

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 376 559**

21 Número de solicitud: 201130572

51 Int. Cl.:

C12Q 1/02 (2006.01)
G01K 11/12 (2006.01)
A23L 3/00 (2006.01)
G01K 3/04 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

11.04.2011

43 Fecha de publicación de la solicitud:

15.03.2012

Fecha de la concesión:

14.01.2013

45 Fecha de publicación de la concesión:

24.01.2013

73 Titular/es:

UNIVERSIDAD PÚBLICA DE NAVARRA (50.0%)
Campus de Arrosadía s/n (OTRI) Edificio del
Rectorado
31006 Pamplona (Navarra) ES y
CNTA. CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGÍA Y
SEGURIDAD ALIMENTARIA-LABORATORIO DEL
EBRO (50.0%)

72 Inventor/es:

RUETE IBARROLA, Leyre;
ARREGUI SAN MARTÍN, Francisco Javier;
MATÍAS MAESTRO, Ignacio Raúl;
ALDAZ DONAMARÍA, Paula;
SOCORRO LERANOS, Abián B.;
VIRTO RESANO, Raquel y
SAIZ ABAJO, María José

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

54 Título: **DISPOSITIVO DE MONITORIZACIÓN DE CONDICIONES DE TIEMPO Y TEMPERATURA.**

57 Resumen:

Dispositivo de monitorización de condiciones de tiempo y temperatura. El dispositivo permite monitorizar las condiciones de tiempo y temperatura en las que se ha mantenido el producto al que está unido, mediante un cambio gradual en el mismo, pudiendo usarse para controlar la cadena de frío de alimentos y medicamentos. Se basa en el crecimiento de microorganismos al superar una temperatura umbral, que da lugar a una acidificación que conlleva un cambio visible en una sustancia presente en el medio, tal como un cambio de color. Los microorganismos y el indicador colorimétrico están alojados en una matriz porosa, preferiblemente celulósica, con un peso base igual o superior a 100 g/m², colocada entre dos láminas plásticas selladas, una de ellas transparente. Esta matriz porosa tiene las características óptimas para permitir, sin la presencia de un agente texturizante, una visualización óptima y homogénea del cambio que se produce en el dispositivo.

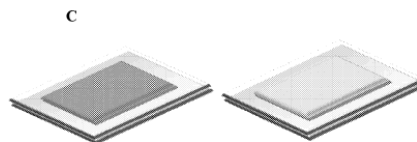


Fig. 2

ES 2 376 559 B1

DESCRIPCIÓN

Dispositivo de monitorización de condiciones de tiempo y temperatura.

CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a un dispositivo capaz de monitorizar el historial acumulado de tiempo-temperatura de un producto. Más concretamente, la invención se refiere a un dispositivo de tiempo temperatura basado en el crecimiento de microorganismos y a los elementos estructurales del mismo que posibilitan un crecimiento homogéneo de los microorganismos, dando lugar a un cambio en el medio que se observa gracias a la presencia de un compuesto indicador en el que el cambio en el medio da lugar a una modificación de alguna característica fácil de percibir por el ojo humano. Este tipo de productos se puede utilizar para indicar la exposición a 10 temperaturas excesivas durante cierto tiempo (o de un tiempo excesivo a ciertas temperaturas umbrales) de productos agroalimentarios, farmacéuticos y biomédicos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 15 El deterioro de los alimentos con el paso del tiempo se produce inevitablemente. El ritmo con el que se produce este deterioro depende de la estructura física y de las propiedades de los propios alimentos, del tipo de microorganismos presentes y de las condiciones ambientales en que se conservan. Otros factores que afectan al ritmo de descomposición son: la acidez de los alimentos, el ritmo respiratorio, el contenido en nutrientes, la resistencia natural a los microorganismos y la estructura biológica. El tipo de proceso que tiene lugar en un alimento, está estrechamente ligado a estas características así como a las condiciones de almacenamiento del mismo.

- 20 Las alteraciones en los alimentos, producen cambios en sus propiedades que pueden ser apreciables mediante un análisis cualitativo. Sin embargo este análisis no es siempre posible. Las condiciones en las que se transportan y almacenan los productos están estrechamente ligadas con la rapidez con que se deterioran estos productos, por lo que existe una tendencia creciente a envasar los productos controlando las condiciones internas del envase para obtener así las condiciones óptimas de conservación de los productos. Un ejemplo es la tecnología 25 MAP (envasado en atmósfera modificada), que se basa en el empleo de nitrógeno solo o mezclado con dióxido de carbono, reduciendo los niveles de oxígeno a valores inferiores al 1%. En estos envases es muy importante que el recipiente permanezca inalterado, impidiendo la entrada de oxígeno y la fuga de dióxido de carbono. Por ello el análisis cualitativo del producto, que requiere contacto directo con el alimento, no puede llevarse a cabo.

- 30 Uno de los aspectos que ha permitido prolongar la vida útil de los alimentos ha sido la introducción de la cadena de frío. Se define la cadena del frío como la serie de elementos y actividades necesarios para garantizar la calidad de un alimento desde que se encuentra en su estado natural o precocinado hasta su consumo. También es aplicable esta definición en el caso de productos sanitarios donde se garantiza la calidad desde su producción hasta su utilización. Algunos de los productos farmacéuticos o productos relacionados con la medicina, requieren de la cadena de frío son: preparados biológicos, análisis clínicos, órganos para trasplantes, insulina, colirios, productos 35 para transfusiones de sangre, vacunas... En general se puede afirmar que el 20% de los productos farmacéuticos más vendidos son sensibles a la temperatura. Cerca del 100% de las vacunas y 68% de los productos comercializados por compañías de biotecnología, necesitan ser almacenados y transportados en un rango de temperatura de 2 a 8 °C. Un ejemplo ampliamente conocido de producto sanitario que requiere de la cadena de frío para su conservación son las vacunas. Las vacunas, como todas las sustancias biológicas, sufren deterioro y degradación acelerados por el calor, con la consiguiente destrucción del principio activo o antígeno inmunizante. Estos productos requieren ser conservados siguiendo una cadena de frío desde que son fabricados hasta el momento en el que se administran. Las vacunas son productos biológicos termolábiles que se deben conservar entre +2° C y +8°C. Temperaturas superiores pueden producir pérdida de actividad, inactivación que se producen en algunos casos sin cambios de aspecto. Ciertas vacunas son más sensibles que otras al calor. Cuando la vacuna 45 pierde su eficacia, el hecho de colocarla en el frigorífico o en el congelador no se la devuelve. La pérdida de potencia es variable y depende de los umbrales de temperatura alcanzados así como el tiempo de permanencia de las vacunas a dichas temperaturas. Algunas de ellas cambian de aspecto y modifican sus características fisicoquímicas, por lo que es importante que el personal encargado de las inmunizaciones tenga la formación adecuada, conozca las características de las vacunas que administra y que esté familiarizado con las normas de conservación y almacenamiento de las mismas. Sin embargo, esto no ocurre siempre por lo que los dispositivos TTI (*time-temperature indicator*) pueden ser un indicador útil de la ruptura de la cadena de frío.

- 50 En muchos países la cadena de frío se aplica a más de la mitad de la comida consumida. Existe además una creciente demanda de prolongar la vida útil de los alimentos, lo que genera nuevos riesgos.

- 55 Tal y como se ha comentado anteriormente, la aplicación de frío es uno de los métodos más extendidos para la conservación de los alimentos. Existen dos tipos de conservación a través del frío:

- La congelación: Implica temperaturas inferiores a los 0°C y permite conservar los alimentos a largo plazo.

- La refrigeración: El término refrigeración está relacionado con temperaturas superiores a 0°C y permite la conservación de los alimentos durante periodos que pueden ser de días o semanas como mucho.

Una de las principales razones del efecto positivo del frío sobre la conservación es que el frío va a inhibir el crecimiento de los agentes alterantes de una forma total o parcial. Esto es así porque la velocidad de crecimiento de los microorganismos depende de la temperatura: al disminuir la temperatura, disminuye la velocidad de crecimiento, existiendo una temperatura mínima, diferente para cada uno, por debajo de la cual no hay crecimiento; la velocidad de crecimiento se incrementa, en general, con la temperatura, fundamentalmente debido al incremento generalizado de la velocidad de las reacciones enzimáticas que tienen lugar en los microorganismos, hasta que se alcanza una temperatura óptima, de nuevo diferente para cada microorganismo, a la cual la velocidad de crecimiento es máxima. Por encima de esa temperatura, la velocidad de crecimiento decae bruscamente, hasta llegar a una temperatura máxima de crecimiento en la que se produce la muerte celular. Así, al disminuir la temperatura reducimos considerablemente la velocidad de crecimiento de los microorganismos, reduciendo el metabolismo celular hasta el punto de que las células pueden parar de crecer.

Los microorganismos se clasifican en varios tipos en función de sus temperaturas de crecimiento mínima, máxima y óptima:

<u>Tipo de</u>	<u>Temp.</u>	<u>Temp.</u>	<u>Temp.</u>
<u>Microorganismo</u>	<u>mínima</u>	<u>óptima</u>	<u>máxima</u>
Psicrófilo	(-5) – (+5)	12 – 15	15 - 20
Psicrotrofo	(-5) – (+5)	25 – 30	30 - 37
Mesófilo	5 - 15	30 – 45	35 – 47
Termófilo	40 – 45	55 – 75	60 – 90

Esta clasificación no es totalmente rígida, siendo habitual encontrar clasificaciones en las que se amplía el rango de temperaturas mínima, óptima y máxima de los organismos mesófilos, considerándose los psicrotrofos como un caso especial de microorganismos mesófilos, capaces de crecer a bajas temperaturas. También pueden encontrarse referencias literarias en las que se distingue un caso especial de bacterias psicrófilas, al que se denomina bacterias criófilas, que son capaces de multiplicarse por debajo de 0°C.

De acuerdo con esta clasificación, es fácil deducir que, a temperatura ambiente, los organismos mesófilos son los responsables principales de la degradación de los alimentos y otros productos sensibles a su acción. Sin embargo, cuando los alimentos u otros productos perecederos se someten a refrigeración o, incluso, a congelación a temperaturas ligeramente por debajo de 0°C, son los organismos psicrófilos y psicrotrofos, principalmente, los que son capaces de mantener actividad en dichos productos, aunque su velocidad de crecimiento esté muy mermada.

En el caso concreto de los alimentos, tanto la congelación como la refrigeración detienen o ralentizan la actividad bacteriana, no la eliminan; así al producirse un calentamiento del producto, las bacterias reanudan su actividad. Si se vuelve a reducir la temperatura, volverá a inhibirse la actividad bacteriana, pero contaremos con un número mucho mayor de bacterias que antes de producirse dicho aumento. El proceso se repite cada vez que se produzca un aumento de la temperatura de conservación. Hay que tener en cuenta que en el momento en el que se proceda al consumo del alimento, cuanto mayor sea el número de bacterias, mayor es la probabilidad de que el alimento se haya deteriorado o de que las bacterias hayan producido toxinas, aumentando de manera considerable la probabilidad de que se produzca una intoxicación alimentaria.

Las razones anteriormente expuestas, hacen que exista un creciente interés en el desarrollo de sistemas dinámicos que permitan al consumidor conocer el estado de conservación de los productos alimenticios de manera fidedigna. Una posible solución a esta problemática son las etiquetas inteligentes, que son capaces de modificar su estado indicando que el estado de conservación del alimento no es el idóneo.

Las etiquetas inteligentes más extendidas en el mercado son las llamadas etiquetas TTI (indicadores de tiempo- temperatura). Son empleadas para controlar que se respeta la cadena de frío de los alimentos cuyo proceso, desde la fabricación hasta llegar al consumidor, deben respetar una temperatura crítica, así como para que el tiempo que transcurra hasta el consumo del producto alimenticio asegure que el mismo es apto para el consumo. Existen varios tipos, según la modificación que haya de producirse en la etiqueta para determinar si el producto sigue o no estando en condiciones de ser consumido utilizado:

- Dispositivos basados en tintas termocrómicas

Los indicadores basados en tintas termocrómicas se presentan bajo la forma de pequeñas pastillas transparentes o de color, que poseen una zona que cambiará de color en el caso de que la cadena de frío se haya roto.

5 El rango de funcionamiento de las mismas es muy amplio, pudiendo encontrar tintas que varían su color desde los -25 °C hasta 66 °C. El cambio de color se da a una temperatura determinada que se denomina **temperatura de activación**. Para evitar la activación indeseada de las mismas, estas etiquetas deben almacenarse por debajo de su temperatura de activación.

10 Un ejemplo es la etiqueta comercializada por la empresa **Temptime** (antiguamente **Lifelines Technologies**), llamada Fresh-Check® TTI, que se encuentra disponible en color rojo y amarillo, de la que se muestran ejemplos en la Fig. 1 A. En cualquiera de las versiones, el mayor oscurecimiento de la zona central con respecto a la corona que la rodea determina que el producto ya no es consumible.

Otras etiquetas TTI que utilizan tintas termocrómicas y que pueden encontrarse en el mercado son:

- ColdMark y WarmMark de la empresa Evidencia
- 15 ▪ La etiqueta CombatFeeding
- ThermoStrip y ClearingPoint de la empresa Hallcrest
- Thermax desarrollada por la empresa TMC

20 La desventaja principal que presenta este tipo de dispositivos es su elevado precio. En todos los casos el precio es superior a 1\$ pudiendo llegar a alcanzar los 3,58\$. Por otro lado, estas etiquetas deben conservarse por debajo de su temperatura de activación. Otro de los inconvenientes que presentan estos dispositivos es que su funcionamiento se ve afectado por la exposición a la luz, por lo que deben recubrirse con películas plásticas que filtren la radiación. Sin embargo, hasta el momento no se ha desarrollado ninguna película que permita filtrar eficientemente todas las longitudes de onda que afectan a las tintas termocrómicas.

25 Algunas patentes que basan su funcionamiento en esta tecnología son US20060127543, EP0837011, GB2455699, KR100890863, US2006249949, GB2373338, EP0779353. Otro tipo de tintas termocrómicas son aquellas que se basan en leucocomponentes como por ejemplo las descritas en WO2008083925, WO2008090045, WO2009127529, WO2009141237, US4917503

- Dispositivos basados en reacciones químicas o enzimáticas

30 Las reacciones químicas y enzimáticas, dependen fuertemente de la temperatura a la que se producen. Además, la cinética de la reacción va a determinar el tiempo tras el cual puede considerarse que la reacción ha concluido. Es por ello que ciertas reacciones pueden utilizarse para monitorizar una combinación de tiempo-temperatura, que es lo que llevan a cabo los dispositivos TTI.

En algunos casos, las reacciones químicas y enzimáticas producen productos que pueden ser utilizados para cuantificar el tiempo y la temperatura a la que se llevó a cabo la reacción.

35 Algunos productos comercializados que hacen uso de esta tecnología son:

- Las etiquetas CheckPoint®, en sus tres versiones, de la empresa Vitsab. Puede verse un ejemplo de las mismas en la Fig. 1B, donde puede apreciarse que el diseño es similar al de las etiquetas de la Fig. 1A, basado en el cambio de color de una zona central rodeada por una corona exterior, aunque el principio que determina el cambio de color de la zona central no es exactamente igual.

40 El mayor problema que presentan estas etiquetas es que los reactivos deben de permanecer separados o inactivos hasta el momento en el que deseamos que el contador de tiempo empiece a funcionar. Algunas de estas etiquetas requieren ser conservadas a temperaturas de refrigeración. En otros casos, los elementos químicos que participan en la reacción se mantienen físicamente separados por una barrera que desaparece, mediante presión y ruptura o mediante fusión en el momento de la activación del dispositivo.

45 Existen numerosos documentos de patente que utilizan reacciones químicas o enzimáticas para monitorizar el paso del tiempo en función de la temperatura. Se citan a continuación algunas de ellas: US4834017, FR2712084, US3942467, US4298348, US4812053, EP0497459, WO0127608, WO2005075978, WO2006015961, WO2006015962, WO2006091464, WO2006091465, WO2006091466, WO2007035365, WO2005075978,

- Dispositivos basados en difusión

Existen dispositivos TTI cuyo funcionamiento se basa en la difusión de un compuesto en un material poroso. El compuesto, tiene una temperatura de fusión determinada que coincide con la temperatura crítica del producto. La respuesta medible es el avance de la difusión del compuesto desde el origen. La gama útil de temperaturas y el tiempo de respuesta del TTI están determinados por la concentración del y el tipo de producto que se funde.

En el mercado, podemos encontrar disponibles dispositivos que utilizan esta tecnología como por ejemplo:

- TTI MonitorMark™ y FreshnessCheck™ de 3M

La Fig. 1C muestra una fotografía de la primera.

La mayor desventaja que presentan estos dispositivos, es su elevado coste que puede superar los 2\$ por unidad.

Además, para su correcto funcionamiento es necesario un preacondicionamiento previo al uso, en el que la etiqueta debe de ser mantenida por debajo de cierta temperatura que viene indicada en el reverso. Para su activación es necesaria la retirada de una tira de seguridad. La precisión del sistema es de 1°C y de un 8% en el caso del tiempo.

Existe una gran cantidad de documentos de patentes que utilizan esta tecnología como por ejemplo EP0484578, EP0930487, WO8301834, WO2007116071, EP0606033, EP0461044, EP0930489, WO9956098

- Etiquetas RFID

Las etiquetas RFID (*Radio Frequency Identification*: Identificación de Frecuencias de Radio) parecen las soluciones más sofisticadas. Son equipamientos destinados a recibir una señal radio y a reenviar inmediatamente como respuesta una señal radio diferente conteniendo la información pertinente.

