

PRESIÓN HIDROSTÁTICA ULTRA ALTA, USOS Y PERSPECTIVAS EN LAS CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

Lila Lubianka Domínguez-Ramírez

RESUMEN

La PHUA (presión hidrostática ultra alta), también llamada pascalización, presurización o presión isostática, es un proceso que consiste en someter un objeto a una presión que puede estar en el intervalo de 100 a 1000 MPa y mantenerla un tiempo determinado. Se denomina presión hidrostática ya que es aplicada a fluidos o a productos sólidos a través de un fluido. La historia de la PHUA comienza con su uso en la metalurgia, posteriormente se dio inicio a la investigación en sistemas biológicos y alimentos y en los últimos años se ha despertado el interés en otros campos como la medicina, la bioquímica, la biología molecular, entre otros. Si bien, el uso de la PHUA se ha centrado principalmente en la conservación de alimentos, gracias a las mejoras en los equipos de altas presiones es que se ha podido incrementar la investigación y extender su industrialización. Particularmente, para la industria alimentaria es importante porque permite eliminar microorganismos patógenos y disminuir el número de microorganismos relacionados con la descomposición del alimento, permitiendo con ello incrementar el tiempo de vida útil sin alterar sabor, aroma ni nutrientes.

Palabras Clave: presión hidrostática ultra alta, nueva tecnología, ciencias biológicas.

High hydrostatic pressure, uses and perspectives in the biological sciences and health

ABSTRACT

High Hydrostatic Pressure (HHP), also called pascalization, pressurization or isostatic pressure is a process in which a product is subjected to pressures between 100 to 1000 MPa during some minutes, depending on the nature of the product. This process is called hydrostatic pressure because the pressure is applied to a fluid and then is transmitted directly to the object. The history of HHP began with its use on metallurgy, then there was a growing interest on researching its applications on other fields, for example, the effect on biological systems and on the food industry. Nowadays the use of HHP is mainly centered on food preservation (by decreasing microbial counts and eliminating pathogens, improving microbiological quality without modification on flavor, taste or nutritional value), the upgrading and development of new equipments with higher capabilities has opened the doors for more research and the possibility of upscaling at industrial level. In recent years, there has been an increased interest on the use of this process in diverse sciences such as medicine, biochemistry, molecular biology, etc.

Key Words: High hydrostatic pressure, new technology, biological sciences.

ARTÍCULO RECIBIDO EL 03 DE OCTUBRE DEL 2013 Y ACEPTADO EL 19 DE NOVIEMBRE DEL 2013.

HISTORIA

Las áreas de la física, la metalurgia y la geoquímica fueron las primeras interesadas en el uso de presión hidrostática, para analizar el fenómeno *per se* o con una aplicación práctica como la fabricación de cerámicas, diamantes, cristales de cuarzo, obtención de placas finas de metal, superaleaciones, etc. Durante la segunda mitad del siglo XIX el interés se desvió hacia el campo de las ciencias de la vida. Hacia 1878, Bert y col.¹ estudiaron el efecto de la presión del oxígeno en los organismos vivos a nivel químico y biológico en la sangre; y en 1884, Regnard y col.², se enfocaron en el efecto de la presión sobre microorganismos de agua salada y agua corriente.

La aplicación del tratamiento con alta presión fue estudiado en alimentos por primera vez en 1899 por Hite y col.³, para el procesamiento de la leche, con el fin de extender su vida de anaquel (aplicando 463 MPa durante 1 hora). Posteriormente al trabajo de Hite se presentó un desarrollo de la tecnología asociada a las altas presiones, no siempre aplicado a la industria alimentaria. Durante las décadas de 1970 y 1980 hubo una mejora sustancial en la maquinaria y el proceso de PHUA aplicado en la industria metalúrgica y, con ello, se abrió la posibilidad de investigar nuevas aplicaciones de este proceso en otras áreas al generarse equipos más eficientes, con capacidad de conseguir presiones más elevadas y con equipos de menor tamaño. Se desarrollaron equipos capaces de generar presiones superiores a 300 MPa. Con estos comenzó a estudiarse, por ejemplo, el comportamiento de diferentes especies microbianas ante la presurización, como la atenuación⁴, diferencias en las sensibilidades⁵⁻⁷, la inducción de inmunogenicidad bacteriana⁸⁻¹¹, el efecto sobre las enzimas tanto a nivel estructural y en su actividad^{7, 12-14}, etc.

