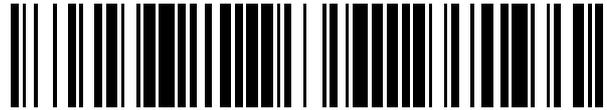


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 354 677**

21 Número de solicitud: 200930141

51 Int. Cl.:

C12Q 1/04

(2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación: **07.05.2009**

43 Fecha de publicación de la solicitud: **17.03.2011**

Fecha de la concesión: **13.02.2012**

45 Fecha de anuncio de la concesión: **23.02.2012**

45 Fecha de publicación del folleto de la patente:
23.02.2012

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
C/ PEDRO CERBUNA, 12
EDIFICIO INTERFACULTADES, 1ª PLANTA
50009 ZARAGOZA, ES**

72 Inventor/es:

**NERÍN DE LA PUERTAS, M.C. CRISTINA;
GUTIÉRREZ BARTOLOMÉ, LAURA y
SÁNCHEZ JARABO, CRISTINA**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

54 Título: **ENVASE INTELIGENTE PARA LA DETECCIÓN DE MICROORGANISMOS.**

57 Resumen:

Envase inteligente.

La presente invención se refiere a un nuevo envase inteligente, diseñado a partir de un nuevo material que comprende un soporte sólido adsorbente parcialmente polar impregnado en una disolución de vainillina, que permite la detección visual del crecimiento de microorganismos en productos de diferente naturaleza sin necesidad de estar en contacto directo con el microorganismo ni con el medio que lo contiene.

ES 2 354 677 B1

DESCRIPCIÓN

Envase inteligente para la detección de microorganismos.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se enmarca dentro del sector alimentario, químico-farmacéutico y de la cosmética. Concretamente, se refiere a un nuevo material formado por un soporte sólido adsorbente parcialmente polar impregnado con una disolución de vainillina y a su uso como sensor colorimétrico para la detección de la presencia de microorganismos en alimentos, en productos cosméticos o farmacéuticos.

Antecedentes de la invención

15 Todos los años existen en el mundo innumerables casos de ingresos hospitalarios como consecuencia de toxoinfecciones alimentarias, derivadas de la presencia de microorganismos.

Por su parte, el consumidor del siglo XXI demanda alimentos de gran calidad sensorial y alto valor nutritivo, es decir mínimamente procesados, en detrimento de los productos convencionales. Es obvio que la aplicación de unas condiciones de procesamiento menos drásticas comporta un incremento del riesgo microbiológico y por lo tanto, la variabilidad del comportamiento microbiano adquiere una importancia crítica, ya que debe conocerse la posibilidad real de supervivencia y desarrollo de la microbiota residual en cualquier producto, para determinar con precisión su vida útil o los riesgos microbiológicos que el productor está dispuesto a asumir.

25 El estudio de la incidencia y prevalencia de patógenos en alimentos es de hecho uno de los objetivos prioritarios de la Unión Europea en materia de seguridad alimentaria. Su finalidad es poder valorar qué riesgo entrañan en realidad los alimentos, así como la adopción de criterios microbiológicos y objetivos de seguridad alimentaria para algunos tipos de alimentos.

Actualmente no existe en el mercado ningún material con compuestos naturales que sea capaz de detectar de forma visual la presencia de un amplio rango de microorganismos en los productos envasados. Por ello, ni el consumidor ni el vendedor o distribuidor pueden conocer si los productos envasados están contaminados o no por microorganismos. En el caso de microorganismos patógenos esta situación supone un grave riesgo para la salud. Para su control es necesario recurrir a exámenes microscópicos y análisis microbiológicos o siembras en medios de cultivo selectivos, lo que implica un gran consumo de recursos de personal y material. Además estos métodos son destructivos, lo que implica que el producto analizado ya no está disponible en la cadena comercial, y requieren un gran consumo de tiempo, puesto que desde que se realiza la siembra, hasta que se realiza el recuento de microorganismos, pasan entre 2 y 7 días, sin tener en cuenta el tiempo necesario para el pre-enriquecimiento. Dichos análisis implican además un coste de laboratorio importante. En cualquier caso estos análisis se realizan de forma aleatoria para un número representativo de muestras, pero en ningún caso pueden realizarse para todas las unidades de todas las partidas de alimentos, con lo que siempre existe un riesgo potencial de que haya contaminación microbiana en un producto y no sea detectado por el productor o el consumidor final. En productos farmacéuticos el riesgo es mucho mayor, ya que sólo se detecta que ha habido un problema de esta naturaleza cuando ya ha causado el daño, con frecuencia irreparable.

En los últimos años, los sistemas de envasado para alimentos han ido evolucionando como respuesta a las exigencias de los consumidores en cuanto a la caducidad, conservación de sus propiedades, frescura, apariencia, etc. Por una parte, los métodos modernos de marketing necesitan un envasado atractivo que comunique algo al consumidor para que de esta forma éste adquiera el producto. En segundo lugar los envases han ido evolucionando a lo largo de los años como respuesta a los profundos cambios en la forma de vida, y la industria del envasado ha tenido que responder a estos cambios.

50 Los envases han de cumplir, entre otras, las siguientes funciones:

- ▲ contener el alimento,
- 55 ▲ proteger el alimento de las acciones físicas, químicas y microbiológicas,
- ▲ conservar la calidad y salubridad del alimento,
- ▲ evitar fraudes,
- 60 ▲ acondicionar el producto para la manipulación comercial,
- ▲ presentar e identificar el producto,
- 65 ▲ informar al consumidor de las características del alimento,
- ▲ alargar la vida útil, etc.

Últimamente, y debido a las nuevas exigencias en la demanda de los consumidores, han surgido dos nuevos conceptos de envase. El envase activo y el envase inteligente. Los envases activos e inteligentes pueden ser vistos como la próxima generación en el envasado de alimentos.

5 Los materiales y objetos activos en contacto con alimentos se definen, de acuerdo con la Directiva Europea 1935/2004, como aquellos destinados a ampliar el tiempo de conservación, o a mantener o mejorar el estado de los alimentos envasados, y que están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que transmitan sustancias a los alimentos envasados o al entorno de éstos o que absorban sustancias de los alimentos envasados o del entorno de éstos. En los últimos años se ha producido un desarrollo importante en el campo del envase activo, con un gran número de publicaciones haciendo referencia a este tema (Rodríguez, A., Battle, R., Nerín, C (2007) “*The use of natural essential oils as antimicrobial solutions in paper packaging. Part II*”. *Progress in Organic Coatings* 60(1): 33-38); Rodríguez, A, Nerín, C., y Battle, R (2008). “*New cinnamon-based active paper packaging against Rhizopusstolonifer food spoilage*”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56 (15)); López, P.; Sánchez, C.; Battle, R, and Nerín, C. (2007b). “*Development of flexible antimicrobial films using essential oils as active agents*”. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(21): 8814-8824); Gutiérrez, L; Sánchez, C.: Battle, R.: Nerín, C. (2009). “*New antimicrobial active package for bakery products*”. *Trends in Food Science & Technology* 20(2); 92-99.