Hay muchas etiquetas RFID en el mercado. Sin embargo, son muy pocas por el momento, las que incluyen la posibilidad de monitorizar la temperatura. Algunos ejemplos de etiquetas son:

- Therm Assure RF de la compañía Evidencia, mostrada en la Fig. 1D
- Variosense de la empresa KWS

Las etiquetas RFID no están extendidas en nuestro día a día, pero pronto empezarán a equipar a los productos con un alto valor añadido, en un principio, hasta llegar a los productos alimentarios. Este aumento en el volumen de producción debería provocar una disminución del coste.

Hasta el momento se han publicado algunos documentos de patente de dispositivos TTI que utilizan la tecnología RFID como por ejemplo WO2008053117

- Dispositivos detectores de aroma

El grupo neozelandés Jenkins ha desarrollado, en colaboración con el instituto HortResearch, una etiqueta inteligente de un único uso que detecta la madurez de la fruta: ripeSense™, que se muestra en la Fig. 1E.

El sabor y el olor de una fruta están estrechamente ligados a la madurez de la misma. Haciendo uso de esta evidencia, el sistema desarrollado consiste en un sensor de aroma integrado en una etiqueta que se coloca en un envase de plástico rígido.

Además del sistema ripeSense™ se han divulgado en documentos de patente otros sistemas de detección de la madurez de frutas y verduras que basa su funcionamiento en la detección de etileno: US2006127543.

- Biosensores

Los biosensores, basan su funcionamiento en la detección de sustancias que están relacionadas con la degradación de los alimentos. Estas sustancias pueden ser volátiles, como en el caso de la degradación del pescado durante la cual se producen bases volátiles nitrogenadas, o sustancias suspendidas en un líquido. Existen biosensores que basan su funcionamiento en la detección de diferentes especies de microorganismos que se relacionan tanto con el proceso de descomposición de los alimentos, como con las intoxicaciones alimentarias. La mayoría de los biosensores todavía no están comercializados. Sin embargo existen dos biosensores que pueden encontrarse ya en el mercado.

- ToxinGuard (ver Fig. 1F): Desarrollado por la empresa ToxinAlert
- FoodSentinelSystem: Que es comercializado por la empresa Sira Technologies

- Sensores electrónicos

Algunos sensores electrónicos capaces de monitorizar el historial de temperatura, pueden ser la base de dispositivos TTI tal y como se describe en los documentos de patente WO2009156285, WO2008083926, WO2004097357, US2007076779, EP0060947, WO2007074247, WO0026111

- TTI basados en microorganismos

Tal y como se ha comentado anteriormente, los productos alimentarios se degradan en función de la temperatura debido al desarrollo de microorganismos que están presentes de manera natural en los productos. Del mismo modo, las vacunas pierden sus propiedades si no son conservadas adecuadamente. La utilización de microorganismos que simulan la degradación real de los productos, por desarrollarse en condiciones de temperatura e, incluso, velocidad, similares a las de los microorganismos que degradan esos productos, ha dado lugar a diferentes dispositivos y patentes.

Estos dispositivos comparten una serie de características como son:

- La utilización de microorganismos capaces de crecer en el rango de temperaturas a las que se va a ver expuesto el producto. Estos microorganismos pueden ser bacterias o levaduras.
- Nutrientes específicos para el tipo de microorganismo que se encuentre presente en el dispositivo.

Su funcionamiento se basa en que el crecimiento de los microorganismos cambia alguna propiedad del medio. En algunos casos, el cambio que se produce en el medio es suficiente para llevar a cabo la respuesta deseada, como por ejemplo el crecimiento de la población de microorganismos. En otros casos es necesario incluir alguna sustancia que si bien no influye en el crecimiento de los microorganismos, permite que el cambio en el medio producido por el crecimiento de los mismos, produzca una señal visual que pueda ser fácilmente detectada por el usuario final del dispositivo.

Algunos de estos cambios son:

- Cambio del pH del medio y como consecuencia, cambio de color de un indicador de pH. De manera que si el alimento es apto para su consumo, el dispositivo presenta un color distinto que en caso de no ser así.
- Cambio de pH del medio y como consecuencia precipitación de algún componente, como por ejemplo la caseína. Esta proteína se desnaturaliza cuando se produce un descenso de pH y precipita volviendo el medio opaco (véase la solicitud de patente FR2859786 A, que describe una etiqueta cuyas características técnicas responden a las de la etiqueta comercial TRACEO®).
- Cualquier proceso que impida que la etiqueta sobre la que se coloque el dispositivo cumpla la función para la que fue diseñada.

Es necesario que el dispositivo permanezca inactivo hasta que finalice el procesado del producto, momento en el cual será introducido en la cadena de frío. Existen diferentes mecanismos que permiten controlar el momento de activación del dispositivo, algunas de las cuales se describen a continuación.

- Separación de los microorganismos y nutrientes. La forma más habitual en que se produce esta separación es crear una barrera física que desaparece en el momento de la activación.
- Microencapsulamiento de nutrientes y/o microorganismos.
- Congelación del dispositivo.
- Cambios de estado sólido a líquido. Los nutrientes y/o los microorganismos se encuentran en estado liofilizado, mezclándose con un compuesto que se funde, convirtiéndose en líquido, cuando se supera una cierta temperatura umbral y permitiendo el crecimiento de los microorganismos.
- Conservación en condiciones hostiles. Se mantienen los microorganismos en condiciones que no permiten su crecimiento. Una de las posibilidades es mantener las condiciones de pH del medio en unos valores en los que el crecimiento de los microorganismos es prácticamente nulo. En el momento de la activación es necesario añadir algún componente que ajuste el pH al valor deseado permitiendo el crecimiento de los microorganismos.

En cualquier caso, es necesario que alguno de los componentes del medio sea un texturizante que tiene como función inmovilizar los microorganismos y/o nutrientes, haciendo que el cambio de la propiedad del medio se

dé de forma homogénea a lo largo del dispositivo. Alguno de los texturizantes que se describen en las patentes son: carboximetil celulosa, hidroxipropil celulosa, hidroxietil celulosa (HEC), agar enriquecido o agar puro entre otros.

Un ejemplo de dispositivo TTI basado en microorganismos es el descrito en el documento de patente US2007275467A1, que se refiere a un método y a un dispositivo indicador para determinar si un producto está en condiciones de ser utilizado o consumido, teniendo en cuenta que el producto está diseñado para ser preservado bajo ciertas condiciones de temperatura y por un período de tiempo que no debe sobrepasarse para que la degradación del producto no haga aconsejable su consumo.

El dispositivo descrito en el documento US2007275467A1 está bajo la forma de una etiqueta transparente que tiene un grosor y una superficie reducidos, adaptados al uso y al producto sobre el cual será puesto, y comprende un sobre transparente, opcionalmente autoadhesivo, que permite observar si se produce algún cambio en el indicador presente en el dispositivo, cambio que indicará que el producto no está en condiciones de ser consumido. Para que el indicador pueda funcionar como tal, se sugiere, preferiblemente, la presencia de un microorganismo que produce ácido durante su crecimiento y/o actividad metabólica, modificando el pH del medio, producción de ácido que se pone de manifiesto por la presencia de, por ejemplo, un compuesto que cambia de color en función del pH, o por la precipitación de la caseína presente en el medio. Los microorganismos presentes deben exhibir una actividad de acidificación en intervalos de temperatura compatibles con las temperaturas del producto; la cinética de acidificación debe ser también compatible con esas temperaturas y períodos de preservación y estar de acuerdo con la cinética de degradación del producto perecedero a controlar. Como posible opción se sugieren bacterias del ácido láctico, con preferencia por las bacterias psicotrofas (definidas como las de actividad metabólica entre 0°C y 45°C) para el control de los productos perecederos mantenidos bajo refrigeración (entre 0°C y 4°C). Para que puedan producir el efecto deseado, deben estar presentes en un medio de cultivo adecuado, junto con los elementos para desarrollar la acidificación. Además, se comenta que el dispositivo contiene uno o más agentes texturizantes, para que el dispositivo tenga la apariencia deseada y el medio se mantenga uniforme. Se sugiere tanto el uso de agentes espesantes como de agentes gelificantes, en ambos casos citando como característica buscada impedir el flujo de la solución que los contiene. La necesidad de añadir el agente texturizante supone un elemento que complica la fabricación del dispositivo. Su presencia no impide, sin embargo, que se considere conveniente desacoplar la fabricación y la activación del indicador, para lo cual, entre otros métodos, se recomienda que los microorganismos estén aislados de los nutrientes, por ejemplo encapsulando uno de esos dos elementos, disposición que requiere que, con posterioridad, se haga desaparecer la barrera física existente entre microorganismos y nutrientes, para que pueda tener la reacción que indica que el producto ha dejado de estar en condiciones de ser consumido. Todo esto supone, igualmente, una complicación añadida para la fabricación del dispositivo indicador, que dificulta que el mismo pueda ser preparado con facilidad en el momento en el que se embala el producto.

La solicitud US2007275467A1, sin embargo, no hace mención alguna a la presencia, como parte del dispositivo indicador, de un sustrato sólido poroso que esté impregnado por el medio líquido. Tampoco las leyendas de la Fig. 12 de dicha solicitud US2007275467A1, donde se representa uno de dichos dispositivos (y que se reproduce como Fig. 2A en la presente solicitud), menciona su presencia.

Otros documentos de patente se refieren a dispositivos en forma de lámina transparente utilizados para cultivar microorganismos y poder observar su crecimiento. Tal es el caso de la solicitud US2005084948A1, en la que se describe un dispositivo diseñado para detectar la presencia de microorganismos en alimentos y en el medio ambiente, pero que no está diseñado para actuar como un indicador de tiempo-temperatura que vaya acoplado al producto cuyo estado de conservación se desea controlar. Realmente, se trata de un dispositivo de cultivo de microorganismos pensado para añadir al mismo una solución obtenida de la muestra en la cual se quiere comprobar la presencia de microorganismos. Dicho dispositivo consta de una capa de matriz porosa unida a una hoja adhesiva, una capa de polímero hidrosoluble y una película transparente, tal como se muestra en la Fig. 2B de la presente solicitud. La solución de la muestra se añade sobre la capa porosa de la matriz, se cubre entonces con la película transparente, y se incuba durante un tiempo determinado a una temperatura apropiada para cultivar microorganismos. Cuando la solución de la muestra sea añadida sobre la capa de la matriz porosa, los microorganismos que están en la solución de la muestra se dispersan uniformemente por la capa de la matriz porosa. Por su parte, la capa de polímero hidrosoluble que está en contacto con la matriz porosa, una vez añadida la muestra, se disuelve en el agua que ha quedado temporalmente retenida en la capa de la matriz porosa, de manera que el polímero se disuelve lentamente en el agua, dando lugar a una solución de elevada viscosidad, que combina la capa polimérica y la capa de la matriz porosa en un único cuerpo. Con ello, los microorganismos se ven empujados a la superficie de la capa de la matriz porosa, lugar en el cual forman colonias. En cuanto a los nutrientes necesarios para el crecimiento de los microorganismos, pueden añadirse o bien a la capa polimérica soluble en agua o a la propia muestra a analizar. Una vez que el polímero hidrosoluble y los nutrientes se han disuelto en el agua, es cuando hay un buen entorno para los microorganismos y los mismos pueden empezar a crecer.

Este dispositivo requiere de la presencia, por tanto, de un polímero hidrosoluble, que da lugar a una solución de elevada viscosidad, que provoca que los microorganismos se vean empujados a la superficie de la capa de la matriz porosa, y que dificulta su desplazamiento por la misma.

En cuanto a la matriz porosa, se dice que la misma debe tener un peso base de 40 a 100 g/m², preferiblemente entre 50 y 90 g/m², más preferiblemente entre 55 y 80 g/m². Se considera inadecuado que la matriz tenga un peso base inferior a 40 g/m², porque no podría retener el agua y las soluciones acuosas añadidas; también se desaconsejan los pesos base superiores a 100 g/m², porque daría lugar al crecimiento de microorganismos tanto en la superficie de la matriz porosa como en el interior de la misma, variando la velocidad de crecimiento según la ubicación de los microorganismos, no dando lugar a una distribución uniforme de los mismos y dificultando la observación de crecimiento de microorganismos en la matriz porosa.

También se mencionan en la solicitud US2005084948A1 intervalos de la permeabilidad al aire de la matriz porosa que se consideran adecuados para el buen funcionamiento del dispositivo, calculados según el método de la norma japonesa JIS L 1912, norma según la cual la medida de la permeabilidad se realiza a 13,8 kPa. Así, en la solicitud US2005084948A1 se menciona que la permeabilidad debe ser, preferiblemente, de 7 a 24 cm/s (que se corresponde, según las condiciones de medida, con el intervalo de 5,07 a 17,39 μm/(Pa . s)), con mayor preferencia de 8 a 20 cm/s (de 5,79 a 14,49 μm/(Pa . s)), y aún más preferiblemente de 10 a 18 cm/s (7,24 a 3,04 μm/(Pa . s)). Se menciona que, cuando la permeabilidad al aire es inferior a 7 cm/s (5,07 μm/(Pa . s) en este caso), los componentes acuosos no se dispersan adecuadamente, debido a la falta de permeabilidad al agua de la matriz porosa, pudiendo esto ser causa de problemas entre los que se incluye la falta de un crecimiento uniforme de los microorganismos. Cuando la permeabilidad al aire es superior a 24 cm/s (17,39 μm/(Pa . s)), los microorganismos pueden no formar colonias al crecer, dificultando su recuento.

En cuanto a los materiales que se consideran adecuados para preparar la capa de la matriz porosa, se citan en la solicitud US2005084948A1: fibras sintéticas (tales como fibras de nylon, poliácridonitrilo, alcohol de polivinilo (PVA), poliéster, poliolefina, poliuretano y del copolímero de acetato de etileno – vinilo); fibras semi-sintetizadas tales como las fibras del rayón; fibras naturales (incluidas las lanas, la seda, las fibras de algodón, las fibras de celulosa y las fibras de la pulpa); y fibras inorgánicas tales como fibras de vidrio.

Respecto a los nutrientes, no se impone ningún tipo de restricción, salvo que sean hidrosolubles y que no inhiban el crecimiento de los microorganismos, mostrando preferencia por el uso de peptonas, extracto de levadura, extracto de carne, casaminoácidos, aminoácidos y mezclas de los mismos, hidratos de carbono tales como la glucosa o la maltosa, y ácidos orgánicos y sus sales. Se menciona que la presencia de sales con capacidad para controlar el pH (o la presión osmótica) no supone ningún problema.

Como puede observarse, el dispositivo de la solicitud US2005084948A1, además de no corresponder en su diseño y condiciones de aplicación a las de un dispositivo de tiempo-temperatura que pueda acoplarse a un alimento u otro producto perecedero para tener una indicación de su estado de conservación, tampoco puede transformarse fácilmente en uno de tales dispositivos de tiempo-temperatura, pues requiere la adición de los nutrientes y/o el inóculo de cultivo microbiano justo en el momento en el que se desea activar el dispositivo, es decir, permitir el crecimiento de microorganismos en el mismo, lo que no hace su preparación sencilla ni facilita que la misma pueda tener lugar, por ejemplo, en el momento en el que se embala el producto perecedero. No se considera, (porque no es el objetivo con el que está diseñado el dispositivo), qué señal podría ser la indicación de que el producto perecedero al que se aplicara ya no está en condiciones de ser consumido, sólo se explican las condiciones para que los microorganismos crezcan de forma que su recuento sea sencillo. Su preparación requiere, además, de la utilización de distintos materiales, no sólo el material de la matriz porosa biocompatible, sino el polímero hidrosoluble, que tiene que presentar unas ciertas características de viscosidad al mezclarse con el agua y la matriz porosa para que el dispositivo funcione.

Sería interesante disponer de un dispositivo, basado en el crecimiento de microorganismos, que pudiera utilizarse como indicador de tiempo-temperatura, preferiblemente apto para productos perecederos que se conservan en condiciones de refrigeración o congelación, que pudiera adaptarse a la forma de una etiqueta adhesiva (para facilitar su acoplamiento al producto), en el que fuera óptima la visualización óptica de la señal que desaconsejara el consumo del producto, y que tuviera una composición sencilla, eliminando la necesidad de componentes como los agentes texturizantes o los polímeros hidrosolubles, de manera que se simplificara su fabricación y que, incluso, fuera posible prepararlo fácilmente de forma simultánea al embalado del producto, aplicándolo directamente sobre el mismo como parte del embalaje o una vez embalado. Además, sería especialmente interesante si tal dispositivo constara de una estructura básica, válida para cualesquiera condiciones de tiempo y temperatura, que pudiera utilizarse para preparar diferentes dispositivos finales, cada uno de ellos válido para el control del cumplimiento de unas determinadas condiciones de conservación de productos, condiciones que variarían según los microorganismos y la composición del medio de cultivo y el método utilizado para confirmar el cumplimiento o incumplimiento de las condiciones de conservación deseadas para el producto.

La presente invención proporciona una solución a este problema.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Tal como se ha comentado previamente, la invención se enfrenta con el problema de sustituir, en los dispositivos de tiempo-temperatura basados en el crecimiento de microorganismos, los medios texturizantes citados anteriormente (Ej. US2007275467A1) con un medio alternativo que permita el crecimiento de los microorganismos,

una visualización óptica del cambio de color óptima y que, además, permita una fabricación más sencilla de los dispositivos.

