

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**



“Desarrollo de un método analítico para la determinación de defensina-1 en miel de abeja, como apoyo en la evaluación de su capacidad antimicrobiana”

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en Bioquímica en el área de especialización en Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Memoria para optar al Título de Bioquímico por:

**IVÁN ERICK OPAZO ABALLAY**

Director: Dr. Edwar Fuentes Pérez

Codirector: Dr. Mauricio Báez Larach

SANTIAGO – CHILE

MAYO 2022

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

**IVÁN ERICK OPAZO ABALLAY**

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Toxicológica y Diagnóstico Molecular y Título de Bioquímico, en el examen público rendido el día

---

**Director de Tesis:**

Dr. Edwar Fuentes P. \_\_\_\_\_

**Co-director de Tesis:**

Dr. Mauricio Báez L. \_\_\_\_\_

**Comisión Evaluadora de Tesis:**

Dra. M<sup>a</sup> Antonieta Valenzuela P. \_\_\_\_\_

Dra. Tatiana Garrido R. \_\_\_\_\_

Dr. Mario Tello R. \_\_\_\_\_

*“There can be no progress nor achievement without sacrifice.”*

James Allen

## AGRADECIMIENTOS

Deseo comenzar agradeciendo a mis directores de tesis: al profesor Edwar Fuentes, por su infinita paciencia y apoyo durante todo el desarrollo de esta tesis, una conversación con él es capaz de entregar tranquilidad y certeza frente a cualquier problema; y al profesor Mauricio Báez, por su excelente disposición, y por siempre estar dispuesto a abrir las puertas de su laboratorio a mí y a cualquier persona que desee expandir los conocimientos que día a día ahí nacen.

A mi familia: mis padres, sin los cuales habría sido imposible la realización de este trabajo, por su amor y entrega, y enseñarme el poder que un abrazo o un desayuno tienen sobre el corazón; a mis hermanos por, a pesar de las peleas, estar siempre presentes para mí; a mis abuelos, por el infinito cariño que me han entregado durante toda mi vida; y a mi pareja, Constanza, por todos estos años de amor incondicional durante los altos y bajos que suceden durante una carrera universitaria.

Al equipo de trabajo del laboratorio de Bioquímica de la facultad, que sin su ayuda y consejo esta tesis no habría sido posible, literalmente; y por hacer sentir del laboratorio, un nuevo hogar; gracias de corazón por todas las risas. Al equipo de trabajo del laboratorio de QA-COET, por su apoyo y compañía, en especial en aquellas extenuantes jornadas de trabajo hasta horas inimaginables en el laboratorio, y por las alegrías y también dolores propios de una tesis que compartimos.

A los amigos que encontré durante la carrera, por todas las risas, alegrías, tramos de estudio, penas y frustraciones que compartimos a lo largo de los años.

A todos los docentes que participaron en mi formación y al personal de apoyo del laboratorio que mantiene todo en orden y funcionando.

Gracias de corazón a todos.

## **LUGAR DE DESARROLLO**

Laboratorio de Química analítica de contaminantes orgánicos y elementos traza, Departamento de Química inorgánica y analítica, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Laboratorio de Bioquímica, Departamento de Bioquímica y biología molecular, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

## **FINANCIAMIENTO**

Proyecto Fondecyt Regular N°1190217.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ABREVIATURAS	xii
RESUMEN	14
ABSTRACT	17
INTRODUCCIÓN	20
1. Relevancia ecológica y económica de <i>Apis mellifera</i> .	20
2. El síndrome de Colapso de la Colmena y sus implicancias actuales.	21
3. Inmunidad en <i>A. mellifera</i> .	22
4. Composición bioquímica de la miel.	24
5. La defensina-1 como biomarcador.	25
6. Herramientas analíticas para la determinación de defensina-1.	28
HIPÓTESIS	30
OBJETIVO GENERAL	30
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
MATERIALES Y MÉTODOS	31
Materiales	31
1. Insumos.	31
2. Reactivos.	31
3. Solventes.	32
4. Instrumentos.	32
5. Equipos.	32
6. Software.	33
7. Cepas bacterianas.	33

Métodos	34
1. Expresión y purificación del péptido defensina-1 recombinante.	34
2. Caracterización del péptido defensina-1 recombinante.	37
2.1. Análisis por LC-MS/MS del péptido defensina-1 recombinante.	37
2.2. Caracterización espectroscópica del péptido defensina-1 recombinante mediante fluorescencia total.	39
3. Desarrollo de un método de purificación y cuantificación de defensina-1 desde la miel de abeja.	40
3.1. Desarrollo de una curva de calibración, utilizando IP-RP-HPLC-FD, de defensina-1 recombinante.	40
3.2. Extracción en fase sólida de defensina-1 recombinante y posterior medición mediante espectroscopía de fluorescencia y IP-RP-HPLC-FD.	40
4. Determinación de la presencia de defensina-1 en miel y miel fortificada con el péptido recombinante, sometida a extracción en fase sólida, mediante el uso de IP-RP-HPLC-FD.	42
4.1. Muestras de Miel.	42
4.2. Extracción en fase sólida de defensina-1 desde mieles de la zona centro-sur de Chile, con y sin defensina-1 recombinante adicionada.	43
4.3. Cuantificación de defensina-1 en miel y miel fortificada con el péptido recombinante, sometida a extracción en fase sólida, mediante el uso de IP-RP-HPLC-FD.	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
1. Obtención de defensina-1 recombinante de <i>Apis mellifera</i> pura.	44
2. Caracterización del péptido defensina-1 recombinante.	45
2.1. Análisis por LC-MS/MS del péptido defensina-1 recombinante.	45
2.2. Caracterización espectroscópica del péptido defensina-1 recombinante mediante fluorescencia total.	48
3. Desarrollo de un método de purificación y cuantificación de defensina-1 desde la miel de abeja.	51
3.1. Desarrollo de una curva de calibración, utilizando IP-RP-HPLC-FD, de defensina-1	51

recombinante.	
3.2. Extracción en fase sólida de defensina-1 recombinante y posterior medición mediante espectroscopía de fluorescencia y IP-RP-HPLC-FD.	58
4. Determinación de la presencia de defensina-1 en miel y miel fortificada con el péptido recombinante, sometida a extracción en fase sólida, mediante el uso de IP-RP-HPLC-FD.	66
CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS	73

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación esquemática de las 3 isoformas del péptido antimicrobiano defensina-1.	24
Figura 2. Expresión de def-1 recombinante y posterior purificación.	36
Figura 3. Flujo de trabajo general de la metodología utilizada para el análisis por LC-MS/MS del péptido defensina-1 recombinante.	38
Figura 4. Fase co-polimérica con balance hidrofílico-lipofílico e intercambio catiónico mediante un ácido débil, presente en las columnas Oasis® WCX para extracción en fase sólida.	41
Figura 5. Resultado de un Tricina-SDS-PAGE al 16% de poliacrilamida de cada paso de la purificación realizada a la defensina-1 recombinante.	45
Figura 6. Cobertura (Coverage) de los péptidos obtenidos para la identificación de defensina-1 de <i>Apis mellifera</i> .	47
Figura 7. Composición aminoacídica de las diversas isoformas de la defensina-1 de <i>Apis mellifera</i> .	48
Figura 8. Matriz de excitación/emisión de una muestra de defensina-1 recombinante purificada de concentración 4 $\mu$ M.	49
Figura 9. Curva de calibración de defensina-1 recombinante realizada por fluorescencia.	50
Figura 10. Cromatograma de un punto de la curva de calibración realizada con defensina-1 recombinante entre 2,9 $\mu$ M y 11 $\mu$ M, realizada por IP-RP-HPLC-FD.	52
Figura 11. Cromatograma de un punto de la curva de calibración realizada con defensina-1 recombinante entre 11 $\mu$ M y 81,36 $\mu$ M, realizada por IP-RP-HPLC-FD.	52
Figura 12. Espectro de emisión de la señal cromatográfica obtenida a 1,55 minutos asociada a la defensina-1 recombinante, a una $\lambda_{exc}$ fija de 280 nm.	54
Figura 13. Curva de calibración de defensina-1 recombinante entre 2,9 $\mu$ M y 11 $\mu$ M, realizada por IP-RP-HPLC-FD.	55
Figura 14. Curva de calibración de defensina-1 recombinante entre 11 $\mu$ M y 81,36 $\mu$ M, realizada por IP-RP-HPLC-FD.	56
Figura 15. Matrices de excitación/emisión de defensina-1 recombinante v/s muestra de miel.	60

Figura 16. Matrices de excitación/emisión de defensina-1 recombinante sometida a SPE v/s miel fortificada con defensina-1 recombinante.	61
Figura 17. Matriz de excitación/emisión de miel de la VII región sometida a SPE.	63
Figura 18. Matrices de excitación/emisión de mieles de la zona centro-sur de Chile sometidas a SPE y llevadas a una concentración final de 1,6 g/mL.	64
Figura 19. Cromatograma asociado a una muestra de defensina-1 recombinante (5 $\mu$ M) sometida a la metodología desarrollada (WCX / IP-RP-HPLC-FD).	65
Figura 20. Cromatograma asociado a una muestra de miel sometida a la metodología desarrollada (WCX / IP-RP-HPLC-FD).	66
Figura 21. Cromatogramas asociados a una muestra de miel fortificada con defensina-1 recombinante (5, 15 y 25 $\mu$ M) sometida a la metodología desarrollada (WCX / IP-RP-HPLC-FD).	69

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Códigos asignados a las muestras de mieles, su localidad de origen, el año en que fueron cosechadas y su pH registrado.	42
Tabla 2. Resultado de la identificación de proteínas en la muestra de proteína purificada recombinante contra la base de datos de <i>Apis mellifera</i> .	46
Tabla 3. Intensidades de fluorescencia de la curva de calibración de defensina-1 recombinante realizada por espectrometría de fluorescencia.	50
Tabla 4. Concentración promedio de defensina-1 encontrada en las diferentes muestras de analizadas.	70

## ABREVIATURAS

$\lambda_{em}$	Longitud de onda de emisión
$\lambda_{exc}$	Longitud de onda de excitación
AGE	Producto de glicación avanzada
$\beta$ ME	Betamercaptoetanol
Def-1	Defensina-1
DTT	Ditiotreitol
C18	Octadecilsilano
EEM	Matriz de excitación-emisión
ELISA	Ensayos de inmunoadsorción ligado a enzima
FD	Detector de fluorescencia
Flu-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con fluoresceína-fenilboronato
GOX	Glucosa oxidasa
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
IMAC	Cromatografía de afinidad asociada a ion metálico
IP-RP-HPLC-FD	Cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa de pares iónicos acoplada a un detector de fluorescencia
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
LC-MS/MS	Cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
LPS	Lipopolisacáridos
MGO	Metilglioxal

SCC	Síndrome del colapso de la colmena
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SPE-WCX	Extracción en fase sólida con intercambio catiónico débil
$S_{y/x}$	Error estándar de la estimación
TFA	Ácido trifluoroacético
Ub-def1	Construcción proteica Ubiquitina / defensina-1
UMF	Factor único de la Manuka
USD	Dólar estadounidense

## RESUMEN

Entre los vectores de polinización animal de las plantas consumidas por el ser humano, la abeja melífera (*Apis mellifera*) es el de mayor relevancia, ya que poliniza alrededor de un 70% de estas; con una valorización aproximada de 190 billones de USD anuales a nivel mundial. Además, desde esta misma perspectiva este insecto es fundamental para mantener los ecosistemas naturales. Sin embargo, desde el 2006 *A. mellifera* ha experimentado un marcado descenso en su población, causado por la desaparición de las abejas obreras adultas de la colmena y el colapso de esta, fenómeno denominado Síndrome del Colapso de la Colmena (SCC); el que ha sido asociado a variados factores estresores como pesticidas, parásitos y patógenos actuando en conjunto. La importancia de *A. mellifera* y las presiones ambientales que está experimentando han llevado a estudiar de manera exhaustiva a la especie.

Para enfrentar los citados estresores y debido a su naturaleza social, *A. mellifera* ha desarrollado diversos mecanismos de inmunidad social, entre los cuales se destaca la secreción del péptido antibacteriano defensina-1 (péptido catiónico, rico en cisteínas con actividad principalmente contra bacterias Gram-positivas) desde glándulas exocrinas hacia los alimentos de la colmena: la jalea real y la miel. Esta última es reconocida por su actividad antibacteriana, antiviral y antifúngica y por ello se ha propuesto su uso en medicina clínica. Además de la defensina-1 hay varios factores responsables de la actividad antibacteriana de la miel (alta osmolaridad, pH ácido, generación de peróxido de hidrógeno). Sin embargo, son limitados los reportes sobre la determinación del péptido en la miel y dado que es uno de los principales factores que le otorgan su capacidad antibacteriana, representa un buen biomarcador para caracterizar y verificar la calidad del producto.

Para determinar defensina-1 en miel se ha propuesto la inmunoadsorción ligada a enzima (ELISA). Aunque este método es específico y bastante sensible, el reconocimiento inmunológico solo considera una parte de la estructura del péptido, lo que podría conducir a una pérdida de información sobre la presencia de diferentes especies, incluida una posible forma glicada de defensina-1. Bajo esta perspectiva, tener métodos de análisis con bases químicas de separación, detección y cuantificación de defensina-1 en la miel, podría representar un apoyo complementario a los estudios que requieren los actuales desafíos apícolas. En la presente tesis se propone desarrollar una metodología con bases químicas de separación, detección y cuantificación de defensina-1 en miel, basada en su extracción en fase sólida con intercambio catiónico débil (SPE-WCX), teniendo en cuenta su composición básica de aminoácidos; para luego determinarla por cromatografía líquida de alta rendimiento en fase reversa de pares iónicos (IP-RP-HPLC), acoplada a un detector de

fluorescencia en serie con un detector de arreglo de diodos.

La hipótesis propuesta es: “La miel de abeja de la especie *Apis mellifera* producida en la zona centro-sur de Chile, presenta defensina-1 en cantidades cuantificables mediante el método analítico desarrollado”. Mientras que el objetivo general de esta tesis fue: “Desarrollar un método analítico para cuantificar defensina-1 en la miel, mediante SPE-WCX asociada a IP-RP-HPLC-FD”.

En primer lugar, se obtuvo defensina-1 recombinante (empleada como patrón) mediante inducción de Ubiquitina-defensina-1 utilizando isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG). Se purificó la defensina-1 recombinante mediante cromatografía de afinidad asociada a ion metálico (IMAC), en un medio denaturante y reductor, y posterior cromatografía por exclusión molecular. Como resultado del proceso se obtuvo aproximadamente 1,25 mg de péptido por litro de medio de cultivo. Se verificó la identidad de la proteína purificada mediante cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS); con un 100% de coincidencia con la secuencia aminoacídica y un peso de 5.560 Da, muy similar al peso teórico de la isoforma utilizada para este estudio (5.525 Da).

Posteriormente se caracterizó a la defensina-1 recombinante por espectroscopía de fluorescencia total. Los espectros de fluorescencia total del péptido arrojaron máximos de excitación/emisión a 220/360 nm y 280/360 nm, asociados al residuo de triptófano presente en la defensina-1 recombinante. Se construyó una curva de calibrado con el valor de fluorescencia obtenido a 280/360 nm de longitud de onda de excitación/emisión ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ ); obteniéndose un  $R^2 = 0,9902$ ; corroborando la relación entre la concentración del péptido y su fluorescencia.

Se implementó un método para la detección-cuantificación de la defensina-1 mediante IP-RP-HPLC-FD. Para ello se usó una elución isocrática 80% fase A (Acetonitrilo y Betamercaptoetanol ( $\beta$ ME) 10 mM) y 20% fase B (Agua ultrapura y  $\beta$ ME 10 mM) en una columna C18 de 150 mm de largo y 4,6 mm de diámetro (Aeris™ 3,6  $\mu$ m PEPTIDE XB-C18 100 x 21 mm). Previo a su inyección, las muestras fueron incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con ácido trifluoroacético (TFA) y  $\beta$ ME para la reducción del péptido. Bajo estas condiciones, la defensina-1 recombinante presentó un único pico cromatográfico a los 1,55 minutos. Se construyeron dos curvas de calibrado de baja (2,9 a 11  $\mu$ M) y alta concentración (11 a 81,36  $\mu$ M); con valores de  $R^2$  de 0,9628 y 0,9828, respectivamente. Los LOD y LOQ fueron 2,2  $\mu$ M y 6,6  $\mu$ M, respectivamente.

Luego, se desarrolló una metodología basada en SPE-WCX para extraer la defensina-1 desde la miel. Los extractos obtenidos fueron analizados inicialmente mediante espectroscopía de fluorescencia total con el fin de evaluar la recuperación de la defensina. Sin embargo, no se obtuvieron resultados concluyentes debido a la variedad de señales de fluorescencia observadas. Por

ello se evaluó el resultado del proceso mediante IP-RP-HPLC-FD. La defensina-1 recombinante pura sometida a SPE-WCX presentó un pico cromatográfico a los 1,55 minutos y dos picos adicionales a los 1,79 y 2,23 minutos; atribuibles a especies de defensina-1 recombinante con una conformación distinta producto de la reducción y re-oxidación de los enlaces disulfuro de su estructura, producidos durante el proceso de purificación y/o separación. Por su parte, las muestras de miel sometidas SPE-WCX presentaron igualmente un pico cromatográfico a los 1,55 minutos asociado al péptido y el mismo pico adicional a los 1,79 minutos, parcialmente solapado al pico de la defensina-1; atribuible a una especie de defensina-1 con una conformación distinta como se mencionó anteriormente. Esto indica la necesidad de una incubación de las muestras con un reductor, previa a su análisis por HPLC

Finalmente se determinó la concentración de defensina-1 en cinco mieles provenientes de la zona central del país, obteniéndose valores entre  $26,5 \pm 0,4$  y  $60 \pm 2 \mu\text{g}$  de defensina-1 / g de miel; con coeficientes de variación entre 0,7 y 3,0%, lo que demuestra la buena repetitividad del método desarrollado.

Se concluye así, que se desarrolló un método basado en SPE-WCX asociado a HPLC-FD el que permitió detectar y cuantificar defensina-1 en mieles chilenas y confirmar la hipótesis propuesta. Este permitirá complementar el estudio de la miel relacionado con la presencia del péptido y su capacidad antimicrobiana y/o avalar el uso de la miel en otras dimensiones, más allá del consumo humano. Cabe señalar que se requieren hacer algunos ajustes al método desarrollado para dar mayor certeza a la determinación del péptido.

## ABSTRACT

Among the animal pollination vectors of plants consumed by humans, the honeybee (*Apis mellifera*) is the most relevant, since it pollinates about 70% of these plants, with an approximate value of 190 billion USD per year worldwide. Furthermore, from this same perspective, this insect is fundamental to maintain natural ecosystems. However, since 2006 *A. mellifera* has experienced a marked decline in its population, caused by the disappearance of adult worker bees from the hive and the collapse of the hive, a phenomenon called Colony Collapse Disorder (CCD), which has been associated with various stressors such as pesticides, parasites and pathogens acting together. The importance of *A. mellifera* and the environmental pressures it is experiencing have led to an exhaustive study of the species.

To cope with these stressors and due to its social nature, *A. mellifera* has developed several social immunity mechanisms, among which is the secretion of the antibacterial peptide defensin-1 (a cationic peptide, rich in cysteines with activity against Gram-positive bacteria), from exocrine glands to the hive food: royal jelly and honey. The latter is recognized for its antibacterial, antiviral and antifungal activity and has therefore been proposed for use in clinical medicine. In addition to defensin-1 there are several factors responsible for the antibacterial activity of honey (high osmolarity, acid pH, hydrogen peroxide generation). However, there are limited reports on the determination of the peptide in honey, and since it is one of the main factors that give honey its antibacterial activity, it represents a good biomarker to characterize and verify the quality of the product.

Enzyme-linked immuno-adsorption assay (ELISA) has been proposed to determine defensin-1 in honey. Although this method is specific and quite sensitive, the immunological recognition only considers a part of the peptide structure, which could lead to a loss of information about the presence of different species, including a possible glycated form of defensin-1. Under this perspective, having methods of analysis with chemical bases of separation, detection and quantification of defensin-1 in honey, could represent a complementary support to the studies required by the current beekeeping challenges. The present thesis proposes a chemically based methodology for the separation, detection and quantification of defensin-1 in honey, based on weak cation exchange with solid phase extraction (WCX-SPE), considering its basic amino acid composition, and then determining it by ion-pair reversed-phase high performance liquid chromatography (IP-RP-HPLC), coupled to a fluorescence detector in series with a diode array detector.

The proposed hypothesis is: "Bee honey of the *Apis mellifera* species produced in the central-southern zone of Chile, presents defensin-1 in measurable quantities by means of the analytical method developed". While the general objective of this thesis was: "To develop an analytical method to quantify defensin-1 in honey, by means of WCX-SPE associated to IP-RP-HPLC-FD".

First, recombinant defensin-1 (used as a standard) was obtained by induction of Ubiquitin-defensin-1 using isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Recombinant defensin-1 was purified by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) in a denaturing and reducing medium, followed by size exclusion chromatography. As a result of the process, approximately 1,25 mg of peptide was obtained per liter of culture medium. The identity of the purified protein was verified by liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS); with a 100% fit in the amino acid sequence and a weight of 5,560 Da, very similar to the theoretical weight of the isoform used for this study (5,525 Da).

Recombinant defensin-1 was then characterized by total fluorescence spectroscopy. Total fluorescence spectra of the peptide yielded excitation/emission maxima at 220/360 nm and 280/360 nm, associated with the tryptophan residue present in the recombinant defensin-1. A calibration curve was constructed with the fluorescence value obtained at 280/360 nm ( $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ ); obtaining an  $R^2 = 0,9902$ ; corroborating the relationship between peptide concentration and its fluorescence.

A method for the detection-quantification of defensin-1 by IP-RP-HPLC-FD was implemented. For this purpose, an isocratic elution of 80% phase A (acetonitrile and  $\beta$ ME 10 mM) and 20% phase B (ultrapure water  $\beta$ ME 10 mM) on a C18 column of 150 mm length and 4.6 mm diameter (Aeris™ 3.6  $\mu$ m PEPTIDE XB-C18 100 x 21 mm) was used. Prior to injection, samples were incubated for 1 h at room temperature with TFA and  $\beta$ ME for peptide reduction. Under these conditions, recombinant defensin-1 presented a single chromatographic peak at 1,55 minutes. Two calibration curves were constructed for low (2,9 to 11  $\mu$ M) and high concentration (11 to 81,36  $\mu$ M); with  $R^2$  values of 0,9628 and 0,9828, respectively. The LOD and LOQ were 2,2  $\mu$ M and 6,6  $\mu$ M, respectively.

