

**REVISIÓN**

## Biosensores y sistemas ópticos y de visión avanzados: su aplicación en la evaluación de la calidad de productos IV gama

Diezma Belén<sup>1</sup>, Correa EC<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Propiedades Físicas y Técnicas Avanzadas en Agroalimentación (LPF-TAGRALIA). Universidad Politécnica de Madrid. Ciudad Universitaria sn, 28040 Madrid, España. Correo electrónico: belen.diezma@upm.es

Recibido: 2015-06-09 Aceptado: 2017-03-20

### Resumen

Los productos mínimamente procesados son alimentos muy atractivos para los consumidores atendiendo a sus propiedades nutricionales y a su facilidad de preparación. Sin embargo, la seguridad microbiológica de estos alimentos requiere de especial atención, dado que a lo largo de su proceso no se someten a tratamientos que aseguren la letalidad de los microorganismos. Aparece así la necesidad de dotar a la industria alimentaria en general, y a la de IV gama en particular, de pruebas rápidas para la detección de contaminantes. En este trabajo se presentan los fundamentos de los biosensores y la imagen hiperespectral (IH) y sus aplicaciones en la aportación de información que se pueda correlacionar con la calidad y el estado de frescura de los productos IV gama y de otros alimentos.

**Palabras clave:** productos listos para consumir, seguridad microbiológica, imagen hiperespectral, sensores químicos.

## Biosensors and Advanced Optical and Vision Systems: Application to Quality Evaluation of Ready-to-eat Products

### Summary

Minimally processed products are very attractive foods for consumers because of their nutritional properties and easy preparation. However, the microbiological safety of these foods requires special attention, since throughout their process they do not undergo treatments that ensure the lethality of microorganisms. This shows the need to equip the food industry in general and the ready-to-eat in particular with rapid tests for the detection of contaminants. This paper presents the fundamentals of biosensors and the hyperspectral image (IH) and its applications in the contribution of information that could be correlated with the quality and freshness of ready-to-eat products and other foods.

**Keywords:** minimally processed products, microbiology safety, hyperspectral image, chemical sensors

### Introducción

En estudios recientes llevados a cabo en Brasil sobre hortalizas de hoja IV gama (Oliveira et al., 2011), se ha constatado que en el 96,7 % de las muestras analizadas (162) la población de bacterias aerobias psicrótrofas era superior a 5 log ufc/g, mientras que en un 81,5 % de las muestras aparecieron coliformes. Los microorganismos

indicadores como *Escherichia coli*, *Listeria* spp. y *Salmonella* spp. aparecieron en el 53,1 %, el 3,7 % y el 1,2 % de las muestras analizadas respectivamente. Son resultados que indican la necesidad de seguir mejorando en la implementación de programas de calidad en los procesos de productos IV gama con el objetivo de mejorar la seguridad microbiológica y la vida útil, y en el desarrollo de

procedimientos para la detección e identificación de los microorganismos.

Aunque la industria alimentaria trata de satisfacer los requerimientos de la normativa legal vigente en cada estado mediante análisis periódicos de sus productos, estos procedimientos utilizan convencionalmente técnicas microbiológicas de cultivo, aislamiento, conteo e identificación de microorganismos (PCR, espectrometría de masas), que no permiten una monitorización continua y fácil de las producciones debido a que son metodologías caras, lentas, que necesitan de personal técnico bien entrenado y en algunos casos requieren pasos de extracción o pre-tratamiento de la muestra, aumentando el tiempo de análisis (Mello y Kubota, 2002).

Aparece así la necesidad de dotar a la industria alimentaria en general, y a la de IV gama en particular, de pruebas rápidas para la detección de contaminantes. Los últimos avances en matrices de biosensores y tecnologías de imagen permiten ya hablar de sistemas de alto rendimiento (en inglés *high throughput systems*, HSS) que pueden operar en un marco temporal reducido identificando múltiples contaminantes simultáneamente (Bhunja, Kim y Taitt, 2014). A continuación se presentan los fundamentos y aplicaciones de los biosensores y de la imagen hiperespectral (IH) en la evaluación de la seguridad alimentaria especialmente de frutas, hortalizas y productos de IV gama. Se finaliza el artículo presentando algunas aplicaciones en las que se combinan ambas técnicas.

## Biosensores

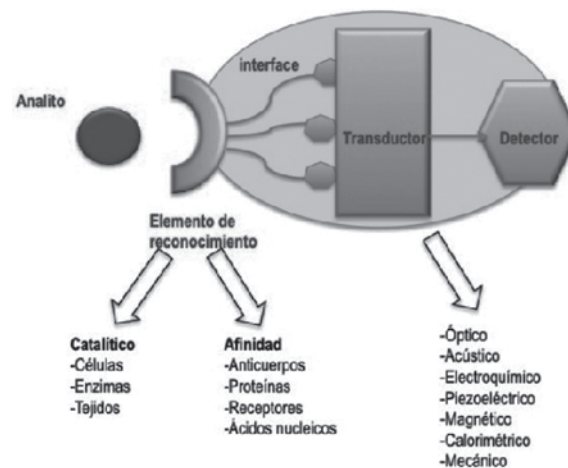
### Funcionamiento de un biosensor

Dispositivos como los sensores químicos que se caracterizan por su potencial bajo coste, su capacidad para monitorear en continuo la calidad química y microbiológica de un producto, con tiempos de respuesta rápidos, pueden satisfacer las exigencias de la industria alimentaria.

Los sensores químicos pueden ser clasificados de acuerdo con el mecanismo que les confiere la especificidad química. Un biosensor pertenece a un subgrupo de sensores químicos que incorpora un elemento de detección biológica o biomimético. Los principales materiales biológicos utilizados en la tecnología de biosensores son las parejas de enzima/sustrato, anticuerpo/antígeno y ácidos nucleicos/secuencias complementarias. La selectividad del elemento de detección biológica ofrece la oportunidad para el desarrollo de dispositivos altamente específicos para el análisis en tiempo real de mezclas complejas (Velasco-García y

Mottram, 2003). En la industria alimentaria las principales áreas de interés para la aplicación de biosensores son la detección de patógenos, pesticidas, microorganismos y toxinas (Mello y Kubota, 2002).

El elemento de reconocimiento biológico de un biosensor se puede clasificar en dos clases principales: biocatalizadores (enzimas, tejidos, etc.) y bioligandos (anticuerpos, ácidos nucleicos, lectinas, etc.). Los transductores tradicionales son de tipo electroquímico, óptico y térmico. La última generación de biosensores (Figuras 1 y 2) combina los principios de medición clásicos con transductores piezoeléctricos y magnéticos.