La solución proporcionada por esta invención se basa en utilizar, como componente del dispositivo, un sustrato sólido en forma de matriz porosa tridimensional biocompatible que disfruta de las características idóneas para que se produzca el crecimiento adecuado de los microorganismos dentro del mismo y que, a su vez, produzca un cambio en el medio, tal como un cambio de pH, que se traduzca en un cambio visible y homogéneo del medio, tal como un cambio de color, por la presencia, por ejemplo, de una sustancia que modifica su color según el pH del medio. Las características de este sustrato sólido poroso, en forma de matriz porosa tridimensional, hacen que dicho cambio de color sea suficientemente intenso y distinguible. Dicha matriz porosa tridimensional tiene la particularidad de presentar una estructura multicapa en el interior de la cual el medio acuoso se difunde y circula libremente, permitiendo que la composición del medio sea homogénea y que el medio acuoso permanezca alojado en todo el volumen de la estructura multicapa, de modo que el crecimiento de los microorganismos y el cambio de color se producen en toda la extensión de la estructura porosa, de manera homogénea.

Estas características se obtienen mediante la utilización de un material poroso biocompatible que disfruta de las características físicas adecuadas, en cuanto a peso base y, preferiblemente, porosidad, como para permitir que el cambio de color se produzca de forma homogénea y que, además, sea lo suficientemente notable como para poder distinguirse a simple vista por el ojo humano. Más concretamente, el dispositivo comprende una matriz porosa biocompatible cuyo peso base es igual o superior a 100 g/m^2 . Preferiblemente, su permeabilidad al aire es inferior a $115 \text{ } \mu\text{m}/(\text{Pa} \cdot \text{s})$, pudiendo ser así superior a $17,39 \text{ } \mu\text{m}/(\text{Pa} \cdot \text{s})$. Preferiblemente también, la matriz porosa biocompatible está basada en una estructura celulósica multicapa, con un peso base igual o superior a 100 g/m^2 , valor que puede ser, por ejemplo, de 480 g/m^2 . En el caso de esta estructura celulósica multicapa, al poder estar constituida por monocapas de celulosa, se utiliza en varias ocasiones a lo largo de la presente solicitud el término "gramaje", propio del papel, como sinónimo del peso base de la misma, pues se refiere igualmente al valor del peso por unidad de superficie.

El dispositivo presenta una estructura muy sencilla, que simplifica su fabricación. Además, para evitar activaciones accidentales del dispositivo previas a su adhesión al producto que se quiere controlar, no es imprescindible preparar todo el dispositivo de una vez, sino que es posible preparar inicialmente la estructura básica del mismo (las dos láminas de plástico, una de ellas preferiblemente con una película de adhesivo, láminas entre las cuales se sitúa la matriz porosa) en la que las láminas de plástico pueden sellarse la una a la otra inicialmente sólo de forma parcial, dejando una abertura. Dicha abertura debe permitir, posteriormente, la introducción del medio de cultivo, los microorganismos y la sustancia colorante indicadora del pH (todos ellos en una única solución o de forma separada) para, una vez introducidos todos los componentes, sellar las dos láminas plásticas y adherir el dispositivo completo al producto percedero a controlar. Así, la invención se refiere, en un primer aspecto, a un dispositivo para controlar el historial de tiempo y temperatura de un producto, que comprende:

- a) una primera lámina de material plástico, impermeable al agua;
- b) una matriz porosa sólida, permeable al agua, cuyo peso base es igual o superior a 100 g/m^2 , que está situada sobre la cara de la primera lámina de material plástico;
- c) una segunda lámina de material plástico, impermeable al agua y transparente o translúcida al menos en una sección de su superficie, situada sobre la matriz porosa sólida, de forma que la matriz porosa sólida queda cubierta por la segunda lámina de material plástico y es visible a través de la sección transparente o translúcida de dicha segunda lámina de material plástico.

Es una realización preferida de la invención, compatible con cualquier otra, aquella en la que la primera lámina de material plástico contiene una película de adhesivo sobre la cara de la lámina que no está en contacto con la matriz porosa, lo que podríamos denominar la cara "exterior" de dicha lámina. Esto facilita la adhesión del dispositivo al producto cuyo historial de tiempo-temperatura se quiera controlar.

Preferiblemente, las dos películas plásticas están selladas la una a la otra, bien a lo largo de todo el perímetro del dispositivo, o bien dejando una porción sin sellar, que puede sellarse posteriormente. También es una posible realización aquella en la que las dos láminas de material plástico estén selladas la una a la otra por un material adhesivo que permite su separación posterior.

La matriz porosa sólida, que debe ser de un material biocompatible, puede comprender fibra de algodón, celulosa, lana, seda, queratina, dióxido de silicio, fibra de vidrio, poliamida, nylon, poliacrilonitrilo, alcohol de polivinilo (PVA), poliéster, poliolefina, poliuretano, copolímero de acetato de etileno – vinilo, rayón, un material esponjoso de origen vegetal, animal, mineral o sintético, o una combinación de dos o más de los materiales anteriores.

Preferiblemente, la matriz porosa sólida es una estructura celulósica multicapa, con un peso base igual o superior a 100 g/m^2 . El intervalo de peso base de la estructura celulósica comprendido entre 100 y 480 g/m^2 es muy adecuado para el funcionamiento del dispositivo. En algunos intervalos, como el comprendido entre 150 y 250 g/m^2 , los resultados son especialmente buenos, al igual que en el valor de 480 g/m^2 . Estas características pueden conseguirse, por ejemplo, con matrices porosas celulósicas que comprenden al menos 5 capas celulósicas de 24

g/m² cada una, siendo adecuadas para el dispositivo de la invención las matrices porosas celulósicas que comprenden de 5 a 20 capas celulósicas de 24 g/m² cada una.

Se ha observado que se obtienen resultados particularmente buenos cuando la matriz porosa sólida tiene una permeabilidad al aire menor que 115 µm/(Pa . s), valor claramente superior a 17,40 µm/(Pa . s). También se obtienen muy buenos resultados con matrices porosas sólidas que presentan una porosidad media mayor que 1,18 segundos. Los dispositivos cuyas estructuras básicas presentan matrices porosas que cumplen cualquiera de estas condiciones son realizaciones preferidas de la invención. Así, sea cual sea el material de la matriz porosa, se prefiere especialmente que la permeabilidad al aire de la matriz porosa sea inferior a 115 µm/(Pa . s) y/o que la porosidad media de la matriz porosa sea mayor que 1,18 segundos. Dentro de esos valores preferidos de permeabilidad al aire, también hay preferencia por que la permeabilidad al aire sea superior a 17,40 µm/(Pa . s).

En una realización preferida de la invención, las dos láminas plásticas están selladas la una a la otra a lo largo del todo el perímetro del dispositivo. En un caso particular de dicha realización, el dispositivo comprende, adicionalmente:

- d) microorganismos distribuidos por la matriz porosa;
- e) un medio de cultivo de dichos microorganismos, alojado en la matriz porosa sólida;
- f) un compuesto indicador que experimenta un cambio perceptible por el ojo humano en función de un cambio en el medio producido por el crecimiento de los microorganismos.

Esta realización del dispositivo, con las dos películas plásticas selladas la una a la otra a lo largo de todo el perímetro de la misma, con el interior de la etiqueta aislado del exterior, será la versión lista para ser adherida al producto cuyo historial de tiempo-temperatura se quiera controlar, permitiendo monitorizar el historial de tiempo-temperatura del producto, tal como la ruptura de la cadena de frío de productos que deban conservarse a temperaturas de refrigeración o congelación.

Se prefiere que el compuesto indicador sea una sustancia que varía su color en función del pH del medio (como el clorofenol rojo), debido a que las formas ácida y básica de dicho compuesto tienen colores diferentes, si bien una de dichas formas puede ser incolora. Así, los microorganismos distribuidos por la matriz porosa deben ser microorganismos que producen algún ácido durante su crecimiento, su desarrollo o su actividad metabólica, por ejemplo por la fermentación de algún azúcar presente en el medio de cultivo. Pueden utilizarse, por ejemplo, bacterias mesófilas, psicrófilas o psicrotrofas (o, incluso, criófilas), prefiriéndose particularmente bacterias psicrotróficas para los productos que deban conservarse entre 0°C y 5°C. Se prefiere especialmente que los microorganismos sean bacterias lácticas, que pueden pertenecer a una única especie o pueden ser combinaciones de varias especies. Se tiene especial preferencia por las bacterias lácticas de la especie *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus delbrueckii*.

El medio de cultivo deberá contener, como mínimo, los nutrientes requeridos por los microorganismos elegidos, que pueden resumirse en: hidratos de carbono (como la glucosa); una fuente de nitrógeno (como la peptona) y, preferiblemente, sales inorgánicas, y/o vitaminas o elementos traza. Se prefiere que el medio de cultivo carezca de sustancias con capacidad tamponante, que dificulten el cambio de pH del medio de cultivo.

El medio en el que vayan a crecer las bacterias deberá contener, además, la sustancia indicadora que experimente un cambio, perceptible por el ojo humano, que indique que el producto no está en condiciones de ser consumido, tal como un cambio de color en función del pH. Esto último puede conseguirse recurriendo a compuestos cuyas formas ácida y básica tienen colores diferentes, pudiendo ser una de dichas formas incolora. Dicha sustancia indicadora debe incorporarse al dispositivo final bien como parte del medio de cultivo líquido, bien en forma de solución independiente. Las características del sustrato sólido poroso de la invención favorecerán su distribución homogénea por todo el dispositivo.

Una vez que se active el dispositivo, es decir, cuando el mismo se someta a una temperatura a la cual se produzca crecimiento de los microorganismos presentes en el mismo, comenzará la acidificación del medio, hasta que llegue a un valor en el que se produzca la modificación en la sustancia indicadora. Las características del medio de cultivo, los microorganismos presentes (su temperatura de crecimiento, la tasa de producción de ácido, la concentración de los mismos, la mezcla de varias especies de microorganismos...) pueden ajustarse de manera que la modificación de la sustancia indicadora se corresponda con el cambio en el producto que se quiere monitorizar: la aparición de una sustancia en el mismo (tal como una sustancia tóxica, que haga desaconsejable su consumo), un grado de deterioro que haga desaconsejable el consumo del producto, un estado de conservación que aconseje consumir el producto de inmediato... o incluso, simplemente, que ha habido una ruptura en las condiciones previstas de conservación del producto durante un tiempo determinado. La modificación del compuesto indicador, tal como un cambio de color, mostrará que ha habido una ruptura en las condiciones adecuadas de conservación del producto al que está unido el dispositivo, durante un tiempo suficiente para que haya tenido lugar la condición o el cambio en el producto que se quiere monitorizar. Por tanto, el dispositivo puede servir para monitorizar si se han cumplido o no las condiciones mínimas de conservación de un producto que deba conservarse por debajo de una temperatura

predeterminada o si las mismas se han superado durante un tiempo que haya podido dar lugar a un grado de degradación del producto determinado.

Por ello, otro aspecto de la invención se refiere al uso del dispositivo de la invención para controlar el historial de tiempo-temperatura de un producto que deba conservarse por debajo de una temperatura determinada, en el que el cambio del compuesto indicador perceptible por el ojo humano indica que se ha producido un cambio determinado en las condiciones del producto o que el producto se ha mantenido por encima de una temperatura umbral durante un tiempo superior a un valor predeterminado. Se prefiere que el cambio a observar sea el cambio de color de una sustancia indicadora de pH que presente un color diferente según el intervalo al que pertenezca el pH del medio, por tener sus formas ácida y básica colores diferentes. Como se ha dicho, el cambio puede ser una indicación de que el producto ya no está en condiciones de ser consumido, o puede ser una indicación de que el producto debe consumirse de inmediato o, simplemente según como se ha diseñado el dispositivo indicador de la invención, puede ser una indicación de que no se han cumplido las condiciones de conservación previstas para el producto. El producto puede ser cualquier producto perecedero o que pueda experimentar un cambio específico que se desee controlar, es decir, cualquier producto que deba conservarse por debajo de una temperatura determinada y preferiblemente que, al sobrepasar un período de tiempo por encima de una temperatura umbral, experimente algún cambio que se desee controlar. El producto puede ser, por ejemplo un producto del campo agroalimentario, farmacéutico o biomédico, tal como un alimento o un medicamento. Se prefiere, especialmente, que el producto a controlar sea un producto que deba conservarse en condiciones de refrigeración, de manera que el dispositivo estará preparado para controlar rupturas en la cadena de frío (que debe ser del mantenimiento del producto entre 0°C y 5°C).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Fig. 1 muestra varios ejemplos de etiquetas tiempo-temperatura:

- Panel A: Etiquetas Fresh-Check®, basadas en tintas termocrómicas: el grado de oscurecimiento del círculo central (menor, igual o superior) respecto al anillo que lo rodea determina, tal como indican las leyendas inscritas en las etiquetas, si el producto está totalmente fresco, si está todavía fresco pero debe consumirse rápidamente o si no debe consumirse, respectivamente.

- Panel B: Etiqueta CheckPoint®, basada en reacciones químicas: el cambio de color del círculo central a amarillo indica que el producto no debe consumirse.

- Panel C: Etiqueta MonitorMark™, en la que se controla el avance desde el origen de la difusión de un compuesto cuya temperatura de fusión coincide con la temperatura crítica del producto. El recorrido del compuesto da una indicación del tiempo que ha permanecido el producto por encima de la temperatura umbral.

- Panel D: Etiqueta ThermAssureRF®, capaces de monitorizar la temperatura y enviar una señal de radio en caso de superar un cierto valor. El botón situado en la esquina inferior izquierda permite activar o desactivar el sensor; a la derecha hay un diodo emisor de luz que indica el estado: verde, correcto; rojo (círculo derecho), alarma activada.

- Panel E: Etiqueta ripeSense™, que detecta aromas relacionados con la madurez de la fruta y cambia su color según dicho estado de madurez.

- Panel F: Etiqueta ToxinGuard®, capaz de detectar la presencia de una batería de sustancias relacionadas con la degradación de alimentos mediante biosensores específicos capaces de interactuar con ellas, dando lugar a una reacción que provoca la aparición de una cruz si el estado del alimento desaconseja su consumo.

La Fig. 2 muestra la estructura del dispositivo de la invención, diseñado para poder actuar como dispositivo tiempo-temperatura en una versión final, que es la que se adhiere sobre el producto a controlar.

- Panel A: Estructura básica del dispositivo, en la que se representan las dos láminas plásticas (recubrimiento inferior y recubrimiento transparente superior), que recubren la matriz porosa tridimensional.

- Panel B: estructura del dispositivo en forma de etiqueta TTI, una vez que el medio con microorganismos ha sido encapsulado dentro de la matriz porosa.

- Panel C: Esquematación del cambio de color que se aprecia en la etiqueta TTI de la presente invención: izquierda color original; derecha, color de la etiqueta si se produce una rotura de la cadena de frío durante 6 horas

La Fig. 3 muestra esquemas en los que se compara la diferencia (ΔE^*_{ab}) del color de las etiquetas de la invención antes (color inicial) y después (color final) de que se produzca el viraje del indicador al haber mantenido la etiqueta a 20°C durante más de 6 horas (equivalente a la ruptura de la cadena de frío), en función de la estructura de la matriz celulósica multicapa:

- Panel A: gráfico en que se representa la diferencia de color en función del número de monocapas de 24 g/m² que componen la matriz porosa

- Panel B: gráfica en que se representa la diferencia de color en función del gramaje, expresado en gramos por metro cuadrado, de la matriz porosa

La Fig. 4 muestra fotografías de una etiqueta de la invención, sometida a un ciclo continuo de 8 horas a temperatura constante de 20°C, antes de que se produzca el viraje de color (fotografía (a)) y después de la rotura de la cadena de frío (fotografía (b)). La parte (a), gris oscuro en la figura, era de color púrpura rojizo en el original; la parte (b), gris más claro en la figura, es de color amarillo ambarino en el original, fácilmente distinguible del color anterior.

La Fig. 5 muestra fotografías de los dispositivos obtenidas cada 3 horas al ser expuestos a la temperatura crítica de 20 °C de manera continua (ciclo 1) o de forma discontinua, tal como indica la línea representada bajo las etiquetas: 3 horas (3 h) a 20°C, seguidas de 3 horas a 5°C y posteriormente 3 horas a 20°C (ciclo 2). Se observa que ambas etiquetas son de un color marrón – rojizo tras las 3 primeras horas de incubación a 20°C. En el ciclo 1, la etiqueta presenta ya un aspecto amarillo – ambarino tras 6 horas de incubación a 20°C; en el ciclo 2, es necesario llegar a las 9 horas de incubación para observar una coloración ámbar oscuro, pero el viraje demuestra que la etiqueta presenta un efecto memoria capaz de registrar de forma acumulativa el exceso de temperatura.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La invención consiste en un dispositivo de tiempo-temperatura, basado en el crecimiento de microorganismos, diseñado de forma que se pueda prescindir de la presencia de medios texturizantes o polímeros hidrosolubles en el medio de cultivo, manteniendo la condición de que la visualización óptica del cambio que se produzca en la sustancia indicadora sea óptima, y que además permita una fabricación más sencilla de los dispositivos.

Una de las ventajas principales que presenta este dispositivo es su fácil fabricación, que hace que el dispositivo pueda fabricarse durante el proceso de embalaje del producto, si bien esto no es estrictamente necesario. El dispositivo presenta una ventaja fundamental respecto de los dispositivos anteriormente descritos, que es su bajo coste que lo hace aplicable a una gran variedad de productos, suponiendo un aumento del valor añadido de los mismos.

