



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

Eliminación de Anisakis en vísceras de pescado mediante Pulsos Eléctricos de
Alto Voltaje

Anisakis inactivation in fish guts with Pulsed Electric Fields

Autor/es

Manuel Bielsa Campo

Director/es

Vanesa Abad Calabia

e

Ignacio Álvarez Lanzarote

Facultad de Veterinaria

2025

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	1
3. INTRODUCCIÓN	2
3.1 <i>Anisakis</i> spp.	2
3.2 Anisakiasis.....	4
3.3 Métodos convencionales para la inactivación de <i>Anisakis</i>	5
3.3.1 Congelación	5
3.3.2 Tratamiento térmico	6
3.4 El equipo TEDEPAD ®	7
3.5 Nuevos sistemas de calentamiento	7
4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	8
5. METODOLOGÍA	9
5.1 Materias primas	9
5.2 Tratamientos térmicos	10
5.3 Tratamiento térmico asistido por ultrasonidos	11
5.4 Calentamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje	12
5.5 Tratamiento de los datos	13
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	14
6.1 Calentamiento en baño termostático.....	15
6.2 calentamiento asistido con ultrasonidos.....	17
6.3 Calentamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje	24
7. CONCLUSIONES	30
8. CONCLUSIONS	31
9. VALORACIÓN PERSONAL	31
10. BIBLIOGRAFÍA	33

1. RESUMEN

La eliminación al mar de vísceras de pescado y restos de peces y cefalópodos conteniendo larvas vivas de *Anisakis* spp. han aumentado la incidencia de este parásito en pescado procedente del mar. Ya se comercializan equipos para buques de pesca con el fin de eliminar larvas de *Anisakis* de vísceras y despojos, pero su alto precio y los tiempos de procesado largos limitan su uso. Los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF) podrían ser una alternativa; sin embargo, hasta la fecha no hay datos de esta aplicación para eliminar *Anisakis* en vísceras de pescado y residuos de la industria pesquera. Es por ello por lo que el objetivo de este trabajo ha sido evaluar esta posibilidad y compararla con otras alternativas como un calentamiento convencional, un calentamiento asistido por ultrasonidos y el uso de pulsos eléctricos de alto voltaje (PEF) como un nuevo sistema de calentamiento óhmico. Cada técnica fue analizada en términos de velocidad de penetración de calor e inactivación de larvas L3 de *Anisakis*. Los resultados indican que los PEF, al aplicar un calentamiento óhmico volumétrico, destacan por su capacidad para alcanzar temperaturas objetivo en tiempos significativamente menores, reduciendo hasta un 68% el tiempo necesario para la inactivación de un mismo número de *Anisakis* en comparación con los otros métodos.

Finalmente, hay que indicar que se desarrollaron ecuaciones matemáticas que han permitido estimar el calentamiento por las tres tecnologías, así como predecir la letalidad acumulada de las larvas bajo distintas condiciones de tratamiento, proporcionando una herramienta de toma de decisiones para optimizar procesos, destacando los PEF como una solución prometedora para la gestión de residuos y control de *Anisakis* en productos de la pesca.

2. ABSTRACT

The disposal of fish viscera and remains of fish and cephalopods containing live larvae of *Anisakis* spp. into the sea has increased the incidence of this parasite in fish from the ocean. Equipment for fishing vessels that can remove *Anisakis* larvae from viscera and offal is already on the market, but its use has been limited due to its high price and long processing times. Pulsed Electric Fields (PEF) could be an alternative; however, there is no data on using this technology to remove *Anisakis* in fish viscera and offal from the fishing industry. The aim of this work has been to evaluate this possibility and compare it with other alternatives such as conventional heating, ultrasound-assisted heating and the use of PEF as a new ohmic heating system. Each technique was analysed in terms of heat penetration rate and inactivation of *Anisakis* L3 larvae. The results indicate that PEFs, when applying volumetric ohmic warming up, stand out for their ability to reach target temperatures in significantly shorter times, reducing the time needed for the inactivation of the same number of *Anisakis* by up to 68% compared to the other methods.

Finally, it should be noted that mathematical equations were developed to estimate the warming by the three technologies, as well as to predict the cumulative lethality of the larvae under different treatment conditions, providing a decision-making tool to optimize processes, and highlighting PEFs as a promising solution for the management of residues and control of *Anisakis* in fishery products.

3. INTRODUCCIÓN

La anisakidosis hace referencia a la enfermedad causada por cualquier miembro de la familia *Anisakidae*, mientras que la anisakiasis se refiere específicamente a la infección causada por miembros del género *Anisakis*. Además, en los últimos años, la incidencia de reacciones alérgicas causadas por *Anisakis* ha aumentado notablemente. Las especies más frecuentes causantes de enfermedad son *Anisakis simplex* y *Anisakis pegreffii* (Baird et al., 2014), y las familias de peces más vulnerables a parasitaciones por *Anisakis* en España son las siguientes: *Lophiidae*, *Trichiuridae*, *Zeidae*, *Merlucciidae* y *Gadidae* (Rahmati et al., 2020). Estas familias incluyen especies de típico consumo humano como el rape, la merluza o el bacalao. Japón es el país con mayor incidencia de anisakiasis, seguido por España, donde se estima una incidencia anual de unos 8000 casos y se considera que la enfermedad está infradiagnosticada (Bao et al., 2017). Tradicionalmente, los *Anisakis* se ha inactivado en pescado mediante tratamientos térmicos y procesos de congelación (Real Decreto 1021/2022). Actualmente, se investigan nuevas tecnologías como las altas presiones hidrostáticas o los pulsos eléctricos de alto voltaje para su inactivación. La eliminación al mar de vísceras y otros despojos de pescado desde los buques de pesca, junto con la sobreexplotación de algunos caladeros, aumentan la prevalencia de *Anisakis* en pescado de consumo humano. Al desechar al mar las vísceras parasitadas con *Anisakis* sin tratar, estas son ingeridas por otros peces o cefalópodos, lo que favorece la concentración de las larvas del parásito en un número mayor de peces. Además, estos peces suelen ser de menor tamaño debido a la sobrepesca que hay en algunas zonas.

En este trabajo se explorarán métodos avanzados, como pulsos eléctricos de alto voltaje, para inactivar *Anisakis* en vísceras de pescado.

3.1 *Anisakis* spp.

Son nemátodos parásitos pertenecientes a la familia *Anisakidae*, entre los que destacan los géneros *Anisakis*, *Contracaecum* y *Phocanema* (Bao et al., 2023). Las larvas en estadio L3 de *Anisakis* son de color blanco (Figura 1), miden entre 18 y 36 mm de longitud y tienen un diámetro

de 0.24 a 0.6 mm. Estas larvas poseen una cutícula exterior, hipodermis y sistemas musculares, así como sistemas nervioso, digestivo y excretor (Gago et al., 2007).

Las especies de *Anisakis* tienen un ciclo biológico similar (Figura 1), en el que utilizan pequeños crustáceos del plancton como hospedadores intermedios, peces y calamares como hospedadores paraténicos y mamíferos marinos como hospedadores definitivos. En estos últimos, los nemátodos alcanzan la madurez y ponen huevos sin fecundar, que son posteriormente liberados al mar donde serán fecundados. Cuando los nemátodos parasitan a peces y crustáceos, están en estado larvario L3, que es también el momento en el que pueden infectar a los humanos si estos consumen peces o cefalópodos crudos o poco cocinados que contienen larvas vivas del parásito.

Las larvas L3 suelen localizarse en la cavidad abdominal y los órganos internos de los peces, y más raramente en el músculo comestible de pescados comerciales. La temperatura de almacenamiento *post mortem* influye significativamente en la migración de *Anisakis* hacia el músculo. Temperaturas por debajo de 2 °C previenen esta migración desde la cavidad abdominal al músculo, reduciendo así la posibilidad de ingerir larvas vivas que puedan causar enfermedad (EFSA, 2024).

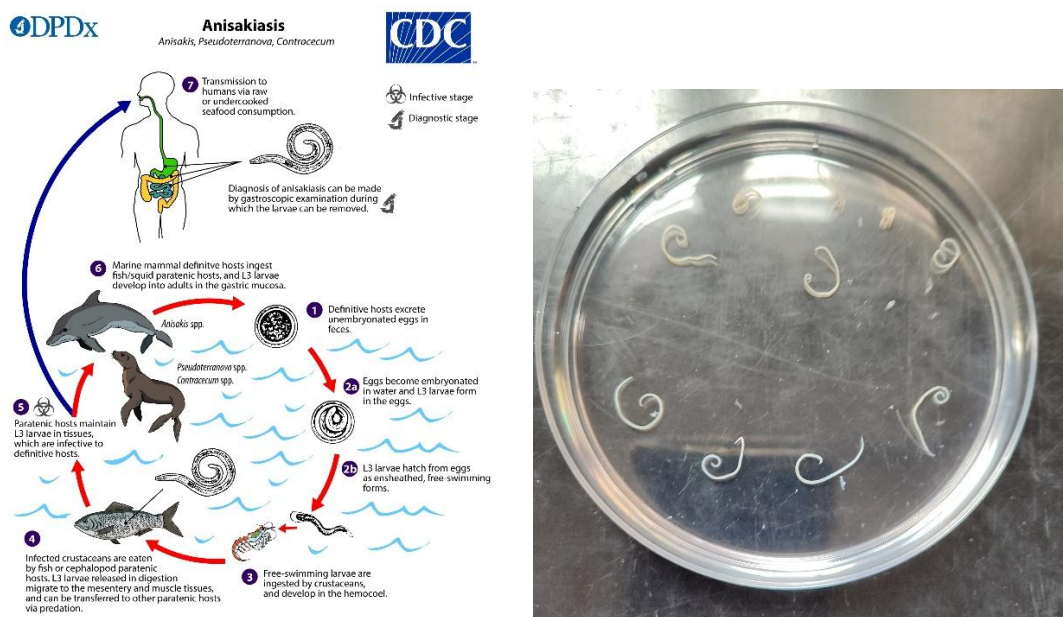


Figura 1. Ciclo biológico de *Anisakis* “Anisakiasis”, en DPDx (Center for Disease Control and Prevention, 2019) a la izquierda y *Anisakis* en estadio larvario L3 en placa de Petri a la derecha.

Anisakis simplex se distribuye tanto en alta mar como en zonas costeras del Atlántico, el Pacífico y la costa de Alaska; *Anisakis pegreffii* se encuentra principalmente en el hemisferio sur; y *Pseudoterranova decipiens* está más restringido a zonas costeras de aguas frías como el Atlántico Norte, los océanos Ártico y Antártico o Japón (EFSA, 2024). La distribución geográfica de estas especies está directamente relacionada con la prevalencia de anisakiasis en distintas regiones

del mundo, destacando la importancia del control en áreas de alta incidencia. Por ejemplo, si hablamos de la prevalencia de las larvas de *Anisakis* en España, en un estudio de 2019, se indica que una media de un 33,65 % del total de pescado analizado procedente de los supermercados españoles estaba parasitado (Debenedetti et al., 2019).

Esta elevada prevalencia está en parte asociada a la eliminación de vísceras de pescado al mar, práctica habitual en las operaciones de pesca industrial. Por ejemplo, anualmente 3000 toneladas de vísceras son eliminadas al mar por la flota española en la zona de pesca Gran Sol (González, 2018). Estas vísceras actúan como un vector para la diseminación de larvas L3 de *Anisakis* en el medio marino. Las vísceras contienen una alta carga de larvas. Al ser eliminadas al mar sin tratamiento, las larvas permanecen viables y reingresan en la cadena trófica marina, infectando a otros peces y mamíferos marinos, que son huéspedes definitivos del parásito, cerrando su ciclo de vida con la consiguiente producción de huevos y finalmente más larvas. Este fenómeno aumenta la prevalencia de *Anisakis* en especies de interés comercial, aumentando el riesgo de anisakiasis y generando rechazo entre los consumidores (Bao et al., 2017).

Entre 2010 y 2023 según datos de la *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) de 2023, se registraron en Europa 544 notificaciones de infección por parásitos en pescado y productos de la pesca, de las cuales un 85 % correspondían a casos relacionados con *Anisakis*. El país de origen de los productos infectados fue mayoritariamente España (114 casos), seguido por Marruecos (95 casos), Francia (92 casos) y otros. Esto pone de manifiesto la necesidad de reforzar el control de las infestaciones por *Anisakis* en España y sus alrededores. Las especies con mayor incidencia fueron: merluza, caballa, rape y bacalao mientras que un 4 % de las notificaciones venían de cefalópodos.

3.2 Anisakiasis

Cuando las larvas L3 vivas de *Anisakis* son ingeridas, logran sobrevivir al pH estomacal y no son expulsadas, pueden penetrar en las mucosas del estómago o el intestino, causando daño tisular. Esta infección invasiva se conoce como anisakiasis. Además de daños en los tejidos, se produce una respuesta inflamatoria, en la que el sistema inmunitario encapsula a los parásitos formando granulomas, de manera muy similar a lo que ocurre en los peces infectados (en muchos casos los *Anisakis* que han migrado al músculo de pescado se encuentran encapsulados) (EFSA, 2024; DPDx, 2019).