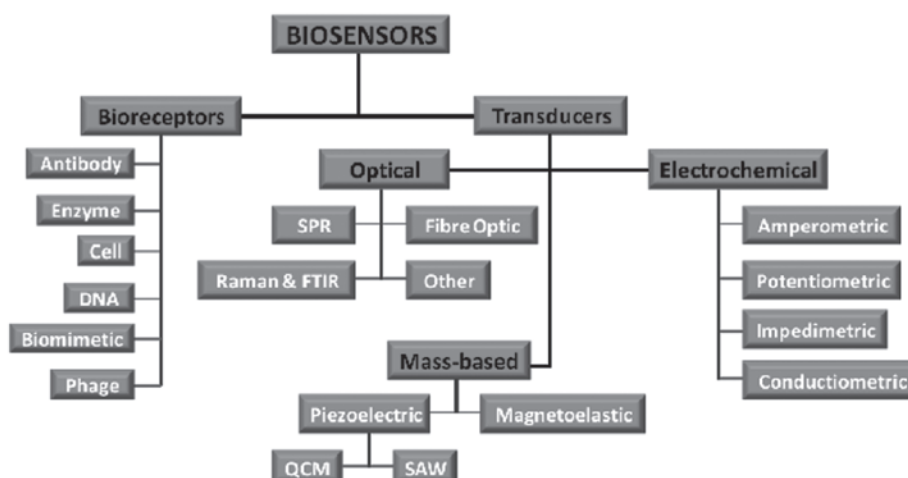


**Figura 1.** Esquema de un biosensor (Torres Ramírez y Méndez Albores, 2014).

### Aplicaciones de los biosensores

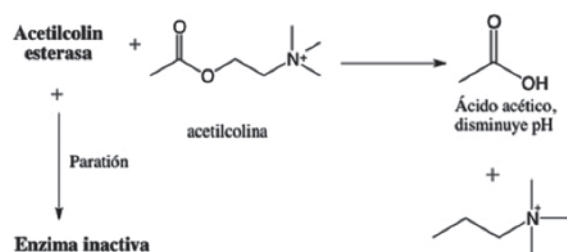
No hay muchas experiencias documentadas de utilización de biosensores en hortalizas de IV gama, sin embargo, sí hay trabajos que presentan su uso en frutas y hortalizas en general, lo que puede asumirse como el antecedente de su aplicación en la industria de los productos listos para consumir. En la post-cosecha de frutas y hortalizas las preocupaciones más importantes son 1) la detección de residuos de plaguicidas, 2) el control de calidad en atmósferas modificadas, 3) la detección de patógenos y toxinas en frutas y verduras, y 4) la calidad nutricional.

1) Detección de residuos de plaguicidas. Un informe reciente de la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (AINIA, 2014) refleja que el 44 % de las muestras recogidas de frutas y verduras europeas contiene restos de productos fitosanitarios. Amine et al. (2006) estimaron que alrededor del 71 % de las aplicaciones descritas



**Figura 2.** Componentes de un biosensor (modificado de Adley, 2014). SPR: Resonancia de Plasmones de Superficie. FTIR: Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier. QCM: Microbalanzas de Cristal de Cuarzo. SAW: Onda Acústica de Superficie.

para los biosensores enzimáticos son para la determinación de plaguicidas, incluidos los carbamatos y compuestos organofosforados, mientras que la detección de metales pesados representaba solamente el 21 %. Los biosensores enzimáticos se basan principalmente en la inhibición por parte del pesticida de la reacción de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) y su sustrato, la acetilcolina (Figura 3). El pesticida se une al sitio esteárico activo de la enzima, inhibiendo su actividad biocatalítica, efecto que se combina con diferentes métodos de transducción de la señal.

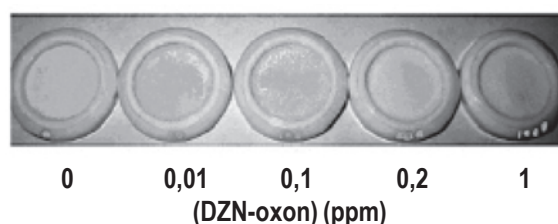


**Figura 3.** Reacción enzimática de la acetilcolinesterasa. En ausencia del inhibidor la enzima hidroliza la acetilcolina en ácido acético y colina (Torres Ramírez y Méndez Albores, 2014).

Velasco-García y Mottram (2003) presentan en su revisión algunas aplicaciones basadas en transductores sensibles a pH, en los que en ausencia del pesticida inhibidor la hidrólisis de la acetilcolina por la AChE libera acético que acidifica el medio, de forma que a menor pH menor con-

centración de pesticida en el medio. Estos transductores se aplicaron con éxito para la cuantificación del pesticida propoxur en muestras de cebolla y lechuga para la determinación de iones de metales pesados y pesticidas organofosforados en patatas.

Nagatani et al. (2007) desarrollaron un chip visual para la detección de un pesticida organofosforado basado también en AChE, que permitía diferenciar entre concentraciones de 0,1 ppm y 0,2 ppm en muestras reales de manzana y zumo de naranja. En presencia del pesticida la enzima está inhibida y no aparece coloración en el chip (Figura 4).



**Figura 4.** Decoloración gradual de los chips desechables a medida que aumenta la concentración del pesticida diazinon-oxon (DZN-oxon) (Nagatani et al., 2007).

Cesarino et al. (2012) desarrollaron un biosensor amperométrico basado en la acetilcolinesterasa inmovilizada en una estructura de nanotubos de carbono y polianilina, para cuantificar los insecticidas carbamatos metomil y carbaril en muestras licuadas de manzana, col y brócoli.

2) Control de calidad en atmósferas modificadas. La determinación de etanol en envases de atmósfera modificada

como los que habitualmente se emplean en los productos de IV gama se puede utilizar como un indicador de anoxia y por tanto para detección de daños en condiciones de bajo oxígeno en las atmósferas en las que se almacenan frutas y verduras. Los sensores de etanol más prometedores desarrollados hasta la fecha son los sensores bi-enzimáticos basados en la co-inmovilización de la enzima alcohol oxidasa con la peroxidasa. En presencia de la enzima alcohol oxidasa el etanol se oxida a acetaldehído y  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual se oxida a su vez por la peroxidasa que lo reduce aún más a  $\text{H}_2\text{O}$  liberando oxígeno. Este sistema se ha utilizado para desarrollar sensores colorimétricos comerciales y desechables, capaces de detectar daños por bajo  $\text{O}_2$  en paquetes de atmósfera modificada que contienen frutas y verduras mínimamente procesadas (Azevedo et al., 2005). Junto con las enzimas se fija en el chip un compuesto cromogénico el 2,2'-azino-di(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) o ABTS, que al oxidarse con el oxígeno adquiere un color verde azulado. El viraje de color del cromógeno indica la detección de etanol en el espacio de cabeza del interior de las bolsas de IV gama.

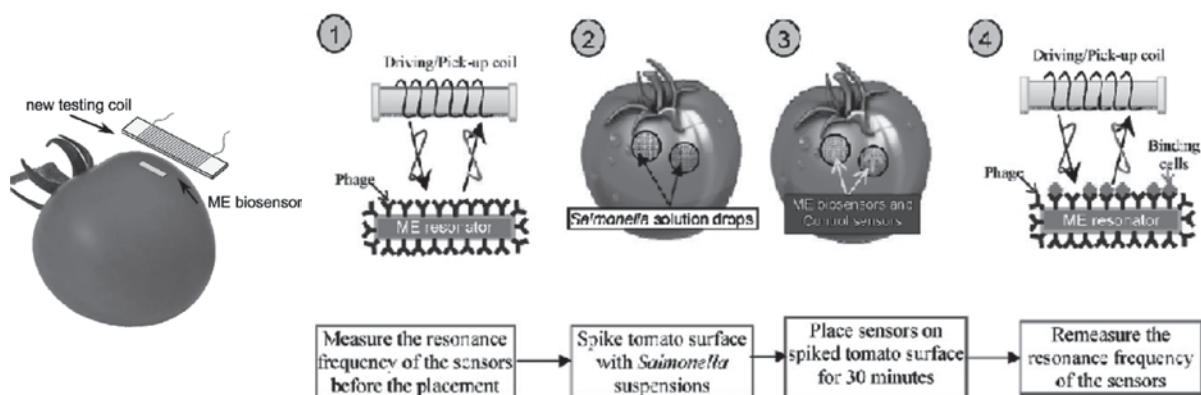
Schlangen, Haemmerle y Moos (2012), desarrollaron un biosensor enzimático amperométrico para la detección de alcoholes volátiles en el espacio de cabeza de zumos de frutas y vegetales. El principio del sensor se basa en la oxidación de etanol a acetaldehído catalizada por la enzima alcohol oxidasa. El  $\text{H}_2\text{O}_2$  producto de la reacción se oxida en el electrodo de platino, generando una señal eléctrica medible proporcional a la concentración del alcohol. El sensor fue capaz de detectar alcoholes volátiles (metanol y etanol) en zumos de tomate, uva, grosella y manzana. No pudo diferenciar entre etanol y metanol, pero puede utilizarse para realizar una detección rápida de estos volátiles como

screening previo de las muestras que deben ir a su análisis a laboratorio.