En cuanto al envase inteligente, las finalidades son diferentes, y ello justifica su separación con una designación especial. Su acción posibilita un sueño en las pretensiones del consumidor del mundo moderno, siendo el envase mismo el que habla de la calidad del producto que contiene o de los sucesos que han marcado su procesado, actuando como chivato de posible mal estado o degradación, así como de un mantenimiento, transporte o distribución inadecuada. Según la Directiva 1935/2004, los envases inteligentes se definen como aquellos materiales que controlan el estado de los alimentos envasados o el entorno de éstos.

25 Como “envases inteligentes” se clasificarían aquellos que utilizan, bien propiedades, bien componentes del alimento o de algún material del envase como indicadores del historial y calidad del producto; hasta el momento se trata fundamentalmente de indicadores de tiempo-temperatura, indicadores de calidad microbiológica, indicadores de oxígeno o dióxido de carbono.

30 El envase inteligente se define por tanto como aquel que monitoriza las condiciones del alimento envasado dando información sobre la calidad del alimento envasado durante el transporte y el almacenamiento, entendiéndose por condición del alimento:

- 35 ▲ procesos fisiológicos (respiración de frutas y verduras frescas)
- ▲ procesos químicos (oxidación de lípidos)
- ▲ procesos físicos (endurecimiento de pan, deshidratación)
- 40 ▲ aspectos microbiológicos (dañado por microorganismos), e
- ▲ infección (por insectos).

Estos envases despiertan un gran interés en la industria alimentaria y la prueba de ello radica en que se está realizando actualmente un gran esfuerzo en el desarrollo e investigación de este tipo de envases.

Dentro de este grupo se encuentran los envases que portan etiquetas, tintes o esmaltes, que se utilizan como indicadores de la calidad, seguridad o tratamiento del producto envasado. Se fundamentan en reacciones físico-químicas, enzimáticas u otras, que dan lugar generalmente, al cambio de color del dispositivo, señalando de esa forma el daño o cambio que tuvo lugar en el alimento.

Así se puede comenzar a explotar la posibilidad de usar la interacción entre el alimento y el envase como algo positivo, es decir, bloqueando o inhibiendo las causas de la descomposición de los alimentos.

55 Muchos de los indicadores inteligentes existentes son de gran utilidad para la industria del envasado de los alimentos, tales como indicadores de tiempo-temperatura, integridad del envase, crecimiento microbiano, autenticidad del envase, etc. Existen varios de estos sistemas patentados pero sólo unos pocos son comerciales, entre los que destacan los indicadores de tiempo-temperatura.

60 No se encuentran muchas referencias en cuanto al desarrollo de envases inteligentes que sean capaces de detectar de forma rápida y eficaz la presencia de microorganismos en el alimento en el momento de adquisición o ingesta. Dado que la ingesta de alimentos en mal estado desde el punto de vista microbiológico es una de las mayores causas de afecciones a la salud (Intoxicaciones alimentarias), es importante poder detectar a tiempo, es decir, antes de la ingesta, los productos envasados que estén infectados. De esta forma, el vendedor los puede retirar a tiempo y el consumidor puede evitar su ingesta sin riesgo para la salud.

Los desarrollos descritos en relación con este tipo de envases inteligentes, necesitan contacto directo entre el microorganismo y el sensor, que actúa como envase inteligente, como en las patentes EP1326653; WO03093784,

WO2008026119, (Kimberly-Clark Worldwide, INC), en la que se emplea un detector cromogénico; o WO0013009, (Johnson Matthey Public Limited Company), en la que se utilizan complejos metálicos como soportes de la reacción. En el documento *Desbordes, J: Coniver, L. Prevot, A. Annales Pharmaceutiques Francaises 1972, 30(7-8), 507-518* se utiliza la reacción coloreada de la vainillina en medio sulfúrico y fosfórico para identificar la presencia de lípidos en estudios bacterianos y finalmente identifica los ácidos grasos por cromatografía de capa fina y por cromatografía de gases. De nuevo en este desarrollo es necesario el contacto directo entre la bacteria y el reactivo para que se produzca la reacción. Además el sistema de fabricación de este tipo de sensores es de gran complejidad, lo que dificulta la posibilidad de fabricación a nivel industrial. Por otra parte el mecanismo de actuación es complejo y requiere inicialmente la generación de un compuesto coloreado, que desaparecerá ante el contacto con microorganismos. Además, los compuestos empleados como cromógenos, son compuestos químicos que en algunos casos necesitan condiciones especiales como acidificación, o complejos compuestos químicos para que tenga lugar la reacción, varios de los cuales no pueden emplearse hoy en día en contacto con alimentos o bien tienen una limitación importante en su concentración. En ningún caso se usan compuestos naturales como principales compuestos cromógenos, ni mucho menos compuestos aceptados como aditivos alimentarios, con las ventajas tecnológicas y de salubridad que esto implica.

En vista de las deficiencias de los envases hasta ahora descritos, los autores de la presente invención, tras un importante trabajo de investigación, han desarrollado un nuevo material que comprende un soporte sólido adsorbente parcialmente polar impregnado en una disolución de vainillina que puede ser empleado como sensor colorimétrico para la detección de microorganismos en productos envasados de diferente naturaleza.

De forma ventajosa, la vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído), autorizada como aditivo alimentario, permite detectar el crecimiento de microorganismos mediante una reacción cromogénica sencilla y fácilmente identificable. Actúa además en el sensor sin necesidad de estar en contacto directo con el alimento o el producto envasado, si bien para que tenga lugar necesita que exista una pequeña concentración de humedad en la fase vapor.

La vainillina es un compuesto natural que se encuentra en muchos vegetales, sobre todo en la vaina de la vainilla. Industrialmente se obtiene a partir del eugenol, el constituyente principal de la esencia de clavo. También se obtiene por oxidación de la lignina, un polímero complejo que se encuentra en el tejido leñoso de las plantas.

