperatura correspondió al fluido de compresión, si se observan las magnitudes de los factores Uso y Carga, no difieren entre sí pero si el cambio de su pendiente.



**Figura 2-63:** Factores fijos estudiados para el parámetro  $\Delta T_2$  de la Etapa 3

**Cálculo del incremento de temperatura en el fluido de presurización  $\Delta T_3$** 

Para el análisis estadístico del parámetro  $\Delta T_3$ , [°C], se utilizó el valor absoluto de los resultados, ya que este parámetro involucra el comportamiento del fluido de presurización durante la etapa de mantenimiento de la presión.

En la Tabla 2-7 se presentan los resultados del análisis del ANOVA de los datos correspondientes al parámetro  $\Delta T_3$ .

**Tabla 2-7:** ANOVA para el parámetro  $\Delta T_3$  de la Etapa 3

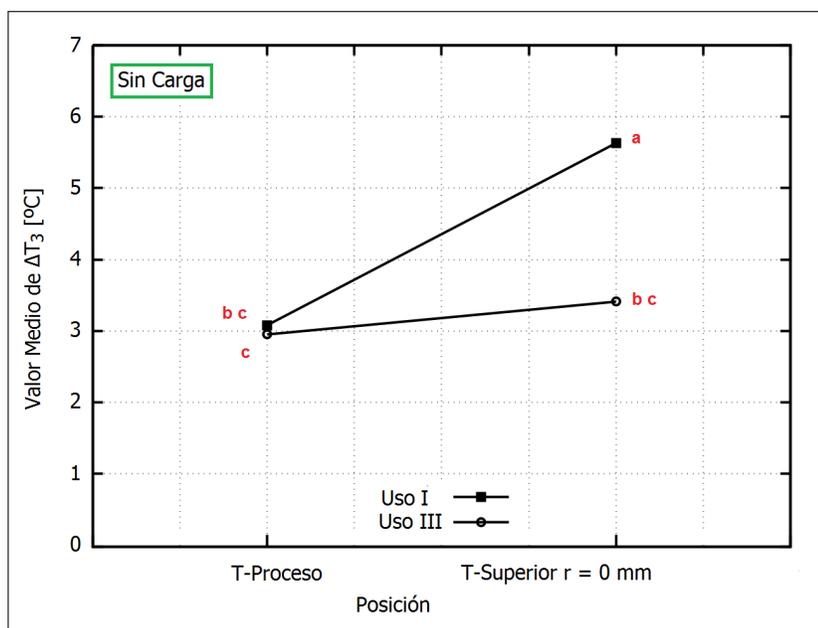
Factores	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrática	Valor F	p Valor
Presión	1	165,58	165,58	289,69	$\geq 2 \times 10^{-16}$
Posición	1	15,7	15,7	122,27	$1,83 \times 10^{-12}$
Uso	1	9,95	9,95	77,47	$4,67 \times 10^{-10}$
Carga	1	9,14	9,14	71,22	$1,21 \times 10^{-9}$
Presión:Posición	1	18,32	18,32	142,65	$2,48 \times 10^{-13}$
Presión:Uso	1	0,41	0,41	3,21	0,0825
Posición:Uso	1	3,83	3,83	29,79	$5,23 \times 10^{-6}$
Carga:Presión	1	2,06	2,06	16,06	$3,42 \times 10^{-5}$
Carga:Posición	1	1,56	1,56	12,14	$1,452 \times 10^{-4}$
Carga:Uso	1	0,81	0,81	6,33	$1,701 \times 10^{-3}$
Presión:Posición:Uso	1	0,69	0,69	5,36	$2,71 \times 10^{-3}$
Carga:Presión:Posición	1	7,09	7,09	55,23	$1,86 \times 10^{-8}$
Carga:Presión:Uso	1	2,78	2,78	21,64	$5,44 \times 10^{-5}$
Carga:Posición:Uso	1	1,22	1,22	9,49	$4,21 \times 10^{-4}$
Carga:Presión:Posición:Uso	1	0,36	0,36	2,79	0,104
Residuos	32	4,11	0,13		

Para un nivel de significación ( $\alpha$ ) de 0,05, resultaron significativas todas las interacciones triples, las interacciones dobles y todos factores fijos. Es importante, destacar que si comparamos las medias del parámetro  $\Delta T_3$  y su desvío estándar: sin carga ( $-3,76 \pm 2,63$  °C) y con carga ( $-2,89 \pm 1,80$  °C), la caída de temperatura del fluido de compresión es mayor en valor absoluto en el equipo en condición de canasta vacía.

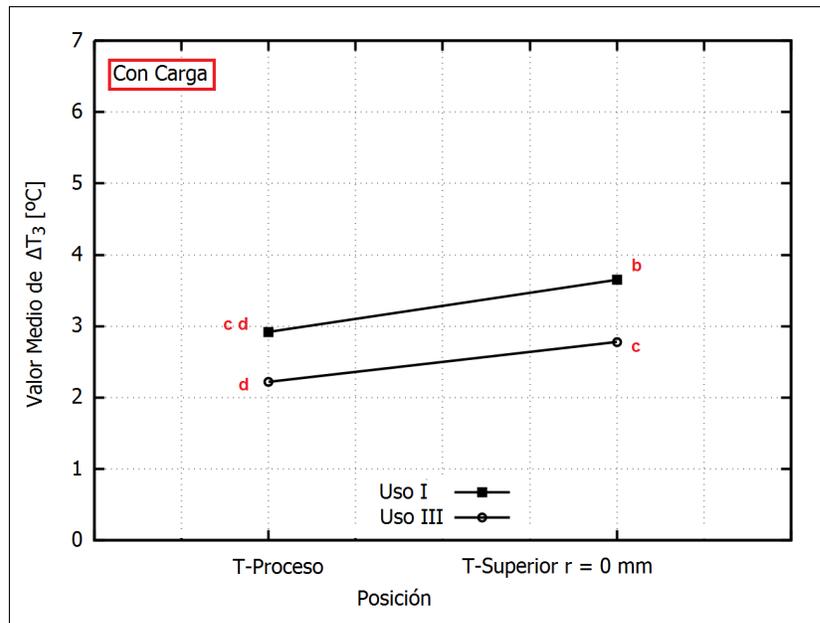
La interpretación de los resultados de este parámetro se basará en función de las interacciones, debido a que se encontraron diferencias significativas. Se destaca que dentro de cada figura se han sido señaladas distintas letras, las cuales indican diferencias significativas.

### Interacción: Carga-Posición-Uso

Si se observa la Figura 2-64 para la interacción Carga\*Posición\*Uso; se analizaron ambos niveles; encontrándose que el mayor descenso de temperatura se obtiene en la posición T-Superior para el equipo sin carga (5,63 °C) en el Uso I, resultando similares pero con el equipo en condición de carga (3,65 °C). En ambos casos el descenso de temperatura es más importante en la posición T-Superior respecto a T-proceso y con el primer uso se obtiene valores más altas, ver Figuras 2-64 y 2-65 Del análisis de los valores medios mediante el test de Tukey con un nivel de significancia del 5%, se obtuvo para la T-Superior el valor medio más alto, siendo estadísticamente significativo frente al resto.



**Figura 2-64:** Interacción Carga-Posición-Uso en la condición sin carga del parámetro  $\Delta T_3$  de la Etapa 3

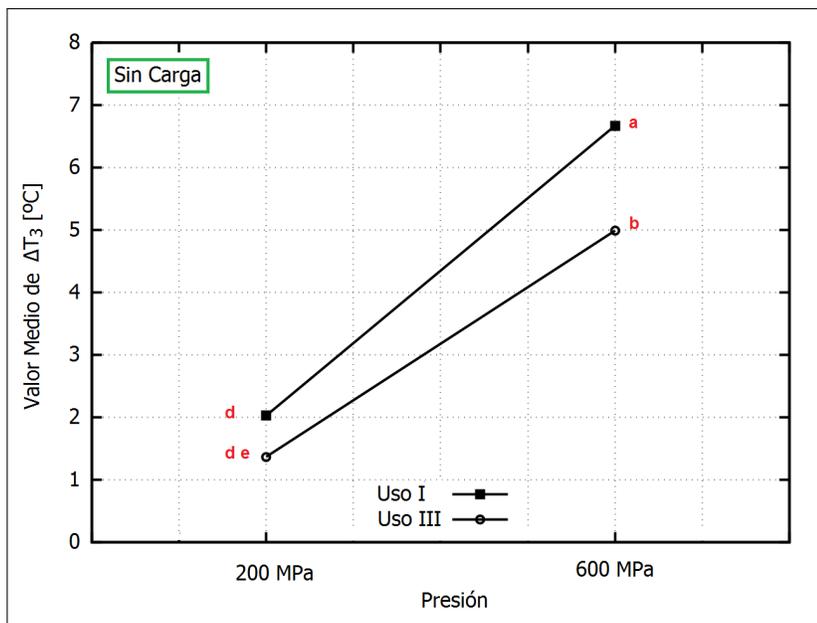


**Figura 2-65:** Interacción Carga-Posición-Uso en la condición con carga del parámetro  $\Delta T_3$  de la Etapa 3

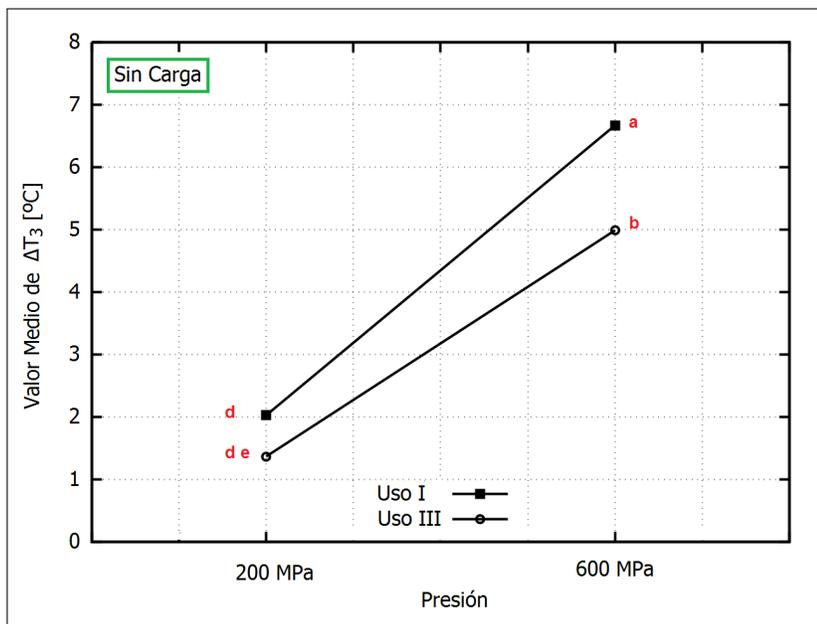
#### Interacción: Carga-Presión-Uso

Las Figuras y presentan los resultados de la interacción Carga\*Presión\*Uso analizadas para ambos niveles de carga. Del análisis de los valores medios mediante el test de Tukey con un nivel de significancia del 5 %, se obtuvo para la condición de procesamiento del equipo a 600 MPa , en el Uso I y sin carga el valor medio más alto para la posición T-Superior, siendo estadísticamente muy significativo frente al resto. Se observa además para la condición con carga, se obtuvieron pendientes paralelas para ambos usos ensayados, asemejándose el Uso III sin carga al Uso I con carga.

**Interacción: Carga-Presión-Posición** Las Figuras 2-68 y 2-69 representan el análisis de la interacción Carga\*Presión\*Posición. Del análisis de los valores medios mediante el test de Tukey con un nivel de significancia del 5 %, se obtuvo para la condición de procesamiento del



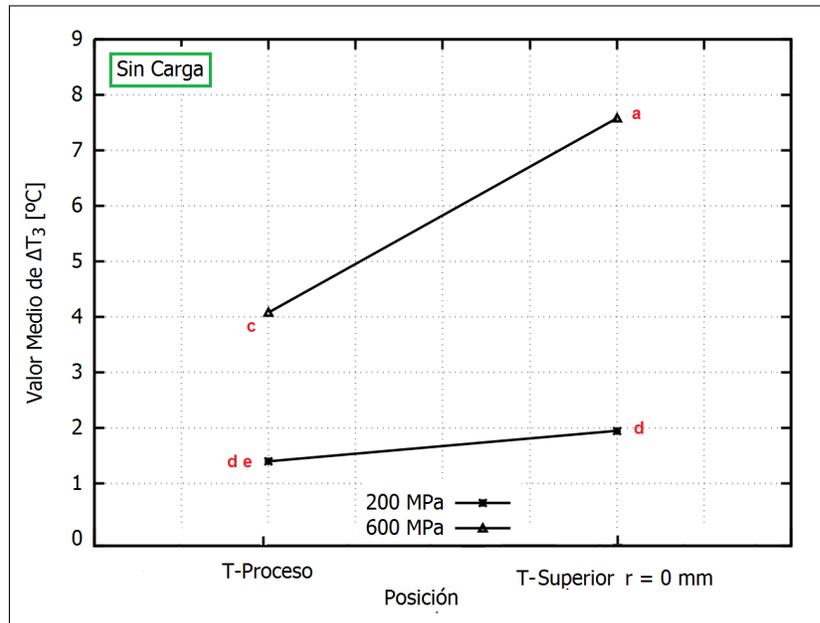
**Figura 2-66:** Interacción Carga-Posición-Uso en la condición sin carga del parámetro  $\Delta T_3$  de la Etapa 3



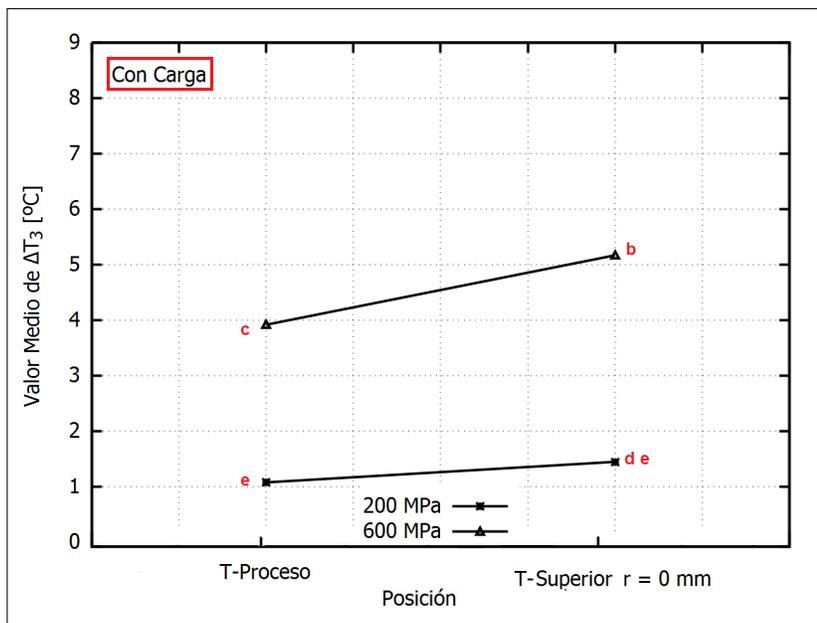
**Figura 2-67:** Interacción Carga-Presión-Uso en la condición con carga del parámetro  $\Delta T_3$  de la Etapa 3

equipo a 600 MPa, para la posición T-Superior, valores estadísticamente muy significativos frente al resto. Los valores de las medias para la condición sin carga (7,58 °C) y con carga

(5,17 °C), evidenciando en forma conjunta la preponderancia del efecto del nivel más alto de presión y posición. Para la posición T-Proceso y en las condiciones ensayadas no se evidenciaron diferencias significativas.



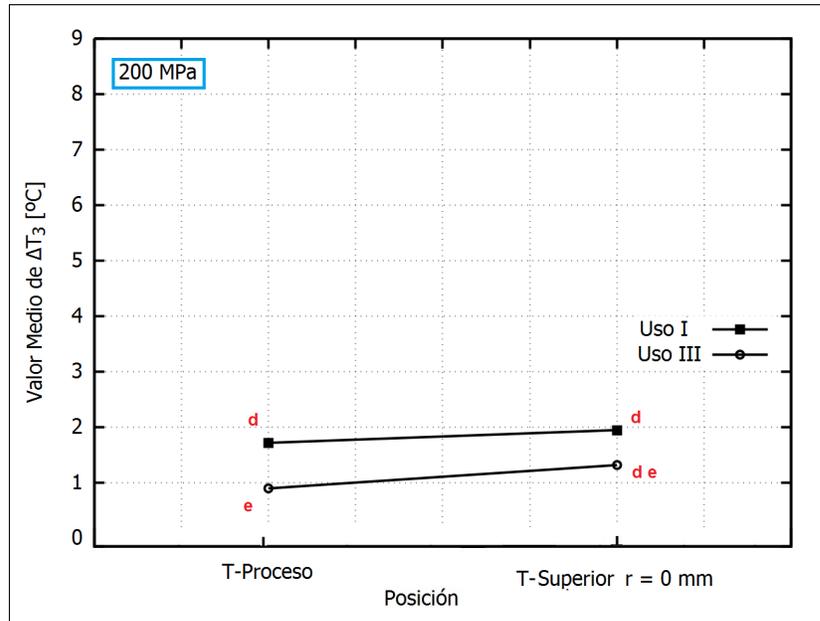
**Figura 2-68:** Interacción Carga-Presión-Posición en la condición sin carga del parámetro  $\Delta T_3$  de la Etapa 3



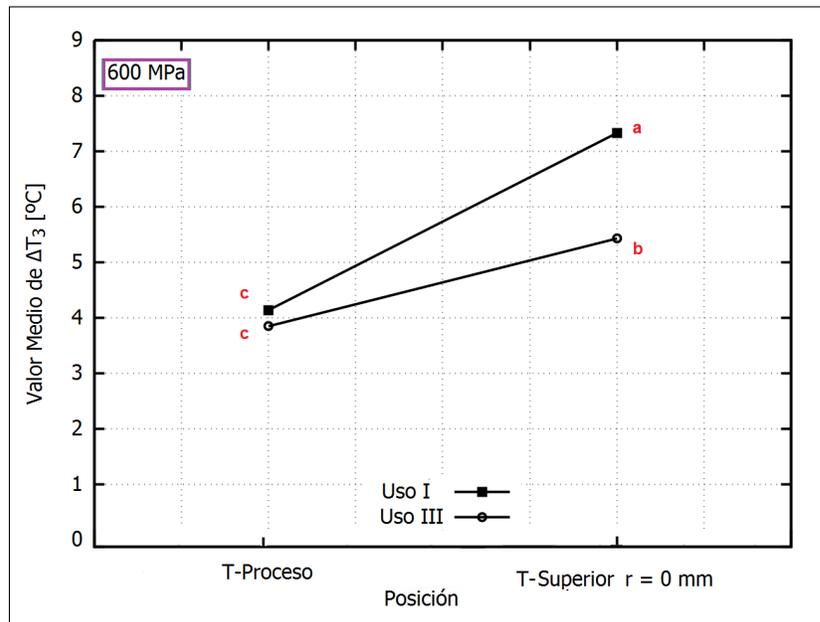
**Figura 2-69:** Interacción Carga-Presión-Posición en la condición con carga del parámetro  $\Delta T_3$  de la Etapa 3

### Interacción:Presión-Posición-Uso

Mediante el análisis de los valores medios utilizando el test de Tukey con un nivel de significancia del 5 %, se obtuvo para la condición de procesamiento del equipo a 600 MPa y para la posición T-Superior Uso I, valores estadísticamente muy significativos frente a la misma posición uso III , ver Figuras 2-70 y 2-71. A 600 MPa, en la posición T-Proceso y en las condiciones ensayadas no se evidenciaron diferencias significativas. A 200 MPa, T-Superior Uso I, presentó diferencias significativas frente a la misma posición Uso III. Tampoco, para la posición T-Proceso para las condiciones ensayadas se evidenciaron diferencias significativas.



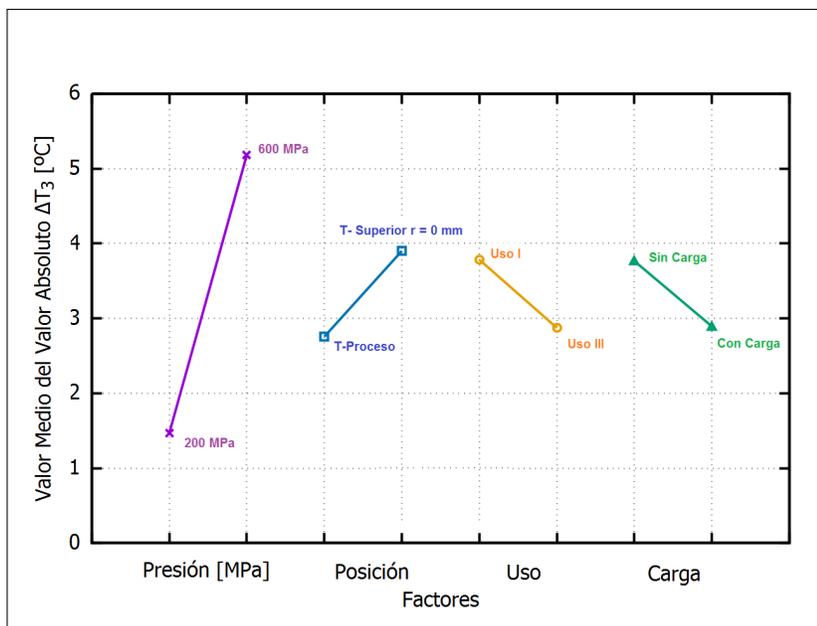
**Figura 2-70:** Interacción Presión-Posición-Uso en la condición de 200 MPa para el parámetro  $\Delta T_3$  de la Etapa 3



**Figura 2-71:** Interacción Presión-Posición-Uso en la condición de 600 MPa para el parámetro  $\Delta T_3$  de la Etapa 3

Finalmente y para continuar con la misma estructura de análisis, sin ser necesario para este parámetro, en la Figura 2-72 se observa que los factores fijos con mayor amplitud representan

una mayor influencia sobre el parámetro  $\Delta T_3$  y en el siguiente orden: Presión, Posición, Uso y Carga. Su efecto sobre  $\Delta T_3$  se incrementa conforme aumenta su magnitud, destacándose el comportamiento del factor Presión.



**Figura 2-72:** Factores fijos estudiados para el parámetro  $\Delta T_3$  de la Etapa 3

### Cálculo del incremento de temperatura en el fluido de presurización $\Delta T_4$

El análisis estadístico de los datos respecto del parámetro  $\Delta T_4$ , [°C] se presenta a continuación mediante la Tabla 2-8 de análisis del ANOVA, para un nivel de significación de  $\alpha$  de 0,05. Se utilizó el valor absoluto de los datos, ya que este parámetro involucra el comportamiento del fluido de presurización durante la etapa de mantenimiento de la presión.

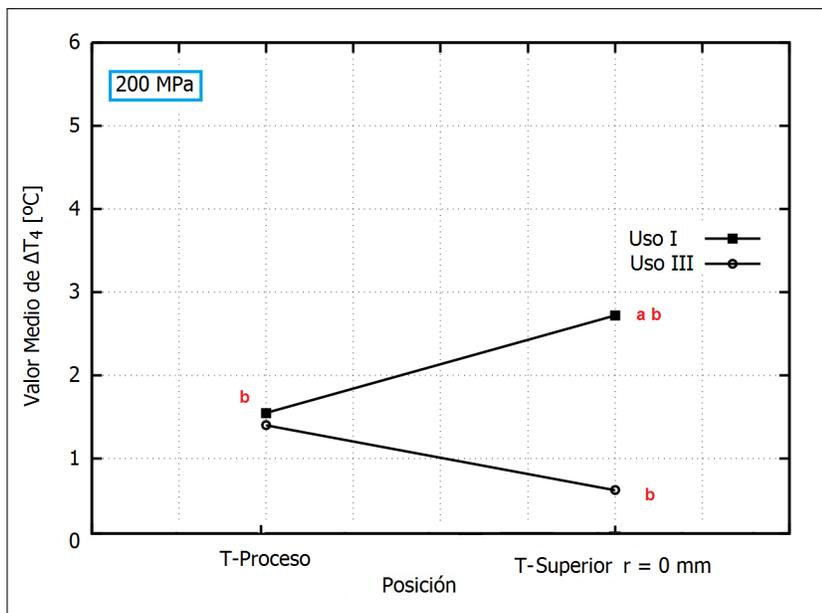
En este estudio resultaron significativas la interacción triple Presión\*Posición\*Uso, las interacciones dobles Carga\*Uso y Presión\*Uso y por último los factores fijos: Presión y Posición.

Las Figuras 2-73 y 2-74 representan a la interacción Presión\*Posición\*Uso analizadas para

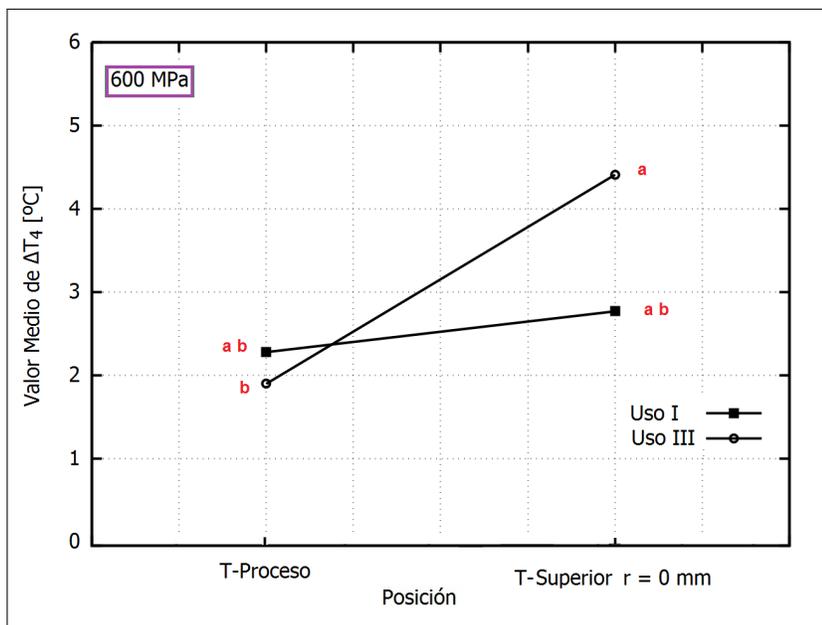
**Tabla 2-8:** ANOVA para el parámetro  $\Delta T_4$  de la Etapa 3

Factores	Grados de Libertad	Suma de Cuadrados	Media Cuadrática	Valor F	p-Valor
Presión	1	19,25	19,253	10,871	$2,4 \times 10^{-4}$
Posición	1	8,585	8,585	4,847	$3,50 \times 10^{-3}$
Uso	1	0,725	0,725	0,409	0,527
Carga	1	0,608	0,608	0,343	0,5622
Presión:Posición	1	5,135	5,135	2,899	0,0983
Presión:Uso	1	9,275	9,275	5,237	$2,89 \times 10^{-3}$
Posición:Uso	1	0,003	0,003	0,002	0,9657
Carga:Presión	1	0,333	0,333	0,188	0,6673
Carga:Posición	1	0,060	0,060	0,034	0,8549
Carga:Uso	1	9,100	9,100	5,138	<b>0,0303</b>
Presión:Posición:Uso	1	11,801	11,801	6,663	<b>0,0146</b>
Carga:Presión:Posición	1	0,092	0,092	0,052	0,8213
Carga:Presión:Uso	1	0,385	0,385	0,217	0,6441
Carga:Posición:Uso	1	3,413	3,413	1,927	0,1747
Carga:Presión:Posición:Uso	1	2,168	2,168	1,224	0,2769
Residuos	32	56,68	1,771		

ambos niveles. Del análisis de los valores medios mediante el test de Tukey con un nivel de significancia del 5%. A 600 MPa y durante el Uso III, la posición T-Superior obtuvo un mayor incremento de temperatura (4,41 °C) respecto del ingreso de fluido. Se observó un comportamiento opuesto a 600 MPa y 200 MPa respecto de los usos y posiciones. A baja presión el valor del parámetro  $\Delta T_4$  desciende desde la posición T-Proceso a T-Superior en ambos usos. En cambio, a 600 MPa se obtuvo una tendencia positiva desde T-Proceso y con una mayor pendiente, hacia T-Superior. Asimismo, se observó la interacción (entrecruzamiento), siendo  $\Delta T_4$  mayor en el Uso III frente al Uso I para las posiciones evaluadas.

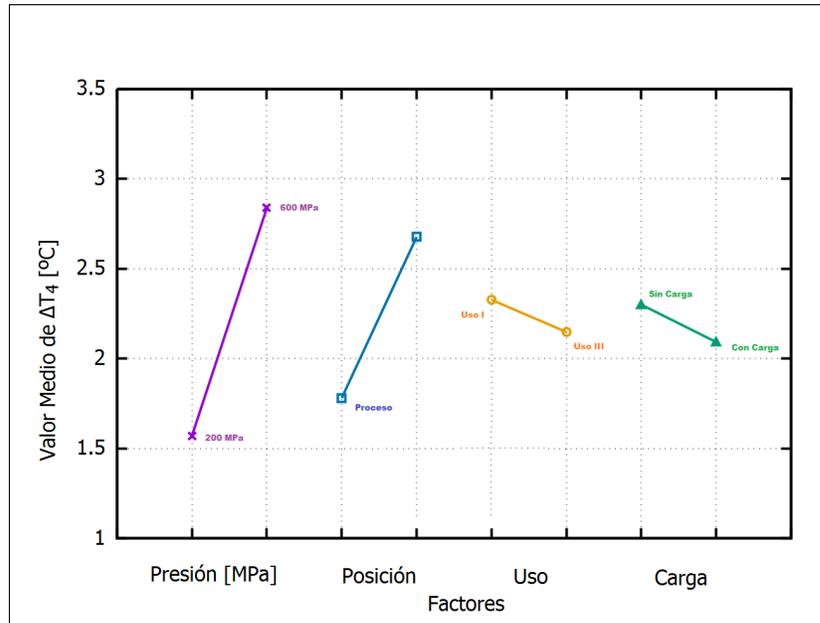


**Figura 2-73:** Interacción Presión-Posición-Uso en la condición de 200 MPa para el parámetro  $\Delta T_4$  de la Etapa 3



**Figura 2-74:** Interacción Presión-Posición-Uso en la condición de 600 MPa para el parámetro  $\Delta T_4$  de la Etapa 3

Se presentan a continuación los factores estudiados y sus magnitudes mediante la Figura 2-75, en este caso resultaron significativos los factores Presión y Posición.



**Figura 2-75:** Factores fijos estudiados para el parámetro  $\Delta T_4$  de la Etapa 3

### Aspectos generales del efecto carga

Los autores Ting y otros (2002) y Otero y otros (2000) describieron el efecto de la carga completa del canasto/cilindro sobre el perfil térmico del fluido de compresión y del alimento durante procesamiento con APH. En particular destacan el efecto de las etapas de compresión y descompresión donde se observaron tanto un aumento (compresión) y una disminución (descompresión) de la temperatura tanto en la muestra sólida como en el fluido de compresión debido al trabajo de compresión/expansión. La magnitud y el signo de estos incrementos de temperatura se manifiestan en forma diferente en el alimento y en el fluido de compresión, dependiendo de la composición de la muestra y del fluido, del nivel de presión, de las condiciones térmicas (temperatura inicial y acondicionamiento) y de las velocidades de compresión y descompresión, entre otras. Si el fluido de proceso desarrolla un calentamiento por compresión mucho mayor/menor que el alimento, entonces el fluido calentará/enfriará

el alimento durante el tratamiento con APH. Este efecto térmico diferencial puede afectar la inactivación requerida de microorganismos y enzimas y producir efectos no deseados en la calidad nutricional y sensorial del alimento.

A su vez, los alimentos sólidos tratados con APH también pueden ser influenciados por la convección natural del fluido de compresión inducida durante el tratamiento con APH. Los investigadores Otero y otros (2000), estudiaron los fenómenos de transferencia de calor y masa durante el tratamiento con APH a 350 MPa, utilizando agua como fluido de compresión, con una temperatura inicial de 20 °C. El estudio contempló el efecto del llenado del cilindro de alta presión introduciendo muestras de agar de diferentes tamaños (grande de 0,09 m de diámetro x 0,18 m de largo y pequeño de 0,04 m de diámetro x 0,15 m de largo), considerando dos situaciones: factor de llenado del 71,3 % o del 11,8 % del volumen del cilindro de alta presión. Otero y otros (2000), informaron sobre la influencia relativa del flujo convectivo del fluido de proceso, al finalizar la etapa de compresión, sobre el perfil térmico de las muestras de agar de dos tamaños diferentes. Para el caso del agar de mayor tamaño, correspondiente a 71,3 % de llenado, el aumento de temperatura registrado en el interior del sólido (al finalizar la compresión) fue de  $9,5 \pm 0,03$  °C y en su superficie fue de  $4,9 \pm 0,3$  °C. El calor generado en la superficie de la muestra durante la compresión evacuaría más rápido debido a la proximidad de la muestra a la pared metálica del cilindro refrigerado. A su vez, para el agar de menor tamaño, el aumento máximo de temperatura de  $9,2 \pm 0,03$  °C en el centro de la muestra y  $8,1 \pm 0,05$  °C en la superficie. En este caso, la diferencia en el incremento de temperatura, entre la superficie y el centro de la muestra (al finalizar la compresión) fue menor que en el caso anterior debido al menor tamaño del agar y a la ubicación del sólido a mayor distancia

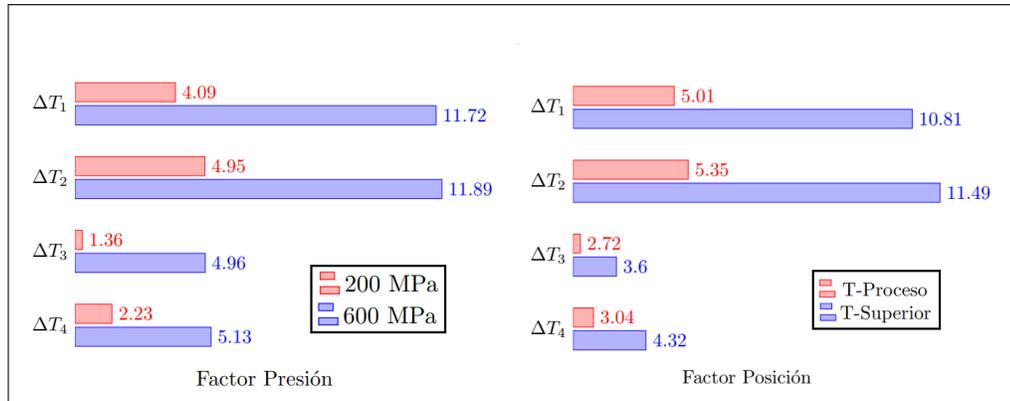
de la pared metálica del cilindro, por lo que la superficie del ágar no se enfriaría con la misma velocidad que en el caso previo. El mayor porcentaje de llenado del cilindro de alta presión determina un menor movimiento del fluido de compresión en la dirección radial, reduciéndose en consecuencia las corrientes de convección. El fluido de compresión fluye hacia la parte superior del cilindro, a medida que aumenta su temperatura al contactar a la muestra sólida (ágar) a mayor temperatura y desciende luego por la zona próxima a la pared del cilindro, en la cual disminuye su temperatura debido a la pérdida de calor por la pared metálica. La mayor parte fluido se ubica en la parte superior del recipiente y allí las corrientes de convección se vuelven más importantes. Otero y otros (2000) observaron que los valores máximos de velocidad se aproximaron a 4 mm/s en el caso del factor de llenado del cilindro del 71,3%. En el caso correspondiente a la muestra más pequeña de ágar (factor de llenado 11,8%) las corrientes de convección juegan un papel importante en la evolución térmica de la muestra sólida, obteniéndose valores máximos de velocidad de aproximadamente 17 mm/s al finalizar la compresión. Si el factor de llenado del cilindro es fijo se alcanza más rápido el equilibrio térmico, pero la viabilidad económica del proceso disminuye. Incluso en este caso, las corrientes de convección no son suficientes para evitar los gradientes de temperatura en la muestra sólida, en los tiempos requeridos. Este conocimiento permite mejorar el control de la temperatura en las muestras solidas durante el tratamiento con APH y así lograr la uniformidad del proceso.

