

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 643 417**

51 Int. Cl.:

G01N 33/12 (2006.01)

G01N 27/327 (2006.01)

G01N 27/49 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

C12Q 1/32 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2015 E 15275162 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2017 EP 2966441**

54 Título: **Sensor y procedimiento para detectar androstenona o escatol en el olor a verraco**

30 Prioridad:

08.07.2014 GB 201412136

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

22.11.2017

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF THE WEST OF ENGLAND,
BRISTOL (100.0%)
Frenchay Campus Coldharbour Lane
Bristol BS16 1QY, GB**

72 Inventor/es:

**HART, JOHN;
CREW, ADRIAN;
MCGUIRE, NATASHA y
DORAN, OLENA**

74 Agente/Representante:

DURAN-CORRETJER, S.L.P

ES 2 643 417 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

Sensor y procedimiento para detectar androstenona o escatol en el olor a verraco

5 **Sector de la invención**

La presente invención se refiere a un sistema de matriz de sensores y un método para detectar y, preferentemente, cuantificar, androstenona y escatol, los productos químicos asociados con el olor a verraco. El sistema puede utilizarse para detectar y cuantificar el olor a verraco en cadáveres de cerdo o cerdos vivos y, por lo tanto, puede utilizarse para evitar la entrada de cuerpos de animales muertos contaminados en la cadena alimentaria y permitir la clasificación de los cuerpos de animales muertos como de "calidad superior".

Antecedentes de la invención

15 El término "olor a verraco" se refiere a un fuerte olor y sabor desagradables del cerdo y productos de cerdo que afectan principalmente a cerdos machos. El olor y el sabor de la carne con olor a verraco tienen un fuerte impacto negativo sobre la percepción de los consumidores de la carne de cerdo. Dado que la carne de cerdo es una de las carnes más consumidas en Europa y en muchas otras partes del mundo, la industria porcina representa una parte grande e importante de la economía global. El problema del olor a verraco representa un reto importante para la industria porcina global y encontrar una solución a este problema es de importancia para la economía mundial.

Se sabe que el olor a verraco está relacionado con una acumulación excesiva de dos compuestos principales, el escatol (3-metil-indol) y la androstenona (5 α -androst-16-en-3-ona) en el tejido adiposo subcutáneo de los cerdos. El escatol se produce a partir del aminoácido triptófano por la acción bacteriana en el intestino de cerdo y la androstenona se produce en el testículo en paralelo con la biosíntesis de otros esteroides. Los altos niveles de escatol se pueden encontrar no solo en los cerdos machos sino también en algunas cerdas. En muchos países se han establecido niveles umbral por encima de los cuales se considera que el cerdo no es apto para el consumo humano. Para el escatol y la androstenona, estos niveles umbral son 0,2-0,25 ppm y 0,5-1 ppm, respectivamente. Los niveles umbral varían entre los diferentes países.

El olor a verraco puede, en general, prevenirse mediante castración que, hasta la fecha, ha sido la solución más popular al problema. Sin embargo, la castración se ha interrumpido en un número creciente de países debido a problemas de bienestar animal. Actualmente existe un debate en curso en la Unión Europea (UE) sobre posibles alternativas a la castración quirúrgica y, por consiguiente, la necesidad de procedimientos para detectar el olor a verraco.

Una alternativa a la castración es criar cerdos machos enteros (no castrados). Esto no solo tiene beneficios de bienestar animal, sino que también tiene beneficios ambientales y de producción. Por ejemplo, se ha descubierto que cerdos machos enteros tienen un mejor índice de conversión alimenticia, una tasa de crecimiento más alta y un porcentaje de magro, lo que reduce los costes de producción. Los cerdos machos enteros también excretan menos nitrógeno en comparación con los castrados debido a una mejor eficiencia para la retención de nitrógeno y, por lo tanto, son más respetuosos con el medio ambiente. Sin embargo, la cría de cerdos machos enteros se asocia con un mayor riesgo de olor a verraco.

El riesgo del olor a verraco puede superarse parcialmente mediante el sacrificio de los animales a una edad más temprana y un peso menor que los machos castrados. Sin embargo, el sacrificio con menor peso se asocia inevitablemente con pérdidas comerciales. Esta es una cuestión particular para los sectores de la industria que producen tipos especiales de jamón de alta calidad y alto precio (por ejemplo, jamón curado seco), que requiere cerdos de peso elevado con una calidad de carne definida. Por lo tanto, si la industria va a avanzar hacia la producción de cerdos machos enteros (especialmente cerdos pesados), tiene que asegurarse de que los cuerpos de animales muertos de estos animales están libres de olor a verraco.

Una segunda alternativa a la castración quirúrgica es la inmunocastración, que está siendo objeto de debate en la UE y no se ha implementado ampliamente. Si se va a implementar ampliamente la inmunocastración, seguirá siendo necesario un procedimiento en línea para evaluar la efectividad de la inmunocastración (es decir, los niveles de escatol y androstenona en la carne).

Una tercera alternativa a la castración podría ser la selección genética hacia los cerdos libres de olor a verraco. Se han realizado extensos trabajos en esta área, pero se han encontrado varias dificultades. No existe una prueba genética para el olor a verraco disponible en el momento actual e incluso si tal prueba está disponible en el futuro, todavía habrá un requisito para evaluar la efectividad de la selección genética utilizando una prueba para el olor a verraco.

El nivel de uno de los compuestos de olor a verraco, es decir, el escatol, puede reducirse mediante manipulación de la dieta y mediante un sistema de manipulación adecuado. Sin embargo, este enfoque no permite la regulación del nivel del otro compuesto de olor a verraco, la androstenona. La eficacia de la manipulación de la dieta de los niveles

de escatol depende de la edad y la raza de los animales. Por lo tanto, se requiere un procedimiento rápido para evaluar la efectividad de la manipulación de la dieta en la carne e idealmente en animales vivos.

Por las razones expuestas anteriormente, está claro que cualquiera que sea el enfoque que se elija para reducir el olor a verraco, es esencial disponer de un procedimiento eficaz para evaluar los niveles de escatol y/o androstenona en los cuerpos de animales muertos y los productos cárnicos. Es preferente que cualquier sistema de monitorización sea rápido, preciso y de bajo coste. Idealmente, el procedimiento permitiría la detección simultánea o paralela tanto de escatol como de androstenona y dar niveles de escatol y androstenona en valores absolutos (en lugar de simplemente detectar la presencia) porque el umbral del olor a verraco difiere entre los diferentes países. Dicho sistema de monitorización podría utilizarse para evitar la entrada de cuerpos de animales muertos contaminados en la cadena alimentaria y permitir la clasificación de los cuerpos de animales muertos como "calidad superior". Este procedimiento no está actualmente disponible.

De hecho, el Panel Científico de Sanidad y Bienestar de los Animales de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria declaró que "no hay procedimientos armonizados para identificar de forma constante los cuerpos de animales muertos con olor a verraco en los mataderos comerciales. La investigación de posibles técnicas de procesamiento para reducir las propiedades ofensivas del olor a verraco se ve obstaculizada por la falta de tales procedimientos para evaluar los niveles de los compuestos que contribuyen al fenómeno" (EFSA, 2004).

Se han propuesto diversas formas de medir la concentración de escatol y/o androstenona, que se pueden resumir brevemente como sigue.

Se ha propuesto un procedimiento colorimétrico para medir el escatol (véase Mortensen, A. B. y Sorensen, S. E. (1984) Actas del 30^a Encuentro Europeo de Investigadores de la Carne, Bristol, Reino Unido; AMSA; 9-14 de septiembre.) Sin embargo, este procedimiento está seriamente limitado porque no es específico, mide una gama de compuestos que contienen el grupo indol, requiere un alto nivel de competencia del operador, implica el submuestreo de carne en línea y la presencia de productos químicos y equipos ópticos situados cerca de la planta de procesamiento de carne. Este procedimiento no ha sido adoptado por la industria. Se han propuesto procedimientos colorimétricos similares para medir la concentración de androstenona (véase Squires, E. J. (1990) Canadian Journal of Animal Science 70: 1029–1040). Este procedimiento también implica un procedimiento largo y costoso que implica la utilización de extracción de muestras, cromatografía líquida y calentamiento, seguido de análisis colorimétrico. Por lo tanto, estos procedimientos no son rentables ni lo suficientemente rápidos para aplicaciones prácticas.

