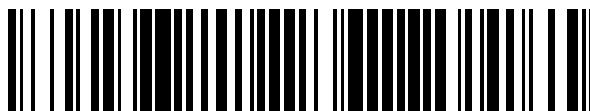


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 953 617**

51 Int. Cl.:

G01N 21/69 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 1/40 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.07.2020** **PCT/FR2020/051209**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.01.2021** **WO21009438**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.07.2020** **E 20750325 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2023** **EP 3983783**

54 Título: **Procedimiento para la detección de escatol en una muestra de tejido de adiposo de cerdo**

30 Prioridad:

12.07.2019 FR 1907882

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

14.11.2023

73 Titular/es:

**COMMISSARIAT À L'ENERGIE ATOMIQUE ET
AUX ENERGIES ALTERNATIVES (100.0%)
Bâtiment Le Ponant, 25 rue Leblanc
75015 Paris, FR**

72 Inventor/es:

**SCORSONE, EMMANUEL y
HAMEL, MATTHIEU**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 953 617 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para la detección de escatol en una muestra de tejido de adiposo de cerdo

Área técnica

5 La invención se relaciona con el campo de la industria alimentaria y, en particular, con el campo de la producción y distribución de carne de cerdo.

Más concretamente, la invención se refiere a un procedimiento para detectar la presencia de escatol, o 3-metilindol (3-MIH), en una muestra de tejido adiposo porcino y, en caso de estar presente, determinar su contenido, con muy alta sensibilidad y muy alta especificidad con respecto a otros compuestos que probablemente también estén presentes en el tejido adiposo del cerdo.

10 Siendo el escatol, junto con la androsterona, responsable de un olor fuerte y desagradable, llamado olor a verraco, que se libera durante la cocción de la carne de cerdos machos enteros, la invención es, en primer lugar, probablemente una implementación para la clasificación de canales de cerdos machos enteros en mataderos con el fin de aislar aquellos cuya carne tenga olor a verraco y orientarlos hacia un circuito de procesamiento adecuado.

15 También es probable que se implemente como una herramienta de investigación, en particular para estudiar los factores que influyen en la producción de escatol en el tejido adiposo de los cerdos machos enteros con miras a desarrollar procedimientos para prevenir o reducir el olor a verraco, por ejemplo mediante selección genética. o por modificación de las condiciones de cría (alimentación, condiciones de alojamiento, composición de grupos de animales en términos de edad, sexo, etc.).

estado del arte previo

20 El olor a verraco resulta principalmente de una acumulación de escatol y androsterona y, en menor medida, de indol en el tejido adiposo - o tejido adiposo – o tejido graso - de cerdos machos enteros, es decir, no castrados.

Este olor, que se libera durante la cocción de la carne de cerdo, generalmente es considerado desagradable por los consumidores.

25 Históricamente, para prevenir el olor a verraco, los cerdos machos eran castrados a una edad anterior a la madurez sexual.

Sin embargo, durante los últimos diez años, razones éticas, de bienestar animal y también económicas han llevado a varios criadores a dejar de castrar cerdos machos con el apoyo de la Unión Europea.

Por tanto, es necesario disponer de un procedimiento para detectar de forma fiable, en las líneas de sacrificio, los canales de cerdos machos enteros cuya carne tenga olor a verraco.

30 La clasificación de canales a partir de una detección de escatol en el matadero plantea muchas dificultades.

Las razones de estas dificultades son múltiples.

35 En primer lugar, la detección de escatol en los tejidos grasos de los cerdos requiere una técnica de detección extremadamente sensible. De hecho, el umbral de rechazo de la carne de cerdo por parte del consumidor está fijado en aproximadamente 0,2 µg de escatol por gramo de tejido adiposo. En términos analíticos, esto significa que, en el caso por ejemplo de una extracción completa del escatol presente en un gramo de tejido adiposo y concentrado en un ml de un solvente apropiado, el objetivo es poder detectar un umbral de concentración de escatol de 1,53 µmol/l en este ml de solución. Asimismo, tras el calentamiento del tejido adiposo y la volatilización de las moléculas de escatol, la concentración de escatol en fase vapor es del orden de algunas decenas de ppb, lo que no facilita la medida de escatol en tal fase.

40 Otra dificultad es la de la selectividad de la detección de escatol. De hecho, dado que el escatol es un compuesto de indol resultante de la degradación del triptófano por las bacterias intestinales, está presente en la grasa de cerdo junto con otros compuestos de indólicos como el indol, que probablemente interfieran en la detección del escatol y provoquen falsos positivos.

Finalmente, agregue a esto:

45 - restricciones de velocidad, debiendo realizarse la detección de escatol en varios cientos de canales por día para la mayoría de los mataderos;

- limitaciones relacionadas con las condiciones que prevalecen en los mataderos, que son ambientes no controlados con grandes variaciones de temperatura a lo largo del año y alta humedad;

50 - restricciones de costes, la detección de escatol no debería tener un impacto significativo en el precio de venta posterior de la carne de cerdo;

- una variabilidad en la composición del tejido adiposo extraído de los canales (contenido de agua, contenido de sangre, etc.); y

un problema de trazabilidad de las muestras analizadas en el matadero.

Se conocen procedimientos para detectar escatol.

5 Los procesos más comunes utilizan cromatografía de fase líquida de alta resolución o cromatografía de fase gaseosa (ver, por ejemplo, K. Verplanken et al, Revista de cromatografía A 2016, 1462, 124-133). Estos procedimientos no son adecuados para su uso en mataderos porque requieren largos tiempos de análisis, operadores altamente calificados, equipos y consumibles costosos y un alto nivel de mantenimiento. Además, dada la complejidad de la matriz grasa, generalmente tienen un nivel de selectividad insuficiente.

10 Recientemente, Dinamarca anunció que cuenta con un procedimiento automatizado basado en espectrometría de masas tras un adecuado procesamiento de las muestras. Pero este procedimiento también es costoso y probablemente no muy adecuado para las condiciones de uso en los mataderos. También adolece de un problema de trazabilidad de las muestras que se analizan en serie en el espectrómetro.

15 Se han estudiado procedimientos inmunológicos, en particular basados en un ensayo fluoroinmunológico que utiliza europio (III) como marcador fluorescente (ver., por ejemplo, MP Aguilar-Caballeros et al, Analytica Chimica Acta 2002, 460, 271-277) pero estos estudios siguen siendo marginales debido a la falta de disponibilidad de anticuerpos específicos.

20 Se ha propuesto un procedimiento para la detección colorimétrica de escatol utilizando el reactivo de Ehrlich (ver. la solicitud internacional WO 83/00928). Este proceso, que es simple de implementar y económico, se utilizó en los mataderos daneses en la década de 1990. Desafortunadamente, tuvo que abandonarse debido a la falta de selectividad del reactivo de Ehrlich, en particular hacia el indol, y por tanto la falta de fiabilidad de los resultados.

25 También se han propuesto procedimientos electroquímicos para la detección de escatol (ver., por ejemplo, la solicitud de patente Europea 2.966.441). Estos procedimientos consisten en medir la corriente de oxidación del escatol en la superficie de un electrodo, la mayoría de las veces de carbono (diamante o de carbono vítreo). Estos procedimientos tienen una sensibilidad muy alta pero adolecen de un importante problema de selectividad debido, también a la complejidad de la matriz grasa.

30 Más recientemente, se han propuesto procedimientos que utilizan la espectroscopia Raman (ver, por ejemplo, X. Liu et al, Meat Science 2016, 116, 133-139). Estos procedimientos adoptan un enfoque integral de análisis simultáneo de androstenona y escatol en tejido adiposo. Sin embargo, los resultados presentados hasta ahora muestran un número inaceptable de falsos positivos y falsos negativos.

35 Finalmente, se han desarrollado narices electrónicas (ver, por ejemplo, JS Vestergaard et al, Meat Science 2006, 74, 564-577). El funcionamiento de estas narices electrónicas se basa en el uso de una red de sensores de reacción cruzada que proporcionan una "huella digital química" global de la muestra a analizar. Aunque potencialmente adecuadas para mediciones en mataderos, las narices electrónicas presentan actualmente un importante problema de selectividad. Además, los sensores que se utilizan en las narices electrónicas suelen ser sensibles a la humedad, que se convierte en una de las principales fuentes de interferencia.

40 Debido a la ausencia de un procedimiento físico-químico para la detección del escatol que sea al mismo tiempo sensible, selectivo y apto para su uso en un matadero, la mayoría de los mataderos de cerdos machos enteros utilizan actualmente un panel de "narices humanas". El protocolo consiste en calentar una muestra de tejido adiposo con un soldador o dispositivo equivalente, la mayoría de las veces directamente sobre los canales, y oler los compuestos olorosos liberados por operadores capacitados específicamente en esta tarea. Este procedimiento de detección es costoso y restrictivo, desagradable para los operadores y sólo efectivo cuando se debe clasificar un pequeño número de cadáveres, ya que los receptores olfativos de los operadores se saturan rápidamente. Además, este procedimiento adolece de una gran variabilidad en los resultados según el operador, con una tasa de verdaderos positivos de solo el

45 70%.

En vista de lo anterior, los inventores se han fijado como objetivo proporcionar un proceso físico-químico que permita detectar la presencia de escatol en muestras de tejido adiposo de cerdos con alta sensibilidad y alta especificidad de manera que conduzca a resultados extremadamente fiables.

50 También se han fijado el objetivo de que este procedimiento también haga posible, si está presente escatol en las muestras de tejido adiposo, ensayar este escatol si se desea.

También se han fijado como objetivo que la implantación de este proceso pueda llevarse a cabo en los mataderos, independientemente de las condiciones de temperatura y humedad que allí prevalezcan, y que esta implantación sea lo suficientemente sencilla y rápida para ser compatible con las limitaciones de clasificación de cadáveres a las que los mataderos están sujetos.

También se han fijado como meta que la implementación de este proceso tenga un coste que no impacte significativamente en el precio de venta posterior de la carne de cerdo.

También se han fijado como objetivo que este proceso permita la trazabilidad de las muestras de tejido adiposo de los cerdos analizados.

