

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 534 838**

51 Int. Cl.:

**C12Q 1/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.04.2010 E 10772046 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.01.2015 EP 2428580**

54 Título: **Envase inteligente para detectar microorganismos**

30 Prioridad:

**07.05.2009 ES 200930141**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**29.04.2015**

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA (100.0%)  
C/ Pedro Cerbuna 12  
50009 Zaragoza, ES**

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 534 838 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Envase inteligente para detectar microorganismos

**Campo de la invención**

5 La presente invención pertenece al campo alimentario, químico-farmacéutico y cosmético. Concretamente, se refiere a un nuevo envase que comprende un material que consiste en un soporte sólido adsorbente, parcialmente polar, impregnado con una solución de vainillina, y a su uso como sensor colorimétrico para detectar la presencia de microorganismos en alimentos, cosméticos o productos farmacéuticos.

**Antecedentes de la invención**

10 Todos los años, se producen innumerables casos de ingresos hospitalarios debidos a infecciones alimentarias provocadas por la presencia de microorganismos.

15 Por su parte, el consumidor del siglo XXI exige alimentos con una elevada calidad sensorial y alto valor nutricional, es decir, mínimamente procesados, en detrimento de los productos convencionales. Es evidente que la aplicación de condiciones de procesamiento menos drásticas conduce a un aumento de los riesgos microbiológicos y, por lo tanto, la variabilidad del comportamiento de los microorganismos resulta crítica, puesto que se deben conocer las posibilidades reales de supervivencia y desarrollo de los microorganismos residuales en cualquier producto con el fin de determinar con exactitud su vida útil o los peligros microbiológicos que el productor está dispuesto a asumir.

20 De hecho, el estudio de la incidencia y prevalencia de patógenos en los alimentos es una de las prioridades de la Unión Europea en lo que respecta a la seguridad alimentaria. Su finalidad es evaluar cuáles son los riesgos que existen verdaderamente en los alimentos, así como la adopción de criterios microbiológicos y objetivos de seguridad alimentaria para algunos tipos de alimentos.

25 En la actualidad, no existe en el mercado ningún material con componentes naturales que sea capaz de detectar visualmente la presencia de una amplia gama de microorganismos en productos envasados. Por lo tanto, ni el consumidor ni el comerciante minorista o distribuidor pueden determinar si los productos envasados están o no contaminados con microorganismos. En el caso de microorganismos patógenos, esta situación representa un importante riesgo para la salud. Para controlarlos, es necesario recurrir al examen microscópico y análisis microbiológicos, o sembrarlos en medios de cultivo selectivos, lo que implica un alto consumo de trabajo humano y de materiales. Adicionalmente, estos métodos son destructivos, lo que significa que el producto analizado ya no está disponible en la cadena comercial; exigen un consumo extremadamente alto de tiempo ya que, desde el momento en que se efectúa la siembra hasta que se lleva a cabo el recuento de microorganismos pueden transcurrir entre 2 y 30 7 días, independientemente del tiempo requerido para el preenriquecimiento. Asimismo, estos ensayos suponen un costo importante para el laboratorio. En cualquier caso, estos ensayos se llevan a cabo de forma aleatoria sobre un número representativo de muestras, pero en ningún caso se pueden realizar sobre todas las unidades de todos los artículos alimentarios, de manera que siempre existe el riesgo potencial de contaminación microbiana en un producto que no sea detectada por el fabricante ni el consumidor final. En el caso de productos farmacéuticos, el riesgo es mucho mayor, puesto que la existencia de un problema de esta clase sólo se detecta cuando el daño, a menudo irreparable, ya se ha producido.

40 A lo largo de los últimos años, los sistemas de envasado de alimentos han evolucionado en respuesta a las demandas de los consumidores en términos de caducidad, conservación de sus propiedades, frescura, aspecto, etc. Por una parte, los actuales métodos de marketing exigen un envase atractivo, capaz de comunicar algo al consumidor para que este adquiera el producto. En segundo lugar, los envases han evolucionado con los años como respuesta a cambios profundos en el estilo de vida, y la industria del envasado ha tenido que adaptarse a esos cambios.

Entre otras, los envases deben cumplir las siguientes funciones:

- 45
- mantener el alimento,
  - proteger el alimento contra acciones físicas, químicas y microbiológicas,
  - conservar la calidad y la salubridad del alimento,
  - impedir fraudes,
  - acondicionar el producto para la manipulación comercial,
  - exhibir e identificar el producto,
  - 50 • informar al consumidor de las características del alimento,
  - prolongar su vida útil, etc.

Últimamente, debido a nuevos requisitos en las demandas del consumidor, han surgido dos conceptos nuevos de envasado, el envasado activo y el envasado inteligente. Los envasados activo e inteligente se pueden considerar como la siguiente generación en el envasado alimentario.

De acuerdo con la Directiva Europea 1935/2004, los materiales y artículos activos en contacto con los alimentos se definen como aquellos cuya finalidad es prolongar la vida útil o mantener o mejorar las condiciones del alimento envasado, y que están diseñados para incorporar deliberadamente componentes que transmiten sustancias al alimento envasado o a su ambiente, o que absorben sustancias del alimento envasado o de su ambiente. En años recientes, se han producido importantes desarrollos en el campo del envasado activo, con un mayor número de publicaciones que se refieren a este asunto (Rodríguez, A., Battle, R., Nerín, C. (2007), "The use of natural oils as antimicrobial solutions essential in paper packaging. Parte 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 y 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 lo que respecta al envasado inteligente, los objetivos son diferentes, lo cual justifica su separación con una designación especial. Su acción permite el desarrollo de una aspiración soñada por las pretensiones del consumidor moderno, en la cual el propio envase ofrece información acerca de la calidad del producto que contiene o de sucesos que han marcado su procesamiento, actuando como testigo de un posible deterioro o degradación, así como de una conservación, transporte o distribución inadecuados. De acuerdo con la Directiva 1935/2004, los envases inteligentes se definen como aquellos materiales que controlan las condiciones del alimento envasado o del ambiente que lo rodea.