Se han sugerido varias técnicas analíticas de alta tecnología para medir el escatol y la androstenona, incluyendo cromatografía de gases de alta resolución (HRGC), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), cromatografía de gases (CG), CG-espectrometría de masas y cromatografía de fluidos supercríticos/espectrometría de masas (véase Dehnhard, M., Claus, R., Hillenbrand, M. y Herzog, A. (1993) Journal of Chromatography: Biomedical Applications 616(2): 205–209; Hansen–Møller, J. (1994) Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 661(2): 219–230; Rius, M. A., Hortós, M. y Garcia–Regueiro, J. A. (2005) Meat Science 71(4): 595–602; Claus, R., Herbert, E. y Dehnhard, M. (1997) Archiv für Lebensmittelhygiene 48: 27–30; de Brabander, H. F. y Verbeke, R. (1986) Journal of Chromatography A 363(2): 293–302; Mågård, M. Å., Berg, H. E. B., Tagesson, V., Järemo, M. L. G., Karlsson, L. L. H., Mathiasson, L. J. E., Bonneau, M. y Hansen–Møller, J. (2002) Journal of Agricultural and Food Chemistry 43(1): 114–120; y Tuomola, M., Hakala, M. y Manninen, P. (1998) Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications 719(1–2): 25–30). Sin embargo, estos procedimientos consumen mucho tiempo debido a que hay laboriosas etapas de preparación de muestras (las muestras deben adquirirse, transportarse a un lugar alejado de los cerdos o los cuerpos de animales muertos, y limpiarse), sólo se puede analizar una muestra a la vez y los procedimientos son caros ya que requieren equipos altamente especializados y costosos.

Se ha propuesto una "nariz electrónica" para detectar escatol (véase Annor–Frempong, I. E., Nute, G. R., Wood, J. D., Whittington, F. W. y West, A. (1998) Meat Science 50(2): 139–151) pero esta tecnología está limitada en gran medida debido a las preguntas que rodean su fiabilidad y sensibilidad y a los costes elevados.

Se han propuesto diversos procedimientos que implican materiales biológicos para la detección de androstenona, incluyendo un radioinmunoensayo, y un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) y un inmunoensayo enzimático de placa de microtitulación (véase Claus, R. (1974) Dosage radioimmunologique du 5 α -androst-16-en-3-one Comptes Rendus Hebdomadaire des Séances de l'Académie des Sciences Ser. D 278: 299–302; Andresen, Ø. (1975) Acta Endocrinologica 79: 619–625; y Claus, R., Mahler, G. y Münster, E. (1988) Archiv für Lebensmittelhygiene 4: 87–90, respectivamente). Sin embargo, estos procedimientos requieren anticuerpos y, hasta la fecha, los anticuerpos que se han producido no son específicos de la androstenona y tienen una reactividad cruzada significativa con otros compuestos esteroideos similares. Además, el radioinmunoensayo requiere sustancias que representan un peligro para la salud humana y, evidentemente, no pueden utilizarse en un entorno distinto a un laboratorio. Estos procedimientos son costosos y requieren equipos e instalaciones de alto coste.

Por último, también se ha propuesto la tecnología de resonancia en modo de corte de espesor (TSMR) (véase Di

Natale, C., Pennazza, G., Macagnano, A., Martinelli, E., Paolesse, R. y D'Amico, A. (2003) *Sensors & Actuators B* 91(1–3): 169–174) pero esto es muy inespecífico y detecta una gama de otros esteroides. También requiere mucho tiempo y requiere un equipo especial costoso.

5 Está claro que existe una necesidad urgente de un procedimiento mejorado para detectar la androstenona y/o el escatol que están asociados con el olor a verraco. La presente invención pretende dar a conocer un procedimiento para detectar androstenona y/o escatol que supere los problemas asociados con los procedimientos existentes. En particular, la presente invención tiene por objeto dar a conocer un procedimiento para detectar, preferentemente
10 cuantificar, androstenona y/o escatol que sea rápido, preciso y de bajo coste.

10 **Características de la invención**

Según un primer aspecto, la presente invención se refiere a una serie de sensores, tal como se cita en la reivindicación 1.

15 Según un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para detectar androstenona y escatol en un animal vivo, un cuerpo de animal muerto de animal o un producto cárnico, tal como se cita en la reivindicación 10. La presente invención se basa en la realización de que los procedimientos electroquímicos u
20 ópticos pueden utilizarse para dar a conocer procedimientos mejorados para detectar y monitorizar los productos químicos que están asociados con el olor a verraco. En particular, los sensores para su utilización en la presente invención pueden detectar androstenona y escatol de una manera rápida, precisa y de bajo coste.

25 La presente invención permite la detección simultánea o paralela tanto de escatol como de androstenona y puede dar a conocer niveles de escatol y androstenona en valores absolutos, lo que es importante debido a los diferentes umbrales de olor a verraco en diferentes países. La presente invención también dar a conocer por primera vez una forma práctica de detectar la presencia y monitorizar la concentración de androstenona y escatol directamente en
30 cuerpos de animales muertos, carne o incluso animales vivos, sin necesidad de preparación de las muestras.

30 En el caso de la androstenona, la presente invención utiliza el hecho de que ciertas enzimas pueden convertir la androstenona (5 α -androst-16-en-3-ona) en androstenol (5 α -androst-16-en-3-ol) y que esta conversión depende de la presencia de un cofactor NAD(P)H. En particular, se demostró que la 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa estaba asociada con el metabolismo de la androstenona en el hígado de un cerdo (véase Doran E., Whittington F.M., Wood
35 J.D. y McGiven J.D., *Chemico-Biological Interactions* 147 (2004) 141–149).

35 El documento US 4 791 057 A describe un procedimiento de ensayo altamente sensible para determinar un 3-hidroxiesteroide o 3-cetósido en una muestra utilizando NAD(P).

40 TALANTA, vol. 99, 16 de diciembre de 2012, páginas 697–702, XP028936756, ISSN 0039–9140 describe un biosensor enzimático para detectar la androstenona a base de la 3 α -hidroxiesteroide hidrogenasa inmovilizada sobre electrodos de material compuesto de nanotubos de carbono/RTIL/NAD⁺. Por lo tanto, el sensor del primer aspecto de la presente invención incluye NADH o NADPH y 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa, así como medios para detectar un cambio en la concentración de NADH o NADPH, comprendiendo los medios, como mínimo, un electrodo
45 o un dispositivo óptico.

45 NADH y NADPH se refieren a la forma reducida del dinucleótido nicotinamida adenina y del dinucleótido nicotinamida adenina fosfato respectivamente, que son bien conocidos en la técnica. Tanto el NADH como el NADPH actúan de la misma manera en la presente invención, por lo que pueden utilizarse cualquiera de los dos. Por NAD(P)H se entiende NADH o bien NADPH. La cantidad de NAD(P)H utilizada es variable y depende del electrodo,
50 de la actividad enzimática en la superficie del electrodo y de la concentración de androstenona que se va a analizar. Típicamente las cantidades estarían en el intervalo de μ g.

55 La enzima utilizada en el sensor es la 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa, habitualmente denominada HSD. Cuando esta enzima entra en contacto con androstenona, la androstenona es metabolizada por la enzima en una reacción redox en la que la androstenona se reduce a androstenol y el NAD(P)H se oxida a NAD(P)⁺. Se conocen dos formas de la 3-HSD (α y β) y ambas se pueden utilizar en el sensor de la presente invención. La forma α es preferente porque está disponible comercialmente, por ejemplo en Sigma-Aldrich Ltd, Diazyme Europe GmbH, mientras que la forma β requiere síntesis especializada, por ejemplo de Abnova.

60 En el procedimiento de la presente invención, puede utilizarse cualquier enzima que funcione de la misma manera que la 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa, es decir, cualquier enzima que metabolice la androstenona en presencia de NADH o NADPH.

65 Los sensores que incluyen la hidroxiesteroide deshidrogenasa se han sugerido anteriormente en diferentes contextos, véase el documento WO/99/19507 y Koide y otros, *Biosensors and Bioelectronics* 22 (2007) 2079 - 2085. No se ha sugerido que los sensores de estos documentos sean útiles con androstenona y, de hecho, no serían adecuados para su utilización en la detección de androstenona. Los sensores son sustancialmente diferentes de los

de la presente invención, como mínimo, en que implican la presencia inicial de NAD(P)^+ en lugar de la forma reducida NAD(P)H .