La vainillina se utiliza mucho como agente aromatizante en alimentación, sobre todo en pastelería. También se emplea en la industria farmacéutica como estimulante gástrico, y en perfumería.

Existen algunas referencias en el estado de la técnica que también citan el empleo de vainillina como precursor de otros reactivos, pero necesita un largo proceso de síntesis y la mezcla con disolventes como etanol y con reactivos como ácido clorhídrico concentrado, piperidina, yoduro de metilo u otros. Por ejemplo, en el documento WO2008026119, la vainillina no es el componente principal de la invención, sino que es necesaria la presencia de otro compuesto en la reacción para que el cambio de color tenga lugar.

Otros métodos, que utilizan la vainillina como detector de la presencia de microorganismos necesitan acidificar fuertemente el medio con HCl, con los inconvenientes que esto implica, y además solamente son capaces de detectar la presencia de aquellos microorganismos que son capaces de producir Indol. Así, en el documento *Ferlin, H.J. y Karabinos, (J.V. Euclides 1954, 14, 345-353)* se describe un medio que contiene triptófano como fuente para aislar *E. coli* y *P. vulgaris* de mezclas según las diferencias en la producción de indol a partir de triptófano. Con ello, desarrollaron también un reactivo para realizar el test de indol. En estas condiciones emplearon la adición de una disolución de vainillina al 0,25% en ácido clorhídrico concentrado para producir un color violeta con el indol, por contacto directo y en fase líquida. Es decir, los microorganismos productores de indol debían encontrarse en dicha disolución, produciendo el indol que da lugar a la reacción cromogénica.

A la luz de estos inconvenientes, una de las principales ventajas de la presente invención es precisamente la utilización de un compuesto natural, no nocivo, aditivo alimentario, como es la vainillina, y la capacidad de detectar la presencia de microorganismo sin necesidad de que exista contacto directo entre el microorganismo y el material de envase.

Su aplicación está dirigida a resolver un problema que supone un gran riesgo para la sociedad, como es la presencia de microorganismos patógenos en los alimentos, en productos de cosmética y farmacia, o en otros productos envasados.

El material de la invención se incorpora en el material de envase de los alimentos, o de cualquier otro productos susceptible de sufrir contaminación por microorganismos, de forma que mediante un cambio de color fácilmente reconocible, (de incoloro a violeta), el consumidor es capaz de rechazar el producto y evitar la ingesta de alimentos o el uso de productos infectados y contaminados con microorganismos peligrosos para la salud.

Por otro lado, es un sistema que contribuye sobremedida al control de calidad del producto envasado pudiéndose retirar a tiempo partidas contaminadas, evitando de ese modo que lleguen al consumidor final así como todos los problemas y costes generados de posibles devoluciones. Los sectores involucrados para la elaboración y aplicación de este nuevo dispositivo, serían por una parte el sector de los envases, quién sería el encargado de fabricar y poner en el mercado el material incorporado ya en el envase. Y por otra parte la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica. Este sector ha de encargarse de la optimización de ubicación del material dentro del envase, teniendo en cuenta el

proceso industrial de envasado, con objeto de lograr una ubicación fácilmente visible para el consumidor final y que no interfiera con el producto envasado ni dificulte el proceso industrial de envasado.

La principal ventaja que posee la utilización de un sensor como el que se presenta como invención es la posibilidad que le ofrece al consumidor de saber que el alimento que va a ingerir o el producto que va a utilizar está libre de microorganismos, en el momento de la adquisición e ingesta del mismo y de esta forma puede abstenerse de consumirlo y rechazar el producto.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Aplicación del material sensor en un film de polipropileno. Cultivo de *E. coli*.

Figura 2. Aplicación del material sensor en filtros de papel en ausencia de microorganismos (blanco), con medio de cultivo (columna izquierda) y sin medio de cultivo (columna derecha).

Figura 3. Aplicación del material sensor en una etiqueta de papel autoadhesiva. Cultivo de *E. Coli*.

Figura 4. Aplicación del material sensor en filtros de papel en presencia de microorganismos (*E. coli*) o ausencia de microorganismos (blanco). El medio de cultivo es Müller-Hinton.

Figura 5. Gráfico de días necesarios para lograr coloración en diferentes medios (Müller-Hinton; T.S.A.; M.E.A.) para diferentes microorganismos.

Figura 6. Aplicación del material sensor a un filtro de papel a diferentes pHs en un cultivo sin microorganismos: medio Müller-Hinton.

Figura 7. Gráfico de la evolución de la concentración de vainillina en el tiempo con a) ausencia de microorganismos (blanco); b) *Candida albicans*; c) *Staphylococcus aureus* y d) *Salmonella choleraesuis*.

Objeto de la invención

En primer lugar, es objeto de la invención un material que comprende un soporte sólido adsorbente parcialmente polar impregnado en una disolución que comprende vainillina.

Es también objeto de la invención el empleo de dicho material como sensor colorimétrico para la detección visual del crecimiento de microorganismos, donde dicho sensor no necesita contacto directo con los microorganismos ni con el medio que los contiene para producir el cambio de color.

Finalmente, es también objeto de la invención, el empleo de la vainillina como reactivo colorimétrico para la detección visual del crecimiento de microorganismos.

Descripción de la invención

La presente invención contempla un nuevo envase inteligente, diseñado a partir de un nuevo material, que permite la detección visual del crecimiento de microorganismos en productos de diferente naturaleza sin necesidad de estar en contacto directo con el microorganismo ni con el medio que lo contiene.

Así, en un aspecto principal de la invención, se contempla dicho material, que comprende un soporte sólido adsorbente parcialmente polar impregnado en una disolución que comprende vainillina.

La presencia de la vainillina en la composición del material permite detectar el crecimiento de microorganismos mediante una reacción cromogénica sencilla y fácilmente identificable. El cambio de color (de incoloro a violeta) en las condiciones del ensayo se relaciona inequívocamente con la presencia de microorganismos, tanto en cultivos puros, realizados en placa Petri, como en alimentos, como por ejemplo la mahonesa casera, que no lleva conservantes, en fármacos o en cosméticos.

La vainillina es un compuesto natural que reacciona ante la presencia de microorganismos. En ausencia de vainillina la reacción coloreada no tiene lugar. La reacción es de carácter irreversible y el color generado aumenta en intensidad mientras se siga produciendo crecimiento microbiano.

En una realización particular, la disolución de vainillina comprende etanol. La concentración mínima de vainillina necesaria para hacer la reacción coloreada visible es de 10% en etanol, preferiblemente de un 10 a un 50%.