Es durante el periodo de 1950 hacia nuestros días cuando se da un gran desarrollo industrial. Particularmente, la década del 80 tiene gran significado, pues es cuando la investigación en el área de alimentos retoma fuerza y Japón se convierte en el primer país en producir y comercializar alimentos presurizados (jugos y derivados de frutas) hacia 1991¹⁵. De hecho, se puede decir que los grandes progresos conseguidos en la industria alimentaria han facilitado también el desarrollo de nuevos equipos, incluidos aquellos desarrollados para la investigación, que han despertado el interés por el efecto de las altas presiones en áreas como bioquímica, biología, química y con aplicaciones en medicina o en la industria farmacéutica, entre otras.

PRINCIPIO Y TRATAMIENTOS CON PRESIÓN HIDROSTÁTICA ULTRA ALTA

La presión está definida como la fuerza (F) aplicada en dirección perpendicular a una superficie, por unidad de área de esta superficie. Matemáticamente queda definida por la ecuación:

$$P = F / A \dots\dots\dots ec. 1$$

La unidad de presión utilizada regularmente es el Pascal (Pa), que equivale: $1Pa=1N/1m^2=10^{-5}$ bar. En los estudios de PHUA

se usa con mayor frecuencia el megaPascal (MPa), debido a los grandes valores que se utilizan ($1 MPa = 10^6 Pa$).

El proceso de PHUA consiste en someter un objeto (alimento u otro objeto) a una presión que puede estar en el intervalo de 100 a 1000 MPa y mantenerla un tiempo determinado. Se denomina presión hidrostática, ya que es aplicada a fluidos o a productos sólidos a través de un fluido (al encontrarse sumergidos en este). Así, este proceso se rige por el Principio de Pascal o Ley Isostática, es decir, la presión se transmite instantáneamente y de forma uniforme (en todas las direcciones y todos los puntos) a través de la masa del fluido y el sólido (figura 1)^{13, 15-16}. Esto es independiente del tamaño y geometría del objeto e independiente de la relación tiempo/volumen (al contrario de los tratamientos térmicos); por ello, los tiempos de proceso tienden a ser cortos. De esta manera, ya que sigue este principio también es denominada presión isostática.

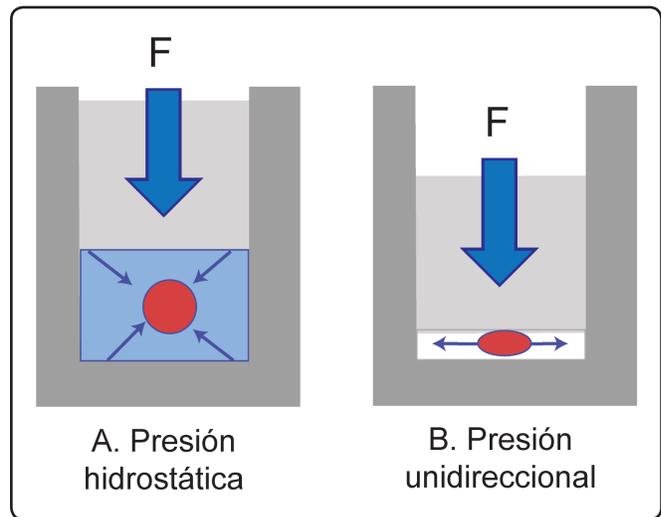


Figura 1. En A, el Principio de Pascal que rige el proceso de presión hidrostática, es decir, la presión se transmite instantáneamente y de forma uniforme al líquido y al sólido; en B, la presión unidireccional concentra toda la fuerza aplica en una misma dirección sobre el sólido, causando su deformación.

La PHUA puede producirse por medio de compresión directa o por compresión indirecta. La compresión directa es utilizada para productos líquidos, ya que la alta presión se obtiene por la presurización de este líquido mediante un pistón, de forma inmediata y a gran velocidad, como se aprecia en la figura 2A. En tanto que la compresión indirecta es utilizada con productos sólidos y semisólidos, ya que se requiere un intensificador de alta presión que bombea el medio presurizante (líquido) desde un depósito hacia la cámara de presurizado hasta alcanzar la presión deseada (figura 2B). Este método es utilizado ampliamente en la industria y usualmente se usa agua como medio presurizante,