5 Divulgación de la invención

Todos estos objetos se consiguen con la invención que propone, en primer lugar, un procedimiento para detectar la presencia de escatol en una muestra de tejido adiposo de cerdos, procedimiento que se caracteriza porque comprende al menos las etapas que consisten en:

a) someter un extracto orgánico de la muestra de tejido adiposo a una reacción de electroquimioluminiscencia;

10 b) medir la intensidad de luminiscencia durante la etapa a) y, si la intensidad de luminiscencia medida supera un valor umbral predeterminado, deducir la presencia de escatol en la muestra de tejido adiposo.

Así, la detección de escatol por el procedimiento de la invención se basa en la técnica de electroquimioluminiscencia.

Se recordará que la electroquimioluminiscencia (o ECL), también denominada quimioluminiscencia electrogenerada, es una técnica que consiste en iniciar un proceso de luminiscencia mediante una transferencia de electrones que se produce directamente en la superficie de un electrodo de trabajo.

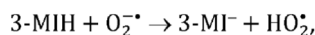
15

Existen diferentes mecanismos de ECL.

En el contexto de la invención, se prefiere que el proceso de luminiscencia se inicie mediante la aplicación de un potencial catódico a un electrodo de trabajo sumergido en el extracto orgánico para inducir la formación de iones superóxido ($O_2^{\bullet -}$) por reducción del dioxígeno disuelto en este extracto.

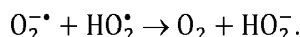
20 En cuyo caso, si está presente escatol en el extracto orgánico, se monitorea la reducción de oxígeno a iones superóxido:

- de la formación de la base conjugada de escatol según la reacción:



después

25 - la formación de radicales hidropéroxido dependiendo de la reacción:



La posterior aplicación de un potencial anódico al electrodo de trabajo permite entonces oxidar la base conjugada de escatol que, una vez oxidada, reaccionará con los radicales hidropéroxido para dar lugar a la formación de N-(2-acetilfenil) formamida en el estado excitado, que, al desexcitarse (o, en otras palabras, al volver a su estado fundamental), emite una luminiscencia medible.

30

Cabe señalar que este mecanismo ECL de escatol ha sido estudiado y descrito por T. Okajima y T. Ohsaka (ver. Journal of Electroanalytical Chemistry 2002, 523, 34-39). Sin embargo, este estudio se llevó a cabo en un contexto puramente teórico, con el objetivo de comprender los procesos químicos involucrados en la ECL de escatol en solución en acetonitrilo pero sin que se prevea ninguna aplicación práctica de estos procesos y, en particular, una aplicación a la detección de escatol en tejidos adiposos de cerdos.

35

En vista de lo anterior, se prefiere que el extracto orgánico cumpla con las siguientes condiciones:

- incluir un disolvente orgánico aprótico;

- ser anhidro, es decir comprender como máximo un 1% en peso de agua; Y

- ser eléctricamente conductor, lo que es posible por a la presencia en este extracto de una sal básica.

40 Para ello, la invención propone preparar previamente el extracto orgánico mediante:

i) separación de la grasa presente en la muestra de tejido adiposo de los elementos no grasos también presentes en la muestra de tejido adiposo, tales como residuos de piel, fibras musculares, etc ;

ii) deshidratación de la grasa presente en la muestra de tejido adiposo, sabiendo que el tejido de cerdo comprende naturalmente alrededor del 15% en masa de agua;

iii) disolver la grasa obtenida al final de la etapa ii) en un disolvente orgánico aprótico para obtener una solución orgánica y calentar la solución orgánica por un tiempo suficiente para permitir la extracción del escatol si éste está presente;

iv) desengrasar la solución orgánica obtenida al final de la etapa iii); y

5 v) añadir una sal básica anhidra a la solución orgánica obtenida al final de la etapa iv);

las etapas i) y ii) pudiendo realizarse de forma sucesiva o simultánea.

De acuerdo con la invención, las etapas i) y ii) se realizan preferiblemente simultáneamente.

10 Para ello, es posible, por ejemplo, calentar la muestra de tejido adiposo a una temperatura al menos igual a 100°C y, preferentemente, entre 100°C y 150°C, y en un recipiente abierto de manera que el agua presente en la muestra de tejido adiposo pueda ser evacuada en forma de vapor de agua. Esto permite licuar la grasa presente en la muestra de tejido adiposo y, por tanto, facilitar su posterior separación de los elementos no grasos también presentes en esta muestra que, a su vez, permanecerán en estado sólido, y al mismo tiempo, para deshidratarlo. Esto también permite desnaturalizar las proteínas presentes en la muestra de tejido adiposo que luego se precipitarán durante la etapa iii), lo que contribuye a reducir la cantidad de especies electroactivas que estarán presentes en el extracto orgánico.

15 Como variante, también es posible someter la muestra de tejido adiposo a un calentamiento a una temperatura inferior a 100°C con tracción al vacío.

20 La duración del calentamiento se elegirá en particular en función de la masa de la muestra de tejido adiposo, la forma, precortada o no, en que se presenta y, si es precortada, el tamaño de los trozos de la muestra, la configuración del recipiente en el que se realiza el calentamiento, el modo de calentamiento (sin o con microondas por ejemplo), la utilización o no de tracción y la temperatura elegida para realizar el calentamiento.

En la etapa iii), la grasa obtenida al final de la etapa anterior o de las dos etapas anteriores (si estas se realizan simultáneamente) se disuelve en un disolvente orgánico aprótico y se calienta la solución orgánica resultante.

25 En lo anterior y en lo que sigue, el término “aprótico”, cuando se aplica a un disolvente orgánico, se toma en su acepción habitual, a saber, que designa un disolvente orgánico cuya molécula está libre del átomo de ácido de hidrogeno, es decir, unido a un heteroátomo como un átomo de nitrógeno, oxígeno o azufre.

De acuerdo con la invención, el disolvente aprótico es ventajosamente un disolvente aprótico polar, es decir de momento dipolar distinto de cero, como el acetonitrilo, el dimetilsulfóxido, el carbonato de propileno o la γ -butirolactona, dándose preferentemente al acetonitrilo.

30 El calentamiento de la etapa iii) se realiza ventajosamente, con agitación, a una temperatura de 50°C a 80°C, durante 1 minuto a 10 minutos, y esto, en un recipiente cerrado para evitar que se evapore el disolvente orgánico aprótico.

35 La propia etapa iv) se realiza ventajosamente sometiendo la solución orgánica obtenida al final de la etapa iii) a una centrifugación para romper la emulsión formada durante la etapa iii) por agitación, manteniendo luego esta solución orgánica a una temperatura inferior o igual a 4°C pero superior a la temperatura de solidificación del disolvente orgánico aprótico para congelar la parte grasa de la solución orgánica pero sin que solidifique el disolvente orgánico, y luego eliminar la parte grasa que ha fraguado.

40 La sal base, que se añade a la solución orgánica obtenida al final de la etapa iv), puede elegirse entre un gran número de sales, entendiéndose que debe ser, por un lado, soluble en el disolvente orgánico aprótico, y por otro lado, química y electroquímicamente inerte para no perturbar la reacción de ECL, ni inducir una reacción indeseable con el escatol. Como bien saben los electroquímicos, esta sal puede ser en particular un tetrafluoroborato, un hexafluorofosfato o un perclorato de tetraalquilamonio en el que el grupo alquilo comprende de 1 a 6 átomos de carbono, como el tetrafluoroborato de tetrabutilamonio o el hexafluorofosfato de tetrabutilamonio, teniendo este tipo de sal, de hecho, una notable estabilidad en un medio orgánico.

45 Además, la sal de base se añade a la solución orgánica obtenida al final de la etapa iv) en una cantidad tal que su concentración en el extracto orgánico esté típicamente comprendida entre 0,01 mol/l y 1 mol/l, preferentemente entre 0,05 mol/l y 0,5 mol/L, y, mejor aún, igual a 0,1 mol/l.

De acuerdo con la invención, es posible añadir a la solución orgánica obtenida, ya sea al final de la etapa iii), de la etapa iv) y/o de la etapa v), un agente secante tal como una sal higroscópica del tipo sulfato de sodio o de magnesio anhidro, o un tamiz molecular (3 o 4 angstroms) para completar la deshidratación realizada en la etapa ii).

50 En un modo de realización preferida del proceso de la invención, el extracto orgánico comprende además una base fuerte, en cuyo caso esta base fuerte se adiciona preferentemente a la solución orgánica obtenida al final de la etapa v).

La presencia de una base fuerte en el extracto orgánico permite, en primer lugar, desprotonar los ácidos orgánicos presentes en este extracto. De hecho, como se mostrará más adelante, el escatol se convierte en un aceptor de protones en varias etapas de la reacción ECL. Sin embargo, cualquier extracto orgánico preparado a partir de una muestra de tejido adiposo porcino contiene un determinado número de compuestos donadores de protones y, en particular, ácidos orgánicos, que son esencialmente ácidos grasos solubles en disolventes orgánicos que requieren operaciones de desengrase como la realizada en la etapa iv) no permiten eliminar. Por tanto, es deseable neutralizar estos compuestos, lo que es posible gracias a la presencia de una base fuerte en el extracto orgánico.

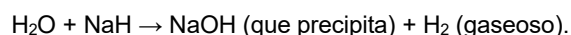
La presencia de una base fuerte en el extracto orgánico también permite asegurar la desaparición de cualquier rastro de agua residual en el extracto orgánico.

Por base fuerte se entiende, en el contexto de la invención, una base que puede desprotonar agua.

Esta base puede ser en particular una base orgánica como la trietilamina, el imidazol, la histidina o cualquier otra amina terciaria, un alcoholato o una amida de un metal alcalino como el alcoholato o la amida de sodio, un hidruro de un metal alcalino o alcalinotérreo como hidruro de sodio, hidruro de litio, hidruro de potasio o hidruro de rubidio, un nitrato de un metal alcalino o alcalinotérreo tal como nitrato de sodio.

Se da preferencia a una base fuerte con el pKa más alto posible.

Una base fuerte particularmente preferida es el hidruro de sodio que, además de tener un ácido conjugado con un alto pKa, tiene la ventaja de ser económico, fácil de obtener y cuya reacción con las especies ácidas conduce a su equivalente de sodio - que precipita y por lo tanto puede ser eliminado - con una liberación en forma gaseosa del hidrógeno presente en el extracto orgánico. A modo de ejemplo, la reacción del hidruro de sodio con el agua aún potencialmente presente en el extracto orgánico es la siguiente:



Como es sabido, la reacción de ECL se lleva a cabo preferentemente en una celda electroquímica, designando aquí los términos "celda electroquímica" al conjunto formado por un recipiente tipo cuenco o similar, en el que se coloca el extracto orgánico para la reacción de ECL, y al menos dos electrodos, a saber, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo.

