



Universidad
Zaragoza

Trabajo Fin de Grado

Biosensor enzimático quimiluminiscente para la determinación de aminas biógenas basado en la reacción luminol-peróxido de hidrógeno

Chemiluminiscent enzymatic biosensor for biogenic amines determination based on the luminol-hydrogen peroxide reaction

Autor

Tomás Ruesca Duro

Directora

Susana de Marcos Ruiz

Departamento de Analítica. Facultad de Ciencias
2018-2019

Este trabajo ha sido realizado con cargo al Proyecto CTQ2016-76846R (MINECO) y las ayudas a grupos de investigación DGA-FEDER (E25_17R).

RESUMEN

Las aminas biógenas son compuestos nitrogenados de bajo peso molecular que presentan funciones biológicas importantes en el organismo de seres vivos. Se producen mediante descarboxilación selectiva de determinados aminoácidos, proceso llevado a cabo por microorganismos, generalmente bacterias. Sin embargo, en concentraciones elevadas pueden suponer riesgos en la salud de estos. Por este motivo, es necesario elaborar métodos rápidos de determinación de dichas aminas biógenas, que sean fiables y sencillos.

En este trabajo de fin de grado se ha elaborado un método rápido para la determinación de aminas biógenas mediante señales quimiluminiscentes, que son la base de un biosensor enzimático. Estas señales son obtenidas al reaccionar el H_2O_2 con luminol, el cual se oxida generando luz. Esta reacción luminol/ H_2O_2 necesita de la presencia de un catalizador el cual, en la mayoría de los casos, se acopla con la reacción enzimática entre el peróxido y la peroxidasa de rábano picante (HRP), siendo el Fe(II) presente en el grupo hemo de la enzima el que actúa como catalizador.

El método propuesto para la determinación de putrescina se basa en la reacción enzimática con Diamino Oxidasa (DAO), en la que se genera H_2O_2 y en la utilización de las propiedades catalíticas del centro metálico (Cu(II)) de la enzima en sustitución HRP. Sin embargo en la concentración en la que se encuentra el Cu(II) en la enzima, no presenta poder catalítico notable. Por ello, se consiguió eliminar el Cu(II) e insertar Co(II), obteniéndose una actividad catalítica suficiente, con un rango lineal de $2,43 \cdot 10^{-6}$ M hasta a 10^{-4} M de putrescina y una DSR(%) de 3,43%. También se comprobó que la cadaverina podía ser determinada con este método quimiluminiscente, si bien para esta amina se tiene menor sensibilidad.

Con Tiramina oxidasa TAO-Co(II) resultó imposible dado que las aminas biógenas con las que reacciona (tiramina, tirosina y feniletilamina) presentan anillos aromáticos, los cuales desactivan la quimiluminiscencia (*quencher*).

ABSTRACT

Biogenic amines are low molecular weight nitrogen compounds that have important biological functions in the organism of living beings. They are produced by selective decarboxylation of certain amino acids, a process carried out by microorganisms, usually bacteria. However, in high concentrations they may entail health risks. For this reason, it is necessary to develop fast methods for the determination of said biogenic amines, which are reliable and simple.

In this thesis project, a rapid method has been developed for the determination of biogenic amines using chemiluminescent signals, based on the use of enzymatic biosensors. These signals are obtained by the H_2O_2 with luminol reacting, which oxidizes generating light. This luminol / H_2O_2 reaction requires the presence of a catalyst which, in most cases, is coupled with the enzymatic reaction between peroxide and horseradish peroxidase (HRP), with Fe(II) present in the heme group of the enzyme that acts as a catalyst.

The proposed method for the determination of putrescine is based on the enzymatic reaction with Diamino Oxidase (DAO), in which H_2O_2 is generated and in the use of the catalytic properties of the metallic center (Cu(II)) of the enzyme in substitution HRP. However, in the concentration in which the Cu(II) is found in the enzyme, it does not present remarkable catalytic power. Therefore, it was possible to eliminate Cu(II) and insert Co(II), obtaining a sufficient catalytic activity, with a linear range of $2,43 \cdot 10^{-6}$ M up to 10^{-4} M putrescine and one DSR (%) of 3,43%. It was also proved that cadaverine could be determined with this chemiluminescent method, although for this amine there is less sensitivity.

With Tyramine oxidase TAO-Co(II) it was impossible given that the biogenic amines with which it reacts (tyramine, tyrosine and phenylethylamine) present aromatic rings, which deactivate the chemiluminescence (quencher).

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Definición de aminas biógenas	1
1.2.	Aminas biógenas presentes en alimentos	1
1.3.	Importancia de la determinación.....	2
1.4.	Definición de biosensor óptico	2
1.5.	Antecedentes del método	3
2.	OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO	4
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	5
3.1.	Reactivos y disoluciones	5
3.1.1.	Aminas	5
3.1.2.	Enzimas.....	5
3.1.3.	Reactivos y disoluciones generales	5
3.2.	Instrumentos y materiales	6
3.2.1.	Instrumentos	6
3.2.2.	Materiales y aparatos.....	6
3.3.	Procedimiento operativo	6
4.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
4.1	Estudios previos	8
4.2	Estudios de la reacción DAO con putrescina	9
4.3	Estudio de la capacidad catalítica del Cu(II).....	12
4.4	Optimización de Co(II).....	12
4.5	Capacidad catalítica de Co(II) unido a proteína	14
4.6	Pruebas con TAO.....	15
4.7	Pruebas con DAO	19
4.7.1.	Optimización.....	20
4.7.2.	Calibración y repetibilidad del método	20
4.7.3.	Determinación de cadaverina	22
5.	CONCLUSIONES	23
6.	BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	25
7.	ANEXO 1	26

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de aminas biógenas

Las aminas biógenas son compuestos orgánicos nitrogenados de bajo peso molecular que actúan, generalmente, como neurotransmisores. Pueden ser clasificadas en función de su procedencia, aminas biológicas exógenas, en las que se incluyen aquellas que son ingeridas a través de los alimentos o endógenas, formadas durante los procesos metabólicos normales de las células vivas, a partir de la degradación de moléculas biológicas como proteínas o aminoácidos.

Son producidas por microorganismos, generalmente bacterias, mediante descarboxilación selectiva de determinados aminoácidos, en la cual se elimina el grupo carboxilo con la formación de la correspondiente amina y CO₂ (figura 1).

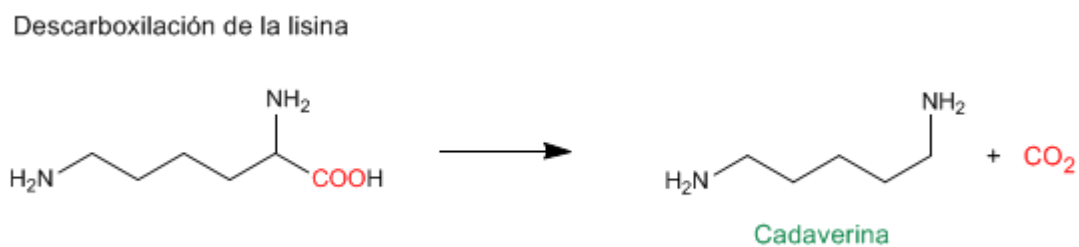


Figura 1: Descarboxilación del aminoácido lisina para generar la amina biógena cadaverina.

1.2. Aminas biógenas presentes en alimentos

Las aminas biógenas son producidas en los alimentos por la acción descarboxilasa mencionada anteriormente y llevada a cabo por microorganismos sobre los aminoácidos libres.

Por este motivo hay parámetros que son determinantes, de los cuales depende la concentración de aminas biógenas en los alimentos¹:

- Presencia de microorganismos con actividad enzimática descarboxilasa.
- Presencia de aminoácidos libres en los alimentos.
- Medio ligeramente ácido, el cual incrementa la capacidad descarboxilasa de los microorganismos.
- Temperatura. Este factor es muy importante, debido a que cada microorganismo presenta unas temperaturas óptimas de crecimiento. Por lo tanto, cuanto mayor sea la cantidad de estos determinados microorganismos, mayor será la descarboxilación de los aminoácidos.
- Sal. Aumentar la concentración de sal en los alimentos reduce la actividad metabólica de descarboxilación de los microorganismos, por lo que se reduce la concentración de aminas biógenas.

Las aminas biógenas más abundantes en los alimentos² se muestran en la figura 2.

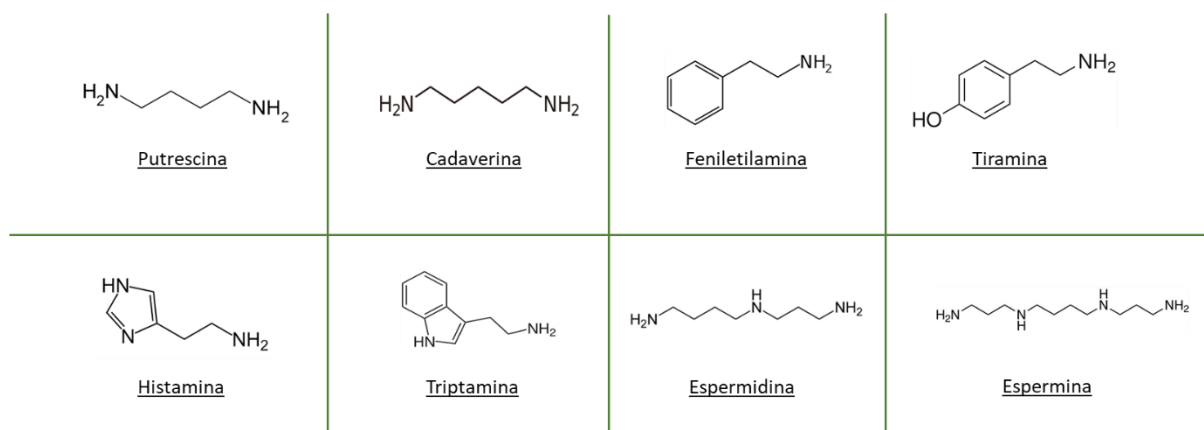


Figura 2: Estructura de las principales aminas biógenas.

Estas aminas biógenas pueden clasificarse atendiendo a varios criterios.

En primer lugar, si se tiene en cuenta el número de grupos amino de las cadenas, encontramos aminas monoatómicas (feniletilamina, tiramina, histamina y triptamina), diaminas (putrescina y cadaverina) o poliatómicas (espermidina y espermina).

En segundo lugar, si se tiene en cuenta la estructura química de las aminas, encontramos aminas aromáticas (tiramina y feniletilamina), heterocíclicas (triptamina e histamina) o alifáticas (putrescina, cadaverina, espermina y espermidina).

1.3. Importancia de la determinación

Las aminas biógenas son muy importantes para los seres vivos ya que, como se ha mencionado anteriormente, presentan funciones neurológicas. Sin embargo, en elevadas concentraciones pueden ser tóxicas y, por lo tanto, perjudiciales para la salud del individuo. Estas concentraciones tóxicas son el resultado de la ingesta de distintos alimentos en mal estado (quesos, pescados, vegetales y bebidas fermentadas)³.