La reacción necesita medio acuoso o al menos humedad para que sea visible, duradera e irreversible y que por tanto sirva como detector colorimétrico. Por ello, el soporte sólido debe ser de un material adsorbente parcialmente polar, capaz de retener la humedad desprendida por el propio alimento en fase de vapor, preferiblemente se utiliza papel o cartón.

En el caso de que la vainillina se incorporara a un soporte hidrofóbico, la reacción no sería permanente, ya que la humedad se condensaría sobre el soporte hidrofóbico y, aunque se colorearía igualmente, no permanecería porque la gota de condensación caería por gravedad. Por tanto, no constituiría un soporte irreversible y estable.

5 Como se ha comentado anteriormente, las características descritas del material de la invención lo hacen adecuado para la detección visual del crecimiento de microorganismos, por lo que en otro aspecto principal de la invención se contempla el uso de este nuevo material como sensor colorimétrico para la detección visual de la presencia de microorganismos.

10 La reacción en el sensor tiene lugar en fase vapor, por lo que la vainillina no necesita estar en contacto directo con el microorganismo ni con el medio que lo contiene. De esta manera, el sensor y los microorganismos pueden estar alejados uno de otro, siendo únicamente el contacto entre ellos a través de una fase vapor.

15 El hecho de que el sensor no necesite contacto directo con el microorganismo es muy ventajoso y una diferencia importante respecto a los sensores descritos en el estado de la técnica, ya que de esta forma los compuestos exhalados por los microorganismos en su metabolismo, alcanzan la fase vapor y a través de esta llegan al sensor donde se realiza la reacción cromogénica. Esto posibilita que el sensor se coloque en la tapa o adherido al envase o formando parte de él, pero a distancia. Tiene la ventaja además de que en estas condiciones, es decir, actuando en fase vapor, es capaz de responder a la presencia de los microorganismos en cualquier punto del producto donde puedan encontrarse, no estando limitado a una fracción o parte del mismo, como sucede cuando se requiere contacto directo.

20 Además, el hecho de producirse el cambio de color provocado por la transferencia o difusión de los compuestos procedentes de los microorganismos en fase vapor permite alcanzar alta sensibilidad, lo que significa que el sensor responde a la aparición de las primeras colonias de microorganismos en el medio.

25 En presencia de una concentración de microorganismos igual o superior a 10 unidades formadoras de colonias por ml o por mg (UFC/ml, UFC/mg) de alimento conteniendo el microorganismo, el sensor cambia de color de manera irreversible, de incoloro (o blanco, debido al papel o soporte sólido) a rosa-violeta. La intensidad del color depende de la concentración de microorganismos.

30 El sensor permite la detección visual del crecimiento de un amplio espectro de microorganismos tales como mohos, levaduras y/o bacterias.

35 Todos los microorganismos que generan en su metabolismo indol dan reacción con la vainillina. Pero además, otros microorganismos que no producen indol en su metabolismo, como *Salmonella* y *Pseudomonas* spp., dan también positiva la reacción de identificación con la vainillina, por lo que la reacción no sería específica "indol-vainillina", sino que se definiría como una reacción más genérica, "compuestos nitrogenados-vainillina".

40 La detección de microorganismos por medio del sensor o sistema inteligente de la invención, se puede llevar a cabo en un producto envasado. El producto envasado puede ser de diferente naturaleza, de forma preferida es un alimento, un producto farmacéutico o un producto cosmético.

45 Así, en realizaciones particulares, el sistema inteligente formado por el material como sensor puede usarse como material de envase propiamente dicho ó bien aplicarse en forma de etiqueta base papel, preferiblemente en formato autoadhesivo, colocada en la cara interna del envase, que puede ser de plástico o de cualquier otro material, de forma que esté expuesto a la atmósfera generada en el interior del envase. El envase deberá ser en esa zona de material transparente e incoloro, para permitir visualizar el cambio de color que se producirá en presencia de microorganismos.

50 Finalmente, en otro aspecto principal de la invención se contempla el empleo de la vainillina como reactivo colorimétrico para la detección visual del crecimiento de microorganismos en fase de vapor, es decir, sin contacto directo entre la vainillina y el microorganismo.

Ejemplos

55 Se estudió la actividad del sensor en base a diferentes materiales del soporte y condiciones experimentales. Ello permitió visualizar de forma clara el funcionamiento del sensor a nivel macroscópico.

60 En la figura 1 se aplicó un film de polipropileno (PP) impregnado en una disolución de vainillina en un cultivo de *E. coli*. A pesar de que la formulación utilizada fuera la correcta diseñada para este sensor, no se observó cambio de color. La razón de la ausencia de respuesta (cambio de color) se debe a que el material no absorbió la humedad ni los compuestos, o lo que es lo mismo, la reacción con la formulación que contiene la vainillina no quedó retenida en el soporte, al encontrarse ésta en un medio no polar, embebida en el polipropileno (PP). De hecho se observó un halo coloreado recubriendo el PP pero que finalmente condensó y se desprendió del film de PP, dando por no válido este soporte no polar ni adsorbente para ser empleado como soporte para el sensor.

65 En la figura 2 se llevaron a cabo ensayos blanco (ausencia de microorganismos), empleando varios filtros de soporte papel impregnados en la disolución de vainillina, en presencia de medios de cultivo (columna izquierda) y en ausencia

de cultivo (columna derecha). Se demostró que, en ausencia de microorganismos, la presencia del medio de cultivo no es suficiente para que la reacción tenga lugar.

5 En la figura 3 se aplicó el material sensor de la invención a una etiqueta autoadhesiva para detectar la presencia de microorganismos en un cultivo de *E. Coli*, pudiéndose observar el cambio de color del sensor.

10 En la figura 4 se aplicó el material sensor a varios filtros de papel en diferentes cultivos de *E. coli* y en un cultivo blanco, es decir sin microorganismo. El medio de cultivo fue Müller-Hinton. Se pudo observar que la coloración se produjo en todos los cultivos de *E. coli*, mientras que en el único cultivo blanco no apareció color.

15 Para ampliar el estudio se evaluó el comportamiento del material de la invención frente a una amplia serie de microorganismos para determinar la concentración mínima necesaria de para que el sensor funcionara adecuadamente.