Se clasificarán como "envases inteligentes" aquellos que utilizan las propiedades o los componentes del alimento o de algún material de envasado como indicadores de la calidad y la historia del producto; hasta el momento, se trata esencialmente de indicadores de tiempo-temperatura, indicadores de calidad microbiológica e indicadores de oxígeno o dióxido de carbono.

Por lo tanto, el envase inteligente se define como el que monitoriza las condiciones del alimento envasado, proporcionando información acerca de la calidad del alimento envasado durante el transporte y almacenamiento, en donde dichas condiciones del alimento significan:

- procesos fisiológicos (respiración de frutas y vegetales frescos)
- procesos químicos (oxidación de lípidos)
- procesos físicos (endurecimiento del pan, deshidratación)
- aspectos microbiológicos (dañado por microorganismos), e
- infección (por insectos).

Estos envases son de gran interés en la industria alimentaria y prueba de ello es el importante esfuerzo que se lleva a cabo actualmente en el desarrollo e investigación de este tipo de envasado.

Dentro de este grupo se encuentran los envases portadores de etiquetas, tintes o esmaltes, que se usan como indicadores de la calidad, seguridad o tratamiento del producto envasado. Se basan en reacciones físico-químicas, enzimáticas o de otro tipo que generalmente conducen a un cambio de color del dispositivo que indica que el alimento ha experimentado un daño o modificación.

De este modo, se puede empezar a aprovechar la posibilidad de utilizar la interacción entre el alimento y el envase como un factor positivo, es decir, bloqueando o inhibiendo las causas del deterioro del alimento.

Muchos de los indicadores inteligentes existentes son muy útiles para la industria del envasado de alimentos tales como los indicadores de tiempo-temperatura, integridad del envase, crecimiento microbiano, autenticidad del envase, etc. Muchos de ellos son sistemas patentados, pero pocos son comerciales, muy en particular los indicadores de tiempo-temperatura.

No se encuentran demasiadas referencias bibliográficas relacionadas con el desarrollo de envases inteligentes que sean capaces de detectar de manera rápida y segura la presencia de microorganismos en el alimento en el momento de su adquisición o ingesta. Dado que el consumo de alimentos deteriorados, desde el punto de vista microbiológico, es una de las principales causas de enfermedad (intoxicación alimentaria), es importante detectar de manera precoz, es decir, antes de la ingesta, los productos envasados que estén infectados. De esta forma, el vendedor puede retirarlos a tiempo y el consumidor puede evitar la ingesta, sin riesgos para la salud.

Los desarrollos descritos en relación con este tipo de envases inteligentes requieren un contacto directo entre el microorganismo y el sensor que actúa como envase inteligente, tal como en las patentes EP1326653, WO03093784, WO2008026119 (Kimberly-Clark Worldwide, Inc.), en las que se usa un detector cromogénico, o la patente WO0013009 (Johnson Matthey Public Limited Company), en la que se emplean complejos metálicos como soportes de reacción. En el documento *Desbordes, J:CONIVE, L. Prevot. A. Annales Françaises Pharmaceutiques* 1972, 30 (7-8), 507-518, se utiliza una reacción coloreada con vainillina en ácidos sulfúrico y fosfórico para identificar la presencia de lípidos en estudios bacterianos y, por último, identificar los ácidos grasos por cromatografía de capa fina y cromatografía de gases. También en este desarrollo es necesario el contacto directo entre la bacteria y el

reactivo para producir la reacción. Adicionalmente, el sistema de fabricación de esta clase de sensores es altamente complejo lo cual dificulta su producción a escala industrial. Asimismo, el mecanismo de actuación es complejo y requiere, en primer lugar, la generación de un compuesto coloreado que desaparecerá al entrar en contacto con microorganismos. Además, los compuestos usados como cromógenos son compuestos químicos que, en algunos casos, necesitan condiciones especiales tales como acidificación, o compuestos químicos complejos para que la reacción tenga lugar, muchos de los cuales no pueden ser utilizados hoy en día en contacto con alimentos o muestran limitaciones importantes de su concentración. En ningún caso se emplean compuestos naturales como compuestos cromogénicos principales y, mucho menos, compuestos aceptados como aditivos alimentarios, con los beneficios tecnológicos y de salubridad que ello implica.

Teniendo en cuenta las deficiencias de los envases descritos hasta la fecha, los autores de la presente invención han desarrollado, después de una investigación considerable, un nuevo material que comprende un soporte sólido adsorbente, parcialmente polar, impregnado en una solución de vainillina, que se puede utilizar como sensor colorimétrico para detectar microorganismos en productos envasados de diferente naturaleza.

De manera conveniente, la vainillina (3-metoxi-4-hidroxibenzaldehído), autorizada como aditivo alimentario, permite detectar el crecimiento de microorganismos a través de una reacción cromogénica sencilla y fácilmente identificable. También actúa sobre el sensor sin necesidad de estar en contacto directo con el producto alimentario o envasado, si bien para tener lugar requiere la presencia de una pequeña concentración de humedad en la fase de vapor.

La vainillina es un compuesto natural presente en muchos vegetales, especialmente en la vaina de la vainilla. Se obtiene industrialmente a partir de eugenol, el componente 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 usa abundantemente como agente aromatizante en alimentos, en especial en repostería. También se utiliza en la industria farmacéutica como estimulante gástrico, y en perfumería.

En el estado de la técnica hay algunas referencias bibliográficas que citan también el uso de vainillina como precursor de otros reactivos, pero exige un tiempo de síntesis prolongado y mezclarse con disolventes tales como etanol y reactivos tales 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 requiere la presencia de otro compuesto en la reacción para que se lleve a cabo el cambio de color.