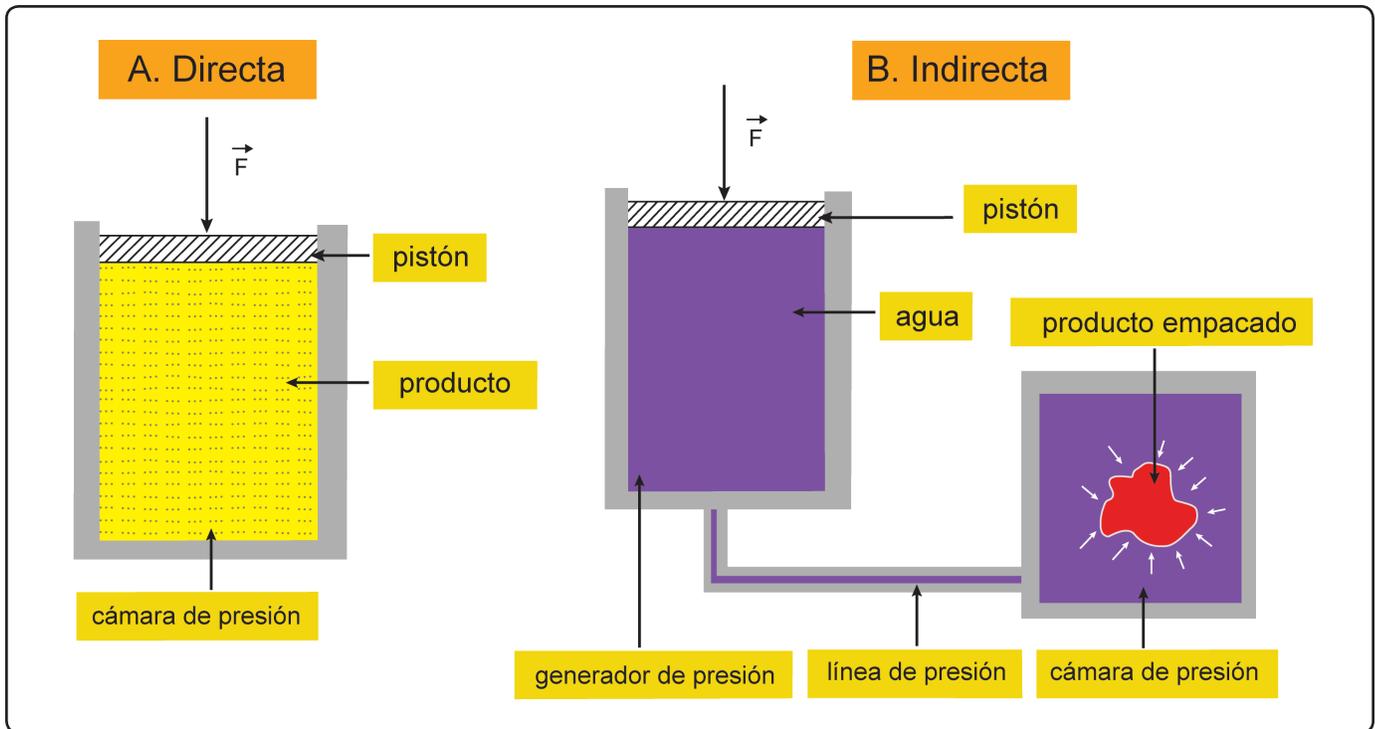


Figura 2. Principios de funcionamiento de la presión directa y de la presión indirecta [modificación a partir de 7].

ya que esta no modifica su volumen con la presión ni causa alteraciones en la cámara de presurizado.

Así mismo, la PHUA puede usarse junto con temperatura modificada. De esta manera, puede considerarse: la presión hidrostática fría, utilizando temperaturas por debajo de la temperatura ambiente; presión hidrostática templada, donde se usan temperaturas de entre temperatura ambiente hasta cerca de 200°C; y la presión hidrostática caliente, con temperaturas superiores a 200°C y que son aplicadas en la industria metalúrgica y de cerámicas. En la industria alimentaria y en la investigación en el área de las ciencias biológicas y de la salud, es común utilizar en frío o templada.

EQUIPOS DE PHUA

Los equipos comerciales están constituidos por una cámara o contenedor de acero inoxidable, un sistema generador de presión o intensificadores de presión (una o varias bombas), un mecanismo de control de temperatura (cuando es necesario calentar se cuenta con una resistencia eléctrica y cuando se requiere de calentamiento-enfriamiento, se incluye una chaqueta de enfriamiento), junto con un sistema de carga y descarga, así como un fluido transmisor de presión (comúnmente agua). El control de la temperatura es muy importante; por ejemplo, si una sustancia u objeto termolábil se somete a presiones de varios cientos de MPa, ya que la temperatura aumenta de 1 a 3°C por cada 100 MPa^{17,18}. De tal manera que se pueden elegir presiones a las cuales la temperatura no afecte el producto y modificar el tiempo de presurizado para conseguir el objetivo

de disminuir carga microbiana o esterilizar, según sea el caso. Usualmente se trata de un proceso por lotes, dependiente de la capacidad de la cámara donde se colocará el objeto o producto. Otra consideración que se debe tomar en cuenta es que cada producto tiene sus propias cualidades y características, por ello es indispensable evaluar todos los parámetros necesarios para encontrar las condiciones ideales del proceso.