### Principales conclusiones para la Etapa 3

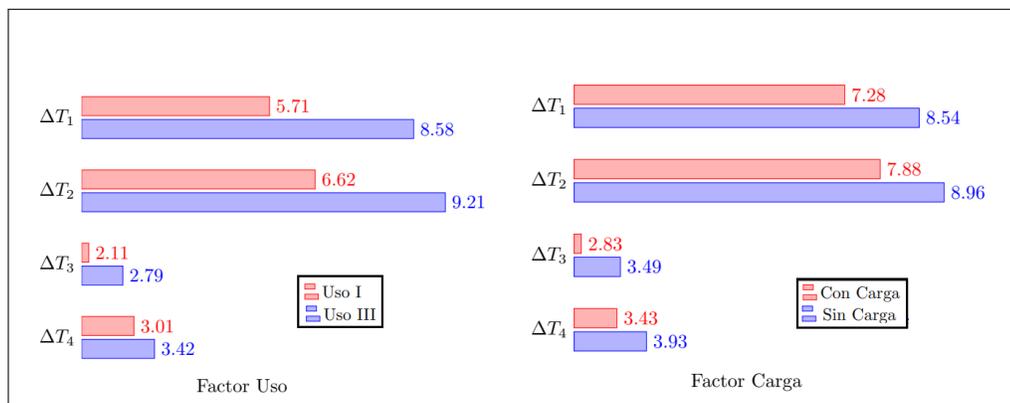
Si bien en esta Etapa 3 se presentaron interacciones triples, dobles y factores fijos estadísticamente significativos, los resultados obtenidos evidenciaron la influencia del factor presión y posición para sus niveles más altos. Destacándose además que un incremento de la temperatura de fluido en la primera etapa del procesamiento por APH ( $\Delta T_1$ ,  $\Delta T_2$ ), se manifestará luego en un marcado descenso térmico ( $\Delta T_3$ ,  $\Delta T_4$ ). Recordando además la temperatura en el ingreso del fluido de compresión para el Uso I diferente al Uso III.

Las siguientes Figuras **2-76** y **2-77** muestran los factores fijos estudiados y en función del incremento de temperatura [ $^{\circ}\text{C}$ ] para una mejor interpretación con los datos sin transformar en los casos antes mencionados. Es de destacar, la magnitud de los factores Presión y Posición luego Carga y Uso. En el caso de la condición sin carga, fue mayor la diferencia térmica para el fluido de procesamiento respecto a la condición con carga. Si bien no se midió experimentalmente la evolución térmica dentro de las muestras de ágar sólido, el efecto de homogenización en la temperatura de fluido se evidenció al graficar la influencia de los factores involucrados. Gracias al modelado y simulación del proceso, en ambas condiciones de a carga, la interpretación del efecto permitió comprender el procesamiento de un alimento sólido durante el tratamiento por APH.

Para los parámetros  $\Delta T_1$ ,  $\Delta T_2$ ,  $\Delta T_3$  los cuatro efectos principales resultados significativos (ver p-Valores de las Tablas **2-5**, **2-6** y **2-7**), mientras que para el último parámetro evaluado ( $\Delta T_4$ ), solamente la Presión y la Posición resultaron significativos.



**Figura 2-76:** Comparación de los factores fijos Presión y Posición para los parámetros de la Etapa 3



**Figura 2-77:** Comparación de los factores fijos Uso y Carga para los parámetros de la Etapa 3

### **2.3.4. Etapa 4: Validación de la distribución de temperatura en el interior del cilindro del equipo APH mediante la utilización de enzima de la $\alpha$ -amilasa fúngica**

El objetivo de esta etapa fue la utilización de metodología pTTI's, sigla en inglés para denominar a integradores de presión-temperatura-tiempo, que permiten medir en forma fácil, precisa e irreversible la lectura de un tratamiento de APH aplicado, Van der Plancken y otros (2008).

En el presente estudio, se utilizó esta metodología para evaluar el efecto indirecto de la no homogeneidad térmica durante el procesamiento con APH y a fin de validar los resultados observados en la distribución de temperatura en el interior del cilindro del equipo APH. En particular, se utilizó la técnica de cuantificación de grupos sulfhidrilos libres [SH-L] de  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae*, como una medida indirecta del efecto térmico en referencia al posible desplegamiento de la proteína.

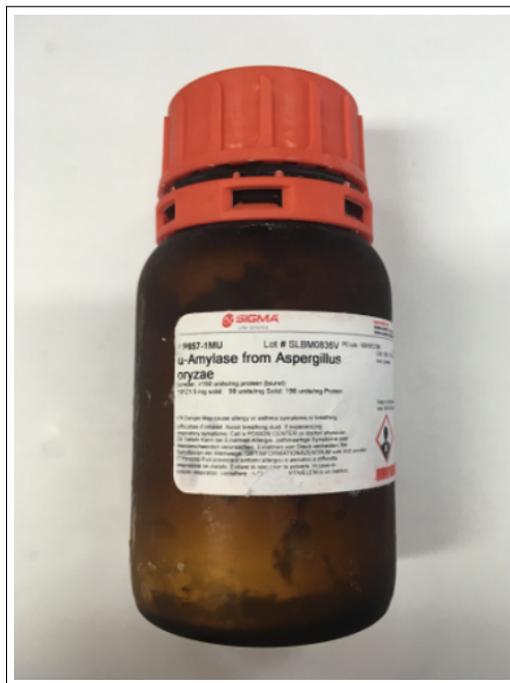
Se selección de la  $\alpha$ -amilasa fúngica, se basó en su susceptibilidad térmica mayor que la  $\alpha$ -amilasa bacteriana, además de desnaturalizarse a una temperatura superior a los 60 ° C y su bajo costo comercial en Argentina.

#### **Preparación del extracto enzimático**

Se preparó una solución (10 mg/ml) de la enzima  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* (A-9857, Sigma Aldrich, Alemania), (ver Figura **2-78**) en buffer 0,01 M Tris-HCL, pH 8,6. Las muestras se envasaron en bolsas marca Cryovac CN-640 (Sealed Air, Buenos Aires, Argentina;

### 2.3. DISEÑO Y EVALUACIÓN DE ENSAYOS EXPERIMENTALES 147

de 2 x 2,5 cm) en volumen final de 1 ml. Posteriormente fueron colocadas en una segunda bolsa marca Cryovac CN-640 (Sealed AirBuenos Aires, Argentina) de 5 x 6 cm y envasadas al vacío en envasadora Rapivac modelo Maximax 800 (Buenos Aires, Argentina).



**Figura 2-78:** Enzima  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae*, (A-9857, Sigma Aldrich, Alemania)

#### **Tratamiento de las muestras con extracto enzimático/buffer mediante APH**

En este ensayo se registró la temperatura del fluido de compresión en tres posiciones diferentes mediante termocuplas Tipo K en las posiciones: T-Superior  $r = 0$  mm, T-Central  $r = 0$  mm y T-Inferior  $r = 0$  mm y la temperatura de proceso (T-Proceso). Las muestras con extracto enzimático envasadas en doble bolsa se ubicaron en el interior de una tercera bolsa de 50 cm de largo conteniendo como guía de sostén una termocupla Tipo K, conectada

al cabezal - sin registro térmico para parte de esta termocupla ya que el conector no fue habilitado para tal fin-, ver Figura 2-79.

Por otro lado, si fueron habilitados los otros 3 conectores para las evoluciones temperatura vs. tiempo durante las diferentes etapas del proceso operativo: compresión (incremento de la presión hasta  $600 \pm 5$  MPa), mantenimiento isobárico (5 min a presión constante) y descompresión hasta alcanzar la presión atmosférica (0,1 MPa).



**Figura 2-79:** Visualización del armado del dispositivo antes del envasado al vacío

Para el Uso I y una vez conectado el dispositivo y la canasta metálica introducida en el cilindro de alta presión, se aplicó el tratamiento con APH. Una vez finalizado el Uso I, las muestras fueron retiradas de la bolsa externa y se mantuvieron bajo refrigeración a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para la posterior cuantificación del contenido de sulfhidrilos libres [SH-L]. Los Usos II y III se llevaron a cabo con nuevas muestras de extractos enzimáticos operando el equipo APH de manera análoga al Uso I y en forma consecutiva. Se aclara además y Tal como se mencionó en la sección referente a la aplicación general del tratamiento de APH , el fluido en la camisa de intercambio se acondicionó a  $18\text{ }^{\circ}\text{C}$ , para todos los ensayos realizados.

### Determinación del contenido de sulfhidrilos libres

Para cada muestra de extracto enzimático envasada en doble bolsa, ubicada de acuerdo a las posiciones elegidas (Superior  $r= 0$  mm, Central  $r= 0$  mm, Inferior  $r= 0$  mm) y en cada uno

### 2.3. DISEÑO Y EVALUACIÓN DE ENSAYOS EXPERIMENTALES 149

de los Usos I, II y III ensayados, se evaluaron los grupos SH libres [SH-L] de acuerdo con el método de Beveridge y otros (1974) y Torrezan y otros (2007). En este método, quinientos microlitros ( $500 \mu\text{l}$ ) de cada bolsa (muestra procesada) fueron adicionados a 1,5 ml de buffer Tris-Glicina (1 M Tris, 0,1 M Glicina y 4 mM EDTA; pH = 8,0) y  $15 \mu\text{l}$  del Reactivo de Ellman (4 mg/ml DTNB en Buffer Tris-Glicina). En todos los casos, el volumen final de la reacción fue 2,015 ml. Luego de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se midió la absorbancia de cada extracto enzimático tratado (posición y uso), a 412 nm en un espectrofotómetro UV-visible (SpectroStar Nano, BMG Labtech GmbH, Alemania).

El coeficiente de extinción molar utilizado fue  $13.600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . La concentración de [SH-L] fue expresada como  $\mu\text{ mol}$  de SH/g de proteína, Ellman (1959). El valor de la concentración se obtuvo a partir de la siguiente expresión:

$$[\text{SH-L}]: (75,53 (D_{o_1} - D_{o_2}) 1000) / V C$$

[SH-L]: concentración de sulfhidrilos libres en la muestra expresada como  $\mu\text{ mol}$  de SH/g de proteína

$D_{o_1}$ : Absorbancia a 412 nm de la muestra

$D_{o_2}$ : Absorbancia a 412 nm del blanco de reactivos

V: volumen de la muestra

C: concentración de proteína en la muestra medida a presión atmosférica

### Diseño experimental y análisis estadístico de la Etapa 4

Para el diseño experimental se utilizó un diseño factorial, considerándose dos variables independientes a) Posición: (T-Superior r= 0 mm, T-Central r= 0 mm, T-Inferior r= 0 mm) donde fue ubicada cada bolsa con extracto enzimático y b) Uso (Usos I, II, III) del equipo de APH en forma consecutiva, aplicando un tratamiento a  $600 \pm 5$  MPa durante 5 min. Se realizaron cuatro repeticiones del diseño propuesto con 36 observaciones.

Se utilizó el programa R CRAN- PROYECT, Team (2013), para realizar un ANOVA ( $\alpha=0,05$ ). La variable respuesta evaluada fue la concentración de [SH-L], expresada en  $\mu$  mol de SH/g de proteína. El modelo estadístico asociado a esta etapa fue el siguiente:

#### Modelo Estadístico

$$Y_{jkl} = \mu + \beta_j + \gamma_k + (\beta\gamma)_{jk} + \epsilon_{jkl} \quad (2-11)$$

$\mu$ , es la media general

$\beta_j$ , es el efecto del nivel j-ésimo del factor Posición

$\gamma_k$ , es el efecto del nivel k-ésimo del factor Uso consecutivo

$(\beta\gamma)_{jk}$  es el efecto de la interacción de la combinación de  $jk$

$\epsilon_{jkl}$ , es el error aleatorio en la combinación  $jkl$

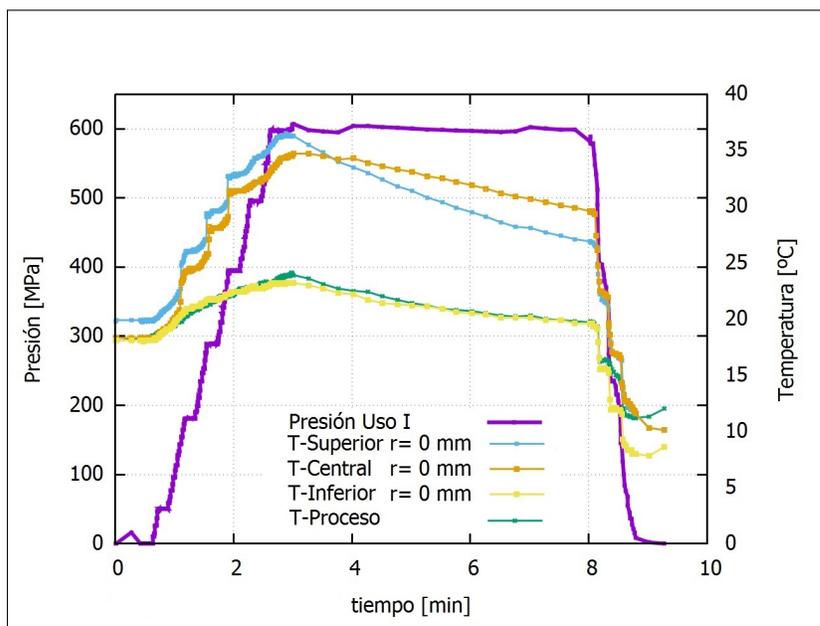
con  $j=1;2;3$  ;  $k=1;2;3$

$l= (1;2..n)$  siendo n, el número de observaciones (36)

.

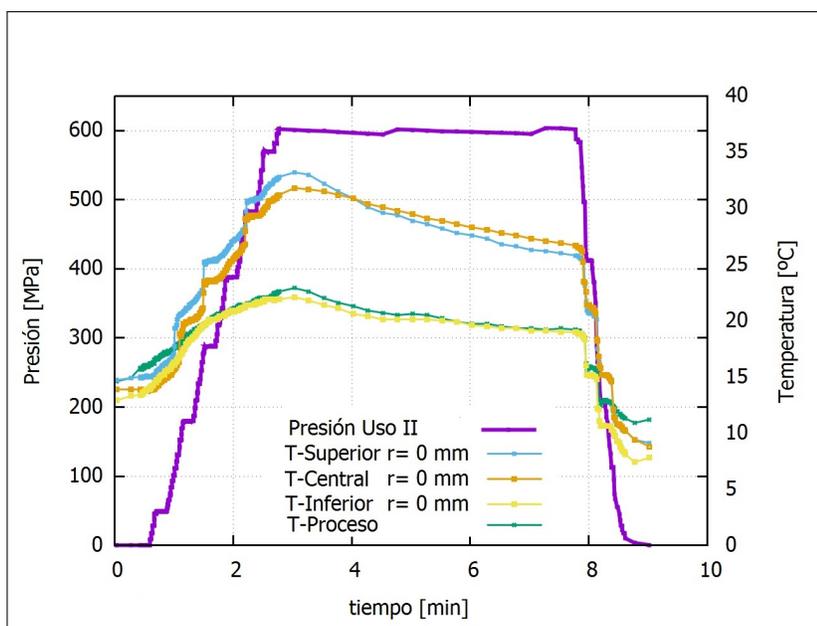
### Resultados correspondientes a la validación de la distribución de temperatura en el interior del cilindro del equipo APH mediante la utilización de enzima $\alpha$ -amilasa fúngica

Las Figuras 2-80, 2-81 y 2-82 representan los ensayos experimentales a los cuales fueron sometidos los extractos enzimáticos para un nivel de presión de 600 MPa. En los tres usos ensayados del equipo APH, las posiciones axiales superior y central presentaron el mismo comportamiento observado respecto de la posición axial inferior, informado también en las Etapas 1 y 2 de este Estudio Experimental.

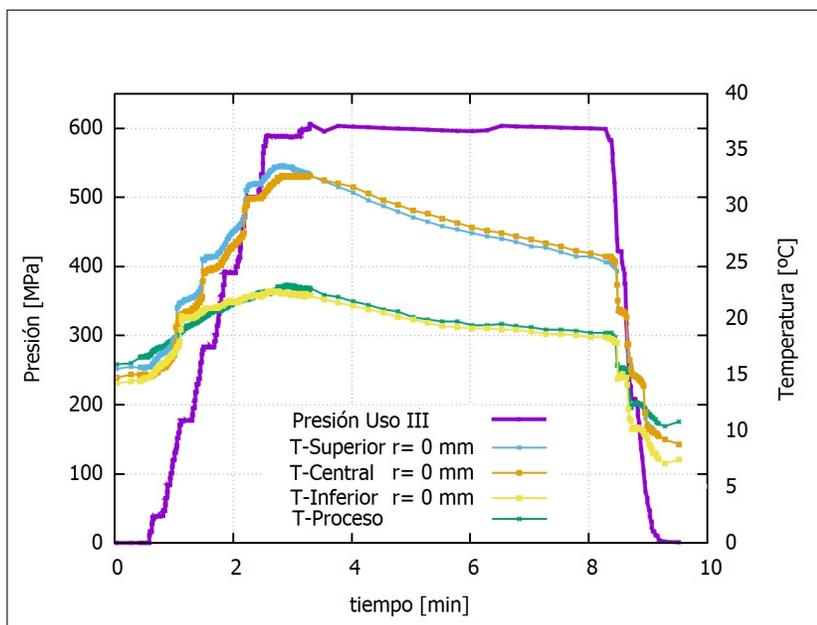


**Figura 2-80:** Primer uso del equipo de APH a 600 MPa  $\pm$  5 MPa utilizado para procesar los extractos enzimáticos

Se utilizó el programa R CRAN- PROYECT Team (2013), para el análisis estadístico de los resultados, aplicando ANOVA ( $\alpha=0,05$ ). La Tabla 2-9 muestra el análisis de varianza para la variable respuesta concentración de [SH-L], encontrándose diferencias significativas en la



**Figura 2-81:** Segundo uso del equipo de APH a  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  utilizado para procesar los extractos enzimáticos



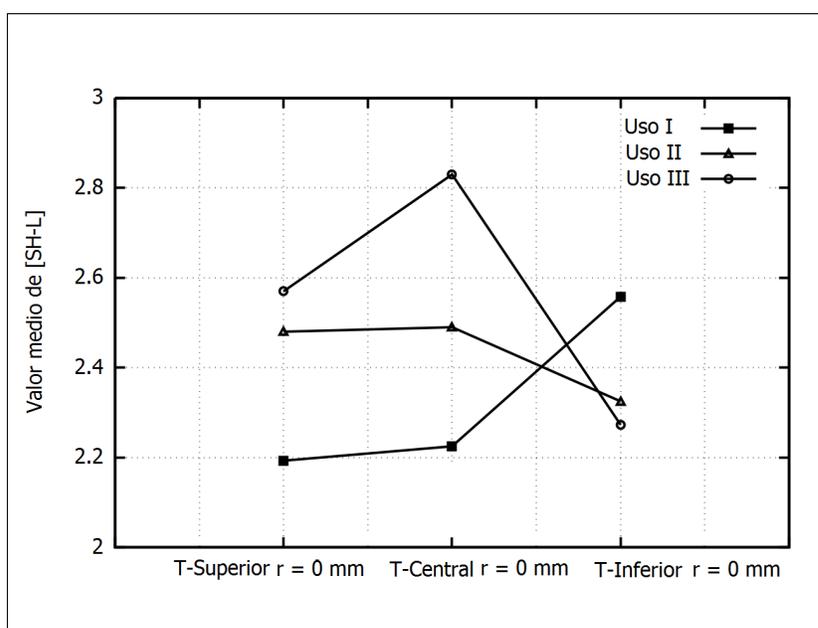
**Figura 2-82:** Tercer uso del equipo de APH a  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  utilizado para procesar los extractos enzimáticos

interacción Posición\*Uso ( $p \geq 0,001$ ) y en el factor Uso ( $p \geq 0,021$ ).

A partir de las Figura 2-83 se observaron los siguientes resultados, donde el Uso I se di-

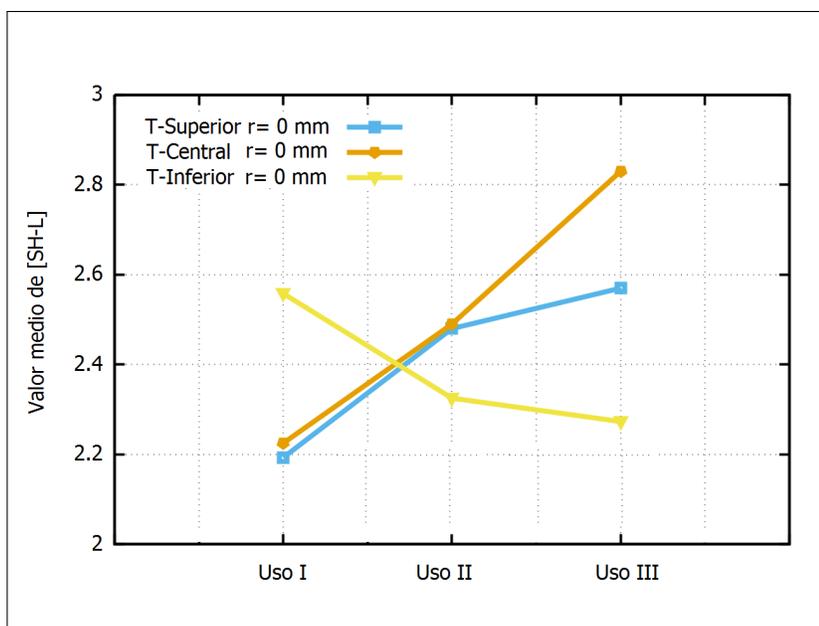
**Tabla 2-9:** ANOVA del contenido sulfhidrilos libres de la Etapa 4

Factores	Grados de Libertad	Suma de Cuadros	Media Cuadrática	Valor F	p-Valor
Posición	2	0,112	0,056	1,539	0,233
Uso	2	0,325	0,163	4,481	0,021
Posición:Uso	4	0,906	0,226	6,243	0,001
Residuos	27	0,979	0,036		

**Figura 2-83:** Valores medios de [SH-L] vs. Posición

ferenció de los Usos II y III por sus comportamientos opuestos para todas las posiciones. Para este primer uso del equipo, se observó el aumento de la concentración de [SH-L] en la posición Inferior respecto de las posiciones Central y Superior. Luego, este comportamiento se invirtió para los usos subsiguientes. En el caso del Uso II, en las posiciones Superior y Central no se observaron diferencias en la concentración de [SH-L] y luego este contenido desciende en el caso de la posición Inferior. En el caso de las posiciones Superior y Central, las concentraciones de [SH-L] resultaron mayores para el Uso II que para el Uso I. A su vez, en el caso del Uso III se observa que las posiciones Superior y Central presentan los

mayores valores de concentración de [SH-L] en relación a las mismas posiciones para los otros Usos. Además, la posición Central presenta el valor máximo, significativamente mayor que los valores observados para las otras posiciones y usos. En las posiciones en las cuales las concentraciones de [SH-L] resultaron mayores, se esperaría que la enzima sufra una mayor exposición a los cambios térmicos, debido a un mayor incremento de la temperatura del fluido, luego de la compresión adiabática y el consecuente aumento de la concentración de [SH-L] en esas posiciones.



**Figura 2-84:** Valores medios de [SH-L] vs. Usos

En la Figura 2-84 se representa el efecto de la interacción entre los factores Posición\*Uso. Las posiciones T-Superior e T-Inferior presentaron un comportamiento opuesto mientras que en la posición Central, el contenido de [SH-L] se incrementó en forma lineal con los sucesivos usos del equipo de APH de laboratorio. Este efecto podría deberse a las estructuras de flujo más o menos estables, las que pueden relacionarse con la cantidad de calor transferido entre los

puntos más calientes hasta los puntos más fríos. La convección de Bénard, o de Rayleigh-Bénard, es un tipo de convección que se da en espacios confinados cuando el gradiente de temperatura en el fluido produce una estratificación inestable de la densidad en dirección vertical, (este efecto se demuestra en la etapa de simulación y modelado).

Los autores Torrezan y otros (2007) y Puppo y otros (2004) estudiaron el comportamiento de geles y proteínas de soja tratados con alta presión y utilizando esta misma metodología de sulfhidrilos libres. Después del tratamiento a alta presión, ellos observaron que todas las muestras presentaron menores contenidos de sulfhidrilos debido a la formación de enlaces S-S a través de reacciones de intercambio SH/S-S. Por otro lado, los autores Kajiyama y otros (1995), también informaron que, cualquiera que sea la concentración de proteína de soja, el contenido de sulfhidrilos (SH) fue consistentemente menor después del tratamiento a presión que antes, sin embargo ninguno de estos trabajos se informó la posición de las muestras dentro de los equipo de APH utilizados. Los autores Grauwet y otros (2010b), también evaluaron la no uniformidad térmica en equipos APH verticales con sólo un ciclo de procesamiento (400-600 MPa; 10-40 °C; 1-15 min) utilizando la medición post tratamiento de la *actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa bacteriana (*Bacillus subtilis*)*. Estos autores, indicaron que la actividad residual más alta, fue observada en el fondo del recipiente dónde las temperaturas son más bajas. Los autores atribuyeron estos resultados a fenómenos de convección por el flujo del fluido de compresión dirigido hacia la parte inferior del cilindro de APH.

Kitsubun (2006) informó los resultados de la simulación de las dos enzimas amilasas como si “fuesen dos partículas independientes una de otra” durante todo el tratamiento con APH. A través de este estudio el autor logró evidenciar la trayectoria de las enzimas que realizan de

acuerdo a las corrientes de flujo que se generan durante la simulación del proceso. Para este investigador, Kitsubun (2006), tanto la distribución espacial y de temperatura determinan el historial de tratamiento sufrido por las enzimas. En este estudio, los extractos enzimáticos posteriormente analizados, fueron ubicados en tres posiciones fijas a diferentes alturas donde la distribución térmica se comportó de manera no homogénea.

Cabe mencionar que en este estudio de trabajo doctoral no se realizó la medición de la actividad enzimática residual para evaluar la distribución del campo de temperatura en el cilindro de alta presión (como la mayoría de las publicaciones encontradas) sino que se determinó la concentración de grupos sulfhidrilos libres como una medida indirecta del desplegamiento proteico. En las proteínas, la presión actúa principalmente en los enlaces hidrofóbicos y electrostáticos de la molécula. El tratamiento con APH causa la desprotonación de los grupos cargados, la rotura de los puentes iónicos y de los enlaces hidrofóbicos y de este modo se producen cambios conformacionales y estructurales en las proteínas, Téllez y otros (2001).

El mapeo térmico evaluado en las etapas previas de este estudio experimental explicaría los resultados observados en este estudio, en el cual se evaluó el efecto de los tratamientos sobre la concentración de [SH-L] de la enzima amilasa. La metodología utilizada (pTTI's y determinación de [SH-L]) demostró ser suficientemente sensible para detectar las diferencias de temperaturas en diferentes zonas del cilindro de alta presión, permitiendo determinar un posible subprocesamiento de muestras (particularmente en aplicaciones de tratamientos combinados temperatura-presión como pasteurización o esterilización asistido por APH) y entre los usos consecutivos, para monitorear la puesta en régimen. La no uniformidad térmica del proceso se relaciona con el comportamiento termofluidodinámico del sistema. Como con-

secuencia de las inhomogeneidades, el estado real del material biológico procesado depende del historial de tratamiento, Knoerzer y Juliano (2016).

#### **Principales conclusiones para la Etapa 4**

La utilización de la metodología pTTI's en combinación con la técnica de cuantificación de la concentración de [SH-L] de la amilasa fúngica no sólo permitió evaluar diferencias entre las muestras procesadas en cada posición fija, sino también variaciones del perfil térmico generado dentro del equipo y sus diferencias entre los usos ensayados. Se demostró que es necesario al menos dos usos consecutivos al evidenciar que no se observaron diferencias significativas en las posiciones Superior y Central. Los resultados obtenidos son muy prometedores y se espera continuar las investigaciones para optimizar la sensibilidad de la metodología propuesta una vez reparado el equipo de APH.

## Parte II

# Capítulo 3

## Estudio de Modelado y Simulación

*En este capítulo se hará un especial énfasis en el trabajo de modelado y simulación del procesamiento por altas presiones a través de la interpretación del comportamiento del fluido de compresión (agua) mediante la generación de un modelo 0D ( 0 Dimensional o de caso de parámetros concentrados). Luego, como herramienta de simulación, se describe la implementación de un código base -la aplicación compressibleInterFoam- del paquete open source OpenFOAM<sup>®</sup> desarrollada para simular flujo multifásico compresible. El modelo fue capaz de capturar el efecto del calentamiento por compresión, la conducción en el sólido y la convección natural debido a gradientes térmicos. Finalmente, se describe el diseño y desarrollo de la geometría del equipo Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System, modelo FPG9400:922 (Stansted, Reino Unido) de escala laboratorio y de configuración vertical, el cual se encuentra rodeado por una camisa de intercambio de calor. Asimismo, se simuló el comportamiento del fluido en condición de canasta vacía y con el agregado de otro material sólido de propiedades similar al ágar para validar resultados obtenidos sólo a 600 MPa.*

## 3.1. Modelo matemático-numérico

### 3.1.1. Análisis de un caso 0 Dimensional ó de parámetros concentrados

El procesamiento mediante APH -de hasta 1000 MPa- es acompañado por un cambio de temperatura debido a una conversión de la energía mecánica en energía interna. El intercambio de calor entre el fluido de presurización y las paredes metálicas del equipo conduce a la aparición de heterogeneidades en el campo de temperatura y consecuentemente en el de densidad. Debido a esto, las corrientes convectivas forzadas que aparecen durante las etapas de compresión y descompresión, se suman corrientes de convección natural, que se vuelven dominantes durante la etapa de mantenimiento relativamente más extensa. De este modo, se generan condiciones no uniformes de proceso que pueden influir sobre el alimento a procesar. Esta primera etapa del trabajo tuvo como objetivo principal desarrollar un modelo simplificado (Caso 0D) que fuera capaz de capturar el efecto del calentamiento y cambio de densidad por compresión.

Basados en el modelo termodinámico llamado *perfectFluid* de OpenFOAM<sup>®</sup>, que luego usaremos en el modelo bidimensional, definimos la densidad como la siguiente función termodinámica:

$$\rho = \frac{1}{RT}p + \rho_v \quad (3-1)$$

donde  $\rho$  es la densidad [ $kg/m^3$ ],  $T$  la temperatura [K] y  $p$  la presión [Pa] (todas supuestas

uniformes aunque variables en el tiempo),  $\rho_v$  la densidad en el *vacío* (para este modelo el fluido nunca se evapora) y  $R$  un coeficiente ajustable (análogo a la constante de un gas en un modelo de gas perfecto).

Es fácil demostrar que para este fluido el diferencial de energía interna puede escribirse como

$$d\hat{u} = \left[ c_p - R \left( 1 - \frac{\rho_v}{\rho} \right)^2 \right] dT \quad (3-2)$$

donde  $c_p$  es el calor específico a presión constante. Linealizaremos el modelo suponiendo el término entre corchetes como constante, definiendo un calor específico total medio como

$$c_m = \bar{c}_p - R \left( 1 - \frac{\rho_v}{\bar{\rho}} \right)^2 \quad (3-3)$$

donde la barra indica valores medios en el intervalo de presiones y temperaturas del problema.

De esta manera, es posible aproximar la variación de energía interna como

$$\frac{d\hat{u}}{dt} \simeq c_m \frac{dT}{dt}. \quad (3-4)$$

Por otro lado, la conservación de la masa, suponiendo que el volumen de la cámara no cambia apreciablemente durante el proceso, se puede expresar como

$$Q\rho_i = V \frac{\partial \rho}{\partial t} \quad (3-5)$$

donde  $Q$  es el caudal que ingresa o egresa [ $m^3/s$ ],  $V$  el volumen de la cámara [ $m^3$ ] y  $\rho_i$  la

densidad de ingreso o egreso del fluido de compresión, modelada como

$$\rho_i = \frac{1}{RT_i}p + \rho_v \quad (3-6)$$

que nos permite escribir finalmente

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} = \frac{Q}{V}\rho_i. \quad (3-7)$$

Además, la conservación de energía en la cámara indica que

$$\rho V \frac{d\hat{u}}{dt} = Q [p + \rho_i(\hat{u}_i - \hat{u})] - UA(T_w - T_a) \quad (3-8)$$

donde  $\hat{u}_i$  es la energía interna del fluido que ingresa o egresa,  $U$  el coeficiente global de transferencia térmica desde la pared interna de la cámara hasta el ambiente exterior,  $A$  el área de la cámara,  $T_w$  la temperatura de la pared interna del cilindro y  $T_a$  la temperatura ambiente.

