

Biospeckle láser: una herramienta prometedora para el control de calidad de los alimentos

Autores: Agustinelli, Silvina; Nisenbaum, Melina*; Guzmán, Marcelo Nicolás; Murialdo, Silvia Elena

Contacto: *melinanisenbaum@gmail.com

País: Argentina

Resumen

La seguridad alimentaria es un tema prioritario a nivel mundial, y los métodos de detección rápidos y precisos de la contaminación microbiana y química son esenciales para prevenir enfermedades transmitidas por los alimentos. En este contexto, el biospeckle láser (BSL), una técnica óptica no invasiva, fácil de operar e inocua, resulta una herramienta prometedora para el monitoreo de la calidad de los alimentos.

El biospeckle láser se basa en el procesamiento del patrón de interferencia dinámico generado por la actividad de la muestra bajo iluminación láser, y tiene varias ventajas sobre las técnicas tradicionales, como su naturaleza no destructiva, capacidad de monitoreo en tiempo real y la detección temprana de cambios en la muestra antes de la aparición de signos visibles de contaminación o deterioro.

En esta presentación, discutiremos el principio del BSL y su aplicación en muestras de alimentos. Presentaremos los estudios que nuestro grupo de investigación está realizando actualmente sobre el control de calidad de los cambios fisicoquímicos y de textura que se producen en filetes de pescado. Nuestros hallazgos demuestran el potencial del BSL como una herramienta confiable y efectiva para el control de calidad en la industria de alimentos: garantiza la seguridad de las muestras, siendo una técnica no invasiva e informa el estado de la carga microbiana y los atributos de calidad en tiempo real.

Palabras claves: análisis en tiempo real; innovación; control de calidad; seguridad alimentaria; patrones speckle

1. Introducción

En todas partes del mundo han surgido epidemias de enfermedades transmitidas por los alimentos (ETA) sobre las que no existe suficiente información para guiar las acciones de las instituciones de salud pública. Hoy se sabe que hay un gran problema de subregistro y falta de datos sobre estas enfermedades en los distintos países. Los alimentos implicados en brotes de enfermedad tienden a ser aquellos que están sometidos a un procesamiento mínimo antes de su consumo, los alimentos frescos, los moluscos bivalvos y los manipulados por gente enferma, donde el patógeno vivo tiene las condiciones necesarias para subsistir, multiplicarse y/o producir toxina. La inocuidad de los alimentos no solo involucra el control en el desarrollo microbiano o contaminación viral sino también las posibles adulteraciones a las que puede ser sometido un alimento al ser elaborado. La adulteración en general implica la sustitución deliberada e intencional de la sustancia alimenticia, incluyendo la simple dilución de la sustancia esperada con un disolvente como el agua. En cuanto a las ETAs los registros llevan a la presencia de virus como factor determinante de las enfermedades, hospitalizaciones y decesos. Sin embargo, respecto a las adulteraciones los registros son puntuales cuando el efecto genera episodios de alto perfil, pero no así respecto a las consecuencias sobre la salud de los consumidores a largo plazo debido a la exposición al mismo. Los controles oportunos como la vigilancia sanitaria resultan fundamentales para mitigar estos eventos. Así

mismo resulta imprescindible contar con información fiable, oportuna y en tiempo real para anticipar y disminuir los impactos negativos.

Es aquí donde se presenta la necesidad de herramientas de control que provean resultados fiables en tiempo real de manera de poder tomar decisiones inmediatas ante brotes o detección de adulteración que pongan en riesgo la seguridad alimentaria de la población.

Las técnicas tradicionales de análisis para el control de los alimentos, como posibles vehículos transmisores de enfermedades, implican grandes volúmenes de muestra y de reactivos, así como tiempos largos de incubación y de obtención de resultados, material de vidrio y equipamiento sofisticado y costoso. Las técnicas emergentes actuales con cortos tiempos de respuesta y de bajo contacto con la muestra como son los métodos espectroscópicos de análisis, requieren en general una alta inversión en el equipamiento, así como también personal calificado para utilizarlo. Es aquí que se hace foco en la necesidad de herramientas económicas de fácil manipulación y aplicación y con un tiempo de respuesta inmediato.