En la actualidad hay fabricante que diseñan y elaboran equipos para escala industrial, como Hiperbaric (España: <http://www.hiperbaric.com/en>), pero también existen algunos que ofrecen equipos para laboratorio o planta piloto, como, por ejemplo, Elmhurst Research Inc. (EE. UU.: <http://www.elmhurstresearch.com>). Un ejemplo es el *500mL 100ksi Heated HPP Lab Unit* de esta compañía (figura 3), en el cual la velocidad de aumento de presión es de 0 a 345 MPa es de 16.78 ± 2.40 MPa/s¹⁹.

COSTOS E INVERSIÓN

En los últimos años se ha dado un avance significativo en las nuevas tecnologías. Se han obtenido grandes progresos en los últimos equipos y se ha logrado una exitosa comercialización de muchos productos alimentarios tratados con presión hidrostática ultra alta. Hay equipos que trabajando a máxima capacidad durante 20 h, 360 días poseen una vida económica de 7 años, así mismo, existen modelos para los que se ha estimado una productividad desde 170 kg/h con un costo de 0.19 €/kg (0.25 dólares americanos o USD) hasta 2000 kg/h con un costo de 0.5 €/kg (0.65 USD) operando al 50% de capacidad y procesando durante 3 minutos con 600 MPa²⁰. De manera que

VERTIENTES

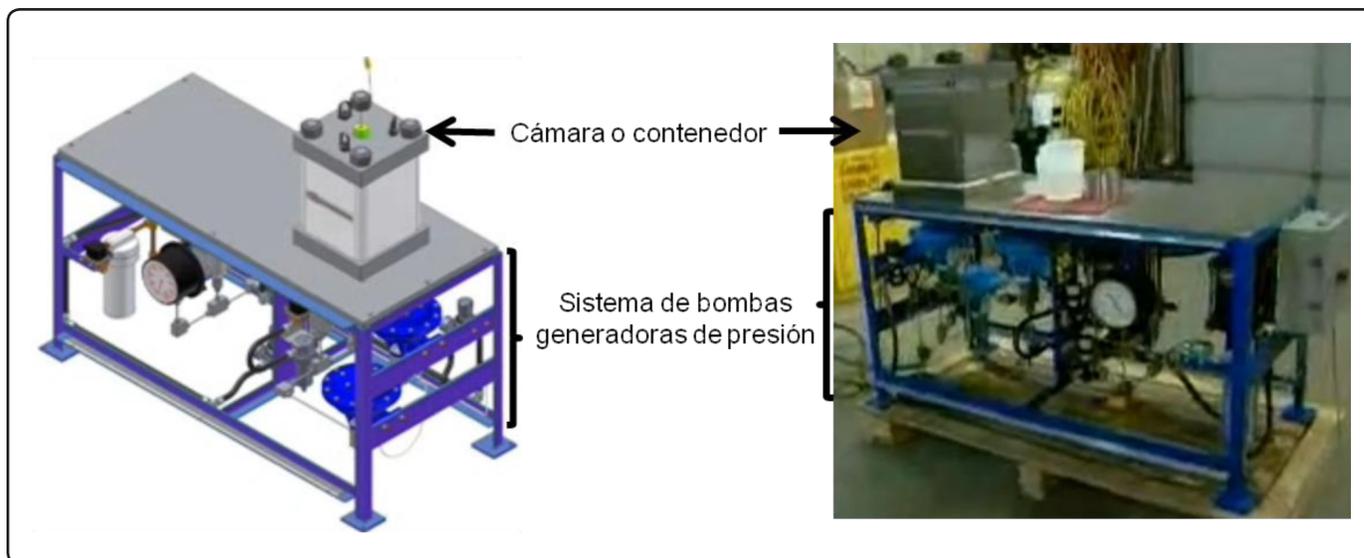


Figura 3. Equipo 500mL 100ksi Heated HPP Lab Unit de Elmhurst Research Inc.

se ha calculado que el valor añadido por libra es equivalente a un costo no mayor de 0.20 USD, en el área de alimentos²⁰.

USOS Y APLICACIONES

En el área de la medicina se ha planteado el uso de la presurización para la desinfección de biomateriales como prótesis, placas óseas, ligamentos y tendones artificiales, entre otros. Los tratamientos convencionales como radiación, esterilización con calor húmedo (en autoclave) o el uso de detergentes, comprometen la integridad biológica y biomecánica de estos materiales. Sustitutos de hueso de fosfato de calcio, tendones de Aquiles y huesos trabeculares mantienen su estabilidad e integridad después de ser tratados con PHUA, sin causar pérdida de función, pero inactiva células tumorales en tendón y tejido óseo y células bacterianas¹¹. En otras áreas se sugiere el uso de la presión junto con calor moderado para esterilizar herramientas médicas para cirugía o para endoscopia¹⁰.