Se llevaron a cabo ensayos para estudiar la eficacia del sensor en los siguientes microorganismos:

15 Mohos

- *Aspergillus flavus* (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, 2687)
- 20 • *Penicillium roqueforti* (Culture Collection of Fungi, IBT, 21319)
- *Eurotium repens* (IBT 1800)
- *Penicillium islandicum* (CECT 2762NT)
- 25 • *Penicillium commune* (IBT 21314)
- *Penicillium expansum*
- 30 • *Penicillium nalgiovensis*

Levaduras

- 35 • *Candida albicans* (American Type Culture Collection, ATCC. 64550)
- *Debaryomyces hansenii* (CECT 10353)
- *Zygosaccharomyces rouxii* (CECT 11928)
- 40 • *Botrytis cinerea*

45 Bacterias

- *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)
- *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644)
- 50 • *Bacillus cereus* (CECT 495)
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213)
- *Salmonella choleraesuis* (CECT 4000)
- 55 • *Yersinia enterocolitica* (CECT 4315)
- *Escherichia coli* (ATCC 29252)
- 60 • *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853)

Se observaron reacciones positivas tanto entre las bacterias, como en los mohos y las levaduras. De los microorganismos ensayados que dieron reacción positiva en la siguiente tabla (tabla 1) se muestran aquellos en los que el valor de la concentración de microorganismos puede expresarse de forma clara, en función de la concentración de microorganismo inoculado y del tiempo necesario para el cambio de color en el sensor.

TABLA 1

Cambio de color en función de la concentración

Bacteria	Días de incubación	MCC (ufc por mg/ml)	MCD(ufc por mg/ml)
<i>P. aeruginosa</i>	1	10	10^7
	2	10	10^2
	3	10	10
<i>E. coli</i>	1	10	10^7
	2	10	10^2
	3	10	10
<i>E. faecalis</i>	1	10	10^6
	2	10	10^2
	3	10	10^2
	4	10	10
<i>B. cereus</i>	1	10	10^6
	2	10	10^4
	3	10	10^2
	4	10	10^2
<i>S. aureus</i>	1	10	$>10^7$
	2	10	10^5
	3	10	10^4
	4	10	10^4
<i>Y. enterocolítica</i>	1	10	$>10^7$
	2	10	$>10^7$
	3	10	10^7
	4	10	10^6

MCC: Concentración mínima inoculada: MCD: Concentración mínima detectada

Se completaron los ensayos estudiando el efecto de diferentes medios de cultivo en el cambio del color del soporte adsorbente que contiene el sensor. Debido al elevado consumo de recursos, se eligieron 2 microorganismos como representantes de cada grupo y tres medios de cultivo, genéricos que permitieran el crecimiento de todos los microorganismos, pero con diferente contenido en fuente de proteínas, como característica diferenciadora. Los medios seleccionados fueron Müller-Hinton (M. H), Malt Extrac Agar (M.E.A) y T.S.A (Tripton Soja Agar). Se prolongó el tiempo del estudio hasta un año. En las tablas siguientes (2 y 3) se resumen los microorganismos y los medios de cultivo seleccionados. Las diferencias en la composición de los medios de cultivo representa diferente concentración de nutrientes y por tanto, simula la situación de los alimentos, en los que los nutrientes para los microorganismos van a ser diferentes unos de otros.

TABLA 2
Microorganismos

GRUPO	MICROORGANISMOS	MEDIO DE CULTIVO
GRAM POSITIVAS	<i>B. cereus</i> y <i>E. faecalis</i>	M. H, M.E.A y T.S.A
GRAM NEGATIVAS	<i>P. aeruginosa</i> y <i>S. Cholerasuis</i>	M. H, M.E.A y T.S.A
LEVADURAS	<i>C. albicans</i>	M. H, M.E.A y T.S.A
MOHOS	<i>A. flavus</i> y <i>P. roqueforti</i>	M. H, M.E.A y T.S.A

TABLA 3
Composición de los diferentes medios de cultivo con los que se ha trabajado

	MÜLLER-HINTON	T.S.A.	SABOURAUD DEXTROSA AGAR	M.E.A
	Almidón 1.5 g	Sodio cloruro 5g	D(+) Glucosa 40g	Malt Extract 13g
	Infusión de carne de res 2g	Peptona de caseína 15g	Cloranfenicol 50 mg	Dextrine 2.5g
	Peptona de caseína hidrolizada	Peptona de soja 5g	Mezcla de peptonas 10g	Gelatine peptone 5g
		Agar 15g	Agar 1g	Agar 15g
pH final	7.2	7.3 +/- 0.2		5.5 +/- 0.2

Los gráficos de la figura 5 muestran los días que fueron necesarios para que el filtro adquiriera la tonalidad prácticamente negra final (morado o violeta muy intenso) para los diferentes microorganismos en los diferentes medios estudiados. Se observa la intensificación del color en función de la concentración de microorganismos.

A raíz de este ensayo se pudo concluir que el medio de cultivo en el que tiene lugar el crecimiento del microorganismo afecta de forma notable al cambio de color. Este cambio fue más rápido en Müller-Hinton, medio con mayor contenido en compuestos nitrogenados, seguido de T.S.A y en M.E.A, el cambio fue bastante más lento.

La principal diferencia entre estos medios es el contenido en compuestos nitrogenados. En el caso del Müller-Hinton, la carne de res y la caseína, suministran compuestos nitrogenados, vitaminas, carbono, azufre y amino ácidos. Para el T.S.A la digestión enzimática de la soja aporta nitrógeno, vitaminas y minerales. Mientras que el M.E.A., tiene un alto contenido en polisacáridos y como única fuente de nitrógeno tiene peptona y en cantidades menores a las presentes en los otros dos medios. Esto afecta a la intensidad de la reacción que tiene lugar con la vainillina y por tanto al cambio de color, ya que en aquellos casos en los que los microorganismos crecen rápidamente porque encuentran gran cantidad de nutrientes, la reacción se produce antes, dando lugar a un cambio de color en el sensor antes en el tiempo y más intenso para el mismo tiempo que en otros casos.

Se investigó el mecanismo de reacción que tuvo lugar, comprobando que microorganismos que generaban en su metabolismo indol daban la reacción positiva, sugiriendo que se trataba de un compuesto coloreado debido a la reacción química producida entre indol y vainillina. Sin embargo, microorganismos que no generan indol, como *Salmonella* y *Pseudomonas spp*, dieron también reacción positiva con la vainillina.

Se hicieron ensayos adicionales para demostrar la efectividad de la vainillina en la detección de microorganismos y descartar que el cambio de coloración se debiera a un cambio de pH o debido a la presencia de CO₂, procedente del metabolismo de los microorganismos. En estas pruebas se seleccionó como medio de cultivo Müller-Hinton, puesto que era el que generaba una reacción más rápida de cambio de color para todos los casos.