3) Detección de patógenos y toxinas en frutas y verduras. De acuerdo con Lazcka, Campo y Muñoz (2007), los biosensores son la tecnología de más rápido crecimiento para la detección de patógenos, siendo posible en un futuro próximo que esta técnica de análisis pueda sustituir la prueba de referencia ELISA. Esta es un gran área de interés, no sólo debido al potencial de los biosensores como indicadores de toxicidad, sino también como indicadores de la calidad, frescura o el deterioro de frutas y verduras (Velusamy et al., 2010; Saaid et al., 2009).

Chai et al. (2013) utilizaron un biosensor magnetoelástico (ME) para la detección de *Salmonella typhimurium* en la superficie de tomates. Los biosensores ME constan de un transductor (un resonador ME) y un receptor específico para bacterias patogénicas. Cuando el biosensor entra en contacto con las bacterias diana específicas, las bacterias son capturadas y ligadas a la superficie del biosensor por el elemento de reconocimiento biomolecular, en este caso el bacteriófago filamentoso E2 específico para *S. typhimurium*. Esta unión incrementa la masa del sensor provocando un descenso en la frecuencia resonante proporcional al número de células bacterianas ligadas a la superficie del biosensor. Se utiliza una electro-bobina magnética para generar el campo magnético oscilante y medir la frecuencia de resonancia (Figura 5). Con este novedoso dispositivo la presencia de *Salmonella* se analiza in-situ y en tiempo real con un límite de detección inferior a  $1,5 \cdot 10^3$  ufc/mm<sup>2</sup>.

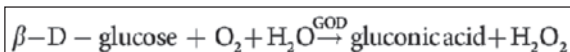
Por otro lado, el desarrollo sobre los frutos de hongos de los géneros *Aspergillus* y *Penicillium* produce micotoxinas. Leung, Shankar y Mutharasan (2007), en su revisión sobre biosensores de fibra óptica, describen un sensor



**Figura 5.** Esquema del modo de utilización del biosensor magnetoelástico (ME) sobre la superficie de un alimento (modificado de Suiqiong et al., 2010; Chai et al., 2013).

fluorescente para detectar fumonisinas y aflatoxinas en maíz, utilizando por una parte un ensayo competitivo para medir la fumonisina B-1 (FB1): el anticuerpo a FB1 se unió covalentemente a la fibra, la señal de fluorescencia fue inversamente proporcional a la concentración de FB1. Por otra parte, la aflatoxina B-1 (AFB (1)) se detectó usando un ensayo no competitivo, porque la AFB(1) emite fluorescencia. La señal fluorescente en este caso era directamente proporcional a la concentración de AFB (1). El límite de detección fue de 2 ng/ml de AFB (1).

4) Calidad nutricional. La afinidad de los biosensores por compuestos específicos permite desarrollar dispositivos para la detección de compuestos de interés nutricional como azúcares o antioxidantes. La glucosa es el principal monosacárido encontrado en casi todas las frutas y se puede utilizar como un indicador de su índice glucémico. Por lo tanto resulta de interés el desarrollo de biosensores simples, fiables y económicos de glucosa para frutas. Ang, Por y Yam (2015) han desarrollado un biosensor enzimático amperométrico basado en la inmovilización de glucosa oxidasa (GOD) sobre una membrana inerte de quitosano fijada a continuación sobre un electrodo de platino. El principio básico de este biosensor es la cuantificación de la glucosa mediante la detección electroquímica del  $H_2O_2$  liberado enzimáticamente (Figura 6). Se evaluó el comportamiento del biosensor mediante la determinación del contenido de glucosa en homogeneizados de manzana, pera, mango, sandía, plátano y naranja. Su precisión fue similar a la de un kit de ensayo de glucosa comercial, con un límite de detección de 5mM.



**Figura 6.** Reacción completa catalizada por la glucosa oxidasa (GOD).

#### *Limitaciones en el uso de biosensores*

A pesar de las aplicaciones descritas en los párrafos anteriores, hay pocas publicaciones sobre biosensores aplicados a la tecnología postcosecha o a los productos de IV gama y muy pocos producidos a nivel comercial en general (Figura 7).

Una observación importante es que la mayoría de los biosensores citados están diseñados para utilizar muestras en fase líquida, mostrando que el enfoque no destructivo está todavía muy lejos en el caso de muestras sólidas. En general, algunos de los principales inconvenientes que los biosensores tienen que superar son la limitada vida útil de

los componentes biológicos, la falta de selectividad en matrices complejas reales, la necesidad de mejora de los dispositivos sensores en cuanto a la sensibilidad y la reproducibilidad y el elevado coste, cuya reducción pasa por la producción comercial en masa.

En el caso concreto de la aplicación de biosensores en el control microbiano de los alimentos, hay aspectos que no siempre se tienen en cuenta como la heterogeneidad espacial de la matriz alimentaria y de la distribución de los microorganismos en la misma, que puede estar influenciada por variables como la porosidad, las propiedades viscoelásticas y los atributos físico-químicos de los alimentos, tales como pH, actividad de agua y capacidad de difusión de los nutrientes y/o metabolitos. Estos efectos son un factor limitante en la aplicabilidad de la tecnología de biosensores en este campo (Adley, 2014).

#### *Futuro de los biosensores*

La construcción de sistemas integrados que utilicen un conjunto de biosensores para la fabricación de autoanalizadores de alta especificidad necesita mejorar o diseñar nuevas tecnologías de sensores (receptores y transductores) y tecnologías de fabricación automatizadas para eliminar la variabilidad lote a lote y hacerlos aptos para la producción comercial en masa, y la integración de la matriz de sensores con un sistema de extracción de muestra apropiado.

La información aportada por los biosensores se puede integrar en sistemas de trazabilidad y de información al consumidor basados en el «internet de las cosas». Zhao et al. (2015) proponen un sistema basado en un biosensor de AChE para detectar residuos de clorpirifos en muestras reales de ocho tipos de verduras y frutas (pepino fresco, judías, espinacas, col, frijol, manzana, tomate y lechuga) con un límite de detección de 2  $\mu\text{g/l}$ . El detector imprime el resultado de la analítica en un código QR que se adhiere al envase con el producto y que puede ser consultado por el consumidor en cualquier punto de la cadena de valor y obtener información sobre el contenido de pesticidas del producto (Figura 8).