Dentro de estas últimas, el Biospeckle Laser (BSL) es un fenómeno interferométrico dinámico (Rabal y Braga, 2008), que se ha adaptado como una herramienta sensible para monitorear cambios muy pequeños en muestras biológicas, vinculados a cambios en el patrón de píxeles de la imagen captada, proporcionado por actividades de dispersión de la luz dentro y fuera de las células. El BSL se ha aplicado en muchas áreas, desde la medicina (Aizu y Asakura, 1991) a la agricultura (Zdunek y col., 2014), en la diferenciación de microorganismos (Murialdo y col., 2012), en la quimiotaxis bacteriana (Murialdo y col., 2009; Nisenbaum y col., 2013), cambios en los alimentos físico químicos y microbiológicos entre otras por ser una Técnica No Destructiva (TND), lo cual la hace relevante en aplicaciones biológicas (Braga, 2017). La diversidad de aplicaciones está asociada a la diversidad de métodos existentes para iluminar, ensamblar las imágenes y proporcionar su análisis. De esta forma, siendo que apremia la demanda de herramientas de control que den resultados en tiempo real y fiables, es que el continuo estudio y aplicación de la técnica de BSL sobre matrices alimenticias resulta fundamental para respaldar la seguridad alimentaria y tomar decisiones en tiempo real que apoyen la misma.

La industria pesquera y los productos pesqueros no se encuentran exentos de formar parte de los brotes de enfermedades transmitidas por los alimentos (Lima dos Santos, 2012). La importancia del pescado como vehículo de ETA depende de varios factores, como la dieta de las personas y la forma tradicional de preparar la comida. Considerando esto, es que en el presente trabajo se estudió la aplicación de la técnica BSL para determinar de forma inocua y en tiempo real cambios en muestras de pescado debido a desarrollo microbiano y adulteraciones físico químicas.

2. Metodología y desarrollo

Se trabajó con especies pesqueras capturadas en el Mar Argentino como lo es la merluza (*Merluccius hubbsi*), así como también sobre especies pesqueras subexplotadas o de pesca acompañante como lo es la especie magra *Macrodon ancylodon*. Sobre la primera matriz se analizó el efecto del tratamiento de filetes con tripolifosfato de sodio (TPS), agente químico de grado alimentario que se utiliza en la industria pesquera para mejorar las propiedades de retención de agua durante etapas de congelado y descongelado. Sin embargo, en concentraciones altas en el músculo de pescado, hacen que aumente la retención de moléculas de agua, aumentando el peso de los filetes, siendo esto una práctica fraudulenta en la aplicación del aditivo. Respecto a los filetes de *Macrodon ancylodon* se estudiaron los cambios en el grado de frescura de filetes sin piel conservados en refrigeración ($5^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$).