Otra de las posibles aplicaciones gira en torno a la hipótesis que sugiere que patógenos inactivados mediante PHUA pueden estimular el sistema inmunológico, abriendo la posibilidad de su uso como vacunas. Otra posible estrategia sería el uso de *fantasmas bacterianos* en lugar de células atenuadas o muertas. Usualmente estos fantasmas se obtienen por la expresión de genes del ciclo lítico, pero sin que ocurra daño en la membrana o en la pared celular, por lo que se mantendrían sus propiedades inmunogénicas. Por ejemplo, en el área de la virología, los virus tratados con PHUA pierden infectividad pero mantienen su capacidad para estimular la formación de anticuerpos. También se sugiere la hipótesis de que al presurizar la cápside, esta se disocia y al reasociarse genera una partícula vírica no infecciosa, pero que mantiene sus propiedades inmunogénicas, además de que epítopes anteriormente ocultos pueden quedar expuestos, incrementando la inmunogenicidad del virus inactivado^{10,11}.

En biología molecular y bioquímica, Pressure Biosciences Inc. ha desarrollado un nuevo método de extracción celular combinando ciclos de presurización junto con extracción con solventes y centrifugación, para obtener fracciones de diferentes moléculas (extracción y purificación mejorada con presurización, patente número US6, 120, 985; aislamiento y purificación de ácidos nucleicos con patente número US6, 111, 096). Con ello, se han obtenido buenos rendimientos para la extracción de proteínas, lípidos, DNA o RNA intactos e incluso organelos, sin necesitar algún paso posterior de purificación²¹⁻²³.

Se ha propuesto como método para la fijación de preparaciones histológicas, comparando la fijación con presiones de 450 MPa por 15 minutos respecto a la fijación con formalina y se obtienen muestras uniformes, firmes, elásticas y pálidas, muy parecidas a las fijadas con formalina, manteniendo la integridad de estructuras finas en tejido de corazón e intestino. Además de que por medio de esta nueva técnica se puede detectar la actividad de la fosfatasa alcalina²⁴.

El uso de PHUA también se ha planteado, por ejemplo, para mejorar la extracción de compuestos químicos de interés farmacéutico a partir de plantas medicinales. Muchos de estos compuestos bioactivos son termolábiles y los métodos de extracción convencionales involucran calentamiento continuo por periodos prolongados (p. ej., extracción mediante reflujo, extracción con soxhlet). Se ha reportado la extracción exitosa de compuestos bioactivos utilizando PHUA, como es el caso de la extracción de los tres principales compuestos fenólicos de *Rubus coreanus* (especie de frambuesa nativa de China, Corea y Japón), utilizando 500 MPa por 15 minutos, mejorando el rendimiento de la extracción convencional basada en métodos térmicos y que dura de 24 a 36 h²⁵.

Igualmente, se ha propuesto el uso de PHUA junto con calor moderado para esterilizar formulaciones cosméticas o liposomas, La PHUA ya ha sido utilizada exitosamente para homogenizar y clarificar jugos en el área de alimentos, contribuye a mejorar la dispersión de las partículas. Así, esta capacidad y la formación de geles de polisacáridos o geles de polisacáridos-proteínas homogéneos es de gran interés también para la industria cosmética y la farmacéutica. Por ejemplo, geles presurizados y emulsiones de proteínas floculadas tienen características reológicas particulares y pueden contribuir a la liberación controlada de principios activos¹⁰.

De esta manera, el uso de la PHUA no solo se restringe a la industria alimentaria como método de conservación, sino que también resulta ser una tecnología con buenas perspectivas en diferentes áreas y que posee aún muchas funciones novedosas por descubrir y evaluar.

EFFECTO SOBRE EL AGUA Y MACROMOLÉCULAS

En agua, usando 600 MPa a una temperatura de 22°C, esta se comprime 15% y la temperatura aumenta de 1 a 3°C, induciéndose también un descenso del pH de 0.2 a 0.5 unidades por cada 100 MPa^{19,26,27}.

Macromoléculas como las proteínas pueden sufrir una desnaturalización reversible usando presiones de hasta 300 MPa. A presiones superiores puede ocurrir la disociación irreversible, generando la gelificación o precipitación de estas, con daño subsecuente a los sistemas biológicos^{7,13-15}.