Otros métodos que utilizan la vainillina como detector de la presencia de microorganismos necesitan acidificar fuertemente el medio con HCl, con los inconvenientes que comporta; asimismo, sólo son capaces de detectar la presencia de los microorganismos capaces de producir indol. De esta forma, el documento Ferlin, H.J. y Karabiner (J.V. *Euclides* 1954, 14, 345-353) describe un medio que contiene triptófano como fuente para aislar *E. coli* y *P. vulgaris* de muestras, basándose en las diferencias de producción de indol a partir de triptófano. Junto con esto, los autores desarrollaron también un reactivo para realizar la prueba de indol. Bajo estas condiciones, usaron la adición de una solución de vainillina al 0,25% en ácido clorhídrico concentrado para producir un color violeta con indol, por contacto directo y en fase líquida. Esto significa que los microorganismos productores de indol debían estar presentes en dicha solución, generando el indol que da lugar a la reacción cromogénica.

#### Breves comentarios sobre el estado de la técnica

El documento JP 7289290 describe un método que trata sobre un proceso de oxidación de creosota, acelerado por catalizadores, y la degradación de microorganismos causada por la creosota y por compuestos clorados. La creosota se degrada en la reacción con *Pseudomonas*. El contacto directo entre algunas *Pseudomonas* y la creosota determina la degradación de diversos derivados de fenol y da como resultado una reacción de color claramente visible para el ojo humano. Siempre se necesita creosota, que es un producto químico obtenido por la destilación del alquitrán, y que es notablemente útil por sus propiedades antisépticas y conservantes. Sin embargo, esta sustancia en ningún caso puede ser de utilidad ni se puede permitir que entre en contacto con alimentos. Además, según el método descrito en el documento JP 7289290, se requiere el contacto físico directo del objeto que se debe inspeccionar o controlar. La vainillina se menciona solamente como un compuesto posiblemente presente en la degradación de la creosota.

El documento WO2008026119A2 se basa en el mismo principio, las mismas tinciones, el mismo modo de acción y aplicaciones similares, centrado fundamentalmente en la detección de la contaminación microbiana de superficies por contacto directo, y se basa en la detección de bacterias mediante una tinción derivada de merocianina.

El documento US2006134728A1 se refiere a un sistema para detectar microbios, es decir, bacterias, hongos, levaduras y virus. El sistema consiste en teñir las células microbianas con una tinción o colorante que es retenido por las células y refuerza el color. No hay ninguna reacción química con metabolitos, aunque los autores no reivindican un mecanismo concreto para demostrar la reacción entre la tinción y los microbios. Sin embargo, no hay contacto directo con los microorganismos y no se produce ninguna reacción ni cambio de color.

El documento US4900681A describe un método para la detección de hidrazina, que es un compuesto muy tóxico. La reacción de detección es de tipo colorimétrico y utiliza vainillina y varios aldehídos aromáticos como reactivos para

producir el color. El color final es amarillo y existen diversos grados de color en torno a la mancha central de hidrazina. Se trata de una reacción química bien conocida en la que el producto final es hidrazina. La hidrazina (denominada también diazano) es un compuesto inorgánico con la fórmula  $N_2H_4$ . Es un líquido inflamable incoloro con olor similar al del amoníaco. Ya sólo este hecho sería suficiente para excluir su empleo en alimentos que se ingerirán posteriormente.

A la luz de estos inconvenientes, una de las principales ventajas de la presente invención es precisamente el uso de un aditivo alimentario que es un compuesto natural inocuo como la vainillina, y la capacidad para detectar la presencia de microorganismos sin la necesidad de un contacto directo entre el microorganismo y el material envasado.

Su aplicación está dirigida a solucionar un problema que representa un riesgo importante para la sociedad como es la presencia de microorganismos patógenos en productos alimenticios, cosméticos y farmacéuticos, o en otros productos envasados.

El material desarrollado se incorpora en el envase para alimentos u otros productos susceptibles de experimentar contaminación por microorganismos, de modo que por medio de un cambio de color fácilmente identificable (desde incoloro a púrpura) el consumidor está en posición de rechazar el producto y evitar la ingesta del alimento o el uso de productos infectados y contaminados con microorganismos perjudiciales para la salud.

Por otra parte, se trata de un sistema que contribuye de forma importante al control de calidad de productos envasados al permitir la retirada a tiempo de lotes contaminados y evitar así que lleguen al consumidor final, así como los problemas y costos adicionales de las posibles devoluciones. Los sectores que intervienen en el desarrollo e implementación de este nuevo dispositivo serían, por una parte, la industria del envasado, que sería responsable de la fabricación y lanzamiento al mercado de estos envases y, por otra parte, las industrias alimentaria, cosmética y farmacéutica. Este sector debe intervenir en la optimización de la localización del material situado en el interior del envase, teniendo en consideración el proceso de envasado industrial, con el fin de lograr una situación fácilmente visible para el usuario final que no interfiera con el producto envasado ni impida el citado proceso de envasado industrial.

La ventaja principal de usar un envase con un sensor según esta invención es la posibilidad que ofrece al consumidor de conocer que el alimento que va a comer o el producto que va a utilizar está libre de microorganismos en el momento de la adquisición e ingestión del mismo y, por consiguiente, poder rehusar su consumo y rechazar el producto.

### Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Aplicación del material sensor del envase en una película de polipropileno. Cultivo de *E. coli*.

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

Figura 3. Aplicación del material sensor del envase en una etiqueta de papel adhesivo. Cultivo de *E. coli*.

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

Figura 5. Gráfico de los días necesarios para alcanzar la coloración en medios diferentes (Müller-Hinton, TSA, MEA.) para diferentes microorganismos.