An SPE-WCX based methodology was developed to extract defensin-1 from honey. The extracts obtained were initially analyzed by total fluorescence spectroscopy in order to evaluate the recovery of defensin. However, no conclusive results were obtained due to the variety of fluorescence signals observed. Therefore, the outcome of the process was evaluated by IP-RP-HPLC-FD. The pure recombinant defensin-1 subjected SPE-WCX presented a chromatographic peak at 1,55 minutes and two additional peaks at 1.79 and 2.23 minutes; attributable to recombinant

defensin-1 species with a different conformation as a result of the reduction and re-oxidation of the disulfide bonds of its structure produced during the purification and/or separation process. For their part, the honey samples subjected to SPE-WCX also presented a chromatographic peak at 1,55 minutes associated with the peptide and the same additional peak at 1,79 minutes, partially overlapping the defensin-1 peak; attributable to a defensin-1 species with a different conformation as previously mentioned. This indicates the need for incubation of the samples with a reducing agent prior to HPLC analysis.

Finally, the concentration of defensin-1 was determined in five honeys from the central zone of the country, obtaining values between  $26,5 \pm 0,4$  and  $60 \pm 2 \mu\text{g}$  of defensin-1 / g of honey; with coefficients of variation between 0,7 and 3,0%, which shows the good repeatability of the developed method.

It is thus concluded that a method based on SPE-WCX associated to HPLC-FD was developed, which allowed the detection and quantification of defensin-1 in Chilean honeys, thus confirming the proposed hypothesis. This will allow complementing the study of honey related to the presence of the peptide and its antimicrobial capacity and/or endorsing the use of honey in other dimensions, beyond human consumption. It should be noted that some adjustments need to be made to the method developed to give greater certainty to the determination of the peptide.

## INTRODUCCIÓN

### 1. Relevancia ecológica y económica de *Apis mellifera*.

La mayoría de las angiospermas, taxón asociado a las especies del reino vegetal comúnmente denominadas como “plantas con flores”, dependen para su fertilización de agentes externos conocidos como vectores, debido a que no poseen polen auto compatible, o la especie posee una variedad macho y hembra definida (Howard & Barrows, 2014; Intergovernmental Services, 2018). Dentro de este tipo de vehículos, se pueden considerar a los vectores animales como los polinizadores más relevantes a nivel mundial, participando en la reproducción floral de más del 87% de los sistemas agrícolas y naturales (Ollerton et al., 2011). Dentro del grupo de polinizadores animales podemos encontrar a: escarabajos, polillas, mariposas, hormigas, aves, abejas, murciélagos, entre otros (Rader et al., 2016). Sin embargo, dentro de este selecto grupo de vectores, los insectos se adjudican el 75% de la polinización de las especies cultivables, y hasta el 94% de las plantas silvestres a nivel mundial (Richards, 2001; Vanbergen et al., 2013).

La abeja occidental o europea (*Apis mellifera*) insecto perteneciente al filo de los artrópodos, se caracteriza por exhibir una organización social altamente jerarquizada, con una función específica para cada individuo, especialmente en las tareas de adquisición y almacenamiento del alimento, resultando en un enjambre que producirá y crecerá como un solo organismo (Trhlin & Rajchard, 2011; Eyer et al., 2016). *A. mellifera* poliniza el 16% de las especies vegetales a nivel mundial y el 70% de las especies de plantas consumidas regularmente por el ser humano, siendo la polinizadora principal del 48% de estas últimas (Thakur, 2012). Se ha estimado que este insecto genera aproximadamente 190 billones de USD anuales sólo por concepto de polinización de cultivos agrícolas a nivel mundial (Paudel et al., 2015); mientras que, en Estados Unidos, los llamados “servicios de polinización” que provee la apicultura produjeron, el 2016, ingresos por 338 millones de USD para cada apicultor con 6 o más colmenas en su poder (Ferrier et al., 2018). En Chile se estima que el impacto económico de esta actividad polinizadora se sitúa en el rango de los 225 a los 450 millones de USD (INDAP, 2007). Esta abeja ha sido ampliamente domesticada en búsqueda de sus productos, principalmente su miel, para ser comercializada debido a su alto valor nutricional (Lerdon & Navarro, 2017); en nuestro país, además, la miel es el principal producto primario pecuario de exportación, cuyo principal destino es a países de la Unión Europea como Alemania y Francia (ODEPA, 2018). Si bien Chile es el exportador de miel número 25 a nivel internacional, la actividad apícola es un rubro importante dentro de las actividades

pecuarias nacionales, con 4657 apicultores responsables de alrededor de 779 mil colmenas, distribuidas en 8851 apiarios repartidos por todo el territorio nacional (Barrera, 2015; SIPEC, 2018; ODEPA, 2018). En virtud de lo anterior, es imposible pasar por alto la importancia que estos organismos tienen, tanto para la mantención de los diversos ecosistemas terrestres en los que están presentes; como para el ser humano, por su aporte a la agricultura, y el impacto cultural que tienen en la sociedad (Byers, 2017; Intergovernmental Services, 2018).

## **2. El Síndrome de Colapso de la Colmena y sus implicancias actuales.**

Con la importancia que cada año va ganando la exportación nacional de productos apícolas, la fiscalización de la calidad y el seguimiento de los estándares internacionales se hace cada vez más complejo, al igual que la protección y mantención de la salud de las colmenas.

Desde el invierno del 2006 hasta la primavera del 2007, en el hemisferio norte del planeta las abejas melíferas adultas comenzaron a desaparecer en masa, dando cuenta de un fenómeno que se venía desarrollando desde hace décadas, con la pérdida de decenas de miles de colonias en EE. UU., entre 1980 y el 2005. (vanEngelsdorp et al., 2007; vanEngelsdorp et al., 2009). Estas desapariciones alcanzaron valores históricos de un 30% del total de colmenas en EE. UU. durante el periodo invernal 2006/2007, lo que despertó la alarma mundial para que se hicieran estudios de monitoreo más estrictos sobre el tema. Como resultado de ello, registros posteriores dieron a luz inquietantes cifras de pérdidas anuales: 53% en Europa, 85% en Medio Oriente y 25% en Japón (vanEngelsdorp et al., 2007; Neumann & Carreck, 2010). La gran mayoría de las colonias que perecieron reportaban las mismas características: 1. Una rápida disminución en el número de abejas trabajadoras adultas, y un exceso proporcional de crías, evidencia de una colmena débil o muerta. 2. Ausencia de abejas muertas al interior o en los alrededores de la colmena. 3. Ataques de pestes y robo por parte de abejas de colonias vecinas, luego de que la colmena colapsara (vanEngelsdorp et al., 2009). Luego, se denominó a este fenómeno como: Síndrome de Colapso de la Colmena (SCC o Colony Collapse Disorder, CCD por sus siglas en inglés), desorden que amenaza la población mundial de esta especie.

Los problemas que afectan a la abeja melífera moderna son múltiples: el uso de pesticidas, las malas prácticas en apicultura, la presión que ejercen ecosistemas saturados y altamente competitivos sobre los polinizadores; además de plagas nacidas y propagadas, en parte, por todos los factores antes mencionados, perjudican continuamente a la especie (Jacques et al., 2017; Le Conte et al., 2010; Mullin et al., 2010; Vanbergen et al., 2013). Se postula que el paso desde una

colmena sana, a una que inevitablemente perecerá por SCC, es inducida por esta serie de factores estresores y patogénicos, muchas veces sinérgicos, que debilitan lentamente a la colmena hasta su inevitable colapso, no lográndose identificar ninguna condición en específico que por sí sola logre causar el síndrome (Li et al., 2018; Oldroyd, 2007). En Chile, aún no se ha realizado un estudio detallado respecto a este fenómeno, pero sí se ha reportado que las abejas melíferas se ven expuestas a una amplia gama de insecticidas, plagas y parásitos. Entre los factores más relevantes que pudiesen causar un SCC, que han sido reportados en el país, está la presencia de los parásitos *Nosema* spp. y *Varroa destructor* (Maggi et al., 2016; Vargas et al., 2017), este último actuando como vector de otros patógenos virales y bacterianos (Hubert et al., 2015; Rosenkranz et al., 2010), los cuales van progresivamente destruyendo y mermando la integridad de la colmena, para que luego de una infección sostenida, esta muera por completo (Rosenkranz et al., 2010). Por lo tanto, canalizar la investigación hacia el entendimiento de los mecanismos inmunológicos de las abejas, y su capacidad de lidiar con estos estresores, podría ayudar a mejorar la salud y productividad de las colonias de la abeja europea.

### **3. Inmunidad en *A. mellifera*.**

Como todos los insectos, las abejas melíferas carecen de un sistema inmune adaptativo clásico. Con una densidad poblacional considerable y en constante contacto, *A. mellifera* es muy susceptible a enfermedades infecciosas, propagadas con facilidad entre los miembros del grupo por las condiciones físicas en las que se encuentran, y más aún cuando estos están altamente relacionados genéticamente entre sí (Cremer et al., 2007). Es por esto que como especie ha desarrollado diversos mecanismos de “inmunidad social”, como por ejemplo: la identificación y expulsión de la colmena de individuos infectados, para evitar el contagio de otros miembros (Spivak & Reuter, 2003), el recubrimiento de la colmena con materiales antisépticos como lo es el propóleo, constantes limpiezas sociales entre individuos en búsqueda de parásitos externos (Evans et al., 2006), y la producción de secreciones con actividad antimicrobiana desde glándulas exocrinas, entre ellas, moléculas de su sistema inmune celular y humoral, que van a parar a las distintas fuentes de alimentos de los que la colmena se provee (Ilyasov et al., 2013; Kwakman et al., 2010). Asimismo, para lidiar con los distintos tipos de infecciones microbiológicas que pueda sufrir, esta abeja ha evolucionado una serie de líneas de defensa individuales, como barreras físicas, respuestas inmunes humorales y respuestas inmunes celulares, las que conforman su sistema inmune innato (Randolt et al., 2008). Los mecanismos de defensa celulares están mediados por

hemocitos, los cuales tienen como principal función la fagocitosis de agentes exógenos y la liberación de péptidos antimicrobianos encargados de eliminar la infección, a nivel de hemolinfa (Müller et al., 2008). Entre ellos está la apidaecina, péptido rico en prolina compuesto de 18 aminoácidos, estable frente al calor, y de estructura no helical, con actividad bacteriostática contra bacterias principalmente Gram-negativas (Casteels et al., 1989); la abaecina, péptido de 34 aminoácidos, con un contenido del 30% de prolina, y capacidad bacteriostática contra el espectro de bacterias Gram-positivas (Casteels et al., 1990); la hymenoptaecina, péptido capaz de disminuir la viabilidad bacteriana tanto de bacterias Gram-positivas como negativas, de 93 aminoácidos en total (Casteels et al., 1993); y finalmente están las defensinas, uno de los componentes humorales más relevantes para la especie de abejas melíferas debido a su presencia adicional en la jalea real y la miel, lo que le da la característica de ser partícipe en la inmunidad social de la colmena (Fujiwara et al., 1990; Kwakman et al., 2010). Las defensinas comprenden una amplia familia de péptidos antimicrobianos, catiónicos, y ricos en cisteínas, capaces de actuar frente a una variedad de microorganismos como bacterias, virus y hongos (Ilyasov et al., 2013; Raj & Dentino, 2002). Las defensinas de insectos comparten ciertas características estructurales como su longitud, variando entre los 36 y 51 aminoácidos; su abundancia de residuos de cisteína, las cuales, al menos para la defensina de *A. mellifera*, son esenciales para su actividad antimicrobiana (Bílikova et al., 2015); y sus estructuras secundarias compuestas por un loop en el amino terminal, un alfa hélice y dos hojas beta antiparalelas estabilizadas por tres puentes disulfuro (Klaudiny et al., 2005). Los estudios sobre la actividad antimicrobiana de la defensina de *A. mellifera* han sido enfocados en bacterias, demostrando actividad bactericida principalmente contra especies Gram-positivas (Bachanová et al., 2002; Bílikova et al., 2015; Gätschenberger et al., 2013; Kwakman et al., 2010), pero con cierta selectividad por algunas Gram-negativas (Bílikova et al., 2015; Kwakman et al., 2010). El mecanismo de acción descrito para las defensinas ha sido generalizado a todas las moléculas que presenten sus características estructurales: estas moléculas, estando ionizadas positivamente, interactúan con los componentes negativos de las membranas, que incluyen lipopolisacáridos (LPS) en el caso de las bacterias Gram-negativas, polisacáridos (como el ácido lipoteicoico) en el de las Gram-positivas, o fosfolípidos. Esta unión provoca la lisis celular, y posterior muerte de la bacteria en cuestión (Raj & Dentino, 2002). Se ha demostrado en *Micrococcus luteus*, que la adición de defensina de insecto resulta en una inmediata perturbación en la permeabilidad de su membrana: la célula pierde potasio citoplasmático y se despolariza parcialmente, lo que deriva en la inhibición de la respiración celular, y una disminución significativa del ATP intracelular (Cociancich et al., 1993).

Dos genes diferentes que codifican defensina han sido descubiertos en *A. mellifera*: *defensina-1* y *defensina-2* (Klaudiny et al., 2005). El gen denominado *defensina-1* codifica 3 isoformas (Fig. 1): la defensina presente en la hemolinfa de la abeja (Denominada en este trabajo como Def-H) (Casteels-Josson et al., 1994), y dos variantes descubiertas en la Jalea Real y la cabeza de abejas melíferas nodrizas, denominadas Royalisina-F (Ro-F) (Fujiwara et al., 1990) y Royalisina-K (Ro-K) (Klaudiny et al., 2005), respectivamente. Adicionalmente, *defensina-1* es la única variante genética expresada en las glándulas superiores de la abeja, las cuales liberan su contenido sobre la Jalea Real o la miel, lo que reafirma su relevancia para la actividad antimicrobiana que presentan estos alimentos, y finalmente, la inmunidad social de la colmena (Ilyasov et al., 2013; Klaudiny et al., 2005).



**Figura 1. Representación esquemática de las 3 isoformas del péptido antimicrobiano defensina-1.** Representación esquemática de las 3 isoformas del péptido antimicrobiano defensina-1. La diferencia entre Ro-K (5525.4 Da) y Ro-F (5532.4 Da) está representada en rojo/azul, al reemplazarse una arginina por tirosina en la posición 50. Adicionalmente, la diferencia entre Ro-K y Def-H (5515.5 Da) es una inversión de los aminoácidos valina y glicina en las posiciones 34-35 y está señalada en verde/fucsia. Finalmente, la diferencia entre Def-H y Ro-F es la conjunción de las dos diferencias mencionadas anteriormente. Las cisteínas, señaladas en color naranja, forman enlaces disulfuro en la siguiente secuencia: C1-C4, C2-C5 y C3-C6. Extremo izquierdo: amino terminal. Extremo derecho: carboxilo terminal. Secuencias obtenidas y editadas a partir de la base de datos en línea del NCBI y del Portal de recursos bioinformáticos suizo (ExPASy).

#### 4. Composición bioquímica de la miel.

En términos moleculares, la miel está compuesta principalmente de monosacáridos como la glucosa y la fructosa, además de otros componentes menores como aminoácidos, ácidos orgánicos, vitaminas, minerales, compuestos fenólicos, péptidos y una serie de enzimas como la glucosa oxidasa, invertasa, amilasa y catalasa (Bogdanov et al., 2008; da Silva et al., 2016). No obstante, su composición variará en gran medida dependiendo del origen botánico de sus

componentes, las condiciones meteorológicas, y la región geográfica (Soares et al., 2017).

Desde la antigüedad, la miel ha sido reconocida por sus propiedades nutricionales y terapéuticas (Bogdanov et al., 2008), por lo que actualmente, es ampliamente estudiada por su potente actividad antibacteriana (Bachanová et al., 2002; Bílikova et al., 2015; Kwakman et al., 2010), antiviral (Shahzad & Cohrs, 2012), y antifúngica (Irish et al., 2006). Entre los responsables de esta actividad está su alta osmolaridad, dada gracias al alto contenido de azúcares que la constituyen (Bogdanov et al., 2008), y el pH ácido que impera en las soluciones de miel, que se genera gracias a la acción de la enzima glucosa oxidasa (GOX), la cual, a partir de glucosa y oxígeno molecular, produce ácido glucónico y peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), otro potente agente antimicrobiano (Bucekova et al., 2014). En conjunto con la acción de estas moléculas, está la defensina-1, descrita anteriormente, la cual llega a la miel gracias a la acción de las abejas recolectoras. Estas se dirigen en búsqueda del néctar, lo succionan, y luego lo almacenan en sus estómagos, donde se mezclará con las secreciones peptídicas y enzimáticas provenientes de sus glándulas hipofaríngeas y salivares, para ser procesado y modificado hasta su almacenamiento final (FAO, 2009). Esto permite concentrar desde un 60-85% de agua inicial en el néctar, hasta un 12-23% de agua en la miel, alcanzando hasta un 95% de peso seco en carbohidratos. (Bogdanov et al., 2008; Bogdanov et al., 2011).

## **5. La defensina-1 como biomarcador.**

Hoy en día, la miel es utilizada en medicina clínica, en particular, para tratar quemaduras, heridas crónicas, infecciones bacterianas resistentes, o en el tratamiento de pacientes que no pueden someterse a un aseo quirúrgico seguro, como neonatos o adultos mayores (Aziz & Abdul, 2017; Jull et al., 2015; Vandamme et al., 2013). Por ende, es esencial la selección de miel de alta calidad para su uso como potencial tratamiento médico.

Los estándares actuales estipulan precisamente los criterios a cumplir, en cuanto a composición, que la miel debe poseer para su consumo, incluyendo entre otros, contenido de azúcares, humedad y concentraciones definidas de ciertos compuestos como metales pesados o pesticidas (FAO, 2001; The Council of the European Union, 2002). Sin embargo, en lo que respecta a los estándares que se requieren cumplir para calificar con la calidad de “clínica” a una miel, no existe un consenso institucionalizado que le conceda dicho título a las mieles cuyo propósito final es terapéutico. No obstante, se ha propuesto en la literatura una serie de criterios necesarios para poder considerar a la miel en cuestión apropiada para su uso clínico, además de la

obvia necesidad de que posea una alta capacidad antimicrobiana, como por ejemplo: estar libre de sustancias tóxicas y contaminantes, su esterilización a través de radiación gamma para librarla de microorganismos persistentes, y el seguimiento de estrictos estándares de producción y almacenamiento de acuerdo con las normas sanitarias establecidas por el organismo legal correspondiente (Hermanns et al., 2020; Simon et al., 2009). Sin perjuicio de lo anterior, se ha desarrollado un indicador específico para clasificar de manera definitiva a la miel como “miel de uso clínico”. El Factor único de la Manuka o *Unique Manuka Factor* (UMF por sus siglas en inglés), es un indicador autóctono de Nueva Zelanda que ha sido utilizado por dicho país, a través de empresas independientes y de acuerdo con sus estipulaciones legales, para certificar productos apícolas con una elevada capacidad antimicrobiana, autenticidad y frescura (Rabie et al., 2016; Unique Manuka Factor Honey Association, 2021). Dicho factor lleva su nombre gracias a la Manuka, árbol de origen oceánico que domina el mercado actual de mieles medicinales.

No obstante, existen problemáticas asociadas al uso de este indicador. El parámetro principal que se utiliza en la determinación del UMF es la actividad antimicrobiana derivada específicamente de la presencia de Metilglioxal (MGO) en la miel en estudio, un precursor altamente reactivo de productos de glicación avanzada (AGEs), el cual le otorga dichas cualidades (Adams et al., 2008; Kwakman et al., 2011). Como se puede verificar en la literatura disponible, los AGEs afectan la funcionalidad de las proteínas al modificar estructuralmente dichas moléculas (Bouma et al., 2003; Chevalier et al., 2002; Ghosh et al., 2013; Ghosh-Moulick et al., 2007; Iqbal et al., 2016; Wei et al. 2009), esto genera la inhibición de enzimas y péptidos importantes para la acción antimicrobiana de la miel, como por ejemplo la GOX (Majtan et al., 2013), y la defensina-1 (Majtan et al., 2012), vulnerando las capacidades antimicrobianas específicas de este péptido contra, por ejemplo, bacterias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, una de las bacterias más relevantes a nivel clínico por sus altos índices de infecciones intrahospitalarias, y su actual resistencia frente a antibióticos convencionales (Cooper & Jenkins, 2009). Además, la presencia del MGO está exclusivamente ligado al origen botánico de la miel, por lo que dicho marcador es insuficiente para analizar la calidad del resto de mieles presentes en el mercado, como por ejemplo la miel Revamil® (Bfactory Health Products, Rhenen, Países Bajos) para la cual está descrito en la literatura que su principal actividad antimicrobiana proviene del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la defensina-1 (Kwakman et al., 2010; Kwakman et al., 2011). Esto último podría abrir las puertas al mercado a mieles de otros orígenes si se emplease a la defensina-1 como un nuevo indicador de calidad antimicrobiana de mieles que no contengan MGO. En base a estos antecedentes la defensina-1 podría ser utilizada como un nuevo marcador biológico capaz de medir la actividad antimicrobiana de la miel y

adicionalmente servir como parámetro analítico en la estandarización de su uso médico y su certificación.

Otros factores que considerar, de entre los múltiples que afectan la composición y calidad de la miel, son condiciones como el tiempo de almacenamiento, o la temperatura a la cual se ve expuesta, las cuales, de no ser las adecuadas, pueden provocar la formación de compuestos tóxicos para el ser humano. Un claro ejemplo de esto son los productos de Maillard, los cuales son producto de la condensación de glucosa con aminoácidos que posean un grupo amino primario, provocando la glicación de las proteínas en cuestión (Welsh et al., 2016; da Silva et al., 2016). Lo anterior cobra aún mayor importancia, cuando las especies modificadas están relacionadas con la actividad antimicrobiana de la miel, como la defensina-1, la cual, como cualquier péptido dentro de una solución con concentraciones saturantes de azúcar, incubado por un largo tiempo, y a temperaturas considerablemente altas para la miel, podría sufrir glicaciones en su estructura, y como se ha visto con la glicación de otras proteínas, perder sus capacidades funcionales (Chua et al., 2013; Welsh et al., 2016). Por todo lo anterior mencionado, es necesario desarrollar métodos que permitan la determinación de compuestos relevantes para establecer la calidad, autenticidad y propiedades de la miel (como lo sería la defensina-1), en vistas a su comercialización y consumo humano, (Bogdanov & Martin, 2002).

Cuando se analizó el contenido proteómico de la miel procedentes de una serie de especies vegetales, como girasol, eucalipto y acacia, se estableció que las principales proteínas identificadas en las mieles procedían de abeja (Chua et al., 2013; Di Girolamo et al., 2012), mientras que el resto de los componentes proteicos proceden del polen forrajado de la planta (Nazarian et al., 2010). Por lo que los péptidos antimicrobianos, discutidos anteriormente, serían un marcador adecuado para verificar la calidad y autenticidad de la miel.