Los síntomas incluyen dolor severo en el estómago o abdomen, náuseas, vómitos y obstrucción abdominal. Estos síntomas aparecen pocas horas después de ingerir las larvas y a menudo se confunden con otras afecciones, como úlceras, intoxicaciones alimentarias o apendicitis. En

casos raros pueden producirse perforaciones intestinales o infecciones en otras áreas, como el mesenterio, la cavidad peritoneal, el esófago o la lengua.

La anisakiasis representa un problema de salud pública en varios países con alto consumo de pescado crudo o poco cocinado. En Japón, se reportan aproximadamente 20,000 casos anuales, mientras que en España la incidencia estimada es de 8,000 casos, aunque se considera que la enfermedad está infradiagnosticada (Bao et al., 2017). Un porcentaje importante de estos casos requiere hospitalización debido a complicaciones graves como perforaciones intestinales o reacciones alérgicas severas. Además, la anisakiasis supone una carga económica significativa tanto para los sistemas de salud como para la industria pesquera, afectando la percepción y consumo de productos marinos (EFSA, 2024).

Anisakis también puede ser causante de reacciones alérgicas, conocidas como anisakiasis gastroalérgica. Además, en algunos casos, puede desencadenar en un shock anafiláctico. En este caso, todavía no se sabe con certeza si estas reacciones ocurren tras ingerir el parásito activo, o si la exposición a los alérgenos de *Anisakis* muertos en productos tratados térmicamente o congelados es suficiente para desencadenarlas. Algunos alérgenos son resistentes a los tratamientos térmicos o la acción enzimática y podrían seguir provocando reacciones (EFSA, 2024).

3.3 Métodos convencionales para la inactivación de *Anisakis*

3.3.1 Congelación

La congelación es efectiva para inactivar parásitos en pescado y productos de la pesca. A menor temperatura de congelación y mayor tiempo de almacenamiento a esa temperatura, más baja es la probabilidad de que sobreviva algún parásito. Tanto la legislación europea como la nacional regulan la congelación del pescado por parte de los establecimientos que sirven comida al consumidor final o colectividades, en los casos en los que no se van a alcanzar los 60 °C en el centro del producto durante al menos un minuto. Estas normativas indican que se deberá congelar el pescado a -20 °C durante al menos 24 horas o a -35°C durante 15 horas (Reglamento (CE) nº 853/2004; Real Decreto 1021/2022).

Sin embargo, algunos estudios señalan la posibilidad de que, en ciertas situaciones, *Anisakis* pueda sobrevivir a estas condiciones de congelación (Podolska, 2019), especialmente si se trata de piezas de pescado enteras. En este sentido, algunas organizaciones proponen extender estas condiciones de congelación. Por ejemplo, la *Food and Drug Administration* de Estados Unidos indica una congelación a -20 durante 7 días mientras que la *Agencia Española de Seguridad*

Alimentaria y Nutrición recomienda mantener a -20 °C el pescado durante 5 días para la completa inactivación de *Anisakis* (AESAN, 2023; FDA, 2020).

En España existen varias preparaciones culinarias donde el pescado se consume sin aplicar un cocinado suficiente para inactivar *Anisakis*, como los boquerones en vinagre o las anchoas en salmuera, así como platos típicos de otras culturas, como el sushi, el sashimi o el ceviche. Esto subraya la importancia de garantizar la seguridad alimentaria en el consumo de pescado crudo o poco cocinado, especialmente en un contexto donde la sobreexplotación de recursos marinos y la eliminación de vísceras y despojos al mar pueden favorecer y aumentar la prevalencia del parásito en ciertas especies.

La congelación, aunque efectiva para inactivar *Anisakis*, puede alterar las características organolépticas del pescado. La capacidad de retención de agua, las pérdidas por goteo o los cambios texturales se ven comprometidos por la formación de cristales de hielo, especialmente aquellos más grandes en congelaciones o descongelaciones inapropiadas (Onitsuka, 2022; Abad, 2023). Si bien esto no sería un problema para el tratamiento de vísceras y despojos, podría resultar un sistema muy caro de implementar con esta aplicación, requiriendo además sistemas rápidos de congelación. Es por ello por lo que resulta de interés buscar alternativas para esta aplicación. Además, entre estas alternativas podrían encontrarse nuevas tecnologías que ya se están investigando para inactivar *Anisakis* sin apenas afectar a la calidad del pescado.

3.3.2 Tratamiento térmico

El tratamiento térmico es un método efectivo y muy utilizado para inactivar *Anisakis* en productos de la pesca. Las larvas L3 de este parásito son sensibles a temperaturas elevadas, habiéndose determinado que para su inactivación completa se requiere alcanzar 60 °C durante al menos un minuto en el centro de la pieza de pescado (AESAN, 2023). El uso del calor para el tratamiento térmico de vísceras de pescado ha sido valorado, pero requiere equipos capaces de alcanzar y mantener esas temperaturas, lo cual implica un consumo significativo de energía y tiempo de tratamiento. Esto limita su aplicación en buques pesqueros en los que incluso se proponía utilizar el calor de los motores para calentar los despojos y así ahorrar costes. Es por ello por lo que se siguen buscando sistemas que permitan calentar los despojos de una forma más eficiente que los sistemas tradicionales de calentamiento por inmersión en un líquido. Uno de estos sistemas que ya se están introduciendo en algunos buques factoría es el sistema TEDEPAD®.

3.4 El equipo TEDEPAD ®

El sistema *Technological Device for Avoiding Parasite Discarding at Sea* TEDEPAD® es un equipo diseñado por las empresas Marexi e Industrias Ferri (España) para la inactivación de larvas de *Anisakis* en vísceras y despojos de pescado mediante la aplicación de microondas (<https://tedepad.com>). Su funcionamiento se basa en un tratamiento térmico controlado, donde las vísceras pasan a través de un sistema que incrementa la temperatura hasta los 78 °C, con duraciones del ciclo de procesamiento de entre 10 y 17 minutos (González, 2018).

El equipo está diseñado para instalarse a bordo de buques pesqueros con distintas capacidades de producción hasta los 600 kg/h (<https://tedepad.com>). Sus costes asociados incluyen el de adquisición e instalación del equipo y su mantenimiento periódico, sin generar costes adicionales en el resto de la cadena alimentaria (González, 2018). Si bien el equipo parece una buena opción para tratar las vísceras antes de ser eliminadas al mar, su precio, que asciende a 38000 € por instalación y 2400 € anuales de mantenimiento, puede resultar elevado para la mayoría de la flota pesquera. Esto dificulta su adopción generalizada sin que la administración pública haga un esfuerzo por intentar reducir la prevalencia de *Anisakis*, interviniendo con nueva legislación o ayudas económicas para su instalación. Actualmente, muy pocas embarcaciones han instalado el sistema y no se dispone de nuevos datos sobre su aplicación.

Por todo ello, se buscan nuevos sistemas que permitan la inactivación rápida del parásito, muchas veces basados en el uso del calor. Algunas de esas alternativas podrían ser los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF) aplicados como un nuevo sistema de calentamiento óhmico, o mejorar los sistemas actuales de calentamiento para ser más eficientes como el empleo de los ultrasonidos.

3.5 Nuevos sistemas de calentamiento

Los **pulsos eléctricos de alto voltaje** (PEF del inglés *pulsed electric fields*) son una tecnología considerada emergente en el ámbito del procesamiento no térmico de alimentos. Consiste en aplicar campos eléctricos (0.5 y 40 kV/cm) de corta duración (del orden de los microsegundos) a un alimento situado entre dos electrodos, en una cámara de tratamiento. Su principal mecanismo de acción es la electroporación, que produce poros en las membranas celulares, lo que permite inactivar microorganismos o parásitos, así como extraer compuestos de interés del interior de las células sin incrementar la temperatura del producto. Los parámetros clave en los PEF son la intensidad del campo eléctrico, la duración de los pulsos (1-200 µs), el tiempo de tratamiento (la duración de los pulsos por el número de pulsos aplicados), la frecuencia de repetición de los

pulsos, la conductividad eléctrica del alimento o del medio y la energía específica por pulso, que es la energía eléctrica que recibe el producto tratado (Raso et al., 2016).

Se ha demostrado la eficacia en la inactivación de *Anisakis* en pescado tratando por PEF, por ejemplo, aplicando un tratamiento de 5 kV/cm y 30 kJ/kg se conseguía inactivar casi el 100 % de las larvas en trozos de merluza sin afectar a su calidad (Abad et al., 2024). Sin embargo, si bien los PEF se consideran un tratamiento no térmico, dependiendo del modo de aplicar los PEF (número de pulsos, frecuencia de aplicación, etc.), estos pueden utilizarse como un nuevo sistema de calentamiento óhmico de productos (incluso sólidos) debido al efecto Joule que generan. Así, se ha conseguido calentar pinzas de buey de mar o trozos de zanahoria hasta temperaturas de 80 y 90 °C en segundos (Sanz, 2017; Astráin-Redín et al., 2023). Esta nueva aplicación podría resultar de gran interés para tratar vísceras y despojos de pescado de forma rápida ya que además de producir electroporación, los PEF podrían producir calentamiento óhmico en matrices conductoras como las vísceras prácticamente instantáneo, inactivando a los *Anisakis* presentes, antes de ser devueltas al mar.

Los **ultrasonidos** son ondas sonoras cuya frecuencia es superior a la perceptible por el oído humano (> 16 kHz). Al aplicarse en un medio líquido produce el fenómeno denominado cavitación que consiste en la formación, crecimiento e implosión de burbujas de vapor de agua dando como resultado efectos mecánicos como la generación de ondas de choque, fuerzas de cizalla e incluso el incremento de la temperatura del medio, o químicos como la generación de radicales (Ciudad, 2018). Los efectos mecánicos se producen sobre todo a frecuencias más bajas 20-100 kHz y los químicos a las más elevadas (> 100 kHz). En la industria alimentaria, los ultrasonidos se han aplicado sobre todo a bajas frecuencias buscando el efecto mecánico muchas veces con el objetivo de mejorar los procesos de transferencia de masa y, sobre todo de energía. Así, por ejemplo, se han diseñado intercambiadores de calor cuya superficie se hace vibrar mediante la aplicación de ultrasonidos con objeto de acortar los tiempos de calentamiento, de conseguir calentamientos más uniformes, y de reducir los problemas de sobrecalentamiento del producto que se adhiere a las paredes del intercambiador. Es decir, la aplicación de calor asistido por ultrasonidos (lo que se ha denominado termosonicación) podría resultar de interés para mejorar el calentamiento tradicional de productos, en nuestro caso, de las vísceras y despojos.

4. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Anisakis spp., un parásito zoonótico que puede causar cuadros gastrointestinales y reacciones alérgicas tiene una prevalencia en algunas de las especies marinas más consumidas en España,

como el jurel, la caballa o la merluza de entre un 45 % y un 100 % (Debenedetti et al., 2019). La eliminación al mar de vísceras de pescado y otros restos de peces y cefalópodos que contienen larvas vivas de este parásito incrementa su incidencia en las especies que permanecen en el medio marino. Aunque ya se comercializan equipos diseñados para instalarse en buques de pesca, como el sistema TEDEPAD, para eliminar las larvas de *Anisakis* en las vísceras y despojos antes de ser devueltas al mar, el coste energético del proceso, así como el tiempo de procesado, limitan su implantación y uso en los barcos. Por otro lado, en las empresas transformadoras, pescaderías, etc., permitiría transformar los residuos SANDACH tipo 2 en tipo 3, evitando la necesidad de almacenamiento en congelación durante varios días con el consiguiente gasto energético y de espacio. Por ello, resulta de interés desarrollar nuevas tecnologías capaces de eliminar al parásito con viabilidad tanto técnica como económica para ambas aplicaciones. Los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEF) podrían ser una alternativa ya que se ha demostrado su eficacia para inactivar larvas L3 de *Anisakis* en filetes de merluza sin afectar a su calidad (Abad, et al., 2023, 2024). Sin embargo, la posibilidad de aplicar los PEF como un nuevo sistema de calentamiento óhmico en el que el producto tratado se calienta volumétricamente en pocos segundos (en algunos procesos en continuo el tiempo de procesado es inferior a 1 segundo) podría permitir una nueva aplicación de esta tecnología para la inactivación de *Anisakis* en vísceras y despojos. Sin embargo, hasta la fecha no hay datos publicados sobre esta aplicación. Por tanto, el **objetivo principal** de este trabajo es evaluar la posibilidad de inactivar las larvas L3 de *Anisakis* spp. en vísceras y despojos de pescado mediante Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje y compararlo con otras tecnologías. Para alcanzar este objetivo principal, será necesario cumplir con los siguientes **objetivos parciales**: determinar la velocidad de penetración de calor en merluza triturada con diferentes tecnologías: calor, calor asistido por ultrasonidos y PEF; describir matemáticamente los calentamientos y desarrollar una herramienta que permita predecir y comparar el calentamiento con las distintas tecnologías; evaluar la letalidad de *Anisakis* mediante calentamientos realizados con las distintas tecnologías.