El sensor incluye también medios para detectar un cambio en la concentración de NADH o NADPH , comprendiendo los medios, como mínimo, un electrodo o un dispositivo óptico. Dado que la androstenona es metabolizada por la enzima en la reacción redox, el NADH o NADPH se convierte en la forma oxidada, NAD^+ o NADP^+ indicados anteriormente. Por lo tanto, detectando un cambio en la concentración de NADH o NADPH , el sensor detecta indirectamente la presencia de androstenona u otro analito metabolizado por la 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa en presencia de NADH o NADPH .

En una realización, se utiliza un dispositivo óptico para detectar un cambio en la concentración de NADH o NADPH . Por ejemplo, puede utilizarse un sistema combinado que comprende una fuente de una longitud de onda de luz adecuada y un detector (por ejemplo, un espectrómetro) para medir cualquier absorbancia de esta luz por el cofactor (NADH o NADPH) que podría alojarse en un recipiente/cubeta transparente. El cambio en la absorbancia puede estar relacionado con la concentración de androstenona. La concentración de androstenona también se pudo detectar por medio de la fluorescencia del cofactor. En ambos casos, la longitud de onda de la luz que se va a absorber es de 340 nm; para la medición de fluorescencia se pudo detectar la luz emitida a 450 nm.

En la realización preferente, los medios para detectar un cambio en la concentración de NADH o NADPH comprenden, como mínimo, un electrodo. En esta realización, el sensor utiliza electroquímica para detectar el analito. En esta realización, el sensor comprende, preferentemente, como mínimo, dos electrodos, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo/electrodo de referencia, más preferentemente tres electrodos, un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia. Ejemplos de configuraciones de electrodos que se han utilizado para otras aplicaciones de biosensores por parte de los inventores pueden encontrarse en otras publicaciones de los inventores (véase, Hart, J. P., Crew, A., Crouch, E., Honeychurch, K. C. y Pemberton, R. M. (2004) *Analytical Letters* 37(5): 789–830 y Hart, J. P., Crew, A., Crouch, E., Honeychurch, K. y Pemberton, R. M. (2007) *Comprehensive Analytical Chemistry*. S. Alegret y A. Merkoci. Amsterdam, Elsevier B.V. 49: Capítulo 23, 495–556).

Los electrodos pueden estar hechos de cualquier material adecuado conocido en la técnica. Los electrodos pueden comprender metales, por ejemplo oro, platino y plata. En una realización preferente, los electrodos comprenden un material de carbono que incluye, por ejemplo, carbono vítreo. Los electrodos pueden estar en cualquier forma, siendo las formas adecuadas bien conocidas por el experto en la materia de electroquímica. Sin embargo, es preferente que los electrodos estén serigrafiados. Pueden ser electrodos de carbono o metales serigrafiados. Son preferentes los electrodos serigrafiados porque son muy baratos de producir y son fáciles de utilizar, reproducibles, desechables (bajo riesgo de contaminación y seguros de utilizar por el técnico y en un ambiente de producción de alimentos) y se pueden fabricar fácilmente en una amplia gama de geometrías, por ejemplo cuadrados, rectángulos y discos. Es particularmente preferente utilizar electrodos de carbón serigrafiados (SPCE), ya que estos pueden ser incluso más baratos y más cómodos.

Los electrodos podrían fabricarse mediante serigrafía de una tinta de carbono comercialmente disponible con la adición del mediador de electrones dentro de la tinta o sobre la superficie del SPCE. El sustrato que contiene los SPCE podría ser uno de muchos sustratos inertes, por ejemplo, PVC o un material cerámico. En un diseño, el área del electrodo de carbono de trabajo está definida por una capa aislante y un contraelectrodo/electrodo de referencia de Ag/AgCl está dispuesto alrededor del electrodo de trabajo en un formato de "palo de hockey". La tinta de carbón para serigrafía adecuada para este fin puede obtenerse en Gwent Electronic Materials, así como las tintas de carbono de otros proveedores.

El NADH o NADPH y la 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa pueden utilizarse en el sensor en una solución que está en contacto con los electrodos. Sin embargo, en una realización preferente, el NADH o NADPH y la 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa se inmovilizan, como mínimo, en uno de los electrodos, preferentemente en el electrodo de trabajo. La inmovilización puede tomar varias formas, incluyendo el secado del cofactor/enzima sobre la superficie del electrodo, atrapándolos en una membrana sobre la superficie del electrodo, o reticulándolos químicamente directamente a la superficie del electrodo (electrodo de trabajo solamente en todos los casos). En cualquier sensor basado en enzimas es ventajoso minimizar la utilización de enzima y cofactor (muy caro) mientras se maximiza la señal generada en la superficie del electrodo.

En la realización que implica, como mínimo, un electrodo para detectar cambios en la concentración de NAD(P)H , se produce una reacción redox en el electrodo que permite la detección de la concentración de NAD(P)H . En una realización, la oxidación de NAD(P)H directamente en la superficie del electrodo para producir NAD(P)^+ . Por lo tanto, cuando se elimina una parte del NAD(P)H (debido a una reacción redox con un analito que es metabolizado por la enzima), la corriente de oxidación del NAD(P)H en el electrodo disminuye.

Sin embargo, es preferente que el sensor comprenda adicionalmente un mediador redox. La utilización de un mediador redox es ventajosa, ya que significa que se pueden utilizar bajos voltajes. Esto es en sí una ventaja muy significativa y potencialmente permite evitar señales de muchos compuestos que interfieren. Una ventaja adicional es que se puede mejorar la sensibilidad. Uno de tales mediadores redox es el azul de Meldola, que puede estar

integrado en una tinta de serigrafía y depositado sobre un sustrato para producir la geometría deseada del sensor. Otros mediadores que se pueden utilizar en el esquema de reacción anterior incluyen fenoxazinas y fenazinas, así como otras clases similares de especies redox que pueden funcionar a potenciales aplicados bajos. Otros mediadores adecuados que podrían utilizarse en la presente invención se desvelan en el documento WO99/19507. Véase también CHINESE JOURNAL OF ANALYTICAL CHEMISTRY, vol. 42, n.º 5, mayo de 2014, páginas 759–765, XP055225398, ISSN 1872–2040, que desvela biosensores de deshidrogenasa que utilizan electrodos modificados con nanotubos de carbono (CNT). En particular, se trata la función de los mediadores, tales como el azul de Meldola, para superar el alto sobrepotencial para la oxidación de NADH en dichos electrodos. Por lo tanto, un ejemplo preferente de fabricación de un sistema de detección de NAD(P)H es la utilización de un mediador soluble en agua, por ejemplo, azul de Meldola, que se prepara en una solución acuosa para mezclar con una formulación de carbono. A continuación, se imprime sobre el sustrato y se deja secar. A continuación, el biosensor se produce inmovilizando HSD y NAD(P)H sobre la superficie del electrodo de trabajo o dentro del electrodo de trabajo del SPCE.

Se utilice o no un mediador, se debe aplicar una diferencia de potencial a través de los electrodos y se debe explorar el sistema para determinar la corriente que surge de las reacciones redox que se producen. El sensor de la presente invención incluye, preferentemente, aparatos (por ejemplo, un potencióstato) para aplicar la diferencia de potencial y explorar los electrodos. Se podría emplear una amplia variedad de técnicas electroquímicas para explorar los sistemas descritos anteriormente; por ejemplo (pero sin limitaciones), voltamperometría cíclica, voltamperometría de corriente continua muestreada, voltamperometría de impulsos y sus variantes, incluyendo, voltamperometría de onda cuadrada, cronoamperometría y amperometría en solución agitada. El voltaje requerido depende de la especie, el pH y el tipo de electrodo; por ejemplo, para la oxidación de NAD(P)H utilizando el azul de Meldola-SPCE, el voltaje puede ser típicamente de +50 mV cuando se usa amperometría. Utilizando una técnica diferente, por ejemplo voltamperometría de barrido lineal, podría estar involucrado un intervalo de potenciales, por ejemplo, de -300 mV a +500 mV.

Según el primer aspecto de la presente invención, se da a conocer una matriz de sensores que incluye un sensor para androstenona y un sensor para detectar escatol, que comprende, como mínimo, un electrodo. De este modo, la presente invención permite la detección simultánea o paralela, preferentemente, la cuantificación, tanto de escatol como de androstenona.