La solución propuesta en la presente invención se basa en mantener la estructura de "etiqueta" preferiblemente autoadhesiva, similar a la de los indicadores descritos en la solicitud de patente US2007275467A1, que presenta sendas láminas plásticas impermeables al agua, de las que al menos una es transparente y la otra posee en la cara exterior una capa adhesiva que facilita su colocación sobre el producto a controlar, láminas plásticas que pueden sellarse la una a la otra de manera que, en el dispositivo final que se adhiere al producto perecedero a controlar, sirven para contener el medio de cultivo y los microorganismos y mantenerlos aislados del medio exterior, sin impedir que dichos microorganismos se vean sometidos a las mismas variaciones de temperatura que experimente el producto sobre el que se adhiera la etiqueta. Sin embargo, a diferencia de los dispositivos descritos en la solicitud US2007275467A1, la estructura del dispositivo de la presente invención hace que no sea necesaria la presencia de un agente texturizante en el medio acuoso en el que van a crecer los microorganismos, para que el dispositivo tenga la apariencia deseada y el medio se mantenga uniforme. Esto es así gracias a que el dispositivo de la invención presenta una matriz porosa tridimensional biocompatible, cuyo peso base es igual o superior a 100 g/m², y cuya permeabilidad al aire, preferiblemente, es inferior a 115 µm/(Pa · s), preparada preferiblemente a partir de una estructura celulósica multicapa, cuyas características permiten que el medio acuoso en el que crecen los microorganismos difunda y circule libremente en el interior de la estructura multicapa, de manera que la composición del medio sea homogénea, que es lo que se desea, sin necesidad de tener que añadir un agente texturizante para obtener un aspecto homogéneo. Las características de la matriz porosa de los dispositivos de la presente invención facilitan que el medio acuoso permanezca alojado en todo el volumen de la estructura multicapa, de modo que el crecimiento de los microorganismos y el cambio de color se producen en toda la extensión de la estructura, de manera homogénea. La estructura de la matriz porosa es biocompatible, con lo cual no supone ningún impedimento para el desarrollo de los microorganismos, y ofrece las propiedades adecuadas en cuanto a peso base (gramaje) y porosidad para que la percepción del cambio de color (indicativo de que es desaconsejable el consumo del producto al que está adherido el dispositivo) sea la suficientemente notable como para poder distinguirse a simple vista por el ojo humano.

La estructura propuesta en esta invención es novedosa, al no haberse utilizado ni en la fabricación de etiquetas TTI ni incluso en sistemas de monitorización de crecimiento de microorganismos ajenos a la fabricación de etiquetas TTI. En dichos sistemas de monitorización de crecimiento de microorganismos es necesaria la utilización de una capa polimérica hidrosoluble con el objetivo de fijar en la superficie de una matriz porosa las colonias de bacterias para así poder estudiar su crecimiento, tal y como se describe en la patente US2005084948A1. Más específicamente, en la citada patente US2005084948A1, el polímero hidrosoluble requerido, alcohol polivinílico, se disuelve al entrar en contacto con la muestra acuosa y se homogeneiza con la matriz porosa, creando gradualmente una solución viscosa que evita que los microorganismos crezcan en el interior de la matriz porosa. De esta manera los microorganismos permanecen confinados en la superficie de la misma, para así favorecer la cuantificación visual de las colonias crecidas en dicho medio de cultivo. Es decir, a diferencia de la citada solicitud US2005084948 A1, donde el objetivo principal es que las colonias de microorganismos crezcan en la superficie de la matriz para poder

ser cuantificadas, en la presente solicitud los microorganismos crecen dispersados homogéneamente en todo el volumen de la matriz porosa tridimensional, para poder así obtener un cambio de color, también homogéneo, del dispositivo. De este modo, y a diferencia de la solicitud US2005084948 A1 descrita anteriormente, el sustrato tridimensional poroso que se describe en la presente invención constituye una estructura multicapa en el interior de la cual el medio acuoso se difunde y circula libremente, de manera que la composición del medio sea homogénea.

La estructura multicapa del dispositivo de la presente invención tiene la particularidad de que sus características no se corresponden con las enseñanzas y recomendaciones respecto a las de las matrices porosas de los dispositivos descritos en la solicitud US2005084948A1, sino que se utilizan en la misma valores de peso base y porosidad desaconsejados en dicha solicitud, por considerarse inadecuados para el crecimiento de los microorganismos. Más específicamente, para que el dispositivo descrito en la solicitud US2005084948A1 cumpla con su objetivo de medio de cultivo adecuado, requeriría de una matriz porosa dentro de un rango de peso base de 40 a 100 g/m², preferiblemente entre 55 a 80 g/m², ya que por debajo de 40 g/m² su matriz porosa es incapaz de retener el agua y las muestras añadidas, impidiendo la formación de colonias de una manera contable. Por otro lado, por encima de un peso base de 100 g/m² el polímero hidrosoluble de alta viscosidad utilizado en esa solicitud es retenido dentro de la matriz porosa de manera que la solución viscosa y la matriz porosa no se unen como debieran, lo que, según la solicitud US2005084948A1, se considera que daría lugar al crecimiento de microorganismos tanto en la superficie de la matriz porosa como en el interior de la misma, variando la velocidad de crecimiento según la ubicación de los microorganismos, no dando lugar a una distribución uniforme de los mismos y dificultando la observación de crecimiento de microorganismos en la matriz porosa. En cambio, en el dispositivo de la presente solicitud, el peso base de la matriz porosa (mayor que 100 g/m²) queda fuera del margen citado en la solicitud US2005084948A1 como apropiado para el crecimiento de microorganismos, a pesar de lo cual el crecimiento de los microorganismos y el cambio de color se producen de manera homogénea en toda la estructura de la matriz porosa, sin necesitar de la presencia de ningún polímero hidrosoluble en el medio de cultivo. Estas mismas condiciones se cumplen incluso con matrices porosas en las que el valor del peso base se aleja mucho del valor máximo recomendado por la US2005084948A1, como pueden ser valores cercanos a 500 g/m² (480 g/m²) que muestran las matrices porosas de los dispositivos con los cuales se han realizado ensayos que se muestran más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud.

Otro de los parámetros característicos de la matriz porosa en el que ambas invenciones pueden y, preferiblemente, presentan diferencias, es en la permeabilidad al aire. En la matriz de la solicitud US2005084948A1 la permeabilidad es de 7 a 24 cm/s (valores que, según las condiciones de medida, corresponden al intervalo de 5,07 a 17,39 μm/(Pa . s), y preferiblemente es de 10 a 18 cm/s (7,24 a 13,04 μm/(Pa . s), ya que, por debajo de 7 cm/s (5,07 μm/(Pa . s)), se considera que la muestra no es uniformemente dispersada junto con el polímero hidrosoluble por falta de permeabilidad en el sustrato poroso, impidiendo el cultivo uniforme de los microorganismos. Por el contrario, por encima de 24 cm/s (17,39 μm/(Pa . s), la fijación de la solución altamente viscosa del polímero hidrosoluble disuelto es insuficiente, impidiendo la formación de colonias de microorganismos fácilmente observables, y por lo tanto impidiendo también su cuantificación de manera ajustada. En la presente solicitud, en cambio, se describe un sustrato cuya permeabilidad al aire es, preferiblemente, menor que 115 μm/(Pa . s), lo cual supone un límite superior recomendado que es claramente mayor que 17,40 μm/(Pa . s), el límite superior recomendado en la solicitud US2005084948A1 (que es 17,39 μm/(Pa . s) más exactamente), por lo que los valores recomendados quedan también fuera de los límites citados en dicha solicitud US2005084948A1, a pesar de lo cual los microorganismos quedan distribuidos de forma homogénea por la matriz y se puede visualizar bien el cambio de color de la sustancia indicadora dependiente del pH.

Así, con los dispositivos de la presente invención se consigue un sistema TTI basado en microorganismos, dispositivo que puede ser empleado, por ejemplo, como indicador de ruptura de la cadena de frío para todos aquellos productos que requieren conservarse a temperaturas de refrigeración o congelación, entre los que se encuentran productos alimenticios, así como productos de la industria farmacéutica y veterinaria. Dicho dispositivo soluciona los problemas que presentan las tecnologías existentes relacionadas que se han comentado en el estado del arte, relativos a la necesidad de que estén presentes agentes texturizantes o polímeros hidrosolubles.

Con ello, una de las ventajas principales que presenta este dispositivo es su fácil fabricación, que hace que el dispositivo pueda fabricarse durante el proceso de embalaje del producto, si bien esto no es estrictamente necesario. El dispositivo presenta, además, una ventaja fundamental respecto de los dispositivos anteriormente descritos, que es su bajo coste, que lo hace aplicable a una gran variedad de productos, suponiendo un aumento del valor añadido de los mismos.

A continuación se describen con mayor detalle características concretas del dispositivo.

- Estructura del dispositivo y preparación del dispositivo. Láminas plásticas

La novedad introducida en esta invención, es la estructura del dispositivo, que se presenta bajo la forma de una etiqueta plana, preferiblemente autoadhesiva, que presenta la estructura básica que se representa en la Fig. 2A, formada por :

- Una lámina plástica que, preferiblemente, contiene una capa de adhesivo, lo cual facilita que el dispositivo se adhiera al producto de interés.
- Una matriz porosa sólida y permeable que absorberá y retendrá el medio líquido (compuesto de microorganismos y medio de cultivo). Esta matriz retiene el medio líquido y actúa como soporte físico en el que se llevará a cabo la fermentación.
- Una segunda película plástica que se colocará sobre las dos estructuras anteriores, que ha de ser transparente o translúcida, para que la matriz porosa pueda verse a través de ella.

Tal como se observa en las Fig. 2A y 2B, las dos láminas plásticas son preferiblemente de las mismas dimensiones, pues están diseñadas para sellarse la una a la otra. En cambio, la matriz porosa sólida preferiblemente, presenta una superficie inferior a la de las láminas plásticas que deben recubrirla, para facilitar el sellado de las mismas. En una posible realización del dispositivo de la invención, en la que el dispositivo es de forma rectangular, el largo y el ancho de la matriz porosa sólida serán inferiores al largo y al ancho de las láminas plásticas. Es perfectamente compatible con la invención que el dispositivo presente otras formas, como por ejemplo circular, en cuyo caso, el diámetro de la matriz porosa sólida será inferior al diámetro de las láminas plásticas. En cualquier caso, el dispositivo deberá ser inferior al del embalaje del producto sobre el cual se quiera colocar, siendo posible que aparezca sobre el mismo con una pequeña etiqueta de forma análoga a los dispositivos mostrados en la Fig. 1, razón por la cual se alude también al dispositivo de la invención como "etiqueta de tiempo-temperatura" frecuentemente a lo largo de la presente solicitud.

Tal como se indicó previamente, es posible preparar previamente esta estructura básica, en la que las láminas de plástico pueden sellarse inicialmente sólo de forma parcial, sin llegar a sellar todo el perímetro de las mismas, dejando una abertura. Es posible, también, diseñar el dispositivo de manera que las láminas plásticas de recubrimiento posean un adhesivo en las caras que están en contacto con la matriz porosa, pero en la sección de las mismas que no queda en contacto con dicha matriz (por corresponder a la porción de superficie que las láminas de plástico presentan en exceso sobre la matriz), que permitirá fijar una lámina plástica sobre la otra y mantener la matriz porosa aislada del exterior. Si la estructura básica del dispositivo se fabrica previamente a la preparación del dispositivo completo (la versión del dispositivo que contiene, adicionalmente a los elementos de la estructura básica, los microorganismos, el medio de cultivo de los mismos y la sustancia indicadora que presenta un variación perceptible por el ojo humano en función del pH), será necesario que la sustancia adhesiva sea tal que permita que las láminas plásticas puedan separarse de nuevo en el momento en el que se desee añadir los microorganismos, el medio de cultivo de los mismos y la sustancia indicadora. También es posible combinar todos los elementos del dispositivo final en el mismo momento, momento que puede ser previo a su colocación sobre el producto perecedero cuya historial de tiempo y temperatura se quiere controlar, o puede ser prácticamente simultáneo al embalado de dicho producto, colocando inmediatamente el dispositivo de tiempo-temperatura sobre el mismo.

Tal como se ha comentado al principio, se prefiere que una de las láminas plásticas presente una capa de adhesivo en la cara de dicha lámina que no esté en contacto con la matriz porosa sólida, la cara que puede considerarse "exterior". Esto hace más fácil colocarla sobre el producto a controlar y que se mantenga junto al mismo. La presencia de dicha capa de adhesivo no es imprescindible, pues la etiqueta puede mantenerse unida al producto a controlar mediante cualquier otro medio, como puede ser mediante el uso de cinta adhesiva o de una lámina adicional de plástico adhesivo transparente, de dimensiones superiores a las de la etiqueta, que se coloque sobre la misma una vez situada la etiqueta sobre el producto al que debe permanecer unida. En cualquiera de estos últimos casos, es importante que la etiqueta se coloque sobre el producto de manera que la matriz porosa sólida quede visible, de forma que no quede tapada, por ejemplo, por la cinta adhesiva; en el caso de que sólo una de las láminas plásticas que conforman la etiqueta sea transparente o translúcida, será necesario tener la precaución de que la lámina plástica que permita observar la matriz porosa (y, por ende, los cambios que puedan producirse en la misma) sea la lámina que no quede en contacto con el producto, sino situada hacia el exterior.

La estructura básica de la etiqueta, compuesta por las láminas plásticas y la matriz porosa sólida situada entre ellas, tiene interés comercial e industrial por sí misma, pues supone una estructura básica común que puede utilizarse como base para la preparación de diferentes realizaciones del dispositivo indicador final, que pueden diferir en la sustancia cuya modificación sirve como indicación de no haberse mantenido las condiciones de conservación deseadas para el producto, así como en los microorganismos presentes (especie, cantidad, intervalos de temperatura de crecimiento, velocidad de crecimiento...) y en las características del medio de cultivo presentes en la versión final y más completa del dispositivo de la invención. Las características específicas de estos tres componentes determinarán las condiciones de tiempo y temperatura en las que el dispositivo indicador experimentará un cambio apreciable para el ojo humano y, con ello, los productos a los que pueda ser interesante unir el dispositivo indicador, según las condiciones de conservación previstas para los mismos y los umbrales de temperatura y tiempo de permanencia por encima de la misma que no se deban superar. En cualquiera de esas posibles realizaciones, la presencia de un texturizante no será necesaria, pues el dispositivo indicador final se habrá preparado a partir de la estructura básica de etiqueta de la invención, que contendrá una matriz porosa con las características que se han mencionado previamente.

Para la preparación de la versión definitiva del dispositivo que puede utilizarse como etiqueta indicadora en un producto, se deposita el medio que contiene los nutrientes y el indicador junto con los microorganismos, sobre la matriz porosa que, a su vez, tiene como soporte una de las láminas plásticas. El medio de cultivo, los microorganismos y el indicador de acidificación pueden depositarse de forma independiente sobre la matriz porosa, cada uno de ellos disuelto (en suspensión en el caso de los microorganismos) en su propia solución acuosa, aunque se prefiere que se mezclen previamente al depósito sobre la matriz porosa y se añadan conjuntamente sobre el sustrato poroso.

Si la estructura inicial de la etiqueta estaba ya previamente preparada (el conjunto de las dos láminas plásticas y la matriz porosa situada entre ellas), el medio que contiene los nutrientes, los microorganismos y el indicador se introducirán por la abertura determinada por la porción de las dos láminas que haya quedado sin cerrar, procediéndose entonces al sellado completo de la etiqueta. Alternativamente, si las láminas plásticas se mantenían unidas por medio de algún adhesivo que permitía su separación, puede recurrirse a separar las láminas plásticas, por ejemplo levantando una de ellas, y depositando el medio de cultivo, con los microorganismos y la sustancia indicadora sobre la matriz porosa. A continuación se aplica la otra lámina plástica en la cara superior y se procede a un sellado térmico en los bordes de las láminas plásticas para que la matriz porosa que aloja el medio de cultivo con los microorganismos quede totalmente encapsulada en una estructura sándwich entre las dos películas plásticas, tal como se representa en las Figs. 2A y 2B.

En cualquier caso, en el momento en que se hayan combinado todos los elementos que forman parte de la versión final del dispositivo de la invención, las dos películas plásticas habrán de sellarse, de manera que el interior de la etiqueta se encuentre aislado del exterior de la misma y del producto, pero siendo sometido a las mismas combinaciones tiempo-temperatura que el producto en el que se encuentre colocada. Entonces, el dispositivo de la invención se pegará en el envase del producto deseado, utilizando para ello, de existir la misma, la capa de adhesivo que puede estar presente en la cara exterior de una de las láminas plásticas, es decir, la cara que no contacta con la matriz porosa, o recurriendo, en caso contrario, a un medio adhesivo adicional que permita que el dispositivo indicador permanezca unido al producto, tal como se ha discutido previamente. Con ello, el dispositivo indicador permitirá monitorizar, por ejemplo, la ruptura de la cadena de frío del producto, en el caso de que el mismo deba conservarse en condiciones de refrigeración o, incluso, de congelación.

Una vez que el dispositivo completo está totalmente ensamblado, si el mismo no se coloca de inmediato sobre el producto a controlar, debe conservarse a baja temperatura, para impedir el desarrollo de los microorganismos previamente a su colocación sobre el producto. El límite a partir del cual la temperatura puede considerarse suficientemente baja dependerá de los microorganismos presentes en el dispositivo, pues lo recomendable es que la temperatura sea inferior a la temperatura mínima de crecimiento de dicho microorganismo. Así, si el microorganismo es capaz de crecer a partir de 0°C, el dispositivo debería conservarse por debajo de dicha temperatura. Es recomendable, para una mejor conservación de los microorganismos, que el dispositivo se conserve a temperaturas negativas a las que habitualmente no queda agua en estado líquido, como pueden ser, por ejemplo, entre (-18°C) y (-80°C), temperaturas que corresponden a los intervalos de congelación utilizados habitualmente en la industria alimentaria y en el ámbito doméstico.

En el caso de las bacterias lácticas preferidas para el dispositivo de la presente invención, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus delbrueckii*, la etiqueta puede conservarse a temperatura de refrigeración o cercana a la misma (5° C), que viene a ser la temperatura de refrigeración que se toma como situación correcta de refrigeración en la cadena de frío; en esta situación, si el indicador añadido es clorofenol rojo, la etiqueta conserva su color púrpura rojizo inicial.