Figura 6. Aplicación del envase provisto con este material sensor a un filtro de papel a diferentes valores de pH, en un cultivo libre de microorganismos, medio de Müller-Hinton.

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

### Objeto de la invención

En primer lugar, un objeto de la invención es crear un envase que permita la detección de microorganismos tales como bacterias, hongos y levaduras en alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos, sin la necesidad de un contacto directo con dichos alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos.

Un objeto adicional de la invención es el uso de dicho envase de forma que indique de manera visible si la concentración de microorganismos en alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos aumenta a más de 10 ufc por ml o mg.

Por último, es también objeto de la invención la enseñanza de un reactivo colorimétrico para detectar visualmente el crecimiento de microorganismos en la fase de vapor.

**Compendio de la invención**

- 5 El primer objeto de la invención se resuelve con un envase para alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos para detectar el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras en alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos, sin necesidad de un contacto directo con dichos alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos contenidos en la atmósfera gaseosa interior de este envase, que se distingue por que este envase está fabricado con un material transparente e incoloro, además de por comprender un sensor en forma de un soporte sólido adsorbente, parcialmente polar, capaz de absorber humedad, con una capa superficial que contiene vainillina, en donde dicho sensor está unido a la cara interior de dicho envase y es visible desde el exterior del mismo, para indicar mediante el cambio de color de este sensor visible la presencia de microbios en los alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos envasados.
- 10 El segundo objeto de la invención se resuelve con el uso de un envase para alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores como sensor colorimétrico para detectar visualmente el crecimiento de microorganismos en alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos en la fase de vapor, es decir, sin un contacto directo entre el material y los microorganismos cuya presencia se debe detectar en los alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos, en donde el cambio de color es visualmente apreciable desde el exterior del envase cuando la concentración de microorganismos es igual o mayor que 10 ufc por ml o mg de alimento.
- 15 El tercer objeto de la invención se resuelve con el uso de vainillina como reactivo colorimétrico para detectar visualmente el crecimiento de microorganismos en la fase de vapor.
- 20 Por consiguiente, la presente invención contempla un nuevo envase inteligente, diseñado a partir de un material nuevo que permite la detección visual del crecimiento de microorganismos en productos de diferente naturaleza, sin estar en contacto directo con el organismo ni el medio que lo contiene.
- De esta forma, en un aspecto principal de la invención, se contempla dicho envase que comprende un soporte sólido adsorbente, parcialmente polar, impregnado con una solución que comprende vainillina.
- 25 La presencia de vainillina en la composición del material en el interior del envase permite detectar el crecimiento de microorganismos por medio de una reacción cromogénica sencilla y fácilmente reconocible. El cambio de color (de incoloro a púrpura) bajo las condiciones de ensayo se relaciona claramente con la presencia de microorganismos, tanto en cultivos puros llevados a cabo en placas Petri, como en alimentos tales como, por ejemplo, mayonesa casera sin conservantes, en medicamentos o cosméticos.
- 30 La vainillina es un compuesto natural que reacciona en presencia de microorganismos. En ausencia de vainillina no se produce la reacción de coloración. La reacción es irreversible y el color producido aumenta de intensidad a medida que continúa el crecimiento de microorganismos.
- 35 En una realización particular, la solución de vainillina comprende etanol. La concentración mínima de vainillina necesaria para hacer visible la reacción de coloración es de 10% en etanol, preferiblemente una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 50% de vainillina en etanol.
- Para ser visible, duradera e irreversible y servir, por lo tanto, como detector colorimétrico, la reacción requiere un medio acuoso o al menos humedad. Por consiguiente, el soporte sólido debe estar formado por un material adsorbente parcialmente polar, capaz de retener la humedad liberada por el propio alimento en la fase de vapor, usando preferiblemente papel o cartón.
- 40 En el caso de incorporar la vainillina en un medio hidrófobo, la reacción no sería permanente porque la humedad se condensaría en el sustrato hidrófobo y, aun cuando también se produciría la coloración, esta no se mantendría debido a que la gota de condensación caería debido a la fuerza de gravedad. Por lo tanto, no sería un sustrato irreversible y estable.
- 45 Tal como se ha mencionado anteriormente, las características descritas de la invención la hacen apropiada para la detección visual del crecimiento microbiano; por consiguiente, en otro aspecto clave de la invención, se contempla el uso de este nuevo material como sensor colorimétrico para la detección visual de la presencia de microorganismos.
- La reacción del sensor del envase tiene lugar en la fase de vapor, por lo que la vainillina no necesita estar en contacto directo con el microorganismo ni con el medio que lo contiene. De este modo, el sensor y los microorganismos en el interior del envase pueden estar separados entre sí, y el único contacto entre ellos se efectúa a través de la fase de vapor.
- 50 El hecho de que el sensor de este envase no requiera contacto directo con el microorganismo es muy ventajoso y representa una diferencia importante con respecto a los sensores descritos en el estado de la técnica, puesto que de esta forma los compuestos exhalados por los microorganismos durante su metabolismo alcanzan la fase de vapor y, a través de la misma, llegan al sensor donde tiene lugar la reacción cromogénica. Esto permite situar el sensor en una pestaña o adherido al envase, o formando parte del mismo, pero a distancia. Asimismo, tiene la ventaja de que,
- 55

bajo estas condiciones, es decir, al actuar en la fase de vapor, es capaz de responder a la presencia de microorganismos en cualquier parte del producto, sin estar limitado a una fracción o porción de este como sucede cuando es necesario el contacto directo.

5 Además, el hecho de que el cambio de color se produzca debido a la transferencia o difusión de compuestos desde los microorganismos en la fase de vapor puede proporcionar una alta sensibilidad, lo que significa que el sensor responde a la aparición de las primeras colonias de microorganismos en el medio.