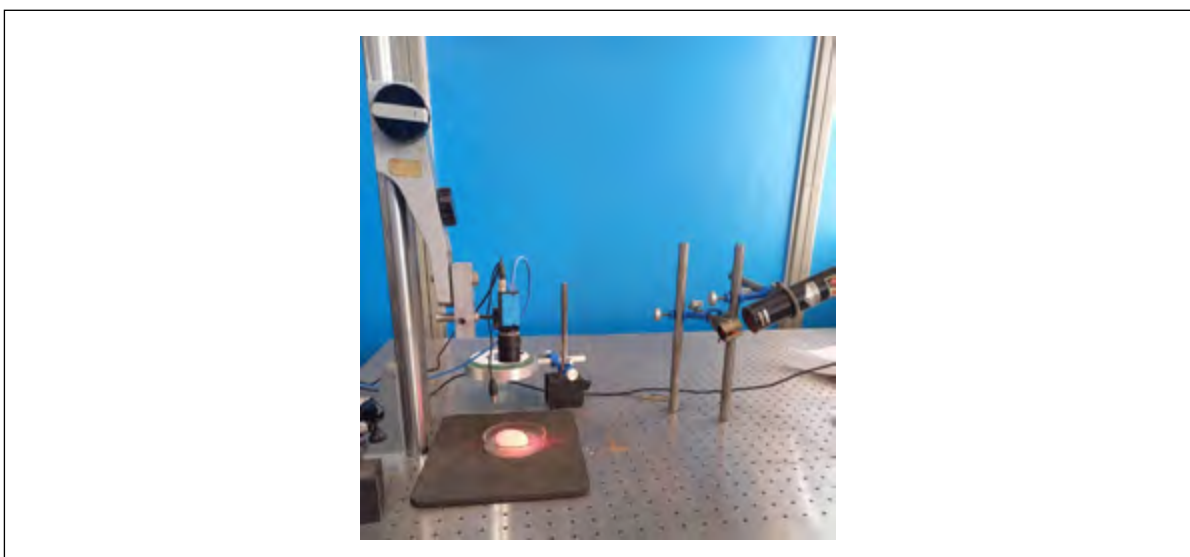
Se configuró un sistema de medición compuesto por una mesa antivibratoria, un láser de He-Ne (10 mW, $\lambda = 632,8$ nm) de baja potencia y una cámara CCD, para aplicar la técnica de análisis de láser biospeckle sobre los cambios en las muestras "in situ", exponiendo la muestra al láser. Se registraron secuencias de imágenes de 400 frames a un tiempo de exposición de 1/30 s. Las imágenes fueron procesadas identificando la intensidad de cada píxel y calculando de forma matemática descriptores que mejor se ajusten a los fenómenos estudiados. Las configuraciones de los sistemas de medición se representan en las figuras 1 y 2, siendo la primera la correspondiente a filetes de merluza en contacto con TPS y el segundo el banco armado para pescadilla a distintos tiempos de conservación en refrigeración.

Estas mediciones con el láser pueden correlacionarse con parámetros físico químicos como contenido de agua, color, textura, pH, así como microbiológicos.

FIGURA 1. Disposición del banco de BSL para medir cambios en filet de *Merluccius hubbsi* tratado con TPS



FIGURA 2. Disposición del banco de BSL para medir cambios en el filet de *Macrodon ancylodon* durante su tiempo de conservación en frío

