



Facultad de Veterinaria  
**Universidad** Zaragoza



# Trabajo Fin de Grado en Ciencia y Tecnología de los alimentos

"Aplicación de luz UV-C para la descontaminación de carne a temperaturas de congelación"

"Decontamination of meat by UV-C light at freezing temperatures"

Autor/es

Lara María Ariño Catalán

Director/es

Ignacio Álvarez Lantarote y Sebastián Ospina Corral

Facultad de Veterinaria

2022

---

## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN .....</b>	<b>3</b>
1.1. RESUMEN.....	3
1.2. ABSTRACT .....	3
<b>2. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>4</b>
2.1. PRINCIPIOS DE LA TECNOLOGÍA .....	5
2.2. COMPARACIÓN ENTRE LUZ UV Y PUV.....	6
2.3. MECANISMO DE INACTIVACIÓN.....	7
2.4. FACTORES QUE AFECTAN A LA EFICACIA LETAL DE LA LUZ UV-C.....	8
2.4.1. Factores asociados a la matriz alimentaria .....	9
2.4.2. Factores asociados con la contaminación microbiana .....	10
2.4.3. Factores asociados con los parámetros de procesado.....	10
2.5. VENTAJAS Y LIMITACIONES .....	11
2.5.1. Ventajas .....	11
2.5.2. Limitaciones .....	12
2.6. APLICACIONES .....	13
2.7. TRATAMIENTOS UV-C EN CARNE .....	13
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>15</b>
4.1. DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA INSTALACIÓN QUE PERMITA APLICAR LOS TRATAMIENTOS DE LUZ UV-C A TEMPERATURA DE CONGELACIÓN.....	15
4.1.1. Diseño y construcción de la instalación .....	15
4.1.2. Caracterización de la instalación .....	16
4.1.2.1. Irradiancia en la zona de tratamiento .....	16
4.1.2.2. Evolución de la temperatura en la zona de tratamiento .....	17
4.1.2.3. Evolución de la temperatura en la superficie de las muestras de carne .....	18
4.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA DE TRATAMIENTO Y LA DOSIS DE RADIACIÓN UV-C EN LA SUPERVIVENCIA MICROBIANA EN CARNE ENVASADA.....	19
4.2.1. Preparación de las muestras de carne para los tratamientos con UV-C .....	19
4.2.2. Tratamientos de las muestras con UV-C .....	19
4.2.3. Recuperación y recuento de supervivientes .....	20
4.3. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA DE LA CARNE ENVASADA SOMETIDA A TRATAMIENTOS POR LUZ UV-C A TEMPERATURAS DE CONGELACIÓN.....	20
4.3.1. Análisis sensorial .....	21

4.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	22
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>22</b>
5.1.	DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN DE UNA INSTALACIÓN QUE PERMITA APLICAR LOS TRATAMIENTOS DE LUZ UV-C A TEMPERATURA DE CONGELACIÓN.....	23
5.1.1.	Caracterización de la instalación .....	23
5.1.1.1.	Irradiancia en la zona de tratamiento .....	23
5.1.1.2.	Evolución de la temperatura en la zona de tratamiento .....	24
5.1.1.3.	Evolución de la temperatura en la superficie de las muestras de carne .....	26
5.2.	EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA DE TRATAMIENTO Y LA DOSIS DE RADIACIÓN UV-C EN LA SUPERVIVENCIA MICROBIANA EN CARNE ENVASADA.....	29
5.3.	ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA DE LA CARNE ENVASADA SOMETIDA A TRATAMIENTOS POR LUZ UV-C A TEMPERATURAS DE CONGELACIÓN.....	34
5.3.1.	Análisis sensorial .....	36
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>38</b>
6.1.	CONCLUSIONES.....	38
6.2.	CONCLUSIONS .....	39
<b>7.</b>	<b>VALORACIÓN PERSONAL .....</b>	<b>39</b>
<b>8.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>40</b>

## 1. RESUMEN

### 1.1. Resumen

La aplicación de radiaciones no ionizantes, entre ellas la UV-C, es una estrategia que lleva décadas evaluándose para prolongar la vida útil de los alimentos. La radiación UV-C (200 - 280 nm) es considerada la más germicida para la mayoría de los microorganismos, ya que su absorción por parte del ADN microbiano provoca lesiones que pueden ocasionar la muerte celular. Sin embargo, debido a su baja capacidad de penetración, su aplicación en alimentos sólidos se ha centrado en la inactivación superficial de microorganismos. En estos productos, la eficacia letal alcanza alrededor de 1 unidad logarítmica dependiendo del tipo de alimento, pero requiriéndose tratamientos muy prolongados que podrían limitar su aplicación industrial, así como afectar a la calidad del alimento. Es por ello que sería necesario encontrar estrategias que permitieran aplicar estos tratamientos prolongados de cara a su aplicación. Una de ellas sería la del tratamiento de alimentos por luz UV-C durante su almacenamiento en congelación. Sin embargo, apenas hay datos a este respecto en la literatura.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, el objetivo principal de este trabajo fue estudiar la eficacia letal de la luz UV-C a temperaturas de congelación sobre la microbiota natural de un producto cárnico (secreto envasado a vacío). Para valorar la eficacia letal de los tratamientos UV-C sobre este producto, se diseñó y construyó una instalación con 4 lámparas UV-C de mercurio de baja presión, que permite aplicar los tratamientos de luz UV-C a temperatura de congelación sobre porciones pequeñas de secreto de cerdo envasado al vacío. La radiación producida por la instalación ha sido estudiada con el fin de encontrar el punto espacial óptimo (radiación más intensa y uniforme) donde la muestra debe ser tratada, siendo esta la zona central de la instalación. Las muestras fueron sometidas a tratamientos de hasta 10 minutos en esa localización, logrando inactivaciones máximas de alrededor de 1 ciclo logarítmico tras 5 minutos de tratamiento, que resultaron ligeramente más prolongados que los aplicados a temperaturas por encima de los 0°C. Estos tratamientos permitieron prolongar la vida útil de las muestras tratadas hasta 4 días cuando se almacenaron las muestras descongeladas a 4°C. Los resultados obtenidos indican que la aplicación de luz UV-C a temperaturas de congelación sería una estrategia a seguir evaluando para su implementación a escala industrial.

### 1.2. Abstract

Non-ionizing radiation application in food, like UV-C, has been considered for decades as an alternative to preservation by thermal treatments. UV-C radiation (200-280 nm) is considered as the most germicidal for most of the microorganisms, since its absorption by the microbial DNA induces damage that can provoke cell death.

However, due to its low penetration capacity, its application in solid foods has been focused in superficial inactivation of microorganisms. In this kind of products, lethal efficacy reaches around 1 logarithmic unit, depending on the characteristics of the food, but requiring very long treatments that could limit its industrial application and even affect food quality. Therefore, it would be necessary to develop strategies that allow the application of these long treatments without compromising the product. One of them would be the UV-C light treatment of food while it is stored frozen. However, further investigation is needed on this subject.

Regarding all of this, the main objective in this project was to study UV-C lethal efficacy at freezing temperatures on the natural microbiota of a meat product (vacuum packed pork “secreto”). To assess the lethal efficacy of the UV-C treatments on this product, a UV-C facility was designed and built. It had 4 UV-C Low Pressure (LP) mercury lamps, emitting at 254 nm of wavelength. This facility allows to apply UV-C treatments at freezing temperatures on little portions of vacuum-packed pork “secreto”. The radiation produced by the equipment has been studied to find the optimal location (with the most intense a uniform radiation) where the sample must be treated. It was found that the central zone of the equipment recorded the highest radiation. The samples were subjected to up to 10 minutes treatments in the central zone, reaching up to 1 logarithmic unit inactivation after a 5 minute treatment, being slightly longer than the treatments applied at temperatures over 0°C. These treatments allowed to extend the shelf-life of the thawed samples up to 4 days when stored at 4°C. The results indicate that the application of UV-C light at freezing temperatures is a viable strategy that should be further evaluated for its implementation on a large scale.

## 2. INTRODUCCIÓN

Para la industria alimentaria supone todo un reto el poder responder a la demanda de los consumidores que desean adquirir productos mínimamente procesados que mantengan las características del “producto fresco”. Muchas veces, este procesado implica métodos de conservación que permiten garantizar la seguridad sanitaria del producto, extender su vida útil y evitar alteraciones del mismo (Zhang *et al.*, 2019). La industria alimentaria es responsable de suministrar alimentos inocuos que lo sigan siendo durante toda su vida útil. Cuanto mayor sea esta vida útil, más fácil resulta su distribución y, además, se garantizan unos determinados niveles de calidad en el momento de consumo, algo que no siempre ocurre con aquellos productos con una vida útil más reducida porque son más susceptibles al deterioro.

Tradicionalmente, las estrategias de conservación de los alimentos más extendidas han sido la refrigeración, el tratamiento térmico, la deshidratación, la congelación y el uso de aditivos. Sin embargo, presentan inconvenientes como la pérdida de calidad organoléptica, la reducción del

valor nutricional o la obtención de un producto totalmente distinto al original (Heinrich *et al.*, 2015). Por lo tanto, en los últimos años, se propone el uso de nuevas tecnologías como métodos de conservación para alcanzar estos objetivos. Según (Zhang *et al.*, 2019) las nuevas tecnologías de procesamiento tienen como objetivo, además de garantizar la seguridad sanitaria y prolongar la vida útil, llevar a cabo un procesamiento mínimo tratando de preservar la calidad nutricional y organoléptica del producto fresco. Algunas de las tecnologías más prometedoras son las altas presiones hidrostáticas, los ultrasonidos, los campos eléctricos de alto voltaje y la radiación ultravioleta (UV), tecnología evaluada en este trabajo.

En torno a 1930 se comenzó a utilizar la radiación ultravioleta con un propósito germicida aplicando tratamientos de luz UV-C de onda continua (CW UV). Inicialmente, estos tratamientos de UV-C empleaban lámparas de mercurio de baja presión (LP: *Low Pressure*) y, posteriormente, se descubrió que también podían usarse las lámparas de mercurio de media presión (MP) (Gómez-López *et al.*, 2007; Farrell *et al.*, 2010).

En un primer momento, esta tecnología se diseñó para la descontaminación de agua, aire y superficies (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004). Poco después se patentó en Japón la primera tecnología de pulsos de luz UV (PUV), que permitió mejorar los tratamientos en continuo, aumentando su capacidad de penetración (Palmieri y Cacace, 2005) y consiguiendo una mayor inactivación en menor tiempo de tratamiento (Farrell *et al.*, 2010). Esta patente fue comprada por Maxwell Technologies®, lo que resultó en el desarrollo de PureBright®, el primer proceso a escala industrial con PUV diseñado para preservar alimentos (Dunn *et al.*, 1989). A raíz de esta invención, muchas otras empresas se interesaron en esta tecnología y hubo un incremento en las publicaciones científicas basadas en ella (Palmieri y Cacace, 2005). En cualquier caso, las lámparas de baja presión de mercurio siguen siendo fuente de un gran número de publicaciones científicas y de aplicaciones en la industria alimentaria (Gayán *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019), debido en parte a su fácil implementación y coste, en comparación con los PUV.

### **2.1. Principios de la tecnología**

La luz ultravioleta (UV) es una radiación no ionizante que se define como la zona del espectro electromagnético comprendida entre las longitudes de onda de 100 a 400 nm. Dentro de esta franja se distingue la luz UV-A (315-400 nm), la luz UV-B (280-315 nm) y la luz UV-C (200-280 nm). La radiación UV-C, también llamada de onda corta, resulta ser la de mayor efecto germicida ya que corresponde con el pico de absorción UV del ADN bacteriano, entorno a los 260-265 nm (Gómez-López *et al.*, 2007; Gayán *et al.*, 2014; McLeod *et al.*, 2018). La también llamada irradiación UV es una tecnología “limpia”, que no genera subproductos químicos ni efluentes, lo

que reduce los costes derivados de su uso. Gracias a ser un método puramente físico de conservación de alimentos tiene una buena reputación entre los consumidores (Koutchma, 2019). La *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó en el año 2000 el uso de tratamientos UV-C con lámparas de mercurio LP para el control de microbiota en zumos de fruta como alternativa a la pasteurización térmica (Food and Drug Administration, 2000), lo que ha sido un gran respaldo para el desarrollo de esta tecnología, que ya se considera segura para su aplicación en alimentos.

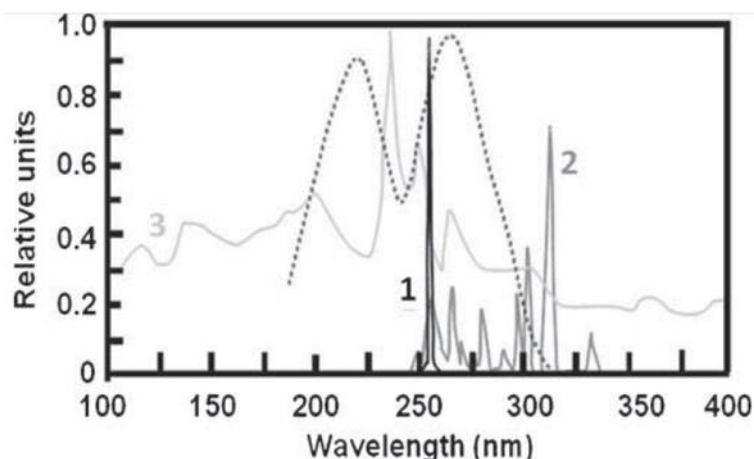
Los tratamientos clásicos con luz UV-C que trabajan en modo continuo (CW UV) se basan en el empleo de luz ultravioleta para lograr un efecto germicida y son un método de conservación no térmico de alimentos (Gómez-López *et al.*, 2007). Las lámparas empleadas en este tipo de tratamientos son de mercurio fundamentalmente LP, ya que emiten de manera continua un 85-95% de su energía a 254nm (Gayán *et al.*, 2014; Manzocco y Nicoli, 2014). También se pueden emplear lámparas de mercurio MP, que emiten en un espectro más amplio, fundamentalmente desde 200 a 400nm (Gómez-López *et al.*, 2007).

Por otro lado, los pulsos de luz UV (PUV), pulsos de luz de alta intensidad (HIP: *High Intensity Pulses*), pulsos UV-C o, simplemente, pulsos de luz (PL) son otro método de conservación de alimentos no térmico que consiste en el uso de pulsos de luz intensos de corta duración, ricos en luz UV-C (Gómez-López *et al.*, 2007). Estos pulsos suelen ser generados mediante una lámpara de xenón, que emite a longitudes de onda de 100 a 1100 nm, incluyendo zonas del espectro como el UV (100-400nm), el visible (400-700nm) y el infrarrojo (700-1100nm) (Oms-Oliu *et al.*, 2010).