Hay posibles disposiciones para la combinación de los dos sensores en el mismo dispositivo, que podría utilizarse para detectar olor a verraco. Por ejemplo, el dispositivo puede comprender: un dispositivo en línea en el que se toma una muestra o extracto a través de una sonda invasiva y se presenta a los sensores (individualmente o en combinación); un dispositivo en línea en el que los sensores (individualmente o en combinación) se presentan al material sujeto al análisis directamente en una sonda invasiva; o un dispositivo para la medición transcutánea en animales vivos.

El sensor de escatol (3-metil-indol) detecta la presencia de escatol mediante oxidación directa del escatol en la superficie del electrodo. En cuanto al sensor de androstenona, los electrodos pueden estar hechos de cualquier material adecuado conocido en la técnica, tal como oro, platino, plata y carbono y pueden estar en cualquier forma. Es preferente que los electrodos estén serigrafiados y es particularmente preferente la utilización de electrodos de carbono serigrafiados.

En una realización preferente, el sensor para escatol comprende un electrodo de trabajo serigrafiado (3x3 mm) rodeado por un electrodo de referencia/contraelectrodo de Ag/AgCl serigrafiado. La respuesta de la corriente para el escatol surge de la oxidación directa en la superficie del electrodo de carbono serigrafiado (SPCE).

Con respecto a la forma geométrica del sensor, se podría utilizar un diseño indicado previamente para medir el alcohol, véase Sprules, S. D., Hartley, I. C., Wedge, R., Hart, J. P. y Pittson, R. (1996 b) *Analytica Chimica Acta* 329(3): 215–221.

La medición del escatol puede llevarse a cabo en una solución tampón a un pH optimizado y una composición de sal tampón. La muestra puede explorarse de varias maneras, incluyendo las siguientes:

El electrodo se coloca en la solución tampón optimizada que contiene la muestra de carne/tejido macerada; el sobrenadante puede depositarse sobre la superficie del sensor de escatol; o mediante inserción directa del sensor de escatol en la carne/tejido del cuerpo de animal muerto/producto cárnico.

El sensor para detectar escatol comprende adicionalmente, de forma preferente, un aparato para explorar el sensor para detectar la oxidación del escatol en la superficie, como mínimo, de un electrodo. En cuanto a la androstenona; se requiere un potencióstato. El potencial depende de varios factores, por ejemplo, del pH, el tipo de membrana. En un ejemplo, los presentes inventores han utilizado voltamperometría de barrido lineal y escaneado el voltaje de -0,5 V a +1,5 V. Las señales aparecen en el rango +0,5 V a +1,5 V. Se puede emplear una amplia variedad de formas de onda electroquímicas, por ejemplo, voltamperometría cíclica, voltamperometría de corriente continua de muestreo, voltamperometría de impulsos y sus variantes, incluyendo voltamperometría de onda cuadrada, cronoamperometría

y amperometría en solución agitada.

THE ANALYST, vol. 138, no. 5, 28 de enero de 2013, página 1346, XP055225490, ISSN 0003-2654 describe la determinación voltamétrica de escatol como un marcador para el olor a verraco en muestras reales. La matriz de sensores de la presente invención se utiliza para detectar androstenona y escatol en un animal vivo, un cuerpo de animal muerto o un producto cárnico. Por lo tanto, el sensor puede insertarse directamente en un animal vivo, un cuerpo de animal muerto o un producto cárnico, preferentemente en el que el animal es un cerdo, de la forma más preferente, en el que el sensor se inserta en el tejido adiposo subcutáneo de un cerdo. Otra realización de la presente invención se refiere a un procedimiento para poner en contacto el sensor con el animal vivo, una muestra del animal vivo, el cuerpo de animal muerto, una muestra del cuerpo de animal muerto, el producto cárnico o una muestra del producto cárnico. Una ventaja de la presente invención en comparación con los procedimientos de la técnica anterior es que puede utilizarse directamente sobre un animal vivo, un cuerpo de animal muerto o un producto cárnico. Esto representa una mejora significativa con respecto a la necesidad de tomar muestras y analizarlas de forma remota, aunque también pueden analizarse muestras en la presente invención. Por consiguiente, la matriz de sensores se utiliza directamente sobre un animal vivo, un cuerpo de animal muerto o un producto cárnico en forma de una sonda que es adecuada para la inserción en el animal vivo, el cuerpo de animal muerto o el producto cárnico. Son posibles varios enfoques. Un dispositivo puede permitir el contacto entre la superficie del sensor y el tejido del animal; esto podría ser un dispositivo de extremos afilados que permita una fácil penetración en el cuerpo de animal muerto. Este dispositivo podría tener dimensiones, por ejemplo, de ancho 0,5-1,5 cm y longitud 1-2 cm. Sin embargo, estas dimensiones pueden reducirse espectacularmente mediante la utilización de microelectrodos que están en el intervalo de 50-100 μm . La parte frontal de la sonda (que puede albergar los sensores) se insertaría en la grasa subcutánea para permitir la medición directa de los dos compuestos del olor a verraco. La sonda puede adoptar la forma de un dispositivo sólido con los sensores sobre una superficie externa que permite que los sensores entren en contacto con el tejido directamente a medida que se inserta o un dispositivo que contiene los sensores dentro de un alojamiento protector que permite el contacto entre el sensor y el tejido a través de una abertura en el extremo. Este último podría manejarse mediante una de diversas maneras; por ejemplo, se podría extraer fluido biológico hacia la sonda de forma activa o pasiva para su exploración; el primero puede requerir un dispositivo de tipo pistón.

30 Figuras

A continuación se describirán los procedimientos y disposiciones de los sensores según la presente invención, solo a modo de ejemplo, con referencia a los dibujos adjuntos, figuras 1-13.

35 La figura 1 muestra un esquema de reacción para la androstenona en electrodos de carbono serigrafados (SPCE) modificados, en los que M_{ox} y M_{red} son las formas oxidadas y reducidas del mediador;

la figura 2 muestra el formato de los electrodos de carbono serigrafados que comprenden azul de Meldola (MB-SPCE) conectados mediante pinzas de oro a un potencióstato;

40 la figura 3 muestra la respuesta de la corriente de MB-SPCE a adiciones de 5×10^{-5} M de NADH añadido a una solución libre de tampón fosfato 50 mM a pH 7; potencial aplicado +50 V frente a Ag/AgCl;

45 la figura 4 muestra la respuesta de la corriente de MB-SPCE a adiciones de 1×10^{-5} M de androstenona añadida a una solución libre de NADH 5×10^{-5} M con 10 U de HSD en tampón fosfato 50 mM a pH 7; potencial aplicado +50 V frente a Ag/AgCl;

la figura 5 muestra la respuesta cronoamperométrica de los MB-SPCE al NADH añadido a la solución libre de tampón de fosfato 50 mM a pH 7;

50 la figura 6 muestra la respuesta cronoamperométrica de los MB-SPCE a la androstenona añadida a la solución libre de NADH 5×10^{-5} M con 10 U de 3α -HSD en tampón de fosfato 50 mM a pH 7;

55 la figura 7 muestra los datos cronoamperométricos para el biosensor que comprenden 2U de HSD con 60 μg de NADH en una solución de tampón de fosfato 50 mM a pH 7 y NaCl 0,1M con androstenona 0, 1 o 5 μM ;

la figura 8 muestra la calibración cronoamperométrica de los biosensores de HSD con androstenona. Datos tomados de los valores de la corriente a 240 y 300 segundos; se utilizaron biosensores individuales para cada concentración;

60 la figura 9 muestra la oxidación electroquímica directa del escatol (3-metil-indol) que puede tener lugar en la superficie de un SPCE.

La figura 10 muestra la voltamperometría cíclica utilizando un D14-SPCE de escatol 0,5 mM en tampón a pH 8.

65 La figura 11 muestra un gráfico de calibración para el escatol utilizando amperometría en solución agitada con un D14-SPCE.

La figura 12 muestra los resultados del análisis directo de androstenona en tejido adiposo.

La figura 13 muestra los resultados del análisis directo de escatol en tejido adiposo.

Descripción detallada de la invención

A continuación, se describen realizaciones preferentes de la presente invención con referencia a las figuras.

La figura 1 muestra un esquema de reacción para la androstenona en electrodos de carbono serigrafiados (SPCE) modificados, en los que M_{ox} y M_{red} son las formas oxidadas y reducidas del mediador. En este sistema, la respuesta analítica surge de la oxidación electrocatalítica de NAD(P)H que implica un mediador redox (M_{ox}/M_{red}). La corriente electrocatalítica máxima se produce en ausencia de androstenona; en presencia de este analito se retira algo de NAD(P)H del grupo sobre la superficie del electrodo, por lo que la señal electrocatalítica disminuye. Esta disminución de la respuesta es proporcional a la concentración de ion androstenona presente en la muestra.