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

El sensor del envase permite detectar visualmente el crecimiento de una extensa gama de microorganismos tales como hongos, levaduras y/o bacterias.

15 Todos los microorganismos que producen indol en su metabolismo reaccionan con la vainillina. Además, otros organismos que no producen indol en su metabolismo tales como especies de *Salmonella* y *Pseudomonas*, también producen resultados positivos a la reacción de identificación con vainillina, por lo que la reacción no sería específicamente de "indol-vainillina", sino que podría definirse como una reacción más genérica de "compuestos de nitrógeno-vainillina".

20 La detección de microorganismos a través del envase inteligente y su sensor, o sistema según la invención, se puede llevar a cabo en un producto que ya esté envasado. El producto envasado puede ser de naturaleza variable y, preferiblemente, es un producto alimentario, farmacéutico o cosmético.

25 De esta manera, en realizaciones particulares, el envase inteligente que incorpora un sensor de este tipo se puede diseñar como un material de envasado en sí mismo, o el sensor se puede aplicar al envase en forma de etiqueta sobre una base de papel, preferiblemente en formato autoadhesivo, situada en la cara interna del envase, que puede ser de plástico u otro material, de modo que esté expuesta a la atmósfera generada en el interior del envase. El envase debe ser de material transparente e incoloro en esa zona para permitir visualizar el cambio de color que se producirá en presencia de microorganismos.

Por último, otro aspecto importante de la invención contempla el uso de vainillina como reactivo colorimétrico para detectar visualmente el crecimiento de microorganismos en la fase de vapor, es decir, sin contacto directo entre la vainillina y el microorganismo.

### 30 Ejemplos

Se ha estudiado la actividad del sensor situado sobre materiales de sustrato y bajo condiciones experimentales diferentes. Esto ha permitido una clara visualización del funcionamiento del sensor a nivel macroscópico.

35 Figura 1 muestra la aplicación de una película de polipropileno (PP) impregnada con una solución de vainillina en un cultivo de *E. coli*. Aunque la formulación utilizada fue la adecuada para el diseño de este sensor, no se observó cambio de color. El motivo de la falta de respuesta (cambio de color) es que el sensor no absorbió la humedad de los compuestos o, lo que es lo mismo, la reacción con la formulación que contiene vainillina no se retuvo en el sustrato, dado que fue un medio no polar empapado en el polipropileno (PP). De hecho, se observó un halo coloreado que cubrió el PP, pero finalmente sufrió condensación y se desprendió de la película, por lo que se considera que este sustrato no polar no resulta válido para ser usado como soporte para el sensor.

40 Figura 2 muestra que se llevaron a cabo ensayos en blanco (sin microorganismos), utilizando diversos filtros de soporte de papel empapados con la solución de vainillina, en presencia de medios de cultivo (columna izquierda) y en ausencia de medios de cultivo (columna derecha). Se demostró que en ausencia de microorganismos, la presencia de un medio de cultivo no es suficiente para desencadenar la reacción.

45 Figura 3 muestra la aplicación del material sensor de la invención a una etiqueta autoadhesiva para detectar la presencia de microorganismos en un cultivo de *E. coli*, en donde se observó el cambio de color del sensor.

Figura 4 muestra la aplicación del material sensor a diversos filtros de papel en diferentes cultivos de *E. coli* y en un cultivo en blanco, es decir, sin microorganismos. El medio de cultivo fue de Müller-Hinton. Se observó que se produjo coloración en todos los cultivos de *E. coli*, en tanto que en el único cultivo en blanco no se desarrolló coloración.

50 Como ampliación del estudio, se evaluó el comportamiento del material de la invención frente a una extensa gama de microorganismos, con el fin de determinar la concentración mínima necesaria para que el sensor actúe de manera adecuada.

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

Hongos

- *Aspergillus flavus* (Colección Española de Cultivos Tipo, CECT, 2687)
- *Penicillium roqueforti* (Colección de Cultivos de Hongos, IBT, 21319)
- *Eurotium repens* (IBT 1800)
- *Penicillium islandicum* (CECT 2762)
- *Penicillium ammune* (IBT 21314)
- *Penicillium expansum*
- *Penicillium nalgiovensis*

Levaduras

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

Bacterias

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

Tanto entre las bacterias como en hongos y levaduras se observaron reacciones positivas. La Tabla 1 muestra los microorganismos analizados que dieron reacciones positivas y los casos en los que se puede expresar claramente el valor de la concentración de microorganismos, dependiendo de la concentración de microorganismos inoculados y del tiempo necesario para el cambio de color en el sensor.

Tabla 1. Cambio de color con respecto a la concentración

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

MCC: Concentración mínima inoculada; MCD: Concentración mínima detectable

Los estudios se completaron analizando el efecto de diferentes medios de cultivo sobre el cambio de color del sustrato adsorbente que contiene el sensor. Debido al elevado consumo de recursos, los autores seleccionaron dos microorganismos como representantes de cada grupo y tres medios de cultivo genéricos que permiten el crecimiento de todos los microorganismos, pero con diferente contenido de la fuente de proteínas como característica de



diferenciación. Los medios seleccionados fueron Müller-Hinton (M.H.), Agar Extracto de Malta (M.E.A.) y T.S.A. (Agar Triptona de Soja). El periodo de estudio se prolongó durante un año. Las tablas siguientes (2 y 3) resumen los microorganismos y medios de cultivo seleccionados. Las diferencias en la composición de los medios de cultivo representan diferentes concentraciones de nutrientes y simulan, de este modo, la situación existente en los alimentos, en la que los nutrientes para los microorganismos serán diferentes en cada caso.