Por último, hay al menos otros dos desarrollos que se espera tengan un impacto significativo en el área de biosensores: el laboratorio en un chip y la nanotecnología. Los nano alambres semiconductores de óxido de metal o nanotubos se pueden utilizar para la fabricación por ejemplo de sensores de gases y biosensores electroquímicos. Estas nanoestructuras cuasi-unidimensionales son esenciales para el avance en el desarrollo de sensores químicos y tendrán un impacto importante en la exploración



| Company                                                      | Biosensor                                                                                                                            | Country |
|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| Oriental electric                                            | Fish deterioration tracking                                                                                                          | China   |
| Massachusetts Institute of Technology                        | Detection of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 in lettuce (Canary)                                                                     | USA     |
| Michigan State University's Electrochemical Biosensor        | Detection of <i>Escherichia coli</i> O157:H7 and <i>Salmonella</i> in meat products in USA                                           | USA     |
| Georgia Research Tech Institute                              | Detection of <i>Salmonella</i> and <i>Campylobacter</i> in pork industry                                                             | USA     |
| Naval Research Laboratory                                    | Detection of <i>Staphylococcal</i> enterotoxin B and <i>Botulinum</i> toxin A in tomatoes, sweet corn, beans and mushrooms           | USA     |
| Universitat Autònoma de Barcelona in collaboration with CSIC | Detection of atrazine traces                                                                                                         | Spain   |
| Molecular Circuitry Inc.                                     | <i>Escherichia coli</i> O157, <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> and <i>Campylobacter</i>                                           | USA     |
| Research International                                       | Proteins, toxins, virus, bacteria, spores and fungi (simultaneous analysis)                                                          | USA     |
| Universal Sensors                                            | Ethanol, methanol, glucose, sucrose, lactose, L-aas, glutamine, ascorbic acid and oxalate                                            | USA     |
| Texas Instruments Inc.                                       | Penaut Allergens, antibiotics                                                                                                        | USA     |
| Yellow Springs Instruments Co                                | Glucose, sucrose, lactose, L-lactate, galactose, L-glutamate, ethanol, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , starch, glutamine and choline | USA     |
| Affinity Sensors                                             | <i>Staphylococcus aureus</i> and cholera toxin                                                                                       | UK      |
| Ambri Limited                                                | Pathogens such as <i>Salmonella</i> e <i>Enterococcus</i>                                                                            | USA     |
| Biacore AB                                                   | Water soluble vitamins, chemical veterinary residues and mycotoxins                                                                  | Sweden  |
| BioFutura Srl                                                | Glucose, fructose, malic acid and lactic acid (fermentation)                                                                         | Italy   |
| Biomerieux                                                   | Microorganisms                                                                                                                       | France  |
| Biosensor Systems Desing                                     | Microorganisms and toxic substances                                                                                                  | USA     |
| Biosensores S.L.                                             | Toxic substances                                                                                                                     | Spain   |
| Chemel AB                                                    | Glucose, sacarose, ethanol, methanol and lactose                                                                                     | Sweden  |
| IVA Co Ltd                                                   | Heavy metals                                                                                                                         | Rusia   |
| Motorola                                                     | Microorganisms and GMO's                                                                                                             | Japan   |
| Inventus Bio Tec                                             | Ascorbic acid                                                                                                                        | Germany |

**Figura 7.** Biosensores comerciales para la industria alimentaria (adaptado de Costa-Silva et al., 2013).

de dispositivos a nanoescala (Liu, 2008; Xia, Wei y Wan, 2010), para la fabricación de microlaboratorios tamaño de tarjetas de crédito e incluso para la detección in vivo.

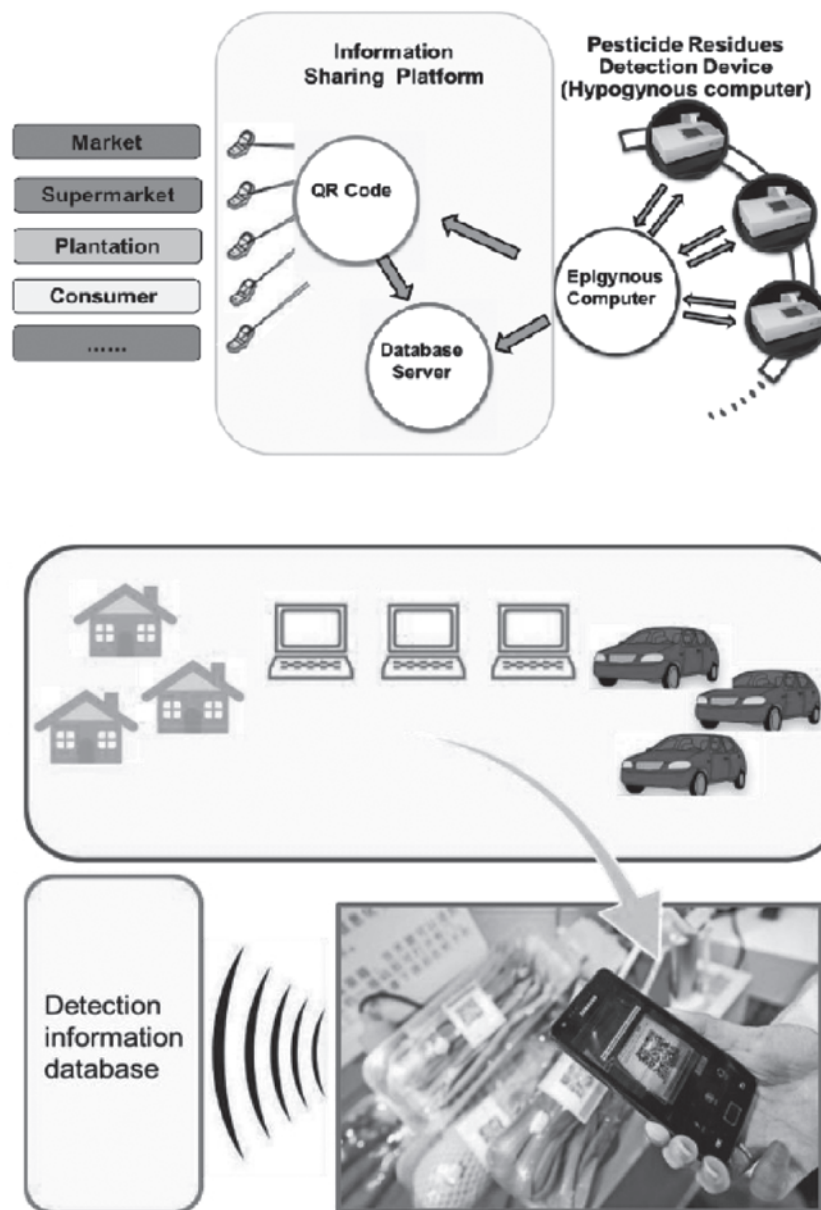
#### Sistemas ópticos y de visión: la imagen hiperespectral (IH)

##### Fundamentos

La IH es un término amplio que engloba todas aquellas técnicas que permiten obtener datos espectrales con reso-

lución espacial mediante el uso de la fluorescencia, la espectroscopia IR y VIS o la espectroscopia Raman. Aúna las potencialidades de la espectroscopia y la imagen convencional, al obtener espectros para todos los píxeles de una imagen (Figura 9) con resoluciones espaciales que pueden variar del nivel de una sola célula al de un objeto macroscópico (un alimento).

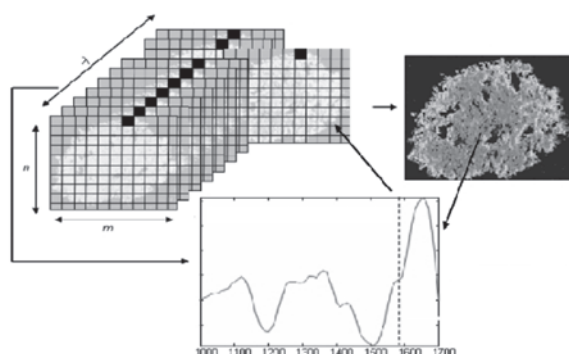
La Figura 10 muestra el esquema habitual que se sigue para preprocesar, analizar y establecer los modelos de predicción cuantitativos o cualitativos a partir de una imagen



**Figura 8.** Arquitectura del sistema de detección de pesticidas (figura superior); modelo de la plataforma propuesta de intercambio de información (figura inferior) (modificado de Zhao et al., 2015). Código QR: código de respuesta rápida.