Combinando las ecuaciones (3-4) y (3-8), podemos escribir

$$\frac{dT}{dt} = \frac{Q [p + \rho_i(\hat{u}_i - \hat{u})] - UA(T_w - T_a)}{\rho c_m V} \quad (3-9)$$

El modelo 0 Dimensional (0D) ó de parámetros concentrados, comprende entonces la imposición de una curva predeterminada de presiones  $p(t)$  y temperatura de ingreso  $T_i(t)$ , la integración numérica explícita de la ecuación (3-9) para obtener la temperatura, la actua-

lización de las densidades  $\rho$  y  $\rho_i$  de sus respectivas ecuaciones de estado (3-1) y (3-6) y la actualización del caudal  $Q$  de la ecuación (3-5). La implementación de este modelo fue desarrollada en el lenguaje de software libre Octave v.4., Eaton y otros (2014).

Las condiciones de procesamiento de APH fueron extraídas del trabajo de Hartmann y otros (2004), utilizando *agua* como fluido de proceso, cuya temperatura inicial fue 295 K alcanzando los 500 MPa. En esta primera aproximación al fenómeno en estudio, se modeló mediante software libre, Octave v.4., Eaton y otros (2014), una rampa de compresión del fluido de presurización de 200 s. A fin de comparar los resultados -de la evolución térmica y del cambio de densidad- obtenidos a partir de la simulación, se utilizaron datos publicados por Saul y Wagner (1989), Wagner y Pruss (2002) y Hartmann y otros (2004), ver Tabla 3-1.

**Tabla 3-1:** Valores utilizados en la simulación del caso OD

Variable	Valor	Comentario
$p_o$ [Pa]	$1 \times 10^5$	
$T_o$ [K]	295	Hartmann y otros (2004)
$\rho_o$ [kg/m <sup>3</sup> ]	1000	agua
$p_{max}$ [Pa]	$5 \times 10^8$	Hartmann y otros (2004)
$\rho_{max}$ [kg/m <sup>3</sup> ]	1169,19	agua, Wagner y Pruss (2002)
$t_{max}$ [s]	200	
$\bar{c}_p$ [J/kgK]	3950	valor medio
$\bar{\rho}$ [kg/m <sup>3</sup> ]	1100	valor medio
$R$ [J/molK]	5000	valor ajustado
$\rho_v$ [kg/m <sup>3</sup> ]	999,97	valor ajustado
$U$ [W/m <sup>2</sup> K]	0	se desprecia transferencia al ambiente

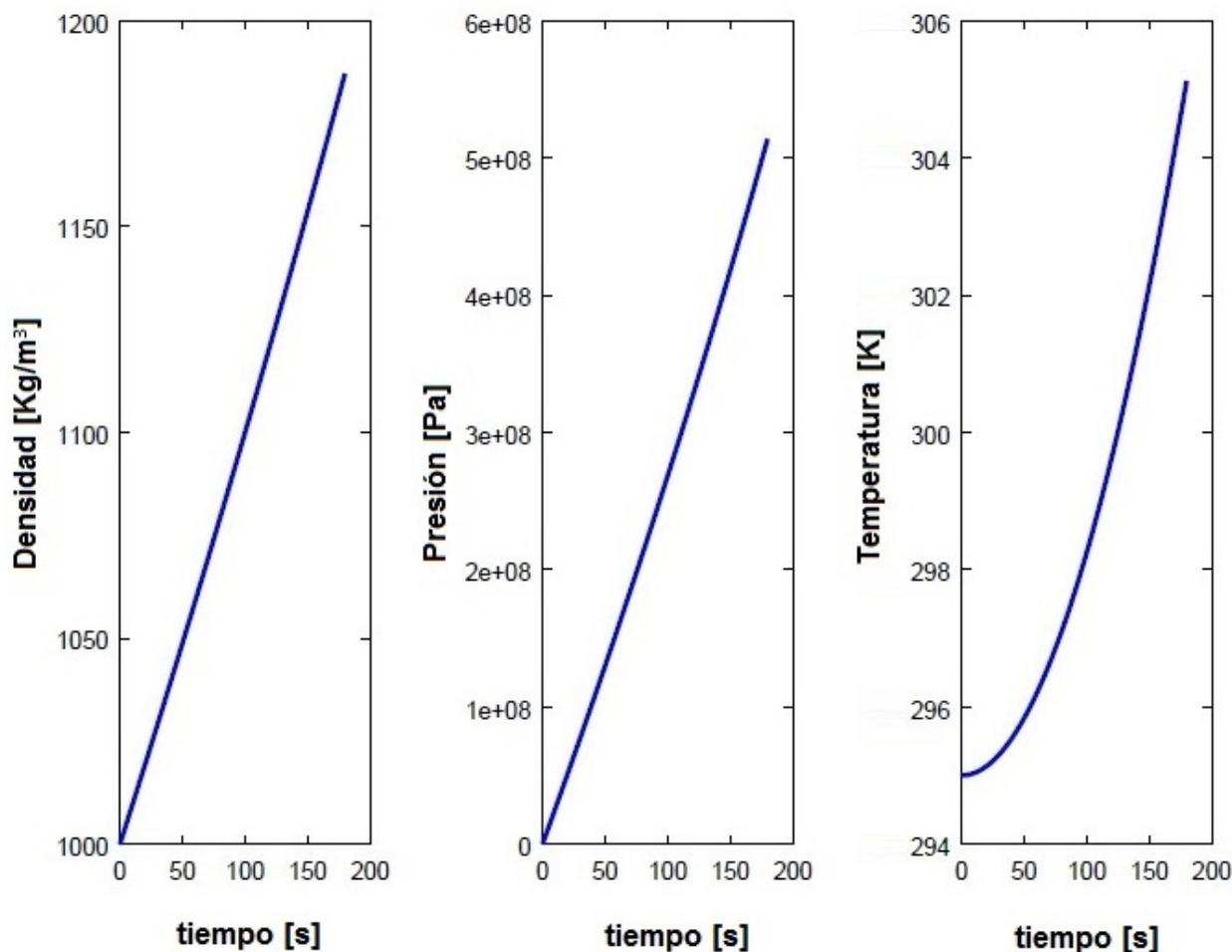


Figura 3-1: Evoluciones de las variables simuladas en función del tiempo

### Resultados y Discusión: Caso OD

La Figura 3-1 presenta las evoluciones simuladas de las variables densidad, presión y temperatura. La simulación realizada logró el comportamiento esperado de presión del agua desde la presión atmosférica hasta los 500 MPa. La evolución térmica del fluido desde los 295 K alcanzó el valor de 305 K mientras que en el trabajo de Hartmann y otros (2004) el valor final alcanzado es de 307 K. Por otro lado, el valor de la densidad final obtenido a partir calculado superó el valor publicado por Wagner y Pruss (2002). Sin embargo, más allá de

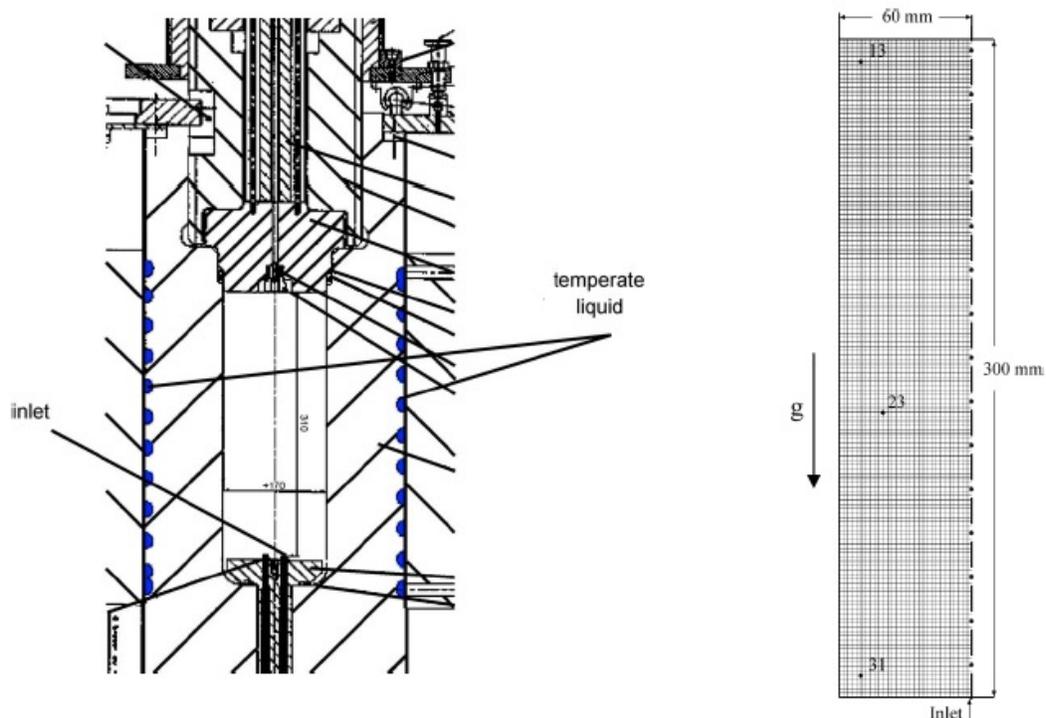
estas discrepancias numéricas y a modo preliminar fue posible obtener un modelo que interprete los cambios térmicos conforme aumenta la presión y de esta manera poder ajustar los parámetros para la subsiguiente modelización multidimensional con OpenFOAM®.

### 3.1.2. Implementación y validación del Modelo Simplificado en OpenFOAM®

Como herramienta de simulación, se utilizó como código base la aplicación *compressibleInterFoam* del paquete open source OpenFOAM® desarrollada para simular flujo multifásico compresible.

A manera de validación, fue seleccionado el trabajo de Hartmann y otros (2004), donde se utiliza agua como fluido de presurización, sin canasta metálica ni carga de alimento dentro de un equipo de  $3,3 \cdot 10^{-3} \text{ m}^3$  de capacidad. En este trabajo, los autores registraron tanto la evolución de la presión en la cámara como de las temperaturas en tres posiciones (Superior, Central e Inferior). El proceso de APH simulado y experimentado alcanzó una presión máxima de 500 MPa ( $5 \times 10^8 [\text{Pa}]$ ). Los autores mencionan en este trabajo que el fluido ingresó con un velocidad de 0,25 m/s a través de válvula de 4 mm de diámetro desde la zona inferior del equipo. En particular, los autores mencionan que el dominio simulado no capturó la geometría real dado que no es simétrica. El tiempo simulado fue de 820 s, incluyendo la etapa de compresión y de mantenimiento de la presión sin reportar resultados de la descompresión y las evoluciones térmicas finales.

Nuestro modelo consideró por el contrario todas las etapas de procesamiento: presurización,



**Figura 3-2:** Esquema del equipo, posición de termocuplas, ingreso de fluido y dominio utilizando 18000 volúmenes de control, Fuente: Hartmann y otros (2004)

mantenimiento de la presión y descompresión. El código base *compressibleInterFoam* fue adaptado con el fin de resolver el problema acoplado de transferencia térmica entre el fluido y la pared metálica de acero, con un espesor de 30 mm. Para poder incluir esta región sólida en la simulación el metal fue representado como un fluido de viscosidad extremadamente alta y con las propiedades térmicas del acero.

El modelo físico contempla los siguientes aspectos:

- Densidad del fluido de presurización: función de la presión y la temperatura.
- Propiedades térmicas constantes.
- Ecuación de movimiento del fluido incluyendo fuerzas boyantes (convección natural).

- Convección – Difusión del calor con fuente térmica por compresión adiabática.
- Flujo laminar excepto muy cerca del ingreso de fluido de compresión.

Las siguientes ecuaciones del modelo matemático corresponden a la conservación de masa, cantidad de movimiento y energía.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho U) = 0 \quad (3-10)$$

$$\frac{\partial(\rho U)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho U U) = -\nabla p + \nabla(\mu \nabla U) + S_U \quad (3-11)$$

$$\frac{\partial(\rho C_p T)}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho U C_p T) = \nabla \cdot (k \nabla T) + S_T \quad (3-12)$$

siendo  $U$  el campo de velocidad,  $\mu$  la viscosidad dinámica,  $S_U$  el término de fuerza boyante,  $S_T$  la fuente interna de calor

Las etapas del ciclo de APH fueron simuladas comenzando con rampa de compresión de velocidad 3 MPa/s, seguida de mantenimiento y descompresión hasta presión atmosférica.

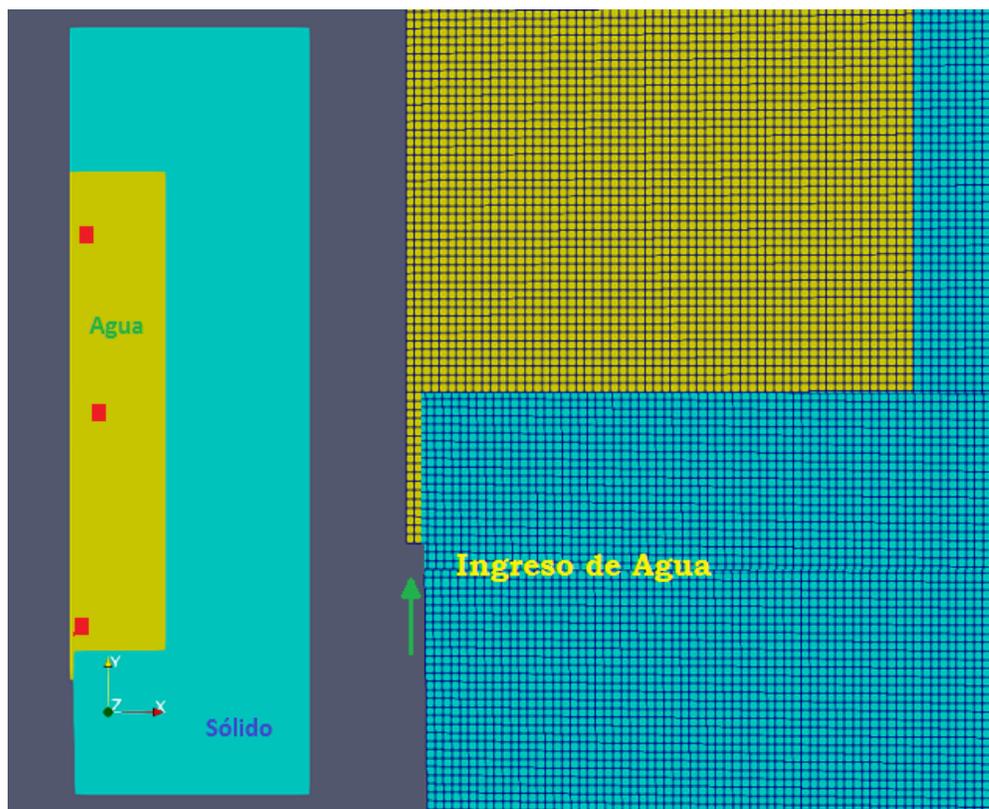
La Tabla **3-2** muestra los valores utilizados de las propiedades termofísicas de los materiales empleados para esta etapa de validación. La Figura **3-3** muestra la geometría 2D simple con

**Tabla 3-2:** Valores utilizados para la validación del trabajo de Hartmann y otros (2004)

Propiedad del Material	Acero	Agua	Referencia
Cp [J/kg K]	475	4200 (adaptado)/ 3950	
k [W/mk]	44,5	0,7	Hartmann y otros (2004)
$\rho$ [kg/m <sup>3</sup> ]		1000	Hartmann y otros (2004)

simetría de revolución generada para representar el equipo de las mismas dimensiones (0,06

m de radio por 0,3 m de largo), sin canasto y sin carga de alimento, publicado en Hartmann y otros (2004). La malla generada fue de tipo uniforme y estructurada constituida por 79209 celdas mediante el software libre Gmsh<sup>®</sup>, Geuzaine y Remacle (2003). Se utilizó una PC con 8 procesadores Intel<sup>®</sup> Core<sup>™</sup> I7 CPU 930 2.80 GHZ. Memoria 7,8 GB de RAM.



**Figura 3-3:** Geometría simple 2D representando el equipo evaluado por Hartmann y otros (2004)

### Resultados de la validación del trabajo de Hartmann y otros (2004)

Durante la compresión adiabática se produce un perfil de densidades que actúa como fuerza impulsora para el desarrollo de un campo de velocidades en el fluido, originado en el fenómeno de convección natural. En el trabajo de Hartmann y otros (2004), el fluido de

proceso ingresó desde la parte inferior del equipo a una temperatura 295 K (22 °C) incrementando su temperatura hasta alcanzar los 307 K (34 °C) como temperatura máxima en la zona superior del equipo durante la etapa de compresión. Luego, en la etapa de mantenimiento, la temperatura de las tres posiciones de fue disminuyendo como así también el fluido de proceso como consecuencia de la pérdida de calor por corrientes de fluido descendentes. Se destaca que los autores Hartmann y otros (2004) no mencionan en su trabajo si el equipo utilizado cuenta con camisa de intercambio de calor.

De izquierda a derecha, las distribuciones de velocidad y temperatura pueden observarse en la Figura 3-4. Las dos primeras evoluciones de carácter transitorio se ilustran representando al fluido (agua) poco antes (136 s) y poco después de 182 s (final de la compresión). Luego, a 500 s se manifiesta la mitad de la fase de mantenimiento, que concluye a los 820 s.

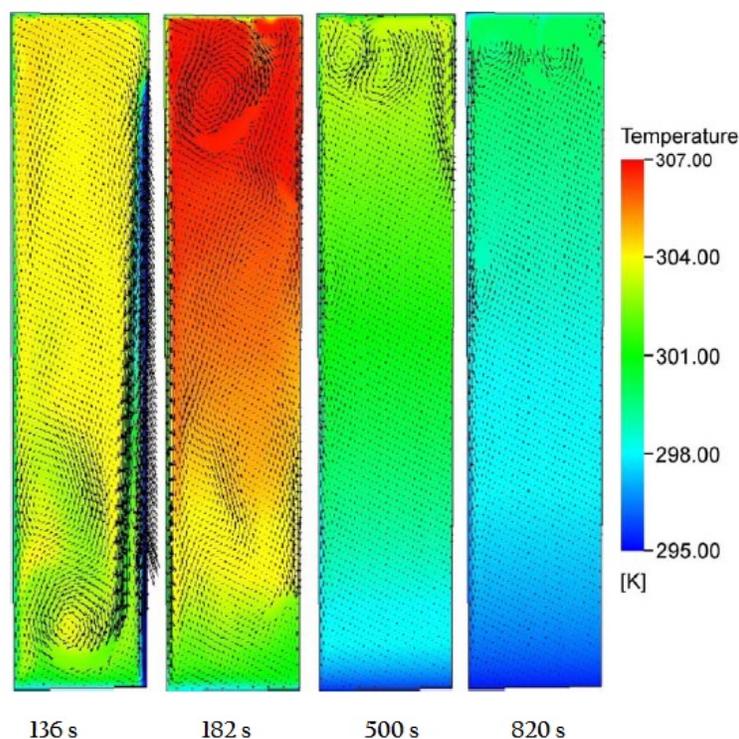
A los 136 s, la corriente de fluido de entrada ingresa en forma es casi recta y en la parte superior se observa un ligero ensanchamiento de su sección transversal y disminuyendo así la velocidad de 0,25 m/s en la entrada aproximadamente a 0,07 m/s cerca de su extremo superior. Debido a su densidad, que es más alta que la del fluido circundante, el flujo que se dirige hacia abajo genera un gran remolino en la parte inferior.

Los mismos autores corroboraron cierta desviación entre los registros experimentales de la evolución térmica en la posición inferior y datos obtenidos en su simulación, dada la existencia de este remolino, sumado a que la configuración no es perfectamente axisimétrica.

Hacia el final de la fase de compresión, el flujo impulsado se ha redistribuido y el gran remolino se desarrolla en la parte superior, debido al fluido descendente previamente enfriado en la pared superior metálica. Sumado a lo anterior, un flujo en la capa límite dirigido hacia

abajo puede observarse cerca de la esquina superior.

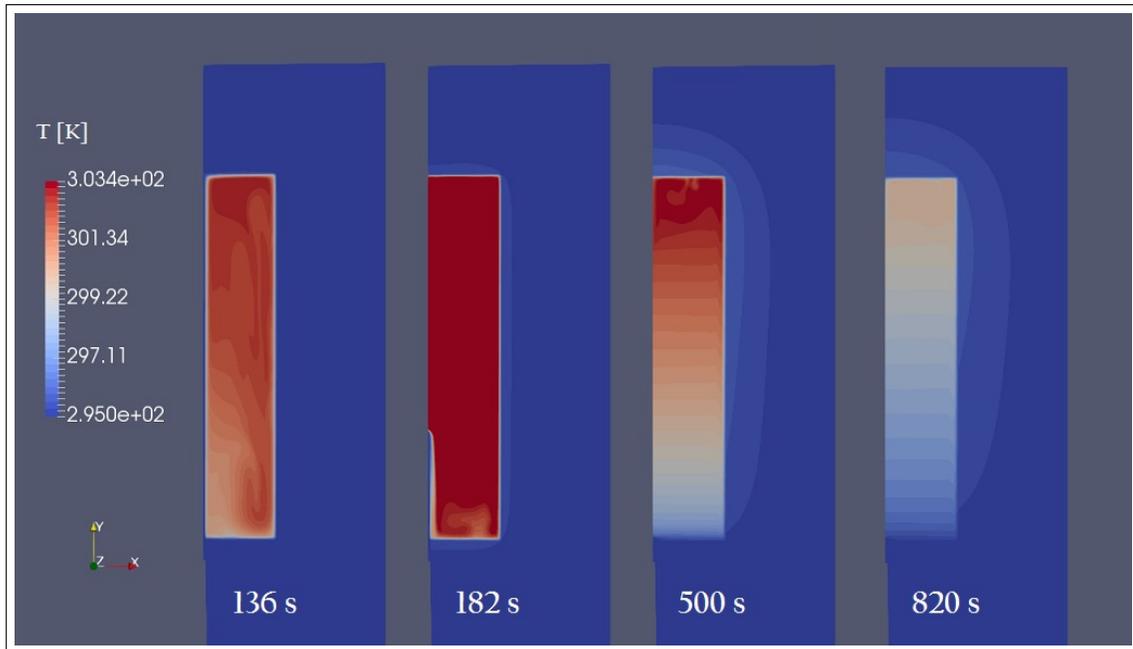
Durante estados posteriores de la fase de mantenimiento de la presión a 500 MPa, el movimiento del fluido es atenuado y si bien se puede observar la compensación térmica, al finalizar esta etapa (es decir, a 820 s) permanece una diferencia térmica final de aproximadamente 6–7 K.



**Figura 3-4:** Resultados de la simulación a 500 MPa, Fuente: Hartmann y otros (2004)

El modelo fue capaz de capturar el efecto del calentamiento por compresión, la conducción en el sólido y la convección natural debido a gradientes térmicos.

La Figura 3-5 permite observar la distribución del fluido ascendente (fluido más caliente) hacia la parte superior del equipo hasta alcanzar los 500 MPa para los mismos tiempos estudiados.

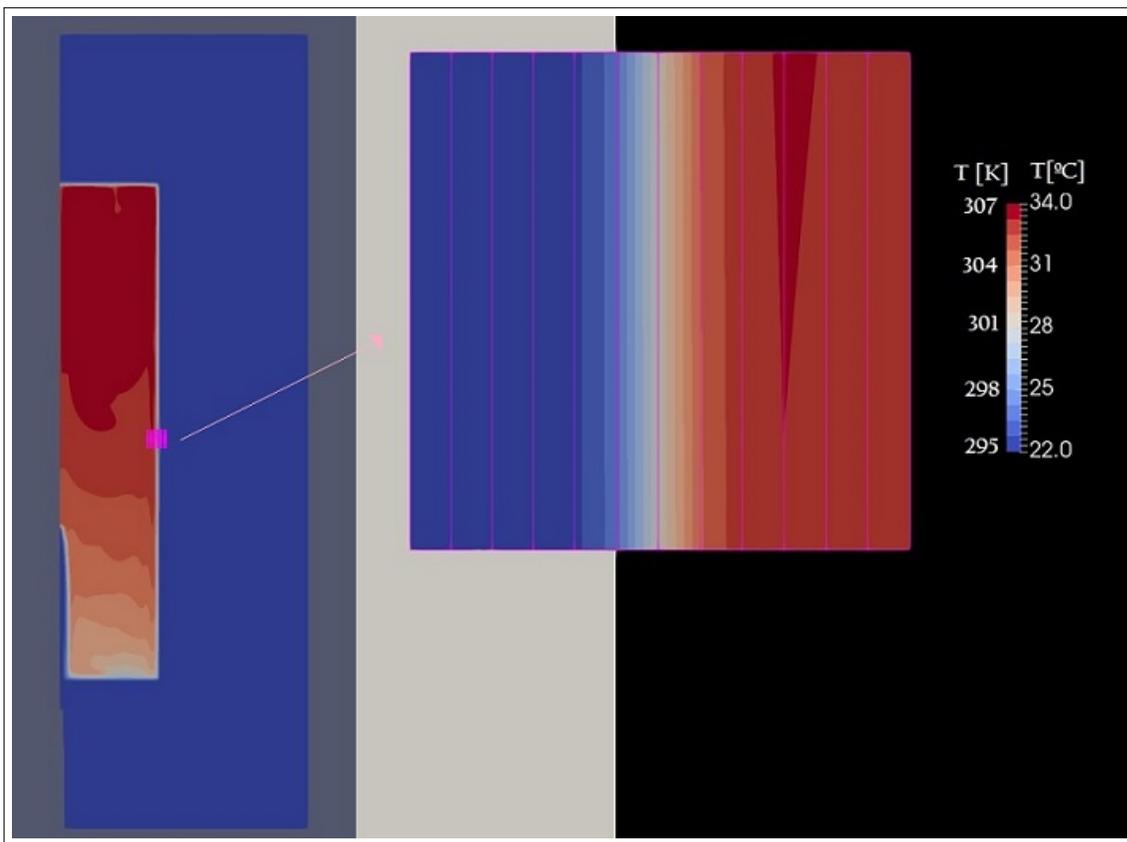


**Figura 3-5:** Evolución obtenida en OpenFOAM<sup>®</sup> durante la compresión y fase de mantenimiento del fluido a 500 MPa

Asimismo, la Figura 3-6 presenta en detalle el efecto de la transferencia de calor entre el fluido y la pared sólida.

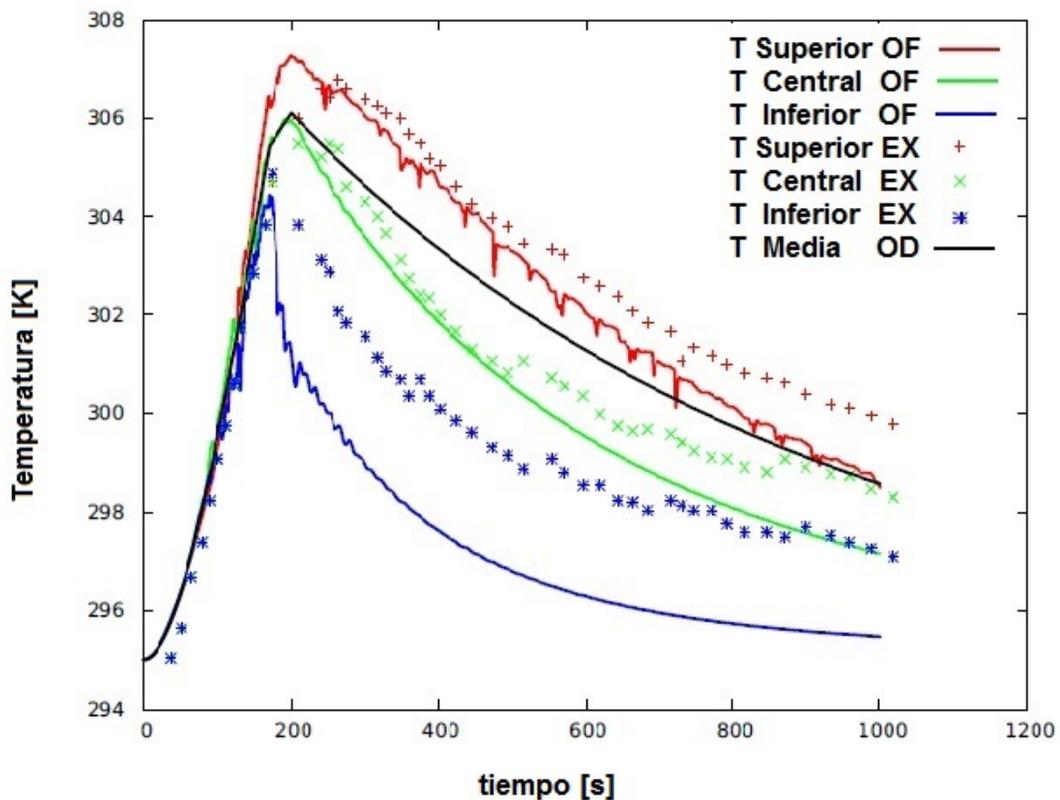
Para comparar los resultados de nuestras simulaciones, se utilizó el modelo de "fluido perfecto" entre los disponibles en el paquete OpenFOAM<sup>®</sup>. Los valores de presurización del fluido (agua) fueron extraídos escaneando los datos experimentales a partir del software libre DigitizeIt, DigitizeIt (2017), e ingresados como datos en OpenFOAM<sup>®</sup>.

La Figura 3-7 muestra concordancia cualitativa con los registros experimentales publicados por Hartmann y otros (2004). Los resultados experimentales de Hartmann y otros (2004) se muestran en la figura mencionada con la abreviatura (EX), nuestros resultados obtenidos mediante OpenFOAM<sup>®</sup> con la abreviatura (OF) en simetría de revolución y la temperatura media del caso 0D, de parámetros concentrados, obtenidos mediante software libre Octave



**Figura 3-6:** Conducción de calor en la pared metálica durante fase de mantenimiento del fluido a 500 MPa

v.4., Eaton y otros (2014). Tanto nuestra simulación como la de Hartmann y otros (2004) se realizaron bajo la suposición de simetría de revolución lo que no correspondió estrictamente a las condiciones del experimento dado que la geometría real no es simétrica y la posición del ingreso de fluido proceso no es centrada. Por esta razón, nuestra simulación y la de Hartmann y otros (2004) no fue posible reproducir con mucha precisión los resultados experimentales, notándose además que las mayores diferencias se encuentran en la zona inferior debido al efecto local del ingreso de fluido no centrado.



**Figura 3-7:** Validación de los resultados experimentales de Hartmann y otros (2004), los obtenidos mediante OpenFOAM® y la temperatura media del caso OD

## 3.2. Diseño de la geometría del equipo de APH marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo FPG9400:922

### 3.2.1. Estudio del caso Stansted Fluid Power Ltd. modelo FPG9400:922

En esta etapa del trabajo de tesis, se diseñó el cilindro encamisado acorde a las medidas de equipo e implementando el ingreso del fluido de presurización (agua) desde su parte inferior. Como herramienta de simulación, se utilizó como código base la aplicación *compressibleInterFoam* del paquete open source OpenFOAM®, desarrollada para simular flujo multifásico compresible. El modelo del fluido perfecto no permite ingresar valores definidos por mezclas de sustancias que no estén incorporadas en sus librerías y en particular el fluido de compresión utilizado en la etapa experimental se compone de una mezcla de agua destilada y propilenglicol (70:30v/v). Las mismas variables termofísicas y sus valores del caso OD (0 Dimensional) mencionadas en la Tabla 3-1.

La Figura 3.2.1 muestra la canasta real utilizada para llevar a cabo los ensayos presentados en la etapa experimental.



**Figura 3-8:** Vista de la posición radial de la canasta metálica utilizada en los ensayos experimentales

En el diseño de la geometría vertical del equipo marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo FPG9400:922 fue llevada a cabo mediante el software libre Gmsh<sup>®</sup>, Geuzaine y Remacle (2003). La malla generada fue de tipo uniforme y estructurada constituida por 465676 celdas y se utilizó una PC con 8 procesadores Intel<sup>®</sup> Core<sup>™</sup> I7 CPU 930 2.80 GHZ. Memoria 7,8 GB de RAM.

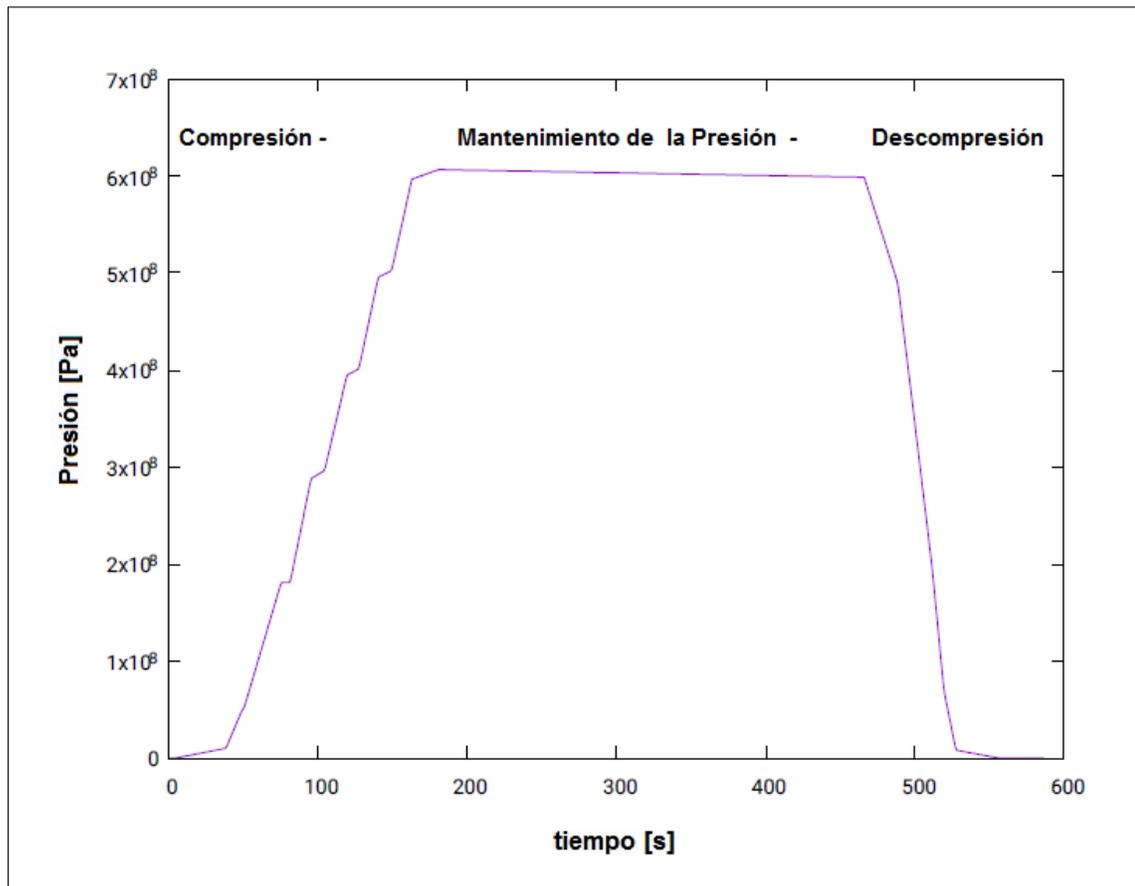
En particular, se adaptaron la cantidad y el diámetro de los orificios en la geometría de la canasta dado que no posee un patrón de perforaciones simétricas. El ingreso de fluido y su distribución se realizó a través de único orificio central y luego fue derivado por medio de tres orificios ubicados en la base de la canasta y por cuatro perforaciones laterales. En particular, se contemplaron las tres etapas del proceso: presurización, mantenimiento de la presión y descompresión durante el procesamiento por altas presiones en un equipo vertical de 2 l como el utilizado en la estudio experimental (marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo FPG9400:922). El código base *compressibleInterFoam* fue adaptado con el fin de resolver el problema acoplado de transferencia térmica entre el fluido y la pared metálica de acero, con un espesor de 30 mm. Para poder incluir esta región sólida en la simulación el metal fue representado como un fluido de viscosidad extremadamente alta y con las propiedades térmicas del acero.