Efecto del CO₂

Los microorganismos en su crecimiento y respiración liberan CO₂. Debido a la abundancia y volatilidad de este compuesto se estudió el efecto que ejercía sobre el color desarrollado por las etiquetas impregnadas con vainillina.

Para ello se realizó la preparación de placas con medio de cultivo y etiquetas impregnada con la disolución de vainillina a estudiar, pero sin presencia de microorganismos. La incubación se realizó en jarras de anaerobiosis y en condiciones de anaerobiosis y microaerofilia, mediante la utilización de sobres generadores de estas atmósferas. Las placas no se sellaron en el interior de la jarra, para que pudiera penetrar el CO₂.

El ensayo se repitió por triplicado y se observó que pasados 50 días, a 37°C, en las placas con Müller-Hinton y el filtro conteniendo la vainillina no se produjo cambio de coloración en el disco.

Por lo que se concluyó que el cambio de color no es producido por la presencia de CO₂.

Efecto del pH

Se modificó el pH del medio superficialmente. Se añadió en tres placas ácido acético y en otras tres NaOH, y se observó el efecto que estos compuestos ácidos o bases podían ejercer sobre el sensor, en ausencia de microorganismos. Se observó que, pasados tres meses, no había ningún cambio de color. No existió contacto directo entre los filtros y los agentes acidificantes o basicantes.

En el siguiente ensayo, se añadió directamente el ácido y la base sobre el filtro, al que previamente se le había añadido vainillina. El resto de preparación de la placa fue para todos los casos idénticos, sin siembra de microorganismo. No se observó tampoco cambio de coloración.

Complementario a estos ensayos se añadió directamente el ácido y la base a la mezcla de etanol-vainillina, y con esta mezcla se impregnó el filtro que se colocó en las placas como en todos los ensayos realizados anteriormente.

Se observó que no existía ningún cambio de coloración en ninguno de los filtros pasado un mes. Por lo tanto se concluyó que el cambio de color del sensor no es producido por un cambio de pH. Tres meses después sigue sin producirse ningún cambio de color.

Sin embargo, cuando se modificó el pH del medio de cultivo intrínsecamente, pasados 5 días, se observó que se produjo un cambio de coloración en las muestras que estaban en fase vapor con el medio de pH 12 y pH 10 (figura 6).

El crecimiento de los microorganismos generó también una modificación en el pH final del medio, siendo pH básico con un valor alrededor de 10.

Análisis de los compuestos responsables del cambio de color

Se analizaron mediante técnicas cromatográficas la evolución de la vainillina y los nuevos compuestos aparecidos tras la reacción.

Para ver la evolución de la vainillina, se realizó un análisis por SPME (microextracción en fase sólida) y GC-MS (Cromatografía de gases-espectrometría de masas)

Como se puede observar (figura 7) tuvo lugar una disminución de la concentración de vainillina en todos los casos. Ésta disminución fue mayor para el caso de *S. aureus* y *S. choleraesuis*, que son además los microorganismos que provocan un cambio de color más rápido e intenso. Con esta técnica no se pudo detectar la presencia de nuevos compuestos responsables del cambio de coloración, ya que probablemente el compuesto coloreado generado no es volátil. Sin embargo disminuyó la concentración de vainillina, lo cual indica que tuvo lugar una reacción de ésta con un compuesto generado por el crecimiento de los microorganismos, provocando la aparición del nuevo compuesto coloreado.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Material que comprende un soporte sólido adsorbente parcialmente polar impregnado en una disolución que comprende vainillina.
2. Material según la reivindicación 1 **caracterizado** porque la disolución comprende etanol.
- 10 3. Material, según la reivindicación 2 **caracterizado** porque la vainillina está en una concentración de al menos el 10%.
4. Material, según la reivindicación 3 **caracterizado** porque la vainillina está en un rango de concentración del 10 al 50%.
- 15 5. Material, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, **caracterizado** porque el soporte es papel.
6. Empleo de un material, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, como sensor colorimétrico para la detección visual del crecimiento de microorganismos.
- 20 7. Empleo de un material, según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque la detección se lleva a cabo en fase de vapor sin contacto directo entre el material y los microorganismos.
8. Empleo de un material, según las reivindicaciones 6 ó 7, **caracterizado** porque el cambio de color es visualmente perceptible cuando la concentración de microorganismos es igual o superior a 10 ufc por ml o mg de alimento.
- 25 9. Empleo de un material según cualquiera de las reivindicaciones 6-8, **caracterizado** porque los microorganismos detectados son mohos, levaduras y/o bacterias.
10. Empleo de un material, según cualquiera de las reivindicaciones 6-9, **caracterizado** porque la detección de microorganismos se lleva a cabo en un producto envasado.
- 30 11. Empleo de un material, según la reivindicación anterior, **caracterizado** porque el producto envasado es un alimento, un producto farmacéutico o un producto cosmético.
- 35 12. Empleo de un material, según las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizado** porque el envase está formado por dicho material.
13. Empleo de un material, según las reivindicaciones 10 u 11, **caracterizado** porque dicho material se adhiere a la cara interna del envase del producto mediante un adhesivo.
- 40 14. Empleo de la vainillina en la fabricación de un material, según cualquiera de las reivindicaciones 1-5, como reactivo colorimétrico para la detección visual del crecimiento de microorganismos en fase de vapor.