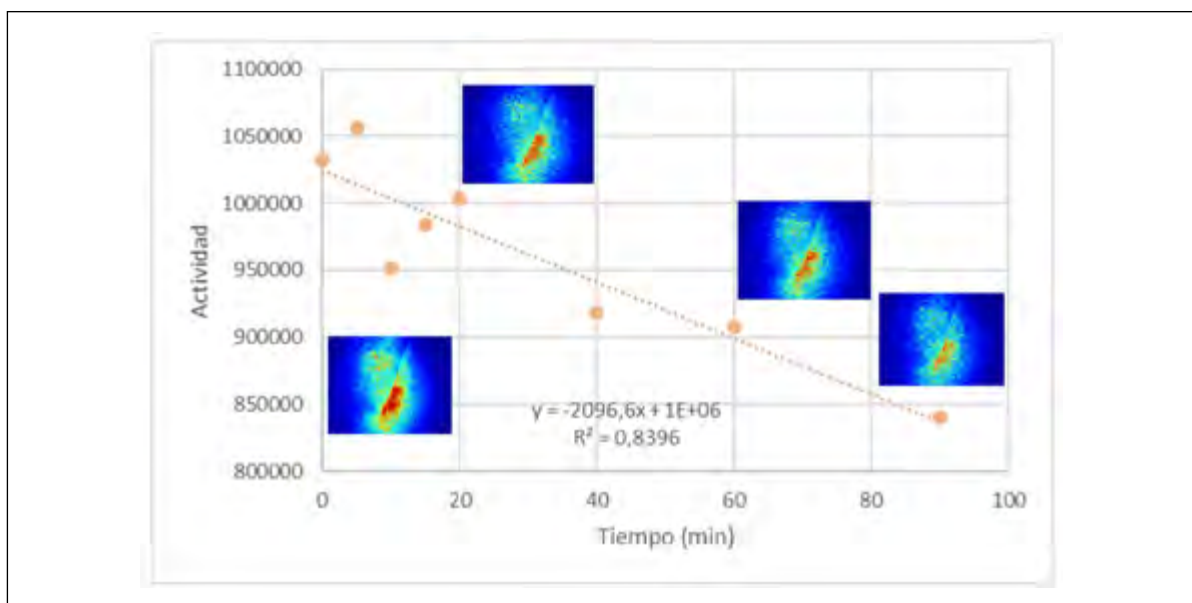


3. Resultados

La interacción de la luz láser con una matriz opaca como lo es el músculo de pescado, dado que no deja pasar luz a través de él, genera patrones de *speckle* que se relacionan con la actividad presente en la muestra. Dicha actividad es procesada a través de rutinas matemáticas programadas en Matlab, referidas a descriptores que permiten explicar el comportamiento de la muestra. Así es que, en el caso de los filetes de merluza tratados con TPS se utilizaron los descriptores Autocorrelación temporal (ACT) y Rango Dinámico (RD).

En la figura 3 se ven reflejadas las tendencias de dichos valores junto con las imágenes que corresponden al descriptor RD.

FIGURA 3. Análisis de actividad de muestras de filet sumergidas en TPS a distintos tiempos mediante descriptores cuantitativos y cualitativos



En la imagen puede visualizarse la tendencia a la disminución de la actividad, no solo de forma numérica sino a través de las imágenes que se obtienen al ser procesadas mediante el descriptor RD.

Los valores obtenidos a partir del análisis de la actividad del patrón *speckle* son correlacionados con los obtenidos a partir de técnicas fisicoquímicas tradicionales. En el caso de los filetes de merluza que pueden ser sometidos a prácticas de adulteración, la actividad del BSL generó una buena correlación con parámetros de textura como es la dureza medida mediante un texturómetro aplicando el análisis de TPA.

Respecto al estudio del efecto de conservación en condiciones de refrigeración, los análisis están en una etapa incipiente, sin embargo, los primeros resultados indicarían que la actividad puede correlacionarse con la carga microbiana de forma positiva, siendo que una mayor actividad del BSL sobre la superficie del filete se relaciona con una mayor carga microbiana.

4. Discusión y Análisis

La técnica de BSL ha resultado una herramienta de análisis que ha resultado propicia para las matrices de alimentos sobre las que estamos trabajando actualmente. La técnica de BSL detecta la actividad biológica en las muestras de forma instantánea, siendo eficaz para ello, sin embargo, dicha actividad no es un meca-

nismo biológico exacto. En principio se realizan suposiciones sobre lo que estaría detectando el BSL y es a partir de la correlación con resultados de técnicas tradicionales que se logra definir esa actividad biológica. En los estudios que estamos llevando a cabo actualmente la técnica BSL ha permitido detectar cambios en la textura de la matriz de un producto pesquero. Los valores obtenidos por el BSL fueron correlacionados con los resultados de las mediciones de contenido de agua, de color, pH y los parámetros que se obtienen a partir de la medición de perfil de textura (dureza, elasticidad, cohesividad, adhesividad, gomosidad y masticabilidad). Luego de estudiar las distintas correlaciones el mejor ajuste se obtuvo entre los valores de BSL, obtenidos a partir de las aplicaciones de distintos descriptores matemáticos y la dureza de las muestras de merluza. Existen antecedentes de este tipo de correlación en estudios que se han hecho sobre manzanas durante su etapa precosecha. Szymanska-Chargot et al. (2012) estimaron la actividad de BSL y la firmeza de manzanas individuales. Durante el período de precosecha, detectaron un aumento en la actividad de biospeckle, y también un aumento en el contenido de sólidos solubles y una ligera reducción en el contenido de ácido y almidón y la firmeza de las muestras. Los autores han logrado una correlación muy sólida entre la actividad del biospeckle y el contenido de sólidos solubles, el contenido de almidón y la firmeza, lo que revela que la técnica del biospeckle tiene un gran potencial para ser aplicada en las etapas previas a la cosecha para el análisis no destructivo de las propiedades mencionadas.