Recientemente, ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA) han sido utilizados para cuantificar la “Major Royal Jelly Protein 1” (MRJP1), también conocida como apalbumina-1, tanto en miel como en jalea real. Sin embargo, debido a su alta abundancia en la miel, la cual alcanza el 23% del contenido proteico total, es difícil verificar variaciones significativas en su concentración producto de factores estresores patológicos, o alteraciones realizadas por el hombre (Bíliková & Šimúth, 2010). En su lugar, la defensina-1 se presenta como una alternativa al encontrarse en bajas concentraciones en la miel, y cuya variación se podría relacionar a adulteraciones como la adición de azúcares industriales, por ejemplo, el jarabe de maíz (Valachová et al., 2016).

Consecuentemente, se ha planteado la determinación de este péptido como parámetro de

calidad estándar, en la selección de mieles cuyo uso requiere una elevada capacidad antimicrobiana. El primer grupo en lograrlo fue el de Valachová (Valachová et al., 2016), el cual evaluó la posibilidad de cuantificar el péptido mediante un ELISA competitivo, utilizando anticuerpos policlonales con el fin de seleccionar mieles con un alto potencial antimicrobiano. Sin embargo, la realización de un ensayo ELISA trae una serie de complicaciones a un procedimiento que busca ser validado y automatizado: i. Para lograr una elevada selectividad se requiere del uso de anticuerpos monoclonales, cuya obtención es laboriosa en tiempo y recursos, ii. Existe una alta posibilidad de obtener un falso positivo o negativo, debido a un bloqueo insuficiente o mal realizado de la superficie con antígeno o anticuerpo inmovilizado, iii. Pobre estabilidad del anticuerpo a utilizar, si es que no se mantiene bajo condiciones de almacenamiento y refrigeración adecuadas (Sakamoto et al., 2018).

Además, aunque este método es relativamente específico y bastante sensible, el reconocimiento inmunológico sólo considera una pequeña parte de la secuencia aminoacídica de la defensina-1. Así, variaciones que puedan ocurrir en otras regiones del péptido, incluyendo una posible glicación, no podrían ser detectadas por esta técnica. Bajo esta perspectiva, contar con métodos de análisis con bases químicas de separación, detección y cuantificación de defensina-1, podría significar un apoyo complementario a los estudios que requieren los desafíos apícolas actuales, como la determinación de su actividad antimicrobiana.

## **6. Herramientas analíticas para la determinación de defensina-1.**

A pesar de lo antedicho, la determinación de defensina-1 en la miel ha sido poco considerada. Una forma propuesta es el ELISA, no obstante, con sus limitaciones antes mencionadas. Frente a este problema, la espectroscopia de fluorescencia aparece como una herramienta analítica útil y simple para evaluar proteínas y sus formas glicadas. Como se puede apreciar en la figura 1, la defensina-1 posee un triptófano en su extremo carboxilo terminal, lo cual permite determinar su presencia mediante fluorimetría. Por lo que sería posible realizar una identificación preliminar rápida de defensina-1 mediante esta técnica espectroscópica; ya sea como proteína recombinante sintetizada en el laboratorio, o nativa en la miel.

Con respecto a la separación necesaria de la defensina-1 desde la miel, antes de su determinación, y teniendo en cuenta la composición básica de aminoácidos de este péptido (Fig. 1) (Fujiwara et al., 1990; Klaudiny et al., 2005); un tratamiento de aislamiento adecuado podría ser el uso de una extracción en fase sólida, con intercambio catiónico débil (SPE-WCX). De hecho, este

tratamiento se ha utilizado de manera eficiente para el aislamiento de la apidaecina (Péptido antimicrobiano básico similar a la defensina-1), desde la hemolinfa de abeja, antes de su determinación por cromatografía líquida (Daníhlík et al., 2014). Por otro lado, la técnica más utilizada para el análisis de péptidos en alimentos es la cromatografía líquida de alto rendimiento en fase reversa de pares iónicos (IP-RP-HPLC) (Herraiz, 1997). Así, luego del aislamiento y concentración de los péptidos de la matriz por SPE-WCX, la separación se puede realizar en columnas C18 para generar "mapas peptídicos", con una fase móvil de agua-acetonitrilo, más 0,1% de ácido trifluoroacético como reactivo de par iónico (Herraiz, 1997). El análisis de los péptidos antimicrobianos de *A. mellifera* y *Bombus pascuorum* se ha realizado de manera efectiva mediante este método (Casteels-Josson et al., 1994; Rees et al., 1997), sin embargo, no hay información disponible sobre la determinación de defensina-1 en miel utilizando IP-RP-HPLC. Por lo tanto, el aislamiento de la defensina-1 desde la miel por SPE-WCX, podría asociarse a IP-RP-HPLC para realizar su determinación analítica.

Por otra parte, la medición de la fluorescencia del triptófano a longitudes de onda de excitación ( $\lambda_{exc}$ ) 280nm / longitudes de onda de emisión ( $\lambda_{em}$ ) 360nm, aumentaría la selectividad y la sensibilidad del análisis. Además, si se registran los espectros de emisión en lugar de valores individuales de fluorescencia, se podría lograr una mejora en estas características analíticas. La cuantificación de péptidos y proteínas separados por HPLC, mediante la detección de fluorescencia nativa debido al triptófano, se ha informado con un límite de cuantificación tan bajo como 0,24 picomoles (Saraswat et al., 2012). Por esta razón, y considerando que el contenido de defensina-1 presente en la miel reportado anteriormente por Valachová et al., (2016) fue en promedio de 1,4  $\mu\text{g/g}$ , la sensibilidad de un método basado en HPLC acoplado a un detector de fluorescencia (FD), puede ser ciertamente adecuada para su determinación en esta matriz. Inclusive, la IP-RP-HPLC se ha utilizado para la separación de péptidos glicosilados de sus análogos no modificados (Frolov & Hoffmann, 2008).

En virtud de lo expuesto, esta tesis propone la utilización de una metodología analítica basada en SPE-WCX asociada a IP-RP-HPLC, y acoplada a un FD en serie con un detector de arreglo de diodos, para la cuantificación de la defensina-1. Complementariamente, se utilizará una versión recombinante del péptido defensina-1, para utilizar como estándar en la determinación de la fluorescencia y comportamiento frente a la IP-RP-HPLC, que tendrá el péptido nativo. De esta manera, se espera contar con un método analítico que permita determinar defensina-1 en miel, considerando que este péptido podría ser un biomarcador imprescindible en la selección de mieles con una alta capacidad antimicrobiana.

## **HIPÓTESIS.**

La miel de abeja de la especie *Apis mellifera* producida en la zona centro-sur de Chile, presenta defensina-1 en cantidades cuantificables mediante el método analítico desarrollado.

## **OBJETIVO GENERAL.**

Desarrollar un método analítico para cuantificar defensina-1 en la miel, mediante SPE-WCX asociada a IP-RP-HPLC-FD.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- 1.** Purificar el péptido antimicrobiano recombinante de defensina-1 de *Apis mellifera*, mediante expresión heteróloga en *E. coli*.
- 2.** Caracterizar la defensina-1 recombinante mediante espectroscopía de fluorescencia y cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas (LC-MS/MS).
- 3.** Desarrollar y validar un método para la determinación de defensina-1 en miel, basado en SPE-WCX asociada a IP-RP-HPLC-FD.
- 4.** Determinar defensina-1 mediante el método previamente desarrollado, en muestras de miel de la zona centro sur de Chile.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales**

#### **1. Insumos**

Asas plásticas de siembra

Papel filtro 5B, Advantec

Placas de cultivo celular de 96 pocillos y fondo plano de poliestireno, Nest

Placas Petri de poliestireno, Nest

Puntas de propileno de micropipeta de 1- 10, 20-200 y 100-1000  $\mu$ L

Tubos con tapa rosca de polipropileno de 15 y 50 mL

Tubos eppendorf de polipropileno de 1,5 y 2 mL

Viales de vidrio ámbar, tapa rosca y contratapa de teflón de 20 mL

Inserto de vidrio de 150  $\mu$ L

Viales de vidrio de 2 mL

#### **2. Reactivos**

Ácido acético 99,8%, Merck

Ácido clorhídrico 37% m/v, Merck

Ácido trifluoroacético para síntesis, Merck

Agar, Becton Dickinson

Betamercaptoetanol, Sigma-Aldrich

Cloruro de sodio para análisis, Merck

Coomassie® Azul brillante G 250, Merck

DTT, Sigma-Aldrich

EDTA, Merck

Etanol 95%, Merck

Extracto de levadura, Merck

E.Z.N.A.® Plasmid Mini Kit II, Omega

Fosfato mono ácido de sodio 99,5%, Merck

Hidróxido de sodio 99%, Merck

IPTG, US Biological

Imidazol, Sigma-Aldrich.

Kanamicina, US Biological

Peptona, Merck

Tris, AppliChem

Urea, Merck

### **3. Solventes**

Acetonitrilo para cromatografía líquida 99,9%, Merck

Agua destilada

Agua grado miliq

### **4. Instrumentos**

Celda de cuarzo de 3 mL con paso óptico de 1 cm para espectroscopía ultravioleta-visible

Celda de cuarzo de 760  $\mu$ L con paso óptico de 0,5 cm para espectroscopía de fluorescencia

Material de vidrio de uso general y volumétrico clase A

Micropipetas de 1-10, 20-100 y 100-1000  $\mu$ L

### **5. Equipos**

Balanza analítica Sartorius Basic B120s.

Balanza granataria RADWAG WTB 200.

Balanza modelo 4000C ( $\pm 0,00001$  g), Precisa.

Baños ultrasónicos ISOLAB y Transsonic Digital, Elma.

Bomba peristáltica Bio-Rad Model EP-1 Econo™ Pump.

Centrífuga modelo Labofuge™, Heraeus™.

Centrífuga modelo Universal 32 R, Hettich.

Centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B.

Columnas de afinidad de níquel HisTrap HP 1 y 5 ml (GE® Life Sciences, EE. UU.).

Equipos de electroforesis en geles de poliacrilamida (BioRad, EE. UU.).

Espectrómetro de fluorescencia modelo Cary-Eclipse, Varian, equipado con dos monocromadores Czerny-Turner y una lámpara de destello de xenón.

Espectrofotómetro luz visible Jenway 6320D.

Sistema HPLC Waters Alliance, modelo 2695, equipado con detector de diodos modelo Waters 996, Photodiode Array Detector y de fluorescencia modelo Waters 2475 Multi  $\lambda$  Fluorescence Detector.

Incubadora con agitación Thermo Stable IS-30R y WIS-30R.

Incubadora ZHiCHENG ZDP-A-2080<sup>a</sup>.

Lector de placas multimodo Tecan Infinite 200 PRO.

Microcentrífuga modelo Z216MK, Hermle.

pHmetro modelo pH 1100, Oakton.

Sonicador Omni International, Sonic ruptor 250.

Mezclador vortex modelo MX-S, Scilogex.

Microcentrífuga Prism<sup>TM</sup> modelo C2500-230V, Labnet.

## **6. Software**

GraphPad Prism v9.0.0 (121), GraphPad Software, Inc.

Matlab v7.6.0.324 (R2008a), The MathWorks, Inc.

STATGRAPHICS Centurion XVI v16.1.03, Stat Point Technologies, Inc.

Geneious 11.0.4, Biomatters Ltd.

Microsoft Office 365

## **7. Cepas bacterianas**

En este trabajo se utilizaron las cepas *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y *Escherichia coli* BL21 (DE3) para el trabajo de biología molecular, obtenidas del Laboratorio de Bioquímica del Dr. Mauricio Báez Larach de la FCQyF de la Universidad de Chile.

## MÉTODOS

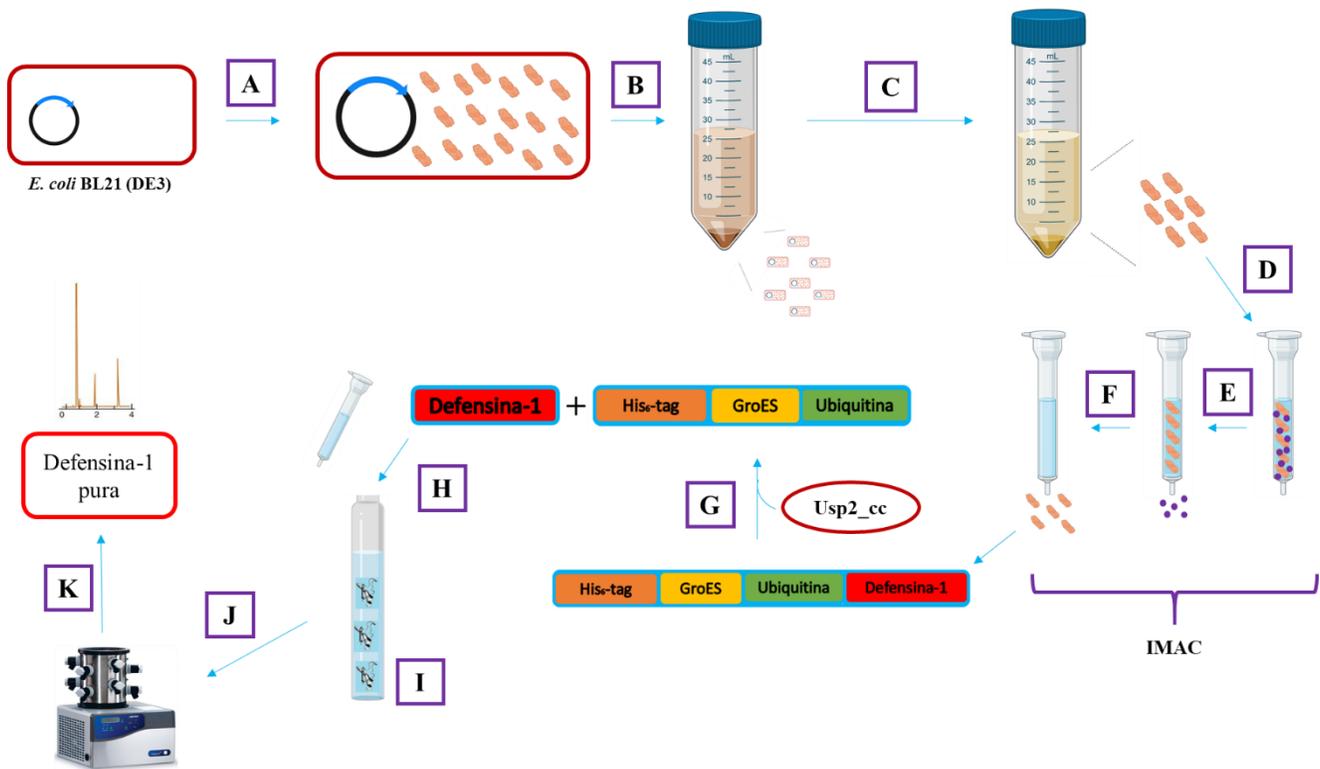
### 1. Expresión y purificación del péptido defensiva-1 recombinante.

Se empleó el método de inducción de la expresión de Ubiquitina-defensiva-1 (Ub-def1) de acuerdo con lo reportado por Shahnawaz et al., 2007, con algunas modificaciones. La proteína recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad a través de columnas de Ni-agarosa, HisTrap HP de 1 mL y 5 mL (GE Healthcare, USA). Con este propósito, la cepa *E. coli* BL21(DE) portadora del vector pET28-GroES, en cuyo interior se encuentra la construcción con el péptido, se cultivó en dos litros de medio LB hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,5 OD (8453 UV-vis Spectrophotometer, Hewlett Packard, Inc.). La inducción de la expresión de Ub-def1 se realizó con IPTG 0,5 mM por 3 horas, 37°C y 220 rpm (Shaking incubator, Model: ZHWY-200D, Zhicheng®). Luego de este tiempo, se procedió a centrifugar a 4080 g por 15 minutos a 10°C, se desechó el sobrenadante, y se centrifugó una segunda vez con 15 mL aproximadamente del sobrenadante restante, a las mismas condiciones mencionadas anteriormente. Finalmente, el sedimento de bacteria se almacenó a -20°C y el resto fue desechado.

El sedimento bacteriano fue disuelto en 40 ml de una solución de lisis (8 M Urea, 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol y 3 mM Betamercaptoetanol ( $\beta$ ME)) hasta completa disolución, y posterior a ella, se continuó la lisis por 1 hora adicional, todo en constante agitación con barra magnética. Posteriormente el lisado fue sonicado a 40% de potencia y pulso de 50% por 15 minutos en hielo (Omni Sonic Ruptor 250, OMNI international©). El sobrenadante de la lisis obtenido mediante centrifugación (14500 g por 45 minutos a 10°C) fue aplicado en dos columnas de Ni-Agarosa HisTrap HP (GE Healthcare, USA) de 5 mL en serie, cuya resina fue previamente equilibrada con la solución de lisis. La carga de la muestra se realizó a razón de 2 ml por minuto. Luego la columna fue lavada con 15 volúmenes (150 mL) de una solución consistente de: 4 M Urea, 50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol y 3 mM Betamercaptoetanol ( $\beta$ ME); para finalmente eluir el péptido con 30 ml de la solución de elución (Urea 4 M, 300 mM NaCl, 0,2 M Ácido acético, 3 mM  $\beta$ ME). Las fracciones eluidas se tomaron cada 1,5 ml y la concentración de proteína se cuantificó utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Las fracciones con mayor concentración de proteína se unificaron en una sola solución, y su composición se modificó para obtener las condiciones adecuadas para la reacción de corte de la proteasa Usp2\_cc, enzima deubiquitinasa que separa la construcción His<sub>6</sub>-tag/GroES/Ubiquitina del péptido (Shahnawaz et al., 2007): 3 M Urea, 300 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 0,5 mM EDTA, 10 mM  $\beta$ ME. Se procuró que la

cantidad de proteína presente en la digestión fuese de 1 mg/ml. Para eliminar la secuencia mencionada anteriormente de manera proteolítica, la solución del péptido se incubó *over-night* con una 20ava parte de proteasa Usp2\_cc a 37°C con respecto a la cantidad total de construcción proteica. El grado de purificación y la acción de la proteasa Usp2\_cc se determinó mediante SDS-Tris-Tricina-PAGE utilizando la muestra de la proteína antes (His<sub>6</sub>-tag/GroES/Ub-def1) y después del corte (def-1) con la enzima en cuestión. La solución del péptido digerido con la proteasa fue almacenada a 4°C.

Posteriormente, la defensina-1 (def-1) recombinante fue separada del resto de la construcción mediante cromatografía de exclusión molecular, para ello primero se pasó el producto de la digestión por una columna de Ni-agarosa, HisTrap HP de 1 mL (GE Healthcare, USA), con el fin de retirar la mayor cantidad posible de enzima (en cuya estructura posee una cola de poli histidina (His<sub>6</sub>)) y del resto de la construcción proteica (His<sub>6</sub>-tag/GroES/Ub/def-1). El péptido resultante, fue dializado con una membrana de diálisis (Spectra/por®3 Dialysis Membrane MW: 3.5 kD, SpectrumLabs S.A.) contra agua de grado mili-q durante toda la noche. El resultado de la diálisis fue posteriormente liofilizado (FreeZone 1 Liter Benchtop Freeze Dry System, Labconco®) para deshacernos del agua y separar al péptido mediante cromatografía de exclusión molecular. Como paso final de la purificación, se re-suspendió el liofilizado en cloruro de Guanidinio (Gn-HCl) 6M previo a la inyección en una columna Superdex™ Peptide 10/300 GL (GE Healthcare, USA). Esta columna fue acoplada al equipo ÄKTA explorer™ (GE Healthcare, USA), y se realizó la corrida cromatográfica a 1 mL/min, en una fase móvil: 150 mM NaCl, 50 mM Acetato de sodio pH 4.0, 10 mM βME. Se rescató el pico cromatográfico asociado a la absorbancia a 280 nm del único triptófano presente en la muestra: el de la def-1, en fracciones de 500 uL. Finalmente, la pureza del péptido se verificó mediante SDS-Tris-Tricina-PAGE de acuerdo con lo propuesto por Schagger, 2006. Un resumen esquemático de la metodología utilizada se expone en la figura 2.



**Figura 2. Expresión de def-1 recombinante y posterior purificación.** Se sobre expresó la construcción que contenía la def-1 mediante el uso de IPTG en la cepa de *E. coli* BL21(DE3), la cual posee el sistema de expresión del fago T7 y posteriormente se purificó la defensina-1 siguiendo la siguiente secuencia: **A.** Inducción de la expresión de la construcción His<sub>6</sub>-tag/GroES/Ub/def-1 utilizando IPTG; **B.** Centrifugación del cultivo inducido para obtenerlo como pella; **C.** Segunda centrifugación para separar la construcción proteica del resto de los remanentes bacterianos; **D.** Carga del sobrenadante obtenido en una columna de Ni-NTA para separar la construcción proteica del resto de proteínas bacterianas; **E.** Lavado de los residuos proteicos con baja afinidad por la columna; **F.** Elución de la construcción mediante el uso de una fase móvil ácida; **G.** Digestión de la construcción proteica eluída para obtener defensina-1; **H.** Elución de la digestión por una columna de Ni-NTA para retener y retirar así la mayor cantidad de construcción sin def-1; **I.** Diálisis de la solución eluída desde la columna de Ni-NTA; **J.** Liofilización del dializado con el fin de concentrar el péptido; **K.** Purificación final del péptido def-1 mediante cromatografía de exclusión molecular, de cualquier remanente aún presente de alguno de los pasos anteriores.

El péptido resultante de la purificación fue cuantificado gracias a una curva de calibración realizada a partir de una muestra de def-1 recombinante, cuantificada a su vez, utilizando un espectrómetro IR Direct Detect® (Merck KGaA©) por una empresa externa (MELISA institute). Con la concentración de esta muestra se procedió a construir la curva tal como se describe más adelante en el punto 2.2.

## **2. Caracterización del péptido defensina-1 recombinante.**

### **2.1 Análisis por LC-MS/MS del péptido defensina-1 recombinante.**

El análisis realizado por LC-MS/MS para verificar la identidad y pureza del péptido purificado fue realizado por la empresa Melisa Institute. Con este propósito, 100 uL de la muestra de defensina recombinante purificada fue enviada a Concepción contenida en una bolsa de bioseguridad y congelada en hielo seco. En el lugar fue cuantificada utilizando un espectrómetro IR Direct Detect® (Merck KGaA©). 50 ug del péptido fue liofilizado y posteriormente resuspendido en 30 uL de una solución 8 M Urea y 25 mM de Bicarbonato de amonio. Luego, el péptido fue reducido con ditioneitol (DTT) a una concentración final de 20 mM en 25 mM de bicarbonato de amonio, e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Seguido, este se alquiló agregando iodoacetamida a una concentración final de 20 mM en 25 mM bicarbonato de amonio, para ser finalmente incubado por 1 hora en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente, fue diluida 8 veces con 25 mM de bicarbonato de amonio.