El esquema de reacción anterior también podría funcionar en ausencia del mediador de electrones, en el que la oxidación se produce directamente en la superficie del electrodo.

Fabricación y evaluación del sensor electroquímico de NAD(P)H

Los presentes inventores han demostrado un ejemplo de la medición electroquímica de NADH (pero podría incorporar NADPH) en solución. Se produjeron los electrodos de carbono serigrafiados (SPCE) que contenían el azul de Meldola (MB-SPCE). El MB-SPCE comprendía un electrodo de carbono basado en agua con un área activa de $3 \times 3 \text{ } \mu\text{m}$ definida por una capa aislante. Esto se fabricó mediante serigrafía de una tinta preparada mezclando una solución acuosa de azul de Meldola con la cantidad apropiada de los componentes de tinta base. Un electrodo de referencia/contraelectrodo de Ag/AgCl se dispuso alrededor del electrodo de trabajo en un formato de "palo de hockey" (véase la figura 2, que muestra el formato del MB-SPCE conectado mediante pinzas de oro a un potencióstato).

Después de la fabricación del transductor, se realizaron estudios iniciales utilizando amperometría en solución agitada para demostrar la viabilidad de explotar la oxidación electrocatalítica de NADH para optimizar el ensayo. La figura 3 se refiere a la respuesta de la corriente de los MB-SPCE a adiciones de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ de NADH añadido a una solución libre de tampón fosfato 50 mM a pH 7; potencial aplicado +50 mV frente a Ag/AgCl. La figura 3 muestra que existe una relación lineal entre las respuestas de la corriente en estado estacionario y la concentración de NADH. Este intervalo de concentración abarca el intervalo que se requiere para el funcionamiento del biosensor, mostrando por lo tanto que los MB-SPCE son capaces de medir NADH en el intervalo de concentración deseado.

No hubo una respuesta de corriente con la adición de la enzima en solución, lo que demuestra que no hubo interacción entre el cofactor y 3 α -HSD. A continuación se examinó la respuesta de los MB-SPCE a las adiciones de androstenona en soluciones que contenían NADH junto con HSD. La figura 4 se refiere a la respuesta de la corriente de MB-SPCE a adiciones de $1 \times 10^{-5} \text{ M}$ de androstenona añadida a una solución libre de NADH $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ con 10 U de HSD en tampón fosfato 50 mM a pH 7; potencial aplicado +50 mV frente a Ag/AgCl. La figura 4 muestra la reducción de la corriente correspondiente con adiciones de androstenona 10 μM , causada por la retirada de NADH durante la conversión de androstenona en androstenol por la HSD (como se muestra en la figura 1). Este comportamiento demuestra que la combinación de MB-SPCE y la enzima libre/NADH se pueden utilizar para determinar la concentración de androstenona en solución.

Los sensores, junto con reactivos solubilizados, se analizaron adicionalmente utilizando cronoamperometría, que se trata más adelante para el funcionamiento de los biosensores. En esta técnica, los sensores se mantienen inicialmente en circuito abierto durante un tiempo fijo, después se aplica un potencial de oxidación adecuado que da como resultado la respuesta de corriente; esto se mide durante un periodo de tiempo definido. La figura 5 se refiere a la respuesta cronoamperométrica de los MB-SPCE al NADH añadido a la solución libre de tampón de fosfato 50 mM a pH 7. La figura 5 muestra que las respuestas de corriente se tomaron a 60 segundos y se encontró que aumentaban en proporción a la concentración de NADH en el intervalo de concentración 0-50 μM . La figura 6 se refiere a la respuesta cronoamperométrica de los MB-SPCE a la androstenona añadida a la solución libre de NADH $5 \times 10^{-5} \text{ M}$ con 10 U de 3 α -HSD en tampón de fosfato 50 mM a pH 7. La figura 6 muestra que, por el contrario, la respuesta de corriente a 60 segundos se redujo con el aumento de la concentración de androstenona en el intervalo de concentración de 0-50 μM .

Fabricación y evaluación del biosensor electroquímico de androstenona

Los biosensores se produjeron inmovilizando 3 α -HSD y NADH (Sigma-Aldrich) (60 μg) sobre la superficie del MB-SPCE (la inmovilización podría llevarse a cabo mediante incorporación directa de los componentes directamente en la tinta). La disminución de la corriente amperométrica producida fue significativamente mayor con 2 U de la enzima inmovilizada sobre la superficie del electrodo. Por lo tanto, se utilizaron 2 U de HSD para otros estudios de

biosensores.

5 Estos biosensores se utilizaron para analizar soluciones tamponadas que contenían androstenona 0, 1 o 5 μM . Estas concentraciones representan aproximadamente las concentraciones que se podrían esperar que un biosensor analizara en un extracto de tejido adiposo u otras muestras adecuadas de tejido para la detección de olor a verraco. Los cronoamperogramas se presentan en la figura 7 que se refiere a los datos cronoamperométricos para el biosensor que comprenden 2U de HSD con 60 μg de NADH en una solución de tampón de fosfato 50 mM a pH 7 y NaCl 0,1M con androstenona 0, 1 o 5 μM . La figura 7 muestra claramente la reducción de la corriente a concentraciones de androstenona más altas; esta diferencia de corriente es proporcional a la concentración del analito.

10 En el ejemplo anterior, se obtiene una corriente estable a 240 segundos, después de lo cual la reducción de corriente es proporcional a la concentración de androstenona. La figura 8 muestra la calibración cronoamperométrica de los biosensores de HSD con androstenona. Datos tomados de los valores de la corriente a 240 y 300 segundos; se utilizaron biosensores individuales para cada concentración. De hecho, la reducción de la corriente a 240 y 300 segundos es directamente proporcional a la concentración de androstenona, como se puede ver en la figura 8.

15 Estos biosensores también se utilizaron para el análisis directo de androstenona en el tejido adiposo. En este experimento, se añadió androstenona a cada concentración en una de las cinco submuestras en aproximadamente 5-6 g de peso. La androstenona se disolvió en metanol y se introdujo en las muestras de grasa (un máximo de 10 μl de volumen). Después de evaporar el metanol, se selló cada muestra en un recipiente estéril durante 24 horas antes del análisis. El análisis se realizó insertando el biosensor en una incisión realizada en el tejido utilizando un bisturí quirúrgico. Los resultados se dan en la figura 12 y muestran claramente que se obtuvo una respuesta incrementada con el aumento de la concentración de androstenona.

25 **Fabricación y evaluación del sensor de escatol**

Los presentes inventores han demostrado un ejemplo de la medición electroquímica de escatol en solución. Esto implica la utilización de un electrodo de carbono serigrafiado (SPCE) que se coloca en una solución tampón acuosa que contiene escatol. El electrodo de trabajo serigrafiado (3x3mm) está rodeado por un electrodo de referencia/contraelectrodo de Ag/AgCl serigrafiado. La respuesta de la corriente para el escatol surge de la oxidación directa en la superficie del electrodo de carbono serigrafiado (SPCE) (véase la figura 9).

30 La figura 10 muestra una respuesta voltamperométrica cíclica típica obtenida con un SPCE utilizando una solución que comprende escatol 0,5 mM en una solución tampón de pH 8,0. Claramente se obtuvo una respuesta bien definida que era el resultado de una reacción de oxidación (véase la figura 9). En condiciones optimizadas también fue posible medir el escatol en presencia de indol. Se realizó un estudio de calibración utilizando la técnica conocida como amperometría en solución agitada; se descubrió que la respuesta de escatol era lineal sobre el intervalo de concentración estudiado 0,5-20 μM (figura 11).

40 El sensor de escatol fabricado también se utilizó para el análisis directo de escatol en tejido adiposo. Este experimento se realizó exactamente del mismo modo que el análisis de la androstenona en el tejido adiposo, pero con la utilización del sensor de escatol en lugar del biosensor de androstenona. Los resultados se dan en la figura 13 y muestran que el análisis directo del escatol es factible a lo largo del intervalo de concentración necesario para la detección del olor a verraco.