El organismo de los mamíferos consta de un tracto intestinal capaz de metabolizar aminas biógenas mediante el uso de enzimas, como la Diamino Oxidasa (DAO), capaz de llevar a cabo la oxidación de dichas aminas biógenas. A pesar de esto, las aminas biógenas pueden encontrarse en elevadas concentraciones en el organismo, debido a un mal funcionamiento de las enzimas oxidadas, a una inhibición de las mismas (mediante algún tratamiento médico) o por una ingesta de elevados niveles de aminas biógenas, las cuales no pueden metabolizarse por la acción de las enzimas.

Por estos motivos, es importante desarrollar métodos analíticos que permitan una determinación rápida y sencilla de estas aminas. Para ello, se van a sentar las bases para el desarrollo de un biosensor óptico enzimático⁴.

1.4. Definición de biosensor óptico

Un sensor es un dispositivo que transforma información química de una muestra (concentración de uno o varios de sus componentes), en una señal analíticamente útil (transformable en información). Al trabajar con reactivos biológicos, la IUPAC lo define como biosensor.

Las partes fundamentales de las que consta un biosensor son: a) una zona receptora cuya función es transformar la información química en una forma de energía o señal primaria. Es la parte química del

sensor. En ella habrá generalmente un reactivo (receptor), inmovilizado sobre un soporte sólido y, si el receptor no es capaz de generar la señal primaria por sí mismo, también un indicador; b) Una zona transductora, que transforma la señal primaria en la señal analítica final. Aunque hay diferentes tipos de señales primarias (masa, conductividad, magnéticas...), los transductores más habituales son los electroquímicos y, en particular, los ópticos. En estos últimos el transductor se denomina detector.

1.5. Antecedentes del método

El método espectrofotométrico conocido y estudiado para la determinación de aminas biógenas consta de medidas de absorción molecular UV-Vis, basado en la reacción descrita en la figura 3. En este método, la amina biógena reacciona con la enzima de la familia de las oxidasas la cual se reduce y, en presencia de O_2 , se genera H_2O_2 . Posteriormente, se acopla otra reacción en la que el H_2O_2 reacciona con la peroxidasa de rábano picante (HRP) (que se oxida). Esta HRP oxidada (HRP II) oxida al colorante 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB), el cual absorbe en el UV-Vis (azul)⁵.

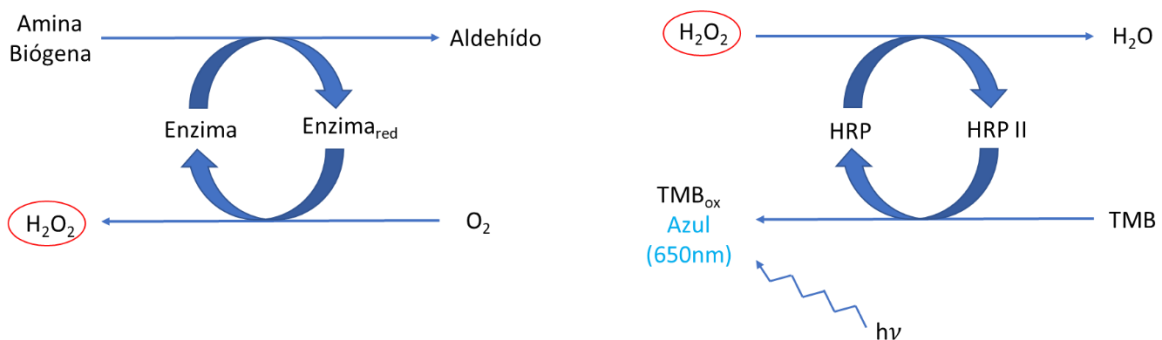


Figura 3: Esquema de reacciones en que se basa el biosensor óptico UV-Vis.

También se tiene conocimiento de la reacción quimiluminiscente⁶ en la que se cambia el empleo de un colorante (TMB) por el empleo de luminol y, con ello, se elimina la necesidad de utilizar una fuente de excitación (Figura 4). En este método, el peróxido de hidrógeno generado por la reacción entre enzima y amina biógena reacciona con la HRP oxidándola a HRP II, la cual, al reaccionar con el luminol, genera luz, medida a 425 nm.

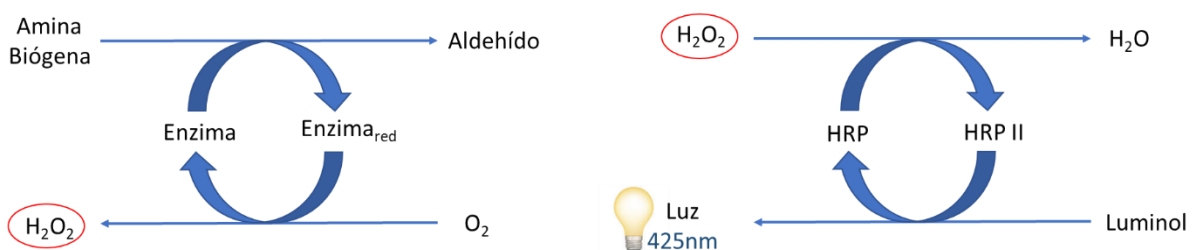


Figura 4: Esquema de reacciones en que se basa el biosensor quimiluminiscente.

2. OBJETIVOS Y PLANTEAMIENTO DEL TRABAJO

La finalidad de este trabajo de fin de grado es, a partir de las reacciones conocidas mencionadas anteriormente (Figura 3 y Figura 4), conseguir una determinación rápida de aminas biógenas empleando únicamente la enzima Diamino Oxidasa (DAO) o Tiramina Oxidasa (TAO), enzimas que presentan centros activos de Cu(II). La detección es quimiluminiscente, empleando la capacidad catalítica del Cu(II) de la DAO y/o TAO para catalizar la reacción entre el H₂O₂ formado en la reacción y el luminol. Eliminando de esta forma la necesidad de utilizar una segunda enzima (HRP).

Al desarrollar un método quimiluminiscente se elimina la fuente de excitación externa, lo cual supone una ventaja frente a otros métodos de determinación de aminas biógenas basadas en espectroscopia UV-Visible.

En concreto se propone:

- 1) Búsqueda y consulta de artículos, metodologías y ensayos existentes relacionados con el tema propuesto.
- 2) Toma de contacto con el equipo empleado, llevando a cabo la realización de análisis de aminas biógenas en base a los métodos enzimáticos previamente desarrollados en el grupo de investigación Biosensores Analíticos, grupo en el cual se ha realizado el trabajo.
- 3) Estudio de la reacción quimiluminiscente entre luminol y el H₂O₂, optimizando condiciones como pH, concentración de reactivos y rango lineal del método.
- 4) Estudio de la capacidad catalítica del Cu(II) libre (preparado por disolución de una sal) en la reacción quimiluminiscente.
- 5) Estudio de la capacidad catalítica del Cu(II) de la enzima en la reacción quimiluminiscente.
- 6) Optimización del método analítico. Elaborar estudios variando la concentración de las aminas biógenas a determinar, con la finalidad de observar hasta qué punto es posible determinar dichas aminas biógenas y en que rango de concentraciones.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos y disoluciones

3.1.1. Aminas

- Putrescina (Putrescine dihydrochloride) Sigma-Aldrich P7505, 98% pureza.
- Cadaverina (Cadaverine dihydrochloride) Sigma-Aldrich C8561, 98% pureza.
- Histamina (Histamine dihydrochloride) Sigma-Aldrich 53300, 99% pureza
- Feniletilamina (2-phenylethylamine hydrochloride) Sigma-Aldrich P6513, 98% pureza.
- Tiramina (Tiramyne hydrochloride) Sigma-Aldrich T2879, 98% pureza

La preparación de las disoluciones de las distintas aminas empleadas se llevó a cabo realizando una pesada de una cantidad conocida de cada una de ellas, en una balanza analítica, sobre un eppendorf previamente tarado. Posteriormente se le añade un volumen determinado de agua miliQ con el fin de obtener la concentración requerida para cada ensayo.

En algunos ensayos realizados fue necesario llevar a cabo alguna dilución de las disoluciones anteriores, empleando agua miliQ, con el fin de poder adicionar la concentración necesaria en cada caso.

3.1.2. Enzimas

- Diamino Oxidasa (DAO) de la casa comercial Molirom (Mm=150000 g/mol). Las disoluciones empleadas de DAO se prepararon tomando el volumen necesario, según la actividad suministrada por la casa comercial, y llevándolo a 2 ml con una disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M, pH 6, con el fin de tener la actividad de enzima requerida en cada análisis.
- Tiramina Oxidasa (TAO) de la casa comercia Asahi ksei pharma T-25 (Mm=190000 g/mol). Para la preparación de TAO se pesó la cantidad necesaria en una balanza analítica, sobre un eppendorf tarado previamente, y se llevó al volumen requerido con una disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ 0,1 M, pH 6, consiguiendo así la actividad necesaria para cada análisis.

3.1.3. Reactivos y disoluciones generales

- Disolución amortiguadora $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ 0,1M, pH 6. Se preparó mediante la disolución de 4,26 g de Na_2HPO_4 (Panreac 131679.1211, Mm=141,96 g/mol) en un volumen final de 300 ml de agua miliQ, ajustándose su pH mediante disoluciones de NaOH 1 M y 2 M.
- Disolución amortiguadora $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$ 0,1M, pH 9. Se preparó mediante la disolución de 3,18 g de Na_2CO_3 (Sigma EC 207-838-8, Mm=105,99 g/mol) en un volumen final de 300 ml de agua miliQ, ajustándose su pH mediante disoluciones de HCl 1 M.
- Disoluciones de Co(II), preparadas a partir de la sal $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Mm=291,04 g/mol), pesando la cantidad requerida para cada ensayo, llevándolo al volumen requerido con agua miliQ. Si fuese necesario, llevar a cabo alguna dilución previa para obtener concentraciones de Co(II) menores.
- Disoluciones de Cu(II), preparadas a partir de la sal CuSO_4 (Mm=249,68 g/mol) pesando la cantidad requerida para cada ensayo, llevándolo al volumen requerido con agua miliQ. Si fuese necesario, llevar a cabo alguna dilución previa para obtener concentraciones de Cu(II) menores.

- Disolución comercial de peróxido de hidrogeno, H₂O₂ 33% (m/v) (panreac 131077.1211). Se llevaron a cabo disoluciones necesarias para cada análisis, en agua miliQ.
- Luminol C₈H₇N₃O₂ (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) (Mm=177,16 g/mol). Las disoluciones se prepararon pesando la cantidad necesaria según la concentración requerida en cada análisis, llevada a 2 ml con NaOH 0,1 M, ya que es más soluble en pH básico.

3.2. Instrumentos y materiales

3.2.1. Instrumentos

- Espectrofotómetro de absorción molecular de fotodiodos UV-Vis Agilent 8453A, que presenta lámparas de deuterio y wolframio y un rango de medida comprendido entre 190 nm y 1100 nm.
- Espectrofotómetro de fluorescencia Cary Eclipse, Agilent Technologies. Empleado para las medidas en quimiluminiscencia.
- Espectrofotómetro de absorción atómica en llama Perkin-Elmer 2380.
- pH-metro CRISON, Basic 20.
- Balanza analítica de precisión ($\pm 0,01$ mg), modelo GR-202-EC que permite pesar entre 1 mg y 210 g.