5. METODOLOGÍA

5.1 Materias primas

Todas las pruebas se realizaron con merluza europea (*Merluccius merluccius*) comprada en pescaderías locales. Se separaban lomos, cola y cabeza, y se guardaban en la cámara frigorífica o en el congelador según la utilización prevista. En la mayoría de las pruebas se utilizaba merluza triturada. En el caso de muestras congeladas, se descongelaban lomos o colas durante 24 horas antes de su utilización en un cámara frigorífica a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Una vez descongeladas las muestras o

directamente cuando se usaban trozos frescos, se picaban con una picadora Meat Grinder Q5152, Qilive, (Villeneuve d'Ascq, Francia) con un disco de picado de 2.5 mm de diámetro (Figura 2). El pescado triturado que se obtenía se guardaba en la cámara de refrigeración para su utilización el día siguiente para que todas las pruebas partieran de una misma temperatura en los estudios de calentamiento por calor, calor asistido por ultrasonidos y PEF.

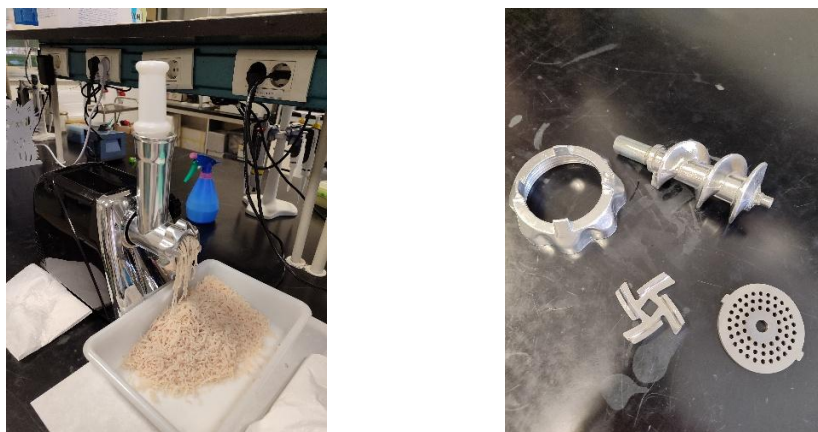


Figura 2: Picadora utilizada para el picado de la merluza y merluza triturada (izquierda) y sus accesorios: anillo de fijación, disco de picado de 2.5 mm, cuchilla de corte y tornillo (derecha).

De la ventresca de la merluza fresca, se extraían las larvas L3 de *Anisakis* que se iban a utilizar para alguna de las pruebas. Se comprobaba su viabilidad mediante el método oficial de estimulación mecánica descrito por la EFSA (2010), y se almacenaban en frascos de polipropileno con tape en una disolución salina al 0,85 % de NaCl (PANREAC) hasta su posterior utilización.

Para alguno de los tratamientos PEF, el pescado se sumergía en una solución acuosa de 3 y 6 mS/cm de conductividad eléctrica. Para su preparación, se adicionaba 0.15 y 0.3 % de cloruro sódico a agua destilada, respectivamente, y se comprobaba y ajustaba la conductividad utilizando un conductímetro compuesto por una sonda de conductividad eléctrica FYA641LFP1/LFL1, Ahlborn, (Holzkirchen, Alemania) conectada a un datalogger (Almemo 2590, Ahlborn).

5.2 Tratamientos térmicos

Para obtener las curvas de penetración de calor del pescado triturado, éste (6.7 ± 0.5 gramos de pescado triturado) se introducía en tubos cilíndricos de acero inoxidable de 18 mm de diámetro y 55 mm de longitud que se tapaban por los extremos con corchos. A través de uno de ellos, se introducía una sonda de temperatura tipo termopar k (FTA 15 P1, Almemo), conectada a su vez

al datalogger y éste a un ordenador donde se registraba la temperatura en función del tiempo utilizando el software Control 5.19, Almemo (Figura 3).

Una vez preparados los tubos (dos por tratamiento), se sumergían en un baño de ultrasonidos Elmasonic P60H, Elma, (Singen, Alemania) una vez atemperado a las temperaturas de estudio (40 a 65 °C), temperatura que se regulaba gracias al uso de un cabezal eléctrico Sous Vide Roner G310, Kitchenboss, (Shenzhen, China) seleccionando 1 °C más que la temperatura objeto de estudio para crear un pequeño salto térmico entre al agua y la muestra. Señalar que, para los estudios de calor, no se conectaban los ultrasonidos disponibles en el baño.

Los tubos se mantenían en el baño hasta que se alcanzaba la temperatura objetivo en su interior quedando registrada la temperatura en todo momento. Además de las sondas para medir la temperatura del pescado, se utilizaba una tercera sonda de temperatura para registrar la temperatura del medio calefactor (agua). Todos los resultados se realizaron al menos por duplicado.

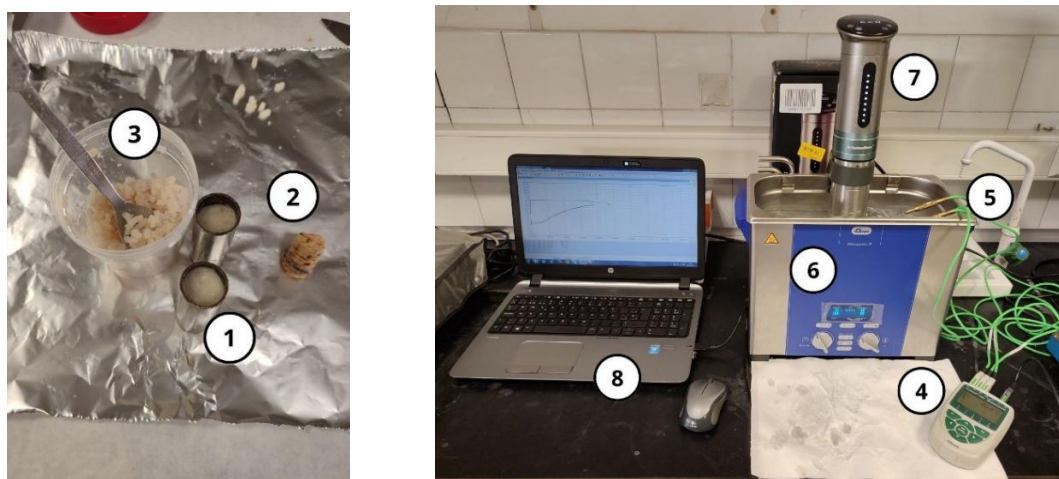


Figura 3: Preparación de las muestras y montaje del baño termostático y registro de temperaturas. Cilindros llenos del pescado triturado (1), corchos por los que se introducía la sonda (2), pescado triturado (3), datalogger (4), sondas de temperatura tipo termopar (5), baño de ultrasonidos (6), cabezal termostático (7) y ordenador para registro de temperaturas (8).

5.3 Tratamiento térmico asistido por ultrasonidos

Para obtener las gráficas de penetración de calor en pescado triturado utilizando ultrasonidos y poder compararlas con las de calor sin aplicar ultrasonidos, se procedió de igual forma a como se ha explicado en el apartado 6.2, pero con la función de ultrasonidos del equipo activada a 37 kHz o a 80 kHz a máxima potencia (580 W), calentando al mismo tiempo con el cabezal termostático. Para cada una de las dos frecuencias se registraron las curvas de penetración de calor de 40 a 65 °C. De nuevo, cada una de las réplicas se analizó por duplicado.

Con el fin de cuantificar la cavitación producida por los ultrasonidos a cada frecuencia se determinó la pérdida de peso de trozos de papel de aluminio al aplicar o no los ultrasonidos. Para ello se pesaron con la balanza analítica trozos de papel de aluminio de unos 200 mg, que se sometían a tratamientos de calor y calor asistido por ultrasonidos (37 y 80 kHz) durante dos minutos. Pasado ese tiempo, se secaban bien y se pesaban de nuevo. Se calculaban las pérdidas de peso en cada caso como porcentaje de peso perdido (Ecuación 1). Cada réplica se analizó por triplicado.

$$\% \text{ de peso perdido} = \frac{P_i - P_f}{P_i} * 100 \quad (\text{Ecuación 1})$$

5.4 Calentamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje

Para la obtención de curvas de penetración de calor en merluza con PEF, se utilizó el equipo Nutri-Pulse® E Cooker NPB06, IXL E-Cooker B.V., (Schalkwijk, Países Bajos). El equipo (Figura 4) genera pulsos eléctricos bipolares de onda cuadrada con un rango de operación de 100 a 600 V, una fuerza de campo eléctrico de 25 a 150 V/cm y una potencia máxima de 3000 W. Se maneja mediante una Tablet inalámbrica donde se pueden modificar los parámetros de trabajo: anchura de pulso (10 a 60 μ s), tiempo entre set de pulsos (500 a 5000 ms), temperatura de calentamiento (20 a 100 °C), el número de pulsos que se aplican (5000 a 80000 pulsos) y el tiempo de calentamiento. Dispone de 3 cámaras de tratamiento que son de electrodos paralelos de titanio separados 40 mm con una capacidad de hasta 300 mL de muestra. Cada cámara dispone de una sonda termopar protegida eléctricamente que permite medir la temperatura de la muestra tratada que se registraba en la Tablet.

Los parámetros que se utilizaron en los tratamientos fueron: temperatura de calentamiento 65 °C, anchura de pulso de 40 μ s y un *pause time* de 500 ms. Estos parámetros fueron los mismos para todos los tratamientos ya que las curvas de penetración de calor con el equipo son iguales independientemente de la temperatura de calentamiento objetivo que se aplique (Latorre, 2025). El equipo automáticamente aplica los pulsos a una frecuencia de 340 Hz.

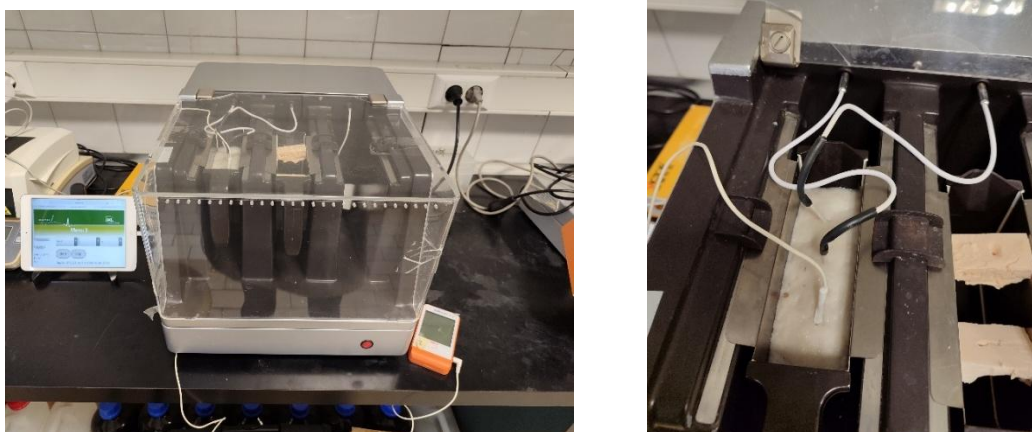


Figura 4: Equipo de pulsos eléctricos y Tablet para su control (izquierda) y cubeta de tratamiento con pescado triturado y las sondas de temperatura termopares (derecha).

Se realizaron dos tipos de pruebas diferentes de calentamiento por PEF. En primer lugar, se trató merluza triturada (apartado 6.3), llenando la cubeta hasta su límite de capacidad. La prueba se realizó por triplicado con 273.7 ± 8.2 gramos de pescado triturado. Se realizó también una prueba en la que se mezclaba pescado triturado (60 %) con agua de la red (40 %). Después, se realizaron pruebas con trozos de pescado de 7 gramos (pesos similares a los utilizados en los tratamientos por calor y por ultrasonidos), que se sumergían en agua con 6 o 3 mS/cm de conductividad eléctrica. En todos los casos, se registraban los tiempos y las temperaturas de las sondas del equipo, tanto para la zona más superficial, como en el centro del producto.

5.5 Tratamiento de los datos

Las curvas de penetración de calor obtenidas para los tratamientos de calor, calor con ultrasonidos y pulsos eléctricos se describieron con ecuaciones matemáticas para comparar las velocidades de calentamiento conseguido con cada una de las tecnologías, predecir las temperaturas alcanzadas en función del tiempo de tratamiento, así como el tiempo que se requería para alcanzar una temperatura determinada de las muestras tratadas.

Debido a que, según la tecnología aplicada, la cinética de las curvas era variable se utilizó un modelo matemático que permitía describir distintas cinéticas como es el caso de la ecuación de Gompertz (Ecuación 2), que representa una curva sigmoidea, y es ampliamente utilizada en modelos de crecimiento o inactivación microbiana por su versatilidad, adaptándola a las curvas de calentamiento obtenidas:

$$T(t) = T(0) + C * \exp \left(- \left(\exp(b * (M - t)) \right) \right) \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde $T(t)$ representa la temperatura alcanzada en función del tiempo (t); $T(0)$ la temperatura inicial de la muestra; C , el valor máximo que $N(t)$ puede alcanzar siendo un valor asintótico; b ,

indica la velocidad a la que la temperatura se aproxima a C ; y M , que es el tiempo en el que ocurre el punto de inflexión de b (cuando la velocidad de calentamiento es máxima).