Tabla 2. Microorganismos

GRUPO	MICROORGANISMOS	MEDIO DE CULTIVO
GRAM-POSITIVOS	<i>B. cereus</i> y <i>E. faecalis</i>	M.H., MEA y TSA
GRAM-NEGATIVOS	<i>P. aeruginosa</i> y <i>S. choleraesuis</i>	M.H., MEA y TSA
LEVADURAS	<i>C. albicans</i>	M.H., MEA y TSA
HONGOS	<i>A. flavus</i> y <i>P. roqueforti</i>	M.H., MEA y TSA

Tabla 3. Composición de los diferentes medios de cultivo utilizados

	MÜLLER-HINTON	TSA	AGAR DEXTROSA SABOURAUD	MEA
	Almidón 1,5 g	Cloruro sódico 5 g	D(+)-glucosa 40 g	Extracto de malta 13 g
	Infusión de carne de vacuno 2 g	Peptona de caseína 15 g	Cloranfenicol 50 mg	Dextrina 2,5 g
	Peptona de caseína hidrolizada	Peptona de soja 5 g	Mezcla de peptonas 10 g	Peptona de gelatina 5 g
		Agar 15 g	Agar 1 g	Agar 15 g
pH final	7,2	7,3 ± 0,2		5,5 ± 0,2

10 Los gráficos de la Figura 5 muestran el número de días necesarios para que el filtro alcanzara un color final, sustancialmente negro (púrpura o violeto muy intenso) para los diferentes microorganismos en los distintos medios de cultivo estudiados. En función de la concentración de los microorganismos se observa una intensificación del color.

15 De acuerdo con este estudio, se llegó a la conclusión de que el medio de cultivo en el que se produce crecimiento de microorganismos afecta de manera significativa al cambio de color. Este cambio fue más rápido en el medio de Müller-Hinton con un contenido mayor de compuestos de nitrógeno, seguido por TSA y MEA, en donde el cambio fue mucho más lento.

20 La diferencia principal entre estos medios es el contenido de compuestos de nitrógeno. En el caso del medio de Müller-Hinton, la carne de vacuno y la caseína proporcionan compuestos de nitrógeno, vitaminas, carbono, azufre y aminoácidos. Para el TSA, la digestión enzimática de habas de soja proporciona nitrógeno, vitaminas y minerales, en tanto que MEA tiene un alto contenido de polisacáridos y como única fuente de nitrógeno tiene peptona, en cantidades menores que las registradas en los otros dos medios. Esto afecta a la intensidad de la reacción que se produce con la vainillina y, por consiguiente, al cambio de color, puesto que los casos en los que los microorganismos crecen rápidamente gracias a que disponen de una gran cantidad de nutrientes, la reacción se produce antes, dando lugar al cambio de color en el sensor de manera más temprana en el tiempo y con mayor intensidad para el mismo periodo de tiempo que en otros casos.

25 Los presentes inventores investigaron el mecanismo de reacción que se produjo, demostrando que los microorganismos que generan indol en su metabolismo tuvieron una reacción positiva, indicando que fue un compuesto coloreado debido a la reacción química entre indol y vainillina. Sin embargo, los microorganismos que no producen indol tales como las especies de *Salmonella* y *Pseudomonas* también dieron una reacción positiva con vainillina.

30 Se llevaron a cabo ensayos adicionales para determinar la eficacia de vainillina en la detección de microorganismos y para excluir que el cambio de coloración fuera debido a un cambio de pH o a la presencia de CO<sub>2</sub> del metabolismo de los microorganismos. En estos ensayos, los presentes inventores seleccionaron como medio de cultivo el de Müller-Hinton dado que fue el que generó la reacción de cambio de color más rápida en todos los casos.

35

Efecto del CO<sub>2</sub>:

Los microorganismos liberan CO<sub>2</sub> con el crecimiento y la respiración. Debido a la abundancia y volatilidad de este compuesto, los presentes inventores estudiaron el efecto que tiene sobre el color desarrollado por etiquetas impregnadas con vainillina.

5 Para lograrlo, se prepararon placas de medio de cultivo y etiquetas impregnadas con la solución de vainillina a estudiar, pero sin la presencia de microorganismos. La incubación se efectuó en jarras anaeróbicas y bajo condiciones anaeróbicas y microaerófilas, empleando sobres que generan estas atmósferas. Las placas no se sellaron en el interior de la jarra, de forma que el CO<sub>2</sub> pudo penetrar.

10 El ensayo se repitió por triplicado y mostró que después de 50 días a 37°C, en las placas de Müller-Hinton y el filtro que contenía vainillina no se produjo ningún cambio de color en el disco.

Por lo tanto, se concluyó que el cambio de color no está causado por la presencia de CO<sub>2</sub>.

Efecto del pH:

15 El pH del medio se modificó superficialmente. Se agregó ácido acético a tres placas y NaOH a otras tres y se observó el efecto que estos compuestos ácidos o básicos tuvieron sobre el sensor, en ausencia de microorganismos. Al cabo de tres meses no se observó ningún cambio de color. No hubo contacto directo entre los filtros y los agentes de acidificación o basificación.

En el ensayo siguiente, el ácido y la base se agregaron directamente al filtro, al cual había añadido vainillina previamente. El resto de la preparación de las placas fue idéntico en todos los casos, sin siembra de microorganismos. Tampoco se produjo un cambio de color.

20 Como complemento a estos ensayos, el ácido y la base se agregaron a la mezcla de etanol-vainillina, el filtro se impregnó con esta mezcla y se situó sobre las placas como en todos los ensayos anteriores.

Al cabo de un mes se observó que no hubo cambio de color en ninguno de los filtros. Por consiguiente, los presentes inventores llegaron a la conclusión de que el cambio de color del sensor no se produce por una variación del pH. Tres meses más tarde seguía sin producirse cambio de color.

25 Sin embargo, cuando se modificó de forma intrínseca el pH del medio de cultivo después de 5 días, se observó la aparición de un cambio de color en las muestras que se encontraban en la fase de vapor con el medio de pH 12 y pH 10 (Figura 6).