Para cada proceso simulado de 586 s (para el primer uso del equipo de APH y su régimen térmico), se presurizó el fluido (agua) hasta alcanzar la presión deseada (600 MPa), mantenida durante 5 minutos para luego descomprimir hasta presión atmosférica. Para evidenciar el efecto de la carga (ágar como en la etapa experimental) durante el tratamiento por APH en el interior de la canasta metálica, se incorporó como tercer material (sólido) 360 mm

de largo por 40 mm diámetro. Las propiedades termofísicas de este sólido fueron similares a las del agua pero sin contemplar la compresión del material en el proceso de APH. la incorporación de un tercer material representó asimismo una nueva capacidad del modelo.

Se utilizó la evolución de la presión obtenida de los ensayos experimentales y se adaptó el escalonamiento de la presión contemplando los tiempos de cada etapa. Si bien en los ensayos experimentales, el fluido de compresión utilizado fue una mezcla de agua:propilenglicol (70:30v/v) , para las simulaciones se continuó implementando el modelo de fluido de compresión con agua a 600 MPa como la máxima presión utilizada experimentalmente. Inicialmente a 20 °C y las temperaturas del fluido de presurización en 6 posiciones internas: Superior, Central, Inferior y en posiciones radiales ( $r= 0$  mm y 35 mm). Para evidenciar el efecto carga y su performance registró la evolución térmica en  $r= 14$  mm.

La Figura **3-9** muestra la evolución de la presión del fluido (agua) durante el procesamiento a 600 MPa como condición impuesta y dato necesario para OpenFOAM<sup>®</sup>, destacándose el escalonamiento de la rampa de compresión y las dos etapas siguientes del proceso de APH. Para el primer uso simulado, la temperatura inicial del fluido de compresión (agua) ingresante desde la parte inferior de la canasta y el ágar se encontraron a 20 °C. Es importante destacar, que solamente el fluido tiene comportamiento laminar en todo el proceso, excepto en esta instancia dónde se manifiesta con un  $Re= 3000$  hasta que termina de ingresar todo el fluido. En el inicio de la compresión y conforme el fluido fluye, la parte que está en contacto directo con la superficie se adhiere a ésta por los efectos de la viscosidad y no se desliza, provocando una velocidad de cero en esta zona. Esto se conoce como condición de no deslizamiento. Esa capa adherida a la superficie transmite la desaceleración a la capa adyacente y ésta a



**Figura 3-9:** Evolución de la presión del fluido (agua) durante el procesamiento a 600 MPa como condición impuesta y dato necesario para OpenFOAM<sup>®</sup>



**Figura 3-10:** Inicio de la etapa de compresión para el primer uso simulado

la que sigue y así sucesivamente debido a la interacción de las fuerzas viscosas existentes, desarrollándose un perfil de velocidades.

A la par de la capa límite de velocidad, también se desarrolla una capa límite térmica. Las partículas del fluido adyacentes a la superficie alcanzarán el equilibrio y tomarán la temperatura de la superficie. Estas partículas intercambiarán energía con las partículas más cercanas y así sucesivamente. Al igual que con la velocidad, se creará un perfil de temperaturas en el flujo, que va desde la temperatura de la superficie hasta la del fluido. Aquella región del flujo donde la variación de la temperatura en dirección normal a la superficie es significativa, se conoce como la capa límite térmica. El grosor de la capa límite de temperatura se incrementará conforme avanza el fluido, debido a que los efectos de la transferencia de calor se presentan a distancias más grandes de la superficie de contacto.

Las Figuras **3-10**, **3-11**, **3-12** y **3-13** corresponden a los cambios de temperatura y el campo de velocidades del fluido (agua) observados durante la etapa inicial de la compresión para la canasta sin carga y con carga durante el proceso de APH.

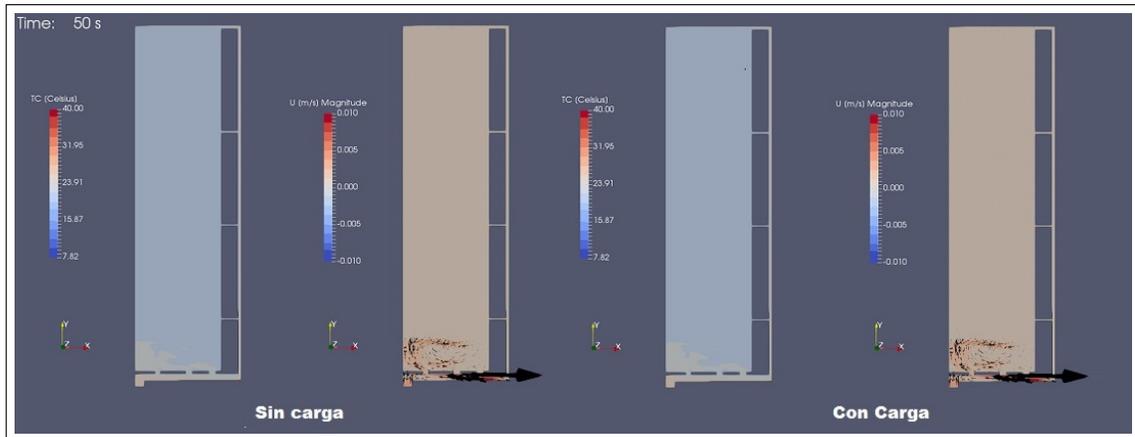


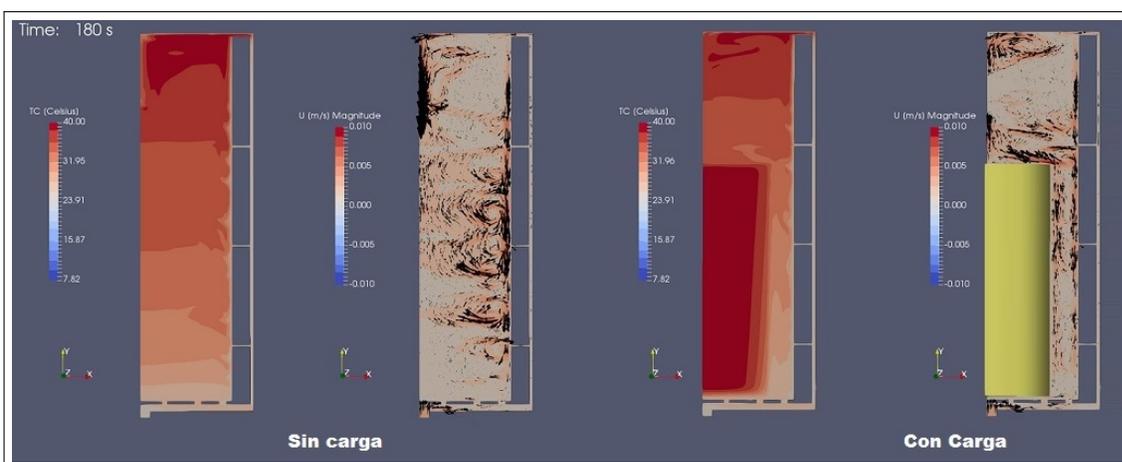
Figura 3-11: Tiempo 50 s desde el inicio del proceso de APH



Figura 3-12: Tiempo 100 s desde el inicio del proceso de APH

Se observó la distribución del fluido casi uniforme en la dirección radial pero cambia en la dirección vertical. También se observa descenso del fluido y su temperatura por el efecto de conducción de calor en la pared metálica de la canasta, de tal forma incorporando fluido con menor temperatura en la zona inferior.

Asimismo, se evidenció el movimiento del flujo longitudinal pero con recirculaciones en la zona superior e inferior. En el final de la etapa de compresión, se observó que el fluido contenido en la sección superior de la canasta alcanzó 37 °C como temperatura máxima. El



**Figura 3-13:** Tiempo 180 s desde el inicio del proceso de APH

efecto de compresión genera e induce una fuente de calor, por lo que la temperatura general es más alta y también lo son sus gradientes de temperatura. El movimiento de fluido y sus recirculaciones presentaron un rango de velocidades de: 0,01 m/s. En el caso de la condición de la canasta con carga de producto, se observó una mayor temperatura en el centro del producto respecto al fluido circundante.

En el inicio del mantenimiento de la presión a 600 MPa ya casi todo el fluido contenido presenta temperatura máxima alcanzada. Se evidenciaron zonas de temperatura en dirección vertical, si bien se presentó una mayor estratificación es menor a la observada a 200 s y disminución de la velocidad del fluido con recirculación en pared. La zona superior continua siendo la zona de mayor temperatura en la condición de canasta vacía y en la condición de llenado, el incremento de temperatura se registró en la zona central. La estratificación de temperatura se redujo en la cantidad de zonas de menor temperatura en dirección vertical, menor velocidad y recirculación de fluido.

Las Figuras **3-14**, **3-15**, **3-16** y **3-17** corresponden a los cambios de temperatura y el campo

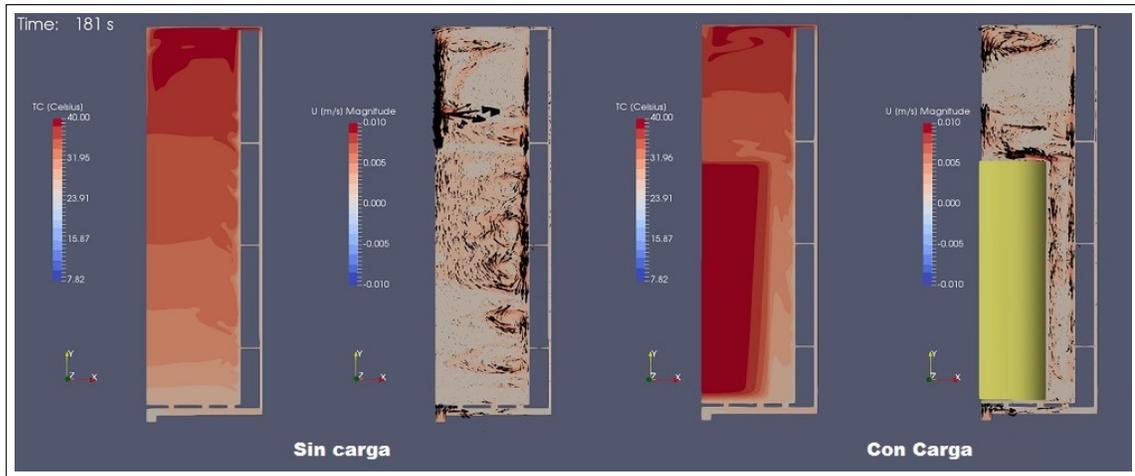


Figura 3-14: Inicio de la etapa de mantenimiento de la presión de 600 MPa, tiempo 181 s

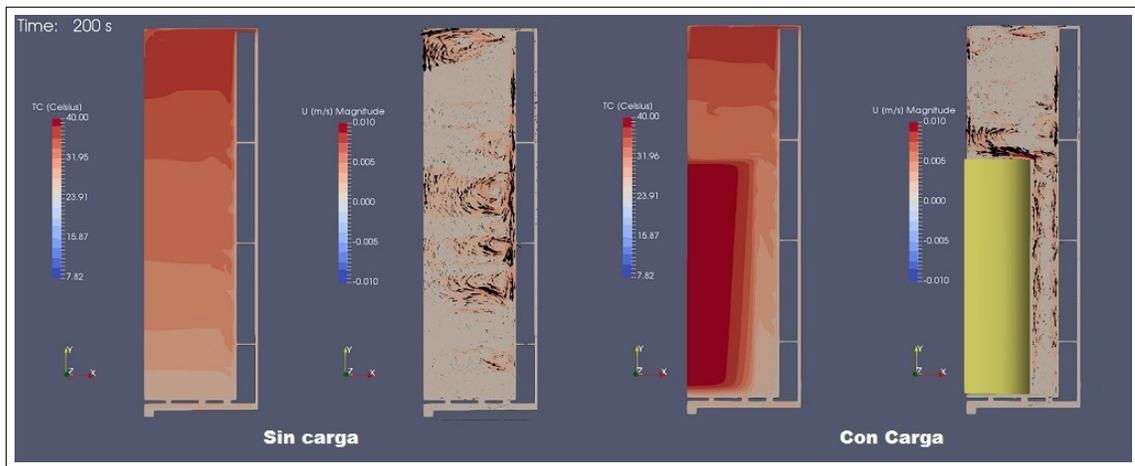
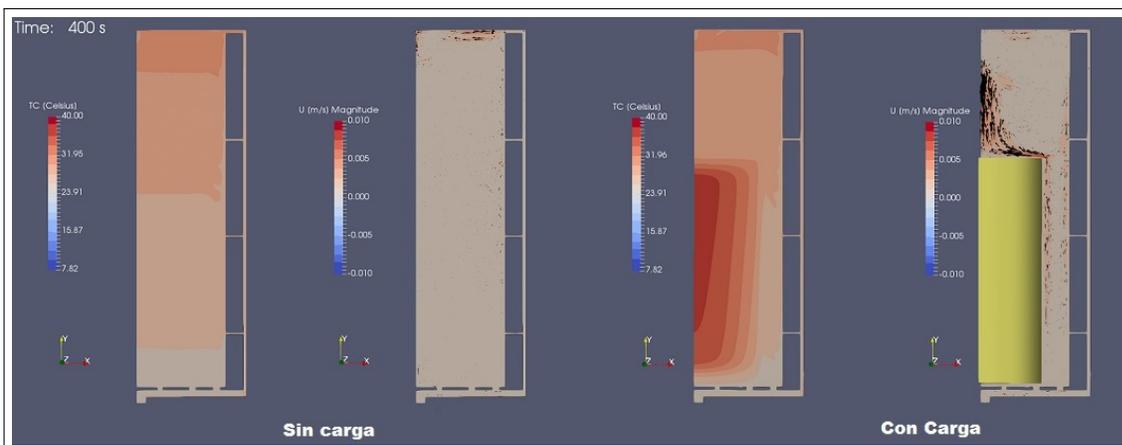
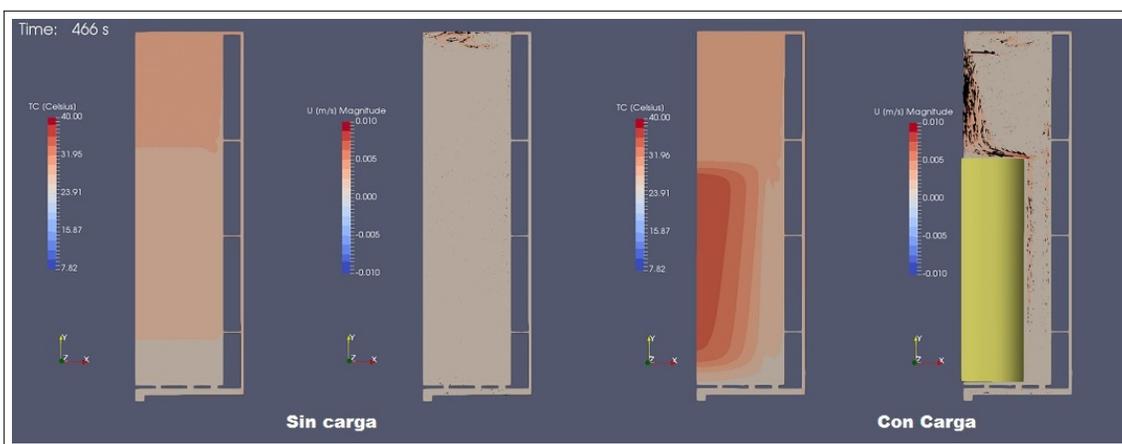


Figura 3-15: Tiempo 200 s desde el inicio del proceso de APH

de velocidades del fluido (agua) observados durante la etapa de mantenimiento de la presión.



**Figura 3-16:** Tiempo 400 s desde el inicio del proceso de APH



**Figura 3-17:** Tiempo 466 s desde el inicio del proceso de APH

En el final de la etapa de mantenimiento, se observó el fluido de proceso a temperaturas por debajo de los 30 °C para la condición de canasta vacía mientras que para la condición de carga y en particular en la zona central se observaron temperaturas menores a 40 °C. Al comparar el final de esta etapa respecto el final de la compresión a los 181 s, las diferencias térmicas y de velocidad son más pronunciadas en el final de la etapa de compresión.

Las Figuras 3-18, 3-19, 3-20 y 3-21 representan la etapa de descompresión, como última etapa del ciclo de APH y el efecto del descenso térmico. Rápidamente el fluido (agua) se

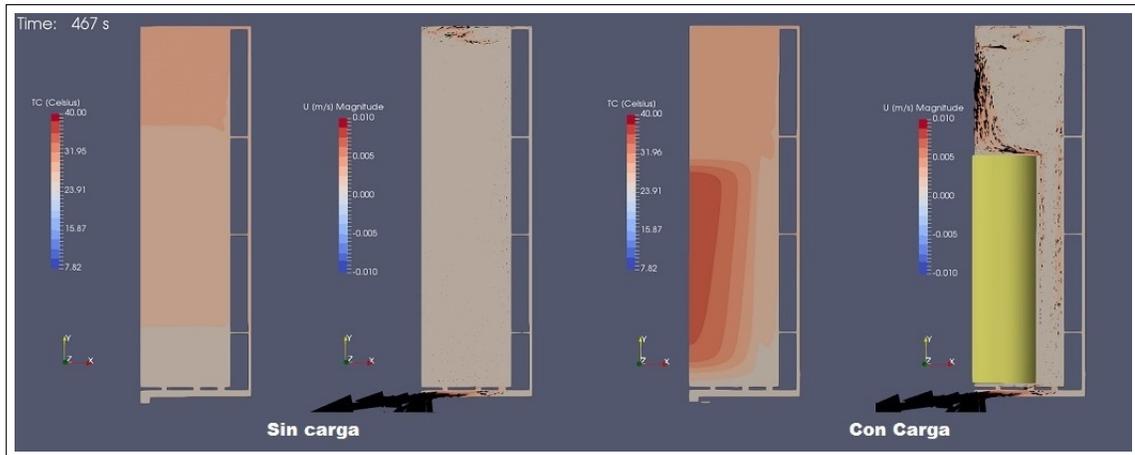


Figura 3-18: Tiempo 467 s desde el inicio del proceso de APH

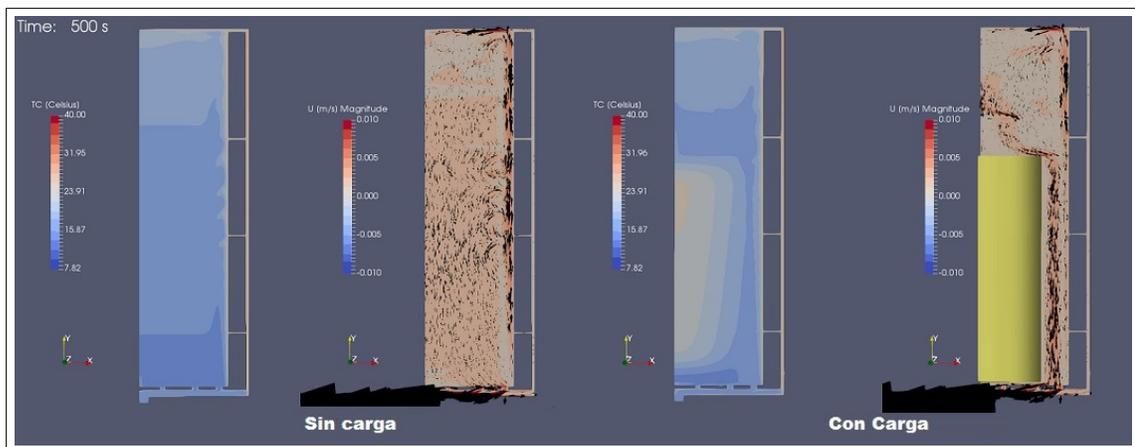
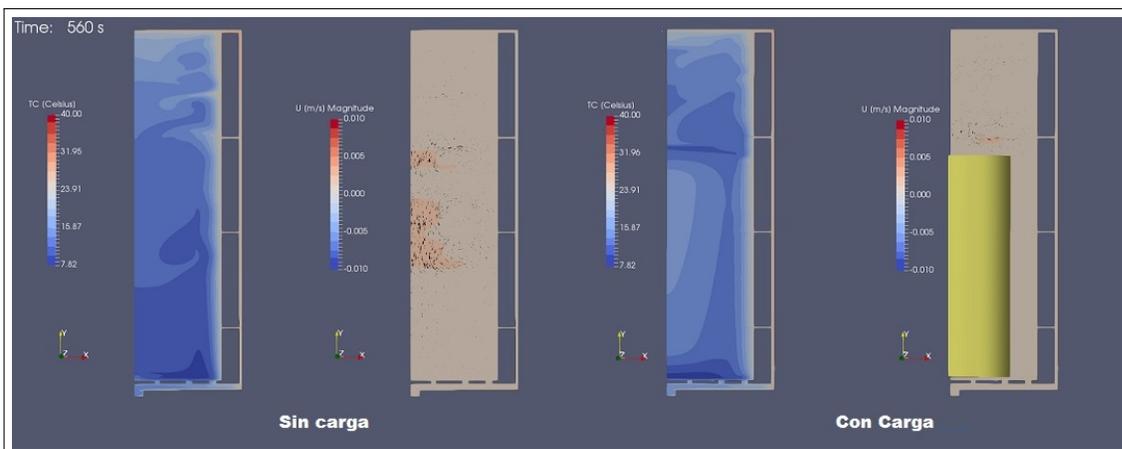


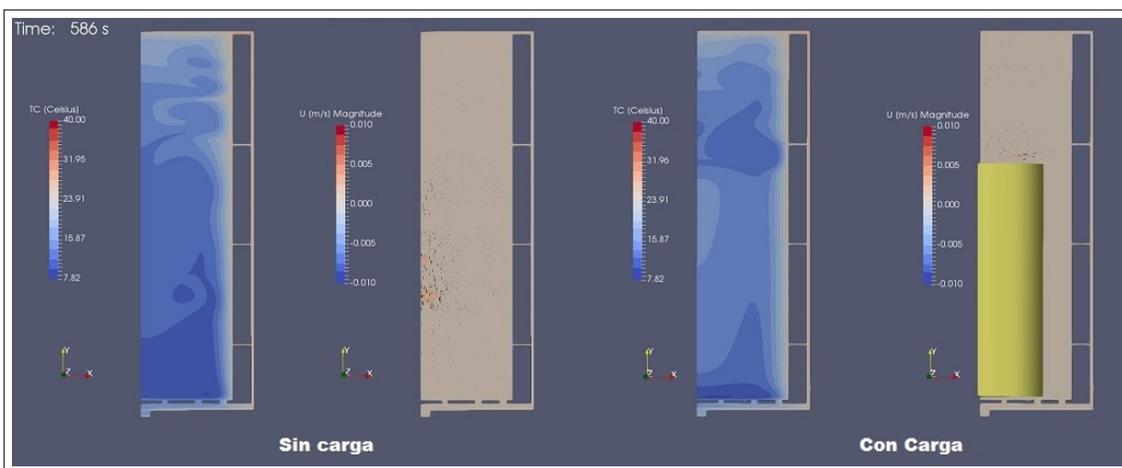
Figura 3-19: Tiempo 500 s desde el inicio del proceso de APH

enfria y desciende hacia el interior de la canasta , la recirculación del mismo se sitúo en la zona superior. Además se observaron zonas de estratificación térmica del fluido de proceso dentro de la canasta, cuya zona inferior finaliza a casi 10 °C.

Las Figuras 3-18, 3-19, 3-20 y 3-21 corresponden a los cambios de temperatura y el campo de velocidades del fluido (agua) observados durante la etapa de descompresión del primer uso del equipo de APH y ambas condiciones de carga.



**Figura 3-20:** Tiempo 560 s desde el inicio del proceso de APH

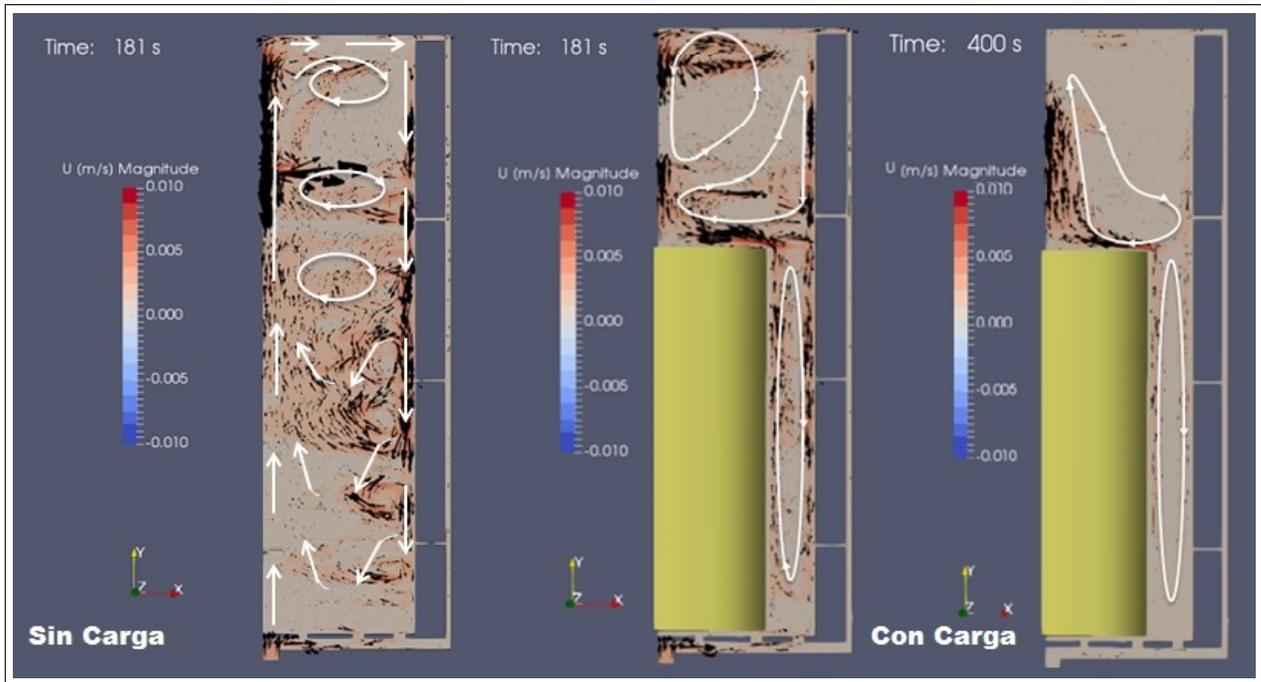


**Figura 3-21:** Tiempo final del proceso de APH a 586 s

La Figura **3-22** tiene por objetivo evidenciar los patrones de flujo observados para los dos casos simulados de carga y primer uso del equipo.

#### **Situación sin carga:**

El fluido de proceso (agua) ingresó desde la parte inferior del cilindro del equipo a 20 °C, incrementando su temperatura hasta alcanzar la temperatura máxima al finalizar la etapa de compresión. Sin bien, se observó la temperatura más alta en la zona superior del cilindro, también se observó la evolución térmica T- Central  $r=0$  mm mayor a la posición T-Superior



**Figura 3-22:** Patrones de flujo observado sin y con carga de ágar simulados

$r = 35$  mm, también observado en el Estudio Experimental. En la zona central, el fluido también recircularía pero sin posibilidad a descender con facilidad. Este fenómeno corresponde a cambios en las estructuras de flujo más o menos estables y dichas estructuras pueden relacionarse con la cantidad de calor transferido entre los puntos más calientes hasta los puntos más fríos. La convección de Bénard, o de Rayleigh-Bénard, es un tipo de convección que se da en espacios confinados cuando el gradiente de temperatura en el fluido produce una estratificación inestable de la densidad en dirección vertical.

Por otro lado, la evolución térmica en la posición T-Inferior para  $r = 0$  y 35 mm fueron similares a la evolución térmica correspondiente al fluido de compresión (T-Proceso), también observado en Etapa Experimental. El fluido, menos denso pero más caliente, se enfrenta a al fluido en contacto con la pared de la canasta metálica de menor temperatura. El fluido

intentará descender, pero recircula en esta misma zona, (efecto también observado por Hartmann y otros (2004)). Por otro lado, se evidenció algo de fluido descendente hasta la parte inferior disminuyendo su temperatura por el efecto de la conducción y pérdida de calor en la pared metálica, se mezclará en la zona inferior para luego ascender.

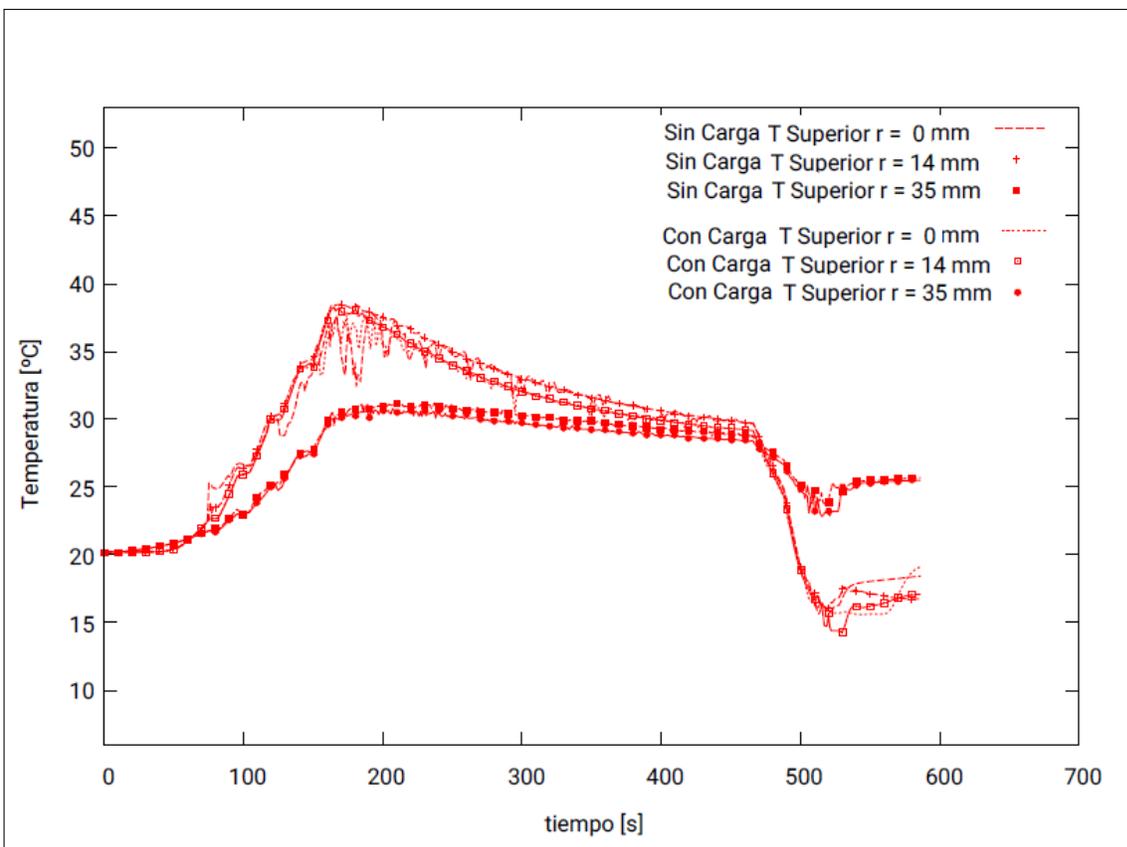
### **Situación con carga:**

La Figura **3-22** también presenta patrones de flujo a 180 y 400 s, donde el espacio de la canasta metálica es ocupado mayoritariamente por el ágar (360 mm de largo x 40 mm de diámetro al igual que lo informado en el estudio experimental) modificando el patrón de flujo durante todo el proceso de APH desde su comienzo. Se observaron tres zonas donde el fluido recircula. Sumado a lo anterior, en la zona superior del sólido (ágar), el fluido incrementó su temperatura por efecto de la compresión adiabática por encima del registro de la posición Superior  $r=0$  mm. Los autores Otero y otros (2000) también observaron experimentalmente y comprobaron en sus simulaciones el registro térmico de muestras de ágar superó la temperatura de fluido de compresión al trabajar 350 MPa, utilizando agua como fluido de compresión y una temperatura inicial de 20 °C. Vale recordar que la zona superior recibe de fluido “más frío” proveniente del contacto con la pared metálica. Luego de la compresión y en mantenimiento de la presión (400 s) solamente se observaron dos zonas de fluido recirculando y el ágar que comenzará a transferir calor hacia el fluido de compresión. En las siguientes Figuras **3-23**, **3-24** y **3-25** presentadas en forma separadas, las evoluciones térmicas del primer uso del equipo en la condición de canasta vacía (sin carga) y carga para

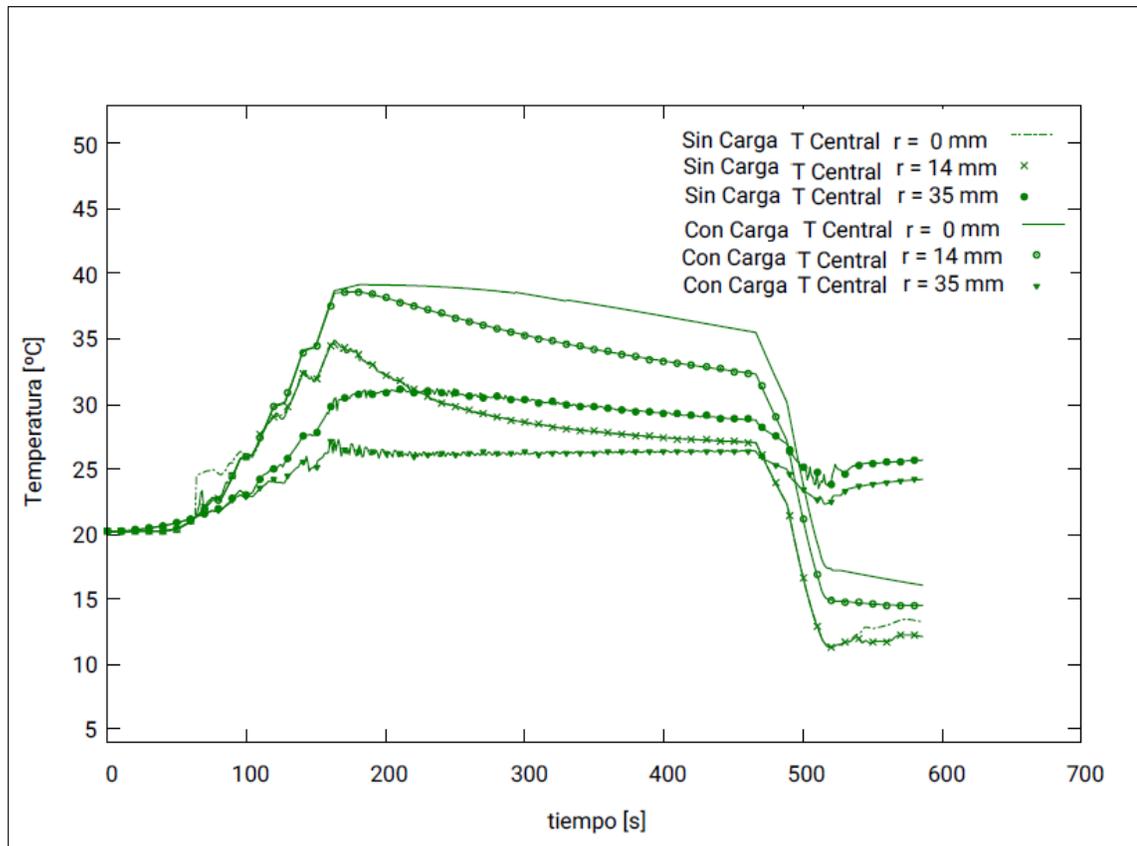
las posiciones Superior, Central e Inferior en  $r = 0, 14, 35$  mm a 600 MPa y 5 minutos de mantenimiento de la presión. De las gráficas anteriores se pueden observar, las diferencias térmicas en las posiciones Superior, Central e Inferior durante ambas condiciones de uso y carga antes mencionado para los radios evaluados. La temperatura inicial del fluido fue de 20 °C.