3.2.2. Materiales y aparatos

- Centrifugadora Eppendorf mini spin, con un máximo de 13400 rpm.
- Columna de separación es Sephadex G-100, que presenta un rango de fraccionación de 4000 a 150000 (g/mol).
- Centrifugadora Heraeus Multifugue X1R; Thermo Fisher scientific, Walthman, EEUU.
- Vasos de precipitados.
- Matraces aforados de 5 ml.
- Micropipetas de volumen variable:
 - Socorex → 5-50 μ L, 10-100 μ L, 100-1000 μ L.
 - Eppendorf → 2-20 μ L, 20-200 μ L.
- Agitador magnético A-01, SBS.
- Material desechable: Puntas de micropipetas, pipetas Pasteur, Eppendorf, tubos cónicos para centrifuga Falcon™ y cubetas de acrílico de 1 cm de paso óptico que permite medidas desde 260 nm.

3.3. Procedimiento operativo

El procedimiento llevado a cabo en las medidas se puede dividir en:

- Quimiluminiscencia: En la cubeta se adicionaban 2 ml en total, siempre siguiendo el orden: disolución amortiguadora, enzima (catalizador), analito (amina biógena o H₂O₂) y luminol. Se medía a 425 nm (longitud de onda del luminol) con una anchura de rendija de 20 nm y una intensidad de 1000 mv. El espectrofotómetro midiendo en quimiluminiscencia otorga un valor cada 0,001 segundos, por lo que fue necesario llevar a cabo un suavizado de los resultados para poder representarlos. Para ello, se realizó un filtro de Savitzky–Golay con el que se consiguió como resultado una función similar a los datos de entrada, pero suavizada y se preservaron las

características de la distribución inicial tales como los máximos y mínimos relativos, así como el ancho de los picos.

- Espectroscopia UV-Visible. En cubeta se adicionaban 2 ml de disolución, siguiendo el orden: disolución amortiguadora, enzima (catalizador), TMB (colorante) y analito (amina biógena). Se medía a dos longitudes de onda 650 nm y 450 nm. El espectrofotómetro nos proporciona tanto un espectro a todas las longitudes de onda como un registro de la señal a una longitud de onda.
- Absorción atómica en llama. Se prepararon las rectas de calibrado de Cu(II) o Co(II) en matraces aforados de 5 ml. Se ajustó el equipo (ganancia, intensidad...) y, tras realizar la medida del blanco, se midieron las distintas señales en orden creciente de concentración. Una vez obtenida la recta de calibrado, se midieron las distintas muestras. Los valores de absorbancia obtenidos para las muestras se interpolaron en la recta de calibrado, obteniendo así la concentración del analito.
- Eliminar el Cu(II) de la enzima. Se empleó una disolución de EDTA pH 7 con metilamina 10^{-3} M, la cual, adicionada a la disolución de la enzima en atmosfera inerte (N_2), $4^{\circ}C$ y 12 h de reacción, consiguió eliminar el Cu(II). Por centrifugado, se separó la apo-enzima del Cu(II) con EDTA.
- Inserción de Co(II) en la enzima. Se hizo reaccionar la apo-enzima con una disolución de Co(II) estequiométrica respecto al Cu(II) eliminado, en atmosfera inerte (N_2) y $4^{\circ}C$, durante 12 h.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Como se ha comentado en el apartado de objetivos, en el grupo del laboratorio de Biosensores Analíticos, en el cual se ha realizado este trabajo, se tiene experiencia en la reacción entre el H_2O_2 y el luminol, donde el peróxido es capaz de oxidar al luminol y producir quimiluminiscencia, en presencia de la enzima HRP cuyos grupos hemo actúan como catalizador.

Además, en el caso de la determinación de aminas biógenas mediante la reacción enzimática (figura 4) se genera H_2O_2 , el cual puede acoplarse a la reacción HRP/Luminol para generar una señal quimiluminiscente, que es proporcional a la concentración de la amina biógena en la muestra.

Como objetivo se quiere conseguir que los centros metálicos de las enzimas DAO o TAO sean capaces de catalizar la reacción de oxidación del luminol, eliminando la necesidad de adicionar una segunda enzima (HRP).

4.1 Estudios previos

En las medidas quimiluminiscentes se emplea luminol. El luminol es un reactivo que, en contacto con un agente oxidante adecuado, emite luz. La longitud de onda de emisión del luminol es 425 nm. El pH de trabajo óptimo del luminol⁷ es 10. Sin embargo, estudios previos llevados a cabo por el grupo de investigación mostraron, como puede observarse en la figura 5, que el pH óptimo de la señal quimiluminiscente cuando se acopla con una reacción enzimática es 9. Esto se debe a que el pH óptimo de las enzimas empleadas es 6, y hay que llegar a un compromiso entre ambos pH óptimos, enzima y luminol.

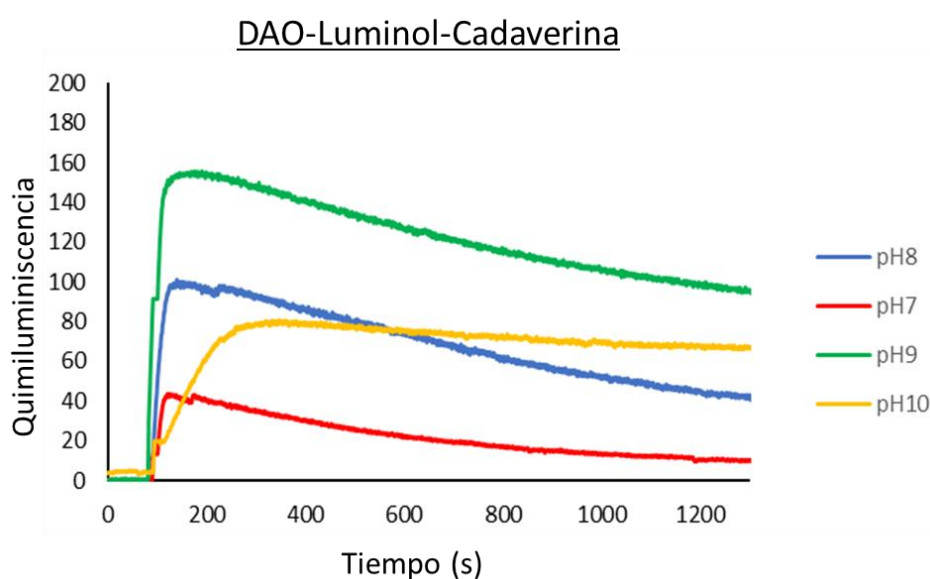


Figura 5: DAO-Luminol-Cadaverina a distintos pH.

De la misma forma, estudios previos habían demostrado que la señal quimiluminiscente del luminol era proporcional a la concentración de cadaverina (figura 6). En nuestro trabajo nos centraremos en estudiar dichas reacciones enzimáticas con putrescina.

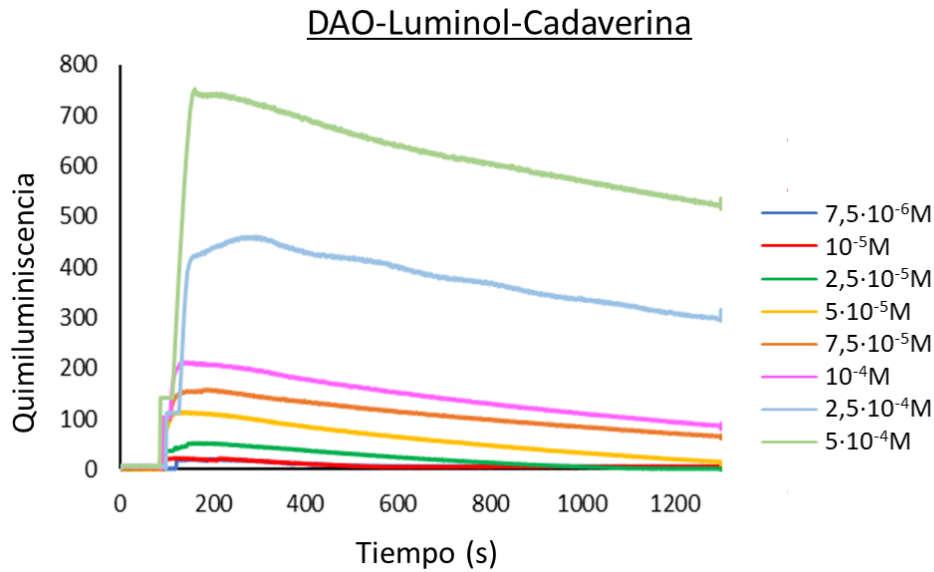


Figura 6: DAO-Luminol-Cadaverina a distintas concentraciones.

4.2 Estudios de la reacción DAO con putrescina

- a) En primer lugar, se estudió la reacción DAO con putrescina en base a las propiedades ópticas de la enzima.

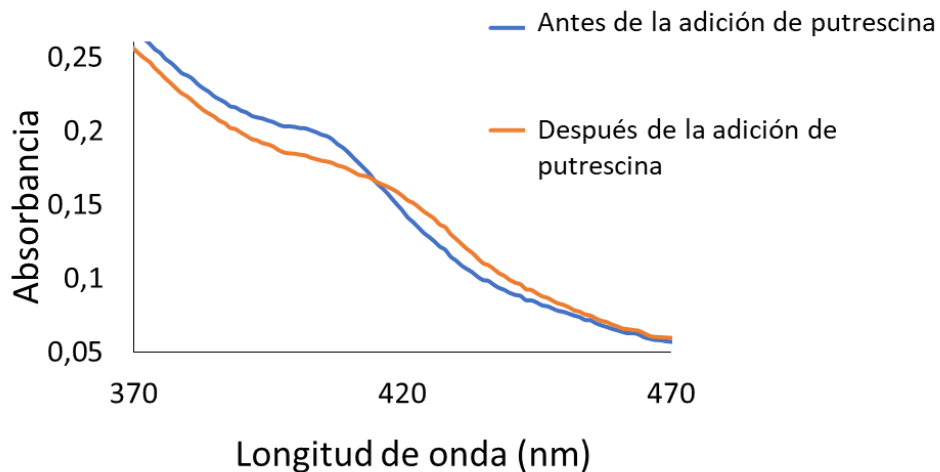


Figura 7: Espectros de DAO con y sin adición de amina biógena.

Estos resultados de la figura 7 parecen indicar que los cambios observados en el espectro de absorción son típicos de la HRP⁸, ya que se observa un aumento de la señal a 420 nm. Si se confirmase la presencia de HRP, como impureza en la obtención de la DAO comercial, sería necesario su eliminación por ser un factor incontrolado ya que se desconoce su actividad en la reacción.

b) Separación DAO-HRP.

Para confirmar la presencia de HRP en la enzima de interés, se procedió a separarlos. La columna de separación es Sephadex G-100, que presenta un rango de fracciónación de 4000 a 150000 (g/mol). La HRP presenta una masa molecular de 44000 g/mol, mientras que la DAO 150000 g/mol. Ambos son retenidos, pero la fracción de la DAO atraviesa la columna primero, debido a su mayor masa. La segunda fracción recogida es HRP, lo cual se confirmó llevando a cabo la reacción de la figura 3.

El seguimiento de la separación se realizó llevando a cabo medidas espectroscópicas con una longitud de onda de 280 nm. El registro de la separación se muestra en la figura 8.