Como se indicó anteriormente, la reacción ECL que se favorece en el contexto de la invención comprende la aplicación de un potencial catódico al electrodo de trabajo de la celda electroquímica para inducir la formación de iones superóxido, seguido de la aplicación de un potencial anódico a este mismo electrodo para inducir la oxidación de la base conjugada del escatol si éste está presente en el extracto orgánico.

Esto se puede realizar según diferentes protocolos electroquímicos y, en particular, mediante:

- una exploración de potencial, en cuyo caso se aplica una exploración al electrodo de trabajo hacia los potenciales negativos y luego una exploración hacia los potenciales positivos;

- un salto de potencial, en cuyo caso se aplica un potencial negativo constante al electrodo de trabajo, durante un tiempo suficiente para saturar la superficie de este electrodo con iones superóxido, luego un potencial positivo constante, también durante un tiempo suficiente para saturar la superficie del electrodo de trabajo con escatol oxidado;

- por una serie de pulsos de potencial anódico y catódico alternativamente.

Es evidente que los parámetros electroquímicos deben adaptarse, en particular según la configuración de la celda electroquímica utilizada, la naturaleza del electrodo de trabajo y del contraelectrodo utilizado, es decir, el material del electrodo que constituye estos electrodos, de la forma en que se preparó el extracto orgánico y, por tanto, de su composición y de su viscosidad. Si se utiliza un electrodo de referencia o pseudo-referencia, los parámetros electroquímicos también deben adaptarse según la naturaleza de este electrodo.

A modo de ejemplo, para extractos orgánicos preparados como se ha descrito anteriormente y celdas electroquímicas equipadas con un electrodo de trabajo y un contraelectrodo de diamante dopado con boro, así como un pseudoelectrodo de referencia en platino, se han obtenido excelentes resultados aplicando al electrodo de trabajo:

- en el caso de un escaneo de potencial: un escaneo que va desde 0 V hasta un potencial negativo comprendido entre -1,5 V y -2,5 V (*contra*. Pt), por ejemplo -2 V (*contra* Pt), luego un escaneo de este potencial negativo a un potencial positivo mayor o igual a +0,5 V (*contra* Pt), por ejemplo +0,8 V (*contra* Pt), con una velocidad de exploración constante comprendida entre 10 mV/s y 100 mV/s, por ejemplo de 50 mV/s;

- en caso de salto de potencial: un potencial negativo constante inferior a -1,5 V (*contra*. Pt), por ejemplo -2 V (*contra*. Pt), durante 0,1 segundos a 45 segundos, luego un potencial positivo constante superior a 0,5 V (*contra*. Pt), por ejemplo de +1 V *contra*. Pt, durante 10 segundos a 30 segundos; y

- en caso de pulsos de potencial anódico y catódico alternativamente: un potencial negativo inferior a -1,5 V (*contra. Pt*), por ejemplo -2 V (*contra. Pt*) seguido de un potencial positivo superior a 0,5 V (*contra. Pt*), por ejemplo + 1 V (*contra. Pt*), a una frecuencia que va de 0,5 hercios a 5 hercios, por ejemplo 1 hercio.

La elección del recipiente para la celda electroquímica no es crítica en sí misma.

- 5 Sin embargo, es deseable que este recipiente sea de un material resistente a los disolventes orgánicos, a los ambientes salinos y, si se utiliza una base fuerte, a los ambientes alcalinos.

Además, este recipiente debe ser de un material ópticamente transparente en el rango de longitudes de onda de emisión de luminiscencia o debe tener al menos una pared de un material que presente tal transparencia si la detección de los fotones emitidos se produce mediante un detector óptico. situado frente a una de sus paredes.

- 10 La elección de los electrodos de la celda electrolítica tampoco es crítica.

Si la reacción de ECL se basa en la formación de iones superóxido, entonces el electrodo de trabajo puede estar hecho de cualquier material de electrodo que permita la formación de tales iones como el carbono (grafito, carbono vítreo, diamante dopado, por ejemplo, boro o nitrógeno, etc), un metal noble (oro, platino, paladio, iridio, etc.) o una aleación de metales nobles.

- 15 El contraelectrodo puede estar hecho de un material de electrodo diferente o del mismo material de electrodo que el que constituye el electrodo de trabajo.

En el contexto de la invención, se prefiere que el electrodo de trabajo y el contraelectrodo estén hechos de diamante dopado, en particular con boro, porque este material es altamente conductor, tiene una estabilidad muy alta, una resiliencia natural que se ensucia debido a la alta densidad atómica del diamante. Esta resiliencia al ensuciamiento es particularmente interesante dado que el extracto orgánico puede contener una cierta cantidad de compuestos derivados del tejido adiposo porcino, incluidos los ácidos grasos, que pueden ensuciar rápidamente la superficie de los electrodos. Además, en caso de ensuciamiento, este tipo de electrodos se pueden limpiar fácilmente electroquímicamente, por ejemplo mediante el procedimiento descrito en la patente. Estados Unidos 9,121,107. Finalmente, este tipo de electrodo tiene una gran ventana de potencial que permite aplicar altos potenciales sin electrolizar el disolvente presente en el extracto orgánico.

- 20 Si se utiliza un electrodo de referencia, éste puede ser en particular un electrodo de calomelano saturado (ECS) o un electrodo de cloruro de plata (Ag/AgCl), posiblemente con doble unión, como se usa tradicionalmente en electroquímica. Sin embargo, en el contexto de la invención, se prefiere utilizar un pseudoelectrodo de referencia hecho de un metal noble como el platino porque este tipo de electrodo también se puede limpiar fácilmente, por ejemplo, pasándolo por una llama.

- 30 Ventajosamente, la celda electroquímica (es decir, el recipiente y los electrodos) están fabricados con materiales de bajo coste (recipiente de plástico, electrodos de pasta de carbón, etc.) para que sean desechables, lo que permite, por un lado, superar los problemas de ensuciamiento de los electrodos y, por otro lado, asegurar la trazabilidad de las muestras de tejido adiposo analizadas, por ejemplo referenciando cada celda electroquímica con respecto a un canal de cerdo.

En cuanto al detector óptico, puede ser un fotomultiplicador acoplado a un fotocátodo en bialcalino, superbialcalino o ultrabialcalino, un fotodiodo de avalancha, un fotomultiplicador con fotocátodo de silicio, un espectrómetro y, en particular, un espectrofluorímetro, un detector con un sensor CCD (de "Dispositivo acoplado cargado"), un detector con un sensor CMOS (de "Semiconductor de óxido de metal complementario"), etc.

- 40 Según la invención, el valor umbral es preferiblemente al menos igual al 150% del valor medio de la intensidad de la luminiscencia correspondiente al ruido de fondo del detector óptico.

Como se indicó anteriormente, el procedimiento de la invención también permite, si el escatol está presente en el extracto orgánico, determinar su contenido.

- 45 Así, si en la etapa b) se dedujo la presencia de escatol, ventajosamente el procedimiento comprende además una cuantificación del escatol presente en el extracto orgánico por comparación de la intensidad máxima de luminiscencia medida durante la etapa b) con una curva de calibración, siendo esta cuantificación llevada a cabo durante la etapa b) o después de la etapa b).

El procedimiento de la invención permite detectar la presencia de escatol en tejido adiposo de cerdo con gran sensibilidad ya que se ha obtenido un límite de detección alrededor de 20 nmol/l de escatol.

- 50 El umbral de rechazo de la carne de cerdo por parte del consumidor se fija en aproximadamente a 0,2 µg de escatol por gramo de tejido adiposo, o grasa cruda, lo que corresponde, suponiendo una extracción completa del escatol presente en 1 g de tejido adiposo en 1 ml de un disolvente orgánico a una concentración de escatol de 1,53 µmol/l.

Como resultado, el límite de detección de escatol por el procedimiento de la invención está alrededor de 3 órdenes de magnitud por debajo de la concentración de escatol a detectar.

Además, como demuestran los experimentos que se describen a continuación, la detección de escatol por el procedimiento de la invención es muy específica ya que otros compuestos de indólicos presentes en los tejidos adiposos de los cerdos, como el indol, no se detectan con este proceso.

La ausencia de excitación fotónica (por UV, luz blanca filtrada u otra) en la celda de electrólisis impide cualquier fluorescencia espontánea de los posibles interferentes y permite así obtener una relación señal/ruido muy elevada.

Además, el procedimiento de la invención es robusto, tanto por el equipamiento que requiere como por su puesta en práctica, sencilla, rápida y económica.

Por lo tanto, es particularmente adecuado para su uso en un matadero.

Asimismo, la invención también se refiere a un procedimiento para la clasificación de canales de cerdos machos enteros, que se caracteriza porque comprende la implementación de un procedimiento para la detección de escatol como se ha definido anteriormente.

Otras características y ventajas de la invención se desprenderán de la descripción adicional que sigue, que se refiere a experimentos que permitieron validar la invención y que se da con referencia a las figuras adjuntas.

No hace falta decir, sin embargo, que esta descripción adicional se proporciona únicamente a modo de ilustración del objeto de la invención y en ningún caso debe interpretarse como una limitación de este objeto.

Breve descripción de las figuras.

La figura 1 representa esquemáticamente una primera celda electroquímica que ha sido utilizada en los experimentos descritos a continuación, vista en sección.

La figura 2 representa esquemáticamente una segunda celda electroquímica que ha sido utilizada en los experimentos que se describen a continuación, vista de 3/4.

La figura 3 ilustra el voltamograma obtenido sometiendo un extracto orgánico de una muestra de tejido adiposo de cerdo no contaminado con escatol, al que se ha adicionado escatol sintético, a una reacción ECL por barrido de potencial.

La Figura 4 ilustra la luminiscencia medida simultáneamente con el registro del voltamograma que se muestra en la Figura 3.

La figura 5 ilustra el cronoamperograma obtenido sometiendo un extracto orgánico de una muestra de tejido adiposo de cerdo no contaminado con escatol, al que se ha adicionado escatol sintético, a una reacción ECL por salto de potencial.

La Figura 6 ilustra la luminiscencia medida simultáneamente con el registro del cronoamperograma que se muestra en la Figura 5.