El comportamiento del fluido en la posición T-Superior durante los primeros segundos sufre mayores variaciones por la presencia de vórtices. En particular se destacan las diferencias observadas a  $r = 0$  mm respecto de  $r = 14$  mm, siendo esta última, la posición con mayor incremento térmico. T-Superior en  $r = 14$  mm con carga (sólo registró el fluido de proceso dada su ubicación), fue semejante a la posición superior  $r = 0$  mm sin carga. Para los radios 35 mm se observó un menor descenso térmico dada la cercanía de la pared metálica de la canasta. Durante el mantenimiento de la presión, se demostró una mayor pérdida de calor, dado el descenso térmico en los radios evaluados de 0 y 14 mm. En el final del procesamiento, se evidenció el comportamiento marcado y diferente de las posiciones, donde los radios menores presentaron un marcado descenso térmico dado el incremento de temperatura obtenido en etapas previas.

El comportamiento del fluido en la posición T-Central durante los primeros segundos sufre menos variaciones por la presencia de vórtice. Las diferencias en los perfiles térmicos observados durante el mantenimiento de la presión presentaron mayores incrementos térmicos en la condición de carga para  $r = 0$  y 14 mm, dada la transferencia del calor desde el material sólido (ágar) hacia el fluido de proceso (agua) frente a la condición sin carga evaluada y las posiciones superiores antes mencionadas. En el final del procesamiento, se evidenció el com-



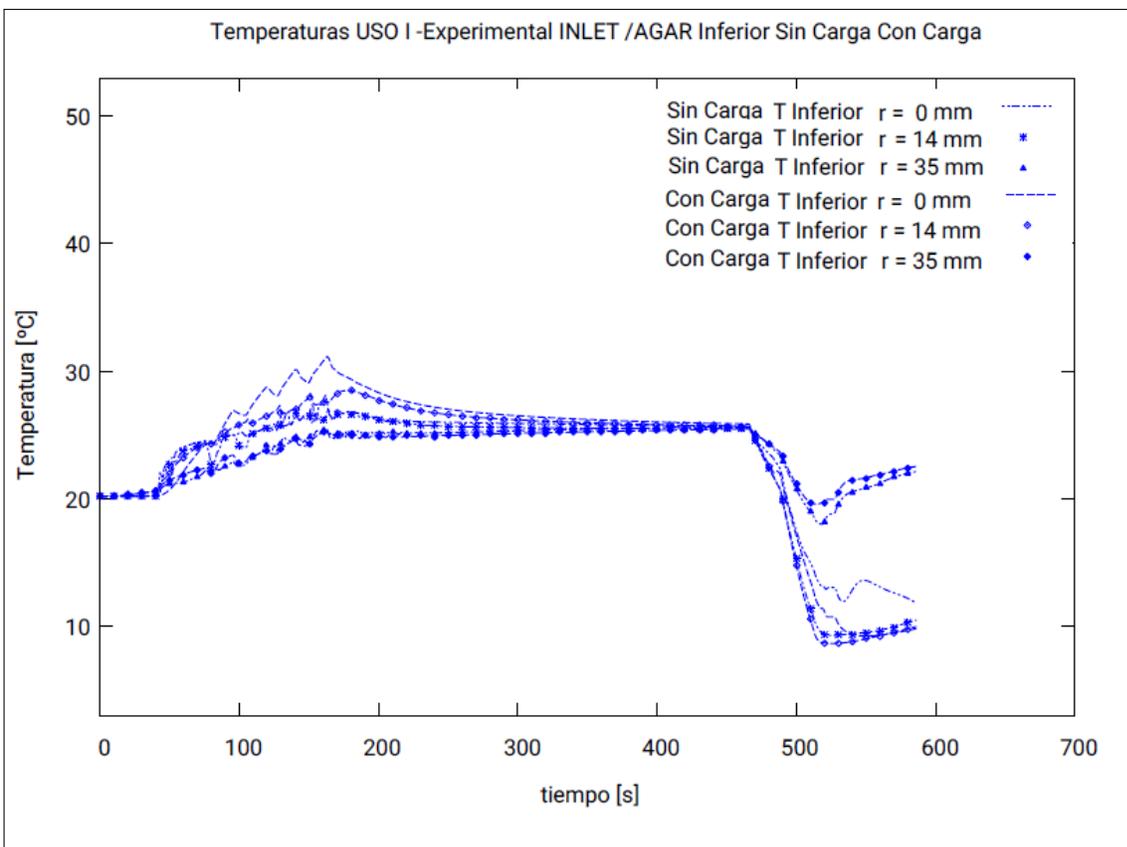
**Figura 3-23:** Evolución térmica de las posiciones superiores para el Uso I



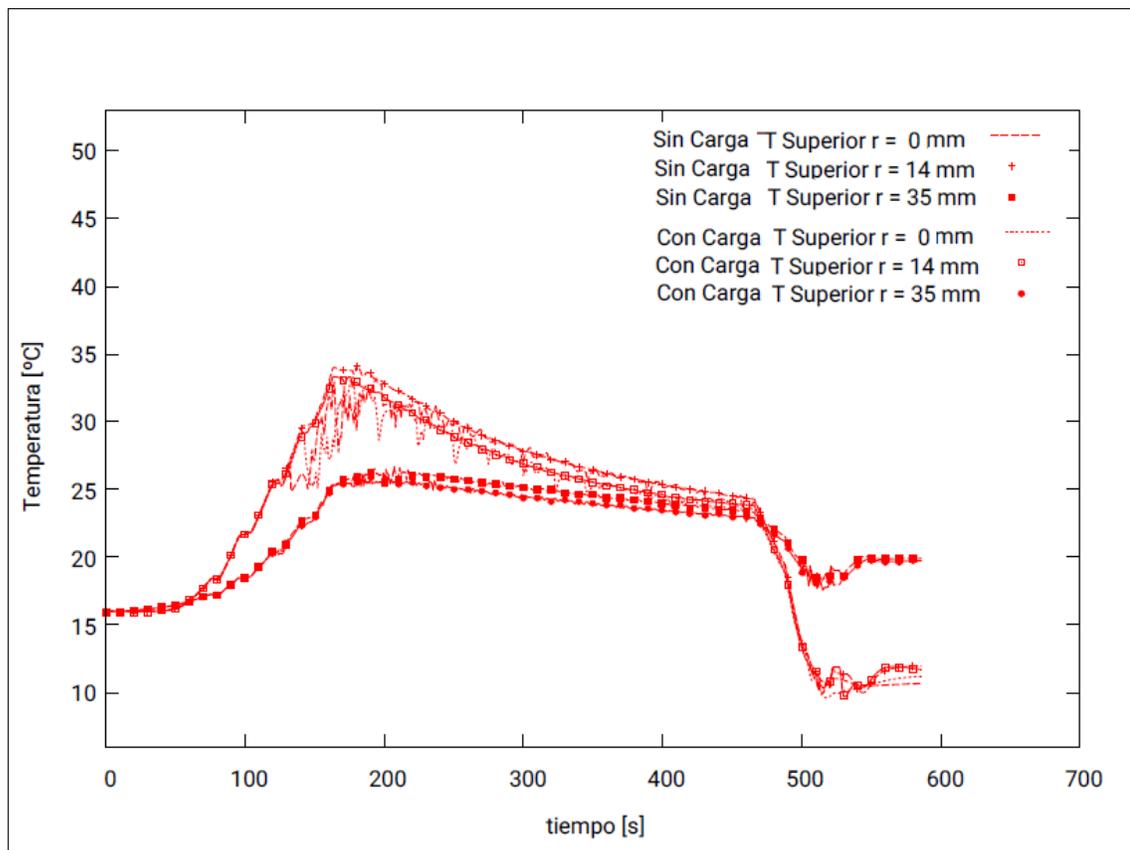
**Figura 3-24:** Evolución térmica de las posiciones centrales para el Uso I

portamiento marcado y diferente de las posiciones, donde los radios menores presentaron un marcado descenso térmico dado el incremento de temperatura obtenido en etapas previas.

El comportamiento del fluido en la posición T-Inferior durante los primeros segundos sufre algunas variaciones por la presencia de vórtices debido a que esta posición se encuentra cercana al ingreso y egreso del fluido de proceso y su semejanza en el comportamiento. Durante el mantenimiento de la presión, y para todos los radios evaluados la pérdida de calor fue menor respecto de las anteriores posiciones evaluadas. En el final del procesamiento, se evidenció el comportamiento marcado y diferente de las posiciones, también se evidenció el descenso térmico dado el incremento de temperatura obtenido en etapas previas.



**Figura 3-25:** Evolución térmica de las posiciones inferiores para el Uso I



**Figura 3-26:** Evolución térmica del las posiciones superiores durante el régimen térmico

Las siguientes Figuras **3-26**, **3-27** y **3-28** fueron obtenidas de las simulaciones del equipo en régimen térmico (luego del Uso I) para ambas condición de carga evaluadas en las posiciones Superior, Central e Inferior en  $r = 0, 14, 35$  mm a 600 MPa y 5 minutos de mantenimiento de la presión. Si bien el fluido (agua) ingresó a 16 °C como temperatura inicial del proceso en régimen térmico obtenida de datos experimentales, el comportamiento térmico del fluido (agua) en las dos condiciones de llenado (sin y con carga) presentó similitudes respecto del primer uso de equipo, sólo que a menores temperaturas.

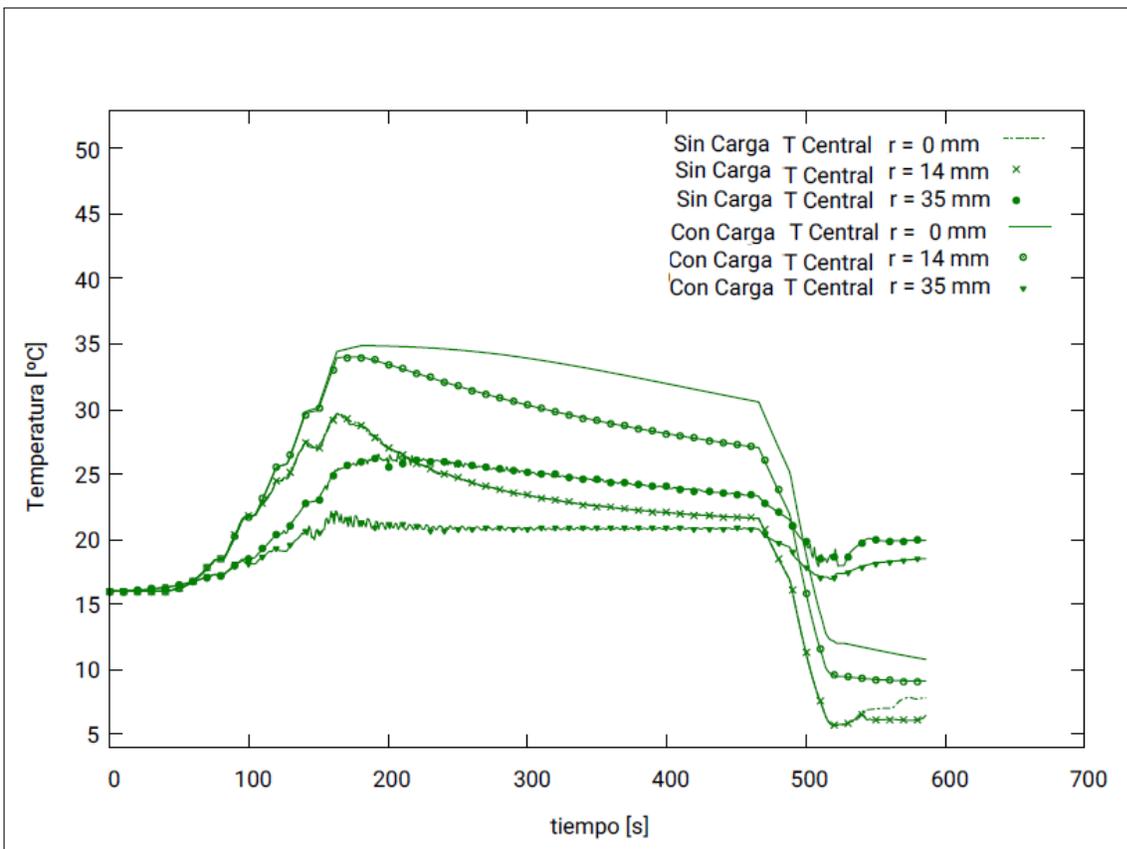
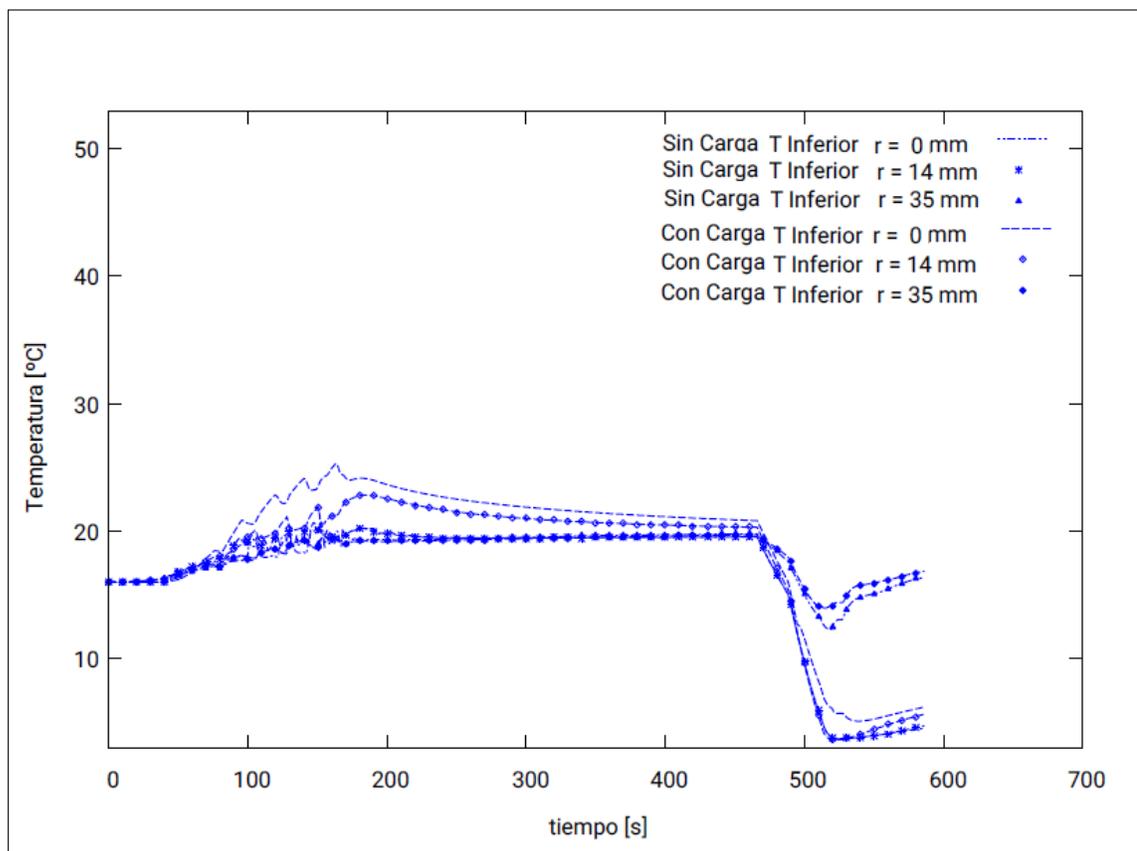


Figura 3-27: Evolución térmica de las posiciones centrales durante el régimen térmico



**Figura 3-28:** Evolución térmica del las posiciones inferiores durante el régimen térmico

### Principales conclusiones del estudio de modelado

A partir del modelado y de la simulación del proceso de APH a 600 MPa con 5 minutos de mantenimiento de presión y para en ambas condiciones de llenado (con y sin carga de producto) se logró una mejor interpretación de los ensayos experimentales.

En la condición de canasta vacía o sin carga de producto, se observó la temperatura más alta en la zona superior, también observado en el Estudio Experimental. En particular, en la zona central, el fluido recircularía pero sin posibilidad a descender con facilidad. Este fenómeno corresponde a cambios en las estructuras de flujo más o menos estables y dichas estructuras pueden relacionarse con la cantidad de calor transferido entre los puntos más calientes hasta los puntos más fríos. Por otro lado, la evolución térmica en la posición T-Inferior para  $r=0$  y 35 mm resultaron similares a la evolución térmica correspondiente al fluido de compresión (T-Proceso) de la etapa experimental. El fluido, menos denso pero más caliente, se enfrenta a al fluido en contacto con la pared de la canasta metálica de menor temperatura. El fluido intentará descender, pero recircula en esta misma zona. Asimismo, se evidenció parte del fluido descendente hasta la parte inferior disminuyendo su temperatura por el efecto de la conducción y pérdida de calor en la pared metálica, donde se mezclará (en esta zona inferior) para luego ascender.

Para el segundo caso evaluado, el espacio de la canasta metálica ocupado mayoritariamente por el ágar modificó el patrón de flujo durante todo el proceso de APH desde su comienzo. Se observaron tres zonas donde el fluido recircula, en la zona superior del sólido (ágar), el fluido incrementó su temperatura por efecto de la compresión adiabática por encima del registro de

la posición Superior  $r= 0$  mm. Para los radios 35 mm se observó un menor descenso térmico dada la cercanía de la pared metálica de la canasta. Durante el mantenimiento de la presión, se demostró una mayor pérdida de calor, dado el descenso térmico en los radios evaluados de 0 y 14 mm. En el final del procesamiento, se evidenció el comportamiento marcado y diferente de las posiciones, donde los radios menores presentaron un mayor descenso térmico dado el incremento de temperatura obtenido en etapas previas.

Como trabajos a futuro, se desea validar experimentalmente estas simulaciones, optimizar las rampas de compresión/descompresión y adicionar compensaciones térmicas frente a la pérdida de calor observadas.

# Capítulo 4

## Conclusiones Generales

El perfil heterogéneo de temperaturas medido en el interior del cilindro del equipo APH marca Stansted Fluid Power Ltd. modelo Pressure Iso-lab System FPG9400:922 disponible en el Instituto Tecnología de Alimentos de INTA, resultó similar a los perfiles térmicos informados para equipos de escala similar utilizados en estudios publicados en la literatura abierta.

En los diferentes usos del equipo APH, la parte superior de la canasta metálica dentro del cilindro de alta presión presentó un mayor incremento de temperatura respecto a las dos posiciones en la parte inferior del cilindro (posición central  $r=0$  y posición próxima a la pared del cilindro  $r=35\text{mm}$ ). En este sentido, durante la compresión se desarrolló un campo de velocidades del fluido por efecto de la convección forzada, mientras que durante la fase de mantenimiento de la presión se produjo el fenómeno de convección natural. El movimiento del fluido de compresión genera condiciones térmicas no uniformes, ya que disminuye el movimiento convectivo.

A su vez, en la posición cuyo radio corresponde al centro de la canasta ( $r= 0$  mm), se obtuvo un mayor incremento de temperatura que en la posición lateral ( $r= 35$ mm). Esto puede deberse al comportamiento del fluido por su proximidad a la pared metálica de la canasta y a la pérdida de calor por la pared del cilindro de alta presión.

El aumento rápido de la temperatura del fluido en la etapa de compresión tuvo como contrapartida un descenso rápido de la misma durante la etapa de descompresión. Luego de esta etapa se observó que la temperatura del fluido fue ligeramente inferior a la inicial, debido a las propiedades termodinámicas del fluido, a la velocidad de compresión y de descompresión y a la pérdida de calor a través de la pared del cilindro.

En la bibliografía consultada no se encontraron resultados correspondientes al estudio del uso consecutivo del equipo APH, pero en el presente trabajo se observó que el equipo utilizado requirió como mínimo un uso sin carga de producto en la canasta metálica para su puesta en régimen térmico.

Los resultados del estudio con y sin carga en la canasta metálica, evidenciaron la influencia del factor nivel de presión y posición dentro del cilindro de alta presión para sus niveles más altos de presión (600 MPa). Se destaca que el incremento de la temperatura de fluido en la etapa de compresión ( $\Delta T_1, \Delta T_2$ ), se manifestará luego en un marcado descenso térmico ( $\Delta T_3, \Delta T_4$ ). A su vez, la temperatura en el ingreso del fluido de compresión ( $20^\circ\text{C}$ ) para el Uso I resultó diferente a la correspondiente al Uso III ( $16^\circ\text{C}$ ).

En los diferentes estudios correspondientes a la etapa experimental, los factores nivel de presión y posición fueron los que determinaron los mayores efectos sobre el perfil térmico, seguido por los factores carga y uso. En el caso de la condición sin carga del cilindro, la

diferencia de temperatura para el fluido de compresión fue mayor en relación a la condición con carga. En este sentido, el trabajo de modelado y simulación permitió comprender el procesamiento de un alimento sólido durante el tratamiento por APH.

A su vez, la utilización de la metodología pTTI's en combinación con la cuantificación de la concentración de [SH-L] de la amilasa fúngica no sólo permitió evaluar diferencias entre las muestras procesadas en cada posición fija, sino también variaciones del perfil térmico generado dentro del equipo y sus diferencias entre los usos ensayados. Luego de esta validación, se demostró que es necesario al menos dos usos consecutivos del equipo al evidenciar que no se observaron diferencias significativas en las muestras analizadas ubicadas las posiciones Superior y Central. Los resultados obtenidos son muy prometedores y se espera continuar las investigaciones para optimizar la sensibilidad de la metodología propuesta a diferentes presiones. Sumado a lo anterior, se espera poder procesar muestras de extractos enzimáticos en la carga de un alimento para evaluar su performance.

El modelado y simulación del proceso de APH permitió interpretar el comportamiento del fluido de compresión (agua) mediante la generación de un modelo OD. Fue posible obtener un modelo que interprete los cambios térmicos conforme aumenta la presión y de esta manera poder ajustar los parámetros para la subsiguiente modelización multidimensional. Luego y a partir de la implementación de un código base como la aplicación *compressibleInterFoam* del paquete open source OpenFOAM® desarrollada para simular flujo multifásico compresible fue posible capturar el efecto del calentamiento por compresión, la conducción en el sólido y la convección natural debido a gradientes térmicos. Se diseñó la geometría del equipo Stansted Fluid Power Ltd. High Pressure Iso-Lab System, modelo FPG9400:922 (Stansted,

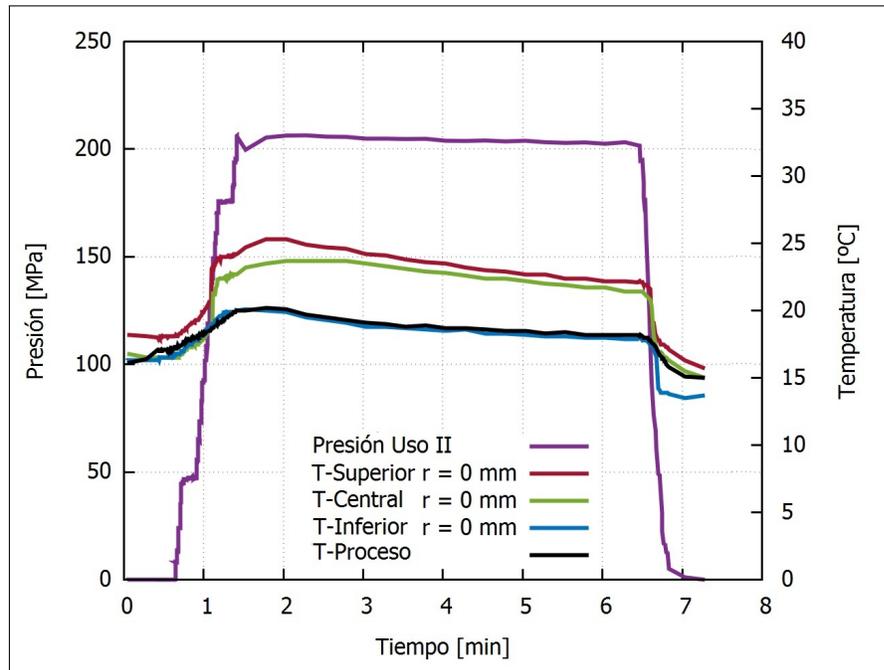
Reino Unido) y simuló el comportamiento del fluido en condición de canasta vacía y con el agregado de otro material sólido de propiedades similar al ágar para validar resultados obtenidos sólo a 600 MPa. La labor realizada en esta etapa de modelado y simulación permitió comprender e interpretar el efecto observado a nivel experimental, a diferentes posiciones en el interior del cilindro y carga durante su procesamiento por APH.

# Apéndice A

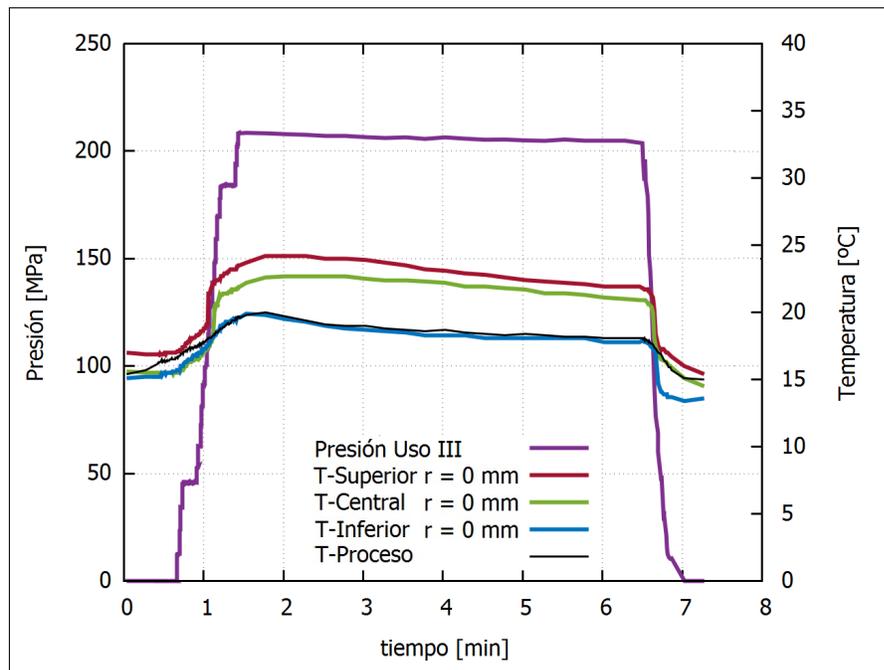
## Anexo Experimental: Etapa 2 y Etapa 3

**A.1. Etapa 2: Distribución de temperatura del fluido de presurización luego de la puesta en régimen térmico, sin carga de alimento en la canasta metálica**

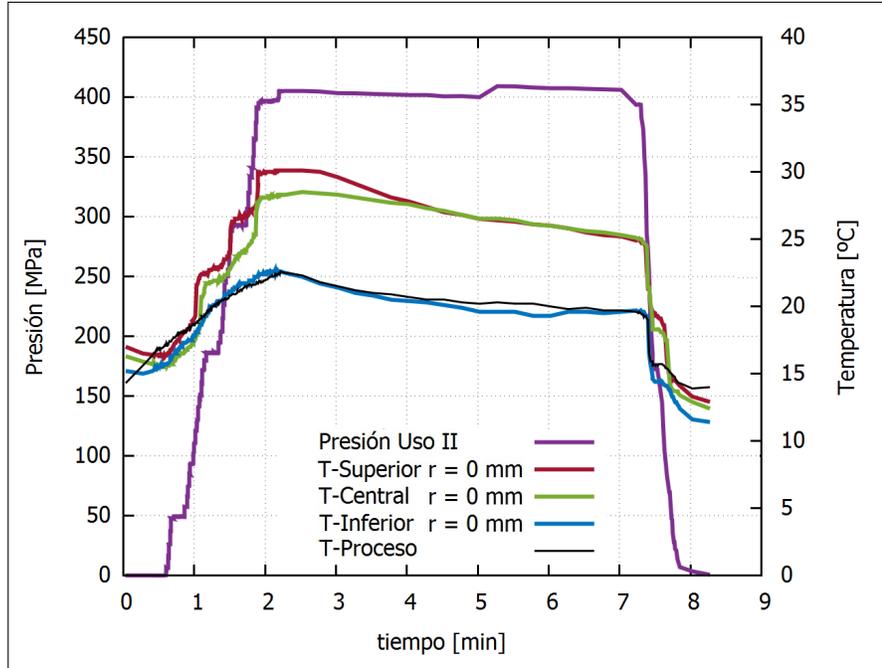
**Curvas registradas a  $r=0$  mm** Las siguientes Figuras A-1, A-2, A-3, A-4 A-5, A-6 corresponden al registro de una repetición a las presiones antes mencionadas y los usos consecutivos del equipo de APH.