hiperespectral. El preprocesado permite la corrección de la imagen eliminando cualquier efecto interferente que pueda deberse a una iluminación deficiente o a la morfología del objeto, y la eliminación del fondo, de modo que el proceso continúa sólo en los píxeles correspondientes a la región de interés. Posteriormente se suele realizar un análisis estadístico exploratorio para establecer, si es posible, aquellas longitudes de onda que presentan mayor variabilidad y por tanto pueden ser las más relevantes en el fenómeno bajo

estudio. Sin embargo, en la IH en el visible y en el infrarrojo, las longitudes de onda suelen estar muy correlacionadas y se requiere la aplicación de técnicas quimiométricas de análisis multivariante como análisis de componentes principales (PCA) para establecer modelos, normalmente cualitativos. La determinación de modelos cuantitativos en muchas ocasiones resulta muy complicado, pues los modelos basados en los patrones espectrales han de relacionarse con valores de referencia química que no pueden

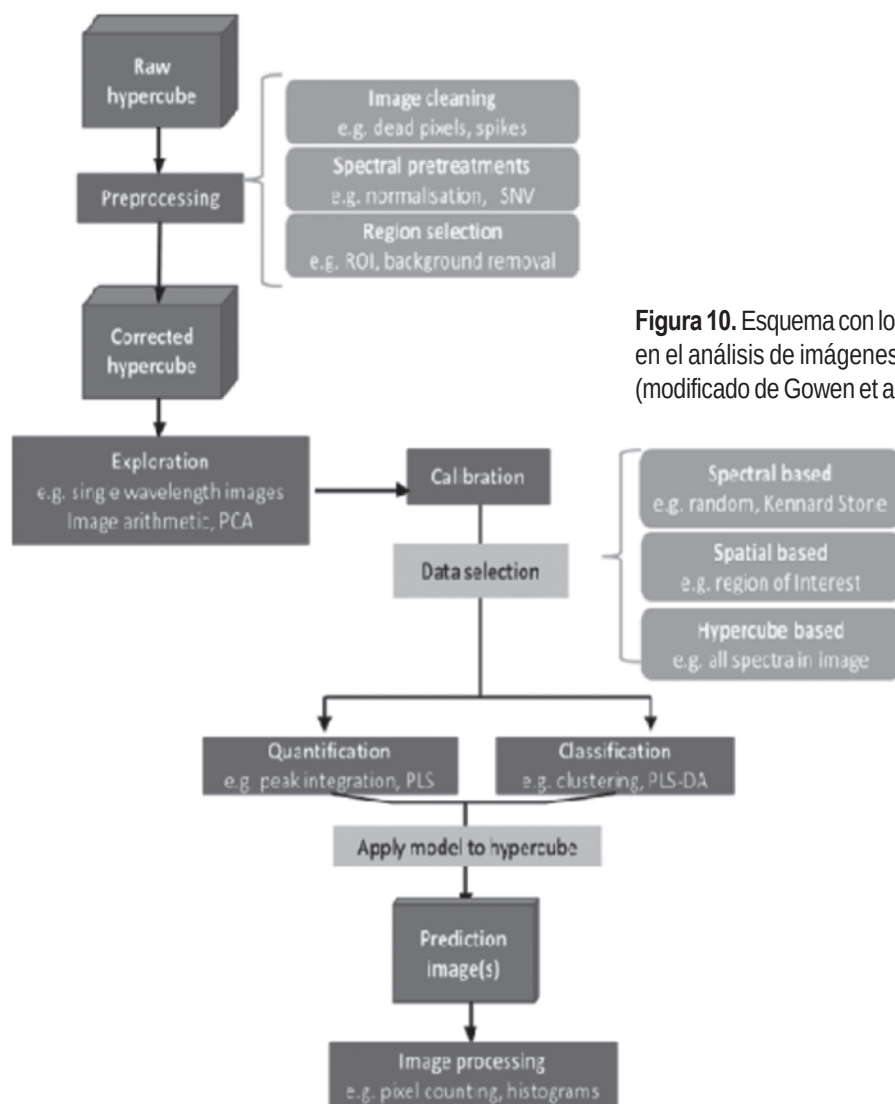


**Figura 9.** Cubo de datos (o hipercono) de una IH: dos dimensiones espaciales y una tercera dimensión espectral (adaptado de Riccioli, 2011).

proceder de un único píxel, sino que son un valor medio representativo de la muestra.

En los últimos años la IH ha alcanzado un amplio reconocimiento como una técnica rápida y no destructiva para la determinación de diferentes parámetros de calidad y seguridad en numerosos alimentos. En trabajos de revisión recientes se presentan catálogos de aplicaciones que ilustran la capacidad de la técnica en la clasificación de productos, en la detección de defectos y enfermedades, en la distribución espacial de la composición química o en la evaluación general de la calidad de productos como carnes, pescados, frutas y vegetales y otros alimentos (Wu y Sun, 2013a, 2013b).

Más concretamente, en los últimos 10 años la IH se ha aplicado también a la caracterización microbiológica de



**Figura 10.** Esquema con los pasos habituales en el análisis de imágenes hiperespectrales (modificado de Gowen et al., 2015).



sustratos (Gowen et al., 2015), trabajando tanto a nivel microscópico y aplicando imagen de espectroscopia Raman de dispersión o de espectroscopia VIS/NIR (Park et al., 2015), como a nivel macroscópico. Las primeras investigaciones a escala macroscópica se llevaron a cabo estudiando el crecimiento de bacterias en agar o depositadas sobre superficies de aluminio o acero inoxidable, para posteriormente estudiar también la viabilidad de la técnica directamente sobre alimentos. En los siguientes apartados se incluyen algunos trabajos representativos de estas aplicaciones a nivel macroscópico, que es el que más se aproxima a la posible implantación de la técnica en los entornos productivos.

#### *Detección e identificación de microorganismos en superficies estructuradas*

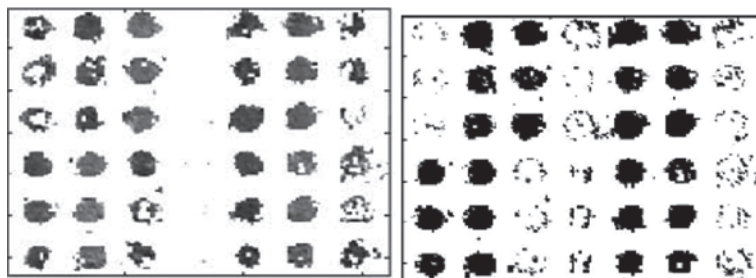
En uno de los primeros trabajos en el área, Dubois et al. (2005) evaluaron la posibilidad de usar la IH NIR (1000-2350 nm) como un sistema de alto rendimiento para la diferenciación de bacterias y la identificación de microorganismos patógenos. En una placa de aluminio con 64 pocillos de 2 mm de profundidad y 1 mm de diámetro se depositaron sendas suspensiones salinas conteniendo los microorganismos a identificar: *Listeria innocua*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* y *Salmonella enteritidis*. Se permitió la desecación de los pocillos antes de adquirir las imágenes hiperespectrales. La distinción entre las especies Gram positivas y las Gram negativas (*E. coli* y *Salmonella* spp.) se basó en las diferencias de intensidad del espectro a 1.940 nm, longitud de onda relacionada con los enlaces de las moléculas de agua. Los distintos contenidos en humedad de unas especies frente a otras podrían explicarse como una consecuencia de la protección frente a la deshidratación que confiere la membrana externa en las Gram negativas. Por otro lado, la intensidad del espectro a

1.685 nm, relacionada con los dobles enlaces cis de las grasas insaturadas, permitió la segregación de *B. cereus* del resto de las especies. Se establece así la viabilidad de la IH, que a través de unas pocas bandas espectrales, provee de una herramienta de alto rendimiento que facilita los procedimientos convencionales para la detección de ciertos patógenos. La aplicación de un análisis discriminante a partir de dos clases, la constituida por *Salmonella* y la formada por *Escherichia*, permitió establecer un modelo de detección para responder a la pregunta de si en una muestra está presente o no uno de los dos microorganismos patógenos.