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Matriz de sensores para detectar androstenona y escatol en un animal vivo, una muestra del animal vivo, un cuerpo de animal muerto, una muestra del cuerpo de animal muerto, un producto cárnico o una muestra del producto cárnico, comprendiendo la matriz de sensores:
- 10 (a) un sensor para androstenona que comprende NADH o NADPH; una enzima que metaboliza la androstenona en presencia de NADH o NADPH; y medios para detectar un cambio en la concentración de NADH o NADPH, comprendiendo los medios, como mínimo, un electrodo o un dispositivo óptico; y
- 10 (b) un sensor para detectar escatol que comprende, como mínimo, un electrodo;
- 15 **caracterizado por que** la matriz de sensores está situada en una sonda o sobre la misma que puede ponerse en contacto con el animal vivo, una muestra del animal vivo, el cuerpo de animal muerto, una muestra de el cuerpo de animal muerto, el producto cárnico o una muestra del producto cárnico; y
- 15 la matriz de sensores permite la detección simultánea o paralela de los niveles tanto de escatol como de androstenona mediante la detección de un cambio en el nivel de NADH o NADPH causado por el metabolismo de la androstenona utilizando, como mínimo, un electrodo o el dispositivo óptico del sensor (a) y la detección de escatol utilizando el electrodo del sensor (b).
- 20 2. Matriz de sensores, según la reivindicación 1, en la que los medios para detectar un cambio en la concentración de NADH o NADPH comprenden, como mínimo, un electrodo, preferentemente, como mínimo, dos electrodos, unos electrodos de trabajo y un contraelectrodo/electrodo de referencia, más preferentemente tres electrodos, un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia.
- 25 3. Matriz de sensores, según la reivindicación 2, en la que, como mínimo, uno de los electrodos comprende carbono, preferentemente en el que el electrodo de trabajo comprende carbono, de forma más preferente en el que los electrodos son electrodos de carbono serigrafiados.
- 30 4. Matriz de sensores, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la enzima que metaboliza la androstenona en presencia de NADH o NADPH es 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa.
- 35 5. Matriz de sensores, según la reivindicación 4, en la que el NADH o NADPH y la 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa se inmovilizan, como mínimo, en uno de los electrodos, preferentemente en el que están inmovilizados sobre el electrodo de trabajo.
- 40 6. Matriz de sensores, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el sensor (a) comprende adicionalmente un mediador redox, preferentemente en el que el mediador redox es azul de Meldola.
- 40 7. Matriz de sensores, según la reivindicación 1, en la que el sensor para detectar escatol comprende adicionalmente un aparato para explorar el sensor con voltamperometría cíclica, voltamperometría de corriente continua de muestra, voltamperometría de impulsos, voltamperometría de onda cuadrada, cronoamperometría o amperometría para detectar la oxidación de escatol en la superficie del, como mínimo, un electrodo.
- 45 8. Matriz de sensores, según la reivindicación 1 o 7, en la que el sensor para detectar escatol incluye, como mínimo, dos electrodos, un electrodo de trabajo y un contraelectrodo/electrodo de referencia, más preferentemente tres electrodos, un electrodo de trabajo, un contraelectrodo y un electrodo de referencia, en el que el, como mínimo, uno de los electrodos comprende carbono, de forma más preferente en el que los electrodos son electrodos de carbono serigrafiados.
- 50 9. Matriz de sensores, según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en forma de una sonda para inserción en el tejido adiposo subcutáneo de un cerdo.
- 55 10. Procedimiento para detectar androstenona y escatol en un animal vivo, una muestra del animal vivo, un cuerpo de animal muerto, una muestra del cuerpo de animal muerto, un producto cárnico o una muestra del producto cárnico, comprendiendo el procedimiento las etapas de:
- (i) dar a conocer una matriz de sensores situada en una sonda o sobre la misma y que comprende:
- 60 (a) un sensor para androstenona que comprende NADH o NADPH; una enzima que metaboliza la androstenona en presencia de NADH o NADPH; y medios para detectar un cambio en la concentración de NADH o NADPH, comprendiendo los medios, como mínimo, un electrodo o un dispositivo óptico; y
- (b) un sensor para detectar escatol que comprende, como mínimo, un electrodo;
- 65 estando el procedimiento **caracterizado por**
- (ii) poner en contacto la sonda con el animal vivo, una muestra del animal vivo, el cuerpo de animal muerto, una muestra del cuerpo de animal muerto, el producto cárnico o una muestra del producto cárnico; y

(iii) detectar un cambio en el nivel de NADH o NADPH causado por el metabolismo de la androstenona, utilizando, como mínimo, un electrodo o el dispositivo óptico del sensor en (a) y detectar escatol utilizando el electrodo del sensor (b).

- 5 11. Procedimiento, según la reivindicación 10, en el que la enzima es 3-hidroxiesteroide deshidrogenasa.
12. Procedimiento, según la reivindicación 10 u 11, en el que la sonda se pone en contacto con una muestra de un animal vivo o de un cuerpo de animal muerto, preferentemente en la que el animal es un cerdo.
- 10 13. Procedimiento, según la reivindicación 12, en el que la sonda se inserta en un animal vivo, un cuerpo de animal muerto o un producto cárnico, preferentemente en el que el animal es un cerdo, de la forma más preferente, en el que el sensor se inserta en el tejido adiposo subcutáneo de un cerdo.