La presión puede generar la ruptura de interacciones no covalentes débiles como las interacciones electrostáticas y las hidrofóbicas, que son aquellas que estabilizan la estructura terciaria y cuaternaria de proteínas. Con la aplicación de presión, las regiones hidrofóbicas quedan expuestas (pueden quedar atrapadas moléculas de agua al interior de la proteína promoviendo que zonas hidrofílicas antes ubicadas en la zona externa de la proteína queden en la parte interna), lo que genera la agregación de la proteína y la pérdida de agua (formación de exudado), junto con la disminución del volumen^{11,14,15}. Este efecto se ve reforzado por el Principio de Le Chatelier (que junto con el Principio de Pascal, rige el proceso físico de la PHUA). De acuerdo con el Principio de Le Chatelier, la presurización acelera las reacciones que involucran un cambio de volumen, favoreciéndolas en la dirección de su disminución^{7,15}.

Cuando se trata de proteínas oligoméricas puede ocurrir un cambio conformacional, ya sea por la disociación o una mala reasociación de sus componentes (cuando el efecto es reversible); hay un cambio en la estructura intermolecular y cambios en la hidratación que pueden causar dificultades para replegarse o causar un plegamiento incorrecto que afecte los sitios de unión del grupo prostético o del sustrato^{7,11,14,15}.

Moléculas de bajo peso molecular como aminoácidos o vitaminas no son afectados; sin embargo, presiones de entre 300 y 600

MPa promueven la oxidación de lípidos que puede continuar durante el almacenamiento del producto²⁸. Además, sistemas lipídicos como membranas celulares suelen verse afectados por la presurización, modificando el estado de la bicapa lipídica^{11,29}.

EFFECTO SOBRE MICROORGANISMOS

La alta presión produce cambios en diferentes niveles de la célula dependiendo del tiempo, temperatura de procesamiento y presión aplicada, llegando incluso a producir modificaciones morfológicas. La combinación de este conjunto de cambios afecta la viabilidad de las células vegetativas (tabla 1).

Presión (MPa)	Efectos
> 200	Influencia sobre la cinética enzimática Modificación de las propiedades físicas de las proteínas Alteración de la membrana plasmática
> 300	Inactivación irreversible de enzimas Muerte de los microorganismos
> 400	Gelificación de almidones Desnaturalización de proteínas
> 500	Muerte de las esporas bacterianas Inactivación de enzimas involucradas en la esporulación

Tabla 1. Principales efectos de la PHUA sobre la microbiota en alimentos.

La membrana celular es el blanco primario del daño ya que los sistemas de lípidos son lábiles a la presión. El arreglo de la bicapa lipídica pasa de un estado líquido-cristalino a un estado de gel al compactarse los fosfolípidos y la fluidez disminuye conforme aumenta la presión^{11,29}. Por ende, también hay una disrupción entre la unión de la membrana celular y la pared celular, generando con ello cambios en la morfología y también modificaciones que alteran la permeabilidad de la membrana^{7,13,15}. Se presenta la inhibición de reacciones productoras de energía tanto por la pérdida de estabilidad de membrana, así como por la pérdida de actividad enzimática general³⁰. Disminuye la síntesis de DNA y hay disminución en los mecanismos de reparación y se produce la desnaturalización de otros biopolímeros⁶. Con la alteración de la permeabilidad de membrana, se pierde la capacidad para mantener el gradiente de pH (que también afecta las reacciones productoras de energía, por lo que hay una disminución en la producción de ATP), se pierde el balance osmótico y las proteínas de transporte también se ven afectadas^{7,15,29}.

Considerando que la desnaturalización de proteínas es irreversible aplicando presiones por encima de 300 MPa y con ello se afectan los sistemas biológicos^{7,11,14,15}, valores

superiores a este son utilizados con mayor frecuencia como método de conservación, ya sea disminuyendo carga microbiana o esterilizando.

El grado en que estos factores se vean afectados originará la disminución de la población microbiana, que es proporcional con el incremento de la presión utilizada en el tratamiento o con el tiempo en que esta es aplicada³¹. Levaduras y hongos filamentosos presentan mayor susceptibilidad, las bacterias gram-negativas son menos susceptibles pero se ven más afectadas que las bacterias gram-positivas que son más resistentes a la presurización, pero las esporas bacterianas lo son aún más⁵⁻⁷. Las células vegetativas son destruidas en un margen de 300 a 700 MPa³⁰. Las esporas bacterianas, en cambio, resisten hasta 1000 MPa; por ello, comúnmente se recurre a la aplicación de presión moderada y alta temperatura para su germinación y después se somete a tratamiento con alta presión para inactivar^{13, 32}.

VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE PHUA

La PHUA no depende del tamaño ni de la forma del objeto a procesar. Es independiente de la masa y del tiempo, la presión actúa de forma inmediata, por lo que no se genera gradiente de presión; así, los tiempos de proceso son cortos. No afecta enlaces covalentes, solamente uniones e interacciones débiles como fuerzas electrostáticas e interacciones hidrofóbicas. Puede aplicarse a temperatura ambiente, por lo que representa menor gasto energético que los procesos térmicos. Además es amigable con el ambiente porque no se generan residuos ni se requieren aditivos químicos para mejorar el proceso.

Sin embargo, también existen algunas desventajas; por ejemplo, las esporas bacterianas son barotolerantes y para inactivarlas se requieren presiones de hasta 1000 MPa. Otra desventaja consiste en que las altas presiones pueden tener efecto en algunas características del producto; por ejemplo, en alimentos, las texturas y el color pueden tener cambios^{13,16,17,33}. Por ello, es importante que para cada nuevo producto que se desee procesar por medio de esta tecnología se deben hacer las evaluaciones pertinentes, tanto de calidad microbiológica como de las características propias del producto.

Hay que mencionar también que puede haber cierta desconfianza del consumidor ante algo novedoso y desconocido como las nuevas tecnologías y esto es un aspecto limitante. Sin embargo, por ejemplo, los alimentos que han sido procesados mediante PHUA van aumentando su popularidad en países como Japón, EE.UU. y algunos europeos como Italia, España y Francia. Las personas han mostrado que si se les informa sobre los beneficios del uso de esta nueva tecnología y de las mejoras en la calidad y seguridad del producto que se pueden conseguir sin un incremento sustancial del costo (entre \$0.25 a \$0.50 USD), estarían dispuestos a adquirirlo³⁴. Gran parte de la población es consciente de la necesidad de nuevas tecnologías para mejorar la calidad de vida.

AGRADECIMIENTO

Gracias a la Dra. Carmen Wachter Rodarte por el espacio y por el tiempo que me ha prestado para conocer más sobre la PHUA. Igualmente, al Dr. Alberto Tecante Coronel por permitirme conocer y utilizar el equipo de PHUA del Dpto. de Alimentos y Biotecnología del Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

REFERENCIAS

- Bert, P. (1978) La Pression Barométrique. In : Recherches de Physiologie Expérimentale. Paris : Masson ; 1978. p. 15-35.
- Regnard P. Recherches expérimentales sur l'influence des très hautes pressions sur les organismes vivants. *CR Hebd Acad Sci.* 1884; **98**: 746-747.
- Hite BH. The effect of pressure in the preservation of milk. *West Virginia Agricultural Experiment Station.* 1899; **58**(1): 15-35.
- Chlopin G, Tamman G. Über den einfluss hoher drücke auf mikroorganismen. *Z Hyg Infektionskr.* 1903; **45**: 171-204.
- Shigehisa T, Ohmori T, Saito A, Taji S, Hayashi R. Effects of High Hydrostatic Pressure on Characteristics of pork slurries and inactivation of microorganisms associated with meat and meat products. *Int J Food Microbiol.* 1991; **12**:207-216.
- Smelt JPPM. Recent advances in the microbiology of high pressure processing. *T Food Sci & Technol.* 1998; **9**:152-158.
- Hugas M, Garriga M, Monfort JM. New mild Technologies in meat processing: high pressure as a model technology. *Meat Sci.* 2002; **62**:359-371.
- Larson WP, Hartzell TB, Diehl HS. The effect of high hydrostatic pressure effects on bacteria. *J Infect Dis.* 1918; **22**: 271-279.
- Silva JL, Luan P, Glaser M, Voss EW, Weber G. Effects of hydrostatic pressure on a membrane-enveloped virus: high immunogenicity of the pressure-inactivated virus. *J Virol.* 1992; **66**: 2111-2117.
- Masson P, Tonello C, Balny C. High-pressure biotechnology in medicine and pharmaceutical science. *J Biomed Biotech.* 2001; **1**(2): 85-88.
- Rivalain N, Roquain J, Demazeau G. Development of high hydrostatic pressure in biosciences : Pressure effect on biological structures and potencial applications in Biotechnologies. *Biotech Adv.* 2010; **28**(6): 659-672.
- Bridgman PW. The coagulation of albumen by pressure. *J Biol Chem.* 1914; **19**: 511-512.
- Heinz V, Knoch A, Lickert T. Product innovation by high pressure processing. *New Food.* 2009; **2**: 43-47.
- Sun XD, Holley RA. High Hydrostatic Pressure Effects on the Texture of Meat and Meat Products. *J. Food Sci.* 2010; **75**(1): 17-23.
- Téllez-Luis SJ, Ramírez JA, Pérez-Lamela C, Vázquez M, Simal-Gándara J. Aplicación de la alta presión hidrostática en la conservación de los alimentos. *Cienc Tecnol Aliment.* 2001; **3**(2): 66-80.
- Raventós M. Industria Alimentaria. Tecnologías Emergentes.