Otras investigaciones se han dirigido a la detección de ciertos microorganismos directamente en agar. Yoon y Lawrence (2010) han aplicado la IH en el rango comprendido entre 400 y 900 nm para distinguir entre colonias de *Campylobacter* y colonias de otros contaminantes no *Campylobacter* en un estadio de evolución temprano (a las 24 horas de incubación). Para ello se generó una librería de patrones espectrales correspondientes a 11 especies contaminantes de *Campylobacter* y otras seis especies contaminantes no *Campylobacter*, para identificar las principales bandas de absorción y generar los correspondientes modelos de segregación (Figura 11). Con un índice basado en dos longitudes de onda (426 y 458 nm) se consiguió un nivel de acierto del 97 %.

#### *Detección e identificación de microorganismos en alimentos*

La identificación, clasificación y cuantificación del crecimiento microbiano directamente sobre la superficie de alimentos mediante IH supondría un procedimiento alternativo para la detección precoz de contaminaciones microbianas. Las aplicaciones a nivel microscópico no son viables en matrices alimentarias, por lo que la mayor parte de los trabajos se ha centrado a escala macroscópica en imágenes en los rangos visible e infrarrojo muy cercano (400-1000



**Figura 11.** Esquema de la siembra sobre placa de agar de especies contaminantes (arriba) y los patrones espectrales medios de *Campylobacter*, no *Campylobacter* y agar a las 24 h de incubación (Yoon y Lawrence, 2010).

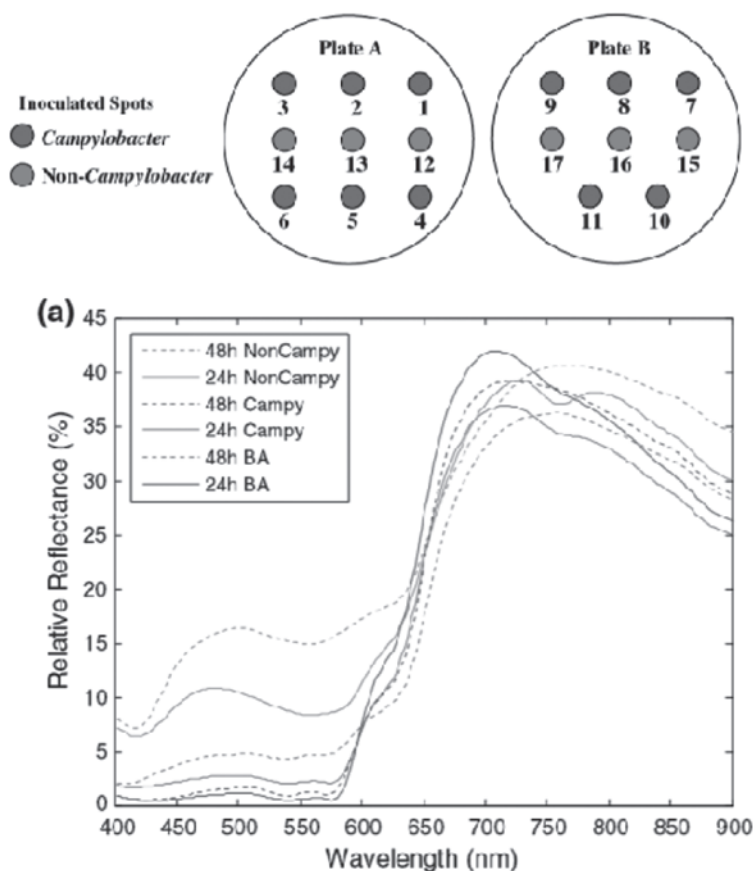
nm) e infrarrojo (900-1.700 nm). Sin embargo, en general, la técnica ha mostrado su potencial en la detección de los efectos secundarios del crecimiento de los microorganismos en el alimento o en la identificación de contaminaciones sospechosas, como la presencia de restos fecales frecuentemente asociadas a la presencia de coliformes. En este sentido hay una amplia trayectoria de investigaciones que persigue la identificación de carcasas de pollo con restos fecales en superficie, llegando a proponer sistemas de evaluación en línea (Park et al., 2006, 2011).

La estimación de microorganismos viables totales en productos avícolas, cárnicos y pescados ha sido el objetivo de diversos trabajos, con resultados esperanzadores. Por ejemplo, Feng y Sun (2013), con imágenes en el rango NIR, establecieron modelos completos (incluyendo la totalidad del espectro) y simplificados (con selección de las longitudes de onda más relevantes), obteniendo en el mejor de los modelos un coeficiente de correlación y un error cuadrático medio de 0,94 y  $0,5 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$  en la validación

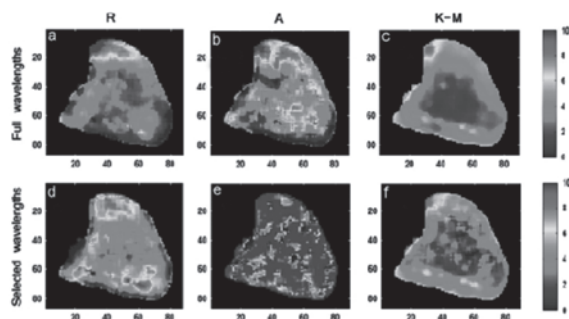
crucada. La visualización de los modelos permite identificar zonas con diferentes cargas microbianas (Figura 12).

Pero además de estimar el número total de bacterias, es de interés la identificación de grupos o géneros específicos, aproximándonos así a los estudios llevados a cabo sobre superficies estructuradas. Aplicando un esquema similar al expuesto para la estimación de viables totales, Feng y Sun (2013), también en carne de pollo, establecieron modelos de predicción de población de enterobacterias, alcanzando errores cuadráticos medios de  $0,45 \log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$ , con las determinaciones comprendidas en el rango de 2,75 a 5,43  $\log_{10} \text{ ufc g}^{-1}$  (Figura 13).

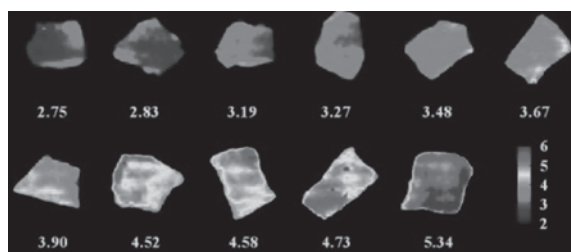
En lo que refiere a productos vegetales, las investigaciones publicadas son menos. Con un carácter eminentemente aplicado, para tratar de sustituir la inspección visual en las líneas de clasificación, cabe mencionar una sucesión de trabajos que persiguen la detección precoz de los efectos causados por *Penicillium* sp. en cítricos. La Figura 14 muestra los patrones espectrales típicos de la superficie del



**Figura 12.** Mapas de distribución de número de viables totales en filetes de pollo para diferentes modelos incluyendo el espectro completo (línea superior) y con selección de variables (línea inferior) (Feng y Sun, 2013).