El crecimiento de microorganismos también generó un cambio del pH final del medio, siendo el valor de pH básico de aproximadamente 10.

30 Análisis de los compuestos responsables del cambio de color

La evolución de la vainillina y de los nuevos compuestos que aparecieron después de la reacción se analizaron por técnicas cromatográficas.

Para evaluar la evolución de vainillina, se llevaron a cabo análisis de SPME (microextracción en fase sólida) y GC-MS (cromatografía de gases-espectrometría de masa).

35 Tal como se puede ver (Figura 7), en todos los casos se produjo un descenso de la concentración de vainillina. Este descenso fue mayor en los casos de *S. aureus* y *S. choleraesuis*, que son también los microorganismos que provocan un cambio de color más rápido e intenso. Con esta técnica, los inventores no pudieron detectar la presencia de nuevos compuestos responsables del cambio de color, probablemente porque el compuesto coloreado no es volátil.

40 No obstante, la concentración de vainillina disminuyó, lo que indica que tuvo lugar una reacción de la misma con un compuesto generado por el crecimiento de los microorganismos, determinando la aparición del nuevo compuesto coloreado.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Envase para alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos para detectar el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras en alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos, sin necesidad de un contacto directo de dichos alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos contenidos en la atmósfera gaseosa interior de dicho envase, caracterizado por que este envase está fabricado con un material transparente e incoloro y, además, por que comprende un sensor en forma de un soporte sólido adsorbente, parcialmente polar, capaz de absorber humedad, con una capa superficial que contiene vainillina, en donde dicho sensor se fija a la cara interna de dicho envase y es visible desde el exterior del envase para indicar por medio del cambio de color de este sensor visible la presencia de microbios en los alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos envasados.
- 10 2. Envase para alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos según la reivindicación 1, caracterizado por que la capa superficial del sensor es una capa impregnada en etanol y al menos vainillina al 10%.
- 15 3. Envase para alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos según la reivindicación 1, caracterizado por que la capa superficial del sensor es una capa impregnada en etanol con vainillina en una concentración de 10% a 50% de vainillina.
4. Envase para alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el soporte sólido adsorbente, parcialmente polar, es papel con un adhesivo para su fijación.
- 20 5. Uso de un envase para alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos según cualquiera de las reivindicaciones anteriores como sensor colorimétrico para la detección visual del crecimiento de microorganismos en alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos en la fase de vapor, es decir, sin un contacto directo entre el material y los microorganismos en los alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos que se deben analizar, en donde el cambio de color es apreciable visualmente desde el exterior del envase cuando la concentración de microorganismos es igual o mayor que 10 ufc por ml o mg de alimento.
- 25 6. Uso de un envase para alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos según la reivindicación 5, para la detección de hongos, levaduras y/o bacterias en alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos.
7. Uso de un envase para alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6, para la detección de microorganismos en alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos envasados.
- 30 8. Uso de un envase para alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7, caracterizado por que el envase de los alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos en los que se debe detectar el crecimiento de bacterias, hongos y levaduras está formado por un envase para alimentos, productos farmacéuticos o cosméticos según una de las reivindicaciones 1 a 4.
9. Uso de vainillina como reactivo colorimétrico para detectar visualmente el crecimiento de microorganismos en la fase de vapor.
- 35