45

50

55

60

65

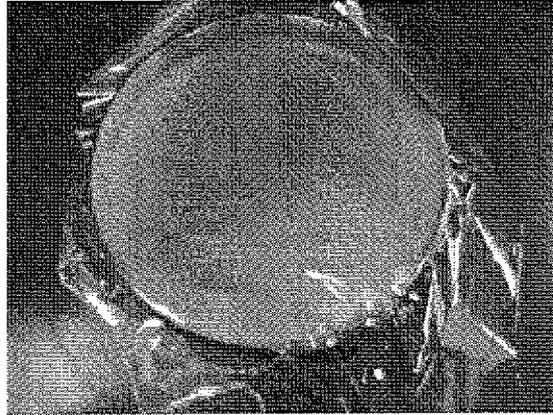


FIGURA 1

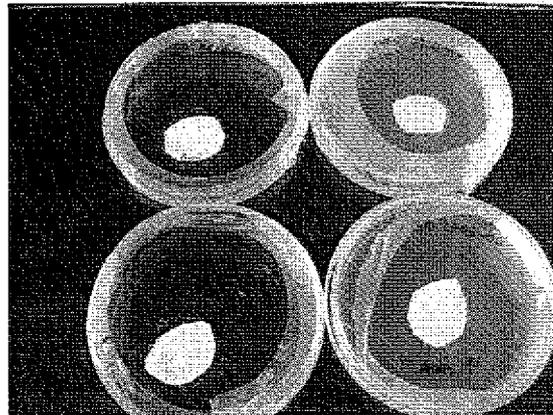


FIGURA 2

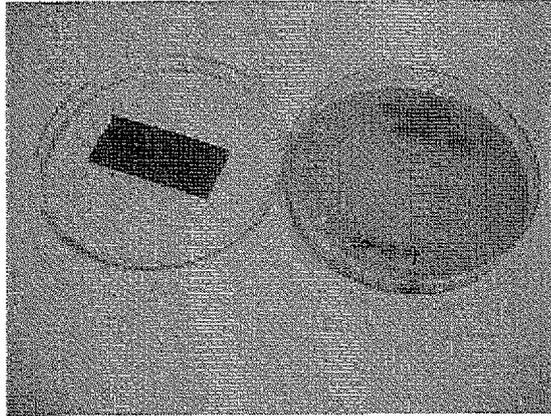


FIGURA 3

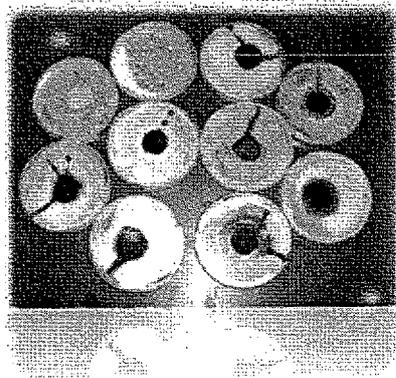


FIGURA 4

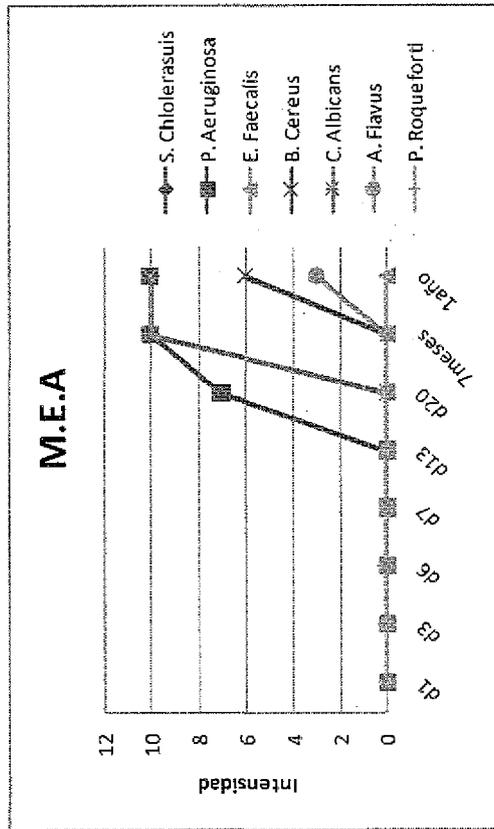
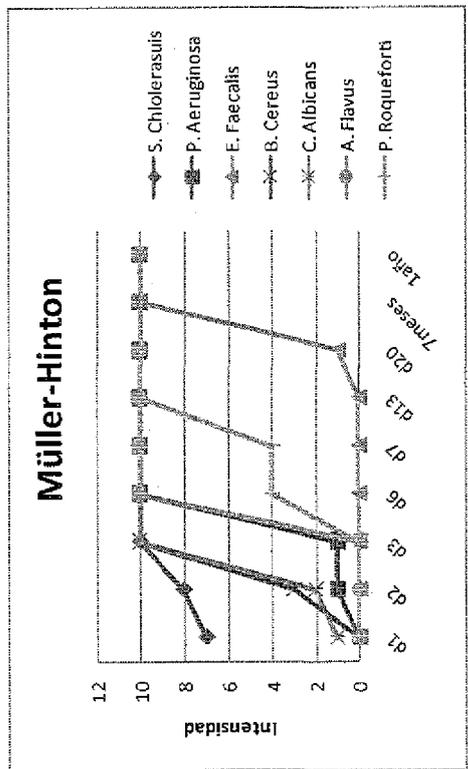
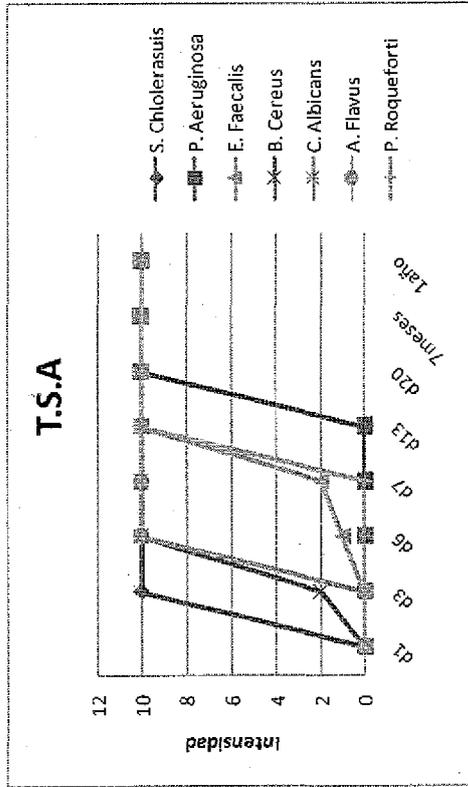