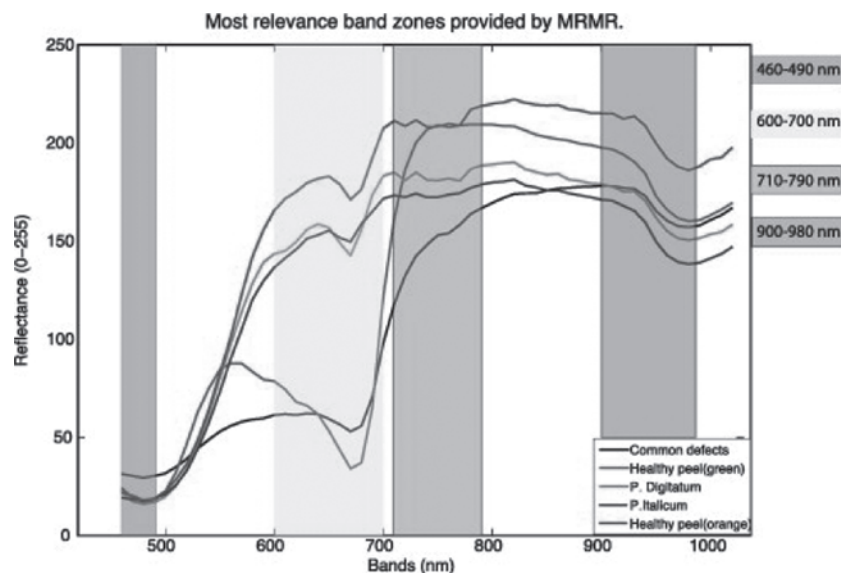
**Figura 13.** Imagen virtual de la estimación de contenido en enterobacterias en carne de pollo (los tonos corresponden a distintos contenidos) (Feng y Sun, 2013).



**Figura 14.** Patrones espectrales de la superficie de un cítrico sin defectos, afectada por trip y afectada por *Penicillium* spp. (Gómez-Sanchís et al., 2012).

fruto. Se consiguieron niveles de acierto comprendidos entre el 90 % y el 98 % identificando frutos con más de un 5 % de superficie de píxeles considerados como afectados por el microorganismo (Gómez-Sanchís et al., 2008, 2012).

En otros estudios recientes la IH en el rango de 400 a 1.000 nm se ha implementado para detectar la contaminación microbiológica de productos como hojas de espina-cas, inoculadas con *E. coli* (Siripatrawan et al., 2011) o con *Listeria innocua* (Aligbe, Diezma-Iglesias y Díaz-Barcos, 2013; Figura 15), y champiñones con *Pseudomonas tola-si* (Gaston et al., 2010). La hipótesis es que la actividad metabólica de microorganismos inoculados a estos vegetales resultaría en cambios bioquímicos con la consecuente formación de productos metabólicos que podrían ser detectados por la IH, indicando así la contaminación del alimento. Es importante también distinguir entre estas alteraciones y los cambios bioquímicos normales que se suceden a lo largo de la vida útil de los alimentos (por ejemplo, el pardeamiento enzimático). En el estudio sobre los champiñones, en los que como en otros productos, tanto la actividad bacteriana como la enzimática dan lugar a la aparición de pardeamientos en la superficie, mediante el patrón espectral se ha podido distinguir entre los daños mecánicos y el deterioro microbiológico con un nivel de acierto del 95 %.



**Figura 15.** Espectros medios (arriba) correspondientes a regiones muy deterioradas (gris) y de deterioro medio (blanco grueso). En las imágenes virtuales de asignación de regiones (abajo) a cada clase de deterioro le corresponde un tono: gris claro para píxeles no deteriorados, blanco para píxeles de deterioro medio y gris oscuro para píxeles deteriorados. Se muestran hojas inoculadas y no inoculadas al principio y al final de la conservación (Aligbe, Diezma-Iglesias y Díaz-Barcos, 2013).

### *Retos de la aplicación de la IH en calidad microbiológica de alimentos*

A pesar de que a lo largo del artículo se han presentado ejemplos que demuestran el potencial de la IH como una herramienta alternativa útil para profundizar en el conocimiento fundamental de la microbiología de los alimentos y para la detección e identificación de determinados microorganismos, es evidente que existen limitaciones de la técnica que han de salvarse antes de estar en condiciones de ser transferida a la industria (Gowen et al., 2015).

Para que pueda adquirirse la imagen de toda la superficie del producto, la presentación de la muestra es todavía una cuestión pendiente de cara a la supervisión en línea de los alimentos. La resolución espacial define el tamaño mínimo de la región que puede ser examinada; los sistemas de IH en aplicaciones macroscópicas presentan una resolución típica de 300  $\mu\text{m}$ , lo que se traduce en que muestras contaminadas con pequeñas colonias no sean identificadas. Sin embargo, hay que buscar una solución de compromiso entre la resolución espacial, el campo de visión y la velocidad de adquisición de la imagen: una mejora de la primera se traduce en una disminución del campo de visión y de la velocidad de adquisición.

En las determinaciones microbiológicas un aspecto clave es el límite de detección. La mayor parte de los estudios se ha centrado en el análisis del deterioro de los alimentos o en la identificación de los niveles microbianos con cargas superiores a  $10^2$  ufc/ml. Aunque los estudios han de ampliarse a un mayor número de especies, puede ya afirmarse que la mayor parte de las técnicas de IH tienen un límite de detección superior al que puede alcanzarse con los procedimientos tradicionales, por lo que pueden tener limitada su aplicación a especies en las que los efectos en la calidad y seguridad de los alimentos se manifiestan a partir de elevadas cargas microbianas. La especificidad de la técnica también plantea dudas razonables. La capacidad de identificar y discriminar ciertos microorganismos en muestras en las que cohabitan otros muchos, por ejemplo en alimentos fermentados, es una tarea que requiere de la aplicación conjunta de las aproximaciones microscópica y macroscópica.

### **Combinación de biosensores e IH**

Las perspectivas de utilizar sinérgicamente ambas tecnologías en la identificación y detección de microorganismos en alimentos se vislumbran si se presta atención a otros ámbitos. Así, en algunas aplicaciones médicas se

ha comprobado ya la viabilidad de utilizar ambas técnicas en sistemas de alto rendimiento. Concretamente Liu et al. (2011) y Du et al. (2014) combinan biosensores basados en fluorescencia implementados en sistemas microfluídicos multicanal (también conocidos como laboratorios-en-un-chip), con la adquisición de la IH a microescala, encargada de recoger la respuesta de los fluoróforos en cada punto de los canales estudiados. Se ha conseguido la identificación de cadenas cortas de oligonucleótidos con *E. coli* y *Streptococcus*  $\beta$  hemolíticos.

### **Agradecimientos**

Las autoras agradecen a la red Cyted Hortyfresco los medios puestos a su disposición para la presentación de este trabajo (<http://www.hortyfresco.cl>).