Con el fin de realizar los análisis por espectrometría de masas en tándem, se realizó una digestión con Tripsina grado secuenciación (#V5071, Promega©), en una proporción 1 en 50 de proteasa/proteína (masa/masa). Se incubó esta mezcla por 16 horas a 37°C. La reacción de digestión se detuvo por acidificación, agregando ácido fórmico al 10%. Luego los péptidos tripticos resultantes fueron sometidos a desalting con columnas *Clean Up Sep-Pak C18 Spin Columns* (Waters), según las indicaciones del proveedor. Finalmente, los péptidos fueron secados en un concentrador rotatorio a 1000 rpm (Equipo no detallado) overnight a 10°C.

Como parte del proceso de LC-MS/MS, 200 ng de los péptidos tripticos obtenidos en el paso anterior fueron inyectados (vehículo de inyección no especificado) a un nanoUHPLC nanoElute® (Bruker©) acoplado a un espectrómetro de masas “timsTOF Pro” (“Trapped Ion Mobility Spectrometry – Quadrupole Time Of Flight Mass Spectrometer”, Bruker©), utilizando una columna Aurora UHPLC (25 cm x 75 µm ID, 1,6 µm C18, IonOpticks©, Australia). La cromatografía líquida se realizó en un gradiente de 90 minutos de 2% al 35% de Buffer B (0,1% ácido fórmico – Acetonitrilo). La colección de resultados fue realizada utilizando el software TimsControl 2.0 (Bruker©) bajo 10 ciclos de PASEF (Parallel Accumulation Serial Fragmentation), con un rango de masas de 100-1.700 m/z, ionización del capilar 1500 V y una temperatura de 180°C en el capilar, frecuencia del TOF 10 KHz a una resolución de 50.000 FWHM.

Para la identificación de los péptidos obtenidos, los datos resultantes fueron analizados con el software PEAKS Studio X+ (Bioinformatics solutions Inc.©) en un servidor de análisis de datos compuesto por 48 núcleos y 512 Gb de memoria RAM. Se utilizaron parámetros de tolerancia de masas de 50 ppm, utilizando masas monoisotópicas y fragmentos iónicos de 0,05 Da. Dentro de las opciones de digestión se utilizó tripsina como enzima: modo de digestión específico y un máximo de 2 escisiones de pérdidas por péptido (“missed cleavages per Peptide”). Se utilizaron como modificaciones post-traduccionales (PTM): Carbamidometilación de las cisteínas (PTM fija), oxidación de metionina, acetilación de Lisina, deaminación de asparagina y glutamina y carbamilación de lisina y N-terminal. La base de datos utilizada para la identificación fue el proteoma de *Apis mellifera* y *Escherichia coli* disponible en Uniprot (18.109 entradas y 4.391 entradas, respectivamente). Se incluyó la estimación de la tasa de descubrimiento falso (False Discovery Rate o FDR por sus siglas en inglés), por medio de una base de datos decoy, construida de manera artificial, con el fin de obtener falsos positivos de manera equitativa en la base de datos real y la decoy; así se logra obtener un parámetro de calidad que dé cuenta de la tasa de falsos positivos resultantes del análisis bioinformático: FDR. Como filtro se utilizó un  $FDR \geq 1\%$  (significancia  $\geq 20$  en PEAKS Studio X+) y 1 péptido único significativo mínimo por proteína para la identificación. Un resumen esquemático de la metodología utilizada se presenta en la figura 3.



**Figura 3. Flujo de trabajo general de la metodología utilizada para el análisis por LC-MS/MS del péptido defensina-1 recombinante.** Imagen extraída del informe entregado por la institución MELISA Institute.

## 2.2 Caracterización espectroscópica del péptido defensina-1 recombinante mediante fluorescencia total.

Para evaluar la fluorescencia de la defensina (producto de la presencia de un residuo de triptófano en su estructura) y la relación de esta señal con su concentración, se obtuvo la fluorescencia de una curva de calibrado preparada a partir de la def-1 recombinante cuya concentración fue determinada previamente mediante espectrometría infrarroja (espectrómetro IR Direct Detect® - Merck KGaA©). Para ello, se prepararon soluciones de la def-1 recombinante entre 1 y 5  $\mu\text{M}$  (equivalentes a 5,525 mg/L y 27,63 mg/L) en triplicado, en el buffer usado para su elución desde la columna de exclusión molecular (150 mM NaCl, 50 mM Acetato de sodio pH 4.0, 10 mM  $\beta\text{ME}$ ). Luego se obtuvieron los espectros de fluorescencia total (también llamados matrices de excitación-emisión o EEM, por sus siglas en inglés) de la curva de calibrado en un espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian Inc., Australia), equipado con dos monocromadores Czerny-Turner, y una lámpara de destello de Xenón. Las EEM se registraron en los intervalos espectrales siguientes: 250 a 450 nm cada 2 nm para la longitud de onda de emisión ( $\lambda_{\text{em}}$ ) y de 200 a 350 nm cada 5 nm para la longitud de onda de excitación ( $\lambda_{\text{exc}}$ ), con un slit de emisión y excitación de 10 nm. Se utilizó una celda de cuarzo (Starna Scientific Limited©, Inglaterra) con un volumen interno de 800  $\mu\text{l}$  y paso óptico de  $5 \times 5$  mm. Las EEM generados fueron posteriormente analizados, registrándose la intensidad de la fluorescencia medida a 280 nm  $\lambda_{\text{exc}}$  / 360 nm  $\lambda_{\text{em}}$  (asociada al residuo de triptófano presente en la defensina-1). Posteriormente se hizo la regresión entre estos valores de fluorescencia y las concentraciones de las diferentes soluciones para evaluar la relación entre ambas. Adicionalmente, los espectros de fluorescencia obtenidos se guardaron en formato ASCII y se transfirieron a una computadora para su posterior manipulación. Las rutinas y cálculos quimiométricos mencionados a continuación se implementaron en MATLAB v7.6.0.324 (R2008a) (Mathworks, Natwick, MA). Se ejecutó el algoritmo MCR-ALS para analizar estos datos utilizando la interfaz gráfica de la caja de herramientas MVC2 (Olivieri et al., 2009), descargada de: [www.iquir-conicet.gov.ar/eng/div5.php?area=12](http://www.iquir-conicet.gov.ar/eng/div5.php?area=12). Se utilizó la rutina propuesta por Zepp y colaboradores (Zepp et al., 2006) para eliminar los picos de dispersión de Rayleigh y Raman de los EEM. De esta manera las matrices provenientes de los distintos puntos del calibrado fueron corregidas y finalmente graficadas mediante la interfaz gráfica mencionada con anterioridad.

### **3. Desarrollo de un método de purificación y cuantificación de defensina-1 desde la miel de abeja.**

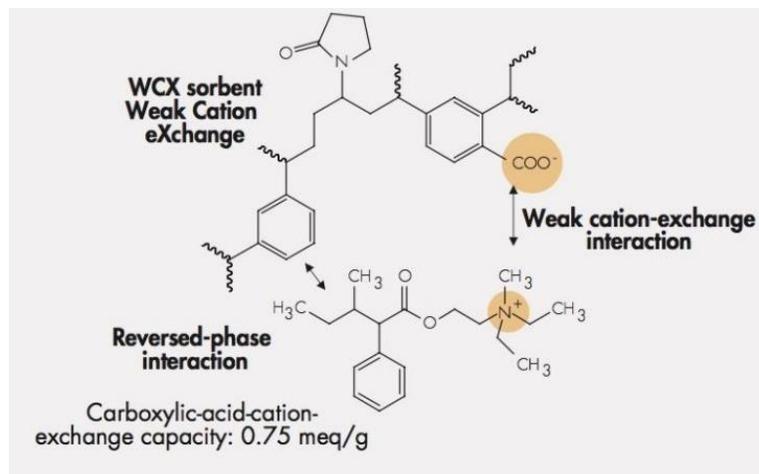
#### **3.1 Desarrollo de una curva de calibración, utilizando IP-RP-HPLC-FD, de defensina-1 recombinante.**

Se implementó un método basado en HPLC de fase reversa acoplado a un detector de fluorescencia, de acuerdo con Rees et al., 1997, con modificaciones realizadas de acuerdo con la naturaleza química de la defensina-1. Se prepararon 16 soluciones entre 2,9 y 81,36  $\mu\text{M}$  (equivalentes a 16,02 y 449,5 mg/L) de defensina-1 recombinante en agua ultrapura para realizar una curva de calibrado. 60  $\mu\text{L}$  de las soluciones para calibrado se mezclaron con 20  $\mu\text{L}$  de una solución de ácido trifluoroacético (TFA) 0,25% v/v y 20  $\mu\text{L}$  de una solución 50 mM de  $\beta$ -mercapto etanol ( $\beta\text{ME}$ ) para obtener una concentración final de TFA de 0,05% v/v y de  $\beta\text{ME}$  de 10 mM. Estas mezclas fueron traspasadas a viales de vidrio de 150  $\mu\text{L}$ . Previo análisis por cromatografía, se incubaron las muestras en el agente reductor, a temperatura ambiente, por 1 hora. Se utilizó el sistema HPLC Waters 600 con una columna C18 de 150 mm de largo y 4,6 mm de diámetro (Aeris™ 3,6  $\mu\text{m}$  PEPTIDE XB-C18 100 x 21 mm). El volumen de inyección fue de 20  $\mu\text{L}$  y la elución se hizo con 2 fases: la fase A correspondió a acetonitrilo y  $\beta\text{ME}$  10 mM y la fase B fue agua ultrapura con la misma concentración de  $\beta\text{ME}$ . El programa de elución de las muestras duró 4 minutos, en los cuales se hizo una elución isocrática con 80% fase A y 20% fase B. El flujo fue de 1 mL/min y la columna se mantuvo a 35°C durante toda la corrida. La curva de calibrado se construyó considerando el área bajo la curva del pico cromatográfico generado por la fluorescencia registrada a 280 nm de excitación y 360 nm de emisión. Además, con el objetivo de corroborar la señal de fluorescencia de la defensina asociada al triptófano, se realizó un registro de los espectros de fluorescencia entre 290 y 400 nm, para 280 nm en excitación, de las fracciones cromatográficas cada 1 segundo (modo scan).

#### **3.2 Extracción en fase sólida de defensina-1 recombinante y posterior medición mediante espectroscopía de fluorescencia y IP-RP-HPLC-FD.**

Se evaluó el uso de un método de extracción y purificación de la defensina-1 desde la miel, basado en extracción en fase sólida empleando una fase co-polimérica, con balance hidrofílico-lipofílico e intercambio catiónico sobre un ácido débil, de la compañía Waters (Oasis®

WCX (weak cation exchange) 6cc/500 mg), de acuerdo con lo propuesto por Danihlík et al., 2014 para la extracción de apidaecina desde hemolinfa de abejas. La fase empleada se muestra en la figura 4.



**Figura 4. Fase co-polimérica con balance hidrofílico-lipofílico e intercambio catiónico mediante un ácido débil, presente en las columnas Oasis® WCX para extracción en fase sólida.** La fase utilizada para realizar las extracciones puede actuar como fase reversa, y a su vez de intercambio catiónico débil, gracias a la presencia de un ácido carboxílico en su estructura, como se presenta en el círculo naranja de la imagen. Imagen extraída de Oasis Sample Extraction Products, 2008, Página 8.

Primero, se evaluaron las condiciones para la extracción en fase sólida sobre WCX para la defensina-1 recombinante pura: se prepararon 12 mL de una solución buffer fosfato (0.15 M Fosfato mono/di-ácido de sodio, ajustado con Ácido clorhídrico 37% m/v hasta pH = 6), en la cual se adicionó defensina-1 recombinante de acuerdo con la concentración final esperada. Se realizó la SPE en las columnas con fase co-polimérica en la siguiente secuencia: i) 5 mL de MeOH para activar la columna. ii) 5 mL de Buffer fosfato para su ambientación. iii) 12 mL de la solución buffer fortificada con defensina-1 recombinante. iv) 5 mL de Buffer fosfato pH 6 como primer lavado (para eliminar azúcares y compuestos polares en la miel). v) 10 mL de MeOH como segundo lavado para eliminar interferencias apolares. vi) 10 mL de una solución Acetonitrilo (AcN) al 40% / ácido trifluoroacético (TFA) 0,15% v/v para eluir el péptido recombinante. El eluato fue recogido en viales de vidrio ámbar tapa rosca de 20 mL, y posteriormente se evaporó a presión reducida con un evaporador rotatorio Heidolph VV 2000 (Heidolph Instruments GmbH & CO. KG®, Alemania). Luego, la muestra se reconstituyó en 500 uL de buffer de elución (150 mM NaCl, 50 mM Acetato de sodio pH 4.0, 10 mM  $\beta$ ME).

Para evaluar de forma exploratoria la capacidad de recuperación de def-1 desde una muestra sometida al proceso de SPE-WCX; se obtuvieron los EEM de dichas soluciones, de acuerdo con lo detallado en la sección 2.2. Esto permitió la identificación de los fluoróforos presentes en las muestras analizadas, más específicamente, el triptófano presente en la estructura de la defensina-1.

Finalmente, con el mismo objetivo del párrafo anterior, se procedió a medir la defensina-1 recombinante obtenida del proceso de extracción en fase sólida, a través IP-RP-HPLC-FD, ya que por sí solo, el espectro de excitación-emisión no es concluyente. Dichas mediciones se realizaron bajo las mismas condiciones descritas en el punto 3.1.

#### **4. Determinación de la presencia de defensina-1 en miel y miel fortificada con el péptido recombinante, sometida a extracción en fase sólida, mediante el uso de IP-RP-HPLC-FD.**

##### **4.1 Muestras de miel.**

Se determinó la defensina-1 en muestras de miel de origen multi-botánico de *A. mellifera* de colmenas originarias de diversas zonas geográficas del país, en específico, de las regiones de: Coquimbo, Valparaíso, Metropolitana, O'Higgins, Maule y Los Lagos. Estas muestras de miel fueron adquiridas directamente a los proveedores durante el período 2016-2020 y almacenadas en recipientes de vidrio. En la tabla 1 se muestra el detalle de las muestras estudiadas.

**Tabla 1. Códigos asignados a las muestras de mieles, su localidad de origen, el año en que fueron cosechadas y su pH registrado.**

Código de la muestra	Locación (región)	Año de cosecha	pH
Miel A	Maule / VII región	2020	4,12
Miel B	De los Lagos / X región	2019	4,29
Miel C	Metropolitana / XIII región	2019	4,57
Miel D	Coquimbo / IV región	2019	4,07
Miel E	De O'Higgins / VI región	2017	3,87
Miel F	Valparaíso / V región	2016	4,26

#### **4.2 Extracción en fase sólida de defensina-1 desde mieles de la zona centro-sur de Chile, con y sin defensina-1 recombinante adicionada.**

Se realizó la extracción en fase sólida sobre WCX de las 6 mieles presentes en la tabla 1. Se prepararon 25 mL de una solución de miel al 20% m/v en Buffer fosfato (0.15 M Fosfato mono/di-ácido de sodio, ajustado con Ácido clorhídrico 37% m/v hasta pH = 6), la cual fue filtrada, antes de alcanzar el aforo. Posteriormente se realizó el procedimiento de extracción en duplicado de acuerdo con lo ya descrito en la sección 3.2; cargando 12 mL de la solución de miel al 20% m/v. La muestra se reconstituyó en 500 uL de buffer de elución (150 mM NaCl, 50 mM Acetato de sodio pH 4.0, 10 mM  $\beta$ ME). Para los experimentos de recuperación de defensina-1 en miel fortificada con esta, se adicionó def-1 recombinante a los 12 mL de solución de miel al 20% m/v (Miel A) a una concentración final de análisis de 5, 15 y 25  $\mu$ M (en 500 uL de buffer ácido), muestras que fueron sometidas al mismo procedimiento de SPE.

Para determinar la presencia de la defensina en los extractos de miel obtenidos mediante SPE-WCX, con y sin def-1 recombinante adicional; se obtuvieron sus EEM de acuerdo con lo detallado en la sección 2.2. Esto permitió la determinación del número de fluoróforos en un sistema multicomponente como es la miel y, en base a la información bibliográfica, la identificación de los compuestos fluorescentes presentes en las muestras de miel purificada, con y sin fortificación previa.

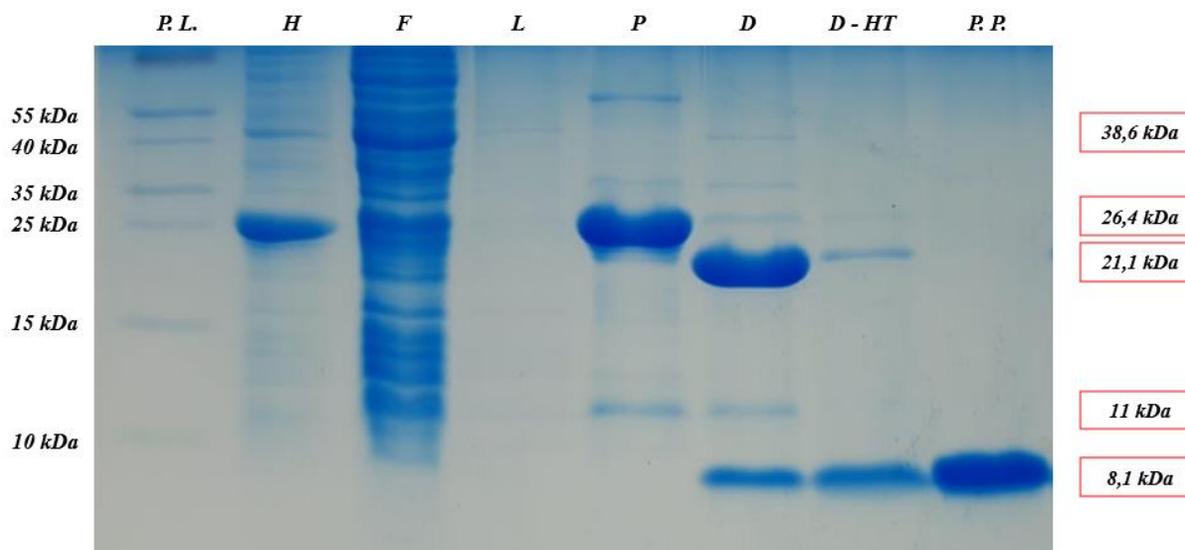
#### **4.3 Cuantificación de defensina-1 en miel y miel fortificada con el péptido recombinante, sometida a extracción en fase sólida, mediante el uso de IP-RP-HPLC-FD.**

Para determinar la defensina-1 en la miel y su recuperación desde miel fortificada con el péptido luego de aplicar SPE-WCX, los extractos de miel fueron analizados mediante IP-RP-HPLC-FD de acuerdo con la metodología descrita en el punto 3.1.

## Resultados y discusión

### 1. Obtención de defensina-1 recombinante de *Apis mellifera* pura.

Como resultado del proceso de purificación de defensina-1 se obtuvo aproximadamente 1,25 mg de péptido por litro de medio de cultivo. La pureza del péptido verificada mediante SDS-Tris-Tricina-PAGE se puede observar en la figura 5. En el carril **H** se ve una banda de aproximadamente 26 kDa la cual corresponde al peso teórico aproximado de la construcción expresada en *E. coli* (26,62 kDa); banda que se repite en el carril **P** posterior al lavado de las columnas de Ni-Agarosa HisTrap HP (GE Healthcare, USA) de 5 mL en serie, en las cuales se cargó la proteína, demostrando que la proteína bajo el protocolo utilizado queda retenida en la columna de afinidad y por ende es posible purificar a partir del homogeneizado bacteriano. Adicional a la proteína de interés, existen otras impurezas, las cuales se pueden visualizar como bandas de 46,3; 31 y 11 kDa, que probablemente interactúen fuertemente con la columna, sin embargo, debido a la menor intensidad de las bandas, no son relevantes considerando los pasos realizados posteriormente como parte del proceso de purificación. En el lavado representado por el carril **L** se puede ver que ninguna proteína es lavada de la columna, por lo que no hay pérdida de la construcción proteica durante este paso. Se ve en carril **F** que luego de cargar la columna con el homogeneizado, una gran cantidad de la construcción queda retenida en ella, debido a que no se observa una banda prominente a la altura del peso teórico de la construcción Ub-def1, en el carril correspondiente al frente de la columna. Con fines comparativos, se cargó 18 ug de proteína en los carriles **P**, **D** y **P.P**. En el carril **D** se aprecian 3 nuevas bandas en comparación al carril **P**: una banda de 38,6 kDa la cual representa la proteasa utilizada para separar la defensina-1 del resto de la proteína (Shahnawaz et al., 2007); una banda de 21,1 kDa asociada a la construcción sin la defensina; y finalmente una banda de 8,1 kDa la cual representa a la defensina-1, cuyo peso molecular se aleja de los 5,5 kDa teóricos, atribuible a una migración irregular por parte del péptido debido a su pequeño tamaño (Rath et al., 2009), razón además, por la cual se usa un gel de poliacrilamida más denso de lo común. En el carril **D-HT** se muestra la digestión, luego de haberse pasado por una columna de afinidad a ion níquel para separar la mayor cantidad de construcción de la defensina-1, y como se puede apreciar, aún existen restos de la construcción que no son posibles separar del péptido. Finalmente, la defensina, aún con vestigios de la construcción y la construcción digerida, fue dializada, liofilizada, y purificada mediante cromatografía de exclusión molecular, cuyo resultado y pureza de la defensina 1 se puede apreciar en el carril **P.P**.



**Figura 5. Resultado de un Tricina-SDS-PAGE al 16% de poliacrilamida de cada paso de la purificación realizada a la defensina-1 recombinante. P. L.:** Estándar de peso molecular. **H:** lisado bacteriano obtenido luego de la expresión de la construcción. **F:** fracción eluída luego de pasar el homogeneizado por la columna His-Trap. **L:** fracción eluída luego de pasar buffer de lavado con imidazol por la columna para eliminar cualquier interacción inespecífica. **P:** fracción eluída luego de pasar un buffer de elución ácido para recuperar la construcción desde la columna. **D:** digestión de la proteína eluída en el paso anterior con el fin de separar a la defensina-1 del resto de la construcción proteica. **D – HT:** resultado de la digestión pasado con una columna de afinidad a ion níquel para separar la mayor cantidad de construcción de la defensina-1. **P. P.:** defensina-1 dializada, liofilizada, y purificada mediante cromatografía de exclusión molecular.