La Figura 7 ilustra la respuesta actual obtenida al someter una solución que comprende escatol sintético y hexafluorofosfato de tetrabutilamonio en acetonitrilo a una reacción ECL aplicando una repetición de pulsos de voltaje alternativamente catódicos y anódicos.

La figura 8 ilustra la luminiscencia medida simultáneamente con el registro de respuesta actual que se muestra en la figura 7.

La figura 9 ilustra la luminiscencia medida al someter una solución que comprende escatol sintético y hexafluorofosfato de tetrabutilamonio en acetonitrilo a una reacción ECL mediante barrido de potencial.

La Figura 10 ilustra la luminiscencia medida al someter una solución que comprende indol y hexafluorofosfato de tetrabutilamonio en acetonitrilo a una reacción ECL mediante barrido de potencial.

La figura 11 ilustra la luminiscencia medida al someter un extracto orgánico de una muestra de tejido adiposo de cerdo contaminado con escatol a una reacción ECL por salto de potencial.

La figura 12 ilustra la luminiscencia medida al someter un extracto orgánico de una muestra de tejido adiposo de cerdo no contaminado con escatol a una reacción ECL por salto de potencial.

La Figura 13 ilustra dos curvas estándar producidas al someter extractos orgánicos de muestras de tejido adiposo de cerdo no contaminado con escatol pero que se han suplementado con escatol sintético a un nivel de 0,1 $\mu\text{mol/l}$ a 5 $\mu\text{mol/l}$ (curva 1) y soluciones que comprenden 0,1 $\mu\text{mol/l}$ a 5 $\mu\text{mol/l}$ de escatol sintético y hexafluorofosfato de tetrabutilamonio en acetonitrilo (curva 2) a una reacción ECL por salto de potencial.

En la figura 3, el eje de ordenadas corresponde a la intensidad, indicada como I y expresada en microamperios (μA), de la corriente medida en el electrodo de trabajo, mientras que el eje de abscisas corresponde al potencial, indicado como V y expresado en voltios (V). relativo al potencial del electrodo de referencia, aplicado al electrodo de trabajo.

- 5 En las figuras 5 y 7, el eje de ordenadas corresponde a la intensidad, denotada por I y expresada en miliamperios (mA) en la figura 5 y en microamperios (μA) en la figura 7, de la corriente medida en el electrodo de trabajo mientras el eje de abscisas corresponde al tiempo, denotado t y expresado en segundos (s).

En las figuras 4, 6, 8 a 12, el eje de ordenadas corresponde al número de conteos emitidos, denotado N_e y expresado en unidades arbitrarias (au), mientras que el eje de abscisas corresponde al tiempo, denotado t y expresado en segundos (s).

- 10 En la Figura 13, el eje de ordenadas corresponde al número de conteos emitidos, denotados N_e y expresados en unidades arbitrarias (au), mientras que el eje de abscisas corresponde a la concentración de escatol, denotados $[C]$ y expresados en micromoles /l ($\mu mol/l$).

Presentación detallada de procedimientos de implementación específicos

Los experimentos que se describen a continuación se llevan a cabo utilizando:

- 15 - ya sea extractos orgánicos de muestras de tejido adiposo de cerdo, estén o no contaminados con escatol;
- soluciones denominadas a continuación como "soluciones estándar" y que comprenden escatol sintético en acetonitrilo.

I- Preparación de extractos orgánicos a partir de muestras de tejido adiposo de cerdo y soluciones estándar

I.1 - extractos organicos :

- 20 Los extractos orgánicos de muestras de tejido adiposo de cerdo, contaminados o no con escatol, se preparan siguiendo, para cada extracto, el siguiente protocolo operativo.

Una muestra de tejido adiposo de un cerdo, finamente cortada, se coloca en un vaso de precipitados y se lleva a una temperatura de 120 °C durante 1 hora. Durante este calentamiento, el vaso de precipitados no se tapa para dejar escapar el vapor de agua. El tamaño de la muestra de tejido adiposo se elige de modo que al final de este paso se recojan al menos 5 ml de grasa derretida.

- 25 Luego, 5 ml de esta grasa derretida se transfieren a un tubo de ensayo al que se le agregan 5 ml de acetonitrilo (pureza: 99,8 %). Se cierra el tubo de ensayo, luego se lleva la mezcla a una temperatura de 70°C durante 10 minutos. Se obtiene una solución que se agita con un mezclador vortex durante 5 minutos, luego se centrifuga a 4000 rpm durante 15 minutos para obtener una fase grasa y una fase disolvente.

- 30 A continuación, el tubo se coloca en un congelador a -18°C durante al menos 2 horas para congelar la fase grasa. La fase disolvente se recupera y se transfiere a un nuevo tubo de ensayo.

A esta fase se le añaden 100 mg de sulfato de magnesio para terminar de secarla, luego 0,385 mg de hexafluorofosfato de tetrabutilamonio (TBAHFF) para darle una concentración salina de fondo de 0,1 mol/l.

Los extractos así preparados se conservan en el refrigerador hasta su utilización.

- 35 I.2 - Estándares de soluciones :

Las soluciones estándar se preparan disolviendo, con agitación, escatol sintético en acetonitrilo a una concentración que oscila entre 0,1 $\mu mol/l$ y 5 $\mu mol/l$, luego se agrega a las soluciones resultantes TBAHFF para darles una concentración en sal de fondo de 0,1 mol/L. .

II- Detección de escatol

- 40 II.1 - Aparato experimental :

Las reacciones de ECL se llevan a cabo utilizando dos celdas electroquímicas, indicadas con 10 y 20 respectivamente, que se ilustran esquemáticamente en las Figuras 1 y 2, y un potenciostato PalmSens4.™ (PALMSENS).

- 45 La celda 10 comprende una cubeta de espectroscopia UV/visible de un solo uso, fabricada en poliestireno, cuya parte inferior es de sección cuadrangular y en la que se encuentran dos electrodos 11 y 12 de diamante dopado con boro, que sirven respectivamente de electrodo de trabajo y contraelectrodo, se colocan en dos paredes opuestas de esta parte inferior de modo que estos electrodos por lo tanto se enfrenten entre sí. Los electrodos 11 y 12 tienen una superficie de 1 cm².

La celda 20 comprende una cubeta en forma de paralelepípedo en la que dos electrodos 21 y 22 de diamante dopados con boro, que sirven respectivamente como electrodo de trabajo y contraelectrodo, están colocados en las dos paredes opuestas de esta cubeta que tienen la mayor superficie pero desplazadas entre sí, otra de manera que estos electrodos queden paralelos entre sí pero sin enfrentarse. Los electrodos 21 y 22 tienen una superficie de 4 cm².

- 5 Las celdas 10 y 20 están además provistas de un alambre 13 y 23 de platino, respectivamente, que sirve como pseudoelectrodo de referencia.

Las detección de los fotones emitidos durante las reacciones ECL se realiza en el rango de longitud de onda de 450 nm a 550 nm, usando un espectrofluorímetro Fluoromax[™] 4 o 4P (HORIBA JOBIN YVON) que permite seguir en tiempo real la evolución de la luminiscencia gracias a un software integrado.

- 10 Durante las reacciones ECL, las celdas electroquímicas se colocan en absoluta oscuridad para limitar el ruido de fondo del espectrofluorímetro.

II.2 - Desprotonación de ácidos orgánicos :

Las medidas del escatol en los extractos orgánicos se realizan después de la desprotonación de los ácidos orgánicos presentes en estos extractos.

- 15 Esta desprotonación se obtiene añadiendo hidruro de sodio (NaH) a cada extracto en forma de una dispersión de NaH al 60% en aceite mineral (CAS: 7646-69-7), a razón de 60 mg de esta dispersión por 5 mL de extracto. Durante esta adición se observa un burbujeo correspondiente a la liberación de dihidrógeno. A continuación se deja reposar el extracto durante 15 minutos durante los cuales se forma un precipitado correspondiente a la saponificación de los ácidos orgánicos presentes en el extracto. Este precipitado se elimina.

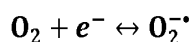
- 20 II.3 - Verificación de la posibilidad de realizar la reacción ECL según diferentes protocolos electroquímicos :

Como se indicó anteriormente, la reacción ECL del escatol que se favorece en el contexto de la invención es una reacción inducida por la aplicación de un potencial catódico al electrodo de trabajo de una celda electroquímica para inducir la formación de iones superóxido, en un extracto orgánico obtenido a partir de una muestra de tejido adiposo de cerdo, por reducción del dióxígeno disuelto en este extracto.

- 25 Esta reacción se puede dividir en las siguientes etapas:

- aplicación de un potencial catódico :

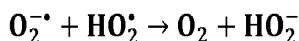
(1) formación de iones superóxido por reducción de oxígeno disuelto:



(2) formación de la base conjugada de escatol en presencia de iones superóxido:



(3) formación de radicales hidroperoxilo:

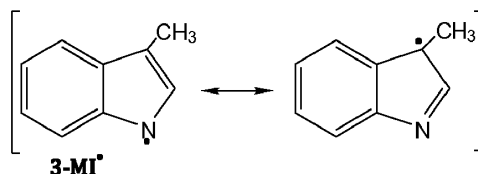


- aplicación de un potencial anódico :

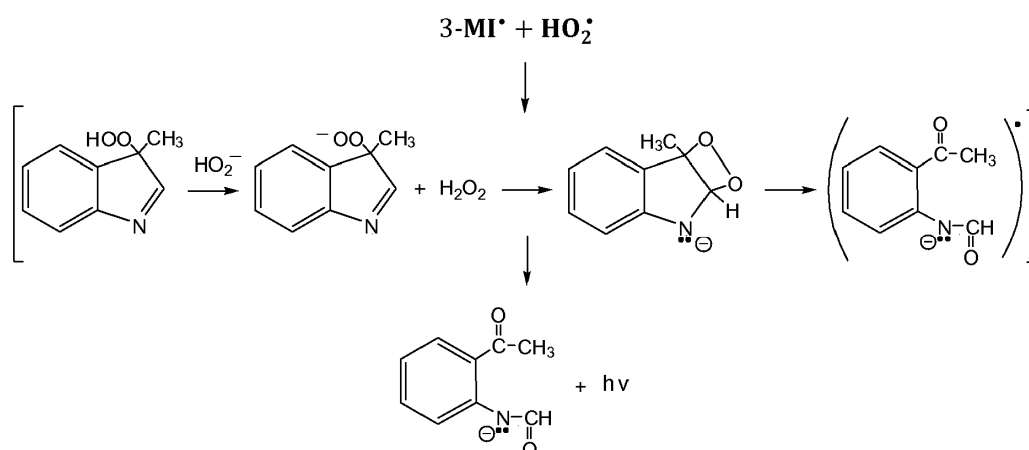
(4) oxidación del escatol:



con :



(5) acoplamiento radical de escatol oxidado con $\text{HO}_2^{\bullet}$ que implica la formación de un compuesto intermedio que comprende un grupo 1,2-dioxetano luego N-(2-acetilfenil)formamida en un estado excitado:



Para obtener esta reacción se prueban tres protocolos electroquímicos:

- una exploración potencial (voltametría cíclica);
- un salto de potencial (cronoamperometría); y
- 5 - una aplicación repetida de pulsos de voltaje alternativamente catódicos y anódicos.