### **Bibliografía**

- Adley, C. (2014). Past, present and future of sensors in food production. *Foods*, 3(3), 491-510.
- AINIA. (2014). *Alternativas sostenibles para mantener a raya los plaguicidas en frutas y verduras*. Recuperado en <http://www.ainia.es/noticias/seguridad-alimentaria/alternativas-sostenibles-para-mantener-a-rya-los-plaguicidas-en-frutas-y-verduras/>
- Aligbe, I., Diezma-Iglesias, B. y Díaz-Barcos, V. (2013). Imagen hiperespectral para la detección de contaminación microbiana en espinaca fresca envasada. En *VII congreso ibérico de agroingeniería y ciencias hortícolas: Innovar y producir para el futuro* (pp. 1057-1063). Madrid: F. G. UPM.
- Amine, A., Mohammadi, H., Bourais, I. y Palleschi, G. (2006). Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1405-1423.
- Ang, L. F., Por, L. Y. y Yam, M. F. (2015). Development of an amperometric-based glucose biosensor to measure the glucose content of fruit. *Plos One*, 10(3). doi:10.1371/journal.pone.0111859
- Azevedo, A. M., Prazeres, D. M. F., Cabral, J. M. S y Fonseca, L. P. (2005). Ethanol biosensors based on alcohol oxidase. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(2), 235-247.
- Bhunja, A. K., Kim, M. S. y Taitt, C. R. (2014). High throughput screening strategies and technology platforms for detection of pathogens: An introduction. En: A. K. Bhunia (Eds.). *High throughput screening for food safety assessment* (pp. 1-9). Cambridge: Woodhead Publishing.
- Cesarino, I., Moraes, F. C., Lanza, M. R. V. y Machado, S. A. S. (2012). Electrochemical detection of carbamate pesticides in fruit and vegetables with a biosensor based on acetylcholinesterase immobilized on a composite of polyaniline-carbon nanotubes. *Food Chemistry*, 135(3), 873-879.
- Chai, Y., Horikawa, S., Li, S., Wickle, H. C. y Chin, B. A. (2013). A surface-scanning coil detector for real-time, in-situ detection of bacteria on fresh food surfaces. *Biosensors and Bioelectronics*, 50, 311-317.
- Costa-Silva, L. M. D., Salviano Dos Santos, V. P., Medeiros Salgado, A. y Signori Pereira, K. (2013). Biosensors for contaminants monitoring in food and environment for human and environmental health. En T. Rinken (Eds.). *State of the art in biosensors: Environmental and medical applications* (pp. 151-168). doi:10.5772/56353



- Du, C., Liu, L., Guo, J., He, Y., Guo, J., Sun, S. y Ma, H. (2014). A biosensor using coupled plasmon waveguide resonance combined with hyperspectral fluorescence analysis. *Journal of Innovative Optical Health Sciences*, 7(1). doi:10.1142/S1793545814500175
- Dubois, J., Lewis, E. N., Fry, F. S. y Calvey, E. M. (2005). Bacterial identification by near-infrared chemical imaging of food-specific cards. *Food Microbiology*, 22, 577-583.
- Feng, Y. Z. y Sun, D. W. (2013). Determination of total viable count (TVC) in chicken breast fillets by near-infrared hyperspectral imaging and spectroscopy transforms. *Talanta*, 105, 244-249.
- Gaston, E., Frias, J. M., Cullen, P. J., O'donnell, C. P. y Gowen, A. A. (2010). Visible-near infrared hyperspectral imaging for the identification and discrimination of brown blotch disease on mushroom (*Agaricus bisporus*) caps. *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, 18(5), 341-353.
- Gómez-Sanchis, J., Gómez-Chova, L., Aleixos, N., Camps-Valls, G., Montesinos-Herrero, C., Moltó, E. y Blasco, J. (2008). Hyperspectral system for early detection of rottenness caused by *Penicillium digitatum* in mandarins. *Journal of Food Engineering*, 89(1), 80-86.
- Gómez-Sanchis, J., Martín-Guerrero, J. D., Soria-Olivas, E., Martínez-Sober, M., Magdalena-Benedito, R. y Blasco, J. (2012). Detecting rottenness caused by *Penicillium* genus fungi in citrus fruits using machine learning techniques. *Expert Systems with Applications*, 39, 780-785.
- Gowen, A. A., Feng, Y., Gaston, E. y Valdramidis, V. (2015). Recent applications of hyperspectral imaging in microbiology. *Talanta*, 137, 43-54.
- Lazcka, O., Campo, F. J. D. y Muñoz, F. X. (2007). Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1205-1217.
- Leung, A., Shankar, P. M. y Mutharasan, R. (2007). A review of fiber-optic biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 125(2), 688-703.
- Liu, A. (2008). Towards development of chemosensors and biosensors with metal-oxide-based nanowires or nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 167-177.
- Liu, Z., Shi, H., Liu, L., Deng, S., Ji, Y., Ma, S., Ma, H. y He, Y. (2011). Line-monitoring, hyperspectral fluorescence setup for simultaneous multi-analyte biosensing. *Sensors (Basel)*, 11(11), 10038-10047.
- Mello, L. D. y Kubota, L. T. (2002). Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. *Food Chemistry*, 77(2), 237-256.
- Nagatani, N., Takeuchi, A., Anwar Hossain, M., Yuhi, T., Endo, T., Kerman, K., Takamura, Y. y Tamiya, E. (2007). Rapid and sensitive visual detection of residual pesticides in food using acetylcholinesterase-based disposable membrane chips. *Food Control*, 18(8), 914-920.
- Oliveira, M. A., De Souza, V. M., Morato Bergamini, A. M. y Pereira De Martinis, E. C. (2011). Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. *Food Control*, 22(8), 1400-1403.
- Park, B., Seo, Y., Yoon, S. C., Hinton, A., Windham, W. R. y Lawrence, K. C. (2015). Hyperspectral microscope imaging method to classify Gram-positive and Gram-negative foodborne pathogenic bacteria. *Transactions of ASABE*, 58(1), 5-16.
- Park, B., Lawrence, K. C., Windham, W. R. y Smith, D. P. (2006). Performance of hyperspectral imaging system for poultry surface fecal contaminant detection. *Journal of Food Engineering*, 75, 340-348.
- Park, B., Yoon, S. C., Windham, W. R., Lawrence, K. C., Kim, M. S. y Chao, K. (2011). Line-scan hyperspectral imaging for real-time in-line poultry fecal detection. *Sensing and instrumentation for food quality and safety*, 5(1), 25-32.
- Riccioli, C. (2011). *Detección y cuantificación de la especie en harinas proteicas de origen animal mediante el uso de sensores hiperespectrales* (Tesis doctoral). Córdoba, España, Universidad de Córdoba.
- Saad, M., Saad, B., Hashim, N. H., Mohamed Ali, A. S. y Saleh, M. I. (2009). Determination of biogenic amines in selected Malaysian food. *Food Chemistry*, 113(4), 1356 - 1362.
- Schlengen, C., Haemmerle, M. y Moos, R. (2012). Amperometric enzyme electrodes for the determination of volatile alcohols in the headspace above fruit and vegetable juices. *Microchimica Acta*, 179(1), 115-121.
- Siripatrawan, U., Makino, Y., Kawagoe, Y. y Oshita, S. (2011). Rapid detection of *Escherichia coli* contamination in packaged fresh spinach using hyperspectral imaging. *Talanta*, 85(1), 276-281.
- Suiqiong, L., Yugui, L., Huiqin, C., Horikawa, S., Wen, S., Simonian, A. y Hin, B. A. (2010). Direct detection of *Salmonella typhimurium* on fresh produce using phage-based magnetoelastic biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 1313-1319.
- Torres Ramírez, E. y Méndez Albores, A. (2014). Biosensores enzimáticos. *Revista Digital Universitaria*, 15, 1-8.
- Velasco-Garcia, M. N. y Mottram, T. (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering*, 84(1), 1-12.
- Velusamy, V., Arshak, K., Korostynska, O., Oliwa, K. y Adley, C. (2010). An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*, 28(2), 232-254.
- Wu, D. y Sun, D. (2013a). Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review: Part I: Applications. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 1-14.
- Wu, D. y Sun, D. (2013b). Advanced applications of hyperspectral imaging technology for food quality and safety analysis and assessment: A review: Part II: Applications. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 19, 15-28.
- Xia, L., Wei, Z. y Wan, M. (2010). Conducting polymer nanostructures and their application in biosensors. *Journal of Colloid and Interface Science*, 341, 1-11.
- Yoon, S. C. y Lawrence, K. C. (2010). Detection of *Campylobacter* colonies using hyperspectral imaging. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 4(1), 35-49.
- Zhao, G., Guo, Y., Sun, X. y Wang, X. (2015). A system for pesticide residues detection and agricultural products traceability based on acetylcholinesterase biosensor and internet of things. *International Journal of Electrochemical Science*, 10, 3387-3399.