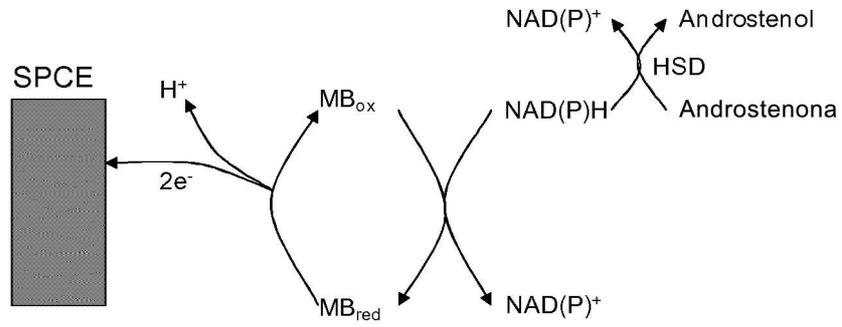


Figura 1

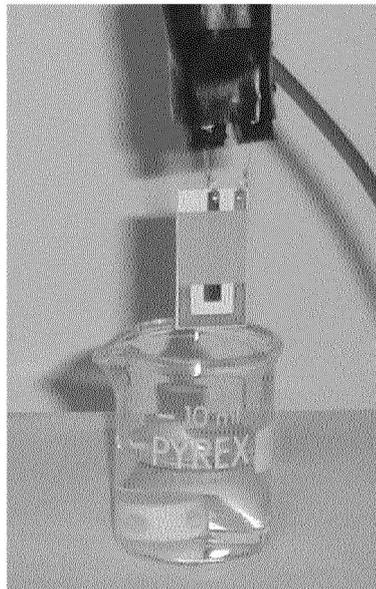


Figura 2

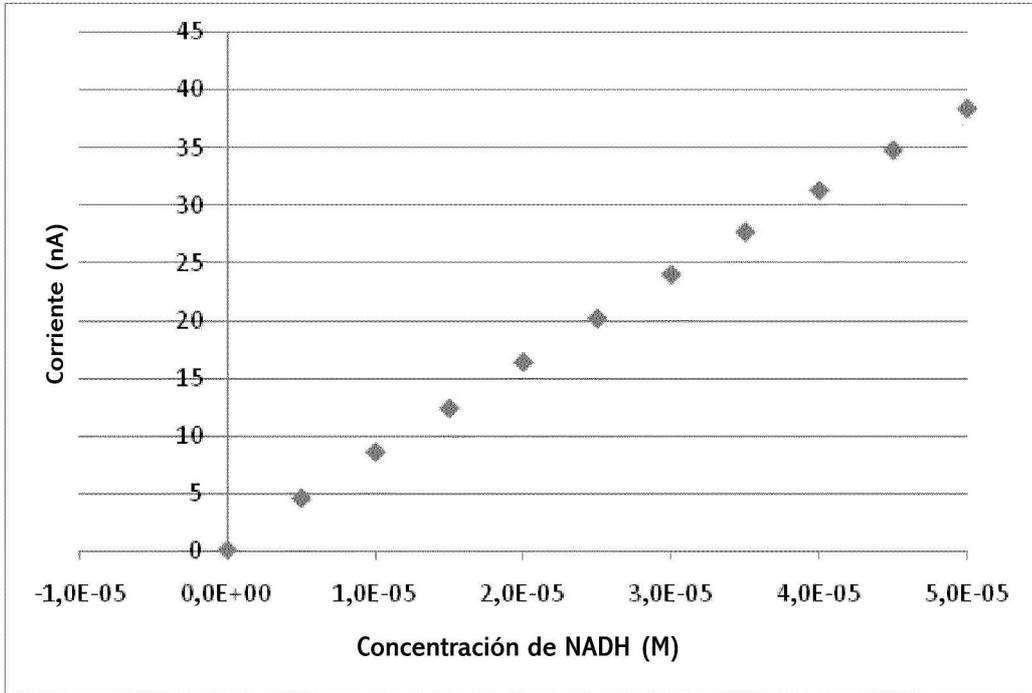


Figura 3

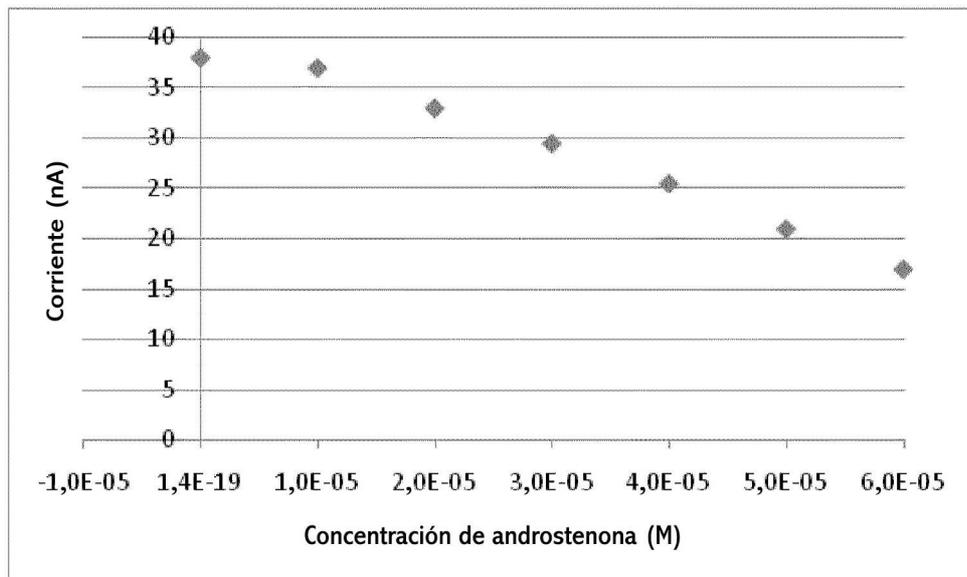


Figura 4

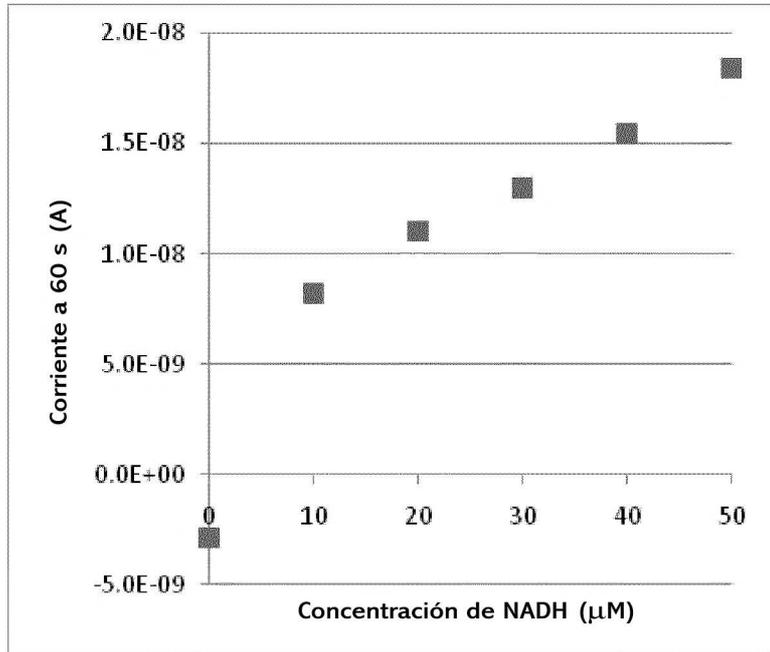


Figura 5

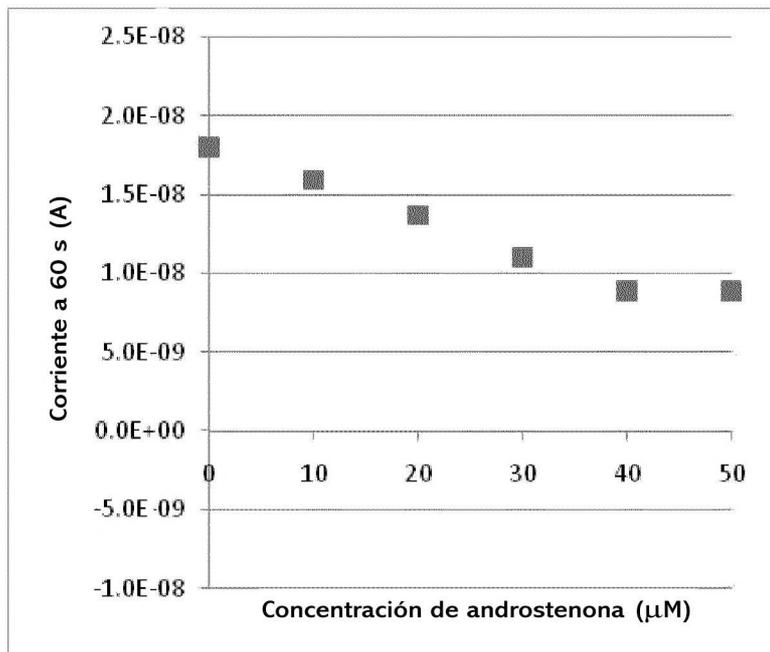


Figura 6

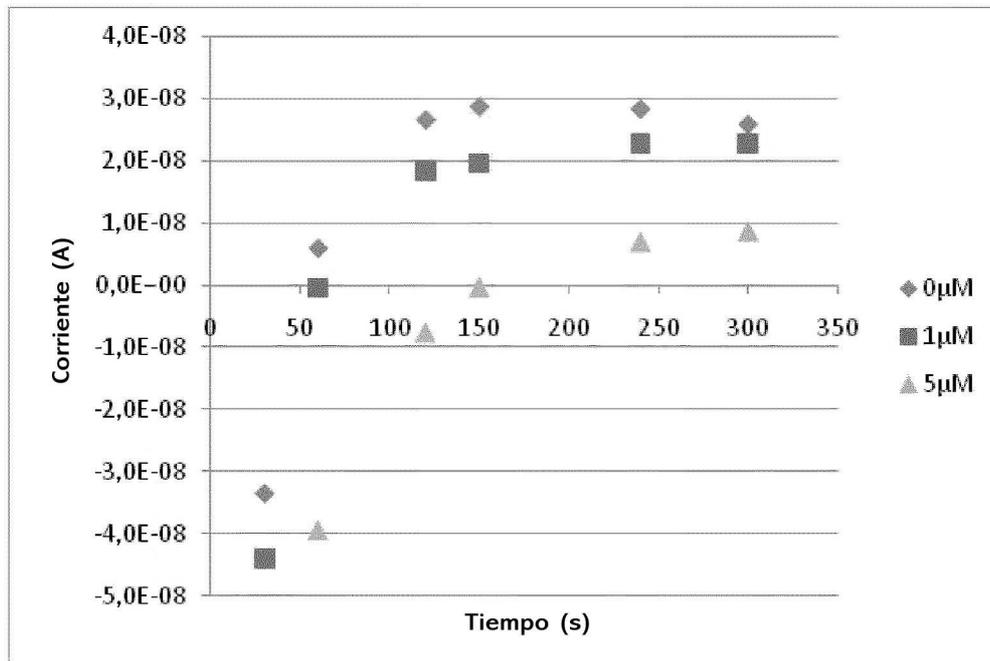