* exploración potencial :

Para la exploración potencial, usamos:

- un extracto orgánico de una muestra de tejido adiposo de cerdo no contaminado con escatol al que se le ha añadido escatol sintético en una concentración de $5 \mu\text{mol/l}$, y

- 10 - la celda electroquímica 10 que se muestra en la figura 1.

Después de haber introducido el extracto orgánico en la celda electroquímica, se aplica al electrodo de trabajo 11 de esta celda un barrido de potencial de 0 a -2 V y luego de -2 V a + 0,8 V. (*contra* el electrodo 13 de referencia) con una velocidad de barrido de 50 mV/s.

La medición de luminiscencia se inicia desde el inicio de la exploración potencial.

- 15 El voltamograma así obtenido y la luminiscencia así medida se ilustran en las figuras 3 y 4 respectivamente.

Como se muestra en la Figura 4, se observa un pico de luminiscencia en el área de potencial anódico del barrido, que puede estar relacionado con la presencia de escatol en el extracto orgánico y cuya amplitud puede a su vez estar relacionada con la cantidad de escatol presente en este extracto.

* Salto potencial :

- 20 Para el salto de potencial, usamos:

- un extracto orgánico de una muestra de tejido adiposo de cerdo no contaminado con escatol al que se le ha agregado escatol sintético en una concentración de $5 \mu\text{mol/l}$, y

- la celda 20 electroquímica que se muestra en la Figura 2.

- 25 Después de haber introducido el extracto orgánico en la celda electroquímica, se aplica un potencial de -2 V al electrodo de trabajo 21 de esta celda. (*contra* el electrodo 23 de referencia) durante 30 segundos, luego + 1 V (*contra* el electrodo 23 de referencia) durante otros 30 segundos.

Aquí también, la medición de la luminiscencia se inicia desde el inicio de la aplicación de un potencial al electrodo de trabajo.

El cronoamperograma así obtenido y la luminiscencia así medida se ilustran en las figuras 5 y 6 respectivamente.

- 30 Como se muestra en la Figura 6, se observa un pico de intensidad de luminiscencia durante el paso del primer potencial al segundo potencial, pudiendo este pico, allí también, estar ligado a la presencia de escatol en el extracto orgánico y cuya amplitud puede, estar relacionado con la cantidad de escatol presente en este extracto.

* Modo de pulso :

El ensayo que consiste en aplicar al electrodo de trabajo una repetición de pulsos de tensión alternativamente catódicos y anódicos se realiza utilizando:

- una solución estándar a 5 $\mu\text{mol/L}$ de escatol, y
- la celda 20 electroquímica que se muestra en la Figura 2.

- 5 Después de haber introducido la solución estándar en la celda electroquímica, se aplica al electrodo de trabajo de esta celda un potencial de -2 V (*contra* el electrodo 23 de referencia) seguido de un potencial de $+1\text{ V}$ (*contra* el electrodo 23 de referencia) repetidamente a una frecuencia de 1 Hz .

Aquí también, la medición de la luminiscencia se inicia desde el inicio de la aplicación de un potencial al electrodo de trabajo.

- 10 La respuesta de corriente del electrodo de trabajo así registrada y la luminiscencia así medida se ilustran en las figuras 7 y 8 respectivamente.

Como se muestra en la figura 8, se observa la emisión de una señal de luminiscencia variable pero de intensidad media en aproximadamente a los 14.000 conteos durante todo el tiempo que dura la aplicación del régimen de pulsos.

- 15 Se realiza otra prueba bajo las mismas condiciones experimentales excepto que se usa una frecuencia de 5 Hz en lugar de 1 Hz . Se obtiene una respuesta ECL similar pero con una intensidad de luminiscencia media de aproximadamente 8000 conteos, que es inferior a la anterior.

II.4 - Verificación del carácter específico de la detección de escatol :

Se llevan a cabo dos experimentos, a saber:

- 20 - un primer experimento que consiste en presentar una serie estadísticamente significativa de extractos orgánicos de muestras de tejido adiposo de cerdos no contaminados con escatol (habiéndose verificado la ausencia de escatol en estos extractos mediante cromatografía en fase gaseosa acoplada a espectrometría de masas o GC/MS, lo que hace posible dosificar escatol hasta una concentración de $0,03\text{ }\mu\text{g/g}$ de grasa) en una reacción ECL y medir la luminiscencia emitida durante esta reacción;

- 25 un segundo experimento que consiste en someter a una reacción ECL, por una parte, soluciones estándar a $5\text{ }\mu\text{mol/l}$ de escatol y, por otra parte, soluciones que comprenden $5\text{ }\mu\text{mol/l}$ de indol y $0,1\text{ mol/l}$ de TBAHFF en acetonitrilo, bajo las mismas condiciones de operación y para medir la luminiscencia emitida durante esta reacción.

A este respecto, se recuerda que el escatol y el indol se diferencian estructuralmente entre sí únicamente en que el anillo pirrol del escatol lleva un grupo metilo a diferencia del anillo pirrol del indol.

- 30 El primer experimento se realiza en la celda 10 electroquímica mostrada en la figura 1 y aplicando un salto de potencial, tal como se describe en el punto II.3 anterior.

El segundo experimento se realiza en la celda 20 electroquímica mostrada en la figura 2 y aplicando un barrido de potencial, como también se describe en el punto II.3 anterior.

No se detecta ninguna señal de luminiscencia significativa durante el primer experimento, siendo la luminiscencia medida del tipo que se muestra en la figura 12.

- 35 Como se muestra en las Figuras 9 y 10, que representan ejemplos de la luminiscencia medida durante el segundo experimento para una solución estándar de escatol y una solución de indol, respectivamente, se observa una señal intensa de luminiscencia para la solución estándar de escatol mientras se observa que no hay señal de luminiscencia significativa para la solución de indol, lo que confirma la naturaleza muy específica de la detección de escatol por el procedimiento de la invención.

- 40 II.5 -Pruebas ciegas de detección de escatol :

Las pruebas de detección de escatol se realizan sometiendo los extractos orgánicos de una muestra de tejido adiposo de cerdo contaminado con escatol ($0,27\text{ }\mu\text{g}$ de escatol/g de tejido adiposo) y los extractos orgánicos de una muestra de tejido adiposo de cerdo no contaminado con escatol a una reacción ECL en la celda 20 electroquímica mostrada en la figura 2 y aplicando un salto de potencial como se describe en el punto II.3 anterior y midiendo la luminiscencia emitida durante esta reacción.

- 45 La contaminación y la ausencia de contaminación de los extractos orgánicos fueron previamente comprobadas por GC/MS.

Los ensayos se realizan a ciegas, es decir que el experimentador no sabe, cuando somete un extracto a una reacción ECL, si este extracto está o no contaminado con escatol.

La Figura 11 muestra una señal de luminiscencia como se observa típicamente para un extracto orgánico de una muestra de tejido adiposo de cerdo contaminado con escatol mientras que la Figura 12 muestra la ausencia de una señal de luminiscencia significativa como se observa para un extracto orgánico de una muestra de tejido adiposo de cerdo no contaminado con escatol.

5 II.6 - Curvas de calibración :

Para verificar la posibilidad de cuantificar el escatol presente en un extracto orgánico de tejido adiposo de cerdo, se elaboran curvas de calibración presentando:

- por un lado, soluciones estándar de escatol que comprenden de 0,1 $\mu\text{mol/l}$ a 5 $\mu\text{mol/l}$ de escatol; y

10 - por otro lado, extractos orgánicos de muestras de tejido adiposo de cerdo no contaminadas con escatol pero con escatol sintético añadido de 0.1 $\mu\text{mol/l}$ a 5 $\mu\text{mol/l}$;

a una reacción ECL y midiendo la intensidad máxima de la luminiscencia emitida durante esta reacción.

La reacción ECL se lleva a cabo en la celda 10 electroquímica que se muestra en la Figura 1 y aplicando al electrodo 11 de trabajo de esta celda un potencial de -2 V (*contra el* electrodo 13 de referencia) durante 30 segundos, luego + 1 V (*contra el* electrodo 13 de referencia) durante otros 30 segundos.

15 Las curvas de calibración así obtenidas se ilustran en la figura 13, correspondiendo la curva 1 a los extractos orgánicos a los que se ha añadido escatol sintético y la curva 2 correspondiente a las soluciones estándar de escatol.

Esta figura muestra, para las dos curvas, una relación casi lineal entre la amplitud de los picos de luminiscencia y la concentración de escatol.

20 La pendiente de la curva 1 es aproximadamente el doble que la de la curva 2, lo que significa que la sensibilidad de detección del escatol en el caso de extractos orgánicos con escatol sintético añadido es aproximadamente el doble que en el caso de soluciones estándar de escatol.

Esto se explica experimentalmente, en primer lugar, por el hecho de que los extractos orgánicos adicionados con escatol sintético reabsorben el 30% de los fotones emitidos (medida realizada por espectroscopia UV/visible). La pérdida del 20% restante de señal probablemente se deba a que los extractos orgánicos adicionados con escatol sintético tienen una mayor viscosidad que las soluciones estándar de escatol sintético y por tanto una menor movilidad iónica lo que ralentiza los procesos de difusión que rigen los procesos electroquímicos.