En cuanto la etiqueta se exponga a la temperatura crítica, es decir, cuando se produzca la ruptura en la cadena de refrigeración, que coincide con el rango óptimo de temperatura de crecimiento de las bacterias antes mencionadas, se producirá la fisión binaria. Por lo tanto, la población bacteriana aumentará y se producirá la fermentación de los azúcares del medio de cultivo, acidificándolo y provocando el cambio de color del indicador del dispositivo.

La lámina plástica que no contiene la capa adhesiva debe de ser transparente, si no en su totalidad, al menos una parte de la misma, de forma que pueda apreciarse la matriz porosa que retiene el medio líquido y la sustancia indicadora que experimenta un cambio visualmente perceptible. El cambio debe ser ópticamente perceptible para el ojo humano de una manera obvia, tal como se muestra en la representación del dispositivo final, con todos sus elementos, que se muestra en la Fig. 2B, en el que la porción correspondiente a la matriz porosa aparece en gris más oscuro, en representación de una matriz coloreada por la presencia de una sustancia indicadora que varía su color en función del pH.

Ambas láminas plásticas deben ser de un material impermeable al agua, pues el medio de cultivo en el que crecerán las bacterias alojadas en la matriz porosa es un medio acuoso, que debe quedar retenido, al igual que las bacterias y la sustancia indicadora del pH, en el dispositivo.

Entre los materiales plásticos compatibles con la invención de los que pueden estar hechas las láminas pueden citarse, por ejemplo, tereftalato de polietileno (PET), polietileno (PE) y polipropileno (PP).

- Microorganismos

Tal como se ha comentado previamente, se prefiere que el dispositivo utilice una población de microorganismos capaces de producir algún tipo de ácido por medio de la fermentación de algún azúcar presente en el medio líquido en el que se encuentran. Se prefiere especialmente que los microorganismos utilizados sean no patógenos y no tóxicos y, además, que su crecimiento y su capacidad para producir sustancias ácidas se produzca a temperaturas que sean compatibles con las temperaturas de conservación de los productos cuyo historial de tiempo-temperatura se quiera controlar.

Las bacterias concretas utilizadas para cada producto deben elegirse teniendo en cuenta la temperatura a la que vaya a conservarse el producto y las condiciones de tiempo y temperatura que darían lugar a que se produzca el cambio en el producto que se desea controlar, tal como una degradación del mismo que haría desaconsejable (o peligroso) su consumo, para que las bacterias elegidas presenten un rango de temperatura, velocidad de crecimiento y capacidad de generación de ácidos tales que su crecimiento permita la generación de ácido en condiciones tales que se correspondan con aquellas que darían lugar a la degradación del producto o a cualquier otro cambio en el mismo que se desee monitorizar. Así, pueden utilizarse bacterias mesófilas, psicrófilas o psicrotrofas (o, incluso, criófilas, para productos conservados a temperaturas cercanas a 0°C o en congelación). Para aquellos productos que se conserven a temperaturas de refrigeración (entre 0° y 5°C), que son condiciones de conservación muy habituales para los productos perecederos, se prefieren las bacterias mesófilas psicrotróficas, particularmente aquellas cuyo metabolismo dé lugar a la producción de ácido entre 0°C y 37°C, incrementándose la producción de ácido al incrementarse la temperatura. En particular, se consideran especialmente adecuados para controlar la ruptura de las condiciones de refrigeración aquellos microorganismos que presenten un crecimiento nulo o casi nulo a temperaturas de entre 1 y 6 grados centígrados, mientras que a temperaturas superiores a 10 grados su crecimiento es apreciable por el ojo humano en pocas horas cuando se cultivan en condiciones normales de laboratorio (tales como inoculados en medios de cultivo contenidos en tubos de ensayo o tras haberse sembrado en la superficie de medios de cultivo sólidos situados sobre placas de cultivo).

Es compatible con la invención el uso de microorganismos de diferentes especies en un mismo indicador, lo que puede facilitar ajustar la temperatura, velocidad de crecimiento y tasa de producción de ácido de las bacterias con los rangos de tiempos y temperaturas en los cuales se manifiesta la degradación del producto a controlar.

Para que cumplan estas condiciones, se prefiere especialmente que se utilicen las llamadas bacterias lácticas, que son cocos o bacilos gram positivos no esporulados, que se utilizan en muchas aplicaciones agrícolas e industriales, porque se consideran en general microorganismos inocuos para el ser humano o, incluso, beneficiosos para su salud. Este tipo de bacterias realiza la fermentación de azúcares con producción de ácido láctico, provocando un descenso en el pH del medio y facilitando la conservación de alimentos perecederos (lácteos y cárnicos). Se trata, además, de bacterias que se desarrollan de manera natural en muchos alimentos perecederos, a temperaturas y velocidades de crecimiento que son muy similares a los de la flora microbiana que degrada el alimento, lo que las hace muy adecuadas para reflejar la contaminación y la cinética de la degradación microbiológica de los productos sobre los cuales se coloque el indicador.

Se pueden utilizar bacterias lácticas como:

- Streptococcaceae: *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus cremoris*; *Pediococcus*, *Leuconostoc*.
- Lactobacillaceae: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus delbrueckii*.

De entre todas las bacterias lácticas, para la presente invención se realizaron experimentos de forma preferente con bacterias de las especies *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus delbrueckii*. Esto es debido a las grandes ventajas experimentales que ofrecen dichas bacterias en la invención que se presenta. Esto es, dichas bacterias disfrutan de unas características de alto interés para este desarrollo: son microorganismos no patógenos, además son microorganismos mesófilos psicrotrofos, que experimentan crecimiento en un rango de operación de entre +5°C a +35°C que es de interés para la invención; acidifican el medio permitiendo un viraje de pH; son bacterias homofermentadoras, aerobio tolerantes por lo que pueden fermentar en presencia o ausencia de oxígeno (que es de interés en dispositivos encapsulados), y además son bacterias ampliamente conocidas y disponibles comercialmente con lo que la barrera de entrada al mercado está minimizada.

- Medio de cultivo

El medio líquido ha de contener, además de una serie de nutrientes requeridos por los microorganismos para llevar a cabo esta fermentación, un indicador colorimétrico que cambiará de color una vez que el pH descienda por debajo de un umbral.

El medio de cultivo utilizado contiene todos los elementos necesarios para la síntesis de células y producción de metabolitos, teniéndose en cuenta los factores físico químicos que afectan a la velocidad de crecimiento como la concentración de nutrientes, actividad del agua, pH, disponibilidad de oxígeno y temperatura.

Como ya se ha comentado previamente, los nutrientes mínimos requeridos por los microorganismos pueden resumirse en: hidratos de carbono (u otras fuentes de carbono similares); una fuente de nitrógeno (como la peptona) y, preferiblemente, sales inorgánicas, y/o vitaminas o elementos traza. Para que el dispositivo funcione tal como se ha diseñado, debe existir en el medio de cultivo al menos un compuesto a partir del cual las bacterias presentes en el dispositivo pueda generar un compuesto ácido que dé lugar al cambio de pH en el medio que provoque en la sustancia indicadora el cambio perceptible para el ojo humano que sugeriría que el producto perecedero controlado por el dispositivo puede no estar en condiciones de ser consumido.

En el caso concreto de las bacterias lácticas, pueden cultivarse en medios de cultivo que contienen diferentes fuentes de carbono. Ejemplos de azúcares y derivados de los mismos y otros hidratos de carbono entre los que puede elegirse la fuente de carbono son: glicerol, eritritol, D-arabinosa, L-arabinosa, ribosa, D-xilosa, L-xilosa, adonitol, β -metil-xilósido, galactosa, D-glucosa, D-manosa, D-fructosa, L-sorbosa, rhamnosa, dulcitol, inositol, manitol, sorbitol, α -metil-D-manósido, α -metil-D-glucósido, N-acetil-glucosamina, amigdalina, arbutina, esculina, salicina, celobiosa, maltosa, lactosa, melibiosa, sacarosa, trehalosa, inulina, melizitosa, D-rafinosa, almidón, glucógeno, xilitol, β -genitibiosa, D-turanosa, D-lixosa, D-tatgorsa, D-flucosa, L-fucosa, D-arabitol, L-arabitol, gluconato, 2-ceto-gluconato, 5-gluconato.

El azúcar presente en el medio, por ejemplo la glucosa, también se usa para la producción de ácido láctico por parte de la bacteria. Por ello, es necesaria la presencia en el medio de cultivo de un azúcar que pueda ser metabolizado por las bacterias presentes en el dispositivo y que se produzca la acidificación del medio, como puede ser la glucosa, o también son ejemplos comunes fructosa, lactosa, galactosa o sacarosa.

En el caso de las bacterias lácticas utilizadas en los ejemplos de la presente solicitud, *Lactobacillus plantarum*, u otras bacterias lácticas preferidas también para los dispositivos de la invención, como *Lactobacillus delbrueckii*, puede ser la glucosa el azúcar presente en el medio de cultivo.

También es necesaria una fuente de nitrógeno, para lo cual puede utilizarse triptona, peptona o cualquier compuesto de origen proteico, por ejemplo.

En general, cuando se trabaja con bacterias lácticas, especialmente del género *Lactobacillus*, se recomienda utilizar el medio de cultivo estándar para el crecimiento de dichas bacterias, esto es un caldo de cultivo tipo MRS, conocido así por las iniciales de los apellidos de los autores del mismo (J.C. de Man, M. Rogosa and M. Elisabeth Sharpe, Appl. Bact. 23, pp. 130-135, 1960). Los ingredientes y concentraciones típicas de este medio son de manera orientativa los siguientes: peptona (10 g/l); extracto de carne (8 g/l); extracto de levadura (4 g/l); glucosa (20 g/l); tween80 (1.08ml/l); fosfato de potasio (2 g/l); acetato de sodio (5 g/l); citrato de amonio (2g/l); sulfato de magnesio (0.2 g/l); sulfato de manganeso (0.05 g/l). Sin embargo, tal como se detalla más adelante en los Ejemplos de la presente solicitud, esta composición del medio no resultó adecuada para conseguir la acidificación del medio de cultivo que se estaba buscando. La causa de ellos es que existen componentes en dicho medio MRS que producen un efecto tampón del mismo.

Es por ello que, para el dispositivo de la presente invención, especialmente cuando se utilizan las bacterias *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus delbrueckii*, se recomienda que el medio de cultivo carezca de compuestos con capacidad tamponante. Por ello, no se recomienda la adición de sales, orgánicas o inorgánicas, que puedan tener capacidad tamponante, como pueden ser sales de fosfato (PO_4^{2-}) o hidrógenofosfato (HPO_4^{-1}), sulfato (SO_4^{2-}), carbonato (CO_3^{2-}), acetato o citrato, entre otras. Todo ello es también contrario a las enseñanzas de la solicitud de patente US20070275467A1, en la que se utilizan sales como K_2HPO_4 y MgSO_4 en la composición del medio de cultivo, aludiendo igualmente al MRS como medio recomendado.

Una posible composición del medio de cultivo adecuado para el funcionamiento del dispositivo de la invención, especialmente cuando se utilizan las bacterias *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus delbrueckii*, es la de un medio de cultivo que comprende:

- Glucosa (preferiblemente, 30 g/l)
- Peptona (preferiblemente, 2 g/l)
- Leche en polvo (preferiblemente, 10 g/l)
- Extracto de levadura (preferiblemente, 2 g/l)

Preferiblemente, a este medio de cultivo no se le añaden sales que puedan tener capacidad tamponante.

Adicionalmente, el medio contendrá la sustancia indicadora que dará lugar a una variación perceptible por el ojo humano, al bajar el pH, como puede ser una sustancia que cambia de color según el pH.

- Indicador de acidificación

En el dispositivo de la presente invención, se puede monitorizar la ruptura de las condiciones adecuadas de conservación del producto al que está adherido el dispositivo gracias a que esto da lugar a una aceleración en el crecimiento de los microorganismos presentes en el dispositivo, que provocan una acidificación del medio, que se visualiza gracias a la presencia de una sustancia indicadora, que sufre una modificación a un determinado valor de pH, modificación que es visualizable por el ojo humano.

Se prefiere especialmente que se utilicen como indicadores de acidificación indicadores de color, que son ácidos o bases débiles, cuyas formas ácidas y básicas tienen colores diferentes. Así, el color de los indicadores cambia cuando el pH del medio pasa a ser inferior o superior al pK_i del indicador (que sería el valor de pH en el que la concentración de las formas ácida y básica en el medio es la misma).

La elección de indicadores de la acidificación que experimentan un cambio de color tiene la ventaja de que se trata de un cambio fácilmente visualizable e identificable por el ojo humano, que tiene lugar de forma clara y, generalmente, brusca. Tiene la ventaja añadida de que existe una amplia variedad de sustancias conocidas que pueden utilizarse como indicadores de acidificación por cambio de color, con distintos colores, y con valores diversos de pK_i, es decir, distintos valores de pH en los que se produce el cambio de color. En la siguiente tabla se muestran algunos ejemplos de sustancias indicadoras que pueden utilizarse para el propósito de la invención; en la misma se cita el nombre de la sustancia, el color que tiene a valores de pH más elevado (el color de la base), el color que tiene a valores de pH más reducidos (el color de la forma ácida) y el intervalo de pH en el que se produce el viraje de color.

Tabla 1: Sustancias indicadoras de pH

Indicador	Color ácido	Intervalo viraje		Color Base
Violeta de metilo	amarillo	0,0	1,6	azul
Rojo cresol (1er intervalo)	rojo	0,0	1,8	amarillo
Cristal violeta	amarillo	0,0	1,8	azul
Verde de malaquita	amarillo	0,2	1,8	azul-verde
Verde de metilo	amarillo	0,2	1,8	azul
Amarillo de metanilo	rojo	1,2	2,4	amarillo
Púrpura de m-Cresol (1er intervalo)	rojo	1,2	2,8	amarillo
Púrpura de metacresol	rojo	1,2	2,8	amarillo
Azul de timol (1er intervalo)	rojo	1,2	2,8	amarillo
4-o-Tolilazo-o-toluidina	naranja	1,4	2,8	amarillo
Naranja IV (Tropeolina 00)	rojo	1,4	3,2	amarillo
2,6-Dinitrofenol	incoloro	1,7	4,4	amarillo
Naranja de benzilo	rojo	1,9	3,3	amarillo
2,4-Dinitrofenol	incoloro	2,4	4,0	amarillo
Benzopurpurina 48	violeta	2,2	4,2	rojo
p-Dimetilaminoazobenzeno	rojo	2,9	4,0	amarillo
Amarillo de metilo	Rojo	2,9	4,0	amarillo
Azul de Bromoclorofenol	amarillo	3,0	4,6	púrpura
Azul de Bromofenol	amarillo	3,0	4,6	azul violeta

Indicador	Color ácido	Intervalo viraje		Color Base
Azul de tetrabromofenol	amarillo	3,0	4,6	azul
Rojo Congo	azul	3,0	5,0	rojo
naranja de metilo	rojo	3,1	4,4	naranja
naranja de etilo	rojo	3,4	4,8	amarillo
p-etoxycrisoidina	rojo	3,5	5,5	amarillo
α -naftilo rojo	rojo	3,7	5,0	amarillo
verde de bromocresol	amarillo	3,8	5,4	azul
Resazurina	naranja	3,8	6,4	violeta
2,5-Dinitrofenol	incoloro	4,0	5,8	amarillo
Rojo de metilo	rojo	4,2	6,3	amarillo
Azolitmina (litmus)	rojo	4,4	6,6	azul
rojo de Alizarina S	amarillo	4,6	6,0	rojo
rojo de propilo	rojo	4,6	6,6	amarillo
<u>Rojo de clorofenol</u>	amarillo	4,6	7,0	Rojo-púrpura
p-Nitrofenol	incoloro	4,7	7,9	amarillo
rojo de Bromofenol	amarillo	4,8	6,8	púrpura
Púrpura de Bromocresol	amarillo	5,2	6,8	púrpura
p-Nitrofenol	incoloro	5,4	6,6	amarillo
Azul de Bromotimol	amarillo	6,0	7,6	azul
Amarillo brillante	amarillo	6,6	7,8	rojo
Rojo Fenol	amarillo	6,6	8,4	rojo
m-Nitrofenol	incoloro	6,6	8,6	amarillo
rojo neutral	rojo	6,8	8,0	amarillo
Ácido Rosólico	Amarillo/marrón	6,9	8,0	rojo
Rojo Cresol (2º intervalo)	amarillo	7,0	8,8	rojo
α -Naftoltaleína	marrón	7,3	8,7	verde
Púrpura de Metacresol (2º intervalo)	amarillo	7,4	9,0	púrpura
Púrpura de m-Cresol(2º intervalo)	amarillo	7,4	9,2	púrpura
Naranja I (Tropeolina OOO)	amarillo	7,6	8,9	Rosa-rojo
azul de timol (2º intervalo)	amarillo	8,0	9,6	azul
Rojo de timol	amarillo	8,0	9,6	Azul

Indicador	Color ácido	Intervalo viraje		Color Base
Fenolftaleína	incoloro	8,0	10,0	rojo
o-Cresolftaleína	incoloro	8,2	9,8	rojo
Timolftaleína	incoloro	8,8	10,6	azul
Amarillo de alizarina GG	amarillo	10,0	12,0	naranja
Violeta de b-Naftol	amarillo	10,0	12,0	violeta
amarillo de alizarina R	amarillo	10,1	12,2	rojo
Nitramina	incoloro	10,8	13,0	marrón
azul Poirrier	azul	11,0	13,0	rojo
amarillo de Resorcina (Tropeolina 0)	amarillo	11,1	12,7	naranja
Ácido bencenosulfónico	amarillo	11,4	12,6	naranja
Ácido Indigosulfónico	azul	11,4	13,0	amarillo
amarillo Clayton	amarillo	12,2	13,2	ámbar

En los ejemplos de la presente invención, se optó por el indicador colorimétrico de pH al que se denomina rojo de clorofenol o clorofenol rojo como elemento que ofrece una señal visual de acidificación del medio (inicialmente es púrpura rojizo y según se acidifica el medio su color se torna en amarillo).