El desafío se presenta actualmente con los análisis realizados sobre la pescadilla, siendo que se propuso la hipótesis de que la actividad que está detectando el láser está relacionada con el desarrollo microbiano. Actualmente no hemos encontrado en bibliografía estudios que reflejen esa actividad en particular sobre una matriz alimenticia. Es el desafío que actualmente se nos presenta de manera continuar poniendo a punto la técnica y contribuir con la infinidad de aplicaciones y la versatilidad que la técnica de BSL posee.

5. Conclusión

Los estudios realizados y los que se están llevando a cabo actualmente reflejan el potencial de la técnica BSL para ser utilizada en la industria de los alimentos. Siendo que apremia la adquisición de este tipo de técnicas de análisis tanto en las líneas de producción, como en el control de materias primas, así como en las instituciones que controlan y promulgan la seguridad de los alimentos es que se debe continuar profundizando en los estudios realizados hasta el momento.

Los productos pesqueros, de acuerdo a lo presentado anteriormente resultan vulnerables no solo debido a su condición de perecibilidad sino también a la posibilidad de ser adulterados, lo que hace que la técnica BSL sea apropiada para el estudio y control de los mismos. Continuando con esta línea de investigación es que se generará un aporte significativo a la obtención de resultados en tiempo real ante riesgos de brotes debidos a ETAs y lo que la seguridad alimentaria comprende.

Referencias bibliográficas

- Aizu, Y. y Asakura, T. (1991). Bio-speckle phenomena and their application to the evaluation of blood flow. *Optics & Laser Technology*, 23(4), 205-219. [https://doi.org/10.1016/0030-3992\(91\)90085-3](https://doi.org/10.1016/0030-3992(91)90085-3).
- Braga, R. (2017). Challenges to apply the biospeckle laser technique in the field. *Chemical Engineering Transactions*, 58, 577–582. <https://doi.org/10.3303/CET1758097>
- Lima dos santos, C. (2012). Enfermedades transmitidas por pescado ¿Qué pasa en el Sur? *Infopesac Internacional*, (51), 11-15. <https://www.infopesca.org/sites/default/files/complemento/articulossel/51/N%-C2%BA%2051%20Enfermedades%20transmitidas.pdf>

- Murialdo, S. E.; Sendra, G. H.; Passoni L. I.; Arizaga R.; Gonzalez J. F.; Rabal H. y Trivi M. (2009). Analysis of bacterial chemotactic response using dynamic laser speckle. *Journal of Biomedical Optics*, 14(6), 064015.
- Murialdo, S. E.; Passoni, L.; Guzman, M. N.; Sendra, G. H.; Rabal, H.; Trivi, M. y Gonzalez, J. F. (2012). Discrimination of motile bacteria from filamentous fungi using dynamic speckle. *Journal of Biomedical Optics*, 17, 056011. 10.1117/1.JBO.17.5.056011
- Nisenbaum, M.; Gonzálo Hernán, S.; Cerdá Gilbert, G. A.; Scagliola, M.; Froilán González, J. y Murialdo, S. E. (2013). Hydrocarbon biodegradation and dynamic laser speckle for detecting chemotactic responses at low bacterial concentration. *Journal of Environmental Sciences*, 25(3), 613-625. [https://doi.org/10.1016/S1001-0742\(12\)60020-5](https://doi.org/10.1016/S1001-0742(12)60020-5)
- Rabal, H. J. y Braga, R. A. (2008). *Dynamic laser speckle and applications*. CRC/Taylor and Francis.
- Zdunek, A.; Adamiak, A.; Pieczywek, P. M. y Kurenda, A. (2014). The biospeckle method for the investigation of agricultural crops: a review. *Opt. Lasers Eng.*, 52, 276–285, <https://doi.org/10.1016/j.optlas-eng.2013.06.017>