Las curvas de penetración obtenidas con las tecnologías indicadas se ajustaron por mínimos cuadrados con la ecuación (modelo primario) obteniéndose los parámetros para cada una de las condiciones investigados. En la medida de lo posible, se establecieron valores constantes utilizando la media de los parámetros obtenidos para b y M , y una ecuación de primer grado para C (modelos secundarios). Los valores obtenidos por los modelos secundarios se sustituyeron en el primario para obtener las ecuaciones finales.

Por último, se utilizaron las ecuaciones finales basadas en el modelo de Gompertz obtenidas para cada calentamiento para predecir la inactivación de *Anisakis* con calor, calor asistido por ultrasonidos y PEF. Para ello, se calcularon las letalidades (S_t) para cada tiempo (t) de tratamiento (en este caso intervalos de un segundo) en función de la temperatura (T) definida según las ecuaciones desarrolladas según la ecuación siguiente:

$$\text{Log}_{10}S_t = \left(\frac{t}{D_{T_{ref}} \cdot 10^{\left(\frac{T_{ref} - T}{Z} \right)}} \right) \quad (\text{Ecuación 3}),$$

donde $D_{T_{ref}}$ es el valor D_T de *Anisakis* a una temperatura de referencia (T_{ref}) de 50 °C ($D_{50\text{ °C}} = 0.95 \pm 0.09$ minutos) y un valor Z de 3.79 ± 0.3 °C (Ruiz, 2024).

Con la hoja de cálculo Microsoft Excel 365, Microsoft Corporation, (Redmond, Estados Unidos), se desarrolló un Sistema de Toma de Decisiones (“Decision Support System”) que incluía las ecuaciones finales desarrolladas para el calor, el calor asistido por ultrasonidos y los PEF que permitían estimar las curvas de calentamiento a distintas temperaturas de régimen, así como la letalidad acumulada en el tiempo de tratamiento calculada con la ecuación anterior.

Para elaborar las gráficas de penetración de calor para cada tratamiento aplicado, se utilizó el software GraphPad Prism 8, GraphPad Software, (San Diego, Estados Unidos). Con este mismo programa, se realizaron los ajustes de las curvas de penetración con el modelo de Gompertz, así como análisis estadísticos sencillos como medias y desviaciones de los pesos utilizados en cada prueba y el estudio de diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros correspondientes del modelo en las distintas condiciones investigadas.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha indicado en la Justificación y objetivos, con este trabajo, se pretende definir las condiciones de tratamiento térmico que permita producir un determinado nivel de inactivación de larvas L3 de *Anisakis* presentes en despojos y vísceras de pescado. Debido a que este estudio

es una evaluación inicial, y con el fin de facilitar el trabajo, se ha utilizado como materia de trabajo trozos y despojos de pescado utilizados en otras pruebas. Para uniformizar el producto, éste se ha triturado, simulando también un posible proceso que se podría realizar en los barcos antes de eliminar directamente los despojos. Con el fin de definir estos tratamientos, en primer lugar, en este apartado, se analiza la eficacia letal resultante del calentamiento del pescado mediante calor convencional utilizando para ello un baño termostático en condiciones isotérmicas. A continuación, se comparan estos resultados con los obtenidos mediante la combinación de calor y ultrasonidos (US) o la utilización de pulsos eléctricos de alto voltaje como un nuevo sistema de calentamiento. Además, se desarrolla una herramienta de toma de decisiones para predecir tiempos o temperaturas de tratamiento para cada caso estudiado.

6.1 Calentamiento en baño termostático

Con el fin de determinar la eficacia letal de los tratamientos térmicos frente a *Anisakis*, en primer lugar, fue necesario obtener las curvas de calentamiento de las muestras de pescado en un sistema estándar de calentamiento con el fin de evaluar la velocidad de calentamiento de éstas y así determinar el tiempo necesario para que alcancen una determinada temperatura.

La Figura 5 muestra las curvas de penetración de calor de cilindros de pescado triturado, expresadas como el incremento de la temperatura en función del tiempo de tratamiento, realizadas a distintas temperaturas de régimen. Todas las muestras partían de una temperatura inicial de 21.8 ± 2 °C. Las curvas que se presentan corresponden a los valores promedio de dos réplicas para cada temperatura del baño.

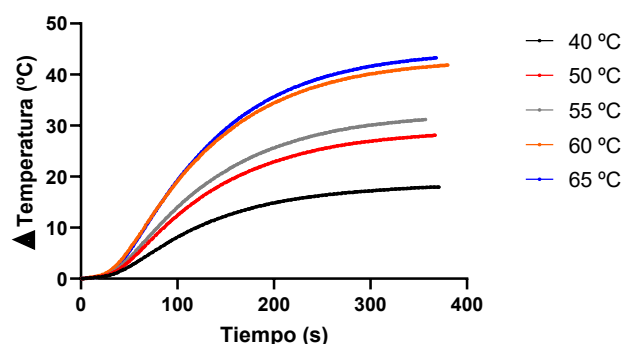


Figura 5. Curvas de penetración de calor del pescado triturado en cilindros de acero inoxidable en baño termostático a diferentes temperaturas de régimen.

Como se observa y era de esperar, la velocidad de transferencia de calor incrementa con la temperatura de régimen del baño en condiciones isotérmicas, es decir con el salto térmico (ΔT) debido a la mayor cantidad de calor (Q) transferida al cilindro de pescado ($Q=U \cdot A \cdot \Delta T$; donde U es el coeficiente global de transferencia de calor y A la superficie del cilindro). Esto hace que,

partiendo de la base de que las temperaturas del producto al inicio del tratamiento eran similares (unos 21°C), se observa que, a mayor temperatura de tratamiento, se alcanza más rápidamente una temperatura determinada debido al mayor calor transferido. Por ejemplo, para aumentar 10 °C la temperatura en el interior del pescado triturado con un baño a 40 °C, se requerían 119 segundos, mientras que, a 65 °C, se reducía el tiempo a 66 segundos. Más adelante y con el fin de evaluar la influencia de la aplicación de los ultrasonidos durante el calentamiento, se describirán las curvas de calentamiento en base a ecuaciones matemáticas para cuantificar dicho efecto por cada una de las tecnologías aplicadas.

Debido a que el objetivo de este trabajo es definir tiempo de tratamiento para conseguir un determinado nivel de inactivación de *Anisakis* en despojos y vísceras de pescado, se han determinado los niveles de inactivación del parásito que se alcanzarían en los cilindros de pescado de las dimensiones evaluadas asumiendo que contenía un determinado número de *Anisakis*. La Figura 6 muestra a modo de ejemplo las curvas de penetración de calor para unas temperaturas de régimen de 55 y 60 °C y los ciclos logarítmicos de inactivación que se alcanzarían. Para el cálculo de la letalidad acumulada según se ha descrito en Material y Métodos, se ha tomado como referencia un $D_{50\text{ }^{\circ}\text{C}}$ de 0.95' y una z de 3.79 °C según ha descrito Ruiz (2024). Para realizar el cálculo, se asumió que todas las muestras partían de 21.8 °C, a los que se añadieron los incrementos de temperatura en función del tiempo de tratamiento para cada temperatura del baño (55 y 60 °C).

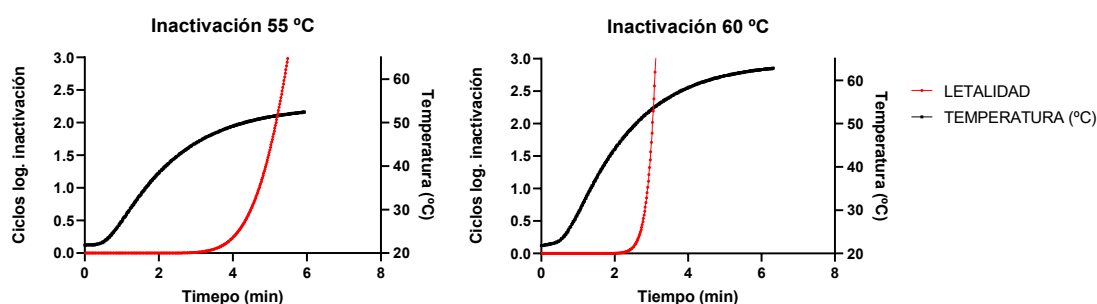


Figura 6. Ciclos logarítmicos de inactivación de *Anisakis* presentes en cilindros de pescado para dos curvas de calentamiento a 55 y 60 °C como temperatura de régimen.

Es notable el efecto que la temperatura tiene en la inactivación: en las gráficas se observa que, con baños a 55 °C, apenas se logra inactivar un ciclo logarítmico (el 90 %) de *Anisakis* en 4.5 minutos. En contraste, al aumentar la temperatura en 5 grados, hasta 60 °C, se conseguiría inactivar tres ciclos logarítmicos (99.9 % de la población) en solo 3 minutos. La utilización de una escala de tan sólo 3 ciclos logarítmicos de inactivación ha sido a modo de ejemplo. Habría que evaluar la carga total de *Anisakis* presente en una determinada cantidad de pescado para determinar los ciclos logarítmicos a inactivar y, por tanto, el tiempo y temperatura de procesado. Debido a que, en este trabajo, el objetivo era comparar el efecto de distintas tecnologías en la

velocidad de penetración de calor en los cilindros de pescado, la aproximación utilizada es de utilidad.

Un aspecto importante para considerar en este tipo de calentamiento “tradicional” es que el calentamiento no es uniforme en todo el producto tratado si no que el calor penetra desde el exterior del cilindro hasta el interior. El resultado es un calentamiento poco uniforme del producto transfiriéndose el calor desde el agua hacia el cilindro por convección y desde este hacia el interior por conducción, por lo que las partes más exteriores del producto se calientan en exceso antes de que el interior alcance la temperatura deseada (figura 7).

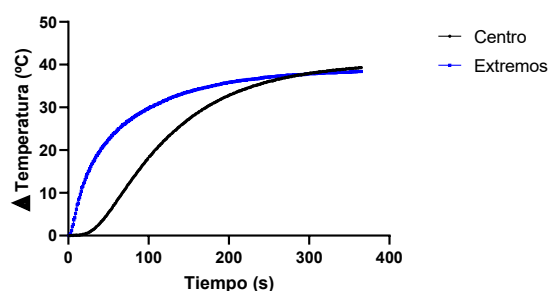


Figura 7. Curvas de penetración de calor del pescado triturado en el centro y en la periferia de los cilindros de acero inoxidable obtenidas a una temperatura de régimen de 60 °C.

Esto podría suponer un problema de pérdida de calidad si el objetivo fuera tratar alimentos destinados a su consumo o comercialización. Sin embargo, en este caso, al tratarse exclusivamente la inactivación de *Anisakis* en vísceras y despojos que serían desechados, este problema no resulta relevante, es más incluso resultaría de interés trabajar con las temperaturas del baño lo más altas para que, aunque el calentamiento no fuera uniforme, se alcanzase lo antes posible la temperatura necesaria para inactivar un determinado número de *Anisakis*. Lo que sí que tendría importancia en este caso sería el coste de ese exceso de energía que se requeriría para este tratamiento. Es por ello, y con el fin de mejorar la velocidad de calentamiento y, por tanto, la transmisión de calor observada en un calentamiento “tradicional” por inmersión en agua en un baño isotérmico, se ha evaluado el posible efecto del calentamiento mediante la aplicación simultánea de ultrasonidos.

6.2 calentamiento asistido con ultrasonidos

Siguiendo el mismo procedimiento utilizado en el calentamiento “tradicional”, se estudió el efecto que las ondas ultrasónicas podían tener en la penetración de calor del pescado triturado en el interior de los cilindros de acero inoxidable. Para ello, se aplicaron los mismos tratamientos de tiempo y temperatura que en el caso del baño sin ultrasonidos, aplicando estos a 37 KHz de frecuencia (Figura 8).

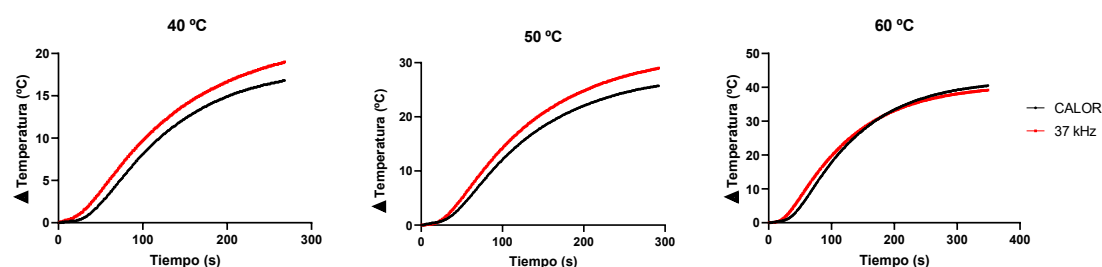


Figura 8. Curvas de penetración de calor del pescado triturado en el baño termostático sin ultrasonidos (negro) y con ultrasonidos (rojo) a diferentes temperaturas de régimen (40, 50 y 60 °C).