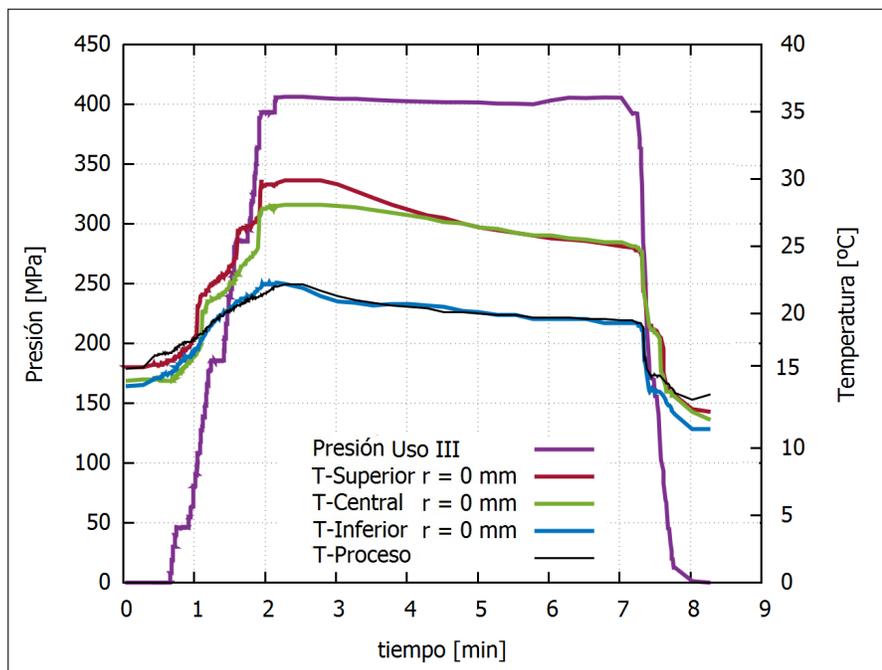
**Figura A-1:** Curvas experimentales con  $r = 0$  mm correspondientes al Uso II del equipo APH y tratamiento  $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



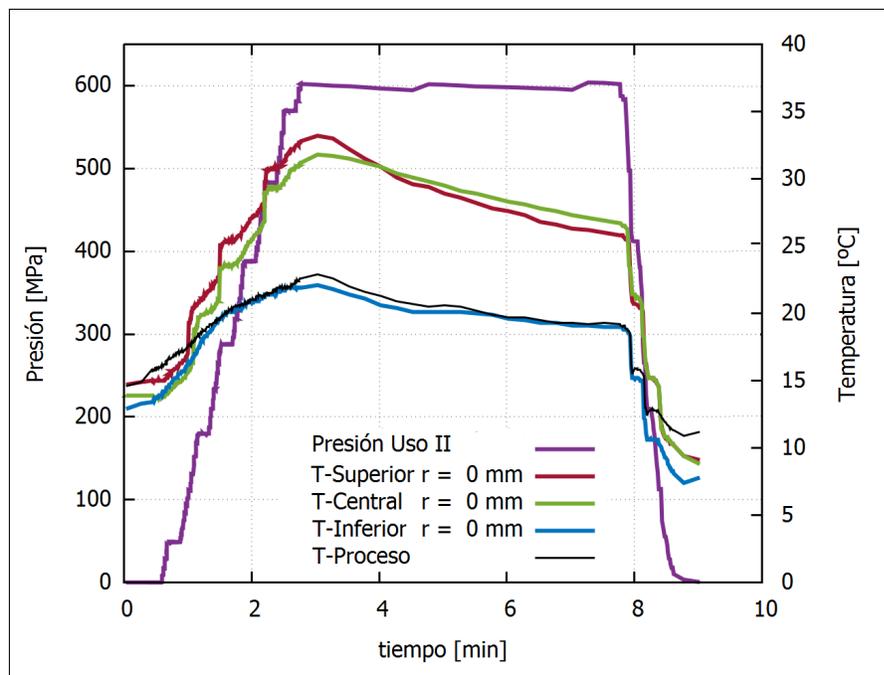
**Figura A-2:** Curvas experimentales con  $r = 0$  mm correspondientes al Uso III del equipo APH y al tratamiento  $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



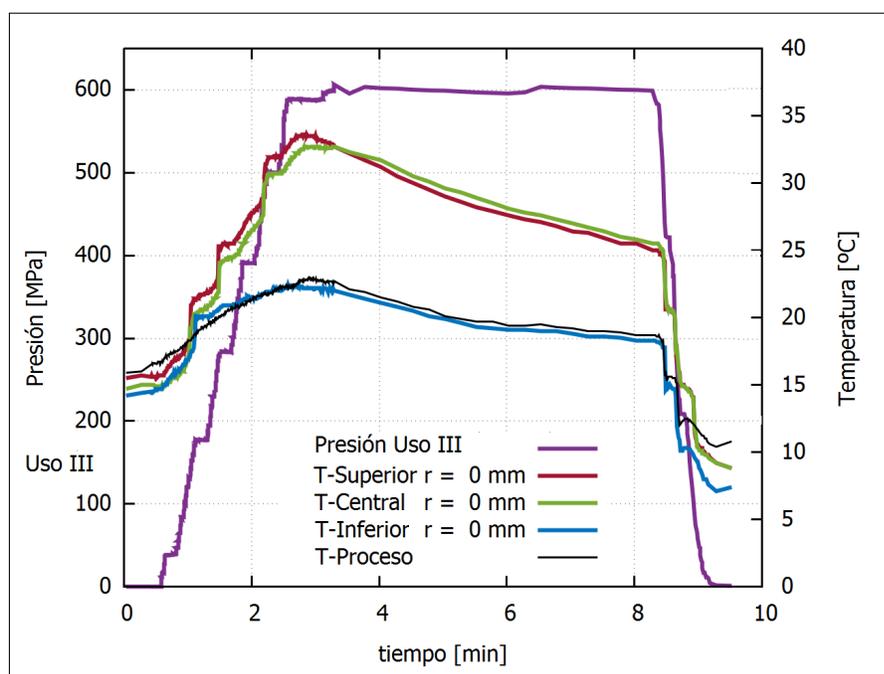
**Figura A-3:** Curvas experimentales con  $r = 0$  mm correspondientes al Uso II del equipo APH y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



**Figura A-4:** Curvas experimentales con  $r = 0$  mm correspondientes al Uso III del equipo APH y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos

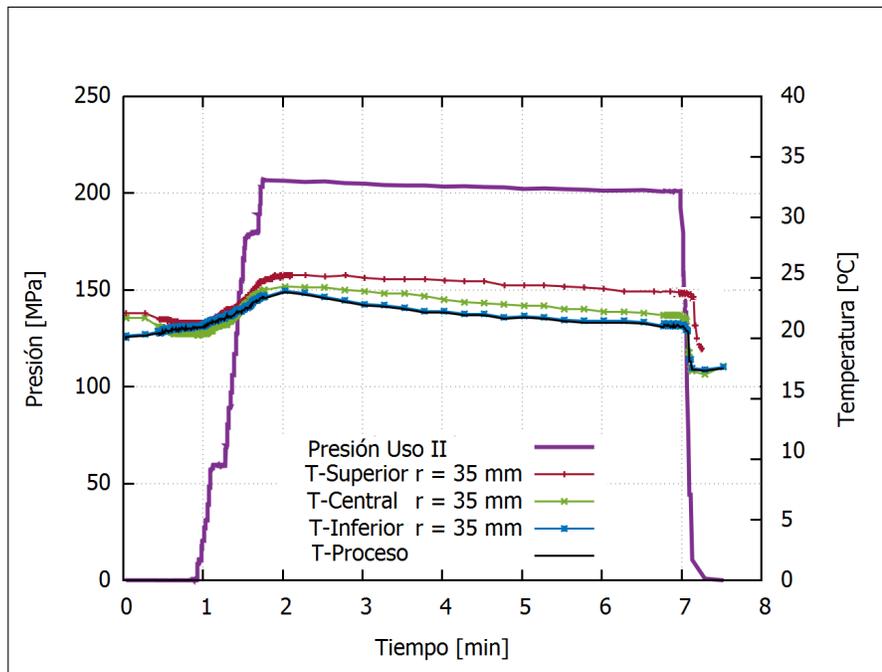


**Figura A-5:** Curvas experimentales con  $r = 0$  mm correspondientes al Uso II del equipo APH y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos

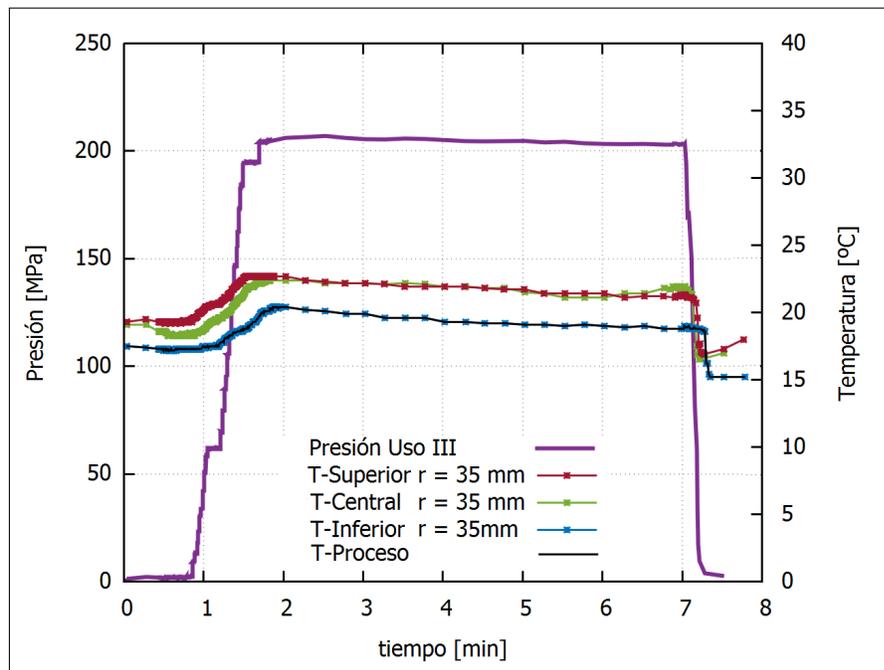


**Figura A-6:** Curvas experimentales con  $r = 0$  mm correspondientes al Uso III del equipo APH y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos

**Curvas registradas a  $r = 35$  mm** Las siguientes Figuras A-7, A-8, A-9, A-10, A-11 y A-12 corresponden al registro experimental de una repetición para los niveles de presión y los usos consecutivos del equipo de APH.

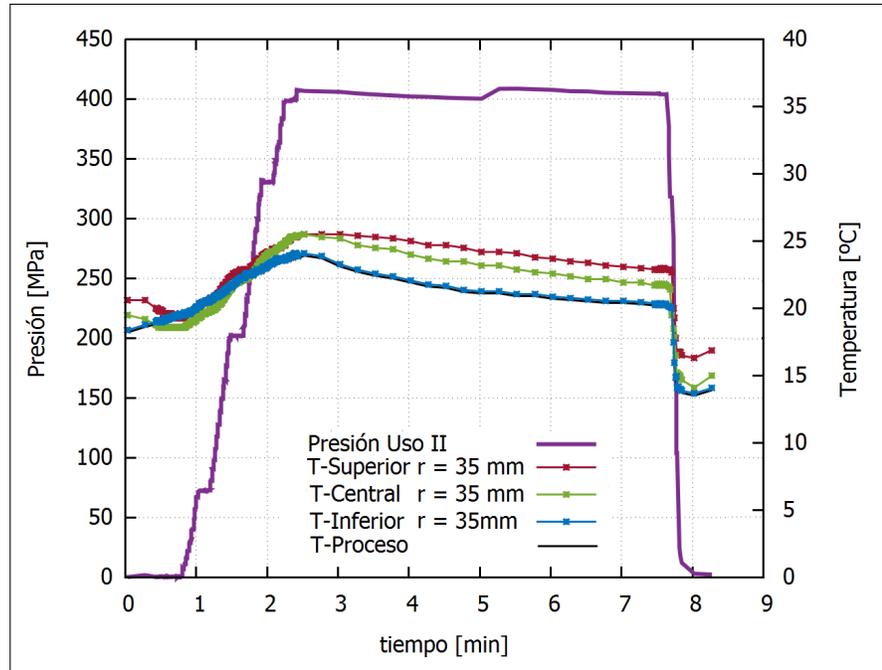


**Figura A-7:** Curvas experimentales con  $r = 35$  mm correspondientes al Uso II del equipo APH y al tratamiento  $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos

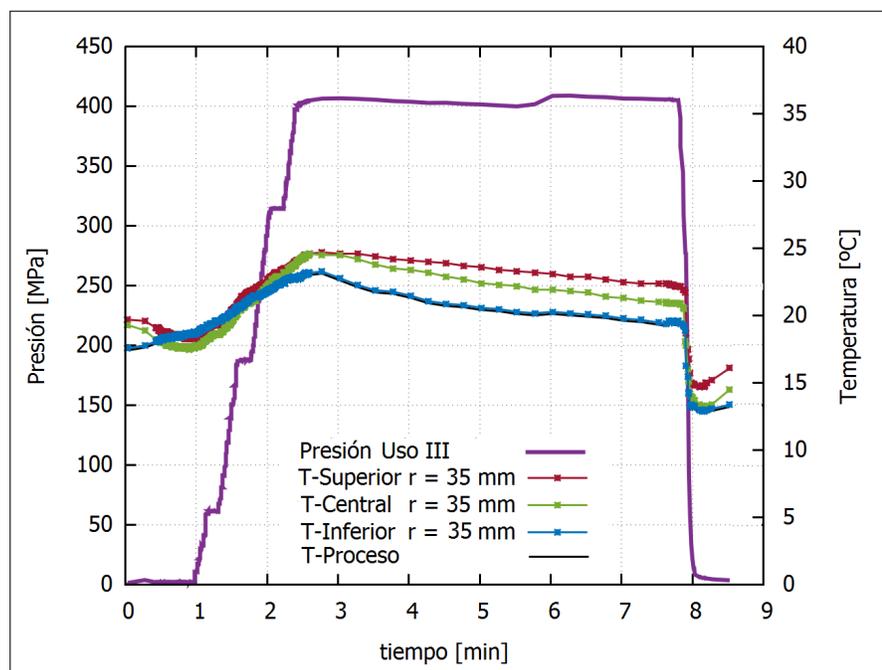


**Figura A-8:** Curvas experimentales con  $r = 35$  mm correspondientes al Uso III y al tratamiento  $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos

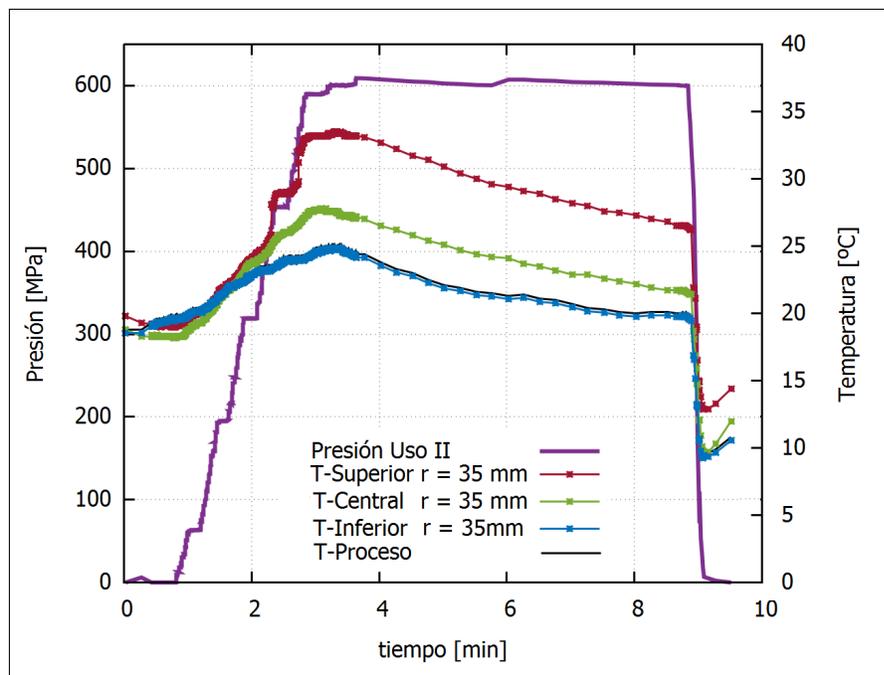
**Curvas registradas y comparadas a  $r = 0$  y  $r = 35$  mm** Las siguientes figuras corresponden al registro de una repetición de la serie de ensayos realizados para los tres niveles de presión evaluados experimentalmente.



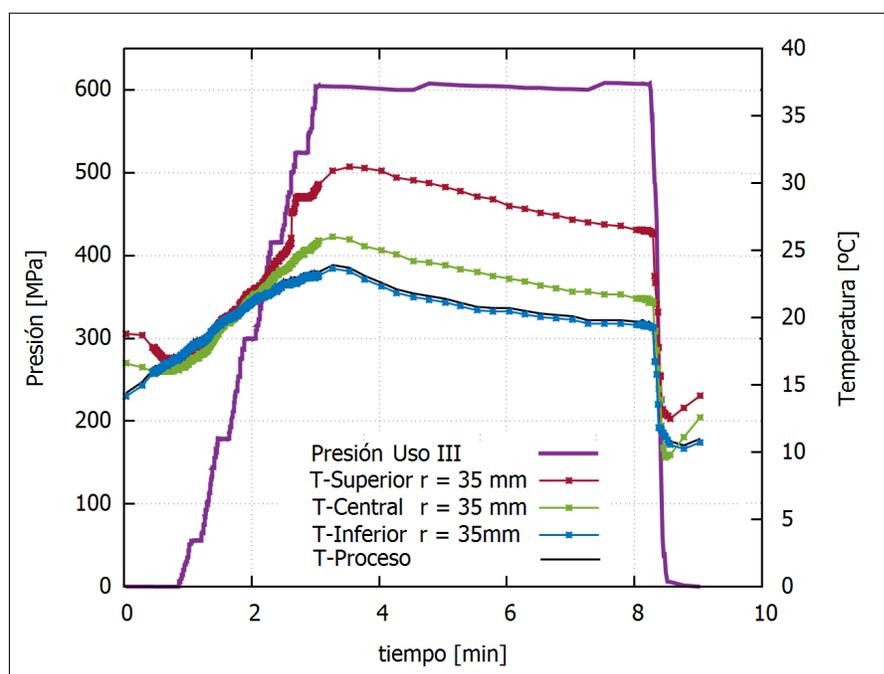
**Figura A-9:** Curvas experimentales con  $r = 35$  mm correspondientes al Uso II del equipo APH y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



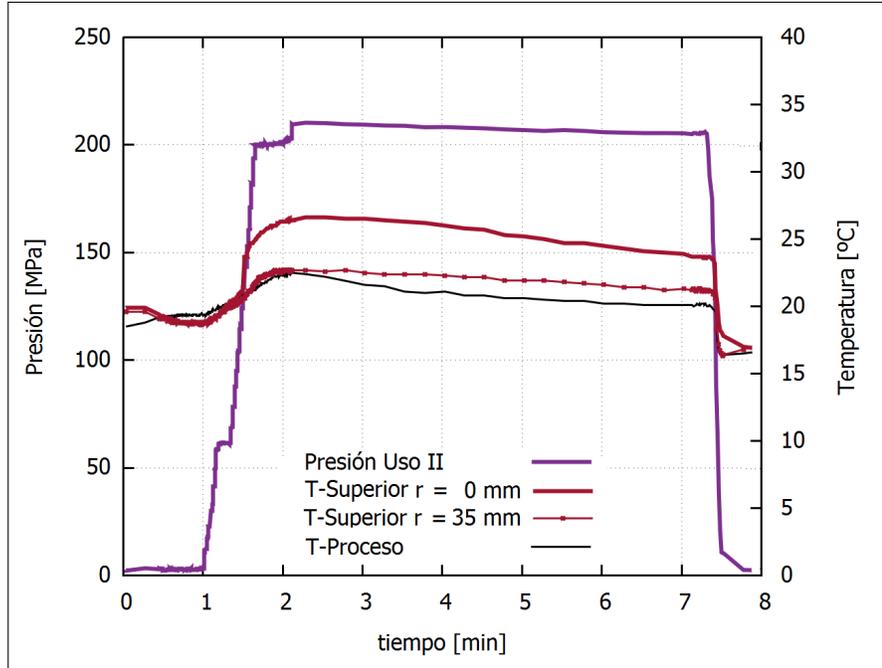
**Figura A-10:** Curvas experimentales con  $r = 35$  mm correspondientes al Uso III del equipo APH y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



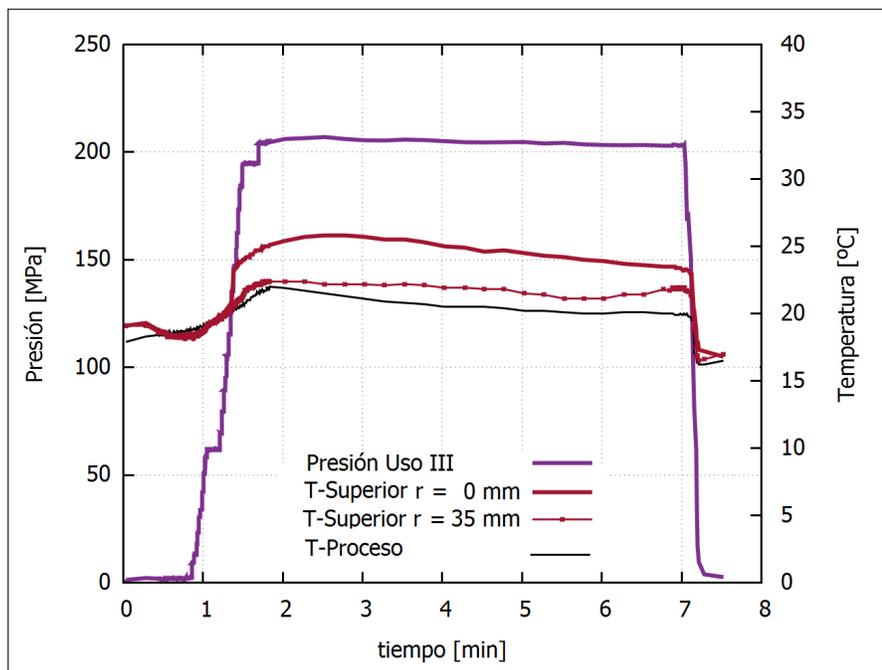
**Figura A-11:** Curvas experimentales con  $r = 35$  mm correspondientes al Uso II del equipo APH y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



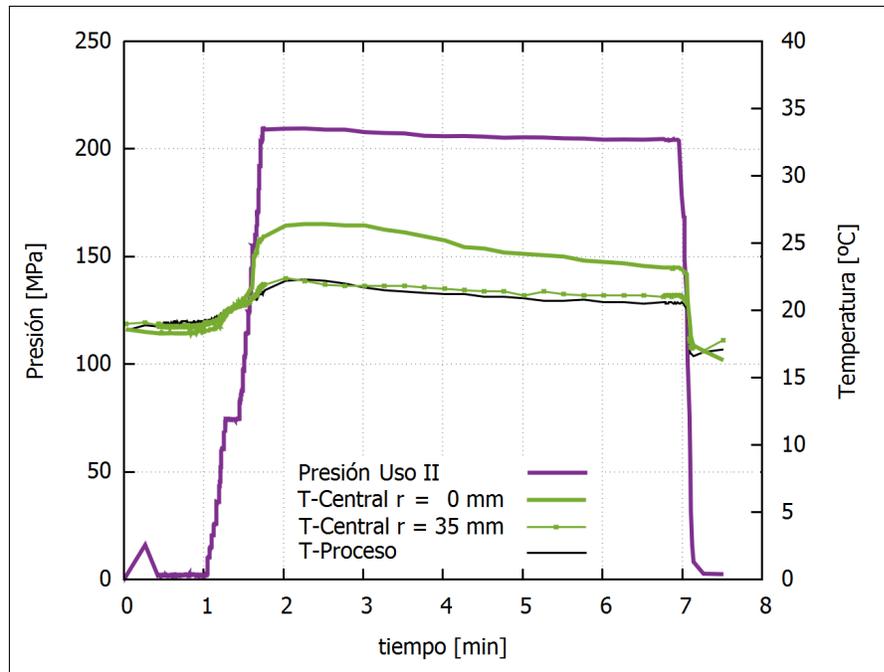
**Figura A-12:** Curvas experimentales con  $r = 35$  mm correspondientes al Uso III del equipo APH y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



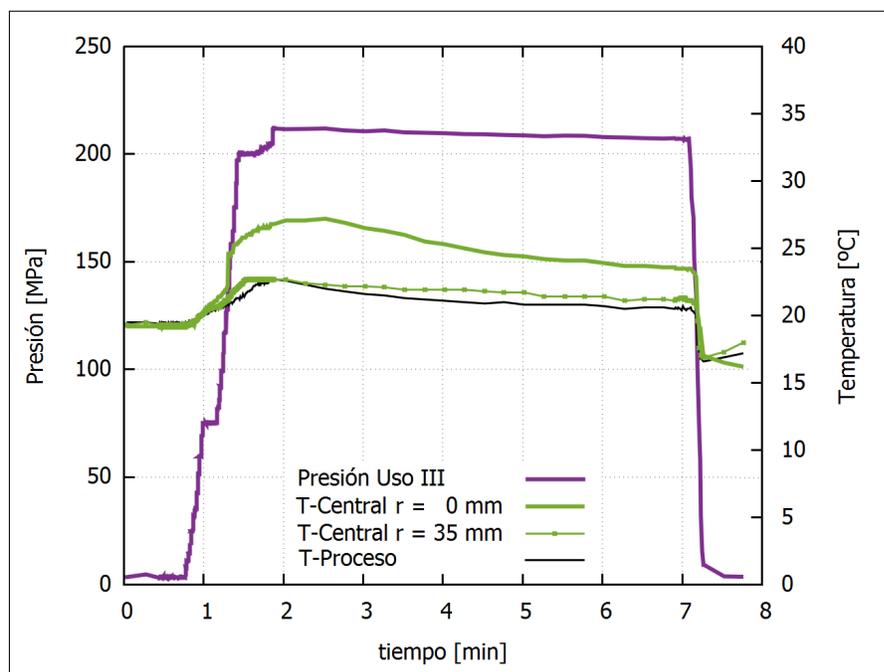
**Figura A-13:** Curvas experimentales con termocoplas T-Superior en posiciones  $r = 0$  y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento  $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



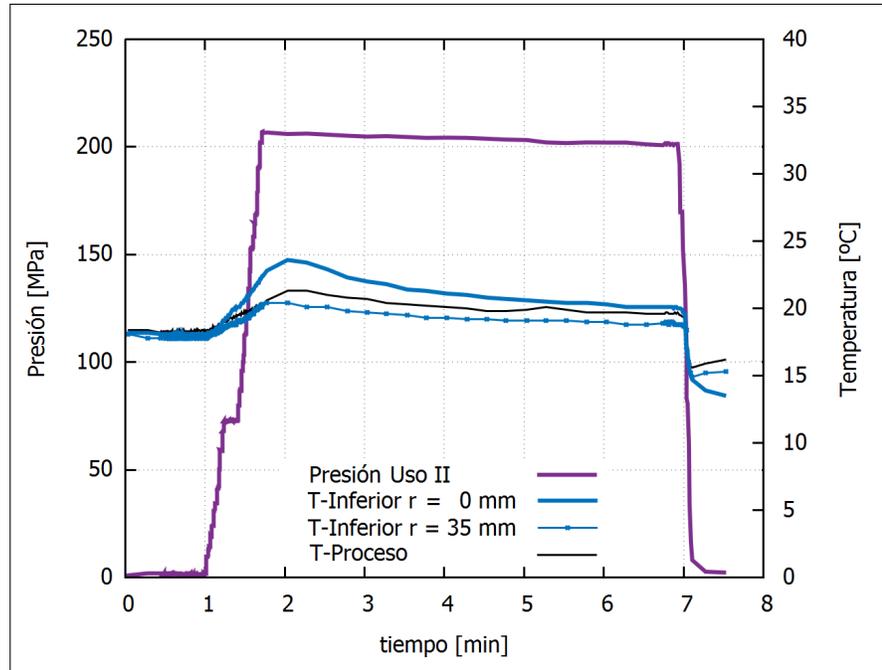
**Figura A-14:** Curvas experimentales con termocoplas T-Superior en posiciones  $r = 0$  y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento  $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



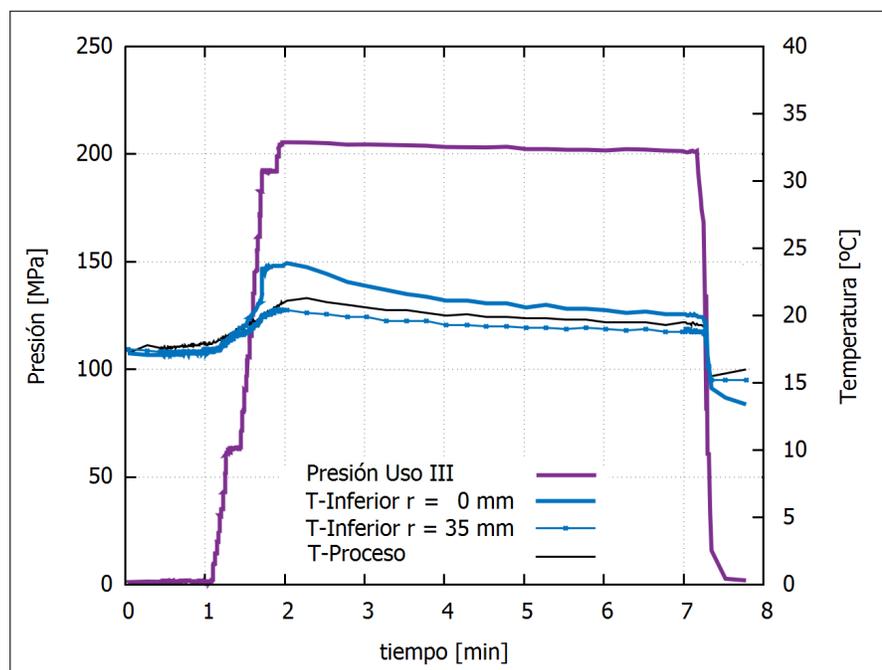
**Figura A-15:** Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso II y al tratamiento  $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



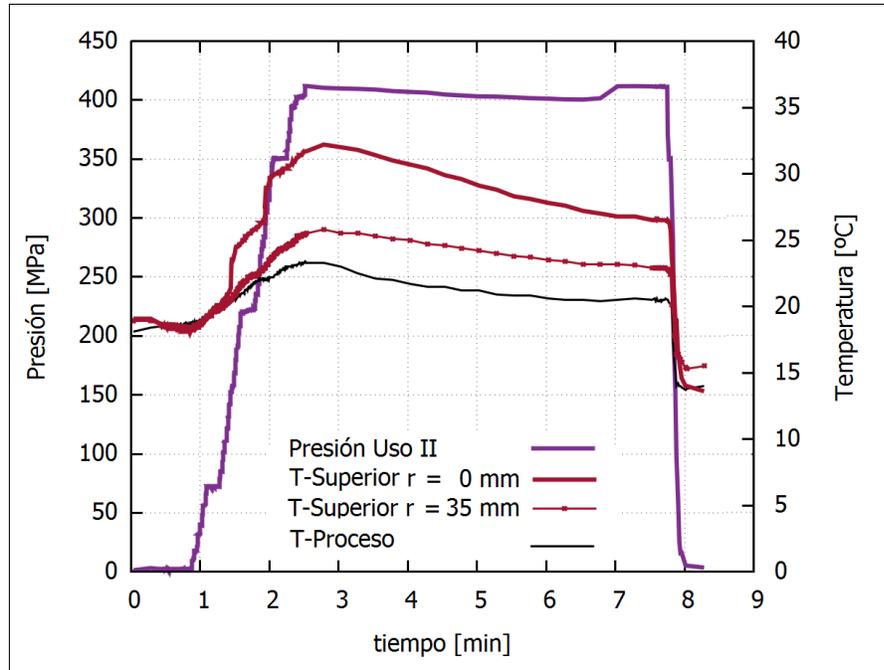
**Figura A-16:** Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso III y al tratamiento  $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



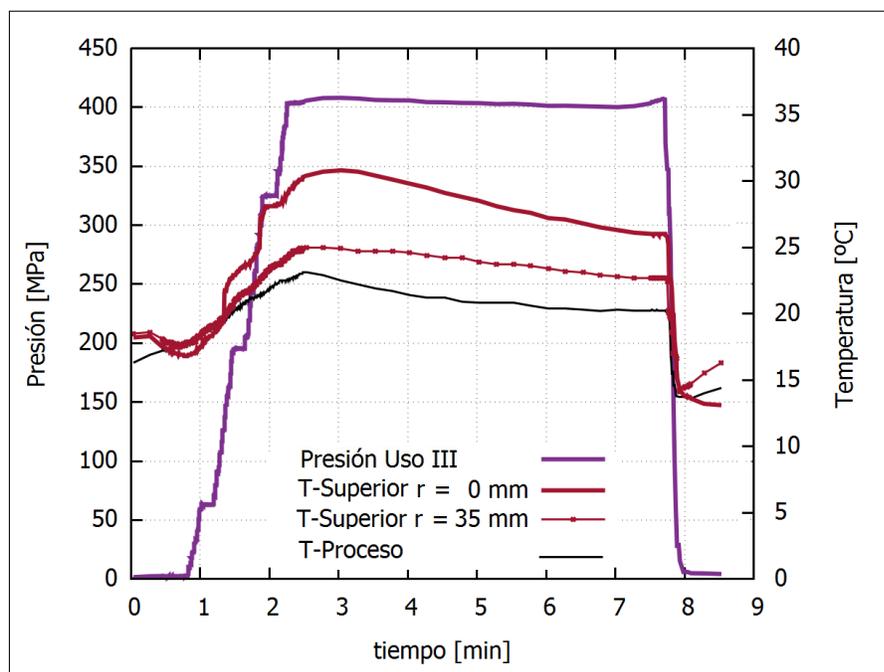
**Figura A-17:** Curvas experimentales con termocoplas T-Inferior en posiciones  $r = 0$  y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento  $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



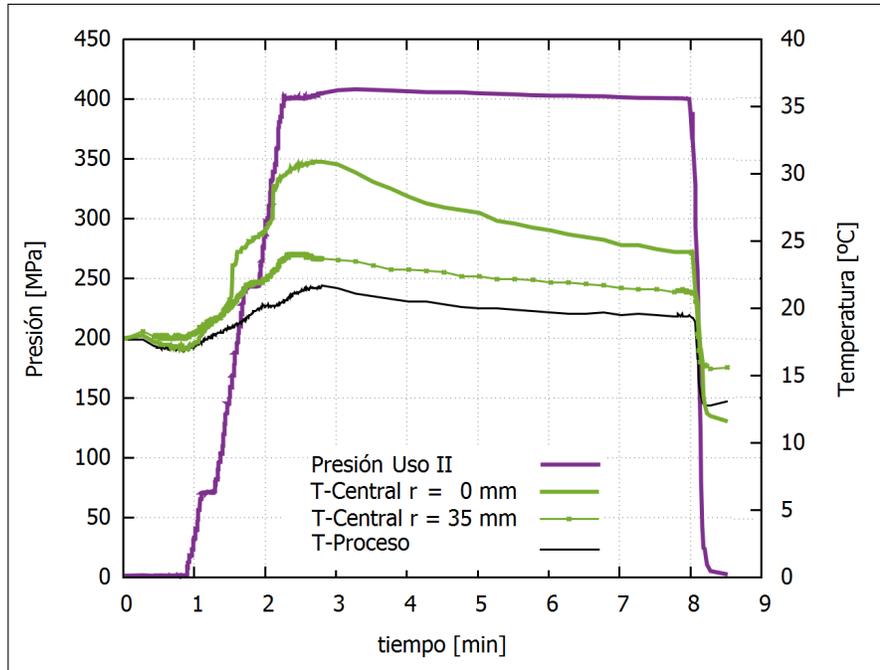
**Figura A-18:** Curvas experimentales con termocoplas T-Inferior en posiciones  $r = 0$  y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento  $200 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