30 Sin embargo, estos dos fenómenos (reabsorción de fotones y aumento de la viscosidad) pueden corregirse fácilmente a partir, por un lado, del coeficiente de absorción del extracto orgánico analizado a la longitud de onda de interés (utilización del valor medio que tiene poco riesgo de variar significativamente de un extracto orgánico a otro o, en su caso, medición realizada en paralelo sobre cada extracto orgánico), y, por otra parte, los coeficientes de difusión de las especies iónicas puestas en juego en el extracto orgánico analizado que habrán sido evaluados de antemano.

Referencias citadas

K. Verplanken et al, Journal of Chromatography A 2016, 1462, 124-133

M. P. Aguilar-Caballeros et al, Analytica Chimica Acta 2002, 460, 271-277

35 WO-A-83/00928

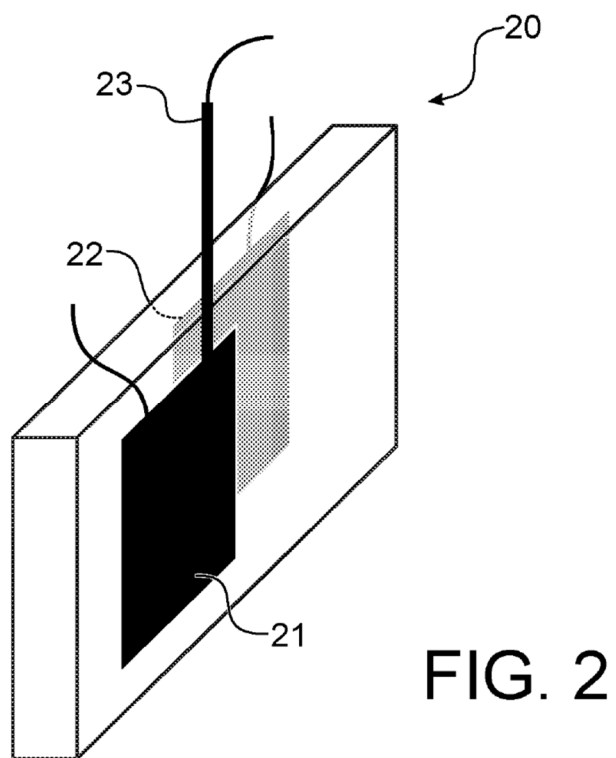
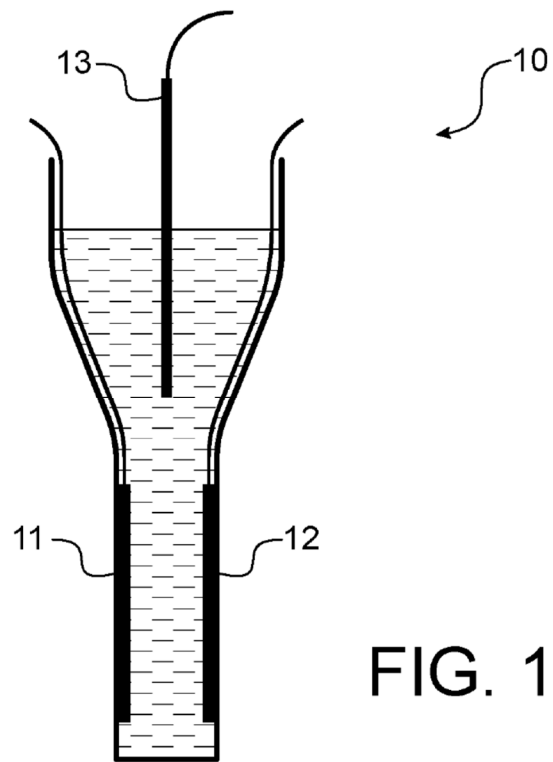
EP-A-2 966 441

X. Liu et al, Meat Science 2016, 116, 133-139

T. Okajima et T. Ohsaka, Journal of Electroanalytical Chemistry 2002, 523, 34-39 US-A-9,121,107

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para detectar la presencia de escatol en una muestra de tejido adiposo de cerdo, caracterizado porque incluye al menos las etapas de:
 - a) someter un extracto orgánico de la muestra de tejido adiposo a una reacción de electroquimioluminiscencia;
 - b) medir la intensidad de luminiscencia durante la etapa a) y, si la intensidad de luminiscencia medida supera un valor umbral predeterminado, deducir la presencia de escatol en la muestra de tejido adiposo.
2. Procedimiento según la reivindicación 1, en el que el extracto orgánico comprende: (1) un disolvente orgánico aprótico, menos del 1% en peso de agua y (3) una sal básica.
3. Procedimiento según la reivindicación 2, que comprende, previo a la etapa a), una preparación del extracto orgánico, preparación que comprende las etapas consistentes en:
 - i) separar la grasa presente en la muestra de tejido adiposo de los elementos no grasos también presentes en la muestra de tejido adiposo;
 - ii) deshidratar la grasa presente en la muestra de tejido adiposo;
 - iii) disolver la grasa obtenida al final de la etapa ii) en un disolvente orgánico aprótico para obtener una solución orgánica y calentar la solución orgánica;
 - iv) desengrasar la solución orgánica obtenida al final de la etapa iii); y
 - v) añadir una sal básica anhidra a la solución orgánica obtenida al final de la etapa iv);
 las etapas i) y ii) pudiendo realizarse de forma sucesiva o simultánea.
4. Procedimiento según la reivindicación 3, en el que las etapas i) y ii) se realizan simultáneamente.
5. Procedimiento según la reivindicación 4, en el que las etapas i) y ii) comprenden calentar la muestra de tejido adiposo a una temperatura de 100 °C a 150 °C en un recipiente abierto, o a una temperatura por debajo de 100 °C con extracción al vacío.
6. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que el disolvente orgánico es acetonitrilo, el dimetilsulfóxido, el carbonato de propileno o la γ -butirolactona, preferiblemente acetonitrilo.
7. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el calentamiento de la etapa iii) se realiza en un recipiente cerrado, a una temperatura de 50°C a 80°C, durante 10 minutos a 30 minutos y bajo agitación.
8. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en el que la etapa iv) comprende una centrifugación de la solución orgánica obtenida al final de la etapa iii), luego la congelación de la parte grasosa de la solución orgánica por mantenimiento de la solución orgánica a una temperatura inferior o igual a 4°C pero superior a la temperatura de solidificación del disolvente orgánico aprótico, y eliminación de la parte grasosa solidificada.
9. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en el que la sal básica es un tetrafluoroborato, un hexafluorofosfato o un perclorato de tetraalquilamonio cuyo grupo alquilo comprende de 1 a 4 átomos de carbono, preferiblemente tetrafluoroborato de tetrabutilamonio o hexafluorofosfato de tetrabutilamonio.
10. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 9, en el que el extracto orgánico comprende de 0,01 mol/l a 1 mol/l, preferiblemente de 0,05 mol/l a 0,5 mol/l y más preferiblemente 0,1 mol/l de sal básica.
11. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10, en el que el extracto orgánico comprende además una base fuerte.
12. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en el que la etapa a) se realiza en una celda electroquímica que comprende al menos un electrodo de trabajo y un contraelectrodo, y la reacción de electroquimioluminiscencia comprende la aplicación al electrodo de trabajo de un potencial catódico seguido de un potencial anódico.
13. Procedimiento según la reivindicación 12, en el que la aplicación al electrodo de trabajo de un potencial catódico seguido de un potencial anódico se realiza por barrido de potencial, por salto de potencial o por una serie de pulsos de potencial catódico y anódico alternativamente.
14. Procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en el que, deducida la presencia de escatol en la etapa b), se realiza además una cuantificación del escatol presente en el extracto orgánico por comparación de la intensidad máxima de luminiscencia medida durante la etapa b) con una curva de calibración, realizándose la cuantificación durante el paso b) o después la etapa b).
15. Procedimiento para la clasificación de canales de cerdos machos enteros, caracterizado porque comprende la implementación de un procesamiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.