En los tratamientos con ultrasonidos, la penetración de calor fue más rápida en comparación con aquellos donde no se aplicaron. Este efecto se manifiesta claramente a las temperaturas más bajas testadas, pero cuando la temperatura está por encima de 50 °C, el efecto disminuye significativamente siendo inapreciable el efecto de los ultrasonidos. Una posible explicación es la reducción de la cavitación acústica a temperaturas más altas, ya que las moléculas adquieren mayor energía térmica, dificultando la generación de las diferencias de presión necesarias para formar burbujas (Ordóñez et al., 1987). Es por ello por lo que, a temperaturas más elevadas, el mayor salto térmico provoca que el efecto de la energía térmica predomine, disipando el impacto que los ultrasonidos podrían tener en la penetración de calor.

La mayor velocidad de penetración de calor observada al aplicar ultrasonidos a bajas temperaturas podría deberse a una mejor convección en el agua del baño termostático, a una mejora de la transferencia de calor desde el agua al cilindro, o a una mejor conducción en el pescado triturado. A bajas temperaturas, el efecto de la cavitación puede aumentar la turbulencia, mejorando así el coeficiente de transmisión de calor por convección en el medio líquido. Sin embargo, estudios previos realizados en alimentos, sugieren que el efecto en el coeficiente de transmisión de calor por conducción en el pescado triturado o del agua al cilindro podría tener aún más relevancia (Ciudad, 2018).

De forma análoga a la evaluación de la letalidad de los tratamientos térmicos tradicionales sobre *Anisakis*, también se ha evaluado la eficacia letal del calentamiento asistido por ultrasonidos del pescado. La Figura 9 muestra las curvas de penetración a 55 °C del pescado utilizando o no ultrasonidos y la letalidad acumulada que se alcanzaría sobre el posible *Anisakis* presente en el pescado. Como se observa, aplicar ultrasonidos (37 kHz) representa una ligera ventaja de tiempo de tratamiento en comparación con el calentamiento convencional. Esto se traduce que para, por ejemplo, inactivar 1000 larvas L3 de *Anisakis* (equivalente a una reducción de 3 ciclos logarítmicos), con el baño convencional se requieren 4,4 minutos y calentar hasta 52,7 °C, mientras que la combinación con los ultrasonidos reduciría ligeramente este tiempo a 4,2 minutos, también a 52,7 °C. Esto equivale a una disminución aproximada del 4 % en el tiempo

de tratamiento, que puede atribuirse al efecto de los ultrasonidos. Habría que valorar si energéticamente compensa la aplicación de ultrasonidos para conseguir esa reducción de un 4 % el tiempo de tratamiento. Sin embargo, sí que hay que considerar que la aplicación de los ultrasonidos haría que, para el mismo tiempo, por ejemplo 4,4' se conseguiría 1 ciclo más de inactivación de *Anisakis*, es decir se eliminarían 10.000 larvas L3 del parásito mejorando la eficacia letal del sistema.

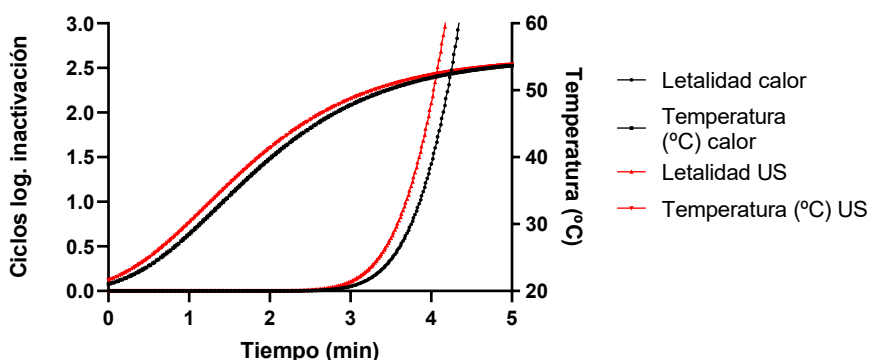


Figura 9. Inactivación teórica de *Anisakis* en pescado al aplicar calentamientos hasta 55 °C con calor y con calor asistido por ultrasonidos.

Debido al efecto que tienen los ultrasonidos, se quiso explorar si su aplicación a otras frecuencias podría resultar en un calentamiento diferente. Así, se realizaron pruebas similares a las anteriores, pero aplicando ultrasonidos a 80 kHz (Figura 10). En el caso de los ultrasonidos a 80 kHz, su efecto en la velocidad de penetración de calor fue menor que a 37 kHz, como se puede observar en la figura 10. Esto se debe a que el fenómeno de cavitación es más intenso a frecuencias bajas, ya que las burbujas que se forman son más grandes, aunque menos estables, de forma que cuando implosionan liberan más energía mecánica. En cambio, a frecuencias más altas, aunque se generan más núcleos de cavitación, se forman burbujas más pequeñas y estables (Brotchie, Grieser, y Ashokkumar, 2009) haciendo que predomine un efecto químico más que el mecánico principalmente observado a bajas frecuencias (20 kHz).

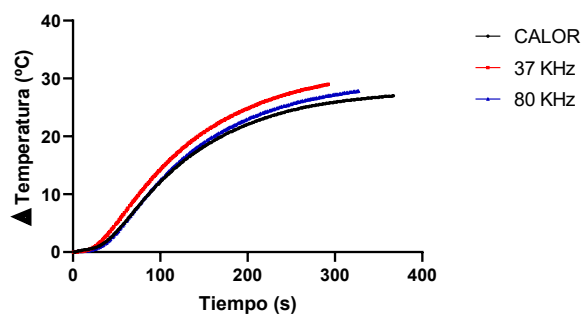


Figura 10. Curvas de penetración de calor de pescado triturado en cilindros de acero inoxidable en baño termostático a 50 °C sin aplicar ultrasonidos (negro), con ultrasonidos a 37 kHz (rojo) y a 80 kHz (azul).

Con el fin de comprobar experimentalmente el mayor efecto mecánico de los ultrasonidos a bajas frecuencias, es decir evaluar la posible influencia de la frecuencia de los ultrasonidos en los fenómenos de vibración y cavitación que podrían mejorar la transmisión de calor, se valoró este efecto mediante la medida de la erosión de papel de aluminio al someterlo a un campo ultrasónico (Figura 11). Este ensayo se suele realizar para evaluar la uniformidad y potencia del campo ultrasónico en los sistemas indirectos de ultrasonidos (Ciudad, 2018). Como se observa, tanto al aplicar ultrasonidos a 80 kHz como al no utilizar ultrasonidos, no hubo pérdida de peso. En cambio, a 37 kHz, las pérdidas alcanzaron un 3 % en peso. Estas pérdidas se deben a los agujeros que se forman en el papel de aluminio debido a la implosión de las burbujas generadas por la cavitación. Esto evidencia que, a frecuencias más bajas, el fenómeno de cavitación es más intenso lo que resultaría en mayores efectos de vibración, fuerzas de cizalla, etc., y, como se ha observado, en una mayor velocidad de penetración de calor.

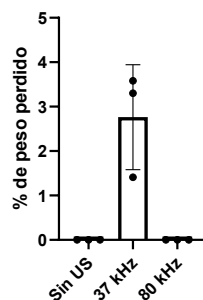


Figura 11. Porcentaje de pérdidas de peso de papel de aluminio al aplicar calor (65 °C durante dos minutos) en un baño termostático, asistido con ultrasonidos a 37 y 80 kHz y sin ultrasonidos.

Con el fin de comparar el efecto de los ultrasonidos en la velocidad de penetración de calor se ha realizado de dos formas distintas. Por un lado, experimentalmente, determinando el tiempo necesario para alcanzar una cierta temperatura y por otra matemáticamente describiendo las curvas de penetración de calor con ecuaciones matemáticas. En base a la primera aproximación, la Figura 12 muestra los tiempos requeridos para que el interior del pescado triturado alcanzara la temperatura fijada en el baño termostático (40, 50, 60 o 65 °C). Como se observa, el efecto de los ultrasonidos es claro, especialmente los de menor frecuencia (37 kHz), y, como ya se ha indicado anteriormente, cuanto menor es la temperatura de procesado. Por ejemplo, para alcanzar 40 °C en el interior del cilindro de pescado la aplicación de ultrasonidos reduciría el tiempo alrededor de un 31-32 % y a 50 °C un 19 y 11 % al aplicarlos a 37 y 80 kHz, respectivamente.

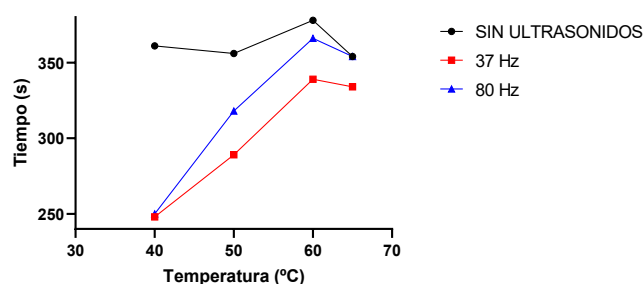


Figura 12. Tiempo que tarda el centro del pescado triturado en alcanzar la temperatura fijada en el baño termostático para diferentes temperaturas, aplicando o no ultrasonidos (37 y 80 kHz).

Una segunda forma de evaluar el efecto de los ultrasonidos en la velocidad de penetración de calor es describiendo las gráficas de penetración de calor utilizando modelos matemáticos. Si bien la ecuación de Ball y Olson suele ser utilizada para describir este tipo de gráficas, debido a que posteriormente se van a describir curvas de penetración que muestran una cinética distinta, se valoró utilizar otro modelo que fuera más flexible y permitiera ajustar gráficas con distintas cinéticas. Es por ello por lo que en este trabajo se ha utilizado el modelo de Gompertz (modelo primario) que, si bien es una ecuación utilizada para describir fenómenos como el crecimiento o la inactivación térmica de microorganismos, es útil para describir distintos tipos de cinéticas de tipo sigmoideo en toda la curva o ajustar parte de ella (Gil, Brandao y Silva, 2006). La Tabla 1 muestra los coeficientes de los parámetros del modelo tras el ajuste a las curvas obtenidas a las distintas temperaturas aplicando o no ultrasonidos (en este caso, sólo se ha trabajado con los ultrasonidos de 37 kHz). Como se observa en base a los valores R^2 (próximos a 1) y a la suma de los errores (Syx), el modelo describió con precisión las curvas.

Tabla 1. Coeficientes de los parámetros de la ecuación de Gompertz (N , C , b y M), coeficiente de determinación (R^2) y error estándar de la estimación (Syx) obtenidos tras el ajuste de las curvas de penetración de calor de pescado triturado a distintas temperaturas aplicando calor asistido o no con ultrasonidos (37 kHz).

	40 °C		50 °C		55 °C		60 °C		65 °C	
	Calor	37 kHz	Calor	37 kHz	Calor	37 kHz	Calor	37 kHz	Calor	37 kHz
N	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00	20,00
C	20,02	21,18	29,75	30,46	35,58	36,6	39,35	39,66	45,13	45,37
b	0,01449	0,01498	0,01575	0,01598	0,01348	0,01355	0,01683	0,01652	0,01525	0,01536
M	77,01	71,74	88,88	78,45	75,62	64,75	95,17	79,74	82,4	78,31
R^2	0,999	0,999	0,998	0,998	0,998	0,999	0,996	0,997	0,999	0,999
Syx	0,219	0,182	0,421	0,387	0,438	0,370	0,823	0,759	0,495	0,486

A partir de los datos recogidos en la tabla, se formularon las ecuaciones que relacionan cada uno de los parámetros (N , C , b y M), con la variable temperatura para cada uno de los casos,

calentamiento con y sin ultrasonidos (modelo secundario). El parámetro N , que representa el valor de temperatura inicial, se consideró constante e igual a 20 en la ecuación final. Para el parámetro C (diferencia entre la temperatura inicial del pescado y la final), se observó una relación lineal con la temperatura, obteniéndose un modelo secundario para calor y otro para calor y ultrasonidos mediante dos ecuaciones de primer grado, que, a pesar de tener una pendiente muy parecida, difieren bastante en la ordenada en el origen. Finalmente, en el caso del parámetro b (velocidad de calentamiento) y M (tiempo en el que se produce la máxima velocidad de calentamiento), no se observó una cinética clara entre estos parámetros y la temperatura utilizando o no ultrasonidos. Es por ello por lo que se calcularon valores medios para calor y ultrasonidos para estos parámetros b y M , asumiendo en la ecuación final (modelo terciario) valores constantes. En resumen, los modelos secundarios obtenidos para cada uno de los parámetros del modelo de Gompertz se presentan en la Tabla 2. Hay que señalar que el valor de b , aunque no había diferencias estadísticamente significativas al aplicar calor con y sin US, era ligeramente superior al aplicar US indicando hasta un 1 % más rápido el calentamiento con los US. Sí que había diferencias más marcadas en el parámetro M indicando que esa máxima velocidad de calentamiento se producía antes en el tiempo al utilizar los US, concretamente un 11 % antes lo que justificaría la penetración de calor más rápida en el calentamiento asistido por US.

Tabla 2. Modelos secundarios obtenidos a partir de datos de la Tabla 1.