España: Ediciones UPC; 2005: 25, 26, 77, 78.

17. Herrero AM, Romero de Avila MD. Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *Rev. Med. Univ. Navarra*. 2006; **50**(4): 71-74..

18. Kerr KG, Birkenhead D, Seale K, Major J, Hawkey PM. Prevalence of *Listeria* spp. on the hands of food workers. *J Food Prot.* 1993; **56**: 525-527.

19. Domínguez-Ramírez LL. Efecto de tratamientos de Presión Hidrostática Ultra Alta sobre la microbiota de carne fresca. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. México, D. F. 2013.

20. Picouet P, Pérez-Juan M, Realini CE. High Hydrostatic Pressure technology on fresh beef and beef products. *Recerca I Tecnologia Agroalimentàries*. España. 2008 [citado 30 May, 2011] Formato electrónico: URL: <http://prosafefeef.eu/>

21. Tao F, Shumacher RT, Lawrence NP, Gross V, Smejkal G, Lazarev A. Pressure Biosciences Inc. Extraction of biomolecular complexes assisted by alternating hydrostatic pressure. United State Patent US 2009/0286301. 2009 [citado 13 mayo, 2013] Formato electrónico: URL: <http://www.freepatentsonline.com/y2009/0286301.html>

22. Gross V, Carlson G, Kwan AT, Smejkal G, Freeman E, Evanov AR. Tissue fractionation by hydrostatic pressure cycling technology: the unified sample preparation technique for systems biology studies. *J Biomol Tech.* 2008; **19**: 189-199.

23. Gross V, Lazarev A, Lawrence N, Schumacher R. Isolation of mitochondria from cell cultures by PTC for proteomic analysis. *Biotechniques*. 2008; **45**: 99-100.

24. Takemura G, Fujiwara H, Ogawa J, Fujiwara T, Sasayama S. Fixation of biological specimens by high hydrostatic pressure. *Arch Histol Cytol.* 1993; **56**(4): 411-416.

25. Seo YC, Choi WY, Kim JS, Yoon CS, Lim HW, Cho JS, Ahn J-H, Lee HY. Effect of ultra high pressure processing on immuno-modulatory activities of the fruits of *Rubus coreanus* Miquel. *Inn Food Sci Emerg Technol.* 2011; **12**: 207-215.

26. Cheftel JC, Cuolioli J. Effects of high pressure on meat: A review. *Meat Sci.* 1997; **46**(3): 211-236.

27. Kerry JP, Kerry JM, Ledward DA. Eds. Meat processing: Improving quality. Cambridge, Reino Unido: Woodhead Publishing; 2002.

28. Simonin H, Durantón F, de Lamballerie-Anton. New insights into the high-pressure processing of meat and meat products. *Comprehensive Reviews. Food Sci Food Safe.* 2012; **11**: 285-306.

29. Aymerich T, Picouet PA, Monfort JM. Decontamination technologies for meat products. *Meat Sci.* 2008; **78**: 114-129.

30. Farkas J. Métodos de conservación y conservantes: Métodos físicos. In: Eds. Doyle MP, Beuchant LR, Montville TJ. Microbiología de los alimentos. Fundamentos y fronteras. España: Editorial Acribia; 2001. p. 519, 522-526, 530-537.

31. Fonberg-Broczek M, Windyga B, Szczawinski K, Szczawinska M, Pietrzak D, Prestamo G. High pressure processing for food safety. *A. Bioch. Pol.* 2005; **52**(3): 721-724.

32. Cheftel JC. High Pressure, microbial inactivation and food preservation. *Food Sci. Technol. Int.* 1995; **1**: 75-90.

33. Sangronis E, Pothakamury U, Ramos AM, Ibarz A, Barbosa GV. La alta presión hidrostática: Una alternativa en el procesamiento no térmico de los alimentos. *Alimentos.* 1997; **33**: 32-43.

34. Hicks DT, Pivarnik LF, McDermott R, Richard N, Hoover DG, Kniel K. Consumer Awareness and Willingness to Pay for High-Pressure Processing of Ready-to-Eat Food. *Food Science Education Research.* 2009; **8**(2): 32-38.