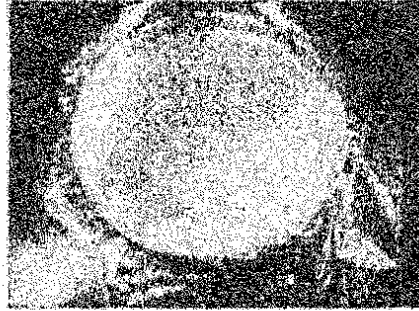


Figura 1

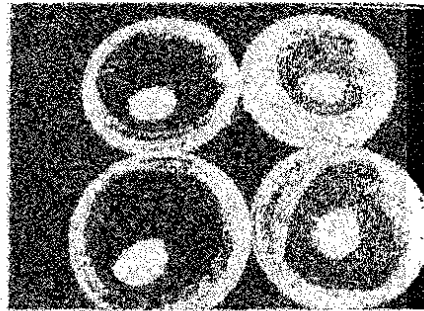


Figura 2

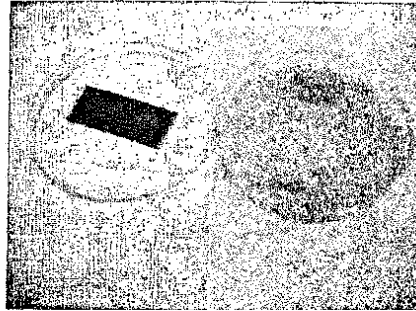


Figura 3

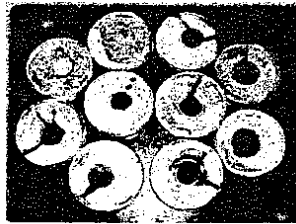


Figura 4

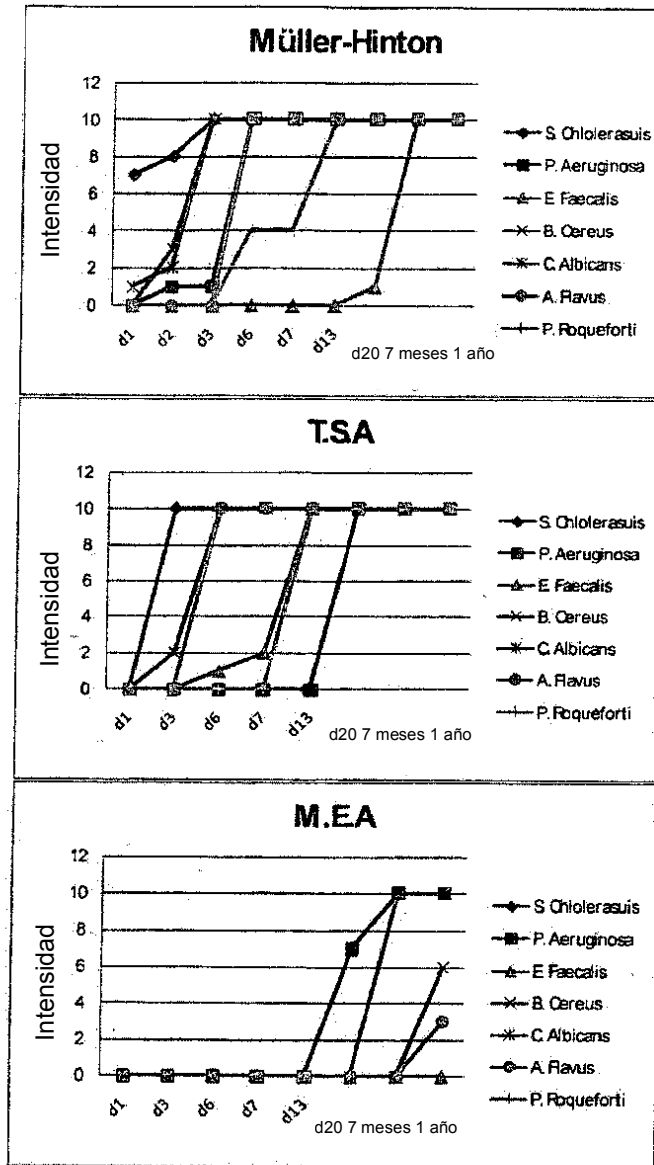


Figura 5

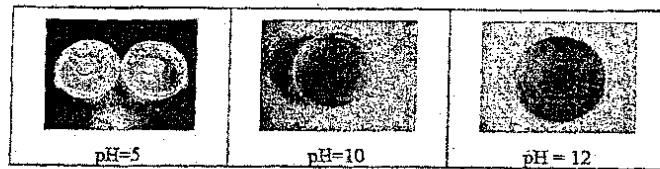


Figura 6

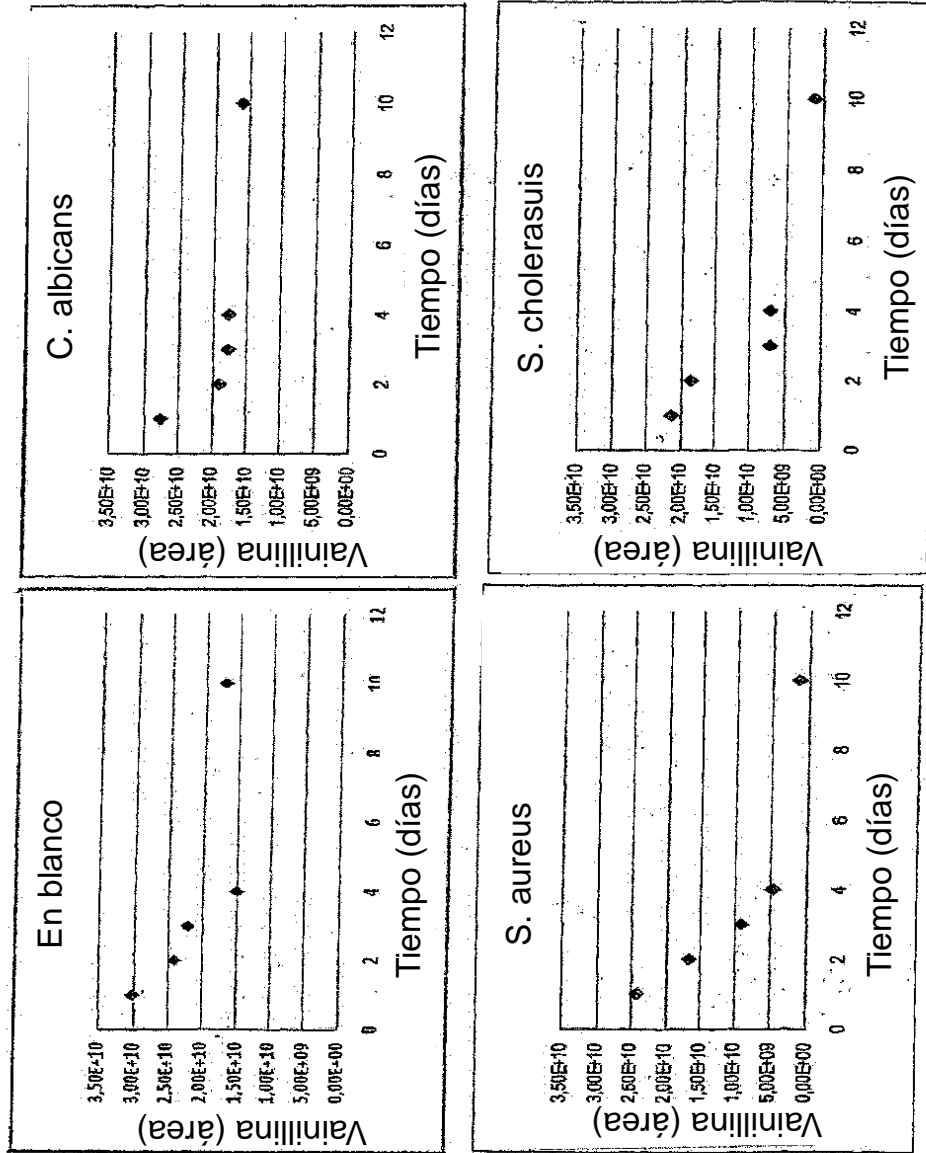


Figura 7