## 2. Caracterización del péptido defensina-1 recombinante.

### 2.1 Análisis por LC-MS/MS del péptido defensina-1 recombinante.

La muestra fue sometida a LC-MS/MS tal como se describió en la metodología. Los datos recolectados desde el espectrómetro de masas fueron analizados utilizando el software PEAKS X+ con el módulo de identificación de proteínas PEAKS IMS. En la tabla 2 se muestra los detalles de la identificación de defensina-1 en la muestra, donde se rescata la cobertura de los péptidos identificados (coverage (%)), número de péptidos (#peptides), modificaciones post-traduccionales (PTM), masa de la proteína completa (Avg. Mass) y descripción de la proteína (Description). Con respecto a estos parámetros, es importante mencionar que el coverage o cobertura; correspondiente a la cantidad de secuencias proteicas, encontradas tanto en la muestra analizada como en el péptido de interés (def-1), que “cubren” la secuencia teórica de la proteína; informada es 54%. No obstante,

este valor depende del contexto en el que se hizo el análisis bioinformático, donde en este caso se comparó las secuencias encontradas en la muestra entregada contra la secuencia completa de la defensina-1, incluyendo las regiones “Pre” y “Pro” del péptido (Figura 7). Bajo esta consideración, se pudo mapear el 100% del péptido maduro de la defensina-1, tal como se puede apreciar en la figura 6. Además, y como consecuencia del análisis bioinformático que arrojó resultados correspondientes al péptido completo, y no sólo la versión madura de este, en la tabla 2 aparece una masa de 10,7 kDa, mientras que el peso del péptido recombinante reportado por la empresa fue de 5.560 Da, casi el valor exacto del peso teórico de la isoforma de defensina-1 utilizada para este estudio: 5.525 Da. En total se secuenciaron 14 péptidos trípticos correspondientes a defensina-1 que contienen diversas PTMs, las cuales son incorporadas artificialmente en los procesos de preparación de la muestra, y se ven en detalle en la figura 6.

**Tabla 2. Resultado de la identificación de proteínas en la muestra de proteína purificada recombinante contra la base de datos de *Apis mellifera*.** Ambas identificaciones hacen referencia a la misma proteína, pero con código de acceso diferente, debido a que fueron encontradas tanto en *Apis mellifera* como en *Apis mellifera carnica*.

Protein ID	Accession	Coverage (%)	#Peptides	PTM	Avg. Mass (Da)	Description
1	P17722	54	14	Carbamidometilación; carbamilación; deamidación; acetilación (N-terminal)	10.717	Defensin-1 OS=Apis mellifera OX=7460 PE=1 SV=3
2	Q5J8R1	54	14	Carbamidometilación; carbamilación; deamidación; acetilación (N-terminal)	10.717	Defensin-1 OS=Apis mellifera carnica OX=88217 PE=1 SV=1



**Figura 6. Cobertura (Coverage) de los péptidos obtenidos para la identificación de defensina-1 de *Apis mellifera*.** Arriba: se logran ver los péptidos identificados, mostrados en franjas azules, así como también las modificaciones post-traduccionales (PTM) sufridas por dichos péptidos. Las barras grises muestran los péptidos *de novo* (sin corte triptico) identificados en la muestra. Abajo: representación esquemática de la isoforma de la defensina-1 utilizada para la identificación del péptido recombinante analizado mediante LC-MS/MS. Se cataloga como “Ro-K” debido a su denominación en la literatura (Klaudiny et al., (2005)). Secuencia obtenida y editada a partir de la base de datos en línea del NCBI y del Portal de recursos bioinformáticos suizo (Expasy).

	I	<u>Pre region</u>	I	<u>Pro region</u>	I
Ro-K		MKIYFIVGLLLFMAMVA	IMAAPVEDEFEPLEHFENEERADRHR		
De-C		MKIYFIVGLLLFMAMVA	IMAAPVEDEFEPLEHFENEERADRHR		
De-L		.....	FEPLEHFENEERADRHR		

Mature peptide

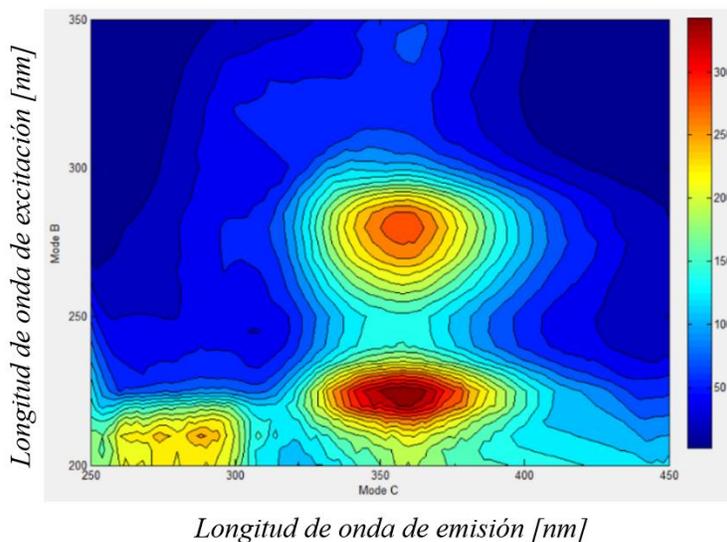
Ro-K	VTCDLLSFKGQVNSACAANCLSLGKAGGHCEKGVCICRKTSFKDLWDKRF
De-C	VTCDLLSFKGQVNSACAANCLSLGKAGGHCEK <u>VG</u> CICRKTSFKDLWDKRF
De-L	VTCDLLSFKGQVNSACAAN <u>H</u> SLGKAGGHCEKGVCICR.....
Ro-F	VTCDLLSFKGQVNSACAANCLSLGKAGGHCEKGVCICRKTSFKDLWDK <u>Y</u> F

*Figura 7. Composición aminoacídica de las diversas isoformas de la defensina-1 de Apis mellifera. Se logra observar la secuencia pre-pro-péptido (parte superior) y péptido maduro (parte inferior). Figura extraída desde Klaudiny et al., (2005).*

## 2.2 Caracterización espectroscópica del péptido defensina-1 recombinante mediante fluorescencia total.

Desde el artículo de Fujiwara et al. en 1990, se ha logrado describir la presencia de la defensina-1 tanto en la jalea real, como la miel. Las tres isoformas de defensina-1 presentes en la abeja melífera contienen 51 aminoácidos, 6 residuos de cisteína que forman tres enlaces disulfuro y un residuo de triptófano en la posición 47. Sin embargo, el análisis por espectrometría de masas de defensina-1 ha reportado diferencias entre la masa molecular de la defensina-1 de hemolinfa o Ro-K (PM = 5525,4 Da) y la de jalea real Ro-F (PM = 5532,4 Da). Dicha diferencia es causada por la sustitución de arginina a tirosina en Ro-F en la posición 50 del extremo C-terminal (Fujiwara et al., 1990; Klaudiny et al., 2005). Por otro lado, la evidencia sugiere que la isoforma encontrada en la miel corresponde a la que presenta arginina (Klaudiny et al., 2005; Kwakman et al., 2010; Valachová et al., 2016). Por ello, y como ya se exhibió en la figura 6, la identidad aminoacídica de la defensina-1 utilizada en este trabajo fue Ro-K. Tomando en consideración que en dicho péptido existe sólo un aminoácido fluorescente, el triptófano, la detección de dicho residuo mediante fluorescencia permitiría evidenciar su presencia en miel, y su posterior caracterización.

La caracterización espectroscópica de la defensina-1 recombinante se realizó a través de los EEM para cada punto del calibrado siguiendo la metodología descrita en el punto 2.2. En la figura 8 se presenta la EEM correspondiente a la concentración 4  $\mu\text{M}$ .



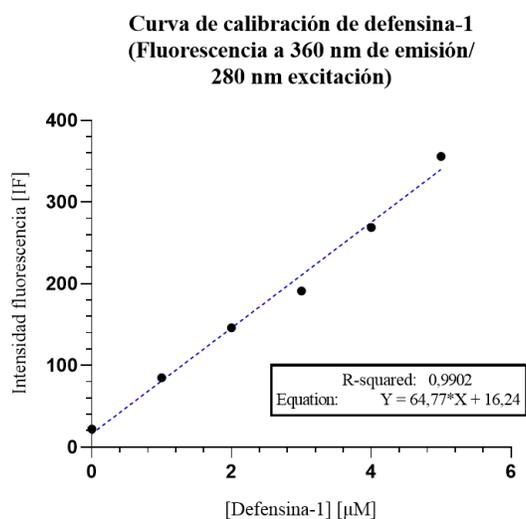
**Figura 8.** Matriz de excitación/emisión de una muestra de defensina-1 recombinante purificada de concentración 4  $\mu\text{M}$ . La visualización se realizó mediante el programa MATLAB v7.6.0.324 (R2008a) (Mathworks, Natwick, MA).

En esta figura se pueden reconocer principalmente dos señales, con máximos de excitación/emisión a 220/360 nm y 280/360 nm, asociadas al residuo de triptófano presente en la defensina-1 recombinante. Estas señales ya se habían encontrado en la caracterización por espectroscopia de fluorescencia de una variación del péptido recombinante sintetizado por nuestro laboratorio (Cabrero, 2018), así como en muestras de miel (Cabrero et al., 2020; Lenhardt et al., 2015). Por otro lado, existe una señal a 340/360 nm de excitación y emisión que no corresponde a ningún aminoácido fluorescente, por lo que se puede asociar a alguna impureza resultante del proceso de purificación del péptido. A partir de estos resultados se extrajo el valor de intensidad de fluorescencia, a 280 y 360 nm de  $\lambda_{\text{exc}}$  y  $\lambda_{\text{em}}$  respectivamente, de los distintos EEM de las soluciones de defensina entre 1 y 5  $\mu\text{M}$  preparadas. Este valor se escogió para la creación de una curva de calibrado de intensidad de fluorescencia del triptófano de la defensina recombinante v/s su concentración. En la tabla 3 se pueden observar dichos valores de intensidad en triplicado. Los resultados obtenidos fueron analizados mediante el software GraphPad Prism 9.0 con el fin de obtener una regresión lineal simple de los datos del calibrado. El coeficiente de determinación ( $R^2$ ) para el calibrado y la ecuación que describe la relación entre las variables, así como también la

gráfica resultante de la regresión lineal se puede observar en la figura 9. Como se puede ver, el  $R^2$  fue de 0,9902, lo cual indica una alta correlación lineal entre las variables. Ello indica la posibilidad de emplear la espectroscopía de fluorescencia, como una herramienta sencilla, para evaluar de forma exploratoria (“screening”) la presencia de la defensina-1 y su concentración aproximada en una muestra que haya pasado por un proceso de purificación previo. En consecuencia, se establecieron a partir de estos resultados las condiciones de detección por fluorescencia del péptido, la cual precede al método de IP-RP-HPLC-FD desarrollado más adelante.

**Tabla 3. Intensidades de fluorescencia de la curva de calibración de defensina-1 recombinante realizada por espectrometría de fluorescencia.** Se presentan los datos obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia de la defensina-1 recombinante realizadas a 360 nm de emisión y 280 nm de excitación. Las unidades de intensidad de fluorescencia utilizadas fueron las mismas que el equipo entregó, las cuales son arbitrarias y se denominaron como IF (intensidad de fluorescencia).

Curva de calibración de defensina-1 (Fluorescencia a 360 nm de emisión/ 280 nm excitación)				
Concentración de Defensina-1 [ $\mu$ M]	Intensidad fluorescencia a 360 nm de emisión 1 [IF]	Intensidad fluorescencia a 360 nm de emisión 2 [IF]	Intensidad fluorescencia a 360 nm de emisión 3 [IF]	Promedio
0	22	22	22	22
1	86	85	84	85
2	150	145	143	146
3	194	192	187	191
4	274	271	261	269
5	360	357	351	356

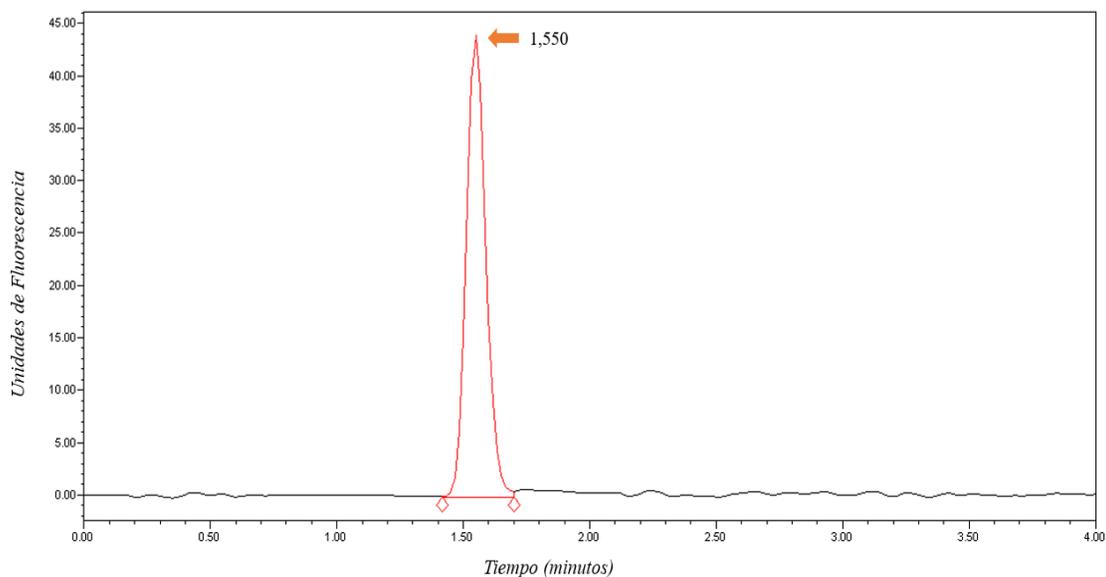


**Figura 9. Curva de calibración de defensina-1 recombinante realizada por fluorescencia.** Adicionalmente se presentan el  $r^2$  y la ecuación que representa dicha curva.

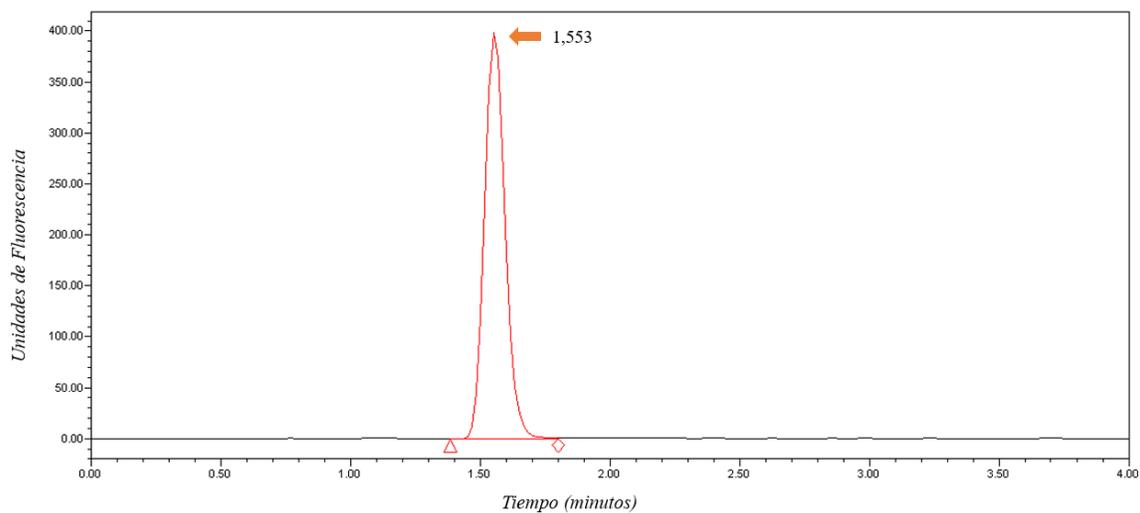
### **3. Desarrollo de un método de purificación y cuantificación de defensina-1 desde la miel de abeja.**

#### **3.1 Desarrollo de una curva de calibración, utilizando IP-RP-HPLC-FD, de defensina-1 recombinante.**

La cromatografía líquida en fase reversa se ha transformado en una importante alternativa a la hora de analizar péptidos y proteínas. La versatilidad de esta técnica no solamente le permite separar proteínas de acuerdo con sus propiedades químicas, las cuales de no ser propicias para un análisis de este tipo pueden ser incluso modificadas por agentes externos (Giustarini et al., 2013; Kobayashi & Imai, 2021), sino que también es posible utilizar la cromatografía líquida como un fin en sí misma, y caracterizar analíticamente una miríada de moléculas con relativa rapidez (Bobály et al., 2018; Szente et al., 2016; Woldemariam et al., 2020). El uso de esta técnica, especialmente asociada a algún equipo de detección analítica, como fluorescencia o espectrometría de masas le han permitido participar en un sinnúmero de campos científicos, yendo desde la química básica más pura (Mant et al., 2007), hasta su uso aplicado en el área industrial farmacéutica y alimenticia (Cheng et al., 2021; Yamamoto et al., 2013). Al momento de evaluar un método de análisis que permitiera una determinación sensible y específica de la defensina-1, con el fin de realizar una curva de calibración para dicho analito, se recurrió al HPLC en fase reversa acoplado a un detector de fluorescencia, de acuerdo con lo descrito en el punto 3.1. Como se observa en la Figuras 10 y 11, la defensina-1 recombinante presentó un pico cromatográfico a los 1,55 minutos, este tiempo de retención fue reproducible para todos los puntos del calibrado.



**Figura 10.** Cromatograma de un punto de la curva de calibración realizada con defensina-1 recombinante entre  $2,9 \mu\text{M}$  y  $11 \mu\text{M}$ , realizada por IP-RP-HPLC-FD. El punto elegido para representar al grupo fue el de  $7 \mu\text{M}$ . Flujo de la corrida:  $1 \text{ mL/min}$ . El registro de la fluorescencia fue hecho a  $280 \text{ nm}$  de excitación y  $360 \text{ nm}$  de emisión. Flecha anaranjada: tiempo de retención del pico cromatográfico asociado a la defensina-1 recombinante:  $1,550$  minutos.



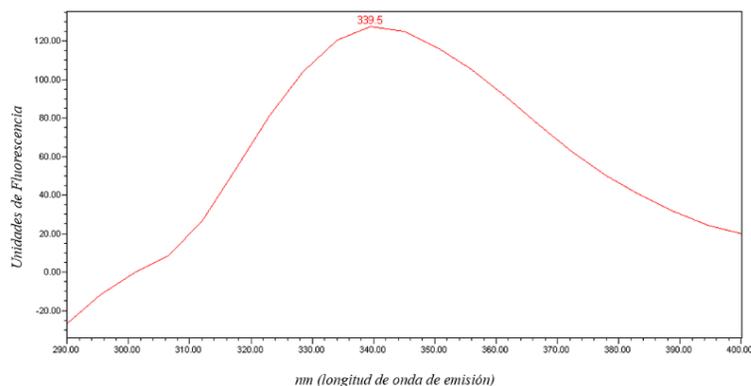
**Figura 11.** Cromatograma de un punto de la curva de calibración realizada con defensina-1 recombinante entre  $11 \mu\text{M}$  y  $81,36 \mu\text{M}$ , realizada por IP-RP-HPLC-FD. El punto elegido para representar al grupo fue el de  $26,7 \mu\text{M}$ . Flujo de la corrida:  $1 \text{ mL/min}$ . El registro de la fluorescencia fue hecho a  $280 \text{ nm}$  de excitación y  $360 \text{ nm}$  de emisión. Flecha anaranjada: tiempo de retención del pico cromatográfico asociado a la defensina-1 recombinante:  $1,553$  minutos.

El uso de la cromatografía líquida está ampliamente documentado en el estudio de péptidos (Josic & Kovac, 2010; Mant et al., 2007). Sin embargo, la mayoría de los trabajos se enfocan en el uso de esta técnica con fines preparativos, es decir, de purificación de péptidos desde matrices complejas (Bateman et al., 2018; Relf et al., 1999; Sivakamavalli et al., 2015). Es escasa la bibliografía sobre el empleo de la cromatografía líquida en fase reversa como un método analítico cuantitativo para la determinación de péptidos antimicrobianos; y más aún en el caso particular de la defensina-1 (Khaje & Sharp, 2020; Preston & Phillips, 2016; Saraswat et al., 2012). Por ello, el trabajo realizado en esta tesis adquirió un carácter exploratorio en lo que concierne al diseño de la metodología para la identificación y cuantificación de la defensina-1 por IP-RP-HPLC-FD. Primero, el uso de un método de elución isocrático, en comparación al resto de trabajos que, en su gran mayoría, utilizan un gradiente, aumentando lentamente el acetonitrilo con el fin de separar de mejor manera los distintos componentes de la matriz (Relf et al., 1999). Esta elección se fundamenta en el hecho que la defensina-1 es un péptido de complejidad elevada al momento de analizar cromatográficamente, producto de la presencia de 6 cisteínas, y por consecuencia 3 puentes disulfuro, en su estructura (Kwakman et al., 2010). Dicha característica estructural provoca que, en un ambiente que no sea fuertemente reductor, se generen una serie de poblaciones que difieren estructuralmente una de otras. Dichas poblaciones podrían ser el producto de la unión de dos o más unidades de defensina-1 a través de puentes disulfuro interconectados entre sí, las que al ser analizadas mediante cromatografía líquida entrega resultados muy complejos de analizar (Sivakamavalli et al., 2015). Por consiguiente, se eligió un método isocrático, con un elevado porcentaje de acetonitrilo, para que el péptido fuese retenido la menor cantidad de tiempo posible por la columna, y evitar la generación de estas poblaciones que dificultan el análisis, ya que a pesar del uso de un agente reductor en las fases ( $\beta$ ME), no fue posible lograr un cromatograma limpio (un pico único) para la defensina-1 pura utilizando un gradiente de fases. Adicionalmente, el uso de estas condiciones cromatográficas permitió que el péptido eluyera en un tiempo extremadamente rápido: como ya se había mencionado y se puede apreciar en las figuras 10 y 11, en menos de 2 minutos el pico cromatográfico se había resuelto por completo, lo que conlleva a una metodología expedita, que permite el análisis de múltiples muestras en un reducido espacio de tiempo, en comparación a una elución en gradiente, por ejemplo, que requiere de entre 20 y 50 minutos, o más incluso, para alcanzar la concentración de acetonitrilo necesaria para eluir al analito de interés (Daully et al., 2006; Gan et al., 2019; Valdés et al., 2020).

Continuando con el uso de agentes reductores; en procedimientos típicos de cromatografía por exclusión molecular, o cromatografía de afinidad iónica es natural el uso de agentes

denaturantes o caotrópicos para el tratamiento y purificación de proteínas (Mant et al., 2007), no obstante, en cromatografía por fase reversa no es común el uso de algún agente denaturante en las fases o la muestra. Es por esto por lo que se utilizaron con precaución dichos agentes en la realización de la metodología expuesta, con resultados exitosos a la hora de realizar la curva de calibración de la defensina-1 recombinante pura; ya que se obtuvo un único pico cromatográfico como lo muestran las figuras 10 y 11.