## **2.2. Comparación entre luz UV y PUV**

Una de las grandes ventajas que presenta la tecnología de PUV frente a la de UV-C es su mayor potencia radiante (Figura 1). Al hacer uso de pulsos de elevada energía en relación con su duración, se logra la misma inactivación microbiana más rápidamente en comparación con los tratamientos UV-C (Farrell *et al.*, 2010). Además, la tecnología PUV emite un espectro mucho más amplio, lo que potencia el efecto germicida al hacer uso de más mecanismos de inactivación. Sin embargo, se pueden generar otros efectos, como el calentamiento del producto tratado, derivados de otras longitudes de onda aplicadas, lo que puede afectar negativamente al producto (Fan *et al.*, 2017), requiriendo sistemas de refrigeración adicionales. Además, las lámparas de xenón son más sostenibles que las de mercurio empleadas en los tratamientos UV-C, por lo que, desde el punto de vista ambiental, los tratamientos PUV tienen una mayor proyección a largo plazo (Gómez-López *et al.*, 2007). Por el contrario, las instalaciones, las

lámparas y la generación de PUV son mucho más costosas que las empleadas en tratamientos UV-C, lo que limita su aplicación industrial (Heinrich *et al.*, 2015).



**Figura 1.** Comparación de la eficiencia letal relativa de las diferentes longitudes de onda de las lámparas LP (1), MP (2) y lámparas de xenón (3) con la eficacia letal para *E.coli* (línea discontinua). Extraído de Gayán *et al.*, 2014.

Para poder estudiar y comparar resultados de forma adecuada, los tratamientos UV-C deben ser caracterizados de manera detallada. En la Tabla 1, se han resumido los parámetros que se deben definir para poder utilizar adecuadamente esta tecnología:

**Tabla 1.** Parámetros de la radiación de un tratamiento de luz UV y la abreviatura, unidades y definición de cada uno de ellos (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004; Condón *et al.*, 2014; Heinrich *et al.*, 2015).

PARÁMETRO	UNIDADES (SI)	DEFINICIÓN
Potencia radiante (W)	W	Energía emitida por segundo.
Capacidad radiante (P)	W/m <sup>2</sup>	Energía suministrada por la lámpara, expresada por unidad de área de ésta.
Irradiancia (E)	W/m <sup>2</sup>	Energía recibida por la muestra, expresada por unidad de área de ésta.
Tiempo de exposición (t)	s	Duración del tratamiento UV-C aplicado.
Dosis de irradiación (H)	J/m <sup>2</sup>	Energía total recibida por la muestra por unidad de área durante un tiempo de exposición concreto ( $H = E * t$ ).

### 2.3. Mecanismo de inactivación

La luz UV-C es letal para la mayoría de microorganismos ya que produce daños en el ADN, que es la principal molécula diana de este tipo de radiación. Este efecto germicida se asocia fundamentalmente a un efecto fotoquímico, ya que los fotones interactúan con la timina y citosina del material genético y los transforman en dímeros de pirimidina, que interrumpen la transcripción, traducción y replicación del ADN, produciendo la muerte celular (Condón *et al.*, 2014; Koutchma, 2019). Por lo tanto, la aplicación de tratamientos con UV-C sobre los microorganismos puede dar lugar a células muertas, dañadas y viables. Las células dañadas

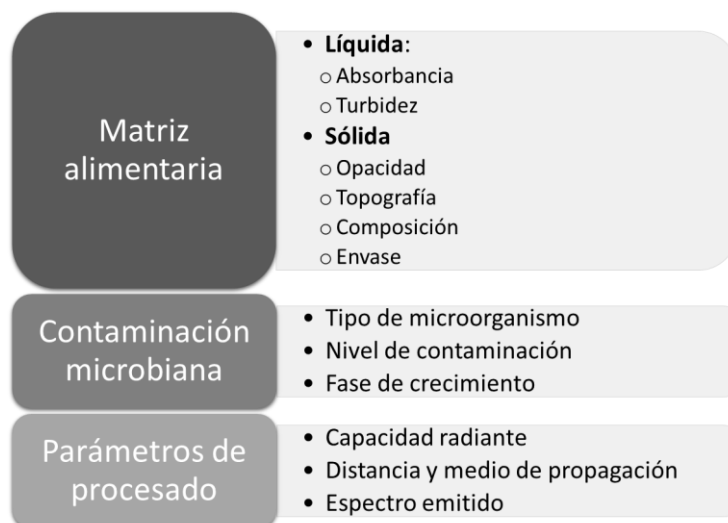


podrían recuperar su viabilidad según las condiciones ambientales y la severidad del daño sufrido (Fan *et al.*, 2017).

En el caso de la luz UV-A y UV-B la generación de foto-productos es menor (Gayán *et al.*, 2014). Existen varios mecanismos enzimáticos en las células capaces de reparar el daño provocado en los ácidos nucleicos. Por lo tanto, los microorganismos son capaces de repararse hasta el punto de retomar la capacidad de multiplicación y, por lo tanto, de ser viables (Heinrich *et al.*, 2015). El mecanismo de reparación más conocido es la foto-reactivación, que se pone en marcha cuando hay una exposición constante a luz visible (Heinrich *et al.*, 2015). La foto-reactivación es importante a tener en cuenta cuando la matriz que ha recibido el tratamiento va a ser expuesta posteriormente a luz visible, como en el caso de la desinfección de agua. Sin embargo, probablemente esto no sea tan problemático en alimentos, ya que suelen ser almacenados y transportados en condiciones de oscuridad, que evitaría la activación de este mecanismo de reparación (Gayán *et al.*, 2014).

#### 2.4. Factores que afectan a la eficacia letal de la luz UV-C

Deben tenerse en cuenta los múltiples factores que afectan en el tratamiento con luz UV-C en términos de eficacia letal sobre los microorganismos. La existencia de los mismos dificulta la estandarización y comparación de tratamientos, sobre todo entre distintas instalaciones, lo que puede suponer una limitación para su implementación industrial. En la Figura 2, se han resumido estos factores:



**Figura 2.** Resumen de los factores que condicionan la aplicación de tratamientos UV-C y su eficacia letal sobre los microorganismos (Gayán *et al.*, 2014; Heinrich *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017).

#### 2.4.1. Factores asociados a la matriz alimentaria

El tipo de matriz alimentaria condiciona la radiación que es absorbida por los microorganismos y, por lo tanto, la que tiene efecto germicida. Cuanta más radiación UV absorba el producto, menor es la radiación restante que incide sobre los microorganismos (Condón *et al.*, 2014). En ese caso, sería necesario suministrar una mayor dosis de irradiación para lograr la inactivación deseada. La absorbancia y la turbidez son los factores de la matriz más relevantes en los alimentos líquidos, ya que afectan a la eficacia letal (Cebrián *et al.*, 2016). Estos resultados son consistentes con la Ley Beer-Lambert-Bourgetts, que describe que la cantidad de luz que penetra en una solución disminuye con el aumento de la absorbancia de la solución (Koutchma, 2019). Por lo tanto, cuanto más turbidez presente el líquido, mayor es el coeficiente de absorción, lo que implica una menor penetración de la luz (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004). El agua, por lo tanto, es la matriz ideal para la aplicación de estos tratamientos. Para otros alimentos con partículas en suspensión, como el vino o la leche, se podrían aplicar estrategias como la de tratar una capa fina de producto, pero esto reduce el volumen de procesado y, por ende, la eficiencia del tratamiento (Oms-Oliu *et al.*, 2010).

En el caso de las matrices sólidas opacas, la capacidad de penetración de la luz UV-C es muy baja, por lo que solo se puede hablar de inactivación microbiana en la superficie del alimento (Heinrich *et al.*, 2016). Además, hay que tener en cuenta que la topografía de la superficie del alimento rara vez es lisa y regular. Normalmente éstos tienden a presentar irregularidades y rugosidades que facilitan la aparición de zonas “de sombra” donde los fotones de luz UV-C no alcanzan a los microorganismos que estuvieran en dichas localizaciones limitando la eficacia de la luz UV-C (Koutchma, 2019). De esta manera, los alimentos considerados como los más adecuados para ser tratados por esta tecnología son las frutas y verduras de superficie lisa como las manzanas, y otros productos como quesos duros, algunos cortes de carne y productos cárnicos, etc. En matrices complejas como las carnes la radiación podría ser absorbida por las proteínas y lípidos, conllevando al descenso de la efectividad de la irradiancia sobre la flora microbiana (Oms-Oliu *et al.*, 2010). Una de las aplicaciones más interesantes para la industria alimentaria sería la aplicación de luz UV-C en productos ya envasados, que no van a ser manipulados posteriormente. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los envases, normalmente de carácter plástico, también pueden absorber parte de la radiación. De la misma manera se debe cuidar que la etiqueta no interfiera con la aplicación del tratamiento (Koutchma, 2019).

#### 2.4.2. Factores asociados con la contaminación microbiana

En cuanto a los factores relacionados con la contaminación microbiana, se observan diferencias en la sensibilidad a los tratamientos UV-C entre distintos géneros, especies e incluso cepas microbianas. En general, las bacterias vegetativas son las más sensibles, seguidas de levaduras, esporos bacterianos, virus y protozoos. Dentro de las bacterias, las Gram+ suelen ser más resistentes que las Gram-, aunque no siempre es así (Gayán *et al.*, 2014; Koutchma, 2019). (Cebrián *et al.*, 2016) concluyeron que el desarrollo de resistencias ocurre con mayor frecuencia en los tratamientos térmicos que en los métodos de conservación no térmicos. Sin embargo, la información disponible todavía es limitada.

Por otro lado, la eficacia letal disminuye a niveles altos de contaminación microbiana debido a que los microorganismos tienden a aglomerarse y a apilarse. Por lo tanto, sólo los microorganismos de la capa más superficial reciben una dosis de radiación suficiente para ser inactivados, y forman una barrera que protege a los de las capas inferiores de los fotones de luz UV-C de modo similar a lo que se ha explicado con las zonas “de sombra” (Gómez-López *et al.*, 2007). También, la fase de crecimiento puede influir en su susceptibilidad a la luz UV-C. Gayán *et al.*, (2014) consideran que la resistencia de los microorganismos incrementa al avanzar la fase exponencial hasta alcanzar el máximo en la fase estacionaria. Por lo tanto, para obtener resultados óptimos, interesa que la carga microbiana del alimento sea baja y el tratamiento se lleve a cabo lo más pronto posible tras la obtención del producto.

#### 2.4.3. Factores asociados con los parámetros de procesado

Los parámetros de procesado más importantes que afectan a la resistencia microbiana a la luz UV-C son la capacidad radiante, la distancia y medio de propagación y el espectro de emisión. La capacidad radiante de la lámpara depende del propio equipo. Es muy importante diferenciar entre capacidad radiante e irradiancia (Tabla 1) y que la energía emitida por la lámpara no es la misma que la recibida por la muestra, ya que está condicionada por la distancia y el medio de propagación (Gómez-López *et al.*, 2007).

En general, la distancia de la muestra con respecto a la lámpara UV-C afecta a la incidencia de la energía, por lo que la irradiancia es mayor cuanto menor es la distancia entre la lámpara y la muestra, tal y como describe la ley de Beer-Lamber-Bourgetts (Gómez-López *et al.*, 2007). Además, la posición y orientación de las lámparas también afecta, alcanzándose una mayor inactivación en muestras pequeñas colocadas para recibir radiación directa y uniforme de la lámpara (Koutchma, 2019). También se debe evitar la acumulación de partículas o suciedad en las lámparas y en la superficie a tratar para evitar que actúan de barrera y protejan a los microorganismos.

La eficacia letal también depende del espectro emitido por la lámpara. Como ya se ha comentado, las lámparas de mercurio LP emiten un 85-95% de su radiación a una longitud de onda de 254 nm (Gayán *et al.*, 2014; Manzocco y Nicoli, 2014), muy próxima al pico de absorción del ADN (260 a 265nm), por lo que se le atribuye mayor efecto germicida. Se debe tener en cuenta que la temperatura óptima de emisión de las lámparas LP a 254 nm es de 40°C (Koutchma, 2019). Por otro lado, las lámparas de mercurio MP emiten un espectro más amplio (200-400nm), pero tan solo el 20% de la radiación se emite a 254 nm. A pesar de esta diferencia, el efecto germicida de ambos tipos de lámpara es muy similar. Esto se debe a que el espectro más amplio de emisión compensa el menor porcentaje de UV-C (Gayán *et al.*, 2014). Sin embargo, existe una diferencia significativa, y es que las lámparas LP no inactivan el sistema de foto-reactivación microbiano, mientras que las lámparas MP y las de xenón sí que lo hacen (Heinrich *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2017).

## **2.5. Ventajas y limitaciones**

### **2.5.1. Ventajas**

La ventaja principal de los tratamientos con luz UV-C es que son un método de conservación no térmico, lo que permite aumentar la vida útil de los alimentos sin alterar su calidad nutricional ni organoléptica de manera significativa en términos de efecto térmico (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004). Al ser un método de inactivación fundamentalmente físico no produce subproductos indeseables que pudieran modificar las características sensoriales del producto final. Además, tampoco genera residuos químicos ni radioactivos (Oms-Oliu *et al.*, 2010).

Desde el punto de vista tecnológico, es una tecnología fácilmente combinable con otros métodos de conservación como, por ejemplo, tratamientos térmicos, atmósferas modificadas, altas presiones hidrostáticas, sustancias químicas con efecto antimicrobiano y refrigeración y congelación. Estas combinaciones pueden producir efectos sinérgicos letales muy interesantes (Heinrich *et al.*, 2015). Gracias a la versatilidad de esta tecnología, se puede esperar un aumento de sus aplicaciones. Gouma *et al.*, (2020) comprobaron que la combinación simultánea de radiación UV y calor (50-60°C) aumentó el efecto germicida de ambas tecnologías al aplicarlas a zumos vegetales y caldos de carne. Sin embargo, este efecto sólo se produce hasta cierta temperatura, alcanzada la cual, la eficacia letal del calor predomina sobre la de la combinación de tecnologías. Por otro lado, poder aplicar tratamientos a un producto ya envasado evita riesgos de contaminación cruzada (Heinrich *et al.*, 2015). Además, el uso de películas plásticas permeables a la luz UV-C podría disminuir la pérdida de humedad y la consiguiente deshidratación del producto durante el tratamiento (Manzocco y Nicoli, 2014).

Las instalaciones de luz UV-C requieren poco espacio físico y, económicamente, los costes de operación son bajos y la eficiencia energética es elevada (Heinrich *et al.*, 2015). Tampoco supone un incremento de la carga de trabajo para el operario (McLeod *et al.*, 2018) ya que es fácil de usar, aunque se deben tomar algunas medidas de seguridad como evitar la exposición directa y eliminar el ozono generado (Gómez-López *et al.*, 2007). Además, se pueden aplicar estos tratamientos en medio acuoso, introduciendo las lámparas en tubos de cuarzo impermeables (Manzocco y Nicoli, 2014). En este sentido, la FDA aprobó la aplicación de luz UV-C en alimentos en el año 2000 y, desde entonces, tanto el consumidor como la industria sienten una mayor confianza ante esta tecnología. A nivel europeo, los tratamientos UV-C no requieren autorización específica de acuerdo con el Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo relativo a nuevos alimentos. Esto es una gran ventaja ya que facilita la implantación a escala industrial.