5 La Fig. 2C muestra un ejemplo de cómo cambia el aspecto del dispositivo de la invención por efecto del cambio de pH gracias a la presencia de dicho indicador colorimétrico: en la parte de la izquierda, se observa el dispositivo antes de que se produzca la acidificación del medio (púrpura rojizo en el original, gris más oscuro de la Fig. 2C), mientras que a la derecha se observa el aspecto del dispositivo cuando el pH ha bajado por debajo de 4,6 (amarillo en el original, gris más claro en la Fig. 2C).

10 Esta sustancia indicadora puede ser añadida directamente al medio de cultivo de los microorganismos, añadiéndose posteriormente toda la mezcla sobre la matriz porosa, o pueden añadirse de forma separada. Se prefiere la primera opción.

- Matriz porosa

15 Uno de los aspectos fundamentales de la presente invención es la matriz porosa. Dado que va a estar en contacto directo con los microorganismos, es necesario que sea totalmente biocompatible y que la concentración bacteriana no se vea afectada por entrar en contacto con la misma. Además, dicha matriz debe tener unas características en relación con su estructura y porosidad que permitan albergar en su interior a la población de microorganismos y al medio líquido, sin interferir en el proceso de fermentación, de manera que este no se vea alterado ni ralentizado. De esta manera, este dispositivo TTI actúa como un indicador colorimétrico que va a dar información sobre las posibles alteraciones en la cadena de frío del producto, tal como se esquematiza en la Fig. 2C a la que ya se hizo alusión previamente, que corresponde al cambio de color de la etiqueta si se produce una ruptura de la cadena de frío durante 6 horas.

20 Tal como se ha mencionado previamente, estas características se consiguen utilizando una matriz porosa sólida, permeable al agua, cuyo peso base es igual o superior a 100 g/m² y cuya permeabilidad al aire es, preferiblemente, superior a 115 µm/(Pa . s).

El grosor de la matriz porosa está limitado por la aplicación ya que, como se ha comentado con anterioridad, el dispositivo TTI se presentará bajo la forma de una etiqueta plana.

La matriz porosa debe ser de un material totalmente biocompatible, que no impida el crecimiento de los microorganismos albergados en la misma. Ejemplos de materiales que cumplen estas condiciones son:

30 - Fibras de origen vegetal, como las fibras de algodón o las fibras de celulosa;

- Materiales de origen animal, como las lanas, la seda o la queratina;
- Matrices inorgánicas, como las de dióxido de silicio o las fibras de vidrio;
- Matrices de fibras de polímeros sintéticos o semisintéticos, como la poliamida, nylon, poliácridonitrilo, alcohol de polivinilo (PVA), poliéster, poliolefina, poliuretano, el copolímero de acetato de etileno – vinilo o el rayón;
- Materiales esponjosos porosos de origen vegetal, animal, mineral o sintético, tal como las esponjas, entendiendo por esponja aquellos materiales porosos de origen sintético o natural, con alta capacidad de retención de líquidos.

La matriz puede estar constituida por uno de estos materiales naturales o artificiales o por una combinación de dos o más de ellos. Además, las condiciones idóneas de esta matriz porosa en cuanto a peso base, espesor, permeabilidad, se pueden lograr mediante el apilamiento de películas porosas monocapa, capas simples, de aquellos materiales que puedan obtenerse de esta manera, hasta dar con los valores adecuados.

Además, como se ha explicado anteriormente, la estructura de la matriz porosa debe ser tal que atenúe el color que presenta el medio líquido de manera que, el cambio de color del dispositivo desde su estado inicial a su estado final sea lo suficientemente obvio, como para que una persona pueda diferenciar sin ninguna duda estos dos estados que van a determinar si un producto ha estado sometido a condiciones de rotura de la cadena de frío o no es el caso.

En los ensayos que se muestran más adelante dentro del apartado de Ejemplos, se realizaron estudios con distintos materiales y combinaciones de capas de los mismos. Se encontró que los mejores resultados se obtenían con una matriz porosa preparada preferiblemente a partir de una estructura celulósica multicapa, formada por monocapas de 24 g/m². En los ensayos realizados para comprobar la estructura más adecuada para percibir el cambio de color de la sustancia indicadora, se observó que la diferencia de color se incrementaba según se iban añadiendo monocapas, hasta que el número llega aproximadamente a 5-6 capas, número a partir del cual la adición de nuevas capas (que pueden ser, por ejemplo, 20) no introduce cambios sustanciales en el cambio de color de las etiquetas y las diferencias se mantienen aproximadamente constantes.

Si estos mismos resultados sobre la apreciación del color se representan en función del gramaje de la matriz, se observa que las diferencias de color se incrementan hasta que el parámetro alcanza el valor de unos 100-150 g/m². A partir de esos valores, el aumento en el gramaje no introduce cambios sustanciales en el cambio de color de las etiquetas y las diferencias se mantienen prácticamente constantes, aunque el resultado parece ser algo mejor en el intervalo de 150 – 250 g/m². Esta tendencia de obtención de resultados óptimos o cercanos a los óptimos aunque se aumente el gramaje se mantiene incluso en los valores más elevados ensayados, cercanos a 500 g/m², como el de 480 g/m².

Las características y el funcionamiento de la etiqueta se explicarán ahora con más detalle por medio de los Ejemplos y las Figuras que aparecen a continuación.

EJEMPLOS

- Ejemplo 1: Determinación de las condiciones óptimas

1.1. Elección del medio de cultivo

Puesto que una de las realizaciones preferidas del dispositivo de la invención es su utilización para la monitorización de alimentos y otros productos perecederos que se conservan en condiciones de refrigeración (preferiblemente, entre 0° y 5°C), se partió de elegir las bacterias lácticas como candidatas preferidas a ser utilizadas en los dispositivos de la invención, eligiéndose entre ellas *Lactobacillus plantarum subsp. plantarum* y *Lactobacillus delbrueckii subsp. delbrueckii*. Estas bacterias fueron adquiridas a la Colección Española de Cultivos Tipo, correspondiéndose a los números de cepa CECT 748T y CECT 4005 respectivamente.

Por ello, se comenzaron los ensayos utilizando el medio de cultivo estándar para el crecimiento de dichas bacterias, esto es un caldo de cultivo tipo MRS, conocido así por las iniciales de los apellidos de los autores del mismo (J.C. de Man, M. Rogosa and M. Elisabeth Sharpe, Appl. Bact. 23, pp. 130-135, 1960). Los ingredientes y concentraciones típicas de este medio son de manera orientativa los siguientes: peptona (10 g/l); extracto de carne (8 g/l); extracto de levadura (4 g/l); glucosa (20 g/l); tween80 (1.08ml/l); fosfato de potasio (2 g/l); acetato de sodio (5 g/l); citrato de amonio (2g/l); sulfato de magnesio (0.2 g/l); sulfato de manganeso (0.05 g/l). En este caso, el medio se adquirió ya preparado a Sigma-Aldrich (MRS Broth, número producto 69964). A este medio de cultivo se añadió el indicador colorimétrico clorofenol rojo (0,1 g/l), preparado disolviendo 0,1 gramos de clorofenol rojo (adquirido a Sigma-Aldrich) en 1 litro de agua.

Los ensayos demostraron que la elección del medio de cultivo no es un proceso evidente. Para ello, de los cultivos aislados en placa se arrastró con el asa de siembra una única colonia. Se introdujo el asa de siembra en un

tubo de ensayo que contenía 10 ml de MRS, siendo la concentración bacteriana en este tubo del orden de 2×10^8 ufc/ml (ufc: unidades formadoras de colonia). Este tubo se introdujo durante 24 horas en un ambiente con las condiciones óptimas de crecimiento que, en el caso de las bacterias seleccionadas, se trata de una temperatura de 37 °C en anaerobiosis. Del precultivo incubado durante 24 horas, se inoculó con 100 µl un tubo con 50 ml de medio MRS. Tras 24 horas de incubación se obtuvo una suspensión que a partir de ahora se considerará la suspensión de trabajo. Tras realizar un conjunto de series experimentales en los que se inoculó estos medios con la suspensión de trabajo de *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus delbrueckii*, se observó que al someter el medio a temperatura ambiente (20°C) en una incubadora Stuart Scientific S160D Incubator sin agitación, durante un período superior a 12 horas, la esperable acidificación del medio debido a la fermentación no se producía y, lógicamente, tampoco se observaba cambio de color alguno. Esta situación (más de 12 horas a 20 °C) claramente excede las condiciones de una rotura en la cadena de frío alimentaria, es por ello que se deduce que el medio estándar de cultivo para observar el crecimiento de estas bacterias no es útil para lograr el objetivo de la presente invención. Por ello, se llevaron a cabo distintos ensayos reformulando el medio, con el fin de encontrar la composición más adecuada.

Tras realizar distintos ensayos, la causa de la falta de utilidad del medio MRS es que existen componentes en dicho medio MRS que producen un efecto tampón del mismo, lo que confirmaba que era necesario un estudio de reformulación de dicho medio.

Tras varias series experimentales en las que se fueron reajustando, eliminando y sustituyendo ingredientes, el medio de cultivo con el que se obtuvieron los mejores resultados, que sirve a modo de ejemplo para ilustrar la presente invención, pero que no se debe considerar limitativo contiene carbohidratos como la glucosa, fuentes nitrogenadas y sustratos complejos como extracto de levadura, pero preferiblemente no contiene sustancias tamponantes que dificulten el cambio de pH del medio de cultivo.

Para llevar a cabo los experimentos que dieron lugar a esas conclusiones sobre la composición del medio de cultivo, la glucosa, la peptona, el extracto de levadura y, como se ha mencionado antes, el clorofenol rojo se adquirieron a Sigma-Aldrich; como leche en polvo se utilizó la leche probiótica de Hero Baby.

Así, la composición del medio de cultivo, en su versión más simplificada y efectiva quedó de la siguiente manera:

- Glucosa: 30 g/l
- Peptona: 2 g/l
- Leche en polvo: 10 g/l
- Extracto de levadura: 2 g/l

A ellos hay que añadir la sustancia indicadora, que siguió siendo:

- Clorofenol Rojo 0,1 g/l

En estas condiciones, el cambio de color se observó en menos de 8 horas, observándose ya tras mantener el medio 6 horas a una temperatura de 20°C.

1.2. Elección de la matriz porosa

Para elegir la matriz porosa, se tuvieron en cuenta las condiciones antes especificadas: debe permitir el crecimiento de los microorganismos y debe facilitar la percepción del cambio de un indicador, preferiblemente de color, debida a la acidificación del medio producida por el crecimiento de los microorganismos, de tal forma que el cambio de color sea perceptible para el ojo humano de forma clara y obvia.

La elección del tipo de sustrato a utilizar como matriz porosa no es un proceso evidente ya que hay que realizar una experimentación muy amplia hasta conseguir una matriz porosa con las características adecuadas

Para encontrar las matrices porosas más adecuadas, se prepararon dispositivos de tiempo-temperatura de la invención, siguiendo la siguiente metodología:

- **Preparación del medio de cultivo:** En agua ultrapura (18.2 MΩ.cm) se prepara el medio de cultivo junto con el indicador en la siguiente concentración: glucosa: 30 g/l; Peptona: 2 g/l; Leche en polvo: 10 g/l; Extracto de levadura: 2 g/l y Clorofenol Rojo 0,1 g/l. La glucosa, la peptona, el extracto de levadura y el clorofenol rojo se adquirieron a Sigma-Aldrich; la leche en polvo era de la casa Hero. Una vez realizada la mezcla se esteriliza en autoclave a 120 °C y así se obtiene la solución stock de medio de cultivo.

Asimismo también se preparó una suspensión de trabajo tras un proceso de escalado incubando a 37°C durante 24 horas *Lactobacillus plantarum* en el medio MRS Broth estéril.

De la solución stock del medio de cultivo, se extrajeron 900 µl en un eppendorf y se inocularon con 100 µl de la suspensión de trabajo.

- Preparación de las etiquetas: Se prepararon dos láminas plásticas de polipropileno (Exxon Mobil, referencia 50LL537), de dimensiones rectangulares, de 3 x 3,3 cm, y se lavaron con etanol.

Sobre una de las láminas se situó, en cada caso, la matriz porosa del material de ensayo, tras lo cual se depositaron sobre la misma 450 µl del medio de cultivo previamente preparado, que contenían aproximadamente $2,3 \times 10^8$ ufc/ml de *Lactobacillus plantarum*, de tal manera que el líquido fuera absorbido y saturara el sustrato. Tras ello, se colocó la segunda película plástica sobre el sustrato y se sellaron térmicamente. Las etiquetas obtenidas se utilizaron para identificar el tiempo de viraje necesario según la matriz porosa.

Estas etiquetas se conservaron inactivas, esto es, a temperatura de refrigeración (5 °C), hasta su utilización.

Los diferentes sustratos, candidatos a matriz porosa, sobre los que se depositaron los medios de cultivo, para estudiar el efecto de sus diversos valores de peso base y porosidad, fueron entre otros: tejido tipo gasa (25,5 g/m²), papel de filtro Albet (75 g/m²), papel labsoaker Versi-Dry® (VWR, referencia 115-9255) (87,3 g/m²), papel protector de superficies bench protector VWR® (VWR, referencia 115-9220) (181,8 g/m²), tejido textil (35% algodón, 65% poliéster) (195 g/m²), papel de filtro protector de superficies Fisherbrand® (Fisherbrand, referencia W1611C) (211,1 g/m²), discos de fibras de algodón compactado Demak'Up® (Colhogar) (255 g/m²), papel celulósico multicapa de varios gramajes (Lorca Medicina Ortopedia S.A. referencia d11p60za) (desde 24 hasta 480 g/m²).

Para evaluar dicho tiempo de viraje en color se empleó una cámara climática (Cámara climática compacta CCLP. INELTEC. S. L.) y se sometieron a las etiquetas a diferentes ciclos de temperatura que simulaban las condiciones de ruptura de la cadena de frío. Se consideró como situación típica de refrigeración 5 °C y como situación de ruptura de la cadena de frío 20 °C. Por ello, las etiquetas fueron sometidas a un ciclo continuo a temperatura constante de 20 °C. y se observó el período de tiempo necesario para que se produjera el cambio de color en las mismas.

Se comprobó que los tejidos del tipo tejido tipo gasa, papel de filtro Albet, papel labsoaker Versi-Dry®, papel protector de superficies Bench Protector VWR®, tejido textil (35% algodón, 65% poliéster) o el papel de filtro protector de superficies Fisherbrand® no daban resultados óptimos para ser utilizados en los dispositivos de la invención para el control de productos que deben mantenerse en condiciones de refrigeración, cuando las bacterias utilizadas eran de la especie *Lactobacillus plantarum*, ya que el color no se distribuía homogéneamente o, simplemente, dicho color era imperceptible para el ojo humano. En otro tipo de sustratos, como los discos de fibras de algodón compactado, el proceso de viraje de color es apreciable pero se ralentiza hasta períodos de tiempo que no son los más adecuados para aquellas aplicaciones que requieran una detección de la rotura de la cadena del frío en un tiempo breve (para estos sustratos el cambio de color se producía para períodos superiores a 12 horas a 20°C).

Por otro lado se observó que la matriz basada en una estructura celulósica multicapa sí que cumple con las características requeridas en la presente invención, es biocompatible, adquiere un color homogéneo y claramente perceptible al ojo humano y además permite que las bacterias acidifiquen el medio en un tiempo inferior a 8 horas a una temperatura de 20°C, produciéndose el viraje de color de una manera también perceptible.

Una vez seleccionada esta estructura celulósica multicapa como medio preferente a utilizar como matriz porosa, se realizó un estudio adicional con el objetivo de determinar las condiciones óptimas de la misma. De esta manera, con el objetivo de determinar las propiedades de la estructura porosa tridimensional, esto es, determinar el gramaje y porosidades adecuados que permitan obtener un cambio de color óptimo, se llevó a cabo un estudio de la variación de la intensidad de color de la etiqueta dependiendo del gramaje de la matriz, que se hizo variar añadiendo distinto número de capas celulósicas simples, de 24 g/m² cada una de ellas. Con este fin se prepararon de nuevo etiquetas como las descritas en la Figs. 2B y 2C, en las que se varía el gramaje de la matriz porosa de la misma desde los 24 g/m² hasta los 480 g/m², variando el número de monocapas celulósicas añadidas a la misma de 1 a 20. Cada una de estas etiquetas se sometió a diferentes ciclos de temperatura que simulaban las condiciones de rotura de la cadena de frío (Cámara climática compacta CCLP. INELTEC. S. L.), de forma análoga al ensayo realizado para identificar el material poroso más adecuado descrito más arriba. La reflectancia espectral de las etiquetas se midió en el rango UV-VIS mediante un espectrofotómetro dotado de esfera integrante y usando una geometría di:8°. A partir de las curvas de reflectancia espectral, se determinaron las coordenadas de color CIELAB para el iluminante estándar D65 y el observador estándar de 10°. A partir de éstas se calcularon las diferencias de color ΔE^*_{ab} (CIE. (2004). Colorimetry 3rd ed (3 ed.). Vienna: Commission Internationale de L'Eclairage) entre las muestras con color previo al viraje (color inicial) y tras el viraje de cada muestra (tras la rotura de la cadena del frío).