	Calor	US - 37 kHz
N	20	20
C	$0,9968X - 19,863$	$0,9602X - 17,196$
R ²	0.998	0.995
b	$0,01516 \pm 0.0012$	$0,01528 \pm 0.0011$
M	$83,816 \pm 8.2$	$74,598 \pm 6.3$

A partir de los modelos secundarios (Tabla 2) y sustituyéndolos por los parámetros del modelo primario, se obtuvieron las ecuaciones finales (modelos terciarios) que describen las curvas de calentamiento por calor y calor asistido con ultrasonidos para calentamientos desde 40 a 65 °C.

$$T(t) = 20 + (0.9968 * T^a - 19.863) * \left(\exp \left(- \left(\exp(0.01516 * (83.816 - t)) \right) \right) \right)$$

(Ecuación 4)

$$T(t) = 20 + (0.9602 * T^a - 17.196) * \left(\exp \left(- \left(\exp(0.01528 * (74.598 - t)) \right) \right) \right)$$

(Ecuación 5)

Una vez obtenido el modelo, se procedió a su validación. Para ello, se representaron las temperaturas reales obtenidas experimentalmente frente a las que se estimaban con los

modelos terciarios desarrollados. A modo de ejemplo se muestra la validación para las curvas de 40, 50 y 60 °C aplicando sólo calor (Figura 13). Como puede observarse, el modelo describió con precisión los datos experimentales, obteniéndose unos valores $R^2 > 0.999$, si bien a bajas temperaturas de calentamiento el modelo subestima ligeramente los valores reales.

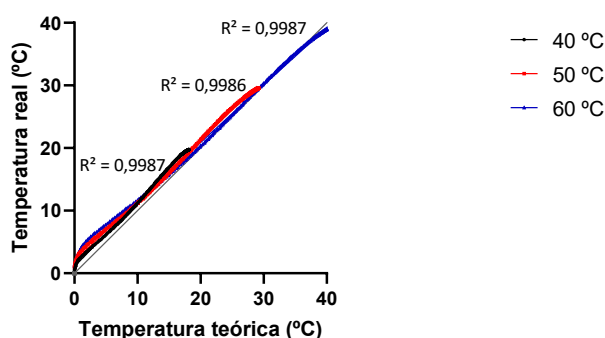


Figura 13. Relación entre los valores de temperatura obtenidos experimentalmente frente a los estimados por el modelo terciario desarrollado a diferentes temperaturas del baño termostático.

Los modelos desarrollados pueden utilizarse, por ejemplo, para calcular la letalidad de un tratamiento, ya sea por calor, o por calor asistido por ultrasonidos o para definir la temperatura a aplicar para conseguir un determinado nivel de inactivación de *Anisakis*. La Figura 14 muestra una imagen del DSS (“Decision Support System” o herramienta de toma de decisiones) que se ha desarrollado y que permite obtener las curvas de calentamiento aplicando o no ultrasonidos de cilindros de pescado para una determinada temperatura de régimen y la letalidad acumulada alcanzada. En la Figura se ha calculado con los modelos la temperatura de régimen a seleccionar en un baño termostático para conseguir una inactivación de 6 ciclos logarítmicos de *Anisakis*, es decir 10^6 L3. Se ha asumido la presencia de 1000 larvas L3 por cada kg de merluza y que se trata hasta 1000 kg de producto; esta parasitación está por encima de la prevalencia detectada: por ejemplo, en un estudio en merluza europea del Atlántico Norte, se encontró una prevalencia del 95,6 %, con una media de 11,3 larvas por pez (rango de 1 a 41). La mayoría de las larvas se localizaron en las vísceras, especialmente en el hígado y las gónadas (ELIKA, 2022). Como se observa, seleccionando 51,4 °C, y partiendo de una temperatura inicial de 20 °C, se conseguirían inactivar 6 ciclos logarítmicos a los 6,3’ al aplicar ultrasonidos y calor. En caso de no aplicarlos, en este tiempo se habrían reducido 3,4 ciclos logarítmicos, requiriéndose 7,6 minutos para inactivar 10^6 larvas con solo calor, es decir una reducción de 1,3’ o un 18 % menos de tiempo.

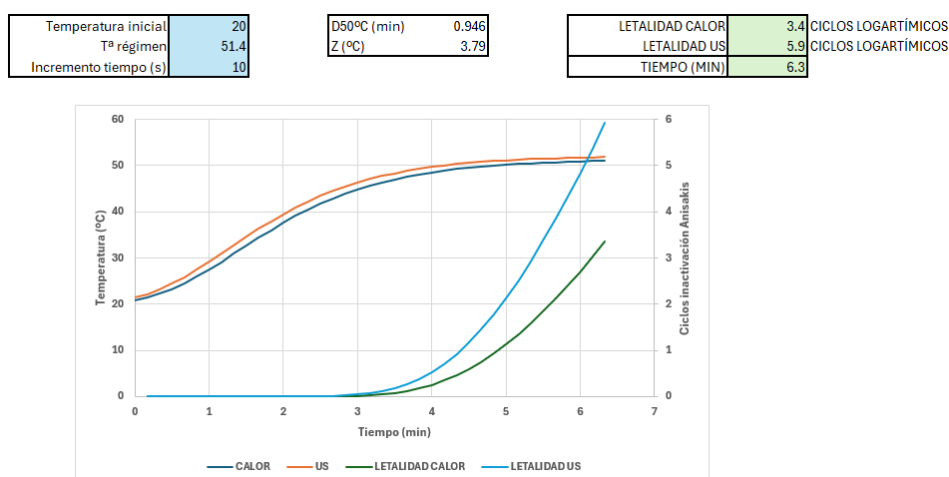


Figura 14. DSS desarrollado para determinar las curvas de calentamiento aplicando o no ultrasonidos de cilindros de pescado y la letalidad acumulada de larvas L3 de *Anisakis*.

Según estos resultados, la aplicación de ultrasonidos (37 kHz) representa una cierta ventaja de tiempo de tratamiento en comparación con el baño convencional (calor) sobre todo al trabajar a menores temperaturas. Así, si en vez de 51°C, se trabaja a mayor temperatura, por ejemplo, a 55 °C, para inactivar 10^6 larvas L3 de *Anisakis* (equivalente a una reducción de 6 ciclos logarítmicos), el baño convencional requiere 4,7 minutos. En contraste, combinar los ultrasonidos con el baño reduce este tiempo a 4,3 minutos. Esto equivale a una disminución aproximada del 9 % en el tiempo de tratamiento, que puede atribuirse al efecto de los ultrasonidos. Como se ha indicado, dependiendo del consumo eléctrico que supone la incorporación de los ultrasonidos, sería de interés o no incorporar esta tecnología para reducir tiempos y temperaturas de tratamiento para la destrucción de un determinado nivel de *Anisakis* en los despojos y vísceras.

6.3 Calentamiento con pulsos eléctricos de alto voltaje

Tras evaluar la penetración de calor en la merluza triturada mediante calentamiento por inmersión en baño en condiciones isotérmicas a determinadas temperaturas de régimen, y en baño isotérmico con la aplicación de ultrasonidos, se analizó el efecto del calentamiento por PEF en el mismo producto. Para ello, y como se ha descrito en la sección de Material y métodos, se utilizó un equipo de pulsos eléctricos diseñado para aplicar PEF a muy bajos campos eléctricos (0.08 kV/cm); debido a ese bajo campo eléctrico y la gran cantidad de pulsos que se aplican, se produce principalmente un calentamiento óhmico siendo menos importante el efecto electroporador. Al tratarse de un calentamiento óhmico, se trata de un calentamiento volumétrico, es decir, el producto se calienta de una forma más o menos uniforme en todo él, a diferencia de lo que sucedía en los otros sistemas de calentamiento utilizado. Los iones libres

presentes en la composición del pescado se desplazan en dirección del campo eléctrico que se aplica de forma bipolar, es decir como si se alternase su dirección, produciendo el movimiento de los iones que, al rozar e interaccionar con otras moléculas del producto y la resistencia del medio, generan calor mediante efecto Joule (Purnama et al., 2024).

El calentamiento volumétrico generado por los PEF se ha descrito que favorece un calentamiento más uniforme en comparación con los métodos convencionales de calentamiento, lo que mejoraría tanto la eficiencia energética como el tiempo de calentamiento (Sanz, 2018; Astráin-Redín et al., 2022). Con el fin de evaluar estas ventajas, se aplicó un calentamiento por PEF en muestras de pescado triturado hasta alcanzar los 65 °C en toda la muestra. La Figura 15 muestra las curvas de calentamiento registradas en dos puntos distintos de la cámara de tratamiento: en el centro y en la superficie del producto (la parte más superficial de la cámara de tratamiento). En la figura de la izquierda, se muestra un ejemplo de una de las réplicas y en la de la derecha los valores medios y la desviación estándar de las tres réplicas realizadas.

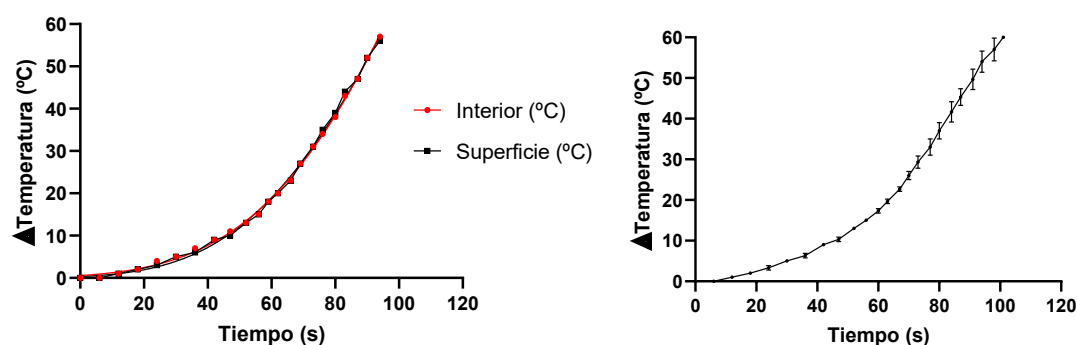


Figura 15. Curvas de penetración de calor por calentamiento óhmico con PEF de la merluza triturada hasta una temperatura objetivo de 65 °C en el centro y la superficie del producto (izquierda) e incrementos de la temperatura medios (las barras de error corresponden a la desviación estándar) para pescado triturado calentado por PEF (derecha).

Como se observa, la penetración de calor es homogénea en todo el pescado, sin diferencias considerables entre la parte interior y la exterior de la cubeta de tratamiento. Además, los tratamientos presentan una alta reproducibilidad, con una baja variabilidad entre réplicas: el coeficiente de variación era inferior al 10 % a lo largo de toda la curva de penetración de calor, y en la mayoría de los casos, menor del 5 %. Estos resultados confirman el calentamiento volumétrico y más uniforme con esta tecnología que con las anteriores. Como ya se ha descrito anteriormente, al analizar las curvas de calentamiento obtenidas con el baño termostático en el centro y el exterior de la merluza triturada (Figura 7), se observaba un calentamiento irregular.

De forma análoga a las otras tecnologías, se evaluó la eficacia letal de los tratamientos sobre *Anisakis*. La Figura 16 muestra los resultados observándose un rápido incremento de la

temperatura y, en consecuencia, de la inactivación. En este caso, para inactivar 6 ciclos logarítmicos, el tiempo de tratamiento fue de unos 88". Como se discutirá con más detalle más adelante, este tiempo es muy inferior al descrito con anterioridad demostrando de nuevo las ventajas apuntadas por esta tecnología en comparación con el calor tradicional o el asistido por ultrasonidos.

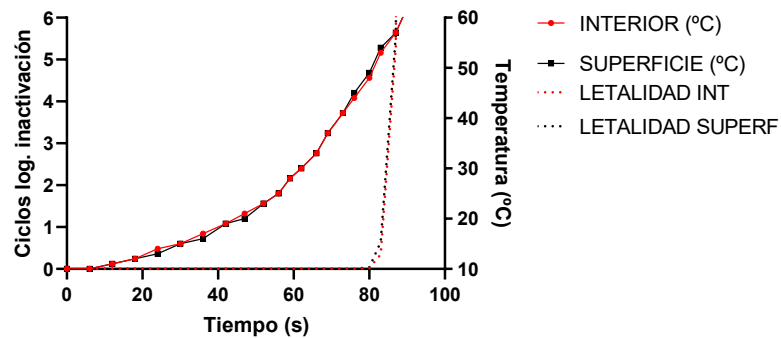


Figura 16. Ciclos logarítmicos de inactivación de *Anisakis* presentes en el pescado triturado en base a las curvas de calentamiento mostradas en la Figura 15.

Antes de pasar a comparar las diferencias entre unas tecnologías y otras, se hizo un estudio del efecto de distintos factores que condicionan la tecnología de los PEF. Uno de los parámetros que más influye en el calentamiento de un sólido por PEF es la conductividad eléctrica del medio de tratamiento. De forma general, el calentamiento es más rápido cuando la conductividad del medio o del producto es más elevada. Es más, si el alimento se encuentra sumergido en un medio acuoso, la velocidad de calentamiento en el producto y en el medio acuoso dependerá de la conductividad eléctrica de uno y otro (Astráin-Redín et al., 2022; Sanz, 2018). Así, si se trata un alimento sólido sumergido en agua con una conductividad eléctrica más baja que la del alimento, se calentará primero el alimento ("calentamiento de dentro a fuera"); en cambio, si la conductividad del medio es más alta que la del alimento, lo que se calentará primero será el medio, generalmente agua ("calentamiento de fuera a dentro" como si fuera un calentamiento normal en un recipiente con agua caliente). Cuando las conductividades del medio y del alimento son similares, el calentamiento es uniforme, es decir el medio y el alimento se calientan a la misma velocidad. Para comprobar este fenómeno, en la Figura 17 se compara el tratamiento por PEF en un trozo de pescado sumergido en agua con diferente conductividad eléctrica (3 y 6 mS/cm; la conductividad del pescado es de unos 6 mS/cm).