Figura 7

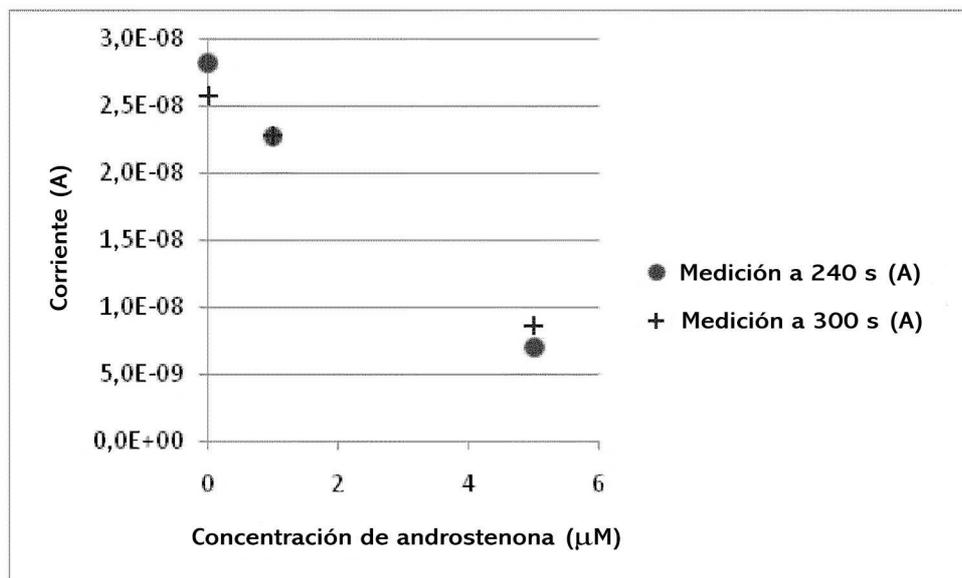


Figura 8

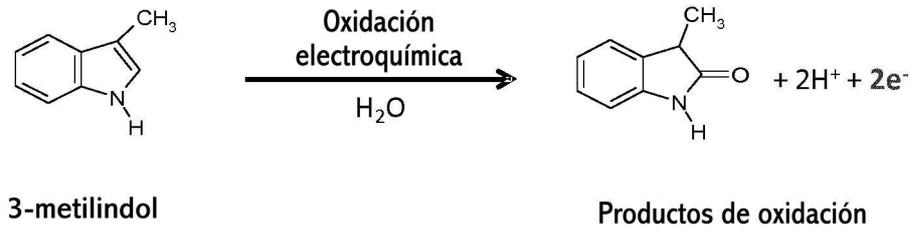


Figura 9

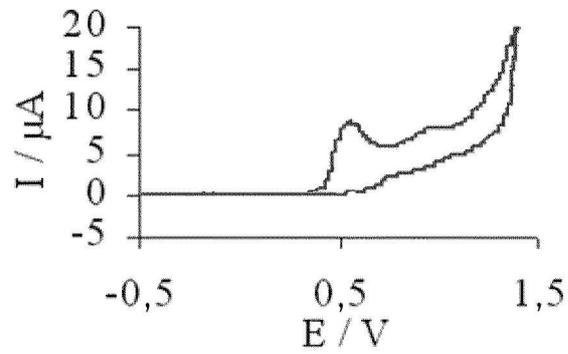


Figura 10

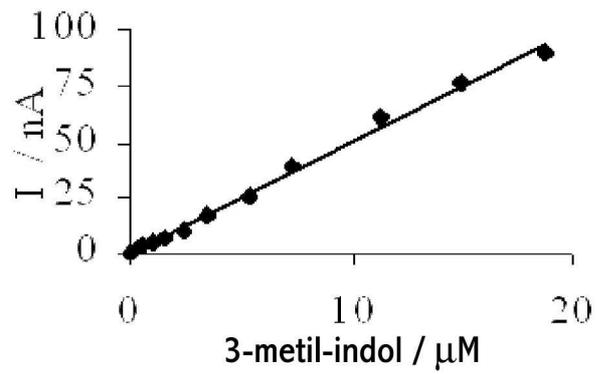


Figura 11

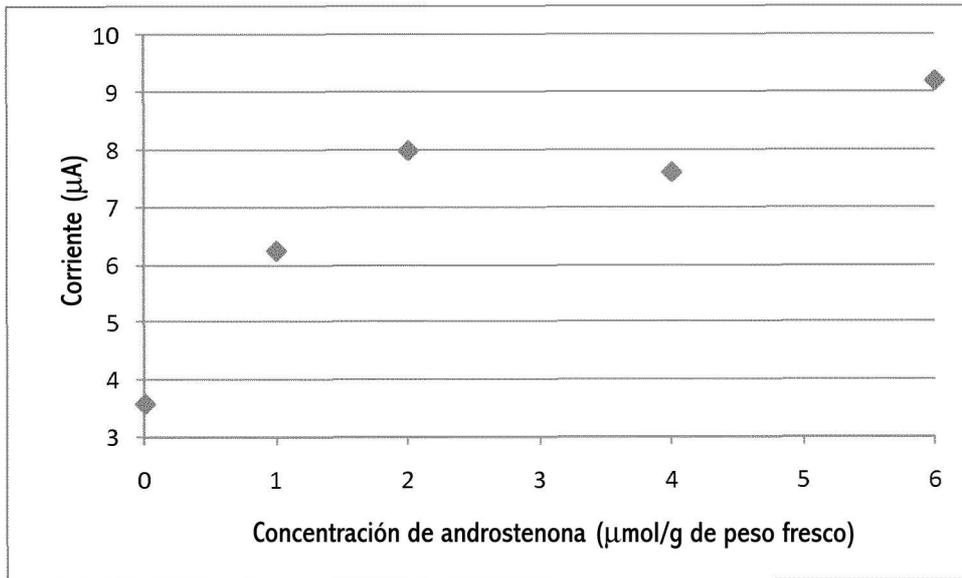


Figura 12

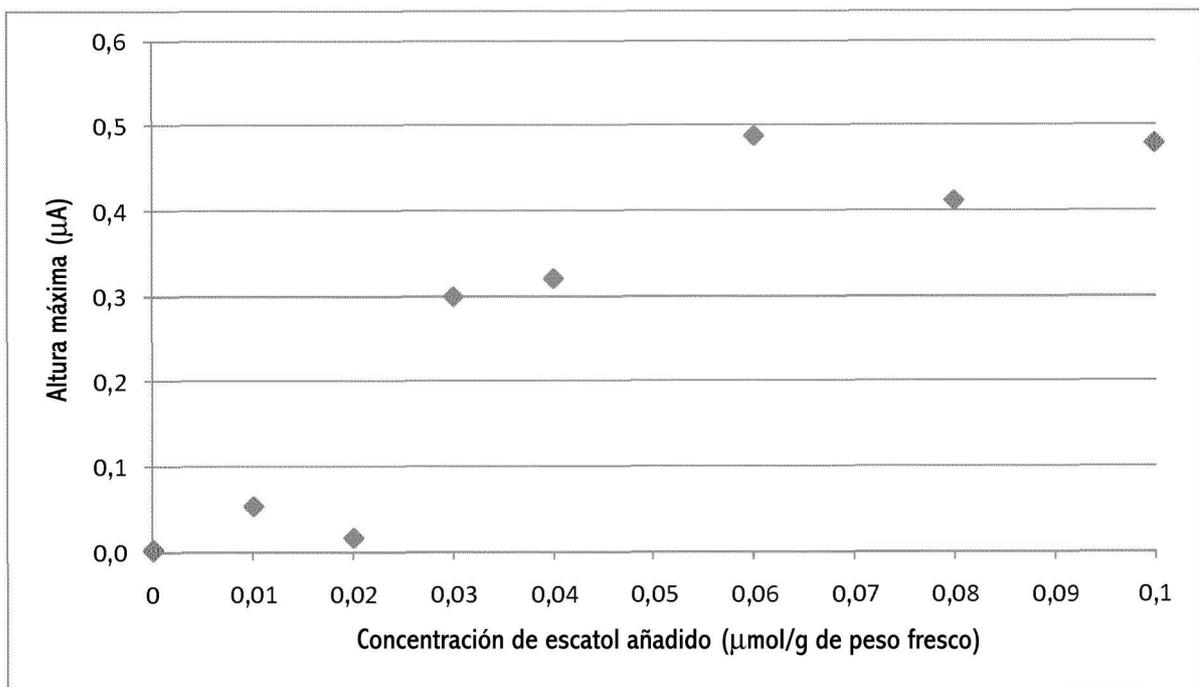


Figura 13