Los resultados obtenidos se pueden apreciar en la Fig. 3, en la que las diferencias de color se han representado tanto en función del número de monocapas presente en la matriz porosa (panel A, donde el valor 0 del eje de abscisas corresponde a una etiqueta en la que se ha prescindido de la matriz porosa pero que incluye el medio líquido con los microorganismos) como en función del gramaje de la matriz porosa multicapa (panel B).

Los resultados obtenidos muestran que la diferencia de color se incrementa con el número de monocapas hasta que el número llega aproximadamente a 5-6 capas. A partir de este número, la adición de nuevas capas no introduce cambios sustanciales en el cambio de color de las etiquetas y las diferencias se mantienen

aproximadamente constantes. De forma análoga, se observa igualmente que las diferencias de color se incrementan con el gramaje de la matriz hasta que este parámetro alcanza el valor de unos 100-150 g/m². A partir de estos valores el aumento en el gramaje no introduce cambios sustanciales en el cambio de color de las etiquetas y las diferencias se mantienen aproximadamente constantes.

Por ello se puede concluir que en el experimento realizado las condiciones ópticas óptimas de percepción visual se logran a partir de una matriz porosa cuyo gramaje excede 100 g/m², valores desechados en medios de cultivos como los indicados en la solicitud US2005084948 A1. Bajo dichas condiciones, la etiqueta muestra de manera homogénea un color claramente perceptible para el ojo humano y realiza un viraje de dicho color cuando se produce la rotura de la cadena del frío.

Con el objetivo de definir otras propiedades físicas de la matriz porosa, dicha matriz porosa celulósica cuyo gramaje excede los 100 g/m² fue sometida a ensayos de permeabilidad al aire según el método de Bendtsen descrito en la norma ISO 5636-4 ó en UNE 57066-2, obteniéndose unos valores menores a 115 µm/(Pa . s). Asimismo también se sometió a ensayos de porosidad siguiendo el procedimiento descrito en las normas ISO/CD 5636-5 ó UNE 57066-3 y los valores obtenidos fueron de una porosidad media muy baja, quedando los resultados de los ensayos fuera del campo de aplicación de las normas correspondientes y correspondiendo a valores de 1,18 segundos.

Por tanto, tanto los valores de gramaje (peso base) como los de permeabilidad al aire están fuera de los límites recomendados para las matrices porosas biocompatibles descritas en el documento US20050087948A1, a pesar de lo cual el dispositivo posibilita tanto el adecuado crecimiento de los microorganismos dentro del mismo como la acidificación del medio para dar lugar a un cambio de color fácilmente perceptible e identificable por el ojo humano, que pueda ser considerado un indicador del estado de conservación del producto perecedero al cual se adhiera el dispositivo de la invención. Y todo ello sin necesidad de utilizar ningún componente o aditivo texturizante para inmovilizar los microorganismos y/o los nutrientes, entendiéndose como texturizante, como se explicó previamente, todos aquellos componentes que otorgan cierta viscosidad a un sustrato líquido y que pueden tener propiedades relacionadas con la retención de agua, tal y como los utilizados en los medios de cultivo descritos para dispositivos indicadores de tiempo temperatura similares a los de la presente invención, como pueden ser los descritos en la solicitud de patente US2007275467A1.

- Ejemplo 2: Ejemplo ilustrativo del funcionamiento de las etiquetas

Tras los estudios de optimización de medios y matriz expuestos anteriormente, a continuación se describe un ejemplo ilustrativo del funcionamiento de uno de los dispositivos de la presente invención. Este ejemplo no debe ser considerado limitativo del alcance de la misma.

Se prepararon una serie de etiquetas de manera análoga a como se ha descrito en el punto 1.2 del Ejemplo 1, preparando el mismo medio de cultivo con microorganismos y medio indicador y utilizando igualmente láminas plásticas de polipropileno, previamente lavadas con etanol, para cubrir la matriz porosa y aislarla del exterior.

Como matriz porosa se utilizó una matriz celulósica porosa de 480 g/m², de unas dimensiones de 2 x 2,3 cm, que se situó sobre una de las láminas plásticas, depositando a continuación sobre dicho sustrato 450 µl del medio de cultivo inoculado, de tal manera que el líquido sea absorbido y sature el sustrato poroso. Posteriormente se colocó la segunda lámina plástica sobre el sustrato y se selló térmicamente.

Las etiquetas se conservaron inactivas a temperatura de 5°C y posteriormente fueron sometidas a un ciclo continuo a temperatura constante de 20°C. Se consideró que el procedimiento de viraje concluyó con las etiquetas viradas en un tiempo de 8 horas. La Fig. 4 muestra fotografías que corresponden a la matriz porosa de una de estas etiquetas antes (a) de comenzar la incubación a 20°C y tras el viraje de color (b). El cambio de color es evidente y fácilmente observable, pues la parte (a) (de gris más intenso en la Fig. 4) es de color púrpura rojizo en el original, mientras que la parte (b) aparece en el original de color amarillo – ámbar, fácilmente perceptible y distinguible del anterior.

Con el objetivo de comprobar que estas etiquetas funcionaban como verdaderos dispositivos TTI y disfrutaban de un efecto memoria capaz de registrar de forma acumulativa el exceso de temperatura, se sometió a las etiquetas a un ciclo discontinuo variable (ciclo 2) entre la temperatura crítica de 20° C y la temperatura de refrigeración 5° C: 3 horas a 20 °C, seguidos de 3 horas a 5 °C y posteriormente 3 horas a 20 °C, tomándose fotografías a las 3, 6 y 9 horas. Las fotografías obtenidas se muestran como parte de la Fig. 5 (fila inferior de fotografías, "Ciclo 2"); sobre las mismas, a modo de comparación, se han colocado las fotografías obtenidas de una etiqueta sometida a un ciclo continuo a 20°C (fila superior de fotografías; "ciclo 1"). Como se puede observar en la Fig. 5, el efecto memoria es claro, apreciándose un retardo en el viraje correspondiente al tiempo que habían sido sometidas a temperatura de refrigeración, lo que confirma que estos dispositivos pueden funcionar como etiquetas TTI, para monitorizar rupturas en la cadena de frío de productos que deban ser conservados a temperatura de refrigeración.

REIVINDICACIONES

1. Dispositivo para controlar el historial de tiempo y temperatura de un producto, caracterizado por que comprende:
 - a) una primera lámina de material plástico, impermeable al agua;
 - b) una matriz porosa sólida, permeable al agua, cuyo peso base es igual o superior a 100 g/m^2 , que está situada sobre la cara de la primera lámina de material plástico;
 - c) una segunda lámina de material plástico, impermeable al agua y transparente o translúcida al menos en una sección de su superficie, situada sobre la matriz porosa sólida, de forma que la matriz porosa sólida queda cubierta por la segunda lámina de material plástico y es visible a través de la sección transparente o translúcida de dicha segunda lámina de material plástico.
2. Dispositivo según la reivindicación 1, en el que la primera lámina de material plástico contiene una película de adhesivo sobre la cara de la lámina que no está en contacto con la matriz porosa.
3. Dispositivo según la reivindicación 1 ó 2, en el que la matriz porosa sólida comprende fibra de algodón, celulosa, lana, seda, queratina, dióxido de silicio, fibra de vidrio, poliamida, nylon, poliacrilonitrilo, alcohol de polivinilo (PVA), poliéster, poliolefina, poliuretano, copolímero de acetato de etileno – vinilo, rayón, un material esponjoso de origen vegetal, animal, mineral o sintético, o una combinación de dos o más de los materiales anteriores.
4. Dispositivo según la reivindicación 1 ó 2, en el que la matriz porosa sólida es una estructura celulósica multicapa, con un peso base igual o superior a 100 g/m^2 .
5. Dispositivo según la reivindicación 4, en el que el peso base de la estructura celulósica multicapa está comprendido entre 100 y 480 g/m^2 .
6. Dispositivo según la reivindicación 5, en el que el peso base de la estructura celulósica multicapa está comprendido entre 150 y 250 g/m^2 .
7. Dispositivo según la reivindicación 5, en el que el peso base de la estructura celulósica multicapa es de 480 g/m^2 .
8. Dispositivo según la reivindicación 4, que comprende al menos 5 capas celulósicas de 24 g/m^2 cada una.
9. Dispositivo según la reivindicación 8, que comprende de 5 a 20 capas celulósicas de 24 g/m^2 cada una.
10. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la matriz porosa sólida presenta una permeabilidad al aire menor que $115 \text{ } \mu\text{m}/(\text{Pa} \cdot \text{s})$.
11. Dispositivo según la reivindicación 10, en el que la matriz porosa sólida presenta una permeabilidad al aire superior a $17,40 \text{ } \mu\text{m}/(\text{Pa} \cdot \text{s})$.
12. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que la matriz porosa sólida presenta una porosidad media mayor que 1,18 segundos.
13. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las dos láminas de material plástico están selladas la una a la otra a lo largo del perímetro del dispositivo, quedando una porción de dicho perímetro sin sellar.
14. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las dos láminas de material plástico están unidas por un material adhesivo que permite su separación posterior.
15. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en el que las dos láminas de material plástico están selladas la una a la otra a lo largo de todo el perímetro del dispositivo.
16. Dispositivo según la reivindicación 15, que comprende, adicionalmente:
 - d) microorganismos distribuidos por la matriz porosa;
 - e) un medio de cultivo de dichos microorganismos;
 - f) un compuesto indicador que experimenta un cambio perceptible por el ojo humano en función de un cambio en el medio producido por el crecimiento de los microorganismos.
17. Dispositivo según la reivindicación 16, en el que los microorganismos producen algún ácido durante su crecimiento, su desarrollo o su actividad metabólica.

18. Dispositivo según la reivindicación 16 ó 17, en el que los microorganismos son bacterias mesófilas, psicrófilas o psicrotrofas.

19. Dispositivo según la reivindicación 17, en el que los microorganismos son bacterias lácticas.

5 20. Dispositivo según la reivindicación 19, en el que las bacterias lácticas se seleccionan del grupo de *Streptococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus cremoris*, *Pediococcus spp.*, *Leuconostoc spp.*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus delbrueckii*, o combinaciones de las mismas.

21. Dispositivo según la reivindicación 20, en el que las bacterias lácticas pertenecen a la especie *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus delbrueckii*.

10 22. Dispositivo según la reivindicación 16, en el que el medio de cultivo comprende al menos un hidrato de carbono, una fuente de nitrógeno, sales inorgánicas y/o vitaminas o elementos traza.

23. Dispositivo según la reivindicación 16, en el que el medio de cultivo carece de sustancias con capacidad tamponante.

15 24. Dispositivo según la reivindicación 21, 22 ó 23, en el que el medio de cultivo comprende glucosa, peptona, leche en polvo y extracto de levadura.

25. Dispositivo según la reivindicación 24, en el que la composición del medio de cultivo es:

- glucosa: 30 g/l;
- peptona: 2 g/l;
- leche en polvo: 10 g/l,
- 20 - extracto de levadura: 2 g/l,

y que adicionalmente comprende un compuesto indicador que experimenta un cambio perceptible por el ojo humano en función de un cambio en el medio producido por el crecimiento de los microorganismos.

26. Dispositivo según la reivindicación 24, en el que los microorganismos son bacterias lácticas que pertenecen a la especie *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus delbrueckii*

25 27. Dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 26, en el que el compuesto indicador que experimenta un cambio perceptible por el ojo humano en función de un cambio en el medio producido por el crecimiento de los microorganismos es un indicador de color cuyas formas ácida y básica tienen colores diferentes, pudiendo ser una de dichas formas incolora.

28. Dispositivo según la reivindicación 27, en el que el indicador de color es clorofenol rojo.

30 29. Dispositivo según la reivindicación 25, que comprende 0,1 g/l de clorofenol rojo.

30. Dispositivo según la reivindicación 16, en el que:

a) la primera lámina de material plástico, impermeable al agua, que contiene una película de adhesivo sobre una de sus caras, es de polipropileno;

35 b) la matriz porosa sólida, permeable al agua, es una estructura celulósica multicapa cuyo peso base es 480 g/m²;

c) la segunda lámina de material plástico, impermeable al agua y transparente al menos en una sección de su superficie, es de polipropileno;

d) los microorganismos distribuidos por la matriz porosa pertenecen a la especie *Lactobacillus plantarum*;

40 e) el medio de cultivo de los microorganismos comprende glucosa (30 g/l), peptona (2 g/l), leche en polvo (10 g/l), extracto de levadura: 2 g/l, y

f) que comprende también clorofenol rojo (0,1 g/l) como compuesto indicador.

31. Uso de un dispositivo según una cualquiera de las reivindicaciones 16 a 30 para controlar el historial de tiempo-temperatura de un producto al que está unido el dispositivo y que debe conservarse por debajo de una temperatura determinada.

32. Uso según la reivindicación 31, en el que el cambio del compuesto indicador perceptible por el ojo humano indica que se ha producido un cambio determinado en las condiciones del producto o que el producto se ha mantenido por encima de una temperatura umbral durante un tiempo superior a un valor predeterminado.

5 33. Uso según la reivindicación 31 ó 32, en el que el compuesto indicador es un indicador de pH cuyas formas ácidas y básicas tienen colores diferentes, pudiendo ser una de dichas formas incolora.

34. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 33, en el que el cambio en el compuesto indicador indica que el producto ya no está en condiciones de ser consumido, de que el producto debe consumirse de inmediato o de que no se han cumplido las condiciones de conservación previstas para el producto.

35. Uso según la reivindicación 34, en el que el producto es un alimento o un medicamento.

10 36. Uso según una cualquier de las reivindicaciones 31 a 35, en el que se monitorizan rupturas en la cadena de frío de un producto que debe conservarse en condiciones de refrigeración.

37. Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 31 a 36, en el que el dispositivo indicador es un dispositivo como el reivindicado en la reivindicación 30.

A



B



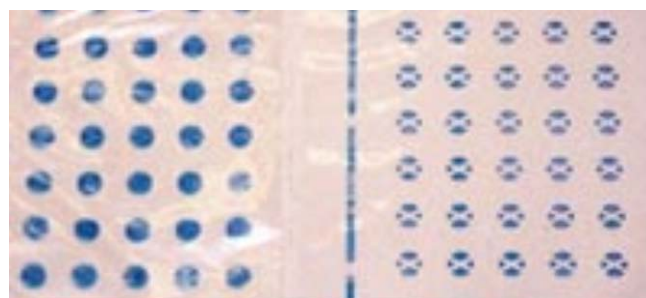
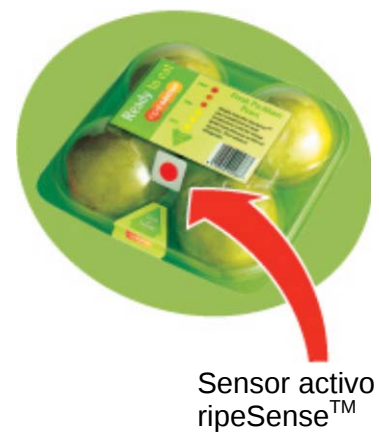
C



D



E



F

Fig. 1

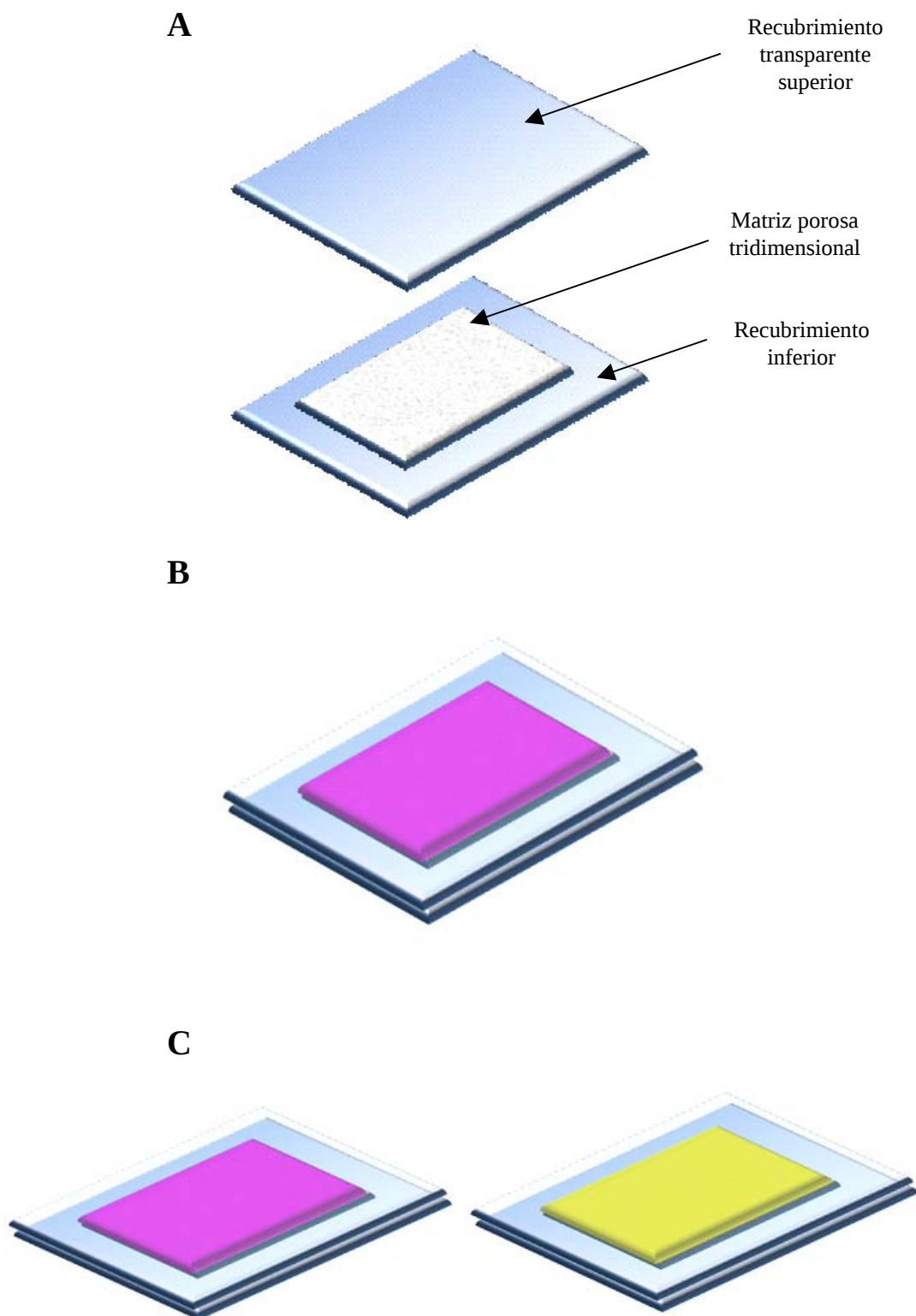
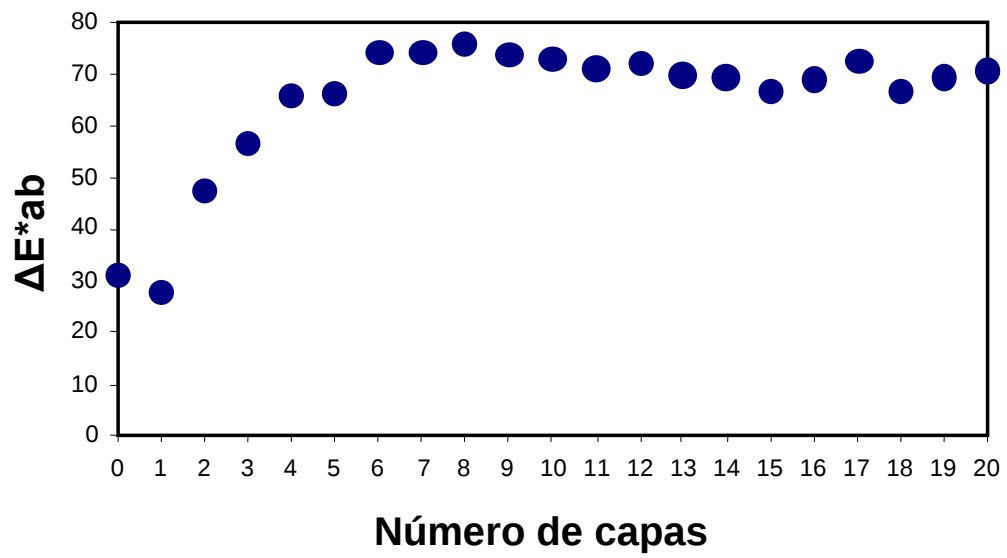