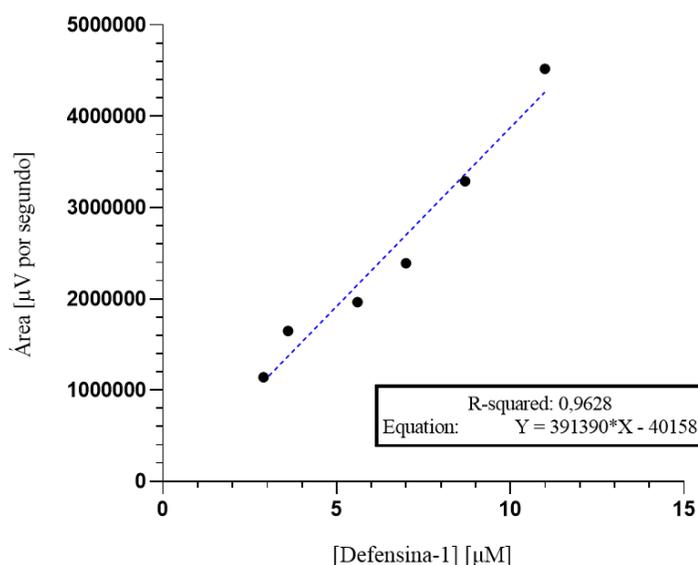
Para caracterizar espectroscópicamente el pico cromatográfico correspondiente a la defensina-1, éste fue analizado en modo *scan*. Como se muestra en la figura 12, la señal cromatográfica presente a los 1,55 minutos de la corrida tuvo un máximo en emisión de 340 nm. Esto confirmaría el hecho de que la isoforma de la def-1 expresada y purificada tiene sólo un triptófano y no una tirosina adicional como la Royalisina-F, isoforma que se encuentra en la jalea real (Klaudiny et al., 2005), ya que carece del máximo de emisión a 300 nm, que es característico de la tirosina. Gracias a esto sería posible utilizar el triptófano presente en la def-1 recombinante como el fluoróforo para la determinación del péptido en la miel utilizando este método analítico, ya que hay antecedentes que indicarían la presencia de defensina-1 con triptófano, y no tirosina, en la miel de las abejas Chilenas (Ley, 2018). El desplazamiento en el máximo de emisión del triptófano desde 360 nm (observado en las EEM) a 340 nm (observado en el modo scan del HPLC) se puede deber a las diferencias de polaridad en el medio al que está expuesto el aminoácido. Durante la separación cromatográfica el triptófano está en un medio comparativamente más apolar (80% acetonitrilo y 20% agua) que durante la obtención de las EEM (150 mM NaCl, 50 mM Acetato de sodio pH 4.0, 10 mM  $\beta$ ME), lo que produce un desplazamiento de la fluorescencia del triptófano hacia longitudes de onda más cortas, en este caso, 340 nm (Vivian & Callis, 2001).



**Figura 12.** Espectro de emisión de la señal cromatográfica obtenida a 1,55 minutos asociada a la defensina-1 recombinante, a una  $\lambda_{exc}$  fija de 280 nm. El punto elegido para representar al grupo fue el de 13,7  $\mu$ M.

Para llevar a cabo la cuantificación de la defensina-1 y obtención de parámetros de calidad analíticos se prepararon dos curvas de calibrado abarcando dos series de concentraciones del péptido: una curva de bajas concentraciones (2,9 a 11  $\mu\text{M}$ ), y una curva de altas concentraciones (11 a 81,36  $\mu\text{M}$ ). Las curvas fueron analizadas con el programa cromatográfico Empower® 3. La señal correspondiente a la defensina-1 fue integrada, obteniéndose su área, la cual fue utilizada para hacer una curva de calibrado y obtener sus correspondientes parámetros de calidad (Figura 13 y 14).

**Curva de calibración de defensina-1 mediante IP-RP-HPLC-FD**  
*Intervalo inferior de concentraciones*

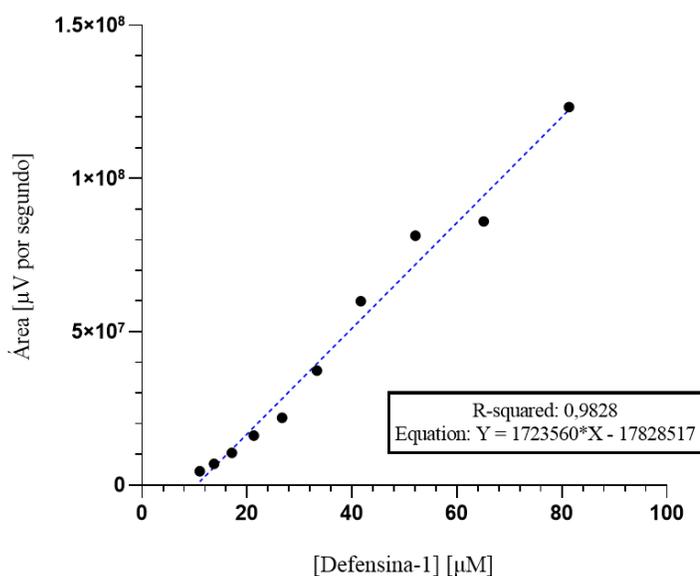


[Defensina-1] [ $\mu\text{M}$ ]	Área [ $\mu\text{V}$ por segundo]
2,9	1141451
3,6	1647148
5,6	1964216
7	2388304
8,7	3286827
11	4517032

Parámetro de calidad	Valor numérico	
Sy/x	0,6647 $\mu\text{M}$	1,275 $\mu\text{g/g}$ de miel
LOQ	6,647 $\mu\text{M}$	12,75 $\mu\text{g/g}$ de miel
LOD	2,194 $\mu\text{M}$	4,208 $\mu\text{g/g}$ de miel

**Figura 13. Curva de calibración de defensina-1 recombinante entre 2,9  $\mu\text{M}$  y 11  $\mu\text{M}$ , realizada por IP-RP-HPLC-FD.** Se presentan en la tabla superior los datos obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia de la defensina-1 recombinante realizadas a 360 nm de emisión y 280 nm de excitación durante las corridas cromatográficas detalladas con anterioridad. El parámetro elegido para relacionar con la concentración del péptido fue el área bajo la curva del pico cromatográfico obtenido. Por otro lado, en la tabla inferior se muestran los parámetros de calidad del calibrado.

**Curva de calibración de defensina-1 mediante IP-RP-HPLC-FD**  
*Intervalo superior de concentraciones*



[Defensina-1] [µM]	Área [µV por segundo]
11	4517032
13,7	6896041
17,1	10493501
21,3	16164000
26,7	21933948
33,3	37345691
41,7	59941803
52,1	81358305
65,1	86000926
81,36	123336172

Parámetro de calidad	Valor numérico	
S <sub>y/x</sub>	3,276 µM	6,285 µg/g de miel

**Figura 14. Curva de calibración de defensina-1 recombinante entre 11 µM y 81,36 µM, realizada por IP-RP-HPLC-FD.** Se presentan en la tabla superior los datos obtenidos a partir de las mediciones de fluorescencia de la defensina-1 recombinante realizadas a 360 nm de emisión y 280 nm de excitación durante las corridas cromatográficas detalladas con anterioridad. El parámetro elegido para relacionar con la concentración del péptido fue el área bajo la curva del pico cromatográfico obtenido. Por otro lado, en la tabla inferior se muestran los parámetros de calidad del calibrado.

El coeficiente de determinación para el calibrado de concentraciones bajas (Área = 391390 [Defensina-1 Recombinante] - 40158) fue 0,9628, lo cual indica una importante correlación lineal entre las variables y una gran variabilidad de la respuesta explicada mediante el calibrado. El error estándar de la estimación (S<sub>y/x</sub>) del modelo de calibración fue 0,6647 µM (equivalente a 1,275 µg/g de miel) y consecuentemente los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) fueron 2,194 µM (equivalente a 4,208 µg/g de miel) y 6,647 µM (equivalente a 12,75 µg/g de miel), respectivamente. Mientras que el coeficiente de determinación para el calibrado de concentraciones altas (Área = 1723560 [Defensina-1 Recombinante] - 17828517) fue 0,9828, una correlación lineal entre las variables incluso mayor que la curva anterior. La S<sub>y/x</sub> del modelo de calibración fue 3,276 µM (equivalente a 6,285 µg/g de miel). El valor del LOQ obtenido, está en el límite superior del intervalo de valores de contenido de defensina-1 en miel reportados por Valachová et al., 2016 (1 a

5 µg/g), no obstante, y como se observará en los resultados de defensina-1 presente en mieles de abeja Chilena, el LOQ conseguido es adecuado para la cuantificación del péptido, ya que se encuentra por debajo de las concentraciones encontradas en dichas muestras de miel.

Cabe señalar que este trabajo busca complementar las técnicas de análisis de defensina-1, y en general, de compuestos fluorescentes como marcadores bioquímicos para evaluar la calidad de la miel y la salud de la abeja. En literatura se han reportado otras metodologías con esta finalidad, por ejemplo, en el trabajo de Valachová et al., 2016 utilizan el método ELISA competitivo (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas), en donde la defensina-1 de la muestra de miel compite con una secuencia sintética marcada, la cual es similar a la del péptido completo, para unirse a una cantidad limitada de anticuerpo. Cuanto mayor es la concentración de la defensina-1 en la muestra, más débil es la señal obtenida. El anticuerpo utilizado en dicho trabajo es policlonal, es decir, es una mezcla de anticuerpos que se unen con variada afinidad a distintas zonas (epítomos) del extremo carboxilo de la defensina-1, lo que, por un lado, tiene la desventaja de que un compuesto con una estructura similar, pueda presentar reactividad cruzada y, por otro lado, no permite diferenciar entre poblaciones de péptidos que presenten diversas modificaciones, ya que es posible que dicho anticuerpo se una a alguna zona sin alteraciones, pasando por alto cambios estructurales críticos en la defensina, producto de, por ejemplo, el ambiente químico en que se encuentra (da Silva et al., 2016). Con el método cromatográfico aquí descrito, en cambio, se utiliza como patrón un equivalente de la secuencia de la defensina-1 madura completa, que tiene la ventaja de ser un analito con una estructura idéntica a la isoforma prevalente en la miel (Ro-K) (Klaudiny et al., 2005; Kwakman et al., 2010). Además, el procedimiento cromatográfico permite separar los interferentes presentes en la muestra, e igualmente podría separar posibles especies del analito con modificaciones estructurales (como glicación, fructación y/o formación de aductos), y asociarlas a algún fenómeno biológico que esté sucediendo a nivel de colmena, o en la abeja misma, como se pretende realizar a futuro en este laboratorio. Adicionalmente, con este método se podría diagnosticar la calidad de la miel en cuestión, ya que la detección de una población de defensina-1 modificada químicamente podría dar cuenta de una capacidad antimicrobiana alterada; tal como lo han reportado Kiselar et al., 2015, quienes observaron la pérdida de la actividad antibacteriana de la  $\beta$ -defensina-2 humana en presencia de metilglioxal y glioxal, sustancias que aumentan en condiciones de hiperglicemia (como ocurre en la miel), por formación de aductos.

### **3.2 Extracción en fase sólida de defensina-1 recombinante y posterior medición mediante espectroscopía de fluorescencia y IP-RP-HPLC-FD.**

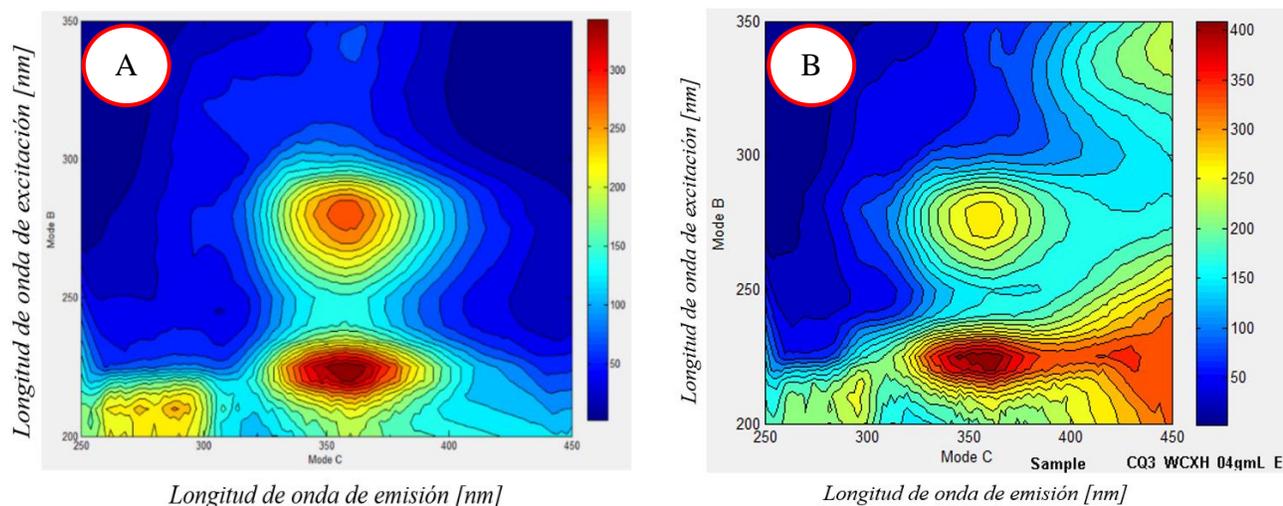
Las defensinas comprenden una amplia familia de péptidos, cuya principal característica, además de su capacidad antimicrobiana, es la presencia de numerosos aminoácidos básicos, como arginina, histidina y lisina en su estructura (Fujiwara et al., 1990; Kwakman et al., 2010), lo que produce un incremento en su punto isoeléctrico (pI), el cual en el caso de la defensina-1, alcanza un valor teórico de 8,64 (Obtenido de: portal de recursos bioinformáticos suizo (ExPASy) ([https://web.expasy.org/compute\\_pi/](https://web.expasy.org/compute_pi/))). Esta característica le otorga la capacidad de ser retenida por fases de intercambio catiónico con grupos cargados negativamente, como un ácido carboxílico. La cromatografía de intercambio iónico es un método establecido de separación de moléculas cargadas, incluyendo los péptidos y proteínas (Adhikari et al., 2010). Dentro de las posibilidades, en el mercado existen fases de intercambio catiónico fuertes y débiles (SCX y WCX respectivamente). Las columnas con una fase SCX poseen una densidad de carga superficial (negativa primordialmente), que se mantiene constante en un amplio rango de pH, mientras que en el caso de las WCXs la carga superficial cambia dependiendo del pH presente en la fase móvil a la cual se someta la columna (Di Palma et al., 2012). La cromatografía en “modo mixto” (fase reversa e intercambio catiónico) ha sido utilizada con éxito en métodos de purificación de diversas proteínas cargadas positivamente, como la lactoferrina, endostatina y vasopresina (Recio & Visser, 1999; Shiloach, et al., 2003; Thomas et al., 2011), aprovechando la interacción de la columna tanto con la porción fuertemente básica de dichas proteínas, como con el resto de la secuencia predominantemente hidrofóbica. También se ha reportado el uso de columnas con fase WCX para la extracción y purificación de apidaecina desde hemolinfa de abejas, péptido antimicrobiano de carácter básico con un valor de pI cercano a 11 (Daníhlík et al., 2014). En esta tesis, se utilizó columnas Waters (Oasis® WCX (weak cation exchange) 6cc/500 mg), las cuales permiten la retención del péptido mediante el lavado de la columna con un buffer fosfato (pH 6), el cual produce tanto la carga negativa de la fase estacionaria, la cual es un ácido carboxílico (Figura 4), como la carga positiva de la defensina-1/def-1 recombinante. De esta manera, es posible separar el resto de las moléculas no polares y polares cuyo punto isoeléctrico esté por debajo de 6, de cualquier compuesto básico cuyo punto isoeléctrico esté por encima de dicho valor, como la defensina-1, enriqueciendo la fracción recogida de dicho péptido, con lavados consecutivos utilizando el buffer fosfato (pH 6) y metanol (Di Palma et al., 2012).

Una vez decidido el tipo de cromatografía y columna por utilizar, se procedió con la metodología para lograr el objetivo buscado. En la Figura 15 se observan los perfiles de excitación-emisión de la defensina-1 recombinante (4  $\mu$ M) y de una muestra de miel de la V región purificada por extracción en fase sólida a una concentración final de 0,4 g miel/mL. Estos datos se recogieron en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio para determinar los parámetros adecuados para realizar la extracción en fase sólida, y del cual nació el protocolo utilizado en esta sección de la tesis. Así, en la figura 15 B se puede observar que el espectro de la miel tratada por WCX presentó dos máximos de excitación/emisión a 220/360 nm y 280/360 nm similares a los de la defensina-1 recombinante (Figura 15 A), asociado a la presencia de triptófano en el péptido, atribuibles a la superposición de dos transiciones  $\pi \rightarrow \pi^*$  separadas del anillo indol (Creed, 1984a).

En cuanto a la presencia de interferentes fluorescentes que podrían arrojar resultados indeseados, dentro de las moléculas que fluorescen que predominan en la miel, podemos encontrar 3 tipos: compuestos fenólicos, productos de Maillard y vitaminas (Bogdanov et al., 2008; da Silva et al., 2016). Dentro del grupo de compuestos fenólicos, podemos distinguir dos grupos: ácidos fenólicos y flavonoides, los cuales provienen del néctar y polen que las abejas recolectan (Silva et al., 2013). De los ácidos fenólicos descritos, los ácidos benzoicos tienen máximos de  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  de 266/315, mientras que los ácidos cinámicos muestran máximos de emisión intensos entre los 400 y 450 nm a  $\lambda_{exc}$  de aproximadamente 310 nm (Ley, 2018; Wünsch et al., 2015). Por otro lado, los flavonoides presentan compuestos cuyas  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  rondan los 460-480/520-580 nm (Monago-Maraña et al., 2016).

En la miel podemos encontrar vitaminas, particularmente fluorescente, la riboflavina ( $B_2$ ) (Sunarić et al., 2020), la cual presenta un par de  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  de 450/525 nm (Yang et al., 2015). Por otra parte, los productos de glicación avanzada (AGEs) presentan fluorescencia principalmente a 365 nm y 440 nm en  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$ , respectivamente (Matiacevich & Buera, 2006). AGEs correspondientes a polímeros multicomponentes de proteínas-polifenoles-oligosacáridos (melanoidinas) han sido aislados desde la miel (Brudzynski & Miotto, 2011).

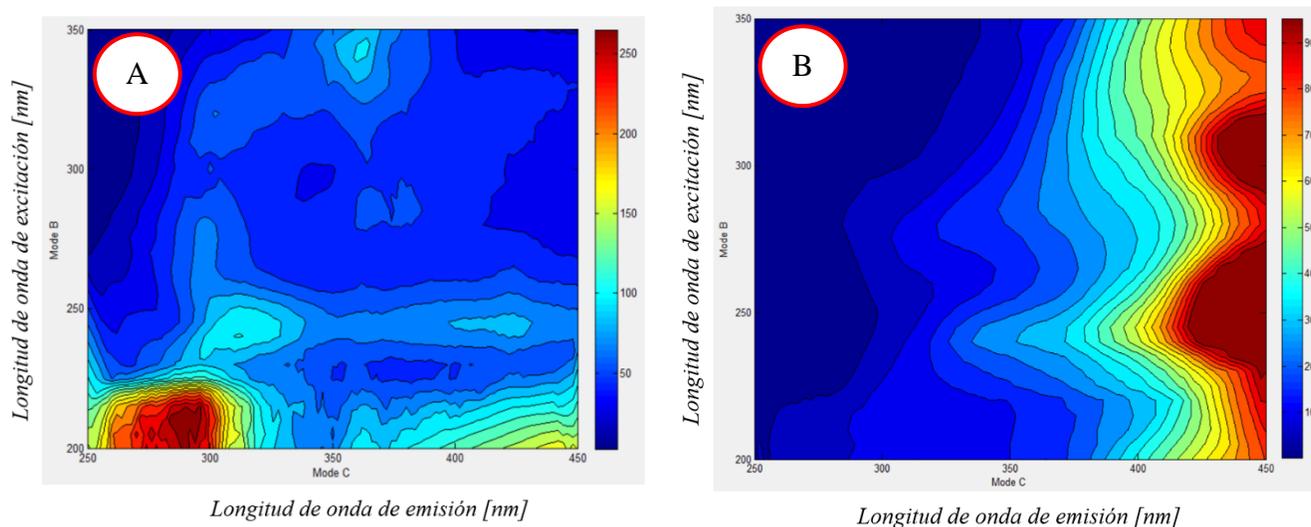
Como se puede observar, solamente los ácidos benzoicos podrían interferir con la detección de triptófano, asociado a la defensina-1 presente en la miel por la metodología de espectroscopia de fluorescencia. En base a estos resultados, se tomó la decisión de utilizar la metodología de extracción propuesta, ya que permitiría extraer la defensina-1 desde la miel, para su posterior análisis mediante IP-RP-HPLC-FD.



**Figura 15. Matrices de excitación/emisión de defensina-1 recombinante v/s muestra de miel.** (A) Defensina-1 recombinante a 4  $\mu$ M. (B) Muestra de miel de la V región (Miel F) purificada por extracción en fase sólida con WCX, a una concentración de 0,4 g/mL de miel. El eje X corresponde a las longitudes de onda de emisión y el eje Y a las de excitación. La visualización se realizó mediante el programa MATLAB v7.6.0.324 (R2008a) (Mathworks, Natwick, MA).

Con el objetivo de evaluar la recuperación de defensina-1 recombinante desde la miel usando columnas de WCX; la proteína fue sometida al proceso de extracción en fase sólida descrito en la metodología, tanto pura como en presencia de una miel de la VII región, a una concentración de 5  $\mu$ M (27,6 mg/L). Luego del proceso se registraron los EEM de acuerdo con lo descrito en el punto 2.2 de la metodología. Como se puede observar en la figura 16 A, a pesar de obtener una señal con un máximo de excitación/emisión a 280/360 nm, asociable al triptófano de la defensina-1 recombinante, no se logró obtener una señal limpia. Además, dentro de los componentes fluorescentes encontrados en la matriz de excitación/emisión, se observó nuevamente una señal a 340/360 nm de  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  respectivamente, tal como en el proceso de caracterización de la señal fluorescente de la defensina-1 recombinante. Esta señal no correspondía a ningún aminoácido fluorescente, sin embargo, aparece de manera reiterada, por lo que es posible que se trate de alguna impureza presente en alguno de los solventes utilizados o resultante del proceso de purificación del péptido. Estos interferentes podrían suponer un problema al momento de realizar algún análisis cuantitativo. Sin embargo, las EEM sólo entregan una visión general del grado de limpieza y recuperación de la defensina-1 alcanzado en la SPE con las columnas WCX, ya que la posterior separación y cuantificación mediante HPLC-FD, si es concluyente para establecer la eficiencia del proceso.