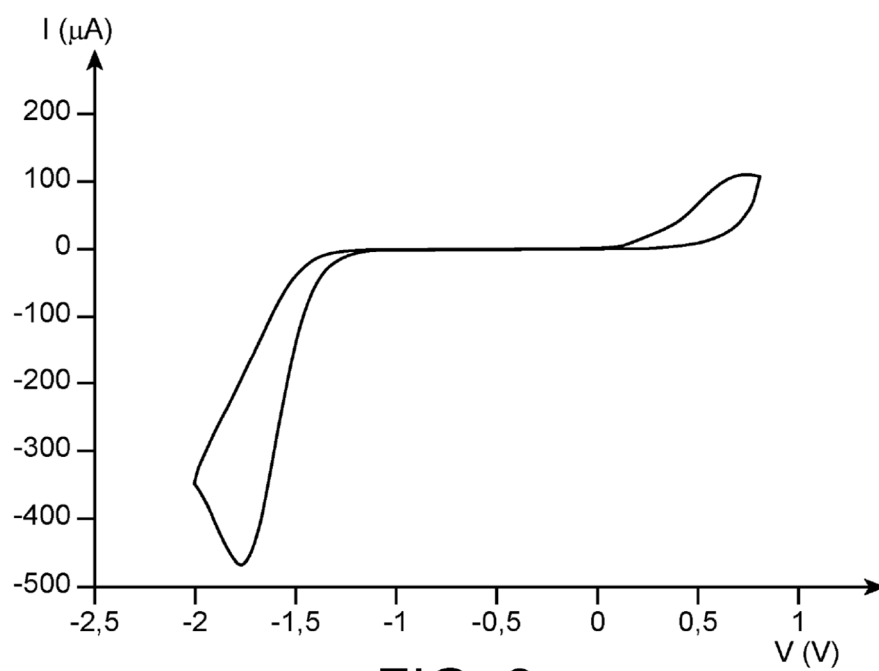


FIG. 3

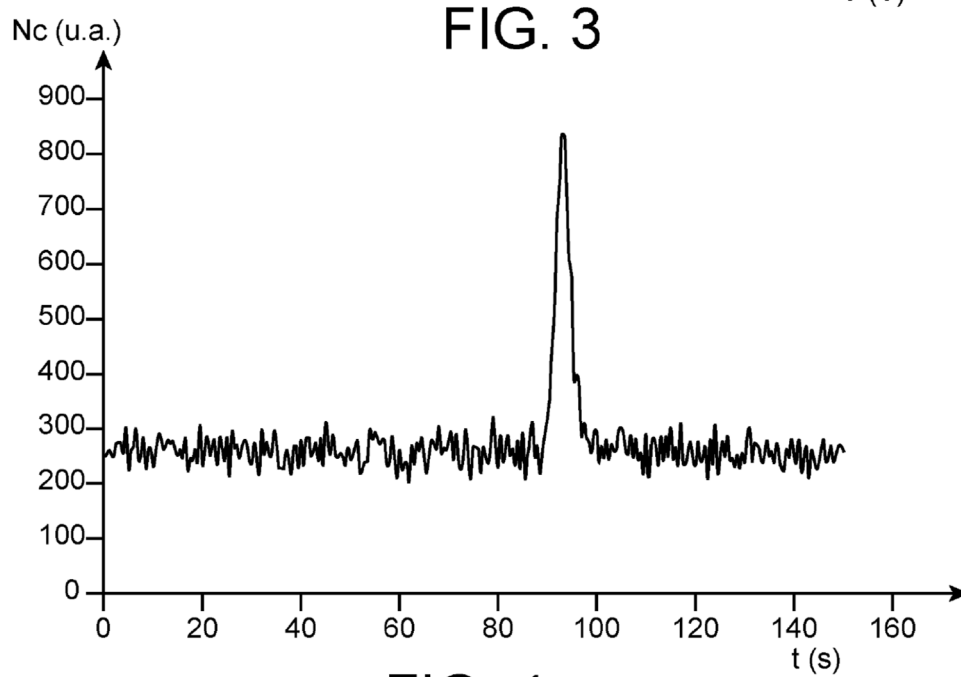


FIG. 4

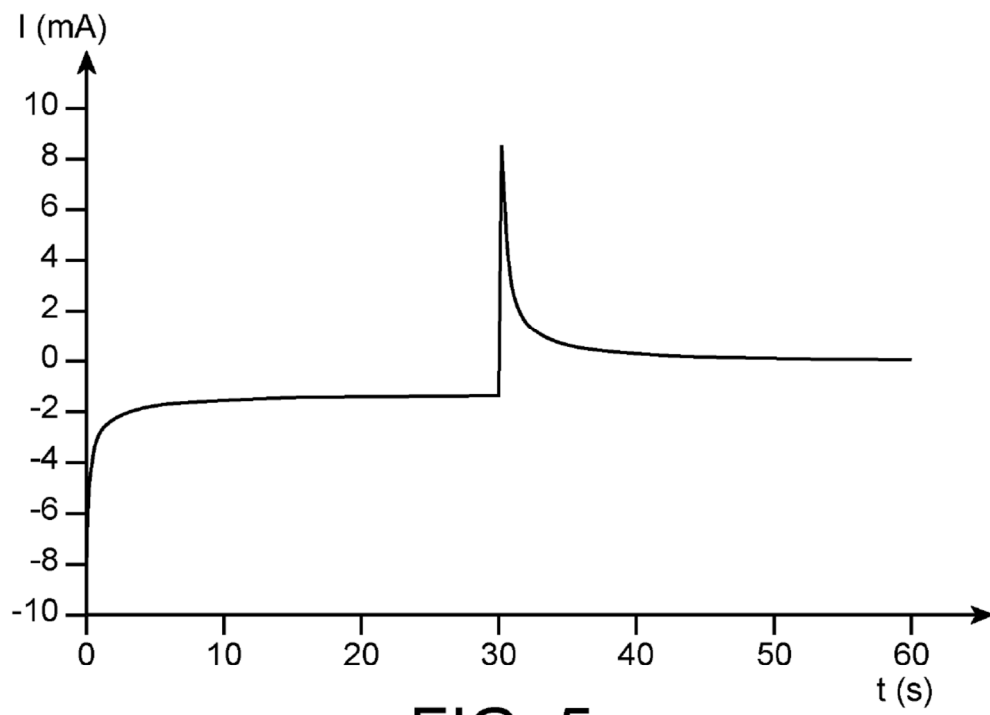


FIG. 5

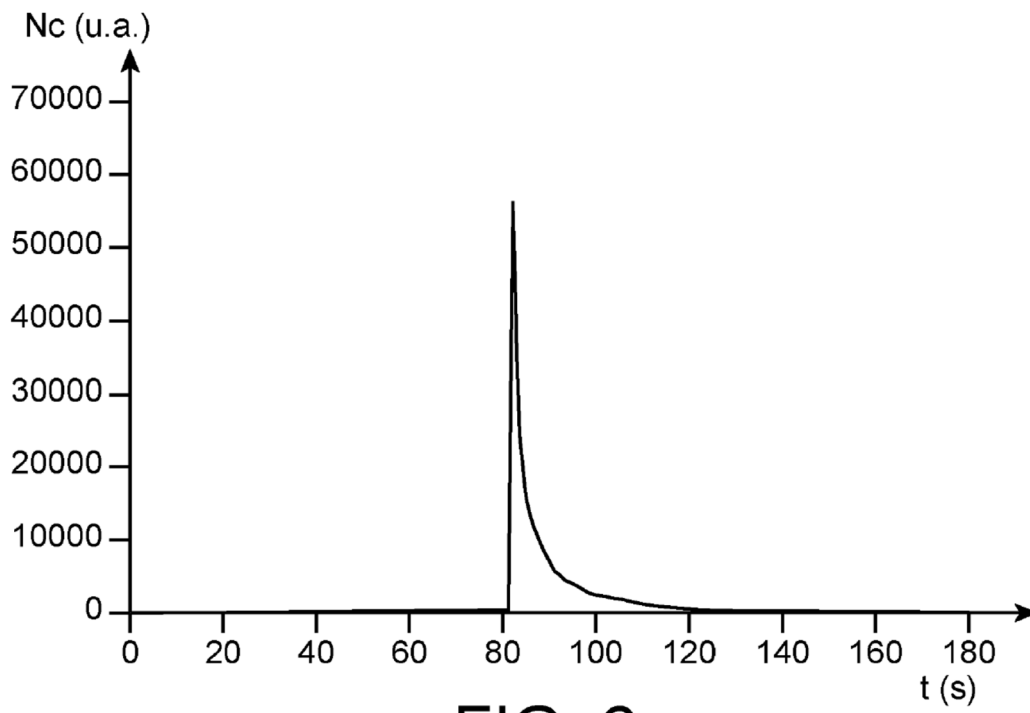


FIG. 6

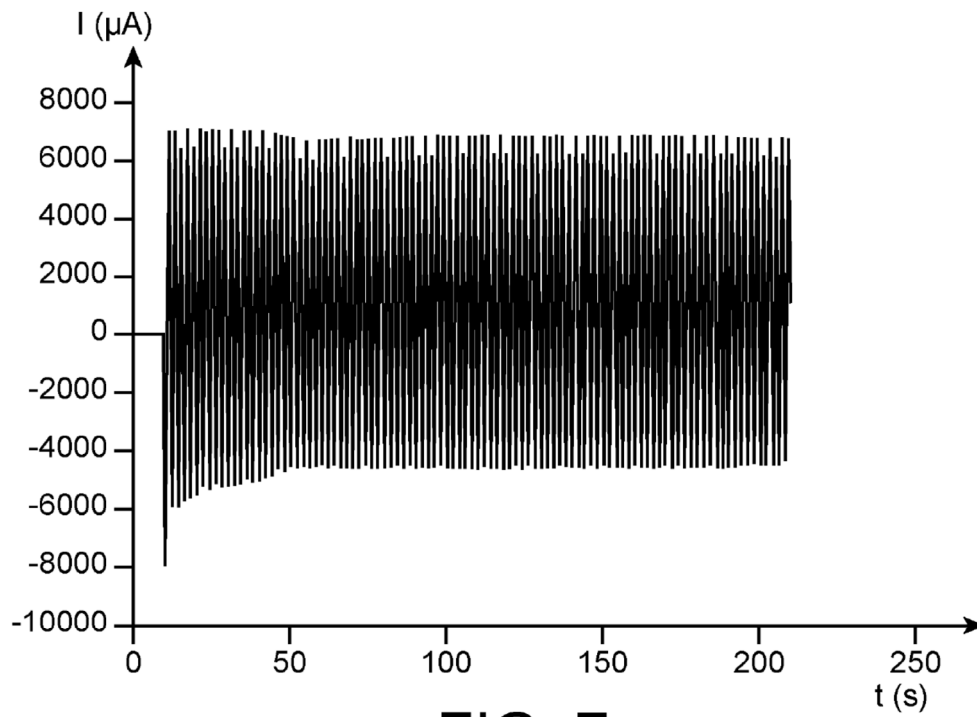


FIG. 7