Fig. 2

A

Diferencia de color



B

Diferencia de color

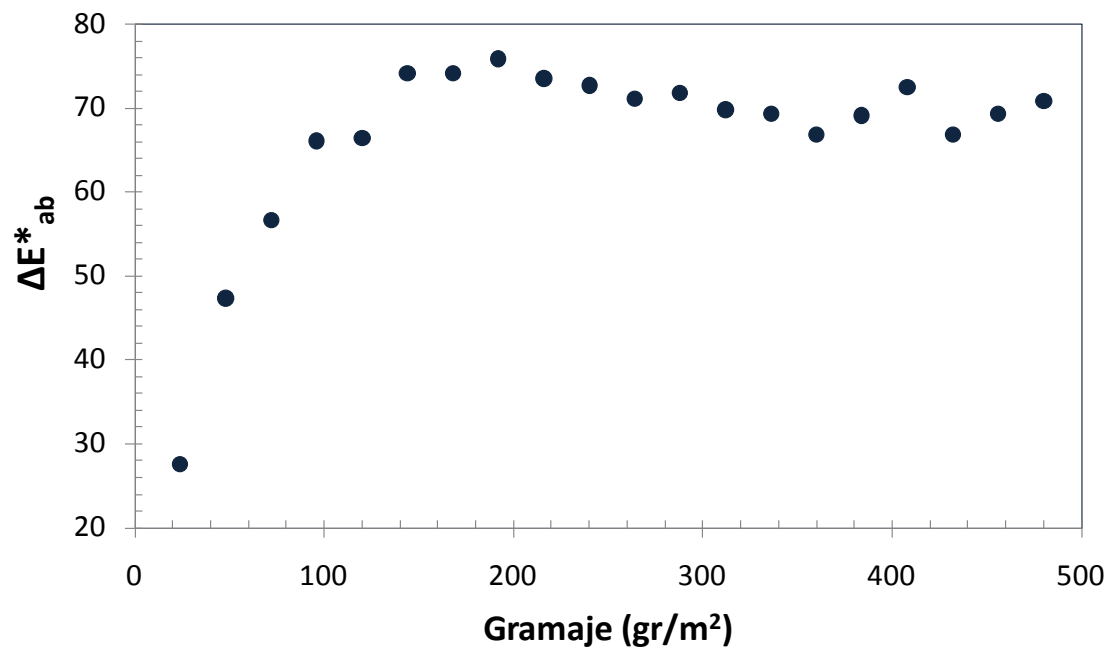


Fig. 3



Fig. 4

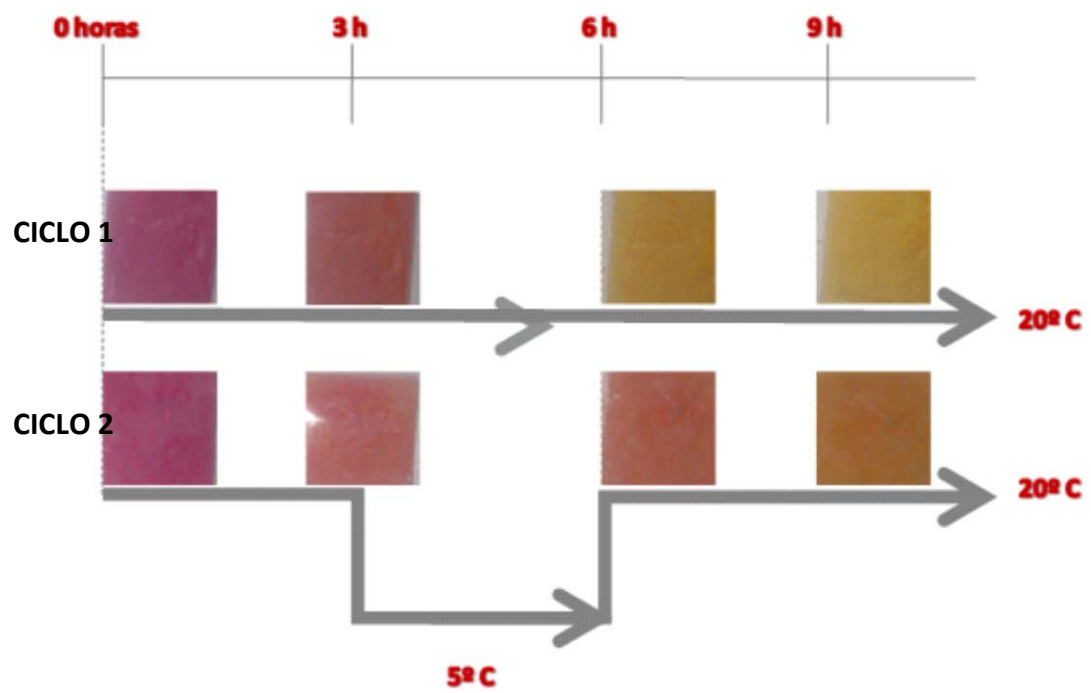


Fig. 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 201130572

②② Fecha de presentación de la solicitud: 11.04.2011

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
Y	US 20070275467 A1 (LOUVET et al.) 29.11.2007, párrafos [0016],[0099]-[0101],[0105]-[0110],[0119],[0123],[0126],[0133]-[0137]; resumen; figura 12.	1-3,13-29,31-36
Y	US20050084948 A1 (USHIYAMA et al.) 21.04.2005, párrafos [0001],[0015],[0046],[0047],[0052]; figura 3.	1-3,13-29,31-36
A	WO 2005078402 A1 (SUN CHEMICAL CORPORATION) 25.08.2005, páginas 1,6,12,13.	1-37

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
27.02.2012

Examinador
S. González Peñalba

Página
1/5

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C12Q1/02 (2006.01)
G01K11/12 (2006.01)
A23L3/00 (2006.01)
G01K3/04 (2006.01)
C12M1/00 (2006.01)
C12M1/34 (2006.01)

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

C12Q, G01K, A23L, C12M

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: 27.02.2012

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-37	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 4-12, 30 y 37	SI
	Reivindicaciones 1-3, 13-29 y 31-36	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	US 20070275467 A1 (LOUVET et al.)	29.11.2007
D02	US20050084948 A1 (USHIYAMA et al.)	21.04.2005
D03	WO 2005078402 A1 (SUN CHEMICAL CORPORATION)	25.08.2005

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 solicitud de patente, tal y como ha sido redactada, hace referencia a un dispositivo para controlar el historial de tiempo y temperatura de un producto, que se caracteriza porque presenta una primera lámina de material plástico (de polipropileno, reivindicación 30) impermeable al agua; una matriz porosa sólida, permeable al agua, con un peso base igual o superior a 100g/m^2 , que se encuentra situada sobre la cara de la primera lámina; y una segunda lámina de material plástico (de polipropileno, reivindicación 30), impermeable al agua y transparente o translúcida, situada sobre la matriz porosa sólida (reivindicación 1). La primera lámina de material plástico contiene una película de adhesivo sobre la cara de la lámina que no está en contacto con la matriz porosa (reivindicación 2). Entre los materiales adecuados para la matriz porosa se encuentran, fibras de algodón, celulosa, lanas etc (reivindicación 3). La matriz porosa sólida es una estructura celulósica multicapa, con un peso base igual o superior a 100g/m^2 (reivindicaciones 4-7), que comprende al menos 5 a 20 capas celulósicas de 24g/m^2 cada una (reivindicaciones 8-9), que además, presenta una permeabilidad al aire menor de $115\mu\text{m}/(\text{Pa.s})$ (reivindicaciones 10-11) y con una porosidad media mayor de 1,8 segundos (reivindicación 12). Las láminas de material plástico pueden estar selladas la una a la otra a lo largo del perímetro, quedando una porción del perímetro sin sellar (reivindicación 13), o unidas por un material adhesivo que permite su separación posterior (reivindicación 14), o selladas a lo largo de todo el perímetro (reivindicación 15). Por otro lado, el dispositivo comprende microorganismos distribuidos por la matriz porosa, un medio de cultivo de dichos microorganismos y un compuesto indicador (reivindicación 16). Los microorganismos utilizados son productores de ácido durante su crecimiento (reivindicación 17), concretamente bacterias (reivindicación 18), preferiblemente lácticas (reivindicaciones 19-20), *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus delbrueckii* de manera más preferida (reivindicación 21 y 26). Se reivindica también, el medio de cultivo (reivindicaciones 22-25), así como el indicador (reivindicaciones 27-29), que es clorofenol rojo. Y por último se hace referencia el uso de dicho dispositivo para controlar el historial de tiempo-temperatura de un producto (reivindicaciones 31-37), en el que el producto es un alimento o medicamento.

NOVEDAD Y ACTIVIDAD INVENTIVA L.P ARTS. 6 Y 8

El documento D01 describe un método y un dispositivo para determinar si un producto que debe conservarse a determinada temperatura y durante cierto periodo de tiempo, está en condiciones de ser utilizado o consumido (véase resumen). Dicho documento no se limita sólo a productos alimenticios, si no que contempla también productos tales como medicamentos, vacunas, etc (véase párrafo [0016]).

El dispositivo se encuentra en forma de etiqueta transparente con un espesor reducido, pudiendo consistir en un sobre transparente (opcionalmente autoadhesivo, con objeto de ser aplicado sobre la superficie del producto que se ha de conservar, véase Figura 12) que comprende una sustancia microbiana, un medio de cultivo, los elementos para desarrollar la acidificación y uno o más agentes texturizantes (véase párrafos [0099] y [0100]). Dicho sobre está realizado con al menos uno de los siguientes materiales: tereftalato de polietileno, polietileno y polipropileno (véase párrafo [0101]).

Las sustancias microbianas utilizadas son principalmente bacterias productoras de ácido láctico durante su crecimiento y actividad metabólica, tales como bacterias del género *Lactobacillus* (véase párrafos [0105]- [0110]).

El medio de cultivo, para que se produzca un buen desarrollo de las bacterias, debe contener una fuente de carbono, que puede ser entre otras D-glucosa (véase párrafo [0119]), una fuente de nitrógeno, tal como peptona (véase párrafo [0123]) y extracto de levadura (véase párrafo [0126]), además de ciertas sales.

Pueden, además utilizarse indicadores del color para visualizar la acidificación del medio (véase párrafos [0133]-[0137]).

Sin embargo, en dicho documento no se contempla la existencia de una matriz porosa sólida, permeable al agua, cuyo peso base sea igual o superior a 100g/m^2 , con una permeabilidad al aire superior a $17,40\mu\text{m}/(\text{Pa.s})$ y con estructura celulósica multicapa. Aunque sí se hace referencia en dicho documento a la presencia de ciertos agentes texturizantes, tales como agentes espesantes o gelificantes.

El documento D02 trata sobre un dispositivo y medio de cultivo de microorganismos en forma de lámina que sirve para cultivar y detectar microorganismos en alimentos y en el medio ambiente (véase párrafo [0001]). Dicho dispositivo en forma de lámina presenta una capa de matiz porosa, una película transparente, una hoja adhesiva y una capa soluble en agua de polímero (véase figura 3). Dicha matriz porosa tiene un peso base comprendido entre 40 a 100 g/m², coincidiendo el valor de 100 g/m² con el de la presente solicitud, y una permeabilidad al aire comprendida entre 7 a 24 cm/sec que corresponde con los valores 5.07 a 17,39 µm/(Pa.s), ésta última muy similar a la de la presente solicitud que es superior a 17,40 µm/(Pa.s) (véase párrafo [0015]). Además, entre los materiales que se utilizan para preparar la matriz porosa se encuentran nylon, algodón, celulosa, seda, fibras de poliacrilonitrilo, alcohol de polivinilo, poliéster, poliolefina, poliuretano, fibras de origen animal, fibra de vidrio, etc (véase párrafo [0046]). Entre los nutrientes utilizados para que se produzca el crecimiento del microorganismo, se encuentran: peptona, extracto de levadura y glucosa entre otros (véase párrafos [0047] y [0052]).

El documento D03 se refiere a un dispositivo TTI (indicador de tiempo-temperatura), para determinar si un producto que debe conservarse a determinada temperatura y durante cierto periodo de tiempo, está en condiciones de ser utilizado o consumido. Los productos puede ser alimenticios, materiales biológicos, fármacos, cosméticos etc (véase página 1). El dispositivo es de lo suficientemente sencillo y delgado como para poder incorporarse a una gran variedad de productos (véase página 6). Dicho sistema consiste en una primera parte que comprende un microorganismo como por ejemplo Lactobacillus (véase página 12), una segunda parte que comprende un activador, en este caso nutrientes, tales como glucosa (véase página 6, párrafo primero) y por último, un indicador de pH que puede estar o bien en la primera parte o bien en la segunda. Dicho indicador puede ser entre otros clorofenol rojo (véase página 13). El dispositivo se activa al poner en contacto las dos partes.

A la vista de los documentos anteriores se puede decir que la presente solicitud de patente tiene novedad pero carece de actividad inventiva. En primer lugar, presenta novedad porque no se ha encontrado ningún documento que haga referencia a un dispositivo para controlar el historial de tiempo y temperatura que presente las mismas características técnicas de dicha solicitud de patente. En segundo lugar, carece de actividad inventiva porque, el problema planteado por dicha solicitud de patente es la provisión de un dispositivo para la monitorización de las condiciones de tiempo y temperatura de productos que deben conservarse en intervalos de tiempo y temperaturas concretos. Para ello, la solución que se plantea son las llamadas etiquetas TTI basadas en microorganismos. El documento D01 es el documento más cercano escogido del estado de la técnica, el cual, describe la utilización de etiquetas para controlar las condiciones de tiempo y temperatura utilizando microorganismos. La diferencia entre el documento D01 y el objeto de la presente solicitud es la matriz porosa sólida. Dicha matriz porosa es la responsable del efecto técnico que sería la visualización del cambio de color del indicador debido al cambio de pH como consecuencia del crecimiento de los microorganismos. En el documento D02, se divulga la utilización de matrices porosas con las mismas características que la matriz de la presente solicitud de invención, para el crecimiento de microorganismos en alimentos y en el medio ambiente, por lo que estos medios de cultivo para microorganismos en forma de sólidos porosos biocompatibles son conocidos en el estado de la técnica. Por ello, sería obvio para el experto en la materia el hecho de utilizar dicha matriz porosa en el dispositivo de la presente solicitud de invención, para la obtención de resultados similares, por lo que dicha solicitud carecería de actividad inventiva para las reivindicaciones 1-3, 13-29 y 31-36, mientras que las reivindicaciones 4-12, 30 y 37 sí tendrían actividad inventiva por el hecho de utilizar una matriz porosa multicapa celulósica con un peso base superior a 100g/m², una permeabilidad al aire menor de 115 µm (Pa.s) y superior a 17,40 µm (Pa.s) (que no ha sido encontrada en el estado de la técnica).

Por lo tanto, se considera que las reivindicaciones 1-37 son nuevas según el Art. 6 de la LP y las reivindicaciones 1-3, 13-29 y 31-36 carecen de actividad inventiva según el Art.8 de la LP. Mientras que las reivindicaciones 4-12 se considera que poseen actividad inventiva según el Art 8 de la LP, así como también, las reivindicaciones 30 y 37.