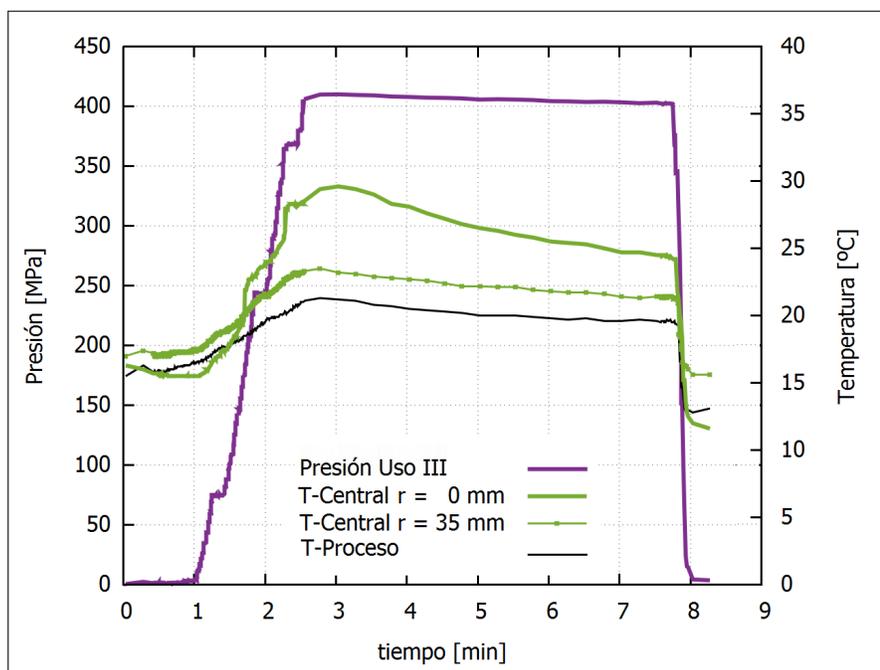
**Figura A-19:** Curvas experimentales con termocuplas T-Superior en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso II y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



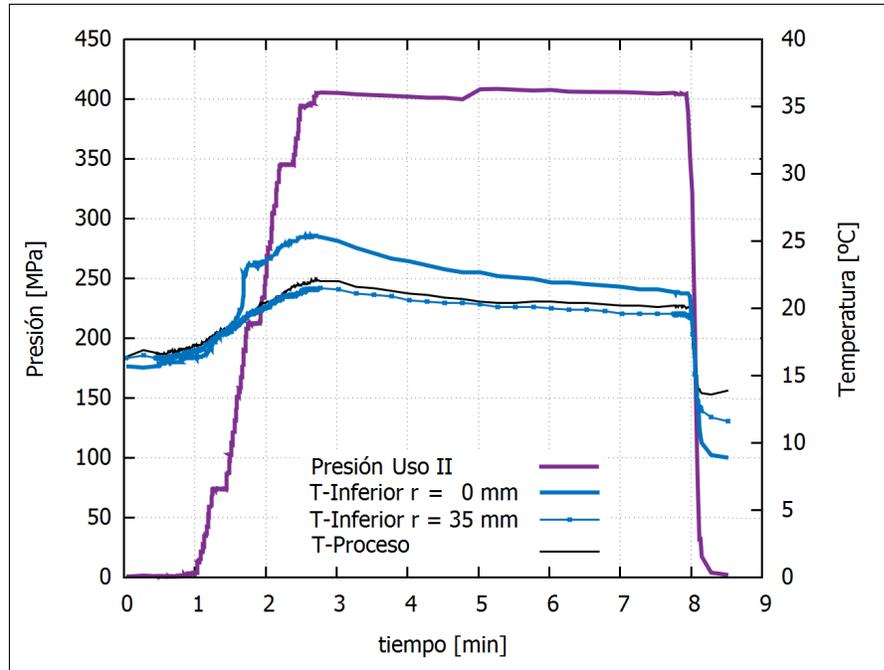
**Figura A-20:** Curvas experimentales con termocuplas T-Superior en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso III y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



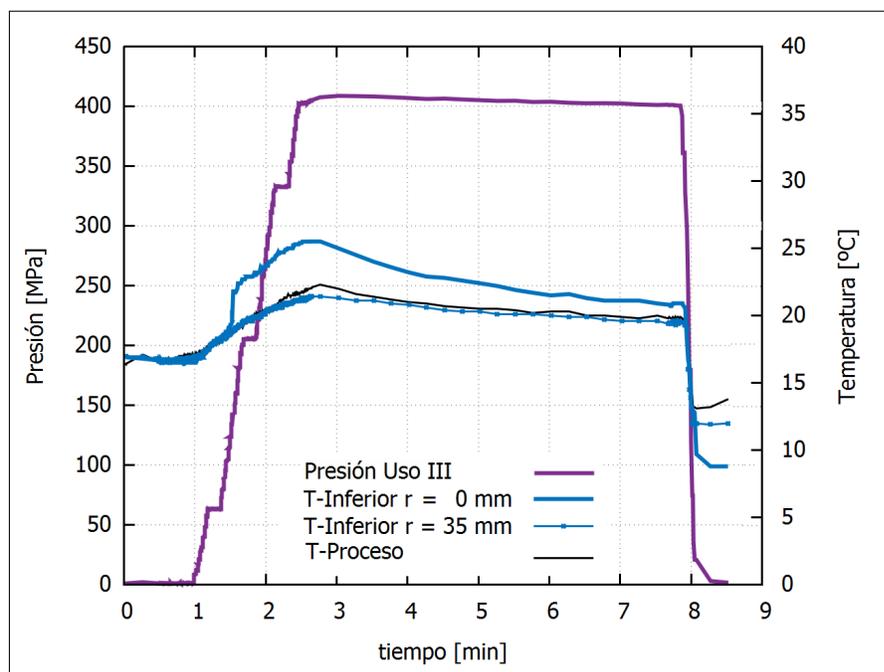
**Figura A-21:** Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso II y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



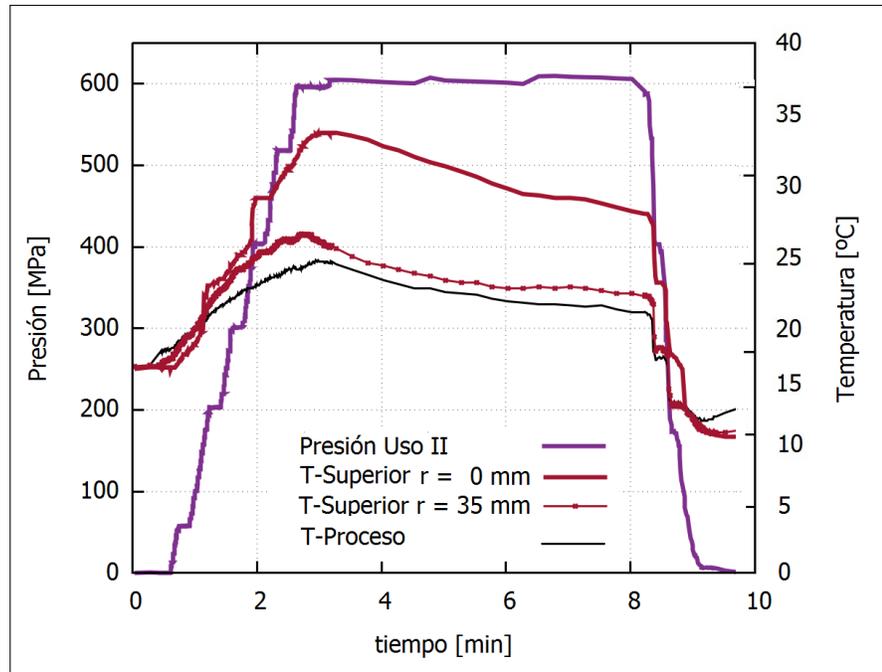
**Figura A-22:** Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso III y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



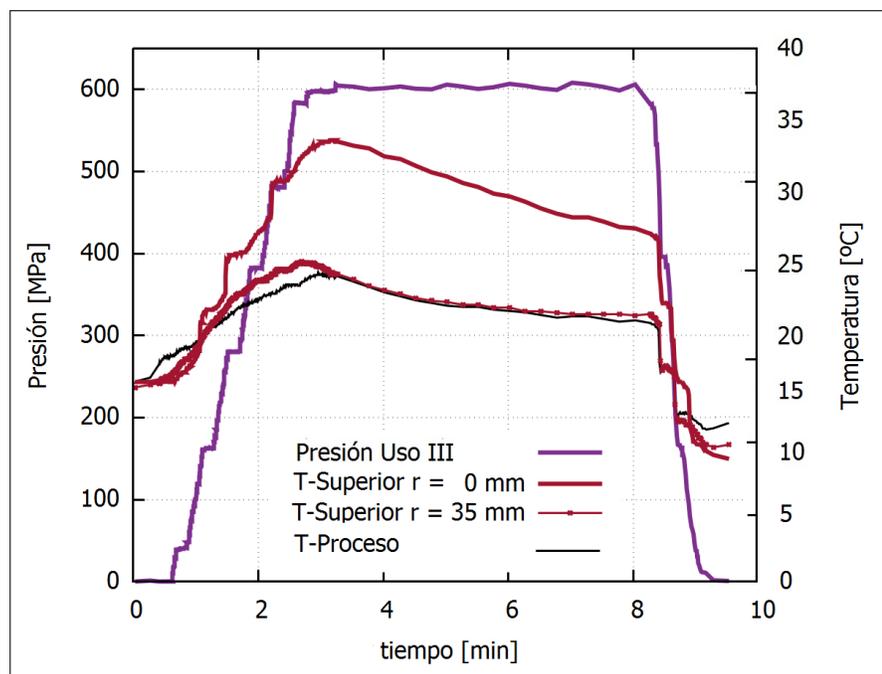
**Figura A-23:** Curvas experimentales con termocuplas T-Inferior en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso II y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



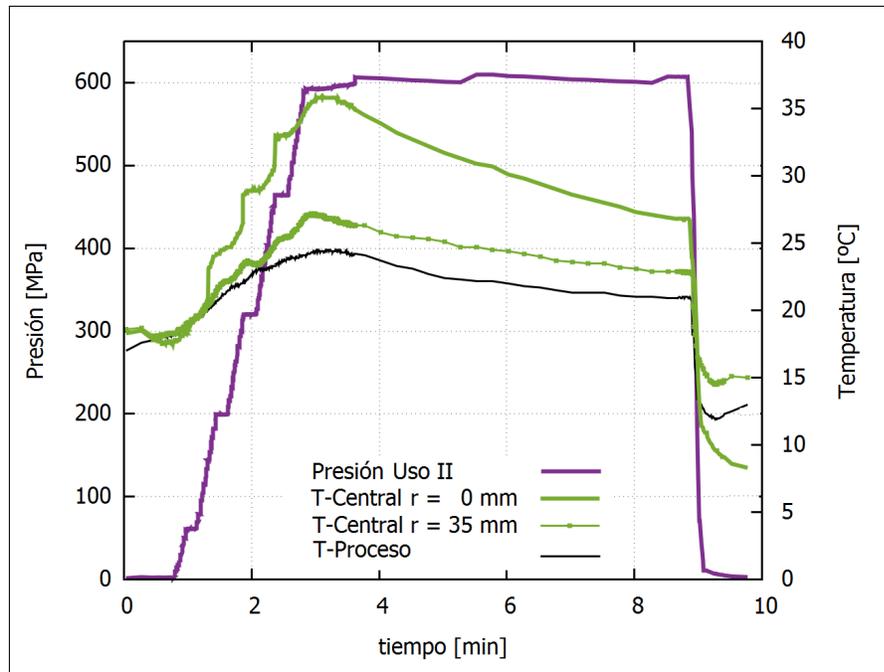
**Figura A-24:** Curvas experimentales con termocuplas T-Inferior en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso III y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



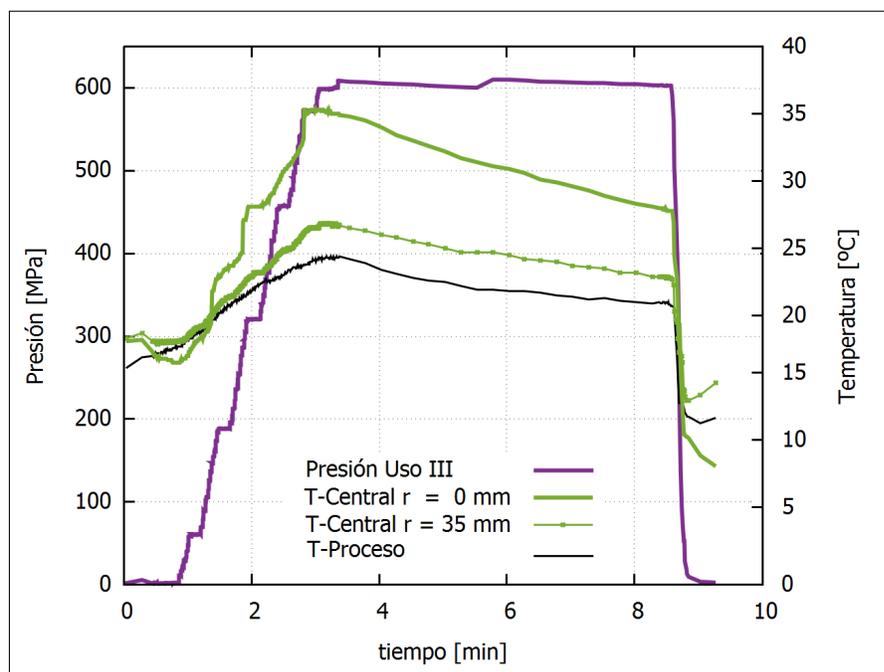
**Figura A-25:** Curvas experimentales con termocuplas T-Superior en posiciones  $r = 0$  y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



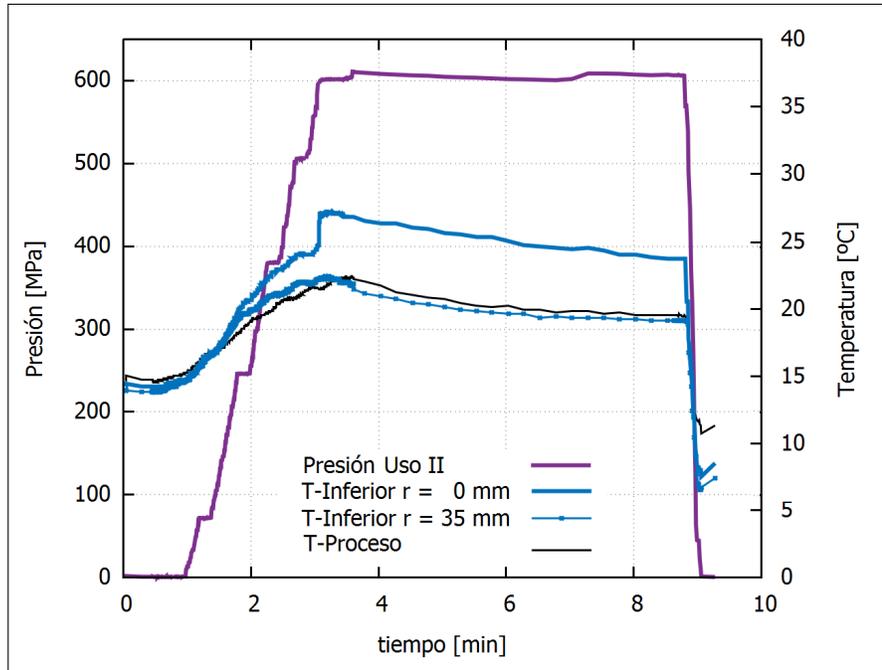
**Figura A-26:** Curvas experimentales con termocuplas T-Superior en posiciones  $r = 0$  y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



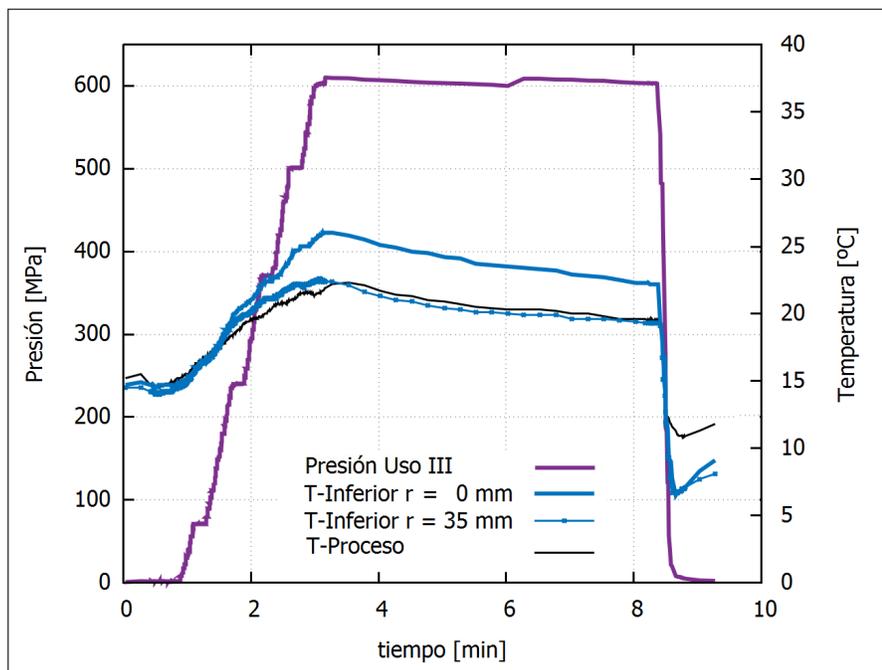
**Figura A-27:** Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso II y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos



**Figura A-28:** Curvas experimentales con termocuplas T-Central en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso III y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos

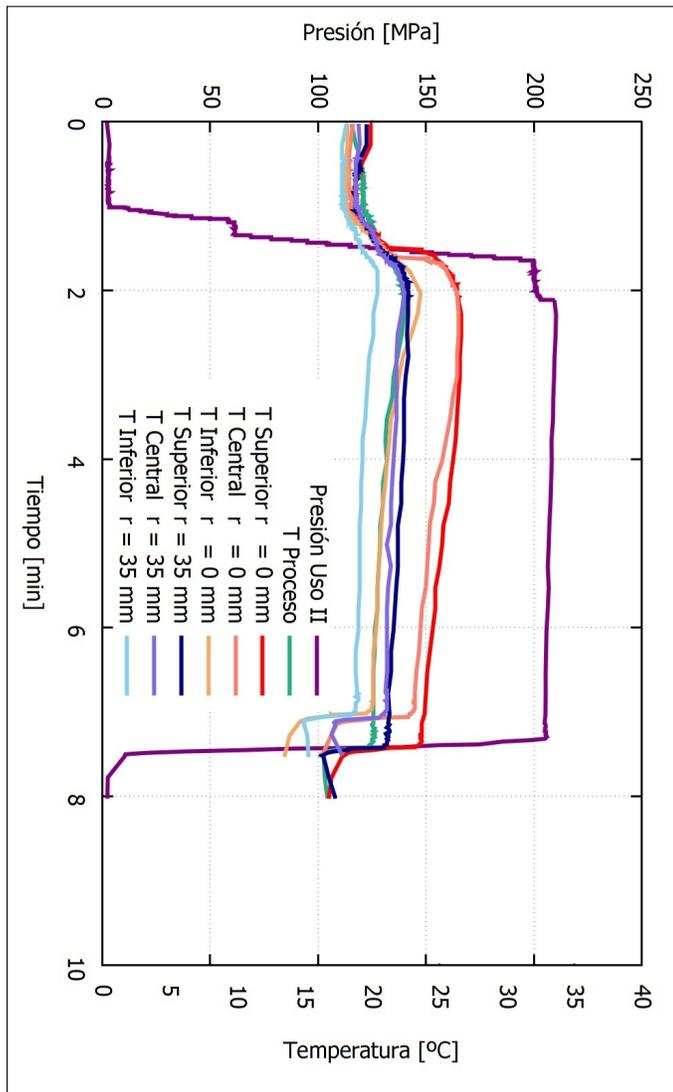


**Figura A-29:** Curvas experimentales con termocuplas T-Inferior en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso II y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos

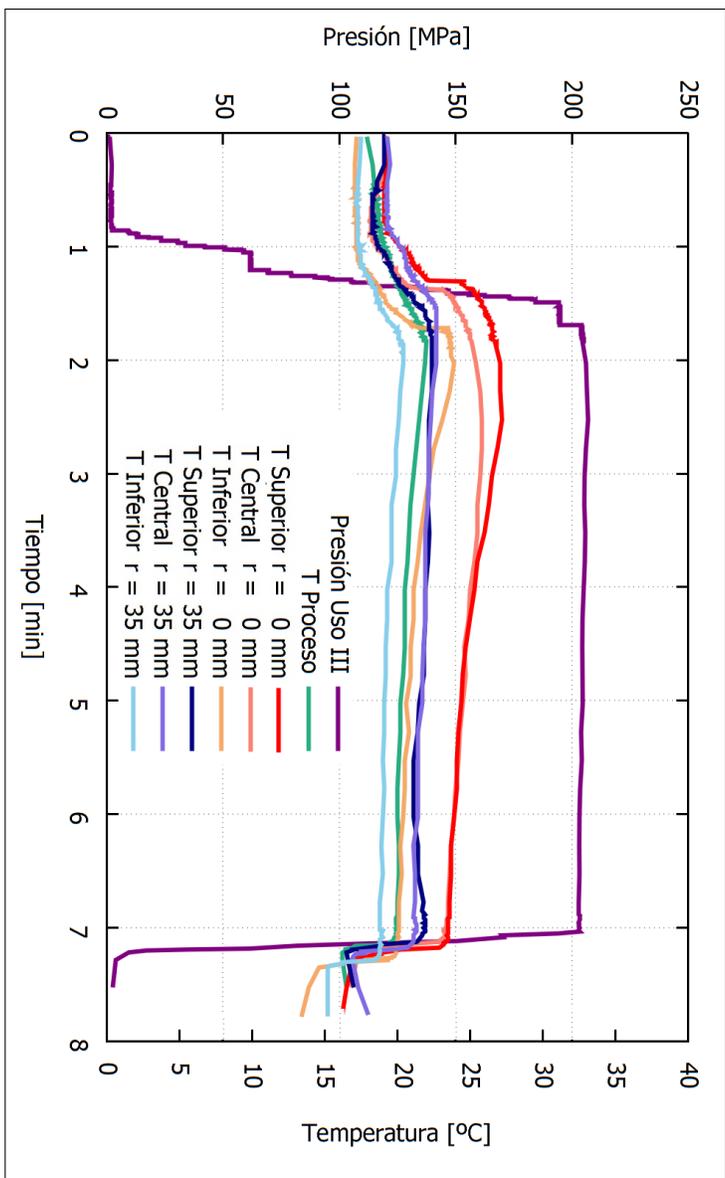


**Figura A-30:** Curvas experimentales con termocuplas T-Inferior en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso III y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante 5 minutos

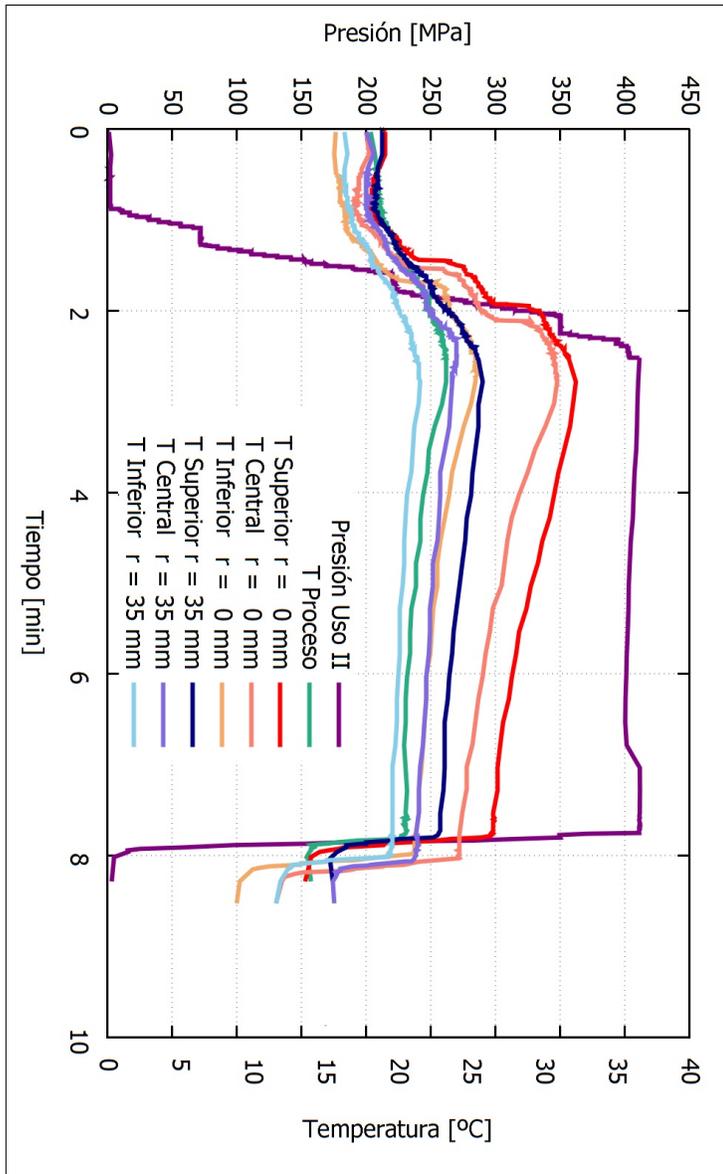
**Curvas ensambladas** Las siguientes Figuras han sido ensambladas a partir de los ensayos experimentales para las posiciones Superior, Central e Inferior en las posiciones  $r = 0$  y 35 mm correspondientes Uso II y III del equipo APH correspondiente al tratamiento 200, 400 y 600 MPa  $\pm$  5 MPa durante 5 minutos.



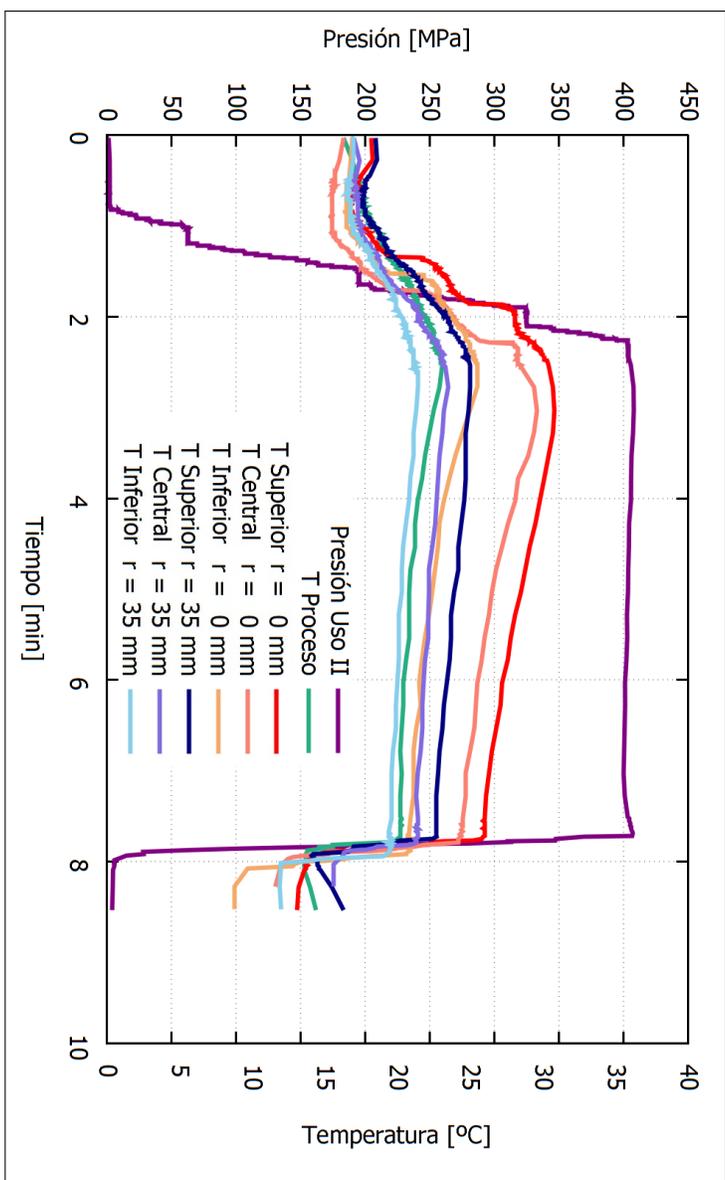
**Figura A-31:** Curvas experimentales con termocouplas en posiciones  $r = 0$  y 35 mm correspondientes al Uso II y al tratamiento 200 MPa  $\pm$  5 MPa durante 5 minutos



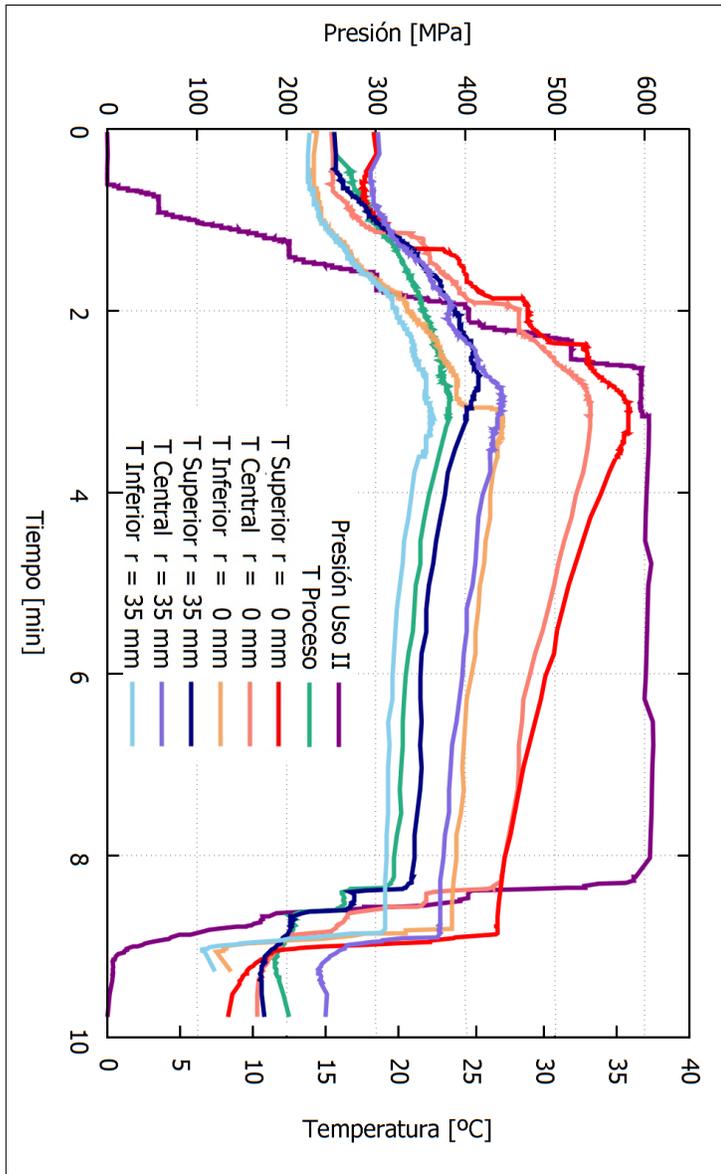
**Figura A-32:** Curvas experimentales con termocuplas en posiciones  $r = 0$  y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento 200 MPa  $\pm$  5 MPa durante 5 minutos



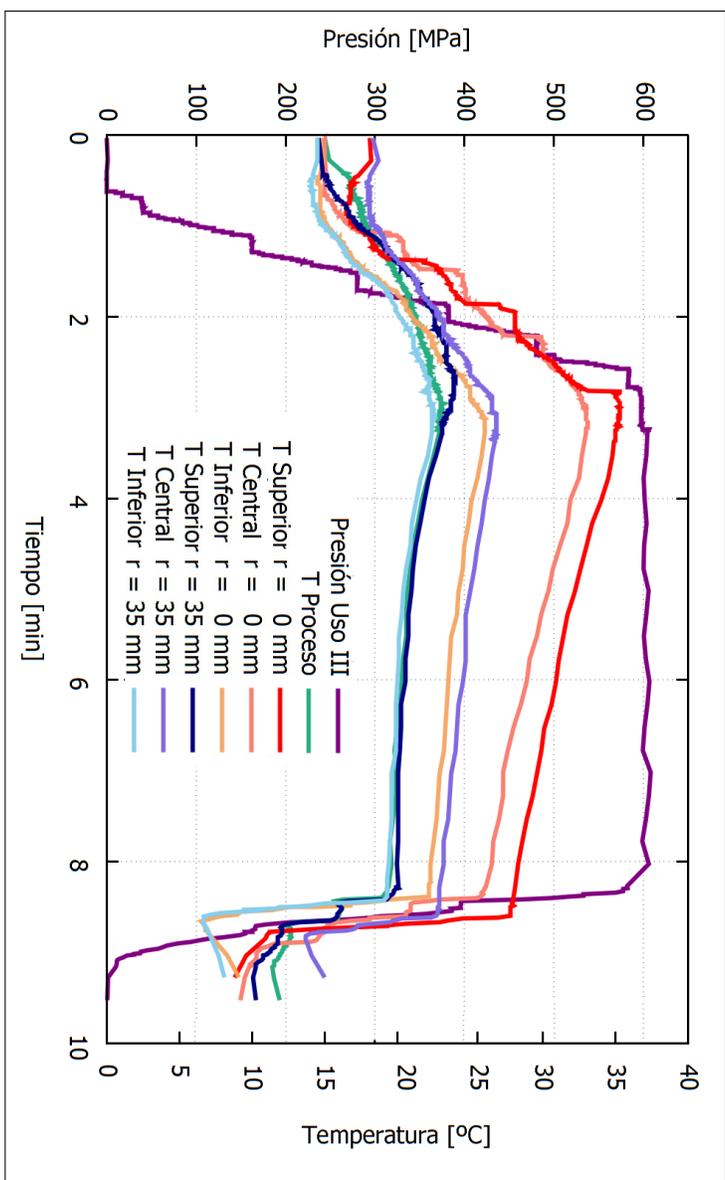
**Figura A-33:** Curvas experimentales con termocuplas en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso II y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante  $5$  minutos



**Figura A-34:** Curvas experimentales con termocuplas en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso III y al tratamiento  $400 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante  $5$  minutos