En cuanto a la EEM de la miel fortificada con defensina-1 y sometida a SPE-WCX (Figura 16 B), no es posible ver con claridad una señal a los 280/360 nm de excitación/emisión asociable al triptófano de la proteína. Además, se obtuvo un perfil de fluorescencia distinto al registrado para una miel tratada de la V región (Figura 15 B), lo que podría ser atribuible a las diferencias en composición de las muestras. En este sentido, el método de SPE-WCX requeriría perfeccionamiento para lograr mayor homogeneidad en sus resultados, especialmente debido a la complejidad de la matriz en cuestión. Sin embargo, y como ya se hizo mención, los EEM sólo entregan una visión general, donde la posterior cuantificación mediante HPLC-FD permite establecer con certeza la eficacia del proceso. En cuanto a las señales obtenidas en la EEM de la miel fortificada (Figura 16 B); las tres señales principales presentaron máximos de excitación a 245, 310 y 350 nm aproximadamente; siendo el máximo de emisión para todas ellas a 440 nm. Estas señales podrían corresponder a ciertos productos finales de glicación avanzada, grupo de compuestos heterogéneos que son formados a partir de la glicación no enzimática de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos, mediante una serie de reacciones de reordenamiento y ciclación, en un fenómeno comúnmente denominado como reacción de Maillard (Ahmad et al., 2014).



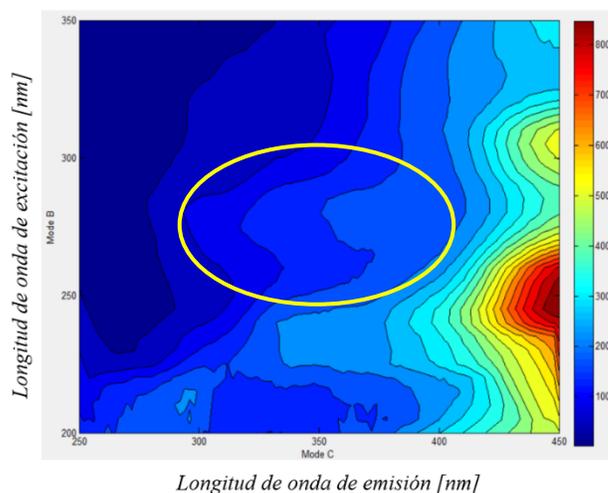
**Figura 16. Matrices de excitación/emisión de defensina-1 recombinante sometida a SPE v/s miel fortificada con defensina-1 recombinante.** (A) Defensina-1 recombinante pura, sometida al proceso de extracción en fase sólida, a una concentración final de 5  $\mu\text{M}$  (27,6 mg/L). (B) Muestra de miel de la VII región (Código: Miel A) fortificada con defensina-1 recombinante de concentración 5  $\mu\text{M}$  (27,6 mg/L) y purificada por extracción en fase sólida con WCX, a una concentración de 4,8 g/mL de miel. El eje X corresponde a las longitudes de onda de emisión y el eje Y a las de excitación. La visualización se realizó mediante el programa MATLAB v7.6.0.324 (R2008a) (Mathworks, Natwick, MA).

Los AGEs tienen máximos de emisión característicos de 440-460 nm, y varían en sus máximos de excitación dependiendo del tiempo y las condiciones de interacción en que se llegaron a formar estos compuestos (Ashraf et al., 2015), siendo ejemplos de AGEs fluorescentes la pentosidina y la crosslina, cuyos máximos de excitación/emisión son respectivamente 370/440 nm y 380/460 nm, presentes en la mayoría de los alimentos con altas concentraciones de carbohidratos, como la miel (Beisswenger et al., 2012; Obayashi et al., 1996). Los AGEs fluorescentes se encuentran formando enlaces covalentes con las biomoléculas mencionadas anteriormente (Ashraf et al., 2015), por lo que es probable que los observados en las muestras con miel estén unidos a péptidos o proteínas. Cuando el grupo amino de una proteína se condensa con un azúcar se originan una plétora de AGEs (Ahmad et al., 2014). Por esta razón se postula que gran parte de la defensina-1 en las mieles podría estar glicada y/o fructada, formando parte de estos compuestos poliméricos de glicación avanzada.

En la literatura es ampliamente aceptado el hecho de que todos estos cambios estructurales asociados a la unión de un azúcar a la estructura de un polipéptido, afectan la funcionalidad de las proteínas, debido a que pueden generar cambios conformacionales (Chevalier et al., 2002; Ghosh-Moulick et al., 2007; Iqbal et al., 2016) o agregación proteica (Bouma et al., 2003; Ghosh et al., 2013; Wei et al. 2009), además de provocar cambios en su fluorescencia, ya sea por aparición de nuevas sondas fluorescentes (asociadas a la fluorescencia propia de los AGEs), o por modificación del ambiente químico que rodea a los aminoácidos aromáticos que componen a estas proteínas (Ioannou & Varotsis, 2019; Sharma et al., 2019). De esta manera, este fenómeno podría alterar la señal fluorescente que se puede observar en los EEM extraídos de las muestras de miel, ya que la defensina-1 presenta una serie de aminoácidos que son susceptibles a este fenómeno químico, la lisina y arginina (Ahmad et al., 2014; Fujiwara et al., 1990) y de ser glicada, la fluorescencia que presenta el triptófano cambiaría longitud de onda de emisión (Vivian & Callis, 2001). Así, la longitud de onda de emisión de dicho aminoácido podría desplazarse hacia longitudes de onda más altas, que como se puede observar en los EEM de las mieles estudiadas en esta tesis en las figuras 15, 16 y 18 ( $\lambda_{exc/em}$  de 250-350/440 nm), predominan en cuanto a señales fluorescentes se refiere. Este viraje ha sido reportado en la literatura, y se ha asociado a una modificación del entorno químico en el que está el triptófano, yendo de un entorno más hidrofóbico, a uno de polaridad mayor, generada por las mismas estructuras que se unen covalentemente a la proteína, y generan un AGE (Ioannou & Varotsis, 2019). Por otro lado, el alto contenido de compuestos fenólicos podría favorecer la formación de complejos entre estos y proteínas que generarían un apantallamiento (quenching) de la señal fluorescente del triptófano (Rawel et al., 2006), además de un posible

cambio estructural que modifique el ambiente del triptófano de manera similar a lo propuesto en el párrafo anterior, con la formación de un AGEs.

Continuando, en la figura 17, se puede observar una muestra de miel purificada mediante el método de extracción, sin fortificar. En este caso, previo a la obtención de la EEM el extracto obtenido fue diluido 1:3 (concentración final de 1,6 g/mL de miel). La dilución de la muestra causó una atenuación de las señales a 440 nm y se puede vislumbrar con mayor nitidez la fluorescencia presente a las longitudes de onda en las que se podría reconocer el triptófano de la defensina-1: excitación/emisión a 220/360 nm y 280/360 nm.

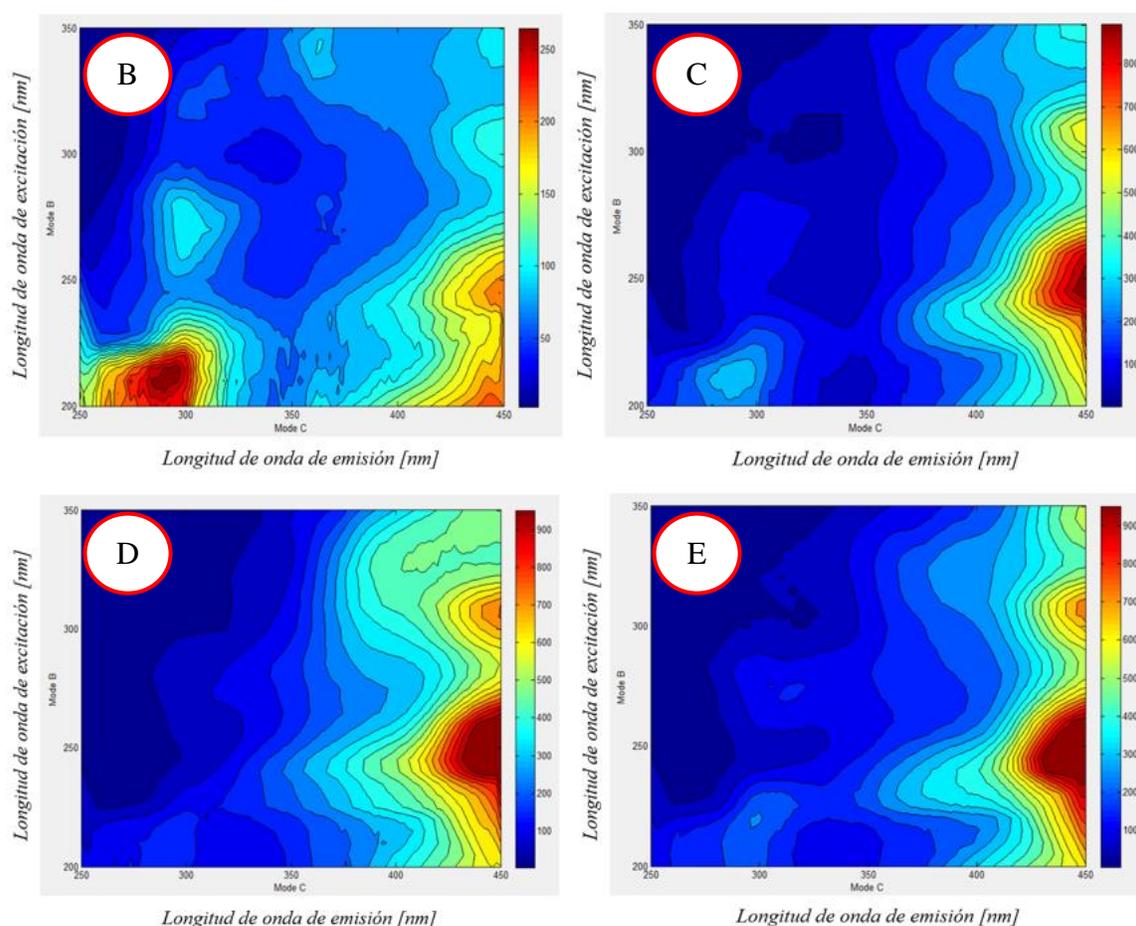


**Figura 17. Matriz de excitación/emisión de miel de la VII región sometida a SPE.** La imagen corresponde a una muestra de miel de la VII región (código: Miel A) purificada por extracción en fase sólida, a una concentración de 1,6 g/mL de miel. Se destaca con un círculo amarillo el intervalo espectral donde se aprecia fluorescencia atribuible a triptófano. El eje X corresponde a las longitudes de onda de emisión y el eje Y a las de excitación. La visualización se realizó mediante el programa MATLAB v7.6.0.324 (R2008a) (Mathworks, Natwick, MA).

Finalmente, en la figura 18 se pueden observar los EEM del resto de las mieles analizadas (mieles desde la B a la E), las cuales poseen características similares a la miel observada en la figura 17, en especial la miel de la figura 18 C: una señal 280/360 nm de excitación/emisión solapada con las de mayor intensidad, y señales con máximos de excitación entre 240 y 350 nm, con un máximo de emisión respectivo de aproximadamente 440 nm. La gran diferencia apreciable en estas muestras de miel es la aparición de una señal a aproximadamente 280/300 nm de excitación/emisión, en las figuras 18 B, C y E, característica de la fluorescencia proveniente de la Tirosina (Creed, 1984b). La presencia de este aminoácido en la miel depende principalmente de su

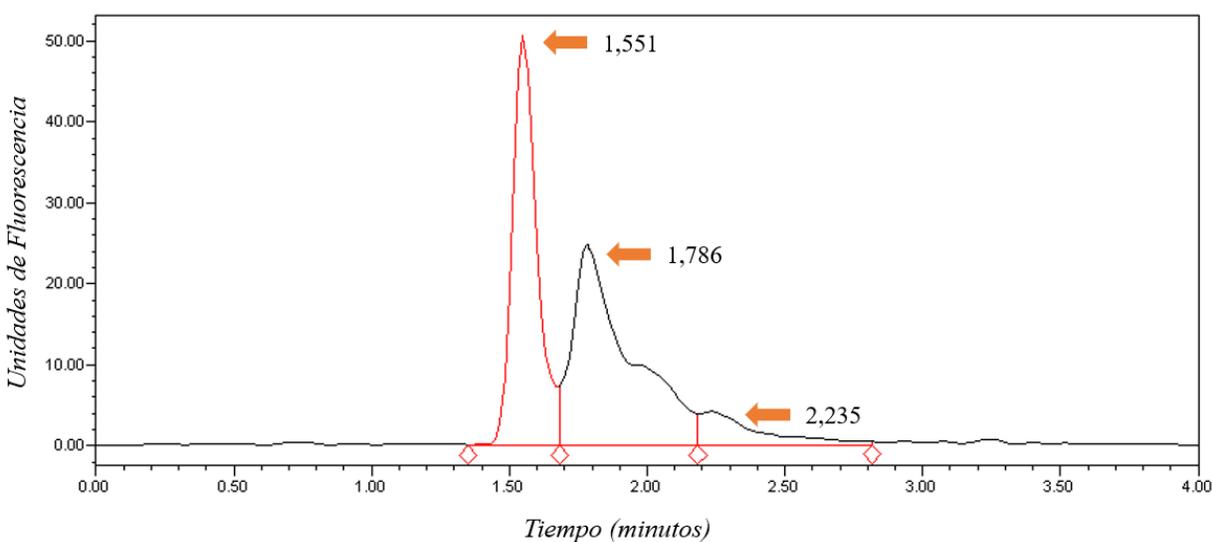
origen botánico (Bouseta et al., 1996; Kaškonienė & Venskutonis, 2010), y considerando que todas las mieles estudiadas provienen de colmenas de distintas regiones del país, es normal que algunas presenten dicha señal fluorescente y otras no.

Articulando toda esta información, es posible que la incipiente señal que aparece a la longitud de onda de emisión de triptófano (360 nm) sea defensina-1, pero enmascarada por las señales de compuestos fluorescentes presentes a mayores concentraciones en la miel y/o desplazada en emisión. En este sentido, la señal de emisión alrededor de los 360 nm observada en las figuras 15 B, 16 B y 17, podría atribuirse al péptido modificado (glicado y/o asociado a compuestos fenólicos) que contiene un residuo de triptófano en un entorno más polar y por lo tanto con un máximo de emisión desplazado hacia el rojo.



**Figura 18.** Matrices de excitación/emisión de mieles de la zona centro-sur de Chile sometidas a SPE y llevadas a una concentración final de 1,6 g/mL. (B) X región (Miel B). (C) XIII región (RM) (Miel C). (D) IV región (Miel D). (E) VI región (Miel E). El eje X corresponde a las longitudes de onda de emisión; eje Y a las de excitación. Visualización obtenida con el programa MATLAB v7.6.0.324 (R2008a) (Mathworks, Natwick, MA).

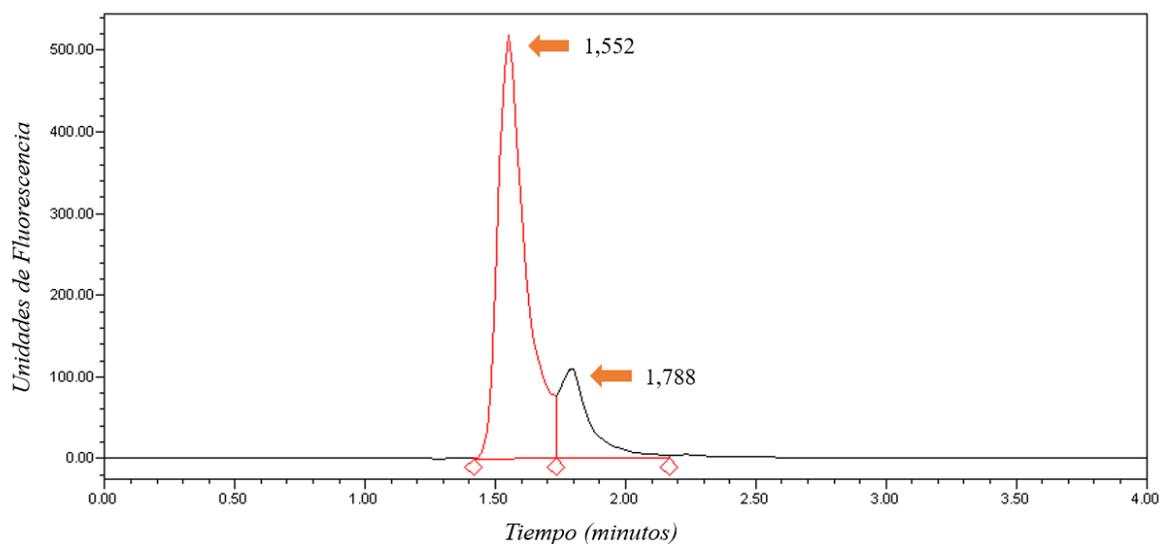
Finalmente, en la figura 19 se presenta el cromatograma de la defensina-1 recombinante pura sometida al proceso de extracción en fase sólida y HPLC-FD. Se observa el pico cromatográfico a los 1,55 minutos atribuido a la defensina-1 (sección 3.1). Sin embargo, a diferencia de lo ocurrido al inyectar directamente el péptido en el HPLC; junto al pico de los 1,55 minutos se obtuvieron dos picos adicionales a los 1,79 y 2,23 minutos. Ambos podrían ser impurezas aportadas durante la SPE. Sin embargo, igualmente se postula que estos picos sean especies de defensina-1 recombinante con una conformación distinta; producto de la reducción y re-oxidación de los enlaces disulfuro en su estructura generados durante el proceso de purificación y/o separación; las que presentarían una interacción distinta con la columna cromatográfica (Estrella et al., 2011; Moghadam et al., 2015; Steiner & Bulaj, 2011; Zhang et al., 1987). Cabe señalar que en este caso las muestras no fueron pre-incubados en el medio reductor antes de la inyección en el cromatógrafo, lo cual puede ser la causa de este resultado (Shahin-Kaleybar et al., 2020; Zhang et al., 1987).



**Figura 19. Cromatograma asociado a una muestra de defensina-1 recombinante ( $5 \mu\text{M}$ ) sometida a la metodología desarrollada (WCX / IP-RP-HPLC-FD).** El registro de la fluorescencia fue hecho a 280 nm de excitación y 360 nm de emisión. Flujo de la corrida: 1 mL/min, isocrática. **Flechas anaranjadas:** tiempo de retención del pico cromatográfico asociado a la defensina-1 recombinante: 1,551 minutos. Impurezas asociadas al método o especies de defensina-1 de distinta estructura: 1,786 minutos, 2,235 minutos.

#### 4. Determinación de la presencia de defensina-1 en miel y miel fortificada con el péptido recombinante, sometida a extracción en fase sólida, mediante el uso de IP-RP-HPLC-FD.

En la figura 20 se presenta el cromatograma de la “Miel A” sometida al proceso de extracción en fase sólida y HPLC-FD. Al igual que para la defensina-1 recombinante inyectada directamente en el cromatógrafo (figuras 10 y 11), y sometida al proceso completo (figura 19), se observa el pico a los 1,55 minutos; atribuible por tanto al péptido nativo presente en la miel estudiada.



**Figura 20. Cromatograma asociado a una muestra de miel sometida a la metodología desarrollada (WCX / IP-RP-HPLC-FD).** La miel seleccionada fue la catalogada como “Miel A” (tabla 1). El registro de la fluorescencia fue hecho a 280 nm de excitación y 360 nm de emisión. Flujo de la corrida: 1 mL/min, isocrático. **Flechas anaranjadas:** tiempo de retención del pico cromatográfico asociado a la defensina-1 recombinante: 1,552 minutos. Impurezas asociadas al método: 1,788 minutos.

Sin perjuicio de lo anterior, se podría corroborar la pureza y el peso molecular del péptido en cuestión mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (Schägger, 2006), o cromatografía de exclusión molecular (Duong-Ly & Gabelli, 2014). Sin embargo, la espectrometría de masas permitiría verificar con mayor certeza la identidad del péptido, ya que dicha técnica se considera como el “Gold standard” a la hora de identificar tanto la masa, como la secuencia de una proteína

(Manes & Nita-Lazar, 2018; Matthiesen & Bunkenborg, 2013).

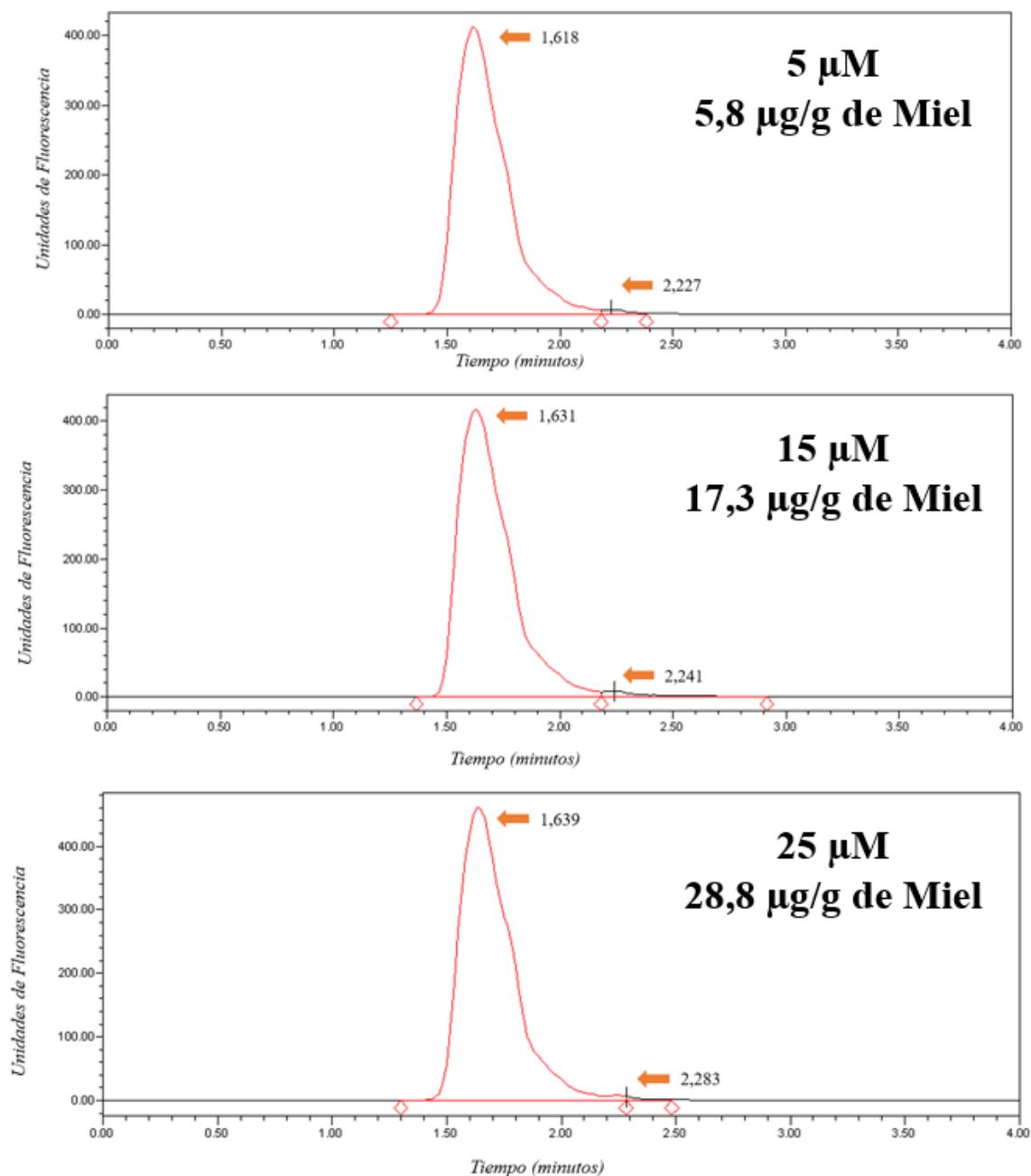
Continuando con el examen de la figura 20, es posible apreciar el mismo pico adicional a los 1,788 minutos, parcialmente solapado al pico de la defensina-1, observado para el péptido puro sometido al proceso de extracción-detección (figura 19). En cuanto a la identidad de este compuesto y como ya se mencionó anteriormente, podría tratarse de especies de defensina-1 con una conformación distinta producto de la reducción y re-oxidación de los enlaces disulfuro producidos durante el proceso de purificación y/o separación cromatográfica (Estrella et al., 2011; Moghadam et al., 2015; Steiner & Bulaj, 2011; Zhang et al., 1987). Cabe señalar que en este caso las muestras tampoco fueron pre-incubadas en el medio reductor antes de la inyección en el cromatógrafo.