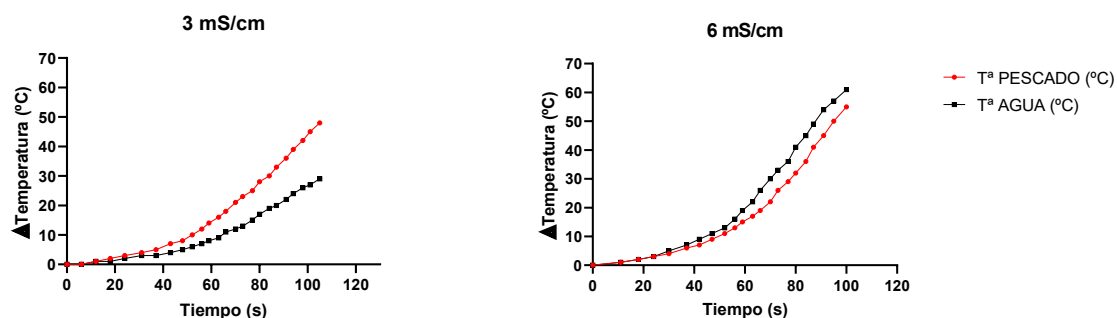


Figura 17. Calentamiento con PEF de un trozo de pescado sumergido en agua con conductividades eléctricas de 3 mS/cm (izquierda) y 6 mS/cm (derecha).

Al tratar el trozo de merluza sumergido en agua con una conductividad eléctrica de 3 mS/cm, se calentaba más rápidamente el pescado (línea roja), mientras que, si se sumergía en agua con 6 mS/cm, sucedía lo contrario. Además, se aprecia como en un medio con menor conductividad el calentamiento es más lento: con una conductividad de 3 mS/cm, para alcanzar 40 °C, era necesario 95 segundos, mientras que a 6 mS/cm, el tiempo se reducía a 88 segundos (7,4 %). El pescado tenía una conductividad ligeramente inferior a 6 mS/cm (5.46 ± 0.14 mS/cm), lo que explica esas pequeñas diferencias en la curva de penetración de calor entre el agua a 6 mS/cm y el trozo de pescado. En el caso del pescado triturado, no se observaron diferencias en las penetraciones de calor entre la superficie y el centro (Figura 15) ya que al estar todo el pescado triturado y no añadirse agua al medio, la conductividad del pescado triturado era más homogénea que cuando es una pieza de pescado como se acaba de ver.

Debido a la influencia de la conductividad eléctrica del medio, y habiendo visto su influencia en la uniformidad del calentamiento entre tratar pescado triturado, con el que se llenaba toda la cámara de tratamiento, o de calentar un trozo de pescado (7 g) sumergido en una solución acuosa de una determinada conductividad, se evaluó el posible efecto en el calentamiento de una mezcla de merluza triturada y agua (60 % merluza y 40 % agua) para compararlo con los otros escenarios. La Figura 18 recoge estos resultados. Como se observa, apenas hay diferencias en las curvas de penetración de calor de los tres escenarios. Esto implica que, con la tecnología de los PEF, el calentamiento de los 3 productos podría emplearse según la aplicación deseada, obteniendo resultados similares. En este estudio, resulta interesante la posibilidad de poder tratar el pescado triturado, ya que la trituración podría suponer un primer tratamiento en el diseño de un equipo destinado a la inactivación de *Anisakis* de despojos y vísceras de pescado que se instalase en un buque factoría. Además, la posibilidad de mezclar ese pescado triturado con agua y que el calentamiento sea igual de efectivo puede ser relevante para el diseño de dicha instalación, ya que podría facilitar el bombeo de la bomba de impulsión del producto desde la

zona de trituración de los despojos hasta la zona de tratamiento para eliminar las larvas L3 de *Anisakis*.

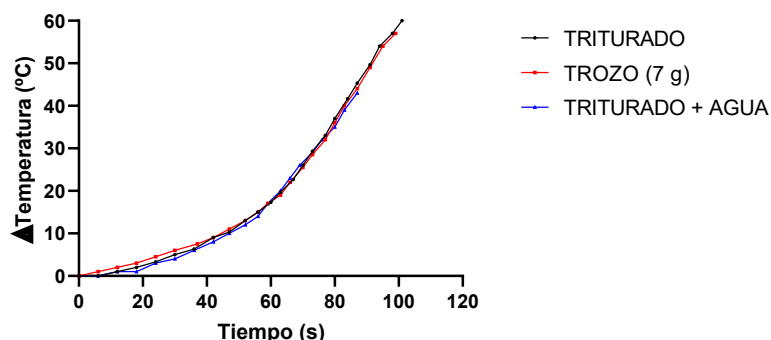


Figura 18. Curvas de penetración de calor con PEF en merluza triturada (negro), una mezcla de agua de la red y merluza triturada (azul) y un trozo de merluza de 7 g en agua con 6 mS/cm (rojo).

Al igual que en el caso del calor y los ultrasonidos, con el fin de evaluar el efecto de los PEF en la velocidad de penetración de calor, se han descrito las gráficas de penetración de calor utilizando modelos matemáticos. Así la Tabla 3 muestra los parámetros de la ecuación de Gompertz para el calentamiento asistido por PEF en pescado triturado, la mezcla de pescado y agua y el trozo de pescado en agua de 6 mS/cm mostrados en la figura anterior. En este caso, se fijaron como constantes tanto el parámetro N (valor inicial de la curva) como C (valor asintótico; se fijó en 200 que es el valor que estimó en un primer ajuste el modelo de Gompertz para las curvas descritas). El modelo de Gompertz describió con precisión las curvas mostrando unos valores R^2 próximos a 1 y los errores estándar de la aproximación cercanos a 0. Como se observa en la tabla, tanto los valores b (velocidad de calentamiento) como M (tiempo en el que se produce esa máxima velocidad), fueron similares no determinándose diferencias estadísticamente significativas lo que permitió definir unos valores medios como se muestra en la última columna de la tabla. Aunque luego se comparará con más detalle, se observa que el valor b obtenido con los PEF es ligeramente superior ($0,0165 \text{ s}^{-1}$) a los obtenidos para los calentamientos en un baño ($0,01516 \text{ s}^{-1}$) y con ultrasonidos ($0,01528 \text{ s}^{-1}$) mostrados en la Tabla 2.

Tabla 3. Parámetros de la ecuación de Gompertz (N , C , b y M) y su coeficiente de determinación y el error estándar de la estimación para el calentamiento asistido por PEF en pescado triturado, la mezcla de pescado y agua y el trozo de pescado en agua de 6 mS/cm.

	Pescado triturado	Mezcla triturado y agua	Trozo en agua	Media
N	0	0	0	0
C	200	200	200	200
b	$0,01646 \pm 0.0006$	$0,01678 \pm 0.0005$	$0,01628 \pm 0.0007$	$0,01650 \pm 0.0002$
M	$115,5 \pm 1.4$	$112,5 \pm 1.2$	$113,4 \pm 1.5$	$113,8 \pm 1.5$
R^2	0,9968	0,9987	0,9963	-
$Sy.x$	1,039	0,5259	1,1	-

Con estos parámetros medios, se ha definido la siguiente ecuación basada en el modelo de Gompertz para describir en este caso el calentamiento por pulsos eléctricos tanto de pescado triturado, una mezcla de pescado triturado y agua o para un trozo de pescado en agua de 6 mS/cm:

$$T(t) = 200 * (\exp(-(\exp(0.0165 * (113.8 - t)))) \quad (\text{Ecuación 6})$$

Esta ecuación se utilizó para predecir la inactivación térmica de *Anisakis* de igual forma que para calor y ultrasonidos, con el fin de poder comparar los tratamientos. Es más, esta ecuación se incorporó al DSS permitiendo simular el calentamiento por los tres sistemas evaluados y predecir la inactivación del parásito en pescado. La Figura 19 muestra las curvas de calentamiento por PEF y con el baño termostático con y sin la aplicación de ultrasonidos hasta una temperatura de 55 °C, así como la letalidad teórica que se alcanzaría de larvas L3 de *Anisakis* en cada caso. Las curvas son comparables ya que en los 3 casos se simula el calentamiento de trozos de pescado o pescado de unos 7 g.

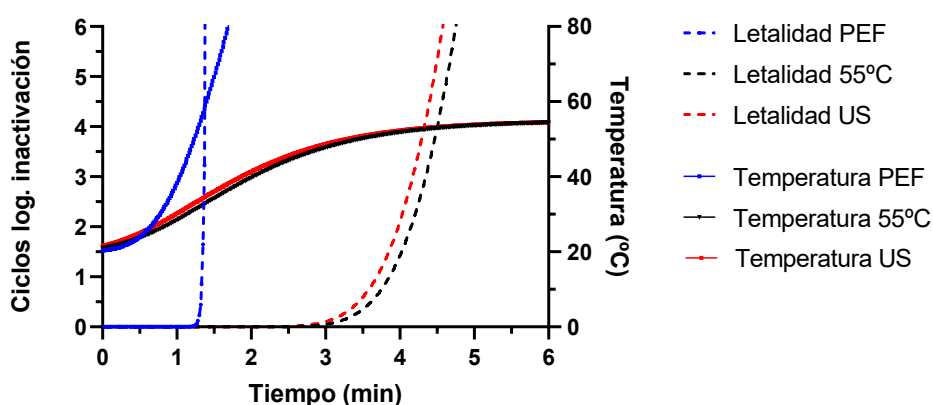


Figura 19. Curvas de penetración de calor del pescado triturado en el interior de cilindros metálicos tratados por calor (negro), por calor asistido por ultrasonidos (rojo) y de trozos de pescado tratados por PEF (azul) y la correspondiente inactivación de *Anisakis* (líneas discontinuas).

Si se comparan los métodos de calentamiento estudiados, el calentamiento por PEF destaca como el más rápido. Por ejemplo, para alcanzar una temperatura final de unos 53 °C, se requieren unos 4,5 minutos utilizando el baño termostático, 4 minutos al aplicar ultrasonidos (37 kHz) junto con calor, y únicamente 1,3 minutos en el caso del calentamiento por PEF. Es decir, utilizando PEF el tiempo de tratamiento se reduce en un 71 % y un 68 % respecto al requerido al aplicar calor y ultrasonidos, respectivamente.

La mayor velocidad de calentamiento de los PEF queda reflejada por la distinta cinética de calentamiento comparado con los otros dos métodos. Los tratamientos con calor y ultrasonidos

presentan una fase lag de calentamiento más prolongada en comparación con los PEF. Aunque los PEF también muestran una fase lag, esta es menor; ello podría deberse a que, al inicio, parte del calentamiento generado por los PEF se disipa a través de los electrodos, pero una vez que estos se calientan, la velocidad de calentamiento del pescado es prácticamente exponencial. Esto es solo una hipótesis que debería comprobarse experimentalmente.

La mayor velocidad de calentamiento se ve reflejada claramente en la de inactivación de los *Anisakis* como se observa en la Figura 19. Las pequeñas diferencias entre el calor y los ultrasonidos ya han sido discutidas previamente. Sin embargo, el calentamiento mediante pulsos eléctricos supone una notable ventaja de tiempo de inactivación con respecto a los otros tratamientos. Por ejemplo, para inactivar 1000 larvas del parásito, mediante cada técnica, se requerirían 4.34, 4.17 y 1.37 minutos con calor, ultrasonidos y PEF, respectivamente. Esto representa una reducción del tiempo de tratamiento al aplicar PEF del 68 % y del 67 % respecto al calor y los ultrasonidos. Es más, cuando trascurren 1.33 minutos de tratamiento por PEF, momento en el que se logra reducir la primera unidad logarítmica de inactivación, esta aumenta drásticamente al aplicar PEF, alcanzándose las 6 reducciones logarítmicas en tan solo dos segundos más.

Finalmente, hay que indicar que gracias al DSS desarrollado, se ha estimado que para conseguir una velocidad de calentamiento y letalidad con el calor o los ultrasonidos similar a la de los PEF, sería necesario una temperatura de régimen del agua del baño de unos 95 °C (Figura 20).