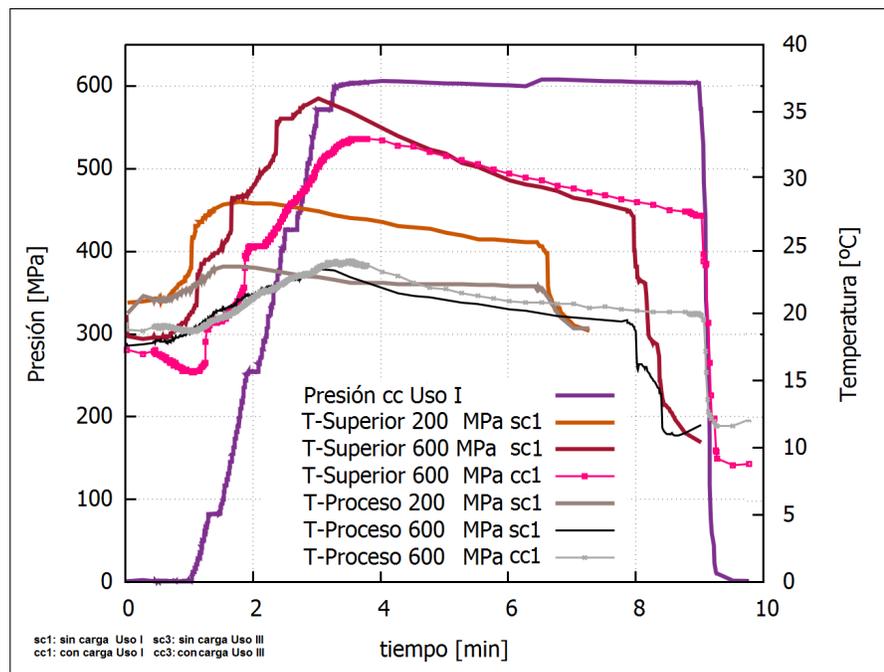


**Figura A-35:** Curvas experimentales con termocuplas en posiciones  $r = 0$  y  $35$  mm correspondientes al Uso II y al tratamiento  $600 \text{ MPa} \pm 5 \text{ MPa}$  durante  $5$  minutos



**Figura A-36:** Curvas experimentales con termocuplas en posiciones  $r = 0$  y 35 mm correspondientes al Uso III y al tratamiento 600 MPa  $\pm$  5 MPa durante 5 minutos

**A.1.1. Etapa 3: Comparación de la distribución de temperatura del fluido de presurización en el interior de la canasta metálica del equipo de APH con carga y sin carga**



**Figura A-37:** Curvas comparadas a 600 MPa Uso I con y sin carga vs. 200 MPa sin carga

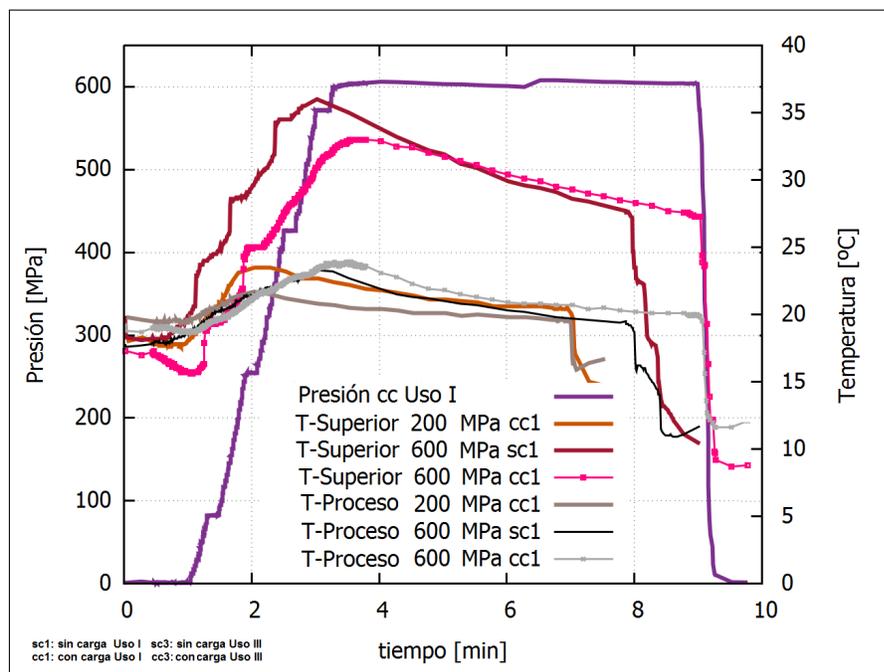


Figura A-38: Curvas comparadas a 600 MPa Uso I con y sin carga vs. 200 MPa con carga

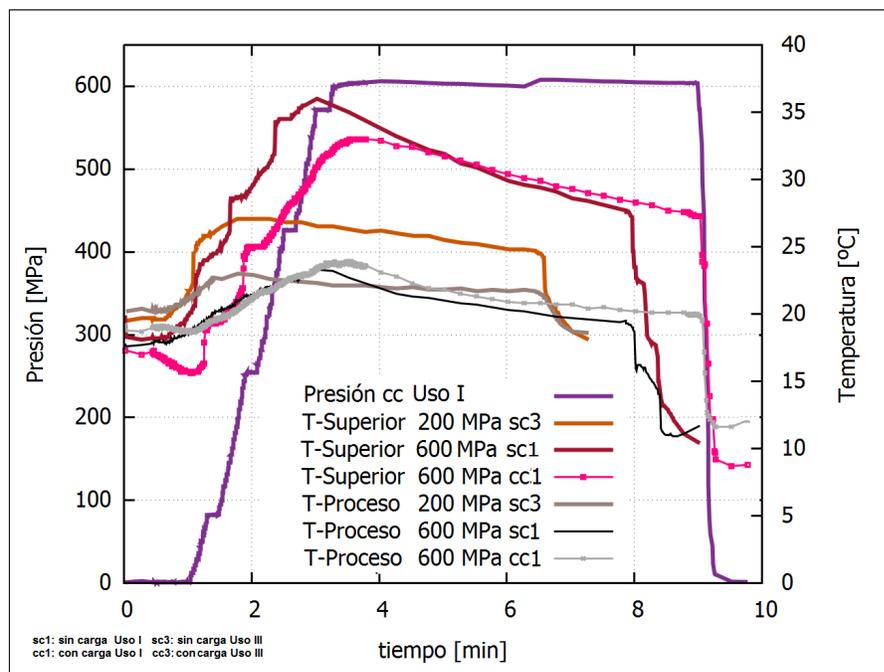
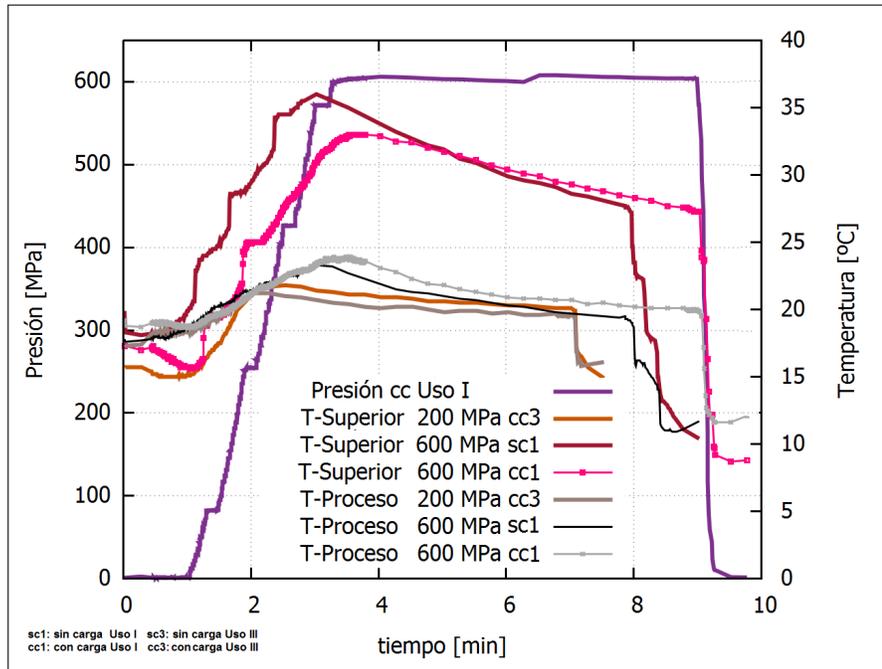
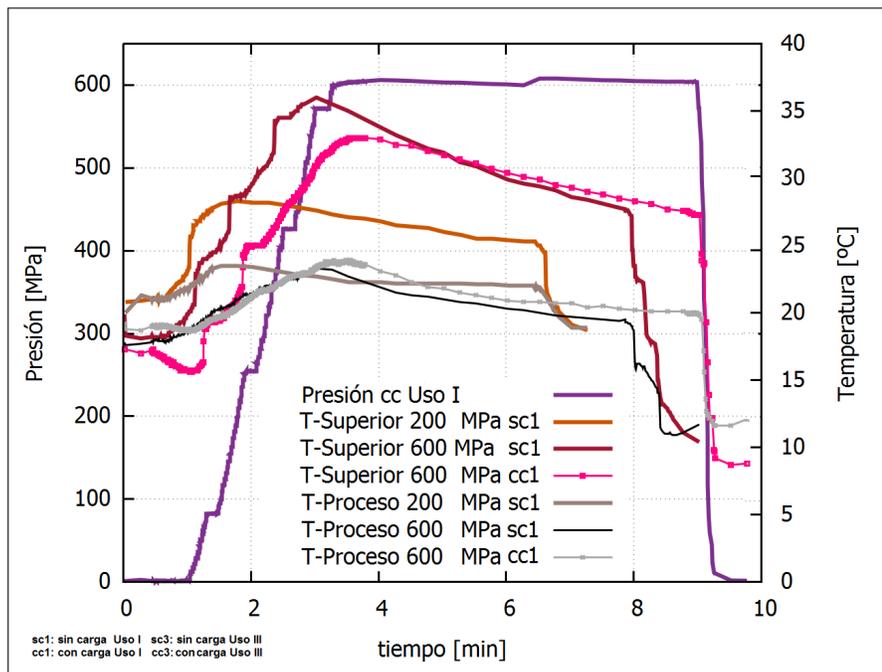


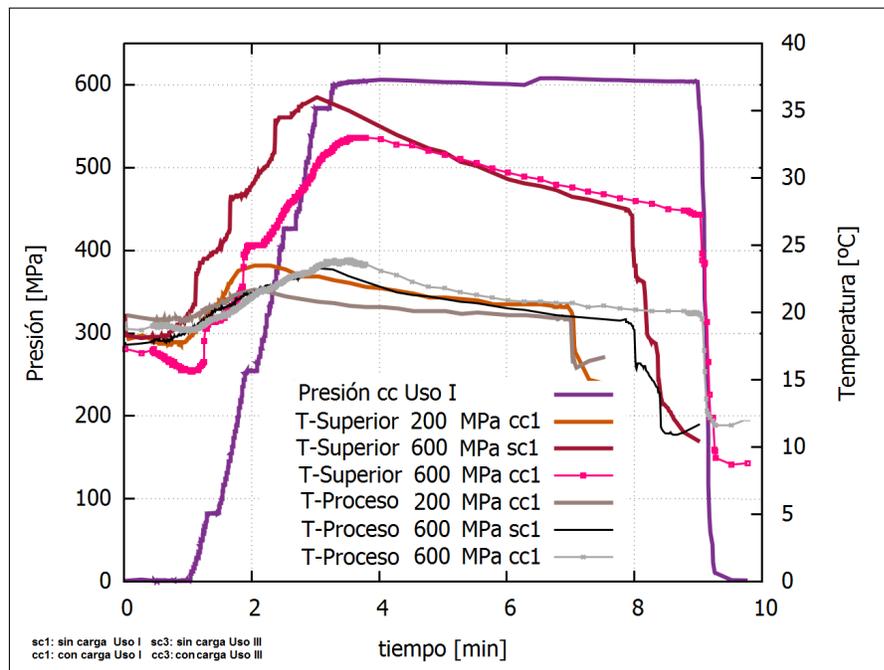
Figura A-39: Curvas comparadas a 600 MPa Uso I con y sin carga vs. 200 MPa Uso III sin carga



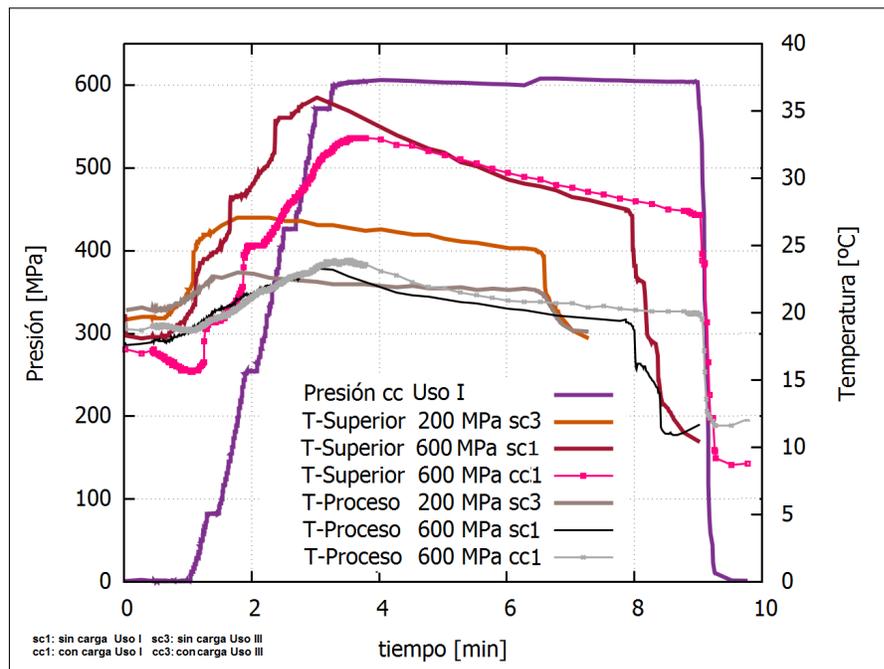
**Figura A-40:** Curvas comparadas a 600 MPa Uso I con y sin carga vs. 200 MPa Uso III con carga



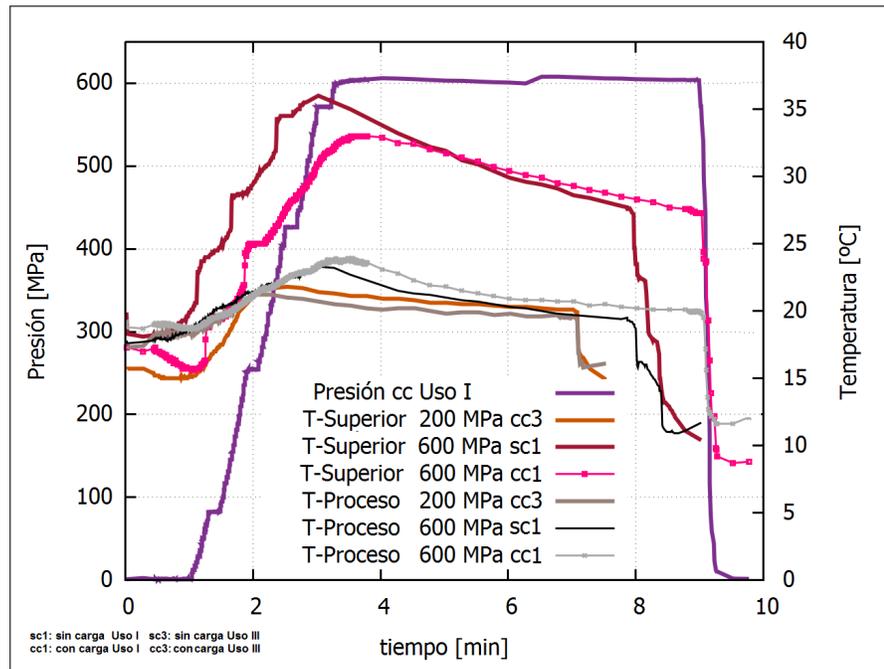
**Figura A-41:** Curvas comparadas a 600 MPa Uso III con y sin carga vs. 200 MPa Uso I sin carga



**Figura A-42:** Curvas comparadas a 600 MPa Uso III con y sin carga vs. 200 MPa Uso I con carga



**Figura A-43:** Curvas comparadas a 600 MPa Uso III con y sin carga vs. 200 MPa Uso III sin carga



**Figura A-44:** Curvas comparadas a 600 MPa Uso III con y sin carga vs. 200 MPa Uso III sin carga

## Apéndice B

### Acta de Defensa de Tesis Doctoral



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

### ACTA DE EXAMEN

Acta Nº: 17 Libro: Defensas de Tesis Tomo: 1 Folio Físico: 14 Fecha Examen: 02/12/2019

Año Académico: 2019 Ubicación: Facultad de Ingeniería Propuesta: Doctorado

Actividad: (DOC ORMANDO) TESIS: Estudio experimental y computacional del perfil térmico en la cámara de presurización de un equipo de altas presiones hidrostáticas Turno: Defensa de tesis Mesa: Mesa Ormando Llamado: Llamado del Turno Defensa de tesis

Nº	Apellido y Nombre	Identificación	Instancia	Fecha	Nota	Letras	Resultado
1	Ormando Paula	DNI 28366372	Libre	02/12/2019	10	diez	Aprobado

Figura B-1:

# Bibliografía

AVOMEX, INC: «<https://tilth.org/tilth-producer/avomex-international-s-a-de-c-v-2/>», 2019.

AVURE: «<https://www.avure-hpp-foods.com/>», 2019.

BAARS, A.; RAUH, C. y DELGADO, A.: «High pressure rheology and the impact on process homogeneity.» *High Pressure Research*, 2007, **27(1)**, pp. 77–83.

BALASUBRAMANIAN, S. y BALASUBRAMANIAM, V.: «Compression heating influence of pressure transmitting fluids on bacteria inactivation during high pressure processing.» *Food Research International*, 2003, **36**, pp. 661–668.

BETZ, S.F.: «Disulfide bonds and the stability of globular proteins.» *Protein Science*, 1993, **1(2)**, pp. 1551–1558.

BEVERIDGE, T.; TOMA, S.J. y NAKAI, S.: «Determination of SH and SS groups in some food proteins using Ellman's reagent.» *Journal of Food Science*, 1974, **39**, pp. 49–51.

BUZRUL, S.; ALPAS, H.; LARGETEAU, A.; BOZOGLU, F. y DEMAZEAU, G.: «Compression

heating of selected pressure transmitting fluids and liquid foods during high hydrostatic pressure treatment.» *Journal of Food Engineering*, 2008, **85(3)**, pp. 466–472.

CARLEZ, A.; RICHARD, N.; ROSEC, J.P. y CHEFTEL, J.C.: «High pressure inactivation of *Citrobacter freundii*, *Pseudomonas fluorescens* and *Listeria innocua* in inoculated minced beef muscle.» *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 1993, **26**, pp. 357–363.

CARLEZ, A.; ROSEC, J.P.; RICHARD, N. y CHEFTEL, J.C.: «Bacterial growth during chilled storage of pressure-treatment minced meat.» *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 1994, **27**, pp. 48–54.

CARLEZ, A.; VECIANA-NOGUES, T. y J.C., CHEFTEL: «Changes in Colour and Myoglobin of Minced Beef Meat Due to High Pressure Processing.» *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 1995, **28(5)**, pp. 528–538.

CHEFTEL, J.C.: «High pressure microbial inactivation and food preservation.» *Food Science Technology International*, 1995, **1**, pp. 75–90.

CHEFTEL, J.C. y CULIOLI, J.: «Effects of high pressure on meat: A review.» *Meat Science*, 1997, **46(3)**, pp. 211–236.

COSTABEL, L. M.; BERGAMINI, C.; VAUDAGNA, S.R.; CUATRIN, A. L.; AUDERO, G. y HYNES, E.: «Effect of high-pressure treatment on hard cheese proteolysis.» *Journal of Dairy Science*, 2016, **99**, pp. 1–13.

DENYS, S.; LUDIKHUYZE, L.; VAN LOEY, A. y HENDRICKX, M.: «Modeling Conductive

- Heat Transfer and Process Uniformity during Batch High-Pressure Processing of Foods.» *Biotechnology Progress*, 2000a, **16**, pp. 92–101.
- DENYS, S.; VAN LOEY, A. y HENDRICKX, M.: «A modeling approach for evaluating process uniformity during batch high hydrostatic pressure processing: combination of a numerical heat transfer model and enzyme inactivation.» *Innovative Food Science. Emerging & Technologies*, 2000b, **1**, pp. 5–19.
- DIGITIZEIT: «<https://www.Digitizeit.de>», 2017.
- EATON, J.; BATEMAN, D.; HAUBERG, S. y WEHBRING, R.: *GNU Octave version 3.8.1 manual: a high-level interactive language for numerical computations*. CreateSpace Independent Publishing Platform, 2014.  
<http://www.gnu.org/software/octave/doc/interpreter>
- ELLMAN, G.: «Tissue sulfhydryl groups.» *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1959, **82(1)**, pp. 70–77.
- FARKAS, D. y HOOVER, G.: «High Pressure Processing.» *Journal of Food Science*, 2000, **65(8)**, pp. 47–64.
- FDA: «<https://www.fda.gov/food/cfsan-risk-safety-assessments/risk-assessments-and-risk-profiles-gaps-knowledge-base>», 2019.
- FOGARTY, W.M y KELLY, C.T.: «Enzymic Developments in the Production of Maltose and Glucose.» En: *Lafferty R.M. (eds) Enzyme Technology*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 149–163, 1983.

- FUNTENBERGER, S; DUMAY, E. y J., CHEFTEL: «Pressure induced aggregation of beta-lactoglobulin in pH 7.0 buffers.» *LWT - Food Science and Technology*, 1995, **28(4)**, pp. 410–418.
- GEUZAINÉ, C. y REMACLE, J.F.: *Gmsh Reference Manual*. <http://www.geuz.org/gmsh>, 2003.
- GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; LÓPEZ DE LA-CEY, A. y MONTERO, P.: «Physico-chemical properties of tuna-skin and bovine-hide gelatin films 2 with added aqueous oregano and rosemary extract.» *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2009, **10**, pp. 148–154.
- GRAUWET, T.: *From protein to indicator towards temperature uniformity mapping in high pressure processing reactors*. Tesis doctoral, Faculteit Bio-ingenieurswetenschappen van de K.U.Leuven, 2010c.
- GRAUWET, T; PLANCKEN, I.V.D; VERVOORT, L; HENDRICKX, M.E y LOEY, A.V.: «Protein-based indicator system for detection of temperature differences in high pressure high temperature processing.» *Food Res. Int*, 2010b, **43(3)**, pp. 862–871.
- GRAUWET, T.; VAN DER PLANCKEN, I.; VERVOORT, L.; HENDRICKX, M.E. y LOEY, A.V.: «Investigating the potential of *Bacillus subtilis* alpha-amylase as a pressure-temperature-time indicator for high hydrostatic pressure pasteurization processes.» *Biotechnology Progress*, 2009, **25(4)**, pp. 1184–1193.
- HARTMANN, C y DELGADO, A.: «Numerical simulation of thermofluidynamics and enzyme

- inactivation in a fluid food system under high hydrostatic pressure.» *In: Hayashi R, editor. Trends in high pressure bioscience and biotechnology. Amsterdam: Elsevier., 2002a, pp. 533–540.*
- HARTMANN, C.; DELGADO, A. y SZYMCYK, J.: «Convective and diffusive transport effects in a high pressure induced inactivation process of packed food.» *Intl J Food Eng*, 2003, **59**, pp. 33–44.
- HARTMANN, C.; SCHUHHOLZ, J.; KITSUBUN, P.; CHAPLEAU, N.; LE BAIL, A. y DELGADO, A.: «Experimental and numerical analysis of the thermofluidynamics in a high-pressure autoclave.» *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2004, **5(4)**, pp. 399–411. ISSN 1466-8564.
- HENDERSON, A.: «ParaView Guide, A Parallel Visualization Application.», 2007.
- HIPERBARIC, INC: «<https://www.hiperbaric.com>», 2016.
- HITE, B.: «The Effect of Pressure in the Preservation of Milk.» *A Preliminary Report West Virginia Agricultural Experiment Station*, 1899, **57**.
- HJELMQWIS, J.: «Commercial high-pressure equipment.» En: *Novel Food Processing Technologies*, CRC Press, 2005.
- HOOVER, D. G.; METRICK, C.; PAPINEAU, A. M; FARKAS, D. F. y KNORR, D.: «Biological effects of high hydrostatic pressure on food microorganisms.» *Food Technology*, 1989, **43**, pp. 99–107.

- HUGAS, M.; GARRIGA, M. y MONFORT, J.: «New mild technologies in meat processing: high pressure as a model technology.» *Meat Science*, 2002, **62**, pp. 359–371.
- INFANTE, J.A; IVORRA, B.; RAMOS, A. M. y REY, J.M.: «On the modelling and simulation of high pressure processes and inactivation of enzymes in food engineering.» *Mathematical Models and Methods in Applied Sciences*, 2009, **19(12)**, pp. 2203–2229.
- JULIANO, P.; KNOERZER, K. y BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.: «Engineering Aspects of Thermal Processing.» En: *Novel Food Processing Technologies*, CRC Press, 2008.
- JUNG, S.; GHOUL, M. y DE LAMBALLERIE-ANTON, M.: «Influence of high pressure on the color and microbial quality of beef meat.» *Lebensmittel Wissenschaft und-Technologie*, 2003, **36**, pp. 625–631.
- KAJIYAMA, N.; ISOBE, S.; UEMURA, K. y NOGUCHI, A.: «Changes of soy protein under ultra high hydraulic pressure.» *International Journal of Food Science and Technology*, 1995, **30(2)**, pp. 147–158.
- KITSUBUN, P.: *Numerical investigations of thermodynamical heterogeneities during high hydrostatic pressure treatment of biological substances*. Tesis doctoral, TU Munich, 2006.
- KITSUBUN, P.; HARTMANN, C. y DELGADO, A.: «Numerical investigations of process heterogeneities during high hydrostatic pressure treatment with turbulent inflow conditions.» *Proc. Appl. Math. Mech*, 2005, **5**, pp. 573–574.
- KNOERZER, K.: «Measuring temperatures under high-pressure conditions.» En: *Reference Module in Food Science*, Elsevier, 2016.

- KNOERZER, K.; BUCKOW, R.; SANGUANSRI, P. y VERSTEEG, C.: «Adiabatic compression heating coefficients for high pressure processing of water, propylene-glycol and mixtures: combined experimental and numerical approach.» *Journal of Food Engineering*, 2010b, **96**, pp. 229–238.
- KNOERZER, K.; BUCKOW, R. y VERSTEEG, C.: «Adiabatic compression heating coefficients for high pressure processing: a study of some insulating polymer materials.» *J Food Eng*, 2010c, **98**, pp. 110–119.
- KNOERZER, K. y JULIANO, P.: *Modeling High Pressure Processes: Equipment Design, Process Performance Evaluation, and Validation*. Food Engineering Series. Springer, New York, NY., 2016.
- MAKITA, T.: «Application of high pressure and thermophysical properties of water to biotechnology.» *Fluid Phase Equilibria*, 1992, **76**, pp. 87–95.
- MASANA, M.; BARRIO, Y.X.; PALLADINO, P.M.; SANCHO, A.M. y VAUDAGNA, S.R.: «Assessment of the effectiveness of high pressure processing and sodium lactate addition to inactivate native *Escherichia coli* O157:H7 and spoilage microflora in cured beef carpaccio.» *Food Microbiology*, 2015, **46**, pp. 610–617.
- MONTGOMERY, D.C.: *Design and analysis of experiments*. Michigan University, 2003.
- OTERO, L.; MOLINA-GARCÍA, A. y SANZ, P.D.: «Thermal effect in foods during quasi-adiabatic pressure treatments.» *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2000, **1(2)**, pp. 119–126.

- OTERO, L. y SANZ, P.D.: «Modelling heat transfer in high pressure food processing: a review.» *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2003, **4(2)**, pp. 121–134.
- PARZANESE, M.: «Tecnologías para la Industria Alimentaria. Tecnología de las altas presiones hidrostáticas.» *Ficha 9. Alimentos Argentinos. Ministerio de Agricultura.*, 2010.  
[www.alimentosargentinos.gob.ar](http://www.alimentosargentinos.gob.ar)
- PATANKAR, S.V. y SPALDING, D.B.: «A Calculation Procedure for Heat, Mass and Momentum Transfer in Three-Dimensional Parabolic Flows.» *International Journal of Heat and Mass Transfer*, 1972, **15**, pp. 1787–1806.
- PEGA, J.; DENOYA, G.I.; CASTELLS, M.L.; SARQUIS, S.; ARANIBAR, G.F.; VAUDAGNA, S.R. y NANNI, M. R.: «Effect of high pressure processing on quality and microbiological properties of a fermented beverage manufactured from sweet whey throughout refrigerated storage.» *Food and Bioprocess Technology*, 2018, **11(6)**, pp. 1101–1110.
- PUPPO, C.; CHAPLEAU, N.; SPERONI, F.; LAMBALLERIE-ANTON, M.; DE MICHEL, F. y AÑÓN, C.: «Physicochemical modifications of highpressure-treated soybean protein isolates.» *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, **52(6)**, pp. 1564–1571.
- RASANAYAGAM, V.; BALASUBRAMANIAM, V.M.; TING, E.; SIZER, C.E.; BUSH, C. y ANDERSON, C.: «Compression heating of selected fatty food materials during high-pressure processing.» *Journal of Food Science*, 2003, **68**, pp. 254–259.
- ROBYT, J.F.; ACKERMAN, R.J. y CHITTENDEN, C.G.: «Reaction of protein disulfide groups with Ellman's reagent: a case study of the number of sulfhydryl and disulfide

- groups in *Aspergillus oryzae* -amylase, papain, and lysozyme.» *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1971, **147(1)**, pp. 262–269.
- SANGER, F.: «Chemistry of Insulin Science.» *Science*, 1959, **129(3359)**, pp. 1340–1344.
- SANTA CRUZ, L.: *Purificación de  $\alpha$ -amilasa de *Aspergillus oryzae* por adsorción*. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas, 1997.
- SANZ, P.; FERNÁNDEZ, P.; MOLINA-GARCÍA, A.; OTERO, L.; GUIGNON, B. y VAUDAGNA, S.R.: «Combination of conventional freezing and high pressure-low temperature treatments: effect on physical properties, microbial quality and storage stability of beef meat.» *Meat Science*, 2007, **77**, pp. 616–625.
- SAUL, A. y WAGNER, W.: «A fundamental equation for water covering the range from the melting line to 1273 K at pressures up to 25000 MPa.» *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 1989, **18(1537)**.
- SHARIFI-RAD, J.; TAKTAZ, F. y HOSEINI-ALFATEMI, S.: «Bioinformatics analysis of  $\alpha$ -amylase three-dimensional structure in *Aspergillus oryzae*.» *British Biomedical Bulletin*, 2014, pp. 1–6.
- SMELT, J.P.P.M.: «CFD simulation of coupled heat and mass transfer through porous foods during vacuum cooling process.» *Trends in Food Science and Technology*, 1998, **9**, pp. 152–158.
- SZERMAN, N.; BARRIO, Y.; SCHROEDER, B.; MARTÍNEZ, P.; SANCHO, A.M.; SANOW, C. y VAUDAGNA, S.R.: «Effect of high hydrostatic pressure treatments on physicochemical

properties, microbial quality and sensory attributes of beef carpaccio.» En: *International Congress on Engineering and Food ICEF 11*, , 2011.

SZERMAN, N.; FERRARI, R.; SANCHO, A. M. y R., VAUDAGNA S.: «Response surface methodology study on the effects of sodium chloride and sodium tripolyphosphate concentrations, pressure level and holding time on beef patties properties.» *LWT-Food Science and Technology*, 2019, **109**, pp. 93–100.

TEAM, R CORE: *R CRAN-PROYECT. A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2013.

<http://www.R-project.org/>

TÉLLEZ, L.; RAMÍREZ, J. A.; PÉREZ LAMELA, C.; VÁZQUEZ, M. y SIMAL GÁNDARA, J.: «Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos.» *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 2001, **3(2)**, pp. 66–80.

TEREBIZNIK, M.R.: *Alfa-amilasa de Aspergillus oryzae: estudios de producción por fermentación en sustrato sólido purificación y estabilización*. Tesis doctoral, Universidad de Buenos Aires, 1998.

TING, E.; BALASUBRAMANIAM, V.M. y RAGHUBEER, E.: «Determining thermal effects in high-pressure processing.» *Food technology*, 2002, **56(2)**, pp. 31–35.

TORREZAN, R.; THAM, W.; BELL, A. E.; FRAZIER, R. y CRISTIANINI, M.: «Effects of high pressure on functional properties of soy protein.» *Food Chemistry*, 2007, **104(1)**, pp. 140–147.

- TRIVEDI, M.; LAURENCE, J. y SIAHAAN, T.: «The role of thiols and disulfides in protein chemical and physical stability.» *Current Protein and Peptide Science*, 2009, **10(6)**, pp. 614–625.
- USDA: «<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/SafePracticesforFoodProcesses>», 2000.
- VAN DER PLANCKEN, I.; GRAUWET, T.; OEY, I.; VAN LOEY, A. y HENDRICKX, M.: «Impact evaluation of high pressure treatment on foods considerations on the development of pressure temperature time integrators.» *Trends in Food Science and Technology*, 2008, **19**, pp. 337–348.
- VAUDAGNA, S.R.; GONZÁLEZ, C.; APARICIO, C.; GUIGNON, B.; OTERO, L. y SANZ, P.: «Effect of high hydrostatic pressure at subzero temperature on quality of ready-to-eat cured beef carpaccio.» *Meat Science*, 2012, pp. 575–581.
- VAUDAGNA, S.R.; GONZÁLEZ, C.; GUIGNON, B.; APARICIO, C.; OTERO, L. y SANZ, P.: «Aplicación de la tecnología de altas presiones hidrostáticas a temperatura subcero en el desarrollo de un producto listo para consumir (carpaccio) preparado con carne vacuna.» En: *XII Congreso de Ciencia y Tecnología de Alimentos (CYTAL)*, , 2009.
- VELÁZQUEZ, G.; VÁZQUEZ, P.; VÁZQUEZ, M. y TORRES, J. A.: «Aplicaciones de procesado de Alimentos por Altas Presiones.» *Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 2005, **4(5)**, pp. 342–352.
- WAGNER, W. y PRUSS, A.: «The IAPWS Formulation 1995 for the Thermodynamic Pro-

erties of Ordinary Water Substance for General and Scientific Use.» *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 2002, **31**, pp. 1–150.

WELTI-CHANES, J.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E.; BERMÚDEZ, D.; GUERRERO-BELTRÁN, J.A. y BARBOSA-CÁNOVAS, G.V.: «Fundamentals and Applications of High Pressure Processing of Foods.» En: *Novel Food Processing Technologies*, CRC Press, 2005.

YORDANOV, D.G. y ANGELOVA, G.V.: «High pressure processing for foods preserving.» *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 2010, **24(3)**, pp. 1940–1945.