### 2.5.2. Limitaciones

Una de las limitaciones de la luz UV-C es su baja capacidad de penetración, por lo que su uso se reduce a la inactivación de la microbiota superficial en el caso de los alimentos sólidos (Manzocco y Nicoli, 2014). La radiación no es efectiva en alimentos con una topografía irregular que presente poros o cavidades, ya que se generan sombras en partes del producto en las que no incide la radiación y, por lo tanto, no se produce inactivación microbiana. En definitiva, no todos los alimentos son adecuados, y el uso de esta tecnología está muy restringido a ciertas situaciones y condiciones operativas (Heinrich *et al.*, 2015).

Si bien es una tecnología no térmica, puede producirse el calentamiento de las muestras sólidas originado por el funcionamiento de las lámparas de UV-C, que se incrementa en tratamientos muy prolongados (Gómez-López *et al.*, 2007). Este calentamiento se produce especialmente en cámaras de tratamiento pequeñas, donde el aire que rodea a la muestra se calienta con facilidad (Manzocco y Nicoli, 2014). Este aumento de temperatura debe controlarse para evitar el detrimento en la calidad organoléptica y/o nutricional del producto antes de alcanzar la inactivación esperada (Oms-Oliu *et al.*, 2010). Por lo tanto, es importante disponer de sistemas de ventilación eficaces y tiempos de tratamiento reducidos. Como ya se ha indicado, son muchos los factores a controlar y tener en cuenta al aplicar un tratamiento UV-C. Por ello, se debe evaluar cada instalación de manera individual para conocer detalladamente su rendimiento.

Por último, aunque las lámparas de mercurio resultan más económicas que las de xenón, su gestión como residuo es más problemática (Gómez-López *et al.*, 2007) por lo que la tendencia actual es reducir su uso. Una alternativa sería sustituirlas por lámparas que no contengan mercurio como las de xenón (PUV), aunque recientemente se está investigando el uso de Light

Emitting Diodes (LED) que pueden resultar más baratos que la PUV, producir menores calentamientos y combinar LED de distintas longitudes de onda de forma simultánea ampliando el espectro de acción (Hinds *et al.*, 2019). Sin embargo, su eficiencia aún es baja y se sigue investigando su aplicación.

## 2.6. Aplicaciones

Como ya se ha indicado, el uso más extendido de los tratamientos UV-C es la desinfección de aire, superficies y agua (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004); en este último caso, la luz UV-C es una alternativa viable al cloro para la desinfección de agua (Li *et al.*, 2017). Además, están muy asociados al sector sanitario, donde la desinfección de materiales y aire es indispensable. Ello se debe a que el efecto germicida es elevado debido a que se dan condiciones ideales (superficies lisas, constantes, sin componentes que absorban la radiación, etc.). Así por ejemplo, con dosis de entre 0,2 y 0,4 J/cm<sup>2</sup> se han conseguido reducir hasta 5 u.log (Manzocco y Nicoli, 2014). Además, esta tecnología representa una alternativa al uso de peróxido de hidrógeno, cuyos residuos no son aceptables en alimentos (Palmieri y Cacace, 2005). En esta misma línea, en la industria alimentaria la luz UV-C se utiliza para desinfectar superficies, utensilios, equipos, ambientes, envases y embalajes pero, sobre todo, se está investigando para reducir la carga microbiana en la superficie de los alimentos (Gayán *et al.*, 2014). Como ya se ha mencionado, la eficacia letal en alimentos sólidos es escasa debido a que son opacos y presentan superficies irregulares y componentes que absorben la radiación UV-C (Koutchma, 2019). Por lo tanto, las reducciones microbianas suelen estar en torno a 1 unidad logarítmica (u. log.) requiriéndose dosis que varían entre 0,5 y 13 J/cm<sup>2</sup> (Chun *et al.*, 2010; Degala *et al.*, 2018; Corrêa *et al.*, 2020). Para aumentar el efecto germicida, serían necesarios mayores tiempos de tratamiento, lo que limitaría la aplicación industrial y podría disminuir la calidad del producto.

## 2.7. Tratamientos UV-C en carne

El término “carne fresca” se refiere a la “carne que no ha sido sometida a procesos de conservación distintos de la refrigeración, la congelación o la ultracongelación, incluida la carne envasada al vacío o envasada en atmósfera controlada” (Reglamento (CE) 853/2004). Debido a su composición nutricional, la carne es una matriz alimentaria ideal para permitir la proliferación microbiana y la propagación de microorganismos alterantes y patógenos (Zhou *et al.*, 2010). Esto hace que su conservación dependa principalmente de una higiene en la manipulación y del mantenimiento adecuado de la cadena de frío durante el procesado, almacenamiento y distribución, ya que no puede ser sometida a tratamientos térmicos de conservación que alterarían sus características de frescura (Heinrich *et al.*, 2015). Por estas razones, se deben

buscar nuevos métodos de conservación que controlen la microbiota de la carne fresca sin modificar sus propiedades, entre las que se han propuesto altas presiones hidrostáticas, envases activos, luz UV, etc. (Zhou *et al.*, 2010); Heinrich *et al.*, 2015).

Como la carne es un alimento sólido opaco, la capacidad de penetración de la radiación UV-C es prácticamente nula, por lo que la inactivación microbiana se centrará en la superficie (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004). Sin embargo, esto no supone un problema en el caso de la carne fresca ya que, como el interior no ha sido manipulado, puede considerarse prácticamente estéril al inicio de su vida útil (Heinrich *et al.*, 2015). La especie, el corte, la topografía y la composición superficial son variables y pueden condicionar la eficacia del tratamiento. Se deben tener en cuenta algunas alteraciones percibidas tras la aplicación de tratamientos intensos, como un olor a quemado en las muestras (Guerrero-Beltrán y Barbosa-Cánovas, 2004; McLeod *et al.*, 2018). Esta tecnología también podría aplicarse en productos cárnicos listos para el consumo, donde la calidad higiénica es fundamental (Koutchma, 2019). Son numerosos los estudios de la luz UV-C para la descontaminación superficial de carnes como pollo, cerdo y ternera, en los que se han determinado niveles de inactivación de alrededor de 1 unidad logarítmica. Keklik *et al.* (2010) trataron pollo envasado con pulsos de luz con dosis de entre 1 y 22 J/cm<sup>2</sup>. Este aumento en la dosis puede explicarse por la presencia del plástico de envasado y porque tan solo una parte de la irradiancia aplicada corresponde a UV-C. La mayoría de estos datos corresponden a tratamiento a temperaturas de refrigeración, pero no existen datos sobre la eficacia letal en carne, envasada y sin envasar, a temperaturas de congelación.

### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

En la actualidad, los métodos de conservación que más se utilizan para preservar la carne fresca son el almacenamiento a temperaturas de refrigeración o congelación combinado con el envasado al vacío o en atmósferas modificadas. Estas estrategias ralentizan, o limitan en el caso de la congelación, el crecimiento de la microbiota naturalmente presente en la carne durante su almacenamiento. Sin embargo, es necesario encontrar nuevas estrategias para limitar aún más este crecimiento microbiano y aumentar la vida útil de la carne manteniendo su calidad y propiedades sensoriales.

Con este fin, el tratamiento de carne fresca con radiación UV-C podría ser un buen aliado en la industria, ya que se ha demostrado su capacidad para la inactivación de microorganismos (hasta 1 ciclo logarítmico), permitiendo alargar su conservación sin disminuir su calidad. Sin embargo, los tratamientos descritos en la literatura requieren largos periodos (de varios minutos) de exposición que podrían limitar su aplicación industrial. De ahí el interés en buscar estrategias que permitan aplicar dichos tratamientos prolongados. Una de estas posibilidades sería la del

tratamiento de carne que se almacenase o se comercializara en congelación, pero apenas existen datos de la aplicación de la tecnología UV-C a temperaturas de congelación. Además, el desarrollo de plásticos permeables a la luz UV-C, ofrece la ventaja adicional de aplicar los tratamientos en el producto envasado, evitando problemas de descontaminación. No obstante, no hay datos en la literatura a este respecto del efecto de la luz UV-C para la inactivación microbiana de productos envasados a temperaturas de congelación.

Por todas estas razones, el objetivo principal que se plantea es evaluar el potencial de los tratamientos de luz UV-C a temperaturas de congelación para incrementar la vida útil de la carne envasada.

Para abordar este objetivo general, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

- **Objetivo 1:** Diseñar y caracterizar una instalación que permita aplicar los tratamientos de luz UV-C a temperaturas de congelación.
- **Objetivo 2:** Determinar la influencia de la temperatura y la dosis de radiación UV-C en la supervivencia microbiana en carne envasada, tanto refrigerada como congelada.
- **Objetivo 3:** Estudiar la evolución de la microbiota de la carne envasada sometida a tratamientos de descontaminación por luz UV-C a temperaturas de congelación.

#### 4. METODOLOGÍA

##### 4.1. Diseño y caracterización de una instalación que permita aplicar los tratamientos de luz UV-C a temperatura de congelación

###### 4.1.1. Diseño y construcción de la instalación

Se diseñó y construyó una instalación con 4 lámparas de mercurio de baja presión, LP (VL-206G, Vilber Lourmat, París, Francia) con un pico de emisión en 254 nm (Figura 3).

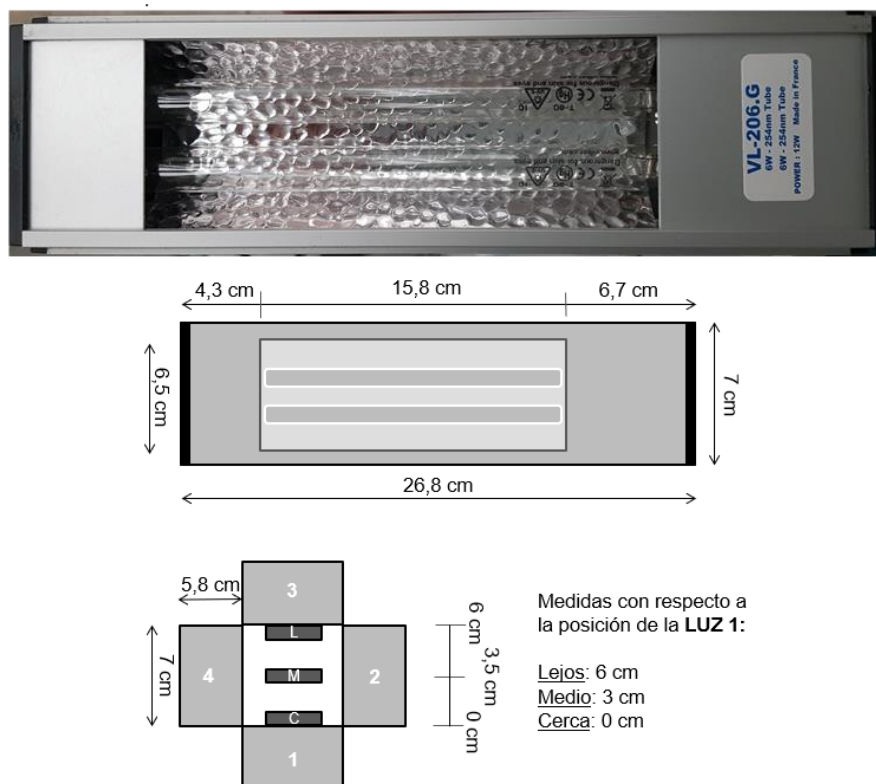


**Figura 3.** Instalación para la aplicación de tratamientos de luz UV-C a temperaturas de congelación. Congelador de 40 L de capacidad (izquierda). Lámparas en el interior del congelador (centro). Detalle de la instalación (derecha).

Cada lámpara cuenta con dos tubos T-C6 (Vilber Lourmat, París, Francia) de 6W cada uno, un reflector para optimizar la radiación UV y una carcasa de aluminio (Figura 4, arriba y centro).



Estas lámparas (numeradas del 1 al 4) se dispusieron en vertical, orientadas hacia el mismo punto, y se fijaron a una superficie formando un espacio interno de forma cuadrangular cuyas dimensiones se muestran en la Figura 4 (abajo). De esta manera, toda la radiación se dirige hacia el centro del cuadrado, que es la zona en la que se introducen las muestras de carne envasadas para ser tratadas. Las muestras quedan suspendidas en la zona de tratamiento a una altura determinada y de manera estable gracias a un soporte del que cuelga la muestra con un hilo de sedal. Así, todas las superficies de las muestras están expuestas a la radiación UV-C.



**Figura 4.** Detalle de una lámpara UV-C de baja presión (LP) vista frontalmente (arriba) y esquema y dimensiones de la misma (centro). Esquema y dimensiones de la zona de tratamiento desde una vista superior (abajo).

#### 4.1.2. Caracterización de la instalación

##### 4.1.2.1. Irradiancia en la zona de tratamiento

Previamente a la realización de los experimentos, se llevó a cabo la caracterización de la instalación, para lo que se estudió la influencia de la localización de la muestra en la irradiancia (expresada en  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ), es decir, en la dosis de radiación UV-C que recibiría la muestra. Dicho de otra manera, se evaluó el efecto de la distancia del producto a irradiar respecto a la fuente de radiación con el fin de encontrar el área en la que la irradiancia fuera elevada y uniforme y, por lo tanto, la más indicada para tratar las muestras. Para ello, se tomaron medidas de dosimetría, con todas las lámparas encendidas, introduciendo un radiómetro UVX Radiometer 97-0015-02 (Analytik Jena US, Upland, EE.UU.) (Figura 5, izquierda) en la zona de tratamiento a

diferentes alturas (0-16 cm) y a tres distancias de las lámparas (Cerca: 0 cm, Medio: 3 cm y Lejos: 6 cm) según se muestra en la Figura 4 (abajo) y en la Figura 5 (centro izquierda, centro derecha y derecha).



**Figura 5.** Medida de la irradiancia a diferentes alturas y distancias de las lámparas en el equipo UV-C en congelación. Radiómetro UVX con sonda (izquierda), soporte para sujetar la sonda en la posición deseada (centro izquierda), vista frontal (centro derecha) y superior (derecha) de la instalación durante la medida a diferentes alturas.

Debido a que la sonda utilizada para medir la irradiancia tiene un rango óptimo de medida de 0 a 40°C, para evitar el enfriamiento de la sonda y asegurar una correcta lectura al hacer las medidas a temperaturas de congelación, la sonda se introdujo en la instalación justo en el momento de hacer la medición, se registraba la irradiancia y se retiraba del congelador. Para la siguiente medida, se dejaba atemperar a temperatura ambiente hasta la siguiente medición, procediendo de la misma forma.

Como consecuencia al funcionamiento de la lámpara se produce un calentamiento en la zona de tratamiento, por lo que las mediciones de irradiancia se realizaron una vez que la temperatura de la zona de tratamiento se había estabilizado, como se presentará más adelante.

#### *4.1.2.2. Evolución de la temperatura en la zona de tratamiento*

La temperatura de la zona de tratamiento aumenta debido al funcionamiento de las lámparas de luz UV-C. Por lo tanto, fue necesario estudiar la evolución de la temperatura y evaluar los efectos que esto podría tener sobre las muestras al trabajar a temperaturas de congelación. Además, es necesario saber en qué momento la temperatura deja de aumentar y se estabiliza en cada temperatura de tratamiento para conseguir la máxima repetitividad en las condiciones de tratamiento y para evaluar el efecto de la luz UV-C a una temperatura concreta y lo más constante posible. Además, podría haber variaciones de la irradiancia de las lámparas en función de la temperatura, como ya se ha indicado en la introducción.

Para registrar esta variación de temperatura, se introdujo una sonda de temperatura tipo termopar K (ALMEMO ZA9220-FS, Ahlborn, Holzkirchen, Alemania) en la zona de tratamiento, lo más centrada posible y a la altura estimada de mayor radiación, según los resultados

obtenidos en el apartado anterior. La sonda de temperatura se conectaba a un sistema de adquisición de datos o *data logger* (ALMEMO 2580, Ahlborn, Holzkirchen, Alemania) y a un ordenador para el registro en continuo de los datos. Estas medidas se tomaron por triplicado. Una vez ubicada la sonda, se encendían las 4 luces UV-C y se realizaba la medición de la temperatura a intervalos de 5 segundos. Con el fin de comparar resultados, también se hizo un estudio de la evolución de la temperatura de la zona de tratamiento en una instalación similar a la anterior disponible en el grupo de investigación, pero instalada en un laboratorio a temperatura ambiente y en el interior de una cámara de refrigeración.

#### *4.1.2.3. Evolución de la temperatura en la superficie de las muestras de carne*

Con el fin de registrar la evolución de la temperatura en las distintas pruebas realizadas, se introdujeron dos sondas termopar, conectadas a un *data logger*. Una de ellas en la capa más exterior de las muestras de piezas de carne refrigerada y congelada, para registrar la temperatura superficial, y otra en el centro de la muestra, en ambos casos, en muestras envasadas. Para estas medidas, las muestras se introducían en la zona de tratamiento con luz UV-C una vez que la temperatura de la zona se había estabilizado (alrededor de las 2 h como se mostrará posteriormente).

Este tipo de estudios se realizó en muestras de carne refrigerada y congelada tratada en la instalación descrita a temperaturas de congelación y, a modo comparativo y cuando se indica, en la instalación a temperatura ambiente y en la ubicada en la cámara de refrigeración. Así, se realizaron estudios de evolución de la temperatura de la carne refrigerada (4°C) y congelada (-18°C) en instalaciones que estaban a temperatura ambiente (25°C), en refrigeración (4°C) y en congelación (-18°C).

Debido a que, tras los tratamientos con UV-C, se observó la aparición de pequeños coágulos en el exudado que dejaba la carne envasada y que este efecto podría estar asociado a un aumento de la temperatura de la muestra, fue necesario realizar sendos estudios específicos al respecto con el fin de determinar si las temperaturas que alcanzaba la muestra en los tratamientos UV-C producían dicha coagulación o a un efecto combinado de la luz UV-C y la temperatura. Por una parte, se envasó parte del exudado de las muestras de carne con el mismo material y metodología que se describe a continuación para el envasado de las muestras de carne. Las muestras de exudado se incubaron por duplicado a diferentes temperaturas (4, 10, 15, 20, 25 y 37°C) y se monitorizaron a lo largo del tiempo para comprobar el momento de aparición de coágulos. Las muestras a 4°C se almacenaron en una cámara de refrigeración. Se utilizaron estufas de incubación de laboratorio estándar de convección natural programadas a 10, 15, 20, 25 y 37°C (Raypa Trade, Barcelona, España).

Por otra parte, se monitorizó la aparición de coágulos al someter la carne a tratamientos con UV-C de diferente duración. Para ello, realizando un registro de temperaturas de las muestras de carne con exudado de forma similar a como se ha explicado para la carne, se trataron en el equipo de UV-C a temperatura ambiente y a temperaturas de congelación, evaluando visualmente la aparición o no de coágulos apreciables en las muestras tras distintos tiempos de tratamiento.

#### **4.2. Evaluación del efecto de la temperatura de tratamiento y la dosis de radiación UV-C en la supervivencia microbiana en carne envasada**

##### **4.2.1. Preparación de las muestras de carne para los tratamientos con UV-C**

La materia prima utilizada en este proyecto fue secreto de cerdo envasado al vacío y refrigerado suministrado por la empresa Naturuel (Teruel, España). Las piezas de carne envasadas al vacío (Figura 6, izquierda) fueron almacenadas en congelación hasta su uso, o en refrigeración dependiendo del momento de la realización de las pruebas. En el caso de las muestras congeladas, se descongelaron con 24 horas de antelación en una cámara de refrigeración a 4°C, se cortaron en piezas magras de 10 g en condiciones lo más estériles posible (todo el material utilizado se desinfectó con isopropanol y el corte se realizó al lado de una llama) y posteriormente se envasaron a vacío. Resultados preliminares, no mostraron diferencias ni en los recuentos de la microbiota presente en la carne antes y después de descongelar, ni en la letalidad y resistencia de la microbiota a tratamientos con luz UV-C.

Como material de envasado se emplearon bolsas de vacío COEX PA15/PE60 (Papeles El Carmen, Pamplona, España), que constan de dos capas coextruidas, una de poliamida y otra de polietileno, y un gramaje de 146 g/m<sup>2</sup>. Se determinó experimentalmente que la transmitancia de este material a la radiación UV era del  $83 \pm 1,4\%$  (Playán, 2021). El envasado se realizó con una envasadora a vacío EV13 (Tecnotrip, Tarrasa, España). Las muestras envasadas se almacenaron en refrigeración o en congelación para su posterior tratamiento en la instalación UV-C.

##### **4.2.2. Tratamientos de las muestras con UV-C**

Las muestras de carne envasadas se sometieron a tratamientos UV-C en la zona óptima de tratamiento establecida para los equipos a temperaturas de -18 y 25°C (Figura 6, derecha), durante distintos tiempos de tratamiento (de 1 a 5 min.).

Como se ha indicado, con el fin de determinar el efecto de la temperatura de la muestra, estas se trataban cuando estaban refrigeradas o congeladas. Cada experimento se realizó al menos por duplicado y los controles no tratados se almacenaron en las mismas condiciones que el resto de muestras hasta el día de la siembra.



**Figura 6.** Muestra de secreto de cerdo envasada al vacío (izquierda) y detalle de la instalación con la muestra en la zona de tratamiento (derecha).

#### 4.2.3. Recuperación y recuento de supervivientes

Las muestras tratadas y los controles se extraían de las bolsas en las que estaban envasadas en condiciones de esterilidad (próximas a una llama) y se homogeneizaban en agua de peptona tamponada estéril (APT, Oxoid, Madrid, España) en proporción 1/10 (m/v) durante 1 minuto a 230 rpm en un homogeneizador Stomacher®400 Circulator (Seward, Worthing, Reino Unido) utilizando bolsas estériles de Stomacher VWR® Blender bag de 400 mL con filtro (VWR, Radnor, EE.UU.). Tras la homogeneización, el líquido filtrado se vertía en un bote estéril y esta dilución era empleada para sembrar o para preparar nuevas diluciones en APT. Las diluciones obtenidas se sembrarán en masa en el medio de cultivo *Agar Triptona Soja* (TSA, Oxoid, Madrid, España) adicionado con un 0,6% (p/v) de extracto de levadura (YE, Oxoid, Madrid, España). El TSA se preparaba con anterioridad a su uso según las instrucciones del fabricante, añadiendo el extracto de levadura en el momento de la preparación. Una vez solidificado el agar, las placas se llevaban a incubar a 37°C en una estufa bacteriológica (Incubig-TFT, J.P. Selecta, Barcelona, España) durante 24-48 horas en condiciones de aerobiosis. Resultados preliminares (Playán, 2021) mostraron que los recuentos de aerobios mesófilos totales (los detectados con la técnica empleada) coincidían con los de los psicrótrofos. Tras la incubación, se llevaba a cabo el recuento de las colonias de las placas con un analizador de imagen (Image Analyzer Automatic Colony Counter, Protos, Synoptics, Cambridge, Reino Unido).

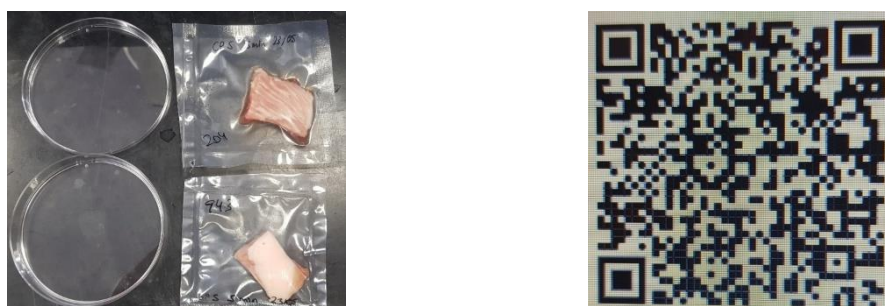
#### 4.3. Estudio de la evolución de la microbiota de la carne envasada sometida a tratamientos por luz UV-C a temperaturas de congelación

Una vez determinadas las condiciones óptimas de tratamiento de las muestras de carne envasadas en el equipo UV-C en congelación, se llevó a cabo un estudio microbiológico de la carne, tratada y sin tratar, a lo largo de su almacenamiento en refrigeración. Se realizaron dos experimentos: uno con muestras refrigeradas y otro con muestras congeladas, ambas tratadas en el equipo en congelación. Se eligieron al azar 48 muestras de carne envasadas a vacío, que

previamente se habían almacenado en congelación. 24 horas antes de iniciar el experimento con las muestras refrigeradas, éstas se descongelaron a temperaturas de 4°C en una cámara de refrigeración. Para ambos casos, se planificaron 8 puntos de control (día 0, 5, 8, 10, 13, 15, 17 y 21) en los que se realizó un análisis microbiológico de las muestras de forma similar a como se ha explicado analizando la microbiota aerobia total. Se guardaron 16 muestras en refrigeración (2 controles por cada día de análisis), 16 muestras (muestras por duplicado para cada día) se trataron durante 2,5 minutos y otras 16 (muestras por duplicado para cada día) se trataron durante 5 minutos. El día de tratamiento (día 0) se realizó la siembra de 6 muestras: 2 controles, 2 tratadas durante 2,5 minutos y otras 2 tratadas durante 5 minutos. Cada uno de los días anteriormente citados se realizó la siembra de otras 6 muestras (2 controles, 2 de 2,5 min y 2 de 5 min). Con el fin de hacer una primera valoración sensorial, para todas las muestras, control y procesadas, se anotaron las diferencias observadas en el aspecto, color y olor.

#### 4.3.1. Análisis sensorial

Se realizó una sencilla valoración sensorial de la carne para comprobar el posible impacto de los tratamientos aplicados sobre las propiedades organolépticas de las muestras. Se trataron 12 muestras de carne envasadas a vacío durante 5 minutos en la instalación a temperaturas de congelación y otras 12 muestras sin envasar en las mismas condiciones, que se envasaron (en condiciones aerobias) tras el tratamiento. Las muestras se almacenaron a 4°C durante 11 días. Pasado este tiempo, se reunió a un panel de 8 consumidores a los que se les proporcionó una muestra de cada tipo, una placa de Petri para depositar la muestra (Figura 7, izquierda) y un código QR para acceder al formulario (Figura 7, derecha).



**Figura 7.** Muestras y material proporcionado a cada consumidor para la realización del análisis sensorial de la carne (izquierda). Código QR de acceso al formulario para la realización de la cata (derecha).

El objetivo fue que los consumidores encuestados valoraran las diferencias percibidas en el aroma de las dos muestras recién abierto el envase y al cabo de 2 y 5 minutos en la placa de Petri (en una escala del 1 al 5, siendo 1 “poco intenso” y 5 “muy intenso”). Además, se les solicitó que describieran a qué les recordaba el aroma, si era agradable o no (en una escala del 1 al 5,

siendo 1 “desagradable” y 5 “agradable”) y si comprarían y/o consumirían el producto si tuviera ese aroma. Además de este análisis sensorial del aroma, el panel de consumidores valoró el sabor de las muestras una vez cocinadas. Para ello, 4 muestras tratadas con envase y 4 muestras tratadas sin envase se envolvieron en papel de aluminio y se cocinaron en una plancha hasta que el interior de las mismas llegó a 70°C. Para monitorizar esta temperatura, se colocó una sonda termopar conectada a un *data logger* en una de las muestras. Una vez cocinada, el panel de expertos valoró el aroma y el sabor al sacarlas del papel de aluminio y se volvió a valorar tras 5 minutos para comprobar si se percibían diferencias.

#### **4.4. Análisis estadístico**

Los resultados fueron representados utilizando el software Origin® 2021 (OriginLab Corporation, Northampton, EEUU). Todos los resultados de inactivación microbiana se sometieron a un análisis estadístico con el fin de determinar diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos. Para ello, se realizaron análisis de varianza (One-way ANOVA) con los valores de las variables cuantitativas trabajadas en este estudio y comparación por pares de Tukey de comparaciones múltiples fueron utilizadas para conocer las diferencias en la inactivación entre los distintos tratamientos con un nivel de significancia del 95% de confianza, empleando para ello el programa GraphPad PRISM® 8 (GraphPad Software).

En las gráficas de los resultados, se han representado las desviaciones estándar mediante barras verticales y, donde se indica, la media de los valores con una línea resaltada y los intervalos de confianza (95%) mediante un sombreado que abarca desde la línea de la media hacia arriba y hacia abajo.

### **5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

En este trabajo, debido a que no se disponía de una instalación para el tratamiento por luz UV-C de alimentos a temperaturas de congelación, fue necesario diseñar y construir una instalación específica, lo que supuso un enorme esfuerzo metodológico en su puesta a punto. De ahí que una parte importante del trabajo se centre en ello. Además, debido a que al utilizar lámparas de luz UV-C de baja presión (LP) se genera calor, y el trabajo versa sobre el efecto de la temperatura en la eficacia letal de la luz UV-C, esta puesta a punto y caracterización de la instalación cobró más importancia. En una segunda parte, una vez caracterizada la instalación, se evaluó la eficacia letal de los tratamientos a temperaturas de congelación. Con el fin de comparar resultados, se realizaron pruebas a temperaturas ambiente y en refrigeración de muestras refrigeradas y congeladas.

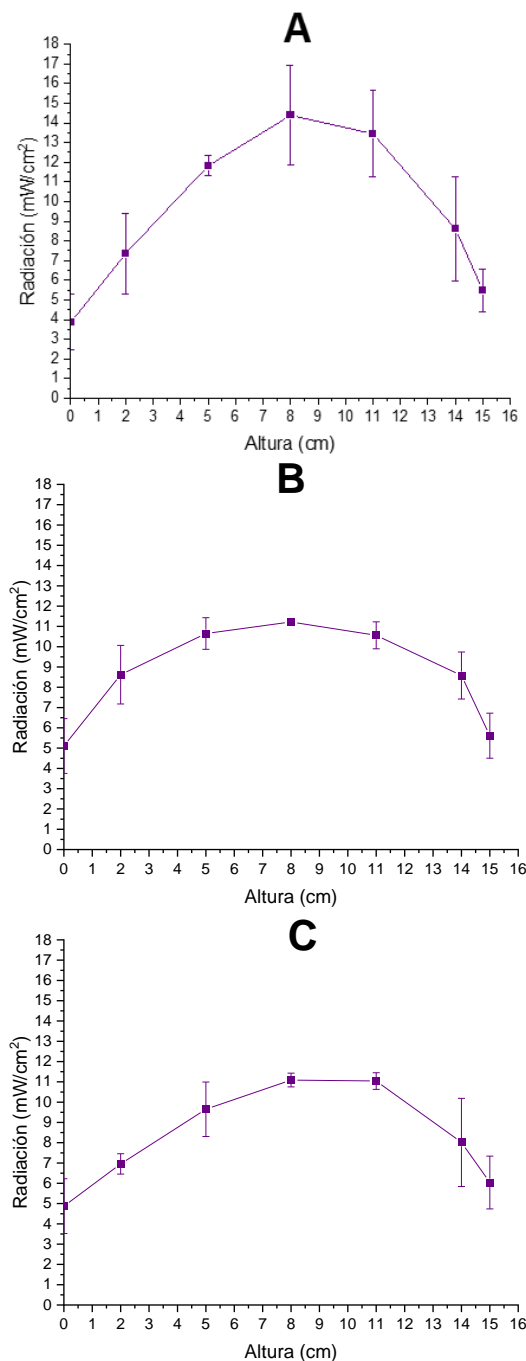


## 5.1. Diseño y caracterización de una instalación que permita aplicar los tratamientos de luz UV-C a temperatura de congelación

### 5.1.1. Caracterización de la instalación

#### 5.1.1.1. Irradiancia en la zona de tratamiento

La Figura 8 muestra la medida de la irradiancia de las lámparas del equipo UV-C en congelación a diferentes alturas y posiciones con respecto a cada lámpara.



**Figura 8.** Medidas de irradiancia (expresada como  $\text{mW}/\text{cm}^2$ ) en la instalación en congelación para cada altura (de 0 a 16 cm) y en las tres posiciones diferentes con respecto a cada lámpara (A. Cerca: 0 cm, B. Medio: 3 cm y C. Lejos: 6 cm).



Como se observa en todas las posiciones, la medida de la irradiancia es mayor en el intervalo de entre 5 y 12 cm de altura. En la zona cercana, se determinaron los mayores valores siendo entre 11 y 17 mW/cm<sup>2</sup> aunque la variación de irradiancia fue la más elevada. En la zona media y alejada, la máxima irradiancia también se da a alturas comprendidas entre 5 y 12 cm, pero en estos casos la dosis es menor que en la zona más cercana (entre 9,6 y 11,2 mW/cm<sup>2</sup>).

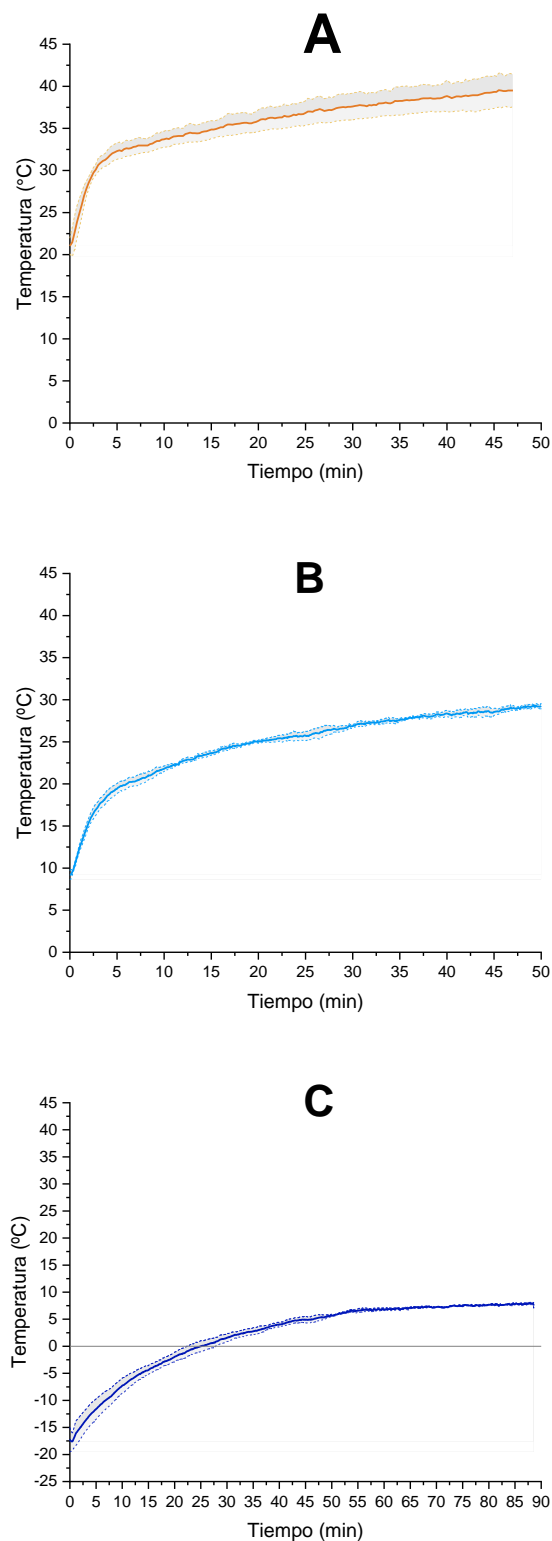
En base a los datos medidos, la zona que presenta las condiciones de radiación más uniformes es la que se encuentra a una distancia media de las lámparas y a una altura de entre 5 y 12 cm. En esta zona la irradiancia es de  $10,9 \pm 0,3$  mW/cm<sup>2</sup>. Por lo tanto, esta fue la zona elegida para colocar las muestras y llevar a cabo los tratamientos en la instalación UV-C en congelación.

#### *5.1.1.2. Evolución de la temperatura en la zona de tratamiento*

Para decidir cuál es el momento óptimo en el que se deben introducir las muestras para ser tratadas, se debe conocer cuándo estabiliza la temperatura en cada equipo. En la Figura 9, puede observarse la variación de la temperatura en la zona de tratamiento de los equipos de UV-C a diferentes temperaturas.

A temperatura ambiente, se observa que la temperatura empieza a estabilizarse tras  $30 \pm 10$  minutos con las lámparas encendidas. La variación de temperatura está condicionada por efectos poco controlables como la temperatura ambiente, el flujo de aire dentro de la cámara y el tiempo que tardan las luces en estabilizarse, el cual también es variable.

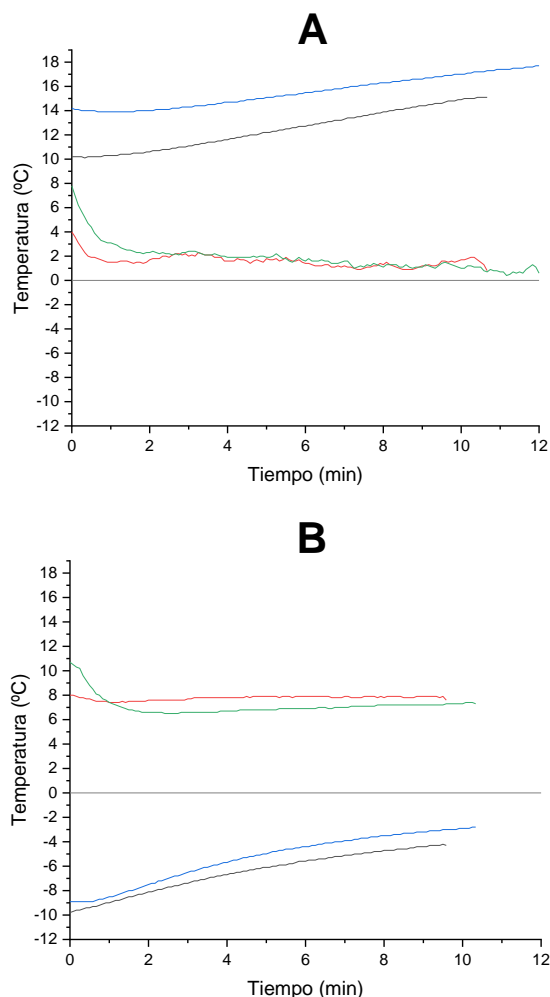
A temperatura de refrigeración, el aumento de la temperatura fue menor que en el equipo a temperatura ambiente. La temperatura de la zona de tratamiento se estabilizó a  $40 \pm 10$  minutos. En el equipo a temperaturas de congelación, se observa una estabilización de la temperatura tras  $50 \pm 10$  minutos de tratamiento determinándose que tras 90 minutos, ninguna de las réplicas superó los 10°C. Esta variación de temperatura indicaba la importancia de disponer de un buen sistema de ventilación en un equipo o instalación de UV-C, sobre todo a temperatura ambiente y en refrigeración, ya que contrarresta el aumento de temperatura producido en la zona de tratamiento durante el funcionamiento de las lámparas por lo que, consecuentemente, la temperatura de la muestra y los efectos derivados de ésta también serían menores.



**Figura 9.** Evolución de la temperatura en la zona de tratamiento en los equipos de UV-C a temperatura ambiente, en refrigeración y en congelación desde el encendido de las lámparas. Se ha representado la media y el intervalo de confianza (95%).

### 5.1.1.3. Evolución de la temperatura en la superficie de las muestras de carne

La Figura 10 muestra, a modo de ejemplo, la temperatura de la superficie de la carne refrigerada y congelada y del aire de la cámara de tratamiento UV-C en congelación durante los tratamientos de UV-C. Como se observa, la muestra refrigerada incrementó unos 4°C tras 10 minutos, mientras que la muestra congelada, el aumento de temperatura fue de unos 6°C en el mismo periodo de tratamientos, pero en ningún caso, llegó a descongelarse.



**Figura 10.** Evolución de la temperatura en la zona de tratamiento (rojo y verde) y en la superficie (negro y azul) de muestras de carne refrigeradas (A) y congeladas (B) al ser sometidas a un tratamiento con UV-C de 10 minutos de duración en la instalación a temperaturas de congelación.

La Tabla 2 recoge los incrementos de temperatura en todas las condiciones evaluadas, variando desde los 13,5°C en la muestra refrigerada tratada en una instalación a temperatura ambiente hasta los 3,8°C de la muestra refrigerada tratada en congelación. Como se observa, el salto térmico de las muestras refrigeradas fue mayor en el equipo a temperatura ambiente que en el de refrigeración y a temperaturas de congelación. Lo mismo ocurrió si se compara la evolución de las muestras congeladas en las tres instalaciones. Por otro lado, si comparamos entre ambas

muestras de cada instalación, las muestras refrigeradas sufrieron un mayor aumento de temperatura en 10 minutos que las muestras congeladas en la instalación a temperatura ambiente y en refrigeración. Sin embargo, en el equipo a temperaturas de congelación se observa que fue al contrario; las muestras congeladas aumentaron de temperatura más rápidamente que las refrigeradas. Aunque a priori esto parece contradictorio, puede explicarse en base a que, a la misma temperatura de la zona de tratamiento, la diferencia de temperatura (salto térmico) es mayor en las muestras congeladas que en las refrigeradas, por lo que la transferencia de calor es mayor en las de menor temperatura, que se calientan con mayor rapidez.

**Tabla 2.** Incremento de la temperatura registrado en las muestras, refrigeradas y congeladas, tratadas durante 10 minutos en las diferentes instalaciones UV-C.

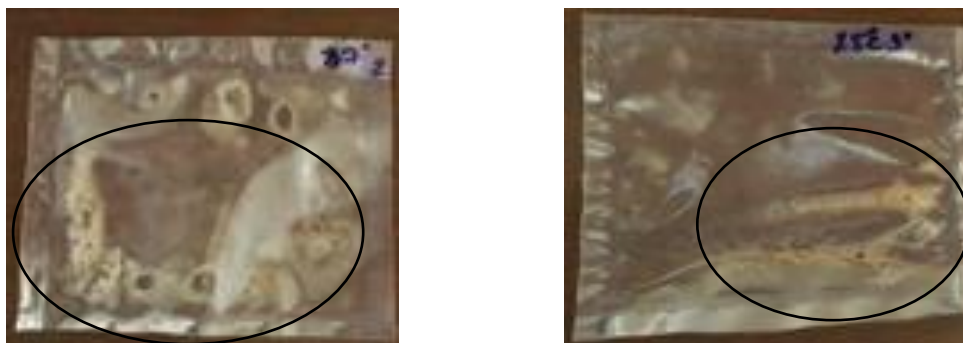
INSTALACIÓN UV-C	MUESTRAS	$\Delta T^a$ en 10 minutos (°C)
<b>Tª Ambiente (25°C)</b>	<b>Refrigeradas</b>	13,5 ± 0,3
	<b>Congeladas</b>	10 ± 0,2
<b>Tª Refrigeración (4°C)</b>	<b>Refrigeradas</b>	10,8 ± 0,2
	<b>Congeladas</b>	6,7 ± 0,5
<b>Tª Congelación (-18°C)</b>	<b>Refrigeradas</b>	3,8 ± 1,5
	<b>Congeladas</b>	5,6 ± 0,3

Todo lo anterior indica que al trabajar a temperaturas de congelación se puede controlar mejor el aumento de temperatura de la superficie de la muestra, lo que beneficia al mantenimiento de la calidad de la carne tratada.

Al realizar estos estudios, se observó en las muestras tratadas a temperatura ambiente la aparición de pequeños coágulos en el exudado existente dentro del envase. Esto condujo a evaluar el posible efecto de las temperaturas alcanzadas, por si eran responsables de la aparición de los mismos o si se debía a un efecto combinado de la luz UV-C y las temperaturas alcanzadas. Así, y como ya se ha indicado anteriormente, se llevaron a cabo dos experimentos, uno para evaluar el efecto solo del calor y otro para el efecto combinado.

En cuanto al efecto del calor, se evaluó la aparición de coágulos en el exudado envasado en bolsitas y almacenadas a 37, 25, 20, 15 y 10°C. Se observó que a 37°C los coágulos aparecieron tras 48 horas de incubación (Figura 11, izquierda), mientras que a 25°C aparecieron tras 120 horas (5 días) (Figura 11, derecha) y no se detectaron tras 408 horas (17 días) a 20°C ni a temperaturas más bajas. La detección de coágulos en los tratamientos de luz UV-C en tiempos de alrededor de 10 minutos, indicaría que la aparición de coágulos sería causada por un efecto combinado de la temperatura y los tratamientos con luz UV-C, dado que el tiempo necesario

para que aparezcan coágulos por efecto de la temperatura es muy superior al tiempo de los tratamientos aplicados.



**Figura 11.** Aparición de coágulos en el exudado tras 2 días almacenado a 37°C (izquierda) y tras 5 días a 25°C (derecha).

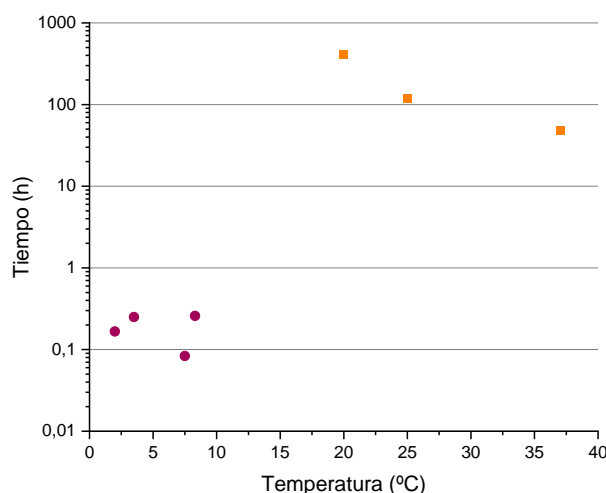
Para confirmar esto, en el segundo experimento se evaluó la aparición de coágulos cada minuto de tratamiento en las distintas condiciones investigadas. Así, se observó una aparición de coágulos tras 5 minutos de tratamiento con UV-C en la muestra refrigerada a temperatura ambiente (Figura 12, izquierda), en la muestra congelada, tras 15,5 minutos (Figura 12, derecha). En ese momento la sonda de la superficie de la muestra marcaba 8,3°C. En la instalación a temperaturas de congelación, aparecieron muy pocos coágulos tras 10 minutos de tratamiento en las muestras refrigeradas y nunca se detectaron tras 10 minutos de tratamiento de las muestras congeladas.



**Figura 12.** Detalle de los coágulos aparecidos en los envases de las muestras de carne tratada con UV-C en el equipo a temperatura ambiente. Carne refrigerada (izquierda) y carne congelada (derecha).

Con el fin de comparar los resultados de ambas pruebas, la Figura 13 muestra los tiempos y temperaturas a los que se detectó la aparición de coágulos independientemente del tratamiento aplicado: los cuadrados naranjas muestran los resultados de la primera prueba con efecto solo del calor y los círculos morados los del efecto combinado.

Como se observa, cuando solo se aplicó calor, para que en unos 10 minutos aparecieran coágulos la temperatura debería ser superior a los 35°C. Sin embargo, al aplicar luz UV-C, cuando la carne tiene una temperatura de unos 2-3°C se detectan coágulos en pocos minutos.



**Figura 13.** Comparación del momento de aparición de los coágulos en las muestras de exudado almacenadas en estufas a diferentes temperaturas (■) y en las muestras de carne tratadas con UV-C (●).

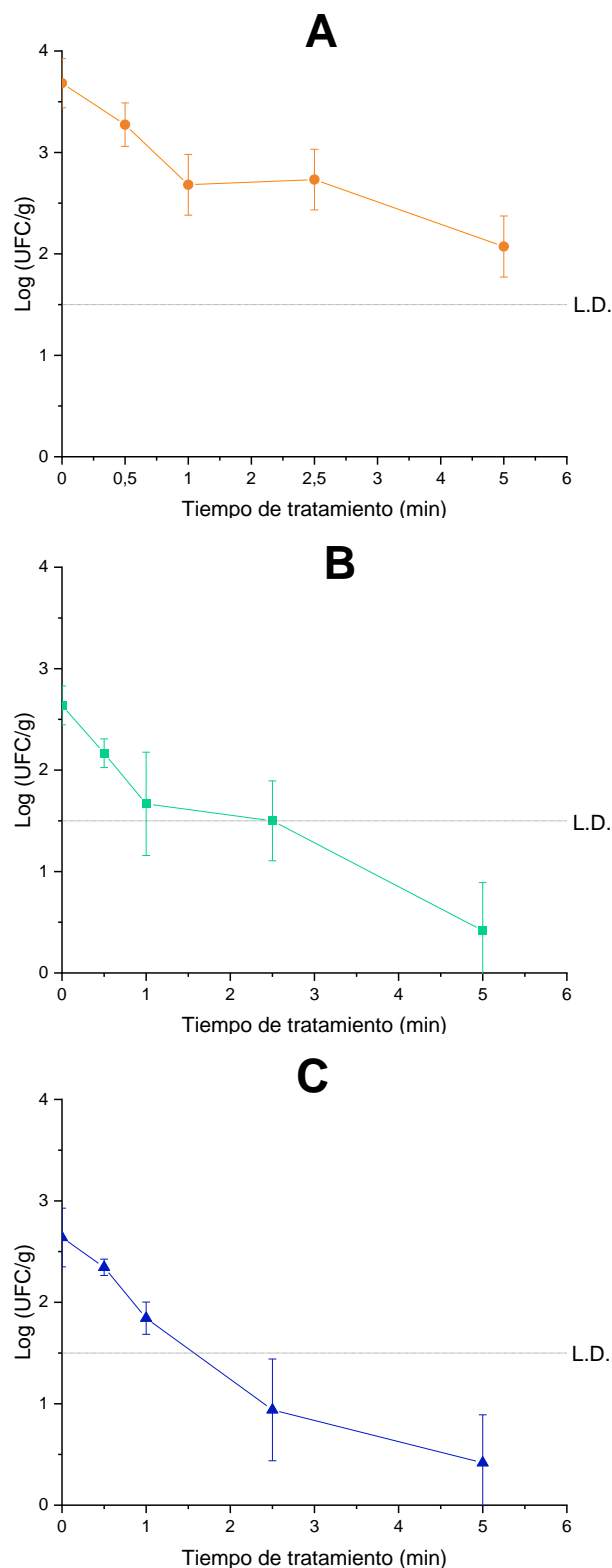
A la vista de los datos anteriores, se puede concluir que los coágulos son una consecuencia del efecto combinado de temperatura y radiación. Su aparición se retrasa cuando se trabaja a temperaturas de refrigeración y se inhibe a temperaturas de congelación.

Por lo tanto, el control de la temperatura de la muestra durante el tratamiento con UV-C es imprescindible para mantener la calidad organoléptica de la carne fresca. Este control será mayor si la temperatura inicial de las muestras es lo más baja posible y el tratamiento con UV-C se hace en un ambiente frío y ventilado para contrarrestar el aumento de temperatura generado por las lámparas. En cualquier caso, cuando las muestras están congeladas y se tratan a temperaturas de congelación, se evitaría la aparición de los coágulos.

## 5.2. Evaluación del efecto de la temperatura de tratamiento y la dosis de radiación UV-C en la supervivencia microbiana en carne envasada

La Figura 14 muestra las gráficas de inactivación de la microbiota aerobia mesófila presente en la carne refrigerada (A y B) y congelada (C) tras distintos tiempos de tratamiento a temperatura ambiente (A) y en congelación (B y C). Como se observa, en todos los casos se consiguió un nivel de inactivación entre 1 y 2 unidades logarítmicas, obteniéndose recuentos inferiores al límite de detección en el caso de los tratamientos B y C debido a que la concentración inicial fue más baja (A:  $5 \times 10^3$  UFC/g; B y C:  $5 \times 10^2$  UFC/g). En el caso de la carne tratada a temperatura ambiente (A) tras un tratamiento de 1 minuto ( $0,39 \text{ J/cm}^2$ ) se redujo la carga 1 unidad logarítmica, y tras 5 minutos ( $1,96 \text{ J/cm}^2$ ), 1,5 unidades logarítmicas. Corrêa *et al.* (2020) observaron un nivel similar de reducción microbiana (*Escherichia coli*) en carne de cerdo de  $1,6 \pm 0,4 \text{ log UFC/mL}$  tras 10 minutos de exposición. Keklik *et al.* (2010) trataron pechugas de pollo deshuesadas

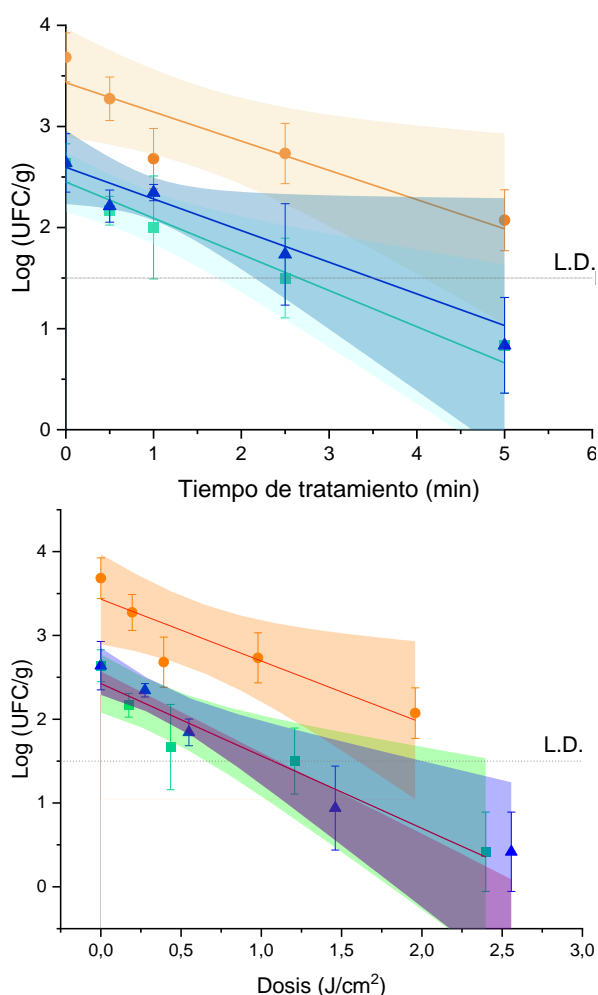
envasadas a vacío durante 30 segundos a 5 cm de la fuente radiante, reduciendo alrededor de 2 unidades logarítmicas ( $\approx 99\%$ ) de *Salmonella* Typhimurium.



**Figura 14.** Inactivación de aerobios mesófilos. A: Muestras de carne refrigerada tratada en el equipo UV-C a temperatura ambiente (●). B: Muestras de carne refrigerada tratada en el equipo UV-C en congelación (■). C: Muestras de carne congelada tratada en el equipo UV-C en congelación (▲). L.D.: Límite de Detección.

En el caso de la instalación a temperaturas de congelación (B y C), en las dos muestras, el tratamiento de 30 segundos ( $0,17-0,27 \text{ J/cm}^2$ ) dio lugar a una reducción de 0,5 unidades logarítmicas, y de 1 reducción logarítmica tras 1 minuto ( $0,44-0,55 \text{ J/cm}^2$ ). Sin embargo, en el tratamiento de 2,5 minutos ( $1,21-1,46 \text{ J/cm}^2$ ) se observó una inactivación mayor, de entre 1 y 1,5 unidades logarítmicas para la carne refrigerada y congelada, respectivamente. El tratamiento de 5 minutos ( $2,40-2,56 \text{ J/cm}^2$ ) fue el que registró la mayor letalidad, situando los recuentos por debajo del límite de detección (1,5 unidades logarítmicas), lo que se traduce en una reducción mayor a 1,5 unidades logarítmicas en cada caso.

Con el fin de comparar con mayor precisión los resultados, los datos de la Figura 14 se han representado en la misma gráfica en base al tiempo (Figura 15, arriba) y energía de tratamiento (Figura 15, abajo).



**Figura 15.** Comparación de la inactivación de la microbiota aerobia mesófila a diferentes temperaturas mediante UV-C con respecto al tiempo (arriba) y según la dosis de radiación aplicada (abajo). Muestras de carne refrigerada tratada a temperatura ambiente (●) y en congelación (■) y muestras de carne congelada tratada en congelación (▲). L.D.: Límite de Detección.



Como se observa, en los 3 casos la cinética de muerte pudo ser descrita por una exponencial, permitiendo determinar la pendiente de las rectas obtenidas, así como el parámetro  $D_{UV}$  (dosis de luz UV-C a aplicar para reducir la población microbiana 1 unidad logarítmica) que las caracteriza. Este valor se ha usado como modelo de inactivación bacteriana dado que puede ser extrapolado a un proceso industrial (Pérez-Chabela *et al.*, 2016). En la literatura, se han descrito cinéticas de inactivación tanto lineales como no lineales describiéndose para ello el modelo de “Weibull” o modelos exponencia (McLeod *et al.*, 2018). En este estudio, ambos modelos eran válidos (datos no mostrados), pero se decidió simplificar el proceso y utilizar la cinética exponencial. Así, en la Tabla 3, se muestran los coeficientes de determinación ( $R^2$ ) de las regresiones aplicadas, las pendientes de las ecuaciones obtenidas y los valores  $D_{UV}$  a las diferentes temperaturas, calculados a partir de la inversa de la pendiente de las ecuaciones de las rectas de inactivación obtenidas. Como se observa, aunque las pendientes y los valores  $D_{UV}$  fueron algo mayores y menores, respectivamente, a temperaturas de congelación, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas ni entre las pendientes de las tres rectas ni en los valores  $D_{UV}$ . Es decir, que la eficacia letal de los tratamientos no estaba influenciada por la temperatura de tratamiento. Por lo tanto, la muerte de los microorganismos por UV-C podría considerarse independiente de la temperatura a la que estuvieran las muestras, en la instalación a temperatura ambiente o en congelación.

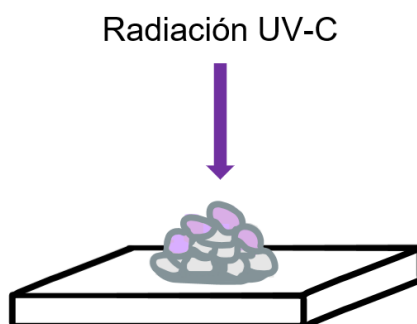
**Tabla 3.** Ecuación de las rectas, pendiente y  $D_{UV}$  de la inactivación microbiana conseguida con los tratamientos UV-C en el equipo a temperatura ambiente y a temperaturas de congelación ( $p < 0,05$ ).

EQUIPO		$R^2$	Pendiente	$D_{UV}$ (J/cm <sup>2</sup> )
Tª Ambiente		0,83	-0,74 ± 0,19 <sup>a</sup>	1,41 ± 0,38 <sup>a</sup>
Tª Congelación	Muestra refrigerada	0,89	-0,86 ± 0,17 <sup>a</sup>	1,19 ± 0,24 <sup>a</sup>
	Muestra congelada	0,92	-0,97 ± 0,16 <sup>a</sup>	1,05 ± 0,18 <sup>a</sup>

Como ya se ha comentado, el efecto de la radiación UV-C depende, entre otros factores, de la topografía de la superficie del alimento y de la interacción de los microorganismos en esta superficie (Koutchma, 2008). La inactivación bacteriana de la luz UV-C, por lo tanto, es dependiente de la matriz del alimento (Millán Villarroel *et al.*, 2015). Así, en los alimentos que presentan una superficie plana y lisa están generalmente asociados a una mayor eficacia letal de la luz UV-C, en cambio, en aquellos con intensa rugosidad en su superficie, se espera que las sombras presentes en ésta sirvan como un escudo protector para los microorganismos presentes en ellas, reduciendo la eficacia letal del tratamiento.

El efecto sombra no solo puede producirse por una superficie rugosa o irregular, sino que el número de microorganismos presentes en la matriz también afecta. Los microorganismos de la

capa superior que consiguen inactivarse con la UV-C no desaparecen, sino que sus restos celulares se apilan en la superficie del alimento protegiendo a los microorganismos de las capas inferiores de la incidencia de la radiación y, por lo tanto, la eficacia letal disminuye (Figura 16). Gracias a que la carga microbiana inicial de las muestras objeto de este estudio era baja, no se produjo o fue limitado el llamado “efecto sombra” (Figura 16), por lo que la radiación habría incidido de manera uniforme en la superficie del alimento produciendo la inactivación microbiana de manera eficaz.



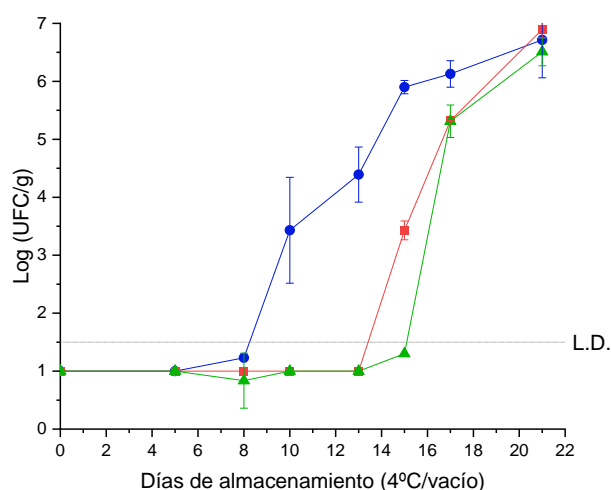
**Figura 16.** Esquema del posible “efecto sombra” creado por la acumulación de microorganismos y restos celulares en la superficie de la carne (color azul), que previene a la radiación UV-C de inactivar a los microorganismos de las capas más inferiores (color gris), disminuyendo la eficacia letal.

Se debe indicar que como parte de este trabajo no se llevó a cabo una evaluación específica del impacto de los tratamientos en la calidad organoléptica de la carne para verificar un posible deterioro de la misma. Sin embargo, sensorialmente no se percibieron alteraciones en las muestras salvo un olor a “quemado” en los tratamientos de 2,5 y 5 minutos, siendo más perceptible en los tratamientos más largos, inmediatamente tras la aplicación de los tratamientos. Esta alteración ya ha sido descrita previamente, indicando que en el producto ya cocinado no es notable y que mantiene la calidad esperada del producto no tratado (McLeod *et al.*, 2018).

En cuanto al color de la carne de cerdo, que está asociado a los niveles de las diferentes formas redox de la mioglobina y es un parámetro que condiciona la decisión de compra del consumidor, (Reichel *et al.*, 2019) evaluaron los niveles de mioglobina en carne de cerdo a lo largo de 14 días y no detectaron diferencias estadísticamente significativas entre la muestra control y la sometida a un tratamiento UV-C de 2,04 J/cm<sup>2</sup>. Tampoco detectaron cambios significativos en cuanto al pH. Según todos estos resultados, los tratamientos de hasta 5 minutos aplicados en este TFG permitirían una inactivación de 1-1,5 unidades logarítmicas de la microbiota de la carne sin alterar la calidad organoléptica del producto.

### 5.3. Estudio de la evolución de la microbiota de la carne envasada sometida a tratamientos por luz UV-C a temperaturas de congelación

En la Figura 17 puede apreciarse la evolución del crecimiento de la microbiota aerobia mesófila en muestras de carne envasadas al vacío almacenadas en refrigeración (4°C) tratadas en la instalación UV-C a temperaturas de congelación durante 2,5 y 5 minutos. A modo de comparación, también se muestra la evolución de las muestras control no tratadas. La carga microbiana inicial fue menor a 1,5 unidades logarítmicas, que era el Límite de Detección (L.D.) determinado.



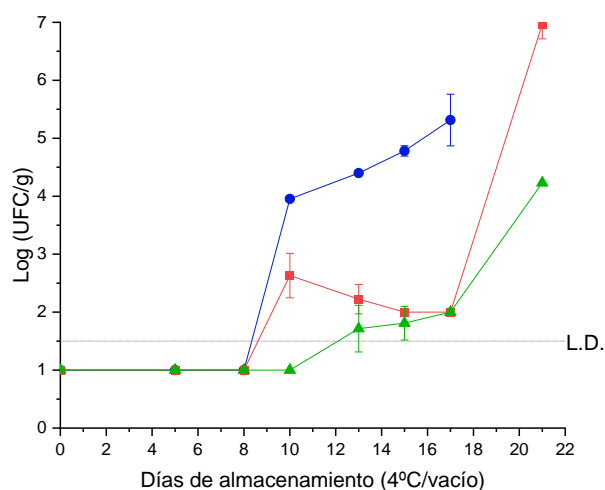
**Figura 17.** Evolución del crecimiento de aerobios mesófilos en muestras de carne (refrigeradas y envasadas al vacío) tratadas con UV-C en el día 0 y almacenadas en refrigeración durante 21 días. Control (●), tratamiento de 2,5 minutos (■) y tratamiento de 5 minutos (▲). L.D.: Límite de Detección.

Como se observa, se puede considerar que hasta el día 8 el crecimiento microbiano estuvo controlado, ya que ni los controles ni las muestras tratadas superaron el L.D. Hasta este día no se apreciaron cambios de aspecto significativos ni en el color, ni en el aumento de exudado, ni hubo un olor desagradable al extraer las muestras de su envase antes de proceder con el análisis microbiológico. A partir del día 8 se produjo un crecimiento exponencial de las muestras control, que alcanzaron 6 unidades logarítmicas el día 15. Las muestras tratadas durante 2,5 minutos se mantuvieron por debajo del L.D. hasta el día 13 (5 días más que el control) y a partir de este día, hubo un crecimiento exponencial de la microbiota. En las muestras tratadas durante 5 minutos no fue hasta el día 15 de almacenamiento cuando se observó este crecimiento exponencial. Ambas muestras tratadas alcanzaron 5,5 unidades logarítmicas el día 17. En el último día de almacenamiento (21) las tres muestras superaban las 6 unidades logarítmicas de aerobios mesófilos.

A partir del día 8 es cuando se apreciaron cambios de aspecto en las muestras control: oscurecimiento, aumento de la cantidad de exudado y cambio de color de rosa a rojo-

amarillento. También se notó un olor desagradable en las muestras control, que fue aumentando con el tiempo de almacenamiento, coincidiendo con el aumento de carga microbiana. De nuevo, y tal y como se ha descrito en el apartado 5.2.2., las muestras tratadas durante 2,5 y 5 minutos presentaban un olor a “quemado”, siendo más persistente en las tratadas durante más tiempo.

Algunos autores han descrito que la carne presenta un olor desagradable cuando la microbiota superficial alcanza  $10^7$  UFC/cm<sup>2</sup>, y que se vuelve pegajosa cuando el nivel es de  $10^8$  UFC/cm<sup>2</sup> (McLeod *et al.*, 2018). En este caso, se ha decidido que cuando los recuentos en placa superan 6 unidades logarítmicas, la carne está alterada y finaliza su vida útil. Según los resultados obtenidos, la aplicación de tratamientos de luz UV-C podría permitir prolongar entre 5 y 7 días la vida útil de las muestras tratadas en refrigeración, resultados similares a los descritos en la literatura para muestras envasadas a vacío (Chun *et al.*, 2010).



**Figura 18.** Evolución del crecimiento de aerobios mesófilos en muestras de carne (congeladas y envasadas al vacío) tratadas con UV-C en el día 0 y almacenadas en refrigeración durante 21 días. Control (●), tratamiento de 2,5 minutos (■) y tratamiento de 5 minutos (▲). L.D.: Límite de Detección.

De forma análoga a la anterior, se estudió la evolución de la microbiota en refrigeración de muestras de carne congeladas envasadas a vacío tratadas con UV-C (0, 2,5 y 5 minutos) a temperatura de congelación (Figura 18). Como se observa, la carga microbiana inicial fue, como en el caso anterior, menor a 1,5 unidades logarítmicas (L.D.).

De nuevo, hasta el día 8 ninguna de las muestras superó el L.D. ni presentó cambios en su aspecto, en el color, en el exudado, ni en el olor. Tal y como ocurrió en el caso anterior, a partir del día 8 en las muestras control se produjo un crecimiento exponencial de aerobios mesófilos que otorgaron a las muestras cambios en su aspecto (oscurecimiento, aumento de la cantidad y cambio del color del exudado) y aparición de un olor desagradable al abrir el envase.

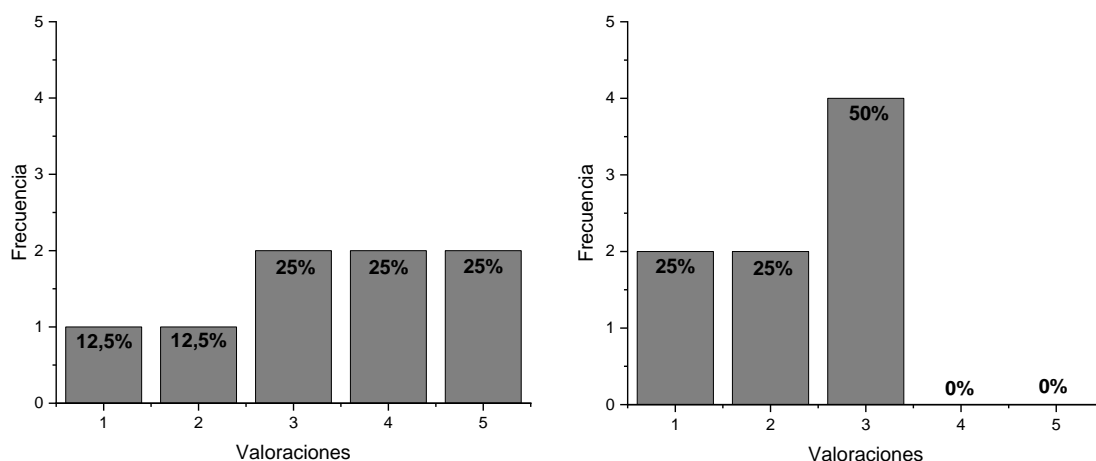
Las muestras tratadas durante 2,5 minutos sufrieron un crecimiento rápido a partir del día 8, pero la carga microbiana se mantuvo más de 1,5 unidades logarítmicas por debajo de los controles. Tanto éstas últimas como las muestras que habían recibido 5 minutos de radiación UV-C se mantuvieron por debajo de 3 unidades logarítmicas de carga microbiana hasta el día 17. En el día 21 tanto los controles como las muestras tratadas durante 2,5 minutos superaron las 6 unidades logarítmicas, mientras que las tratadas 5 minutos se mantuvieron en un nivel de 4. Pese a lo anterior, a partir del día 10 las muestras con tratamiento UV-C presentaron un ligero olor a quemado, que se fue acentuando conforme pasaban los días de almacenamiento. El color de las muestras se fue oscureciendo y el exudado fue aumentando y cambiando de color a amarillo en la parte más alejada de la muestra y rojo en la zona más interna del envase. A priori, podría considerarse que este es un resultado menos favorable que el anterior ya que las muestras tratadas vieron incrementada su carga microbiana a partir del día 8 (en vez del día 13), aunque se mantuvo controlada hasta prácticamente el día 17 de almacenamiento. El incremento observado a partir del día 8 en las muestras tratadas podría deberse a que al tratar las muestras congeladas, haya conseguido sobrevivir algún microorganismo que ha visto favorecida su multiplicación durante la descongelación y exposición del exudado, dando un primer incremento tras esos 8 días de almacenamiento y que fue exponencial a partir del día 17. Cuando el tratamiento se aplicó a las muestras refrigeradas (Figura 17), sin embargo, también el exudado habría recibido radiación, lo que podría ser más eficaz para inactivar todos los microorganismos presentes. En cualquier caso, el tratamiento de las muestras congeladas habría permitido prolongar la vida útil hasta los 17 días, 9 más que en las muestras refrigeradas. Son necesarios más experimentos para validar los resultados. En cualquier caso, según los resultados obtenidos, una aplicación práctica interesante sería la de tratar las muestras congeladas a temperaturas de congelación con luz UV-C (5 minutos, o una dosis de  $2,5 \text{ J/cm}^2$ ) y, cuando se descongelasen, dar un nuevo tratamiento de menor duración (1-2,5 minutos de  $1-1,5 \text{ J/cm}^2$ ) de esta manera, el segundo tratamiento inactivaría los microorganismos presentes en el exudado, incrementando aún más su vida útil.

### 5.3.1. Análisis sensorial

Si bien los resultados obtenidos en cuanto a prolongación de la vida útil en cuanto a crecimiento microbiano eran muy positivos, la detección del olor “a quemado” podría ser una desventaja. Con el fin de determinar de si la película plástica del envase de la carne podía interferir con la radiación UV-C y provocar un cambio en el aroma de las muestra, realizó una valoración sensorial de la carne para comprobar esta circunstancia. Para ello, se hizo una evaluación sensorial sencilla con un total de 8 consumidores. Los resultados obtenidos de la cata realizada

con la muestra tratada envasada (Figura 20, izquierda) reflejaron que la mayoría de los consumidores (75%) detectó una mayor intensidad (valores > 3) de aroma en la muestra recién abierta, que fue disminuyendo tras 2 minutos fuera del envase (el 100% eligió valores < 3) y que casi no se percibía tras 5 minutos (el 62,5% lo valoró con un 1).

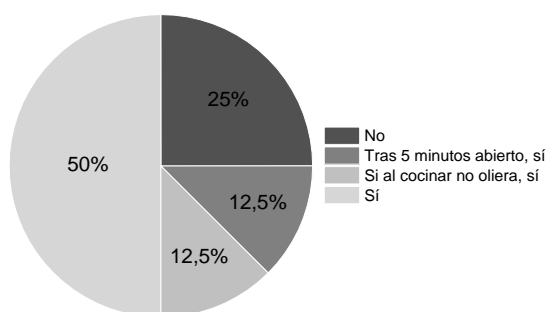
En la muestra tratada sin envasar (Figura 20, derecha), también se percibió una disminución de la intensidad del olor tras 2 y 5 minutos fuera del envase. Sin embargo, en este caso, los niveles reportados eran menores que en la muestra tratada con envase. El 100% de los encuestados eligieron un nivel de intensidad < 3, siendo el nivel 3 el elegido por el 50% (en comparación con el caso anterior en el que se otorgaron puntuaciones > 3 en el 75% de los casos). Tras 2 minutos el 87,5% seleccionó niveles < 2 y tras 5 minutos el 75% seleccionó el nivel 1. Por lo tanto, parece que sí que se observan diferencias al tratar la muestra con envase y sin envase.



**Figura 20.** Respuestas de los consumidores en el análisis sensorial realizado para comprobar la intensidad del olor descrito en muestras tratadas con UV-C envasadas (izquierda) y no envasadas (derecha) tras abrir el envase.

En cuanto a la aceptación del aroma, en ambos casos la mayoría de encuestados eligieron las opciones de un olor “neutro” o “algo agradable”. La mitad de los consumidores asociaron el aroma con olores “a quemado”, “a ceniza” y “a ozono” mientras que el resto lo describió como un olor “neutro”, “a carne” o a “carne de cerdo”.

Por último, solo el 12,5% del panel declaró que no compraría la muestra de carne tratada en el envase si presentase ese olor, mientras que el resto respondió “Sí” o “Sí, si el olor desapareciera tras el cocinado”. En la muestra tratada sin envasar la totalidad de consumidores compraría y consumiría la carne que presentase ese aroma (Figura 21).



**Figura 21.** Respuestas de los consumidores en el análisis sensorial realizado para comprobar si comprarían y consumirían la carne si se percibiera el olor descrito tras el tratamiento UV-C.

En el análisis sencillo que se realizó sobre el aroma y el sabor de las muestras tras ser cocinadas, se percibió el aroma descrito de una manera muy ligera en las muestras tratadas con envase. Sin embargo, en las muestras tratadas sin envase no se apreció este aroma en ningún caso. En cuanto al sabor de la carne, no se vio modificado ni en las muestras tratadas con envase ni en las tratadas sin envase, lo que corresponde con los resultados que obtuvieron McLeod et al., 2018, que compararon muestras de pollo tratadas con UV-C y sin tratar y los panelistas no percibieron diferencias entre las muestras.

Por lo tanto, puede concluirse que, aunque sí que se percibe un aroma algo diferente al de la carne fresca, sobre todo en las muestras tratadas con envase, este aroma no se considera desagradable ni impediría la adquisición o consumo del producto. Además, tras ser cocinadas, las muestras presentaron un aroma y un sabor comparable al de carne de cerdo sin tratar.

Para el futuro es recomendable indicar en el etiquetado del producto que el envase debería abrirse con antelación a su consumo, al igual que se hace con otros productos cárnicos o quesos envasados al vacío, para promover la desaparición del aroma y evitar el rechazo de los consumidores. Además de en los productos antes citados, en carne fresca envasada al vacío también es necesario esta apertura del envase previo al consumo para permitir la oxigenación de la muestra y que recupere el color rosado proporcionado por la Oxihemoglobina, que es más aceptado por el consumidor, por lo que esta indicación no debería suponer un impacto negativo.

## 6. CONCLUSIONES

### 6.1. Conclusiones

De los resultados obtenidos se concluye que:

- La caracterización de la instalación UV-C a temperaturas de congelación, gracias a la medida de la radiación y la temperatura en la zona de tratamiento, permitió definir la posición óptima para que las muestras recibieran la mayor dosis, de una forma uniforme,

consiguiendo la mayor eficacia letal posible (zona central a una altura de entre 5 y 12 cm con respecto a las lámparas UV-C).

- La aplicación de tratamientos UV-C en congelación, de 2,5 minutos ( $1,21-1,46 \text{ J/cm}^2$ ) y 5 minutos ( $2,40-2,56 \text{ J/cm}^2$ ) permitió reducir entre 1 y 1,5 unidades logarítmicas la microbiota presente en las muestras de secreto de cerdo envasadas al vacío, tanto refrigeradas como congeladas.
- La temperatura de la carne no afectó a la eficacia letal de los tratamientos de luz UV-C observándose la misma cinética de inactivación y determinándose un valor  $D_{UV}$  de  $1,2 \text{ J/cm}^2$ .
- La aplicación de tratamientos con UV-C a temperaturas de congelación, tanto en carne refrigerada como congelada, permitiría una extensión de la vida útil de entre 5-7 y 9 días, respectivamente, de la carne envasada al vacío y almacenada en refrigeración y no afectando negativamente a las características organolépticas del producto, que mantiene su calidad similar a la del producto fresco.

## 6.2. Conclusions

From the results obtained it can be concluded that:

- The characterization of the UV-C equipment was performed by taking radiation and temperature measurements, that allowed to define the optimal position for the samples to receive the maximum radiation possible, and therefore the biggest lethal efficacy (central area at 5-12 cm UV-C lamps height).
- The application of UV-C treatments at freezing temperatures of 2,5 minutes ( $1,21-1,46 \text{ J/cm}^2$ ) and 5 minutes ( $2,40-2,56 \text{ J/cm}^2$ ), allowed a reduction of between 1 and 1.5 logarithmic units of the microbiota present in pieces of vacuum-packed pork “secreto”, both refrigerated and frozen.
- The temperature of the samples did not affect to the lethal efficacy of the UV-C treatments, while observing the same inactivation kinetics and determining a  $D_{UV}$  value of  $1,2 \text{ J/cm}^2$ .
- The application of UV-C treatments at freezing temperatures in refrigerated and frozen samples of pork “secreto” extended by 5-7 and 9 days, respectively, the shelf-life of the vacuum-sealed meat stored at refrigeration, and they do not affect its sensory characteristics negatively, maintaining a similar quality to the fresh product.

## 7. VALORACIÓN PERSONAL

Ha sido un placer formar parte de un grupo de investigación durante la elaboración de este Trabajo Fin de Grado ya que he podido comprobar de primera mano todo el tiempo y esfuerzo que se invierte en un proyecto de investigación. Trabajar en equipo es algo a lo que ya estaba



acostumbrada por anteriores experiencias laborales, pero nunca deja de sorprenderme gratamente todo lo que se puede aprender si hay un buen ambiente entre compañeros y si se tiene claro el objetivo que se persigue y se trabaja conjuntamente para conseguirlo.

Considero que ha sido una experiencia muy enriquecedora, tanto personalmente como profesionalmente, que me ha permitido aplicar los conocimientos aprendidos durante la carrera, desarrollar y mejorar algunas habilidades que ya conocía y, por supuesto, aprender muchas otras nuevas. Por nombrar algunas, he aprendido a manejar equipos de radiación UV-C y me siento mucho más segura llevando a cabo análisis microbiológicos (preparación de medios de cultivo, manejo de muestras, siembra en placa y recuentos microbianos). Además, tener que presentar y explicar al resto del equipo los resultados que se iban obteniendo me ha ayudado a mejorar mi comunicación oral. También he aprendido a utilizar nuevos programas de representación y análisis de datos y a interpretarlos de manera correcta. En el proceso de redacción de esta memoria también he tenido que acostumbrarme a escribir de una manera más clara y concisa, tal y como se espera de un documento científico, lo que ha mejorado mi comunicación escrita. He aprendido a gestionar el tiempo que le he dedicado al trabajo de laboratorio para poder compaginarlo con el resto de asignaturas y he tenido que planificar, priorizar y optimizar las actividades que realizaba cada día para poder acabarlas a tiempo.

En todo momento mis tutores me han animado a ser autónoma, pero a la vez han estado disponibles para ayudarme a solventar cualquier duda o problema y siempre han mostrado interés por mi trabajo y me han guiado a lo largo del proceso. Me gustaría darles las gracias por la oportunidad de trabajar con ellos, la confianza que depositaron en mí y todo el apoyo que he recibido a lo largo de estos meses.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Cebrián, G., Mañas, P. y Condón, S. (2016). "Comparative Resistance of Bacterial Foodborne Pathogens to Non-thermal Technologies for Food Preservation". *Frontiers in Microbiology*, 7. doi:10.3389/fmicb.2016.00734.
- 2) Chun, H. H., Kim, J. Y., Lee, B. D., Yu, D. J. y Song, K. B. (2010). "Effect of UV-C irradiation on the inactivation of inoculated pathogens and quality of chicken breasts during storage". *Food Control*, 21(3), pp. 276–280. doi:10.1016/j.foodcont.2009.06.006.
- 3) Condón, S., Álvarez, I. y Gayán, E. (2014). "NON-THERMAL PROCESSING | Pulsed UV Light". *Encyclopedia of Food Microbiology*. Elsevier, pp. 974–981. doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00398-0.
- 4) Corrêa, T. Q., Blanco, K. C., Garcia, É. B., Perez, S. M. L., Chianfrone, D. J., Morais, V. S. y Bagnato, V. S. (2020). "Effects of ultraviolet light and curcumin-mediated photodynamic inactivation on microbiological food safety: A study in meat and fruit". *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 30, p. 101678. doi:10.1016/j.pdpdt.2020.101678.

- 5) Degala, H. L., Mahapatra, A. K., Demirci, A. and Kannan, G. (2018). "Evaluation of non-thermal hurdle technology for ultraviolet-light to inactivate *Escherichia coli* K12 on goat meat surfaces". *Food Control*, 90, pp. 113–120. doi:10.1016/j.foodcont.2018.02.042.
- 6) Dunn, J. E., Clark, R. W., Asmus, J. F., Pearlman, J. S., Boyer, K., Painchaud, F. y Hofmann, G. A. (1989). "Methods for preservation of foodstuffs". Patente US4871559 A, USA.
- 7) Fan, X., Huang, R. y Chen, H. (2017). "Application of ultraviolet C technology for surface decontamination of fresh produce". *Trends in Food Science & Technology*, 70. doi:10.1016/j.tifs.2017.10.004.
- 8) Farrell, H. P., Garvey, M., Cormican, M., Laffey, J. G. y Rowan, N. J. (2010). "Investigation of critical inter-related factors affecting the efficacy of pulsed light for inactivating clinically relevant bacterial pathogens". *Journal of Applied Microbiology*, 108(5), pp. 1494–1508. doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04545.x.
- 9) Food and Drug Administration (2000). "Irradiation in the Production, Processing and Handling of Food". *Federal Register*, 65(230).
- 10) Gayán, E., Condón, S. y Álvarez, I. (2014). "Biological Aspects in Food Preservation by Ultraviolet Light: a Review". *Food and Bioprocess Technology*, 7(1), pp. 1–20. doi:10.1007/s11947-013-1168-7.
- 11) Gómez-López, V. M., Ragaert, P., Debevere, J. y Devlieghere, F. (2007). "Pulsed light for food decontamination: a review". *Trends in Food Science & Technology*, 18(9), pp. 464–473. doi:10.1016/j.tifs.2007.03.010.
- 12) Gouma, M., Álvarez, I., Condón, S. y Gayán, E. (2020). "Pasteurization of carrot juice by combining UV-C and mild heat: Impact on shelf-life and quality compared to conventional thermal treatment". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 64, p. 102362. doi:10.1016/j.ifset.2020.102362.
- 13) Guerrero-Beltrán, J. A. y Barbosa-Cánovas, G. V. (2004). "Advantages and Limitations on Processing Foods by UV Light", *Food Science and Technology International*, 10(3). doi:10.1177/1082013204044359.
- 14) Heinrich, V., Zunabovic, M., Varzakas, T., Bergmair, J. y Kneifel, W. (2016). "Pulsed Light Treatment of Different Food Types with a Special Focus on Meat: A Critical Review". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(4), pp. 591–613. doi:10.1080/10408398.2013.826174.
- 15) Hinds, L. M., O'Donnell, C. P., Akhter, M. y Tiwari, B. K. (2019). "Principles and mechanisms of ultraviolet light emitting diode technology for food industry applications". *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 56, pp. 102153-. doi:10.1016/j.ifset.2019.04.006.
- 16) Keklik, N. M., Demirci, A. y Puri, V. M. (2010). "Decontamination of unpackaged and vacuum-packaged boneless chicken breast with pulsed ultraviolet light". *Poultry Science*, 89(3), pp. 570–581. doi:10.3382/ps.2008-00476.
- 17) Koutchma, T. (2008) "UV Light for Processing Foods". *Ozone: Science & Engineering*, 30(1), pp. 93–98. doi:10.1080/01919510701816346.
- 18) Koutchma, T. (2019) *Ultraviolet Light in Food Technology: Principles and Applications*. Boca Ratón: CRC Press.

- 19) Li, G.Q., Wang, W.L., Huo, Z.Y., Lu, Y. y Hu, H.Y. (2017). "Comparison of UV-LED and low pressure UV for water disinfection: Photoreactivation and dark repair of *Escherichia coli*". *Water Research*, 126. doi:10.1016/j.watres.2017.09.030.
- 20) Manzocco, L. y Nicoli, M. C. (2014). "Surface Processing: Existing and Potential Applications of Ultraviolet Light". *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 55(4). doi:10.1080/10408398.2012.658460.
- 21) McLeod, A., Hovde Liland, K., Haugen, J., Sørheim, O., Myhrer, K. S. y Holck, A. L. (2017). "Chicken fillets subjected to UV-C and pulsed UV light: Reduction of pathogenic and spoilage bacteria, and changes in sensory quality". *Journal of Food Safety*, 38(1). doi:10.1111/jfs.12421.
- 22) Millán Villarroel, D., Romero González, L., Brito, M. y Ramos-Villarroel, A.Y. (2015). "Luz Ultravioleta: inactivación microbiana en frutas". *Saber*, 27(3), pp. 454-469. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/4277/427743080011.pdf> [Consultado 21-05-2022].
- 23) Oms-Oliu, G., Martín-Belloso, O. y Soliva-Fortuny, R. (2008) "Pulsed Light Treatments for Food Preservation. A Review", *Food and Bioprocess Technology*, 3(1), pp. 13–23. doi:10.1007/s11947-008-0147-x.
- 24) Palmieri, L. y Cacace, D. (2005). "High Intensity Pulsed Light Technology". *Emerging Technologies for Food Processing*. Elsevier, pp. 279–306. doi:10.1016/B978-012676757-5/50013-X.
- 25) Pérez-Chabela, Totosaús y Hernández-Alcántara (2016). "Determinación del tiempo de reducción decimal "D" de bacterias ácido lácticas probióticas". *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 1 (2) pp. 129-133. Disponible en: <http://www.fcb.uanl.mx/IDCyTA/files/volume1/2/2/24.pdf> [Consultado 21-05-2022].
- 26) Playán, J. (2021). "Inactivación microbiana en sólidos mediante luz UV-C". Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.
- 27) Reglamento (CE) 853/2004, de 29 de abril de 2004, por el que se establecen normas específicas de higiene de los alimentos de origen animal. Diario Oficial de la Unión Europea, L 139, de 30 de abril de 2004.
- 28) Reglamento (UE) 2015/2283 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de noviembre de 2015, relativo a nuevos alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea, L 327, de 11 de diciembre de 2015.
- 29) Reichel, J., Kehrenberg, C. y Krischek, C. (2019). "Inactivation of *Yersinia enterocolitica* and *Brochothrix thermosphacta* on pork by UV-C irradiation". *Meat Science*, 158. doi:10.1016/j.meatsci.2019.107909.
- 30) Zhang, Z.H., Wang, L.H., Zeng, X.A., Han, Z. y Brennan, C. S. (2019). "Non-thermal technologies and its current and future application in the food industry: a review". *International Journal of Food Science & Technology*, 54(1), pp. 1–13. doi:10.1111/ijfs.13903.
- 31) Zhou, G. H., Xu, X. L. y Liu, Y. (2010). "Preservation technologies for fresh meat – A review". *Meat Science*, 86(1), pp. 119–128. doi:10.1016/j.meatsci.2010.04.033.