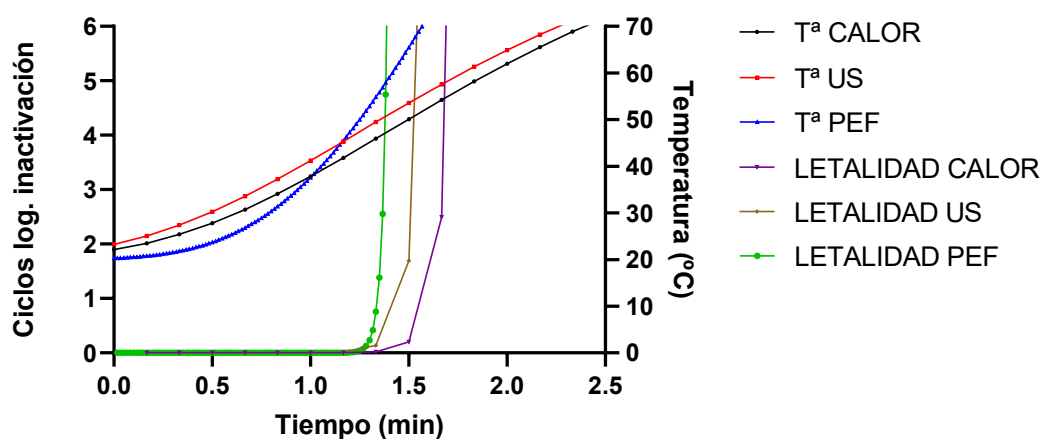


Figura 20. DSS con las curvas de calentamiento para cada tecnología (calor, calor asistido por ultrasonidos y PEF) y la inactivación acumulada de larvas L3 de *Anisakis* con cada una de ellas. Temperatura de régimen del baño de 95 °C.

7. CONCLUSIONES

Tras evaluar varias estrategias de inactivación de *Anisakis* en merluza, se puede concluir que aplicar ultrasonidos permite reducir el tiempo de calentamiento con respecto al calor (baño

termostático) entre un 19 % y un 31 % a temperaturas por debajo de los 50 °C. Sin embargo, ambas tecnologías son más lentas que un calentamiento óhmico aplicando PEF. El tiempo de calentamiento utilizando PEF fue alrededor de un 71 % y un 68 % menor que con baño termostático o ultrasonidos, respectivamente. El resultado de esto es que, lograr la inactivación térmica de 1000 larvas L3 de *Anisakis* utilizando pulsos eléctricos sería un 68 % y un 67 % más rápido que si se utilizara calor o calor con ultrasonidos, respectivamente.

El calentamiento por pulsos eléctricos permitió un calentamiento más uniforme y reproducible, no observándose diferencias entre distintos productos tratados (pescado triturado, trozos de pescado sumergidos en agua o mezclas de pescado y agua), en comparación con las otras tecnologías (calor y calor asistido por ultrasonidos).

Se han desarrollado ecuaciones matemáticas que permiten describir y predecir el calentamiento por las distintas tecnologías, así como su eficacia letal sobre *Anisakis*, permitiendo desarrollar un *Decision Support System* (DSS) para tal efecto.

8. CONCLUSIONS

After evaluating several *Anisakis* inactivation strategies in hake, it can be concluded that applying ultrasound reduces the heating time with respect to heat (thermostatic bath) by 19 % to 31 % at temperatures below 50 °C. However, both technologies are slower compared to ohmic heating by applying PEF. The warm-up time using PEF was about 71% and 68% shorter than with thermostatic bath or ultrasound, respectively. The result of this is that achieving thermal inactivation of 1000 *Anisakis* L3 larvae using PEF would be 68% and 67% faster than if heat or ultrasonic heat were used, respectively.

Heating by PEF allowed for more uniform and reproducible heating, with no differences observed between different treated products (crushed fish, fish pieces immersed in water or fish-water mixtures), compared to the other technologies (ultrasound-assisted heat and heat).

Mathematical equations have been developed to describe and predict warming by different technologies, as well as their lethal efficacy on *Anisakis*, allowing the development of a Decision Support System (DSS) for this purpose.

9. VALORACIÓN PERSONAL

La realización de este TFG ha sido una experiencia enriquecedora para mí. He ampliado mi formación en técnicas de laboratorio, que hasta ahora se habían centrado principalmente en la

microbiología y el análisis fisicoquímico, adentrándome en las nuevas tecnología de procesado de alimentos, y especialmente en la tecnología de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje.

Además, he profundizado en mis conocimientos sobre el parásito *Anisakis* y su relevancia en algunas regiones, comprendiendo mejor los riesgos que plantea y las estrategias para su inactivación, y he adquirido conciencia de la importancia de la gestión de residuos en la industria alimentaria.

Por último, he tenido un acercamiento a la modelación matemática, aprendiendo a valorar la importancia que tiene en la optimización de procesos y la toma de decisiones.

Este proyecto ha contribuido a avivar mi curiosidad científica, que hace años que despertó, y me ha permitido valorar aún más el papel que tiene la investigación en la resolución de problemas de cualquier tipo.

Gracias a mis directores Vanesa y Nacho que me han ayudado en todo momento, y de los que he tenido el placer de aprender.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Abad, V., Martínez, J.M., Mañas, M.P., Raso, J., Cebrián, G. y Álvarez-Lanzarote, I. (2024). "Inactivation by pulsed electric fields of *Anisakis* in naturally infected hake meat". *LWT*, 208, pp. 116714. DOI: 10.1016/j.lwt.2024.116714
- Abad, V., Alejandre, M., Hernández-Fernández, E., Raso, J., Cebrián, G. y Álvarez-Lanzarote, I. (2023). "Evaluation of Pulsed Electric Fields (PEF) Parameters in the Inactivation of *Anisakis* Larvae in Saline Solution and Hake Meat". *Foods*, 12(2), 264. DOI: 10.3390/foods12020264
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2023). *Anisakis*. Madrid: AESAN. Disponible en: https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/anisakis.htm [Consultado el 25-05-2025]
- Astráin-Redín, L., Raso, J., Álvarez, I., Kirkhus, B., Meisland, A., Borge, G.I.A. y Cebrián, G. (2023). "New pulsed electric fields approach to improve the blanching of carrots". *LWT*, 189, pp. 115468. DOI: 10.1016/j.lwt.2023.115468
- Astráin-Redín, L., Moya, J., Alejandre, M., Beitia, E., Raso, J., Calvo, B., Cebrián, G. y Álvarez, I. (2022). "Improving the microbial inactivation uniformity of pulsed electric field ohmic heating treatments of solid products". *LWT*, 154, 112709. DOI: 10.1016/j.lwt.2021.112709
- Baird, F.J., Gasser, R.B., Jabbar, A. y Lopata, A.L. (2014). "Foodborne anisakiasis and allergy". *Molecular and cellular probes*, 28(4), pp. 167–174. DOI: 10.1016/j.mcp.2014.02.003
- Bao, M., Cipriani, P., Mattiucci, S., & Nadler, S.A. (2023). "Resurrection of genus *Phocanema* Myers, 1959, as a genus independent from *Pseudoterranova* Mozgovoř, 1953, for nematode species (*Anisakidae*) parasitic in pinnipeds and cetaceans, respectively". *Parasitology International*, 94, 102741. DOI: 10.1016/j.parint.2023.102741
- Bao M, Pierce GJ, Pascual S, González-Muñoz M, Mattiucci S, Mladineo I, Cipriani P, Basilic I, Strachan NJ. (2017). "Assessing the risk of an emerging zoonosis of worldwide concern: anisakiasis". *Scientific Reports*, 13 (7), 43699. DOI: 10.1038/srep43699
- Brothie, A., Grieser, F. y Ashokkumar, M. (2009). "Effect of Power and Frequency on Bubble-Size Distribution in Acoustic Cavitation". *Physical Review Journals*, 102 (8), pp. 84-302. DOI: 10.1103/PhysRevLett.102.084302
- Ciudad Hidalgo, S. (2021). *Aplicación de ultrasonidos al cocinado de alimentos*. Tesis. Universidad de Zaragoza.
- Debenedetti, Á. L., Madrid, E., Trelis, M., Codes, F. J., Gil-Gómez, F., Sáez-Durán, S. y Fuentes, M. V. (2019). "Prevalence and Risk of *Anisakis* Larvae in Fresh Fish Frequently Consumed in Spain: An Overview". *Fishes*, 4(1), 13. DOI: 10.3390/fishes4010013

- DPDx Laboratory Identification of Parasites of Public Health Concern, (2019). *Anisakiasis*. Atlanta: CDC.
- EFSA Panel on Biological Hazards, (2024). "Re-evaluation of certain aspects of the EFSA Scientific Opinion of April 2010 on risk assessment of parasites in fishery products, based on new scientific data. Part 1: ToRs1-3". *EFSA Journal*, 22(4). DOI: 10.2903/j.efsa.2024.8719
- EFSA Panel on Biological Hazards, (2010). "Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products". *EFSA Journal*, 8(4), pp. 1543. DOI: 10.2903/j.efsa.2010.1543
- ELIKA (2022). *Evaluación del Riesgo de Anisakis a través del consumo de pescado*. Arcaute: ELIKA.
- FDA U.S Department of Health and Human Services Food and Drug Administration (2020). "Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance". Capítulo 5, pp. 91-97. Disponible en: <https://www.fda.gov/media/80637/download> [Consultado el 25-05-2025]
- Gago, L., García, E., Fernández, J. y González, J. (2007). *Detection and Inactivation Methods of Anisakis simplex and Diseases that this parasite produces*. Biotechnology Innovation Circle. Madrid Science Park. Disponible en: <https://pesca.elika.eus/metodos-para-la-deteccion-e-inactivacion-de-anisakis-simplex-2007/> [Consultado 27-05-2025]
- Gil, M., Brandao, T. y Silva, C. (2006). "A modified Gompertz model to predict microbial inactivation under time-varying temperature conditions". *Journal of Food Engineering*, 76 (1), pp. 89-94. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2005.05.017
- González, A.F., Gracia, J., Miniño, I., Romón, J., Larsson, C., Maroto, J., Regueira, M. y Pascual, S. (2018). "Approach to reduce the zoonotic parasite load in fish stocks: When science meets technology". *Fisheries Research*, 202, pp. 140–148. DOI: 10.1016/j.fishres.2017.08.016
- Guan, A., Usieto, M., Sánchez- Alonso, I., Arcos, S., Careche, M. y Otero, L. (2023). "Modeling survival curves of Anisakis L3 after isothermal heat treatments at lethal temperatures". *Food Control*, 154, 109975. DOI: 10.1016/j.foodcont.2023.109975
- Latorre, A. (2025). *Inactivación de anisakis en vísceras y despojos de pescado con pulsos eléctricos de alto voltaje*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.
- Rahmati, A.R., Kiani, B., Afshari, A., Moghaddas, E., Williams, M. y Shamsi, S. (2020). "World-wide prevalence of Anisakis larvae in fish and its relationship to human allergic anisakiasis: a systematic review". *Parasitology research*, 119(11), pp. 3585–3594. DOI: 10.1007/s00436-020-06892-0
- Rapid Alert System for Food and Feed (2023). *The RASFF Window*. Bruselas: European Commission. Disponible en: <https://webgate.ec.europa.eu/rasff-window/screen/search> Consultado [28-05-2025]
- Raso, J., Frey, W., Ferrari, G., Pataro, G., Knorr, D., Teissie, J. y Miklavčič, D. (2016). "Recommendations guidelines on the key information to be reported in studies of application of

PEF technology in food and biotechnological processes". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, pp. 312–321. DOI: 10.1016/j.ifset.2016.08.003

- Ruiz, A. (2024). *Evaluación del efecto de los Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje en el cocinado a baja temperatura de filetes de merluza*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.
- Onitsuka, C., Nakamura, K., Wang, D., Matsuda, M., Tanaka, R., Inoue, Y., Kuroda, T., Noda, T., Negoro, K y Namihira, T. (2022). "Inactivation of anisakis larva using pulsed power technology and quality evaluation of horse mackerel meat treated with pulsed power". *Fisheries Science*, 88, pp. 337-344. DOI: 10.1007/s12562-022-01593-2
- Ordóñez, J.A. et al. (1987). "Effect of the combined ultrasonic and heat treatment (thermoultrasonication) on the survival of a strain of *Staphylococcus aureus*". *Journal of Dairy Research*, 54, pp. 61-67. DOI: 10.1017/s0022029900025206
- Podolska, M., Pawlikowski, B., Nadolna-Altyn, K., Pawlak, J., Komar-Szymczak, K., & Szostakowska, B. (2019). "How effective is freezing at killing *Anisakis simplex*, *Pseudoterranova krabbei*, and *P. decipiens* larvae? An experimental evaluation of time-temperature conditions". *Parasitology research*, 118(7), pp. 2139–2147. DOI: 10.1007/s00436-019-06339-1
- Purnama, S., Salegue, S., Junaedi, M., Andi, D. (2024). "A bibliometric analysis of ohmic heating on food processing in the last two decades". *Heliyon*, 10 (20), e39315. DOI: 10.1016/j.heliyon.2024.e39315
- Sanz, J. (2018). *Pasteurización de buey de mar (Cancer pagurus) asistida por Pulsos Eléctricos de Alto Voltaje (PEAV)*. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Zaragoza.

Textos legales

- Reglamento (CE) nº 853/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal, *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*, L139, de 30 de abril de 2004
- Real Decreto 1021/2022, de 13 de diciembre, por el que se regulan determinados requisitos en materia de higiene de la producción y comercialización de los productos alimenticios en establecimientos de comercio al por menor. *Boletín Oficial de Estado*, n.305, de 21 de diciembre de 2022