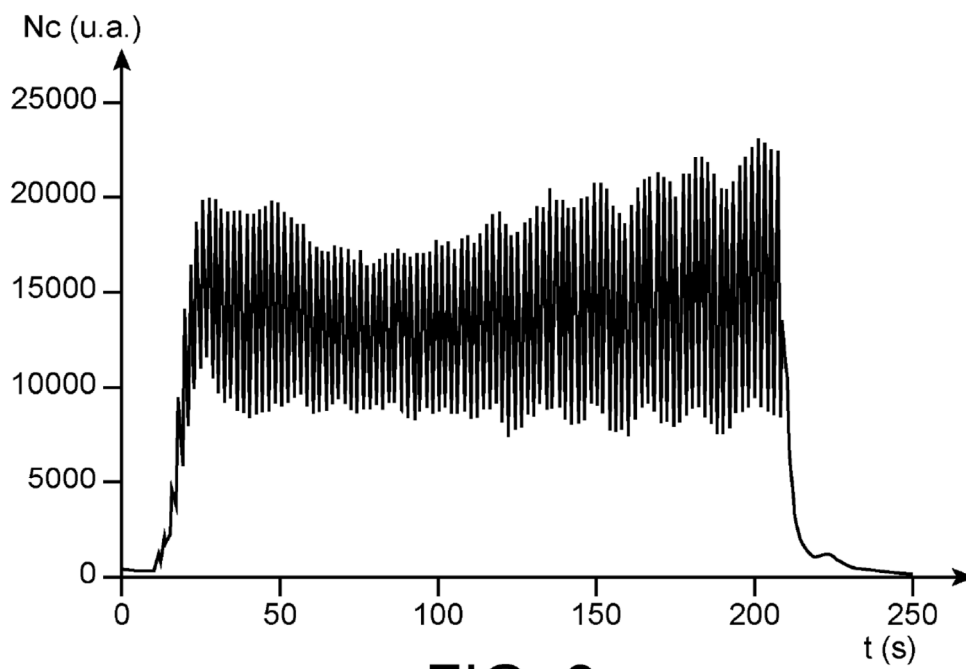
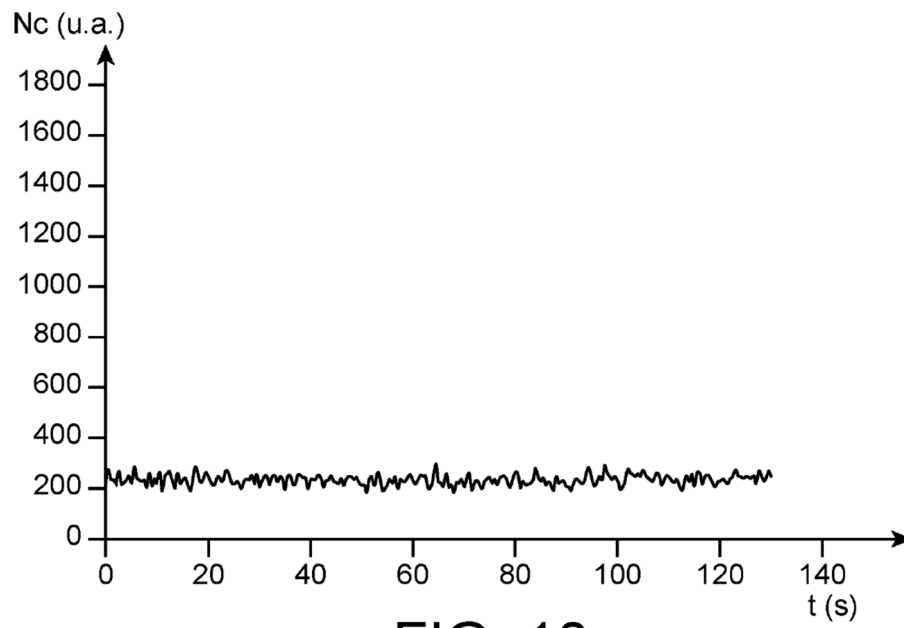
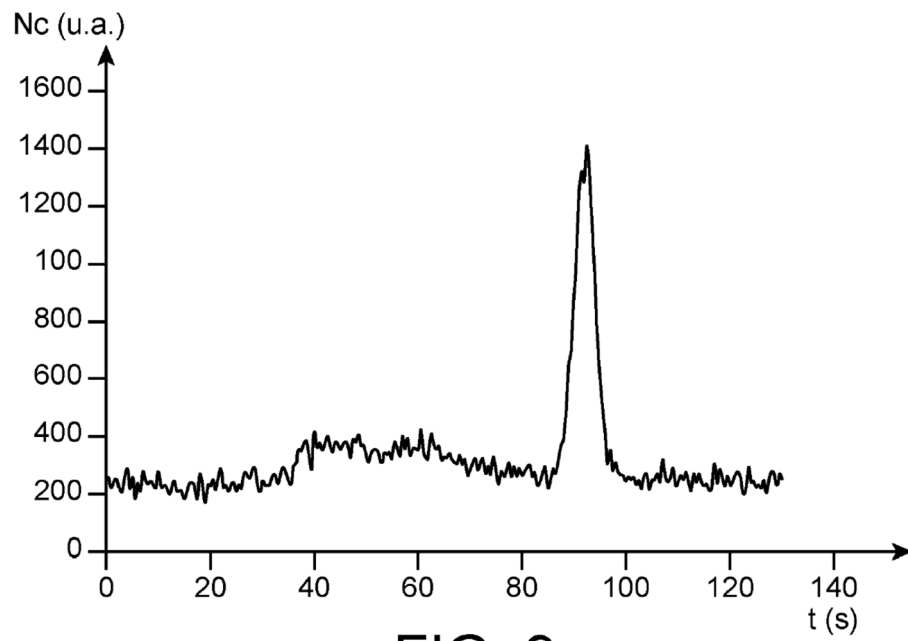


FIG. 8



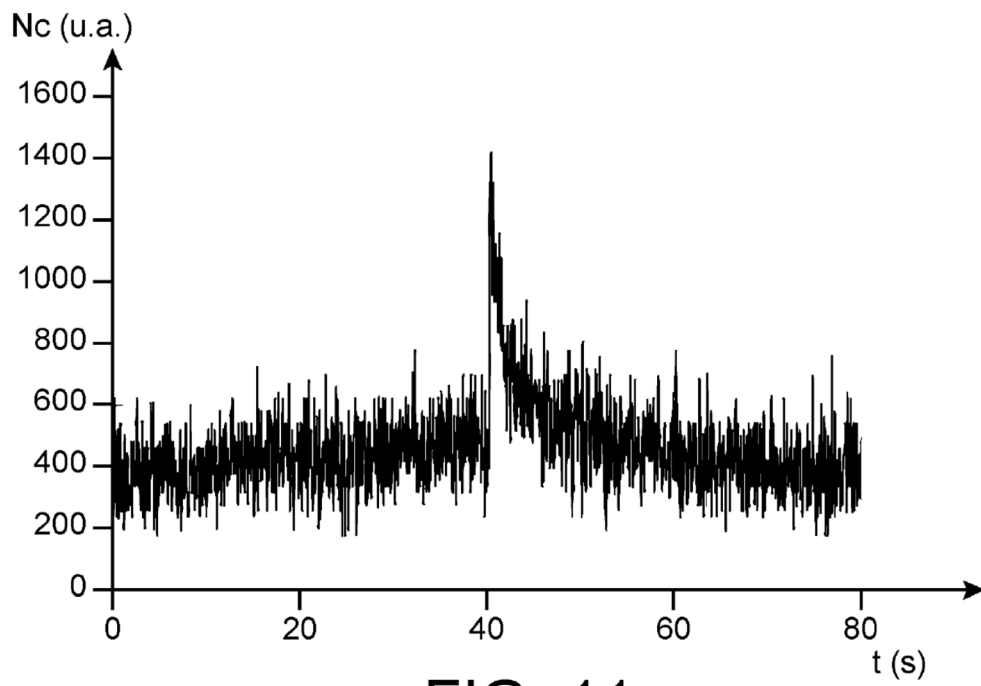


FIG. 11

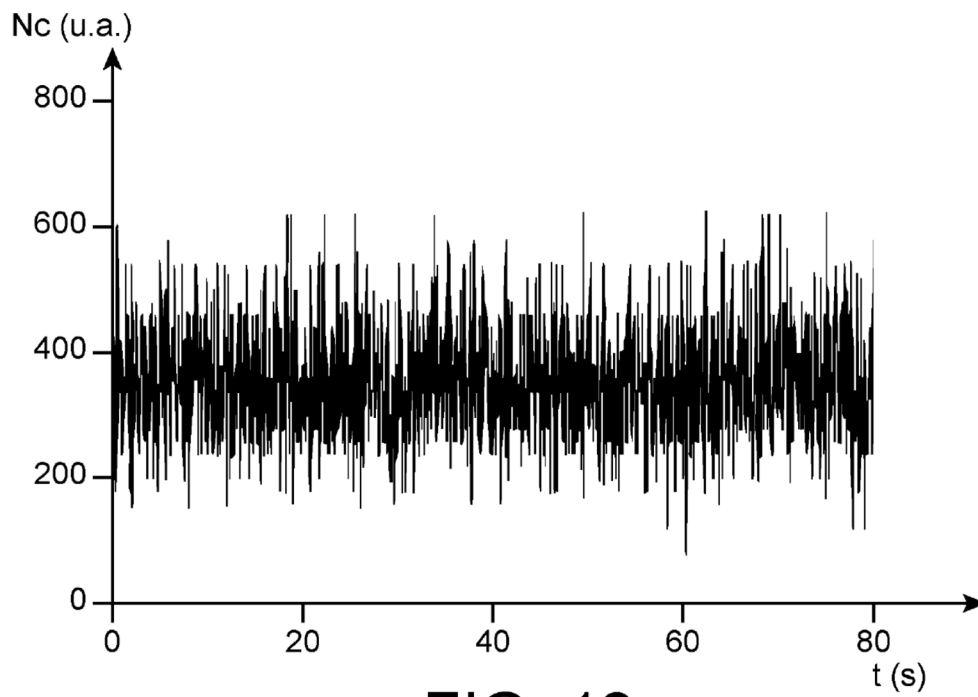


FIG. 12

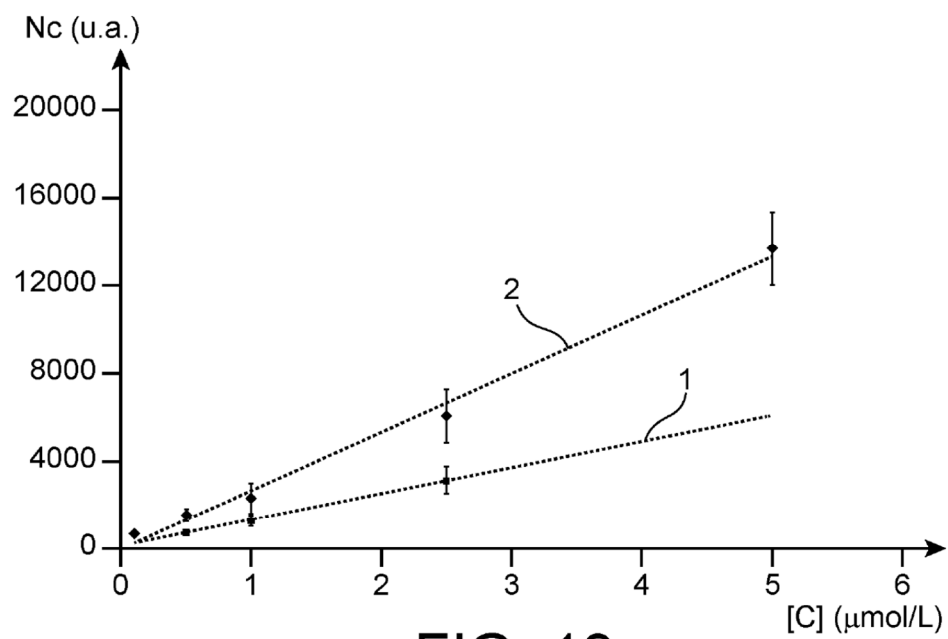


FIG. 13