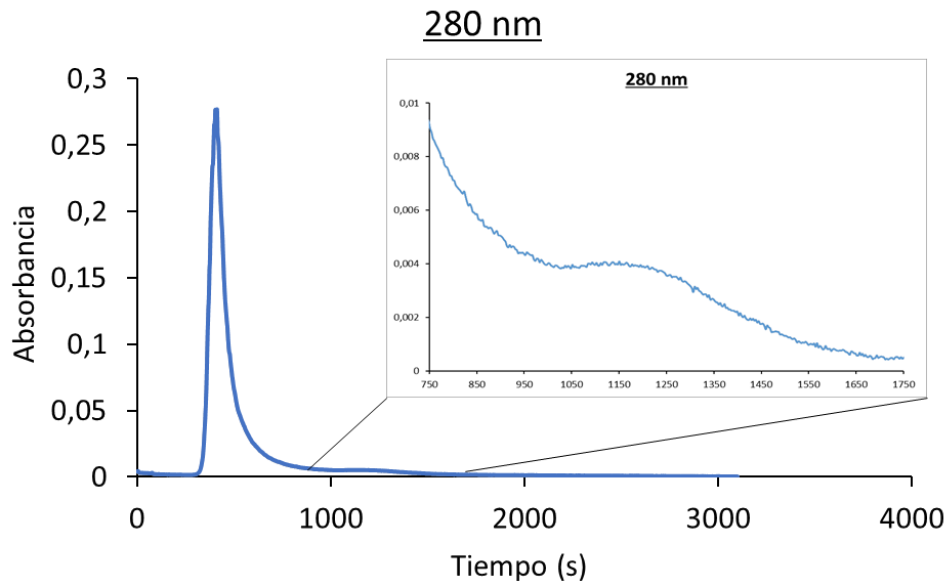


Figura 8: Registro de absorción de DAO con HRP a 280 nm.

c) Seguimiento de la reacción DAO (sin HRP) con putrescina.

En la figura 9 se puede observar que las señales debidas a HRP y DAO comercial son similares mientras que las señales de DAO pura (sin HRP) son prácticamente inapreciables. No se observa quimiluminiscencia al haber separado la HRP.

Cabe esperar que la quimiluminiscencia se debe a la HRP presente en la enzima comercial y es un primer indicio de la presencia de esta HRP como subproducto en la DAO comercial.

Todas las señales presentan la misma concentración de H_2O_2 , $1,25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$.

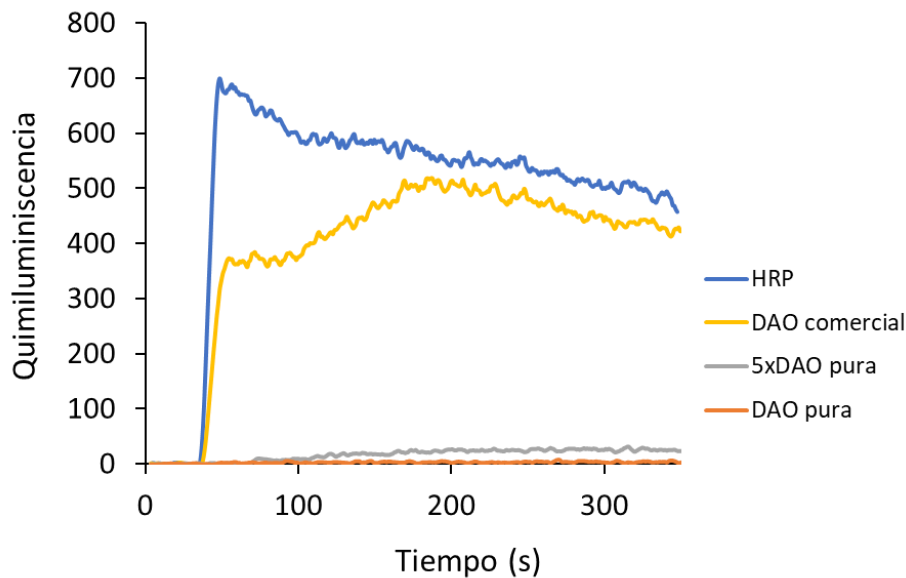


Figura 9: Medidas quimiluminiscentes donde se compara la actividad catalítica de la DAO con y sin HRP.

Esta teoría se confirmó con medidas de absorción molecular, empleando TMB (colorante), basándose en la reacción enzimática comentada en la *Introducción* (figura 3). El colorante y el peróxido reaccionan en presencia de la enzima HRP, que actúa como catalizador de dicha reacción. El avance de la reacción de oxidación del TMB se observó mediante absorción molecular ya que, al ser oxidado el TMB, absorbe en el visible, en longitudes de onda del azul. Se observó que la DAO comercial lleva a cabo dicha reacción, sin la adición de HRP, lo que justifica su presencia en la enzima comercial (figura 10).

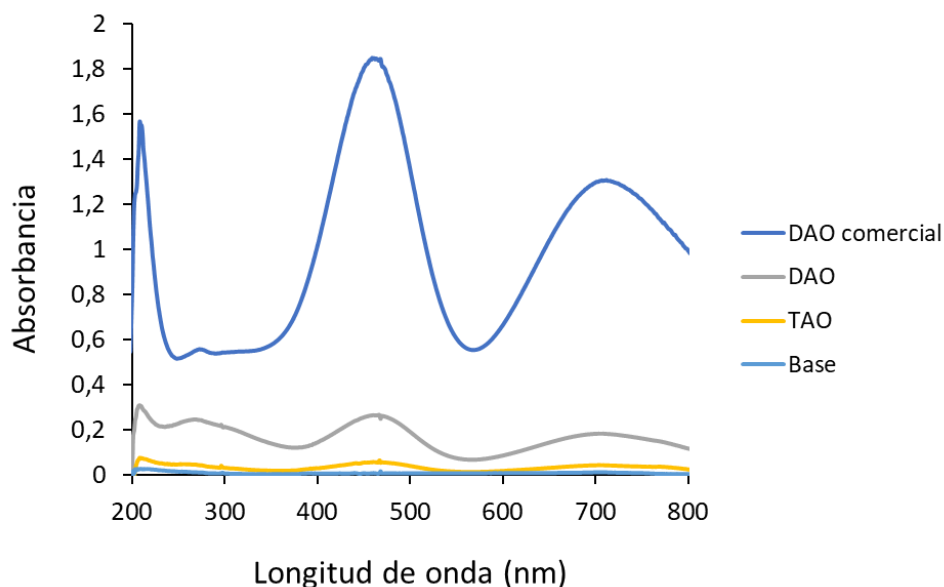


Figura 10: Espectros de absorción Enzima-TMB-Amina biógena.

Todas las medidas presentan 2,8 unidades de enzima y una concentración de H_2O_2 de $5 \cdot 10^{-5}$ M.

Puede observarse que la DAO comercial da una gran señal, debida a la gran cantidad de HRP presente en la misma. Al separar, se consigue eliminar gran cantidad de esa HRP.

También está representado el espectro de absorción empleando la enzima TAO. El estudio de esta reacción con la TAO comercial muestra que presenta muy poca HRP, casi nula, pudiéndose emplear como punto de partida en posteriores ensayos.

4.3 Estudio de la capacidad catalítica del Cu(II)

La señal quimiluminiscente necesita un catalizador, Fe(II) del grupo hemo en el caso de HRP y Cu(II) en el caso de la DAO pura. Sin embargo, como en el empleo de la DAO pura no se consiguió señal luminiscente, el primer estudio fue la comprobación del efecto catalítico del Cu(II) y de otras especies catalíticas como Co(II), sobre la reacción quimiluminiscente.

En dichas pruebas con Cu(II) y Co(II), catalizando la reacción entre el H₂O₂ y el luminol, se llegó a la conclusión de que el Cu(II) presenta un poder catalítico pequeño mientras que el del Co(II) es elevado, como puede verse en la figura 11.

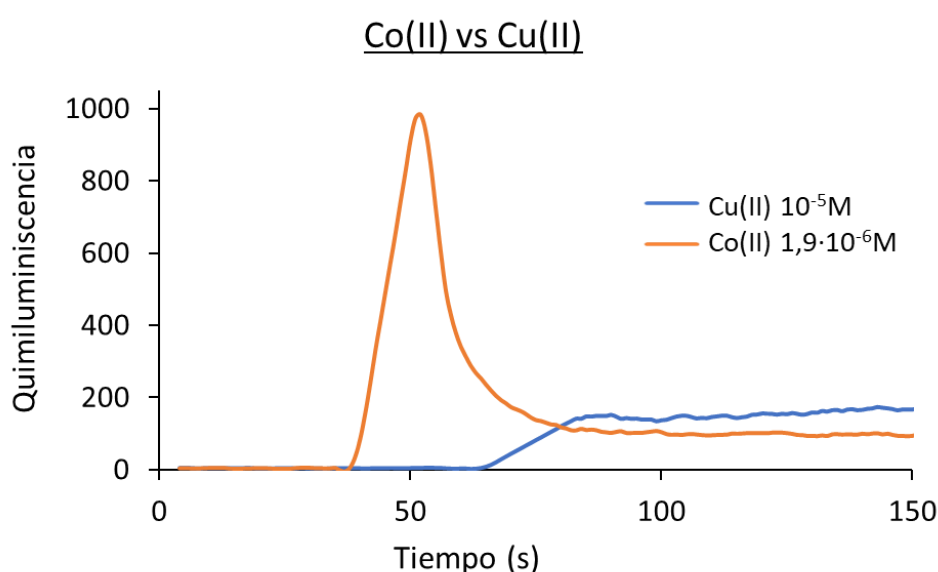


Figura 11: Comparación de la actividad catalítica de Co(II) y Cu(II) en la reacción luminol / H₂O₂

Las enzimas DAO y TAO presentan concentraciones de Cu(II) en su centro activo que no son capaces de generar señal quimiluminiscente, sin embargo, de los resultados obtenidos, cabría esperar que si presentasen señal si contuvieran Co(II) en su centro activo.

4.4 Optimización de Co(II)

Por lo tanto, se procedió a optimizar el método quimiluminiscente empleando Co(II) como catalizador de la reacción de luminol y H₂O₂.

El primer impedimento que se encontró fue que el H₂O₂ es capaz de oxidar al luminol si se encuentra en concentraciones elevadas. Por lo tanto, esa fue la primera medida que se tuvo que corregir, llevando a cabo una serie de blancos (disolución amortiguadora, luminol y peróxido), variando la concentración de H₂O₂ y manteniendo la de luminol constante, tal y como puede verse en la figura 12. A concentraciones de H₂O₂ por encima de 10⁻² M se observa señal quimiluminiscente en ausencia de catalizador.

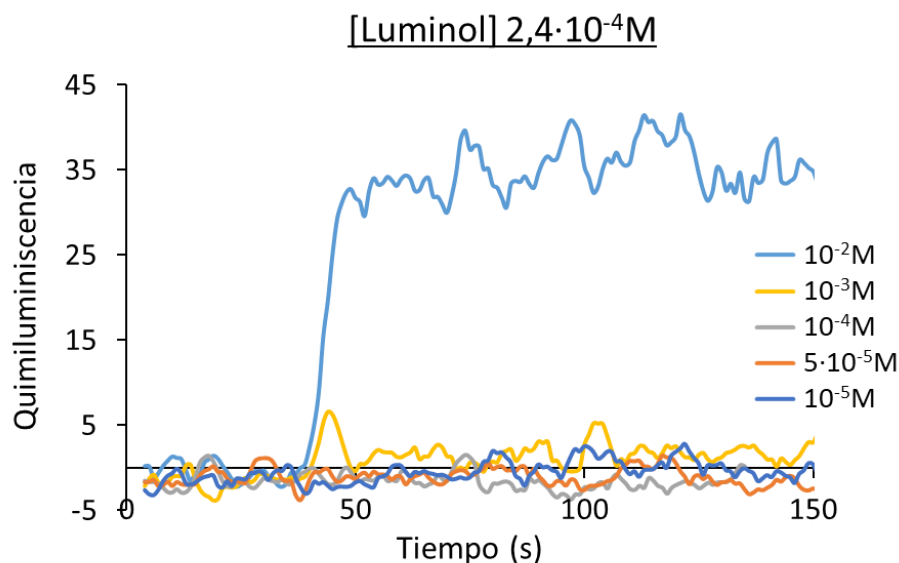


Figura 12: Medidas quimiluminiscentes de blancos (dis. amortiguadora, luminol y varias concentraciones de H_2O_2).

Por otra parte, se realizó una optimización del luminol adicionado, con el fin de obtener las mejores señales posibles (figura 13). Para ello, se realizaron medidas empleando disolución amortiguadora, Co(II) (10^{-5}M), luminol en distintas concentraciones y H_2O_2 (10^{-5}M).

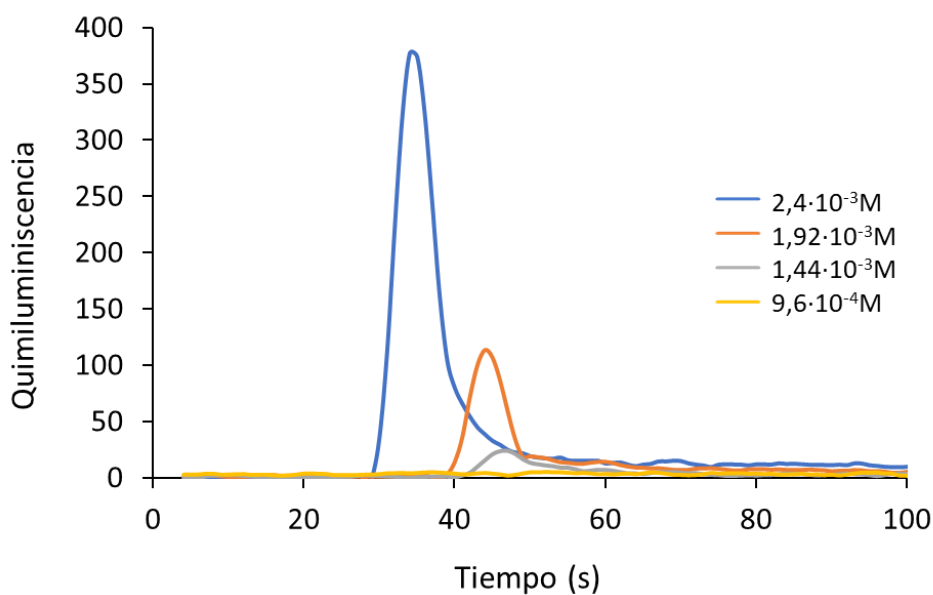


Figura 13: Señales quimiluminiscentes variando la concentración de luminol.

Se escogieron como concentraciones óptimas de luminol las siguientes:

- $2,4 \cdot 10^{-3} \text{M}$ para rango de concentración de $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 10^{-5} \text{M} - 10^{-7} \text{M}$.
- $1,92 \cdot 10^{-3} \text{M}$ para rango de concentración de $\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 10^{-4} \text{M} - 10^{-7} \text{M}$.

Por encima del valor más concentrado de H_2O_2 el luminol se oxida sin presencia de catalizador y, por debajo de la concentración de H_2O_2 mas baja no se aprecia señal.

Finalmente, se tomó como óptima la concentración de luminol de $1,92 \cdot 10^{-3} \text{M}$ en cubeta de 2 ml ya que, además de presentar mayor rango de aplicación, puede emplearse con concentraciones mayores

de H_2O_2 sin que haya señal en ausencia de catalizador. La figura 14 muestra distintas señales variando la concentración de H_2O_2 en el rango de aplicación mencionado.

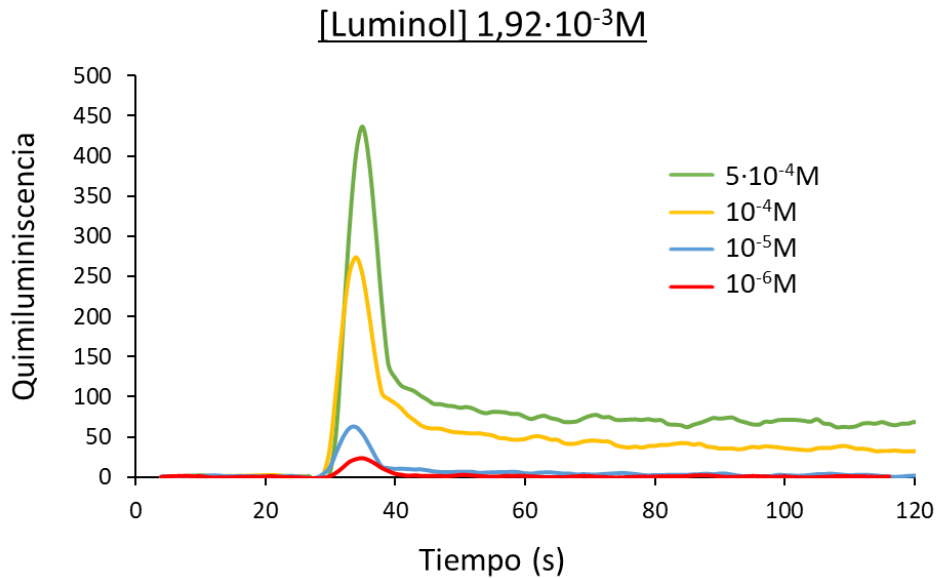


Figura 14: Señales quimiluminiscentes con luminol $1,92 \cdot 10^{-3} \text{M}$, variando la concentración de H_2O_2 .

4.5 Capacidad catalítica de Co(II) unido a proteína

Hasta este punto se ha demostrado que el Co(II) libre presenta mayor poder catalítico que el Cu(II) en las medidas de quimiluminiscencia. Sin embargo, es necesario conocer si el Co(II) formando complejos con una proteína o una enzima va a ser capaz de presentar dicha actividad catalítica.

Para llevar a cabo este estudio sobre la capacidad catalítica que presenta el Co(II) al estar unido a una proteína, se llevó a cabo una reacción de formación del complejo albúmina-Co(II), tal y como se vio en datos bibliográficos⁹.

La figura 15 muestra el espectro de absorción del complejo formado de albúmina-Co(II)⁹.

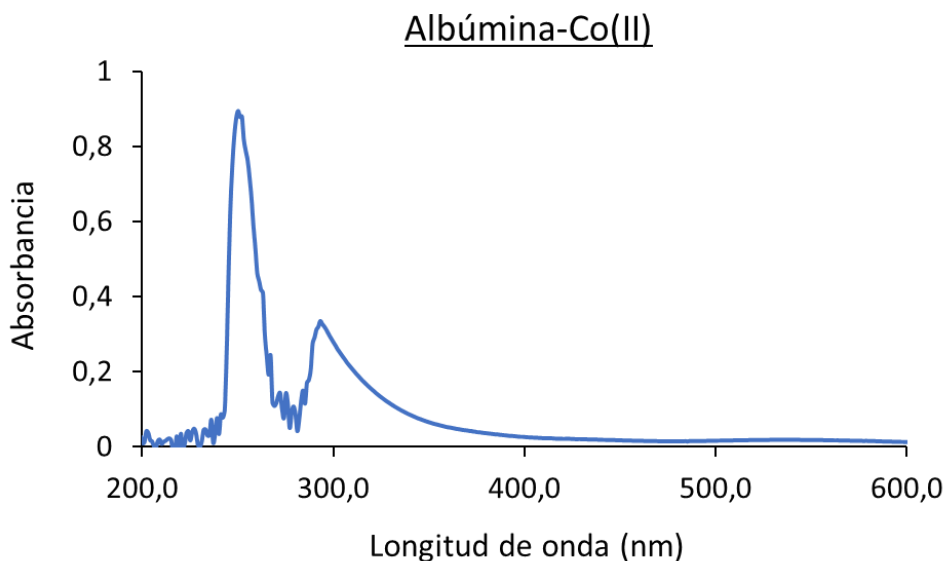


Figura 15: Espectro de absorción del complejo albúmina-Co(II).

Una vez unido el Co(II) a la proteína y, separado el exceso mediante ultracentrifugación (llevada a cabo empleando centrífugas de 10K en las que el Co(II) junto con la disolución amortiguadora son capaces de pasar a la parte inferior y la enzima, dado que presenta mayor tamaño, se mantiene en la superior), se realizaron medidas quimiluminiscentes empleando las mismas concentraciones de reactivos, con el fin de comparar el poder catalítico del Co(II) unido a la proteína y sin unir (figura 16).

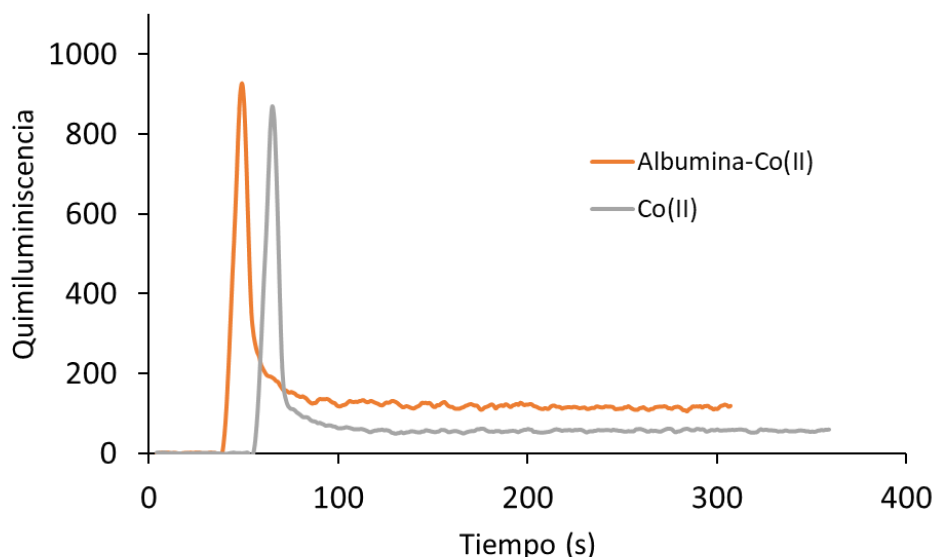


Figura 16: Comparación de la capacidad catalítica entre el Co(II) libre y acomplexado con albúmina.

Como puede apreciarse, la capacidad catalítica del Co(II) es similar a la del complejo albúmina-Co(II), por lo que se puede llegar a la conclusión de que el poder catalítico del Co(II) acomplexado no varía.

4.6 Pruebas con TAO

Se comenzó empleando TAO como enzima ya que, como se ha visto anteriormente, no presenta apenas HRP, por lo que se evita tener que separar. Además, la TAO presenta dos Cu(II) al igual que la DAO, por lo que hay similitud entre ambas. Por lo tanto, los estudios llevados a cabo con la TAO podrían emplearse a posteriori con la DAO.

La TAO presenta también centros activos de Cu(II), por lo que se pudo comprobar que su poder catalítico en la reacción quimiluminiscente es nulo. Se obtuvieron datos bibliográficos en los que se conseguía eliminar el Cu(II) de la enzima y, posteriormente, se insertaba Co(II), regenerándose la actividad catalítica de la propia enzima¹⁰.

Se empleó una disolución de EDTA pH 7 con metilamina 10^{-3} M, la cual, adicionada a la disolución de TAO en atmósfera inerte (N_2), $4^\circ C$ y 12h de reacción, consiguió eliminar el Cu(II). Por centrifugado, se separó la apo-TAO del Cu(II) con EDTA.

El estudio de la separación de Cu(II) se llevó a cabo mediante mediciones de absorción atómica en llama, realizando previamente una recta de calibrado de 0,05 a 0,8 mg/L de Cu(II) (figura 17).

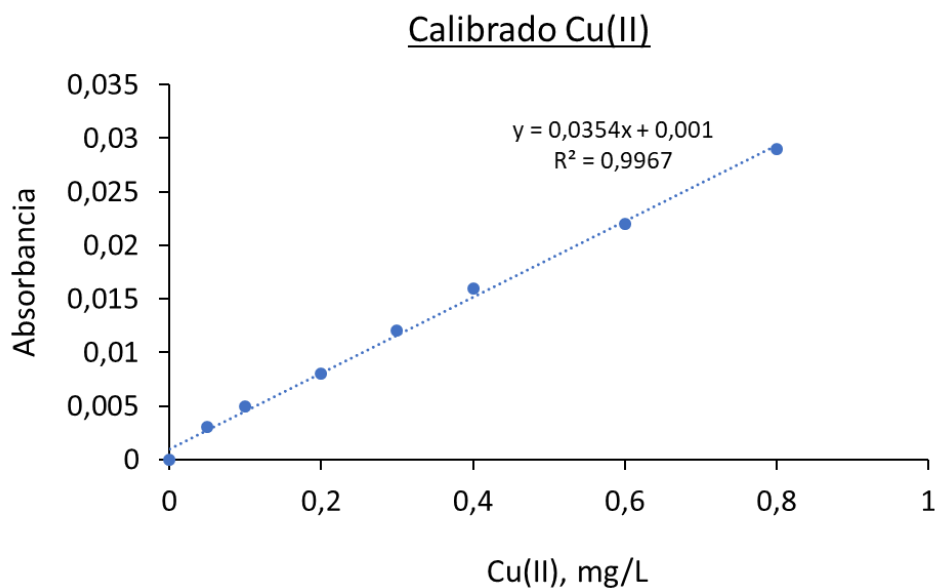


Figura 17: Recta de calibrado de Cu(II), mg/L en absorción atómica en llama.

Al medir en llama las distintas disoluciones, se obtuvieron valores de absorbancia, que, cuando se interpolaron en la recta de calibrado, mostraron los valores de Cu(II) en mg/L que se observan en la figura 18.

	ABS	Cu(II), mg/L
TAO comercial	0,023	0,621
TAO sin Cu	0,004	0,085
EDTA-Cu	0,020	0,537

Figura 18: Concentraciones de Cu(II) interpoladas de las absorbancias obtenidas en absorción atómica.

Puede observarse que prácticamente la totalidad del Cu(II) presente en la TAO comercial se consiguió separar.

Una vez separado el Cu(II), por centrifugación, se hizo reaccionar la apo-TAO con una disolución de Co(II) estequiométrica respecto al Cu(II) eliminado, en atmosfera inerte (N₂) y 4°C, durante 12h.

Se llevaron a cabo distintas medidas comparando la actividad catalítica:

- Apo-TAO, luminol, tiramina.
- TAO, luminol y tiramina.
- TAO-Co(II), luminol y tiramina

En ninguna de las medidas se observó señal quimiluminiscente. Sin embargo, llevando a cabo la reacción con H₂O₂ en vez de con tiramina, sí que se observó señal.

Para intentar justificar estos resultados, se realizó el mismo estudio, pero añadiendo H₂O₂ en vez de generarlo a través de la reacción enzimática y, una vez apareció la señal quimiluminiscente, se adicionó tiramina (a los 400 s), observándose que esa señal desaparecía. Todas estas medidas se recogen en la figura 19.

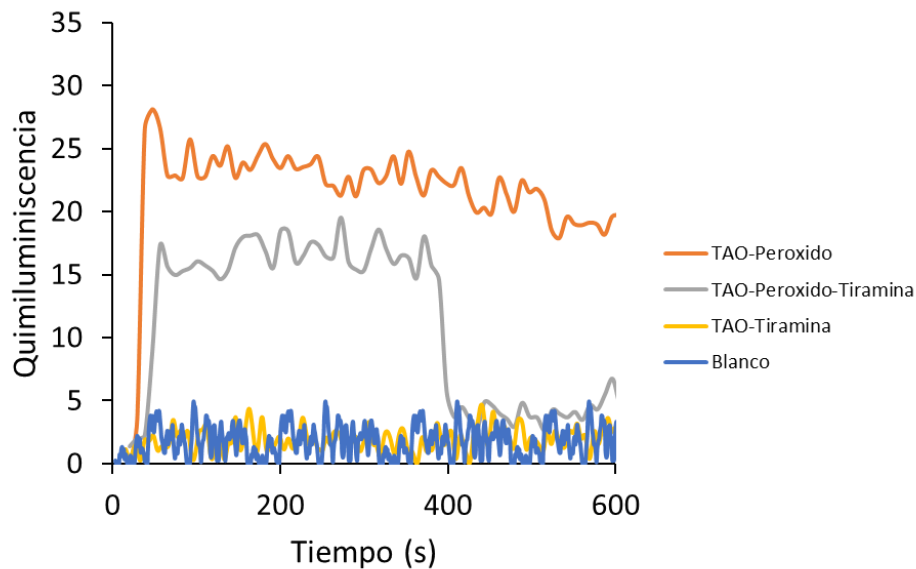


Figura 19: Medidas quimiluminiscentes con TAO.

Por lo tanto, se procedió a estudiar el motivo de este hecho. Se consideraron dos posibilidades:

- Cuando la enzima TAO con Cu(II) reacciona con la tiramina se reduce, por lo que la TAO reducida no es capaz de catalizar la reacción quimiluminiscente.
- La tiramina presenta grupos que son desactivantes de la reacción quimiluminiscente (*quencher*).

Se procedió entonces a llevar a cabo la misma reacción empleando feniletilamina (FEA) y putrescina con la TAO (figura 20). La feniletilamina genera H_2O_2 con la TAO, mientras que la putrescina no, por lo que fue necesario suministrar dicho H_2O_2 para observar la reacción catalítica. Estos estudios se realizaron con el fin de conocer qué grupo es el que produce *quencher* de la quimiluminiscencia o si es la enzima reducida la que no cataliza. La feniletilamina presenta la misma estructura que la tiramina, con la única diferencia de que además de un anillo aromático y grupo amino, la tiramina presenta un grupo OH. La putrescina, por otra parte, es una amina biógena lineal, la única similitud con las anteriores es el grupo amino (figura 1).

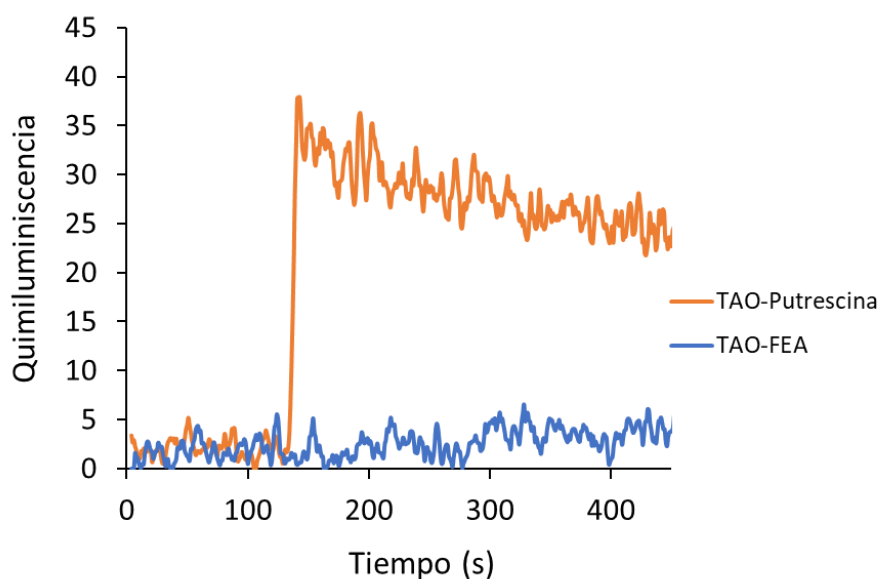


Figura 20: Señales quimiluminiscentes de TAO con dos aminas biógenas.

Los resultados obtenidos mostraron que no hay quimiluminiscencia con la feniletilamina, pero con la putrescina si, por lo que o bien se debía a la enzima reducida o bien al anillo aromático. No podía deberse al grupo amino (pues la putrescina también lo tiene) ni al OH (dado que la feniletilamina no tiene).

Finalmente, para descartar una de las opciones, se llevó a cabo la reacción quimiluminiscente en presencia de fenol, el cual no reacciona con la TAO (no la reduce) por lo que fue necesaria la adición de H_2O_2 . En este análisis tampoco se observó señal alguna, por lo que se pudo afirmar que el anillo aromático era desactivante (*quencher*) de la reacción entre el luminol y el H_2O_2 .

Este suceso se terminó por confirmar empleando directamente Co(II) en vez de la enzima, donde, al añadirle luminol y H_2O_2 se apreciaba señal, pero una vez adicionado fenol o tiramina dicha señal desaparecía.

Todas estas últimas pruebas se recogen en la figura 21, figura en la que puede apreciarse la señal hasta cierto punto, en el que se añade o bien fenol o bien tiramina y, tras la adición, se observa una desaparición de la señal quimiluminiscente.

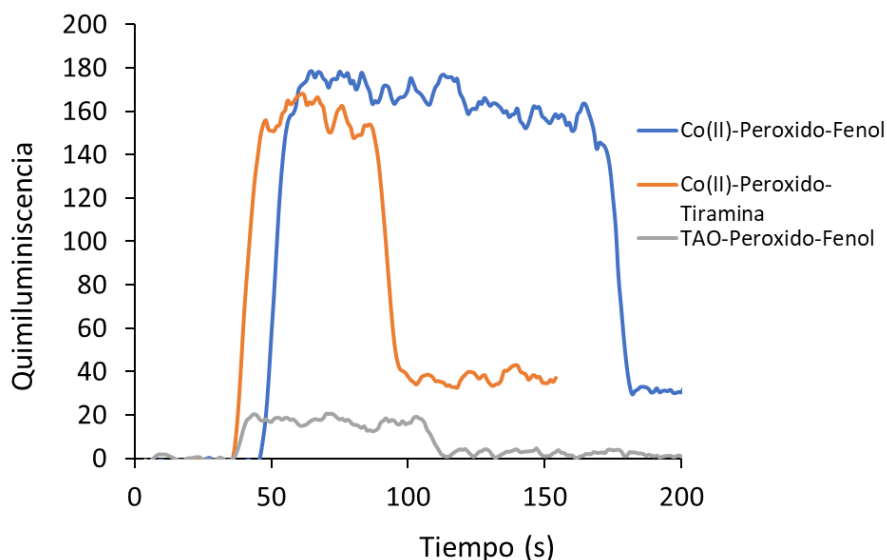


Figura 21: Señales quimiluminiscentes donde se muestra que el anillo aromático es desactivante de la reacción.

4.7 Pruebas con DAO

Tras ver que no se podía trabajar con la TAO, debido a que las aminas que con ella se podrían determinar inhiben la reacción quimiluminiscente entre el luminol y el H_2O_2 (figura 21), se procedió a trabajar con DAO.

Lo primero que se realizó fue la separación de la HRP presente en la DAO comercial (tal y como se ha explicado con anterioridad).

Posteriormente, se comprobó que la putrescina con la DAO no inhibiera la reacción entre el peróxido y el luminol, tal y como ocurría con la TAO y la tiramina. Como era de esperar, la putrescina al no presentar anillos aromáticos no inhibe la quimiluminiscencia.

Más tarde, se procedió a cambiar el centro metálico de la enzima, de $Cu(II)$ a $Co(II)$ al igual que se había realizado con la TAO¹⁰:

- Quitar $Cu \rightarrow$ DAO + EDTA pH 7 + metilamina 10^{-3} M en atmósfera inerte (N_2) y $4^\circ C$ durante 12h.
- Separación por ultracentrifugación de la apo-DAO y el $Cu(II)$ con EDTA + metilamina. Se realizaron medidas de absorción atómica en llama para comprobar que el $Cu(II)$ se había separado de la DAO.
- Inserción de $Co(II) \rightarrow$ Apo-DAO + $Co(II)$ estequiométrico en atmósfera inerte (N_2) y $4^\circ C$ durante 12h. Se recupera la actividad catalítica de la DAO.

Tras esto, se realizó la comparación de la actividad catalítica del $Co(II)$ en la reacción de H_2O_2 con luminol. Para ello se estudiaron dos reacciones (figura 22):

- $Co(II) + H_2O_2 +$ luminol.
- DAO- $Co(II) + H_2O_2 +$ Luminol.

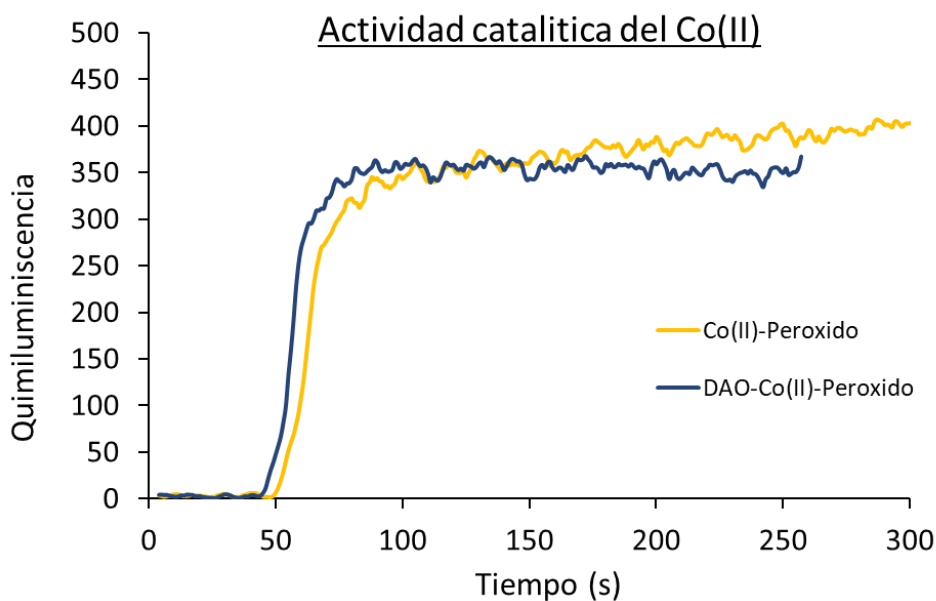


Figura 22: Comparación de la actividad catalítica del Co(II) libre y acomplejado.

Ambas señales son similares por lo que, se puede concluir que la actividad catalítica del Co(II) al estar unido a la enzima se mantiene.

4.8 Optimización Se optimizó la actividad de la DAO (u/ml) para lo cual se llevaron a cabo distintas reacciones manteniendo la concentración de putrescina en 10^{-4} M con DAO-Co(II) en distintas actividades (1 u/ml, 1,5 u/ml, 2 u/ml y 3 u/ml) (figura 23).

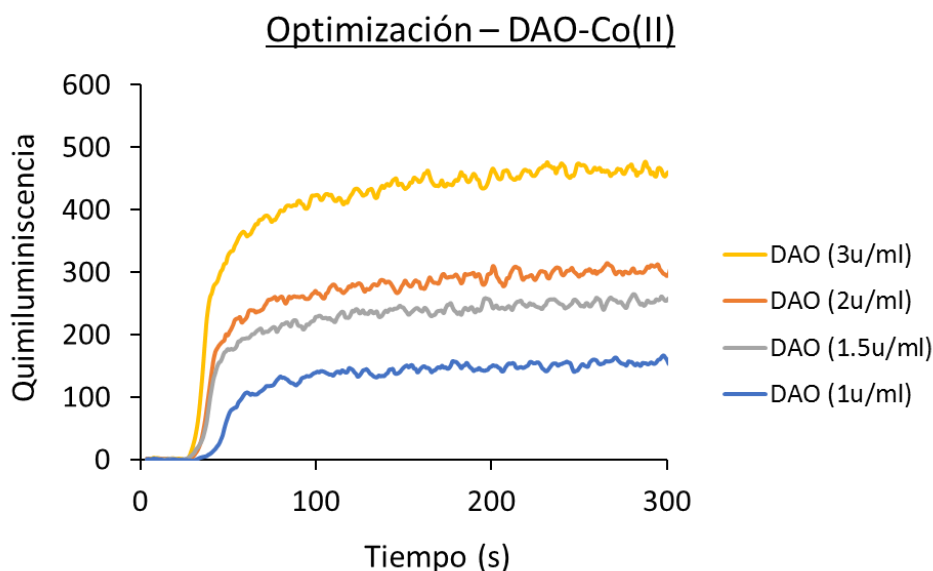


Figura 23: Optimización de la actividad de la DAO-Co(II).

Se decidió trabajar con 2 u/ml debido a que es una señal buena y no supone mucho consumo de enzima.

4.8.1 Calibración y repetibilidad del método

Se continuó la validación del método de determinación de aminas biógenas, para lo cual se realizó una calibración empleando distintas concentraciones de putrescina (figura 24 y figura 25).

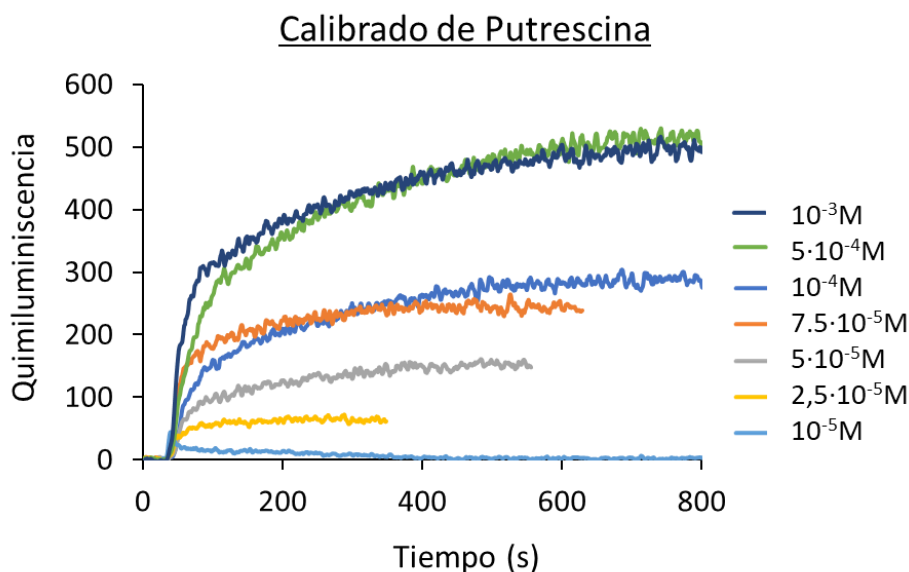


Figura 24: Señal quimiluminiscente con diferentes concentraciones de putrescina.

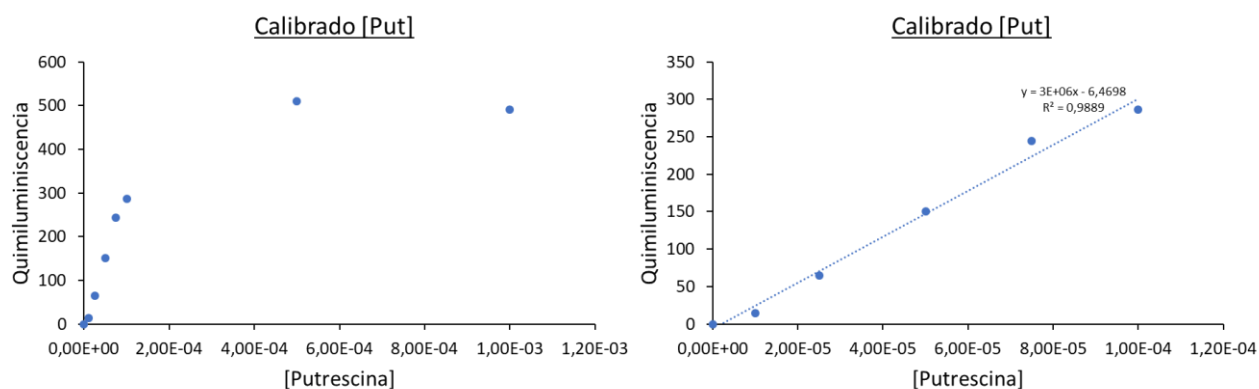


Figura 25: Recta de calibrado. A la izquierda se observa la pérdida de linealidad a concentraciones de putrescina elevadas. A la derecha se presenta el rango lineal del método.

Como puede observarse en el análisis estadístico de los datos (anexo 1) a concentraciones elevadas de putrescina se pierde la linealidad de la calibración. Se tiene un rango lineal de $2,43 \cdot 10^{-6}$ M hasta a 10^{-4} M de putrescina.

Además, se midió la repetibilidad del método, midiendo tres muestras (n=3) de idénticas concentraciones (figura 26):

- Luminol $\rightarrow 1,92 \cdot 10^{-3}$ M.
- Putrescina $\rightarrow 10^{-4}$ M.
- DAO-Co(II) $\rightarrow 1$ u/ml.

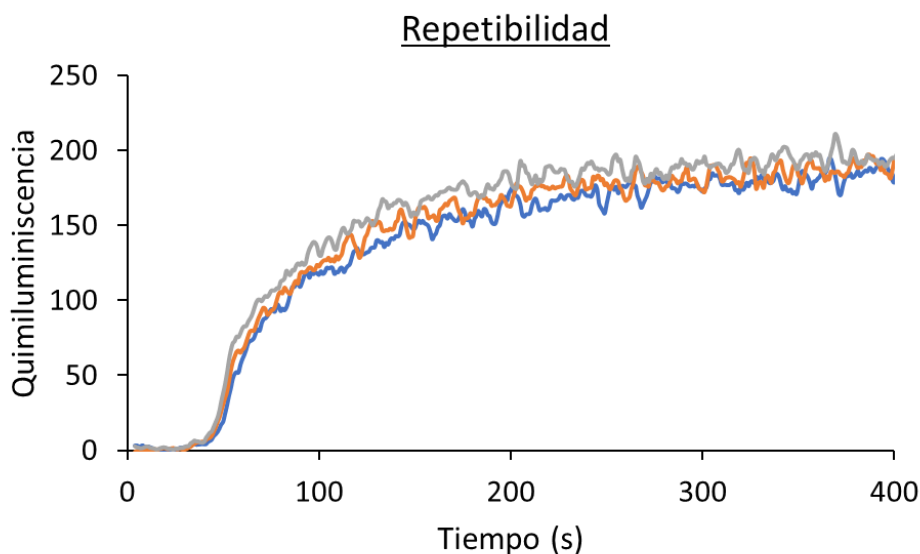


Figura 26: Repetibilidad del método.

La repetibilidad del método, expresada como DSR(%) es de 3,43%.

4.8.2 Determinación de cadaverina

Una vez optimizado el método de determinación de putrescina empleando una enzima con Co(II), se quiso comprobar que también pueden llevarse a cabo medidas de cadaverina, ya que los estudios realizados hasta la fecha con cadaverina y DAO presentaban también HRP (procedente de la DAO comercial). Se finalizó por lo tanto midiendo una concentración de cadaverina 10^{-4} M, comparándola con una de las señales obtenidas para una concentración de putrescina 10^{-4} M (figura 27).

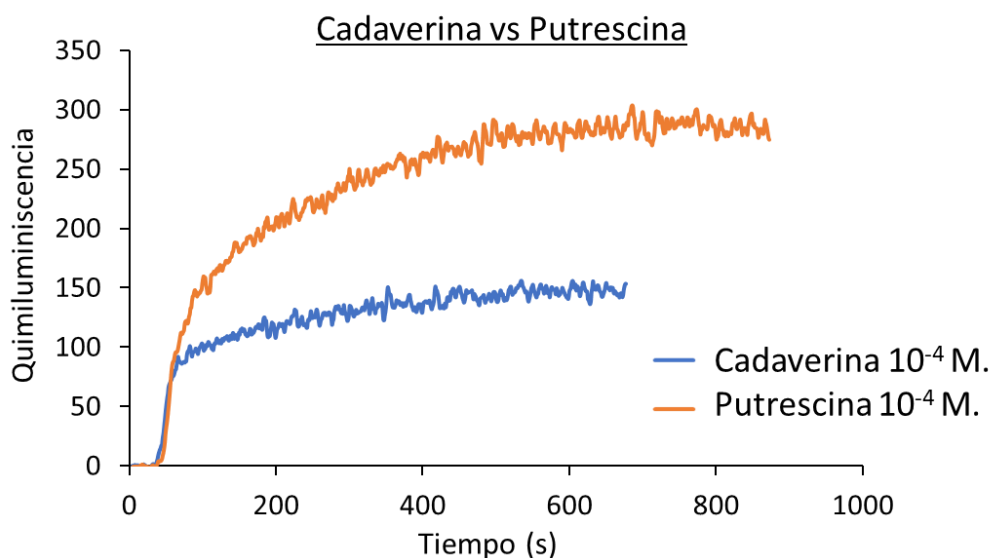


Figura 27: Comparación de la señal quimiluminiscente entre putrescina y cadaverina.

Se observó que también es posible la determinación de cadaverina mediante este método. Sin embargo, la señal es menos sensible, por lo que una buena medida a tener en cuenta sería la realización de las medidas con mayor actividad de la enzima DAO-Co(II).

5. CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la puesta a punto de un método de determinación de aminas biógenas, base del desarrollo de un biosensor óptico enzimático. Un método rápido y robusto, basado en reacciones quimiluminiscentes producidas por la oxidación del luminol al reaccionar con los peróxidos producidos entre la enzima y la amina biógena sin la necesidad de un segundo catalizador (HRP).
- Se confirmó la presencia de HRP en la enzima DAO comercial mientras que la TAO presentaba mucha menor cantidad de esta enzima HRP. Para ello se llevó a cabo la reacción representada en la figura 3, basada en espectroscopia de absorción.
- Se optimizó la concentración de luminol de trabajo ($1,92 \cdot 10^{-3}$ M) así como el pH óptimo (9) y la concentración máxima de H_2O_2 que se puede medir (10^{-4} M), ya que a concentraciones superiores el luminol se oxida sin necesidad de catalizador.
- La capacidad catalítica del Cu(II) presente en las enzimas DAO y TAO era prácticamente nula, por lo que se hizo necesario el estudio de Co(II) como catalizador.
- El Co(II) presenta mayor poder catalítico en la reacción entre H_2O_2 y luminol. La concentración de metal en el centro activo de las enzimas es baja, por lo que en esas pequeñas concentraciones el Co(II) podría catalizar la reacción propuesta.
- Se comprobó que la actividad catalítica del Co(II) al estar acomplejado por una proteína no cambiase, por lo que se formó el complejo albúmina-Co(II) y se compararon las señales quimiluminiscentes de Co(II) libre y acomplejado. Las señales son similares, por lo que la actividad catalítica del Co(II) acomplejado no varía.
- Se estudió la determinación de tiramina con TAO como enzima.
 - No presenta cantidades apreciables de HRP, por lo que no fue necesario realizar la separación TAO-HRP.
 - Se sustituyó el centro activo de Cu(II) por Co(II), comprobando que se mantenía la capacidad catalítica de las enzimas al reaccionar con las aminas biógenas.
 - Se comprobó que la tiramina (previsiblemente por los anillos aromáticos) inhibe o “quenchea” la quimiluminiscencia del luminol.
 - No es posible emplear TAO como enzima para el estudio de la reacción quimiluminiscente luminol/ H_2O_2 pues todas las aminas biógenas con las que reacciona presentan anillo aromático.
- Por todo eso, se optimizó la determinación quimiluminiscente de putrescina con la enzima DAO.
 - La DAO comercial presentaba HRP. Como uno de los objetivos propuestos era evitar acoplar esa segunda enzima a la reacción de H_2O_2 y luminol, se hizo necesario llevar a cabo separaciones.

- Al igual que con la TAO, se realizaron cambios del centro activo de Cu(II) a Co(II). Esta DAO-Co(II) genera H₂O₂ con putrescina, dando señal quimiluminiscente junto con el luminol.
- Se consiguieron señales quimiluminiscentes con putrescina empleando únicamente una enzima, la DAO-Co(II).
- Se optimizó este método, realizando un calibrado variando las concentraciones de putrescina, con el fin de obtener el rango lineal del método ($2,43 \cdot 10^{-6}$ M hasta a 10^{-4} M de putrescina). Se estudió la repetibilidad del método, expresándose como DSR(%) de 3,43%.
- Se llevó a cabo el análisis de una muestra de cadaverina con el mismo método ya optimizado, observándose que también es posible la determinación de esa amina biógena. Las señales obtenidas son, sin embargo, menos sensibles que las observadas con la putrescina. A partir de aquí, habría que optimizar el método y estudiar la posible determinación conjunta de ambos analitos.

6. BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

1. Gardini, F., Özogul, Y., Suzzi, G., Tabanelli, G., & Özogul, F.. Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review. *Frontiers in microbiology*, (2016) 7, 1218.
2. Kaur, N., Chopra, S., Singh, G., Raj, P., Bhasin, A., Sahoo, S. K., ... & Singh, N.. Chemosensors for biogenic amines and biothiols. *Journal of Materials Chemistry B*, (2018) 6(30), 4872-4902.
3. Ruiz-Capillas, C., & Herrero, A. M.. Impact of biogenic amines on food quality and safety. *Foods*, (2019) 8(2), 62.
4. Sanz, I., De Marcos, S., Navarro, J., & Galbán, J., Martín, A. Nanobiosensores ópticos. *SEBBM*. (2017), 19-23.
5. Oliver, S. Determinación rápida y específica de tiramina. Desarrollo de tiras reactivas para el control de calidad en alimentación. *Trabajo Fin de Grado en Química, UNIZAR*. (2018).
6. Heindl, D., & Josel, H. P.. Chemiluminescent Detection with Horseradish Peroxidase and Luminol. In *Nonradioactive Analysis of Biomolecules*. Springer, Berlin, Heidelberg (2000) (pp. 258-261).
7. Khan, P., Idrees, D., Moxley, M. A., Corbett, J. A., Ahmad, F., von Figura, G., ... & Hassan, M. I.. Luminol-based chemiluminescent signals: clinical and non-clinical application and future uses. *Applied biochemistry and biotechnology*, (2014) 173(2), 333-355.
8. Sanz, V., De Marcos, S., Castillo, J. R., & Galbán, J.. Application of molecular absorption properties of horseradish peroxidase for self-indicating enzymatic interactions and analytical methods. *Journal of the American Chemical Society*, (2005) 127(3), 1038-1048.
9. Liang, H., Huang, J., Tu, C. Q., Zhang, M., Zhou, Y. Q., & Shen, P. W.. The subsequent effect of interaction between Co²⁺ and human serum albumin or bovine serum albumin. *Journal of inorganic biochemistry*, 85(2-3), (2001) 167-171.
10. Mills, S. A., Brown, D. E., Dang, K., Sommer, D., Bitsimis, A., Nguyen, J., & Dooley, D. M.. Cobalt substitution supports an inner-sphere electron transfer mechanism for oxygen reduction in pea seedling amine oxidase. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, (2012) 17(4), 507-515.

7. ANEXO 1

	A	B	C	D	E	F	G
1	Resumen						
2							
3	Estadísticas de la regresión						
4	Coefficiente de correlación múltiple	0,831902471					
5	Coefficiente de determinación R^2	0,692061721					
6	R^2 ajustado	0,640738675					
7	Error típico	120,4362317					
8	Observaciones	8					
9							
10	ANÁLISIS DE VARIANZA						
11		<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>	
12	Regresión	1	195590,0322	195590,0322	13,484424	0,010427983	
13	Residuos	6	87029,31543	14504,8859			
14	Total	7	282619,3476				
15							
16		<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
17	Intercepción	116,5970066	51,08215389	2,282538965	0,06258132	-8,396521089	241,5905344
18	Variable X 1	471004,7133	128265,262	3,672114383	0,01042798	157150,9237	784858,503

	Análisis de los residuales			
	<i>Observación</i>	<i>Pronóstico para Y</i>	<i>Residuos</i>	<i>Residuos estándares</i>
15	1	587,60172	-96,13658957	-0,862193904
16	2	352,0993633	158,198808	1,418794327
17	3	163,697478	122,5701449	1,099261293
18	4	151,9223601	92,12625709	0,826227533
19	5	140,1472423	10,67963896	0,095779553
20	6	128,3721245	-63,65784202	-0,570910655
21	7	121,3070538	-107,1834108	-0,961266504
22	8	116,5970066	-116,5970066	-1,045691643