Otro fenómeno que podría estar causando picos cromatográficos de defensina-1 a tiempos de retención diferentes al del péptido recombinante sería la posible glicación de la proteína. Como ya se mencionó en la introducción de este trabajo y en resultados anteriores, las condiciones únicas de la miel hacen altamente probable la presencia de péptidos glicosados (Hellwig et al., 2017; da Silva et al., 2016). La modificación estructural y química de la defensina-1 provocaría una modificación en su polaridad (Ghosh et al., 2013) y con ello una interacción distinta con la fase estacionaria (C18); teniendo como consecuencia final, un cambio en su tiempo de retención. Además, estas alteraciones químicas modificarían las características fluorescentes del péptido, provocando un cambio en los máximos de emisión de fluorescencia (Vivian & Callis, 2001), ya sea por modificación del ambiente en el que se encuentra el triptófano de la defensina (Ioannou & Varotsis, 2019); o aportando fluorescencia desde la misma estructura glicosada (Ashraf et al., 2015; Sharma et al., 2019).

Estos fenómenos descritos podrían explicar la presencia de múltiples picos cromatográficos en los cromatogramas obtenidos de las mieles analizadas por la metodología desarrollada. Para verificar si las estructuras proteicas en estudio están efectivamente glicosadas, sería necesario recuperar la fracción eluída de la IP-RP-HPLC-FD realizada a las muestras de miel, y analizarlas mediante LC-MS/MS; en cuyo caso se obtendría la masa de la defensina-1 más la de la azúcar añadida correspondiente (Frolov & Hoffmann, 2008; Witze et al., 2007). Adicionalmente, existen métodos basados en el uso de PAGE con el fin de detectar proteínas glicosadas (Jackson et al., 2008; Pereira Morais et al., 2019; Priego Capote & Sánchez, 2009). Un ejemplo de estos se basa en la interacción covalente entre el ácido borónico y las estructuras cis-diol presentes en los aductos proteína-fructosamina que se forman en las proteínas glicosadas, con el fin de detectar proteínas en etapas de glicación temprana; esta unión marcada con fluoresceína puede ser observada a través de un gel de poliacrilamida en una técnica denominada electroforesis en gel de poliacrilamida con

fluoresceína-fenilboronato (Flu-PAGE) (Morais et al., 2012).

La figura 21 muestra los cromatogramas obtenidos de la “Miel A” fortificada con defensina-1 recombinante a 5, 15 y 25  $\mu\text{M}$ . En los tres casos se observó un pico cromatográfico a los 1,6 minutos aproximadamente, el que está desplazado en comparación al pico de la defensina-1 obtenido a los 1,55 minutos. Adicionalmente, este pico presentó un “hombro” evidente demostrando la co-elución de otro componente. Por otra parte, el área de este pico fue muy similar para las tres concentraciones, lo que demuestra que el aporte mayoritario a esta no es la defensina-1 añadida, sino que un componente propio de la miel. Además, esto podría evidenciar una modificación de la defensina-1 al ser añadida a la miel constituyéndose en una especie distinta y por lo tanto con un tiempo de retención distinto. Se requiere un programa de elución en gradiente que mejore la resolución para visualizar estos componentes en forma separada. Cabe señalar que en este caso las muestras tampoco fueron pre-incubados en el medio reductor antes de la inyección en el cromatógrafo. En definitiva, este resultado no tiene una interpretación evidente.



**Figura 21.** Cromatogramas asociados a una muestra de miel fortificada con defensina-1 recombinante (5, 15 y 25  $\mu\text{M}$ ) sometida a la metodología desarrollada (WCX / IP-RP-HPLC-FD). La miel seleccionada fue la catalogada como “Miel A” (tabla 1). El registro de la fluorescencia fue hecho a 280 nm de excitación y 360 nm de emisión. Flujo de la corrida: 1 mL/min, isocrático. *Flechas anaranjadas:* tiempo de retención del pico cromatográfico asociado a la defensina-1 recombinante: 1,618; 1,631 y 1,639 minutos. Impurezas: 2,227; 2,241 y 2,283 minutos.

Dado que no hay claridad en la identidad del pico eluido a los 1,6 minutos, además de la posible co-elución de dos componentes, no se calculó la recuperación de la defensina para estas muestras de “miel A” fortificadas. Sin embargo, si se logró determinar la concentración de defensina-1 nativa presente en las mieles sometidas a la metodología. Como se puede apreciar en la tabla 4, la miel proveniente de la VII región (Miel A) del país fue la que presentó la mayor cantidad de defensina-1 con  $60 \pm 2 \mu\text{g}$  de defensina-1 / g de miel, mientras que la miel de la X región (Miel B) presentó la menor, con  $26,5 \pm 0,4 \mu\text{g}$  de defensina-1 / g de miel. Si comparamos estos valores con los únicos descritos en la literatura, los valores más bajos obtenidos ( $26,5 \pm 0,4 \mu\text{g/g}$ ) superan por un factor de cinco al valor más alto encontrado por Valachová et al., 2016 ( $5.17 \pm 1.39 \mu\text{g/g}$ ) en mieles Eslovacas. Dado que la defensina-1 presente en la miel es aportada por las abejas que la producen, las diferencias encontradas podrían asociarse a diferencias genéticas, metabólicas o nutricionales entre las abejas productoras de dicha miel (Chile vs Eslovaquia) (Casteels-Josson et al., 1994; Chua et al., 2013; Di Girolamo et al., 2012; Klaudivy et al., 2005). Por ello, ampliar el estudio a un número mayor de mieles permitiría disponer de más datos sobre el contenido de defensina-1 en estas y compararlos entre sí y/o con los valores publicados. Por otra parte, el uso de HPLC-FD podría permitir la cuantificación de poblaciones de defensina-1 que no pueden ser reconocidas por el método de inmunoadsorción, o cuyas estructuras sean consideradas iguales, habiendo sufrido una modificación química.

Finalmente, cabe destacar que el método de separación-cuantificación de la defensina-1 en miel desarrollado fue altamente reproducible, con coeficientes de variación entre 0,7 y 3,0% (tabla 4) lo que indica la robustez de este.

**Tabla 4. Concentración promedio de defensina-1 encontrada en las diferentes muestras de miel analizadas.** Las mieles estudiadas están descritas en la tabla 1. Dichos valores se obtuvieron mediante la interpolación del área obtenida del pico cromatográfico a 1,55 minutos, de cada miel sometida a WCX/IP-RP-HPLC-FD, en la curva de calibración del “intervalo superior” de concentraciones de defensina-1 recombinante. La concentración promedio de defensina-1 está expresada con su desviación estándar correspondiente.

	Miel A prueba 1	Miel A prueba 2	Miel B prueba 1	Miel B prueba 2	Miel C prueba 1	Miel C prueba 2	Miel D prueba 1	Miel D prueba 2	Miel E prueba 1	Miel E prueba 2
Concentración de defensina-1 en la muestra ( $\mu\text{M}$ )	54,4	49,8	23,3	22,7	29,8	30,0	47,6	47,0	35,5	34,9
Concentración de defensina-1 en la muestra ( $\mu\text{g/g}$ de miel)	62,6	57,3	26,9	26,1	34,3	34,5	54,8	54,1	40,8	40,2
Concentración promedio de defensina-1 ( $\mu\text{g/g}$ de miel)	$60 \pm 2$		$26,5 \pm 0,4$		$34,4 \pm 0,1$		$54,4 \pm 0,4$		$40,5 \pm 0,3$	

Si bien se obtuvieron buenos resultados con la metodología desarrollada, para conseguir un pico cromatográfico único y reproducible de defensina-1 recombinante pura (incluyendo una pre-incubación de las muestras con  $\beta$ ME), con el fin de construir una curva de calibración (figuras 10 y 11); así como también visualizar el péptido nativo en la miel (figura 20); el uso de un método isocrático, con un breve tiempo de elución total (4 minutos), pudo haber afectado la resolución de los picos cromatográficos causando la deficiente separación de las moléculas presentes luego de la purificación en fase sólida en el caso de la miel. Esto indicaría la necesidad de utilizar un gradiente que pueda separar efectivamente cualquier interferente proveniente de la miel, que permita así cuantificar de manera efectiva la defensina-1. Por otra parte, los cromatogramas de la defensina-1 recombinante pura y de miel sometidas a WCX presentaron picos adicionales al péptido, asociados muy probablemente a la diversa cantidad de poblaciones de defensina-1 generadas durante el proceso analítico por la oxidación de sus cisteínas y consecuente formación de puentes disulfuro “inter-defensina” (figuras 19 y 20). En este punto cabe señalar que, debido a circunstancias en el desarrollo experimental del trabajo, estas muestras no fueron pre-incubadas con el agente reductor  $\beta$ ME; y si bien éste estaba presente la fase móvil empleada en el HPLC, no fue suficiente para evitar la presencia de distintas poblaciones del péptido lo que explicaría el resultado observado. Esto indica la necesidad de la pre-reducción tanto de la defensina-1 recombinante pura como de las muestras de miel purificadas previo al análisis por HPLC, mediante incubación con  $\beta$ ME u otro agente reductor como DTT, y de esta manera asegurarnos que toda la población de defensina-1 esté reducida, denaturada, y por consecuencia uniforme.

Finalmente, se concluye que se desarrolló un método basado en SPE-WCX asociado a HPLC-FD, el que permitió detectar y cuantificar la defensina-1 en mieles chilena. Esto, además de ser un hecho novedoso, permitirá complementar el estudio de la miel relacionado con la presencia del péptido y su capacidad antimicrobiana y/o avalar su uso en otras dimensiones, más allá del consumo humano. Sin embargo, también se debe indicar que la metodología desarrollada presenta limitaciones que requieren ser abordadas para una mayor certeza en la determinación de defensina-1 en miel.

## CONCLUSIONES

1. Se establecieron las condiciones experimentales para obtener defensina-1 recombinante pura.
2. Se confirmó la identidad y pureza del péptido purificado mediante LC-MS/MS.
3. Se establecieron las condiciones experimentales para cuantificar defensina-1 en miel utilizando un método basado en SPE-WCX asociada a IP-RP-HPLC-FD.
4. Se logró determinar la presencia de defensina-1 en mieles de una serie de regiones del país.
5. Debido a la complejidad de tanto el analito como de la matriz en cuestión, se requiere abordar algunas limitaciones del método propuesto, y así dar una mayor certeza en la determinación de defensina-1 en la miel.

## REFERENCIAS

- Adams, C. J., Boulton, C. H., Deadman, B. J., Farr, J. M., Grainger, M. N., Manley-Harris, M., & Snow, M. J. (2008). Isolation by HPLC and characterisation of the bioactive fraction of New Zealand manuka (*Leptospermum scoparium*) honey. *Carbohydrate research*, 343(4), 651–659. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.12.011>.
- Adhikari, S., Manthena, P. V., Sajwan, K., Kota, K. K., & Roy, R. (2010). A unified method for purification of basic proteins. *Analytical biochemistry*, 400(2), 203–206. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2010.01.011>.
- Ahmad, S., Khan, M. S., Akhter, F., Khan, M. S. & Khan, A. (2014). Glycoxidation of biological macromolecules: A critical approach to halt the menace of glycation. *Glycobiology*. 11:979-90. doi: 10.1093/glycob/cwu057.1–43.
- Ashraf, J. M., Ahmad, S., Choi, I., Ahmad, N., Farhan, M., Tatyana, G. & Shahab, U. (2015). Recent advances in detection of AGEs: Immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches. *IUBMB life*, 67(12), 897-913. <https://doi.org/10.1002/iub.1450>.
- Aziz, Z., & Abdul Rasool Hassan, B. (2017). The effects of honey compared to silver sulfadiazine for the treatment of burns: A systematic review of randomized controlled trials. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 43(1), 50–57. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2016.07.004>.
- Bachanová, K., Klaudivy, J., Kopernický, J., Simúth, J. (2002). Identification of honeybee peptide active against *Paenibacillus* larvae through bacterial growth-inhibition assay on polyacrylamide gel. *Apidologie*, 33(3), 259–269. <https://doi.org/10.1051/apido:2002015>.
- Barrera, D. (2015). Mercado internacional de miel. OFICINA DE ESTUDIOS Y POLÍTICAS AGRARIAS, ODEPA, Ministerio de agricultura. Retrieved from: <https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2015/08/Apicultura2015.pdf>.
- Bateman, A., Chitramuthu, B. P., & Bennett, H. (2018). Chromatographic Methods for the Purification of Granulin Peptides. *Methods in molecular biology*, 1806, 19–34. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8559-3\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8559-3_2).
- Beisswenger, P. J., Howell, S., Mackenzie, T., Corstjens, H., Muizzuddin, N. & Matsui, M. S. (2012). Two fluorescent wavelengths, 440(ex)/520(em) nm and 370(ex)/440(em) nm, reflect advanced glycation and oxidation end products in human skin without diabetes. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 14(3):285-92. doi: 10.1089/dia.2011.0108.

Bíliková, K., & Šimúth, J. (2010). New criterion for evaluation of honey: Quantification of royal jelly y protein apalbumin one in honey by ELISA. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(15), 8776–8781. <https://doi.org/10.1021/jf101583s>.

Bílikova, K., Huang, S. C., Lin, I. P., Šimuth, J., & Peng, C. C. (2015). Structure and antimicrobial activity relationship of royalisin, an antimicrobial peptide from royal jelly of *Apis mellifera*. *Peptides*, 68, 190–196. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.03.001>.

Bobály, B., Fleury-Souverain, S., Beck, A., Veuthey, J-L., Guillarme, D. & Fekete, S. (2018). Current possibilities of liquid chromatography for the characterization of antibody-drug conjugates. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 147, 493-505, ISSN 0731-7085, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2017.06.022>.

Bogdanov, S. & Martin, P. (2002). Honey authenticity. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* 93. 232-254.

Bogdanov, S., Jurendic, T., Sieber, R., & Gallmann, P. (2008). Honey for nutrition and health: A review. *Journal of the American College of Nutrition*, 27(6), 677–689. <https://doi.org/10.1080/07315724.2008.10719745>.

Bogdanov, S. (2011). Honey Composition. *The Honey Book*, (Chapter 5), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.12.010>.

Bouma, B., Kroon-Batenburg, L. M., Wu, Y. P., Brünjes, B., Posthuma, G., Kranenburg, O., de Groot P. G., Voest, E. E. & Gebbink, M. F. (2003). Glycation induces formation of amyloid cross-beta structure in albumin. *Journal of Biological Chemistry*. 24;278(43):41810-9. doi: 10.1074/jbc.M303925200.

Bouseta, A., Scheirman, V. & Collin, S. (1996). Flavor and free amino acid composition of lavender and eucalyptus honeys. *Journal of food Science*, 61(4), 683-687.

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brudzynski, K. & Miotto, D. (2011). Honey melanoidins: Analysis of the compositions of the high molecular weight melanoidins exhibiting radical-scavenging activity. *Food Chemistry*, 127, 3, 1023-1030. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.01.075>.

Bucekova, M., Valachova, I., Kohutova, L., Prochazka, E., Kludiny, J., & Majtan, J. (2014). Honeybee glucose oxidase—its expression in honeybee workers and comparative analyses of its content and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-mediated antibacterial activity in natural honeys. *Naturwissenschaften*, 101(8), 661–670. <https://doi.org/10.1007/s00114-014-1205-z>.

Bucekova, M., Juricova, V., Monton, E., Martinotti, S., Ranzato, E., & Majtan, J. (2018). Microwave processing of honey negatively affects honey antibacterial activity by inactivation of bee-derived glucose

oxidase and defensin-1. *Food chemistry*, 240, 1131–1136.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.08.054>

Byers, D. L. (2017). Studying Plant–Pollinator Interactions in a Changing Climate: A Review of Approaches. *Applications in Plant Sciences*, 5(6), 1700012. <http://doi.org/10.3732/apps.1700012>.

Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., Vaeck, M., & Tempst, P. (1989). Apidaecins: antibacterial peptides from honeybees. *The EMBO Journal*, 8(8), 2387–2391. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1989.tb08368.x>.

Casteels, P., Ampe, C., Riviere, L., van Damme, J., Elicone, C., Fleming, M., ... Tempst, P. (1990). Isolation and characterization of abaecin, a major antibacterial response peptide in the honeybee (*Apis mellifera*). *European Journal of Biochemistry*, 187(2), 381–386. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15315.x>.

Casteels, P., Ampe, C., Jacobs, F., & Tempst, P. (1993). Functional and chemical characterization of Hymenoptaecin, an antibacterial polypeptide that is infection-inducible in the honeybee (*Apis mellifera*). *Journal of Biological Chemistry*, 268(10), 7044–7054.

Casteels-Josson, K., Zhang, W., Capaci, T., Casteels, P., & Tempst, P. (1994). Acute transcriptional response of the honeybee peptide-antibiotics gene repertoire and required post-translational conversion of the precursor structures. *Journal of Biological Chemistry*, 269(46), 28569–28575.

Cabrero, G. (2018). Caracterización Analítica de Defensina-1 y Actividad de Glucosa Oxidasa en Miel como Indicadores de la Infección por *Nosema Ceranae* en abejas. (Tesis de Magíster). Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Cabrero, G., Sanhueza, O., Pezoa, M., Báez, M. E., Martínez, J., Báez, M., Fuentes, E. (2020). Relationship among the minor constituents, antibacterial activity and geographical origin of honey: A multifactor perspective. *Food Chemistry*, 315, 126296. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126296>.

Cheng, G., Zhao, J., Wang, X., Yang, C., Li, S., Lu, T., Li, X., Wang, X. & Zhu, G. (2021). A highly sensitive and selective method for the determination of ceftiofur sodium in milk and animal-origin food based on molecularly imprinted solid-phase extraction coupled with HPLC-UV. *Food Chemistry*, 347, 129013, ISSN 0308-8146. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129013>.

Chevalier F., Chobert J. M., Dalgalarondo M., Choiset Y. & Haertlé T. (2002). Maillard glycation of beta-lactoglobulin induces conformation changes. *Nahrung*, 46(2):58-63. PMID: 12017991.

Chua, L. S., Lee, J. Y., & Chan, G. F. (2013). Honey protein extraction and determination by mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405(10), 3063–3074. <https://doi.org/10.1007/s00216-012-6630-2>.

Creed, D. (1984a). The photophysics and photochemistry of the near-uv absorbing amino acids—I. Tryptophan and its simple derivatives. *Photochemistry and Photobiology*, 39(4), 537-562.

Creed, D. (1984b). The photophysics and photochemistry of the near-uv absorbing amino acids—II. Tyrosine and its simple derivatives. *Photochemistry and photobiology*, 39(4), 563-575.

Cremer, S., Armitage, S. A. O., & Schmid-Hempel, P. (2007). Social Immunity. *Current Biology*, 17(16), 693–702. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.06.008>.

Cociancich, S., Ghazi, A., Hetru, C., Hoffmann, J.A., Letellier, L., (1993). Insect defensin, an inducible antibacterial peptide, forms voltage-dependent channels in *Micrococcus luteus*. *J. Biol. Chem.* 268, 19239– 19245.

Cooper, R. A & Jenkins, L. (2009). A comparison between medical grade honey and table honeys in relation to antimicrobial efficacy. *Wounds*. February. Retrieved from: <http://www.woundsresearch.com/content/a-comparison-between-medical-grade-honey-and-table-honeys-relation-antimicrobial-efficacy>. Date of Access: 22/03/2019.

Danihlík, J., Šebela, M., Petřivalský, M., & Lenobel, R. (2014). A sensitive quantification of the peptide apidaecin one isoform in single bee tissues using a weak cation exchange pre-separation and nanocapillary liquid chromatography coupled with mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1374, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.041>.

da Silva, P. M., Gauche, C., Gonzaga, L. V., Costa, A. C. O., & Fett, R. (2016). Honey: Chemical composition, stability and authenticity. *Food Chemistry*, 196(April), 309–323. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.09.051>.

Dauly, C., Perlman, D. H., Costello, C. E. & McComb, M. E. (2006). Protein separation and characterization by np-RP-HPLC followed by intact MALDI-TOF mass spectrometry and peptide mass mapping analyses. *Journal of proteome research*, 5(7), 1688–1700. <https://doi.org/10.1021/pr060108z>.

Di Girolamo, F., D’Amato, A., & Righetti, P. G. (2012). Assessment of the floral origin of honey via proteomic tools. *Journal of Proteomics*, 75(12), 3688–3693. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.029>.

Di Palma, S., Hennrich, M. L., Heck, A. J. & Mohammed, S. (2012). Recent advances in peptide separation by multidimensional liquid chromatography for proteome analysis. *Journal of Proteomics*, 75(13), 3791-3813. doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.033.

Duong-Ly, K. C. & Gabelli, S. B. (2014). Gel filtration chromatography (size exclusion chromatography) of proteins