FIGURA 5

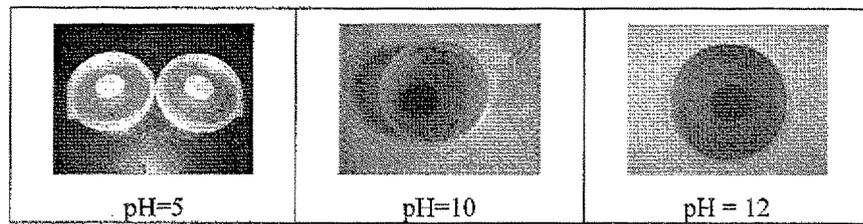


FIGURA 6

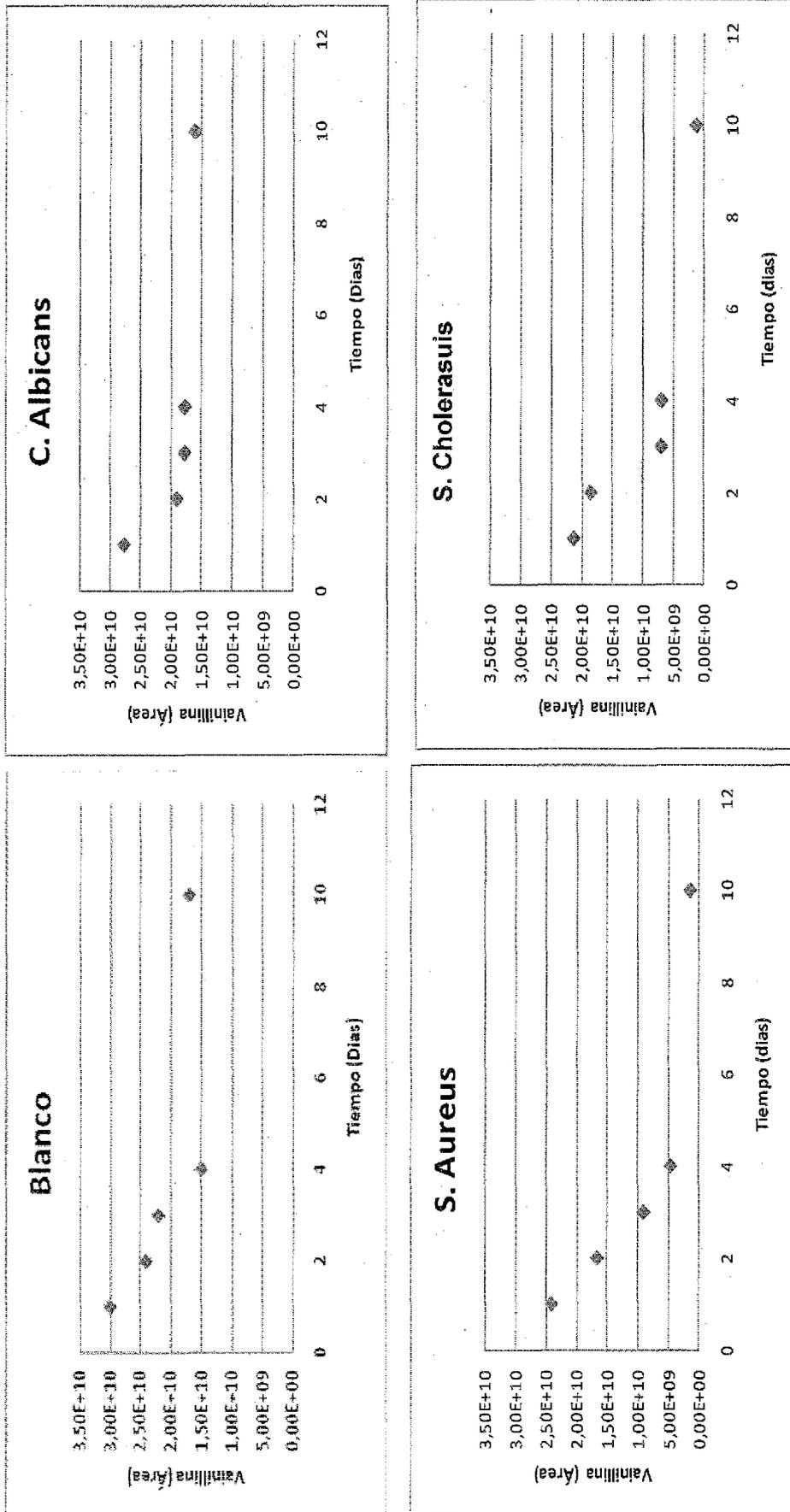


FIGURA 7



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 200930141

②② Fecha de presentación de la solicitud: 07.05.2009

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: **C12Q1/04** (01.01.2006)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WO 2006065350 A2 (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, INC) 22.06.2006, todo el documento.	1,6
A	WO 2008026119 A2 (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE) 06.03.2008, todo el documento.	1,6
A	US 20070264680 A1 (ALLEF et al.) 15.11.2007, todo el documento.	1,6

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
04.03.2011

Examinador
A. Amaro Roldan

Página
1/4

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C12Q

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 04.03.2011

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 1-14	SI
	Reivindicaciones	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	WO 2006065350 A2 (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, INC)	22.06.2006
D02	WO 2008026119 A2 (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE)	06.03.2008
D03	US 20070264680 A1 (ALLEF et al.)	15.11.2007

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente invención se refiere a un envase inteligente, fabricado de un material que comprende un soporte sólido adsorbente parcialmente polar impregnado de una disolución que comprende vainillina y que permite la detección visual del crecimiento de microorganismos en productos envasados alimenticios, farmacéuticos o cosméticos sin necesidad de estar en contacto directo con el microorganismo ni con el medio que lo contiene ya que la detección del microorganismo se lleva a cabo en fase de vapor.

D01 se refiere a un método para detectar cuantitativamente o semi-cuantitativamente la presencia de un microbio en una muestra, que comprende: a) poner en contacto el tinte de la prueba con la muestra para que dicho tinte pueda sufrir un cambio detectable de color; y b) comparar el color del tinte de la prueba correspondiente al control con el del color que se ha puesto en contacto con la muestra. El tinte preferido es entre otros la merocianina, que se forma a partir de la vainillina.

D02 se refiere a un sistema de contaminación por microbios. Dicho sistema alerta al usuario en el caso de contaminación del sistema por microbios. La señal gráfica se revela cuando un gráfico oscuro reacciona con el microbio contaminante y cambia de color o al menos pierde la transparencia. Este sistema de detección de microbios se puede utilizar de forma independiente o puede incorporarse a un artículo. También se describe el método de detección de microbios.

D03 se refiere a un kit para detectar rápidamente un grupo de organismos, cultivables o no, con los que comparte la misma actividad enzimática. En concreto, el kit y el método de detección se pueden utilizar por ejemplo en el campo de los cosméticos, en el que la actividad enzimática de los microbios, responsable del mal olor o la caspa, se detectan como indicadores de la presencia de grupos concretos de microorganismos. Además, el método es rápido, fácil de realizar y barato.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA

Los documentos citados solo muestran el estado general de la técnica y no se consideran de particular relevancia, ya que para una persona experta en la materia, no sería obvio aplicar las características de los documentos citados y llegar a la invención tal y como se menciona en las reivindicaciones 1-14. Por lo tanto, el objeto de la presente solicitud cumple los requisitos de novedad y de actividad inventiva de acuerdo con los Artículos 6-8 de la Ley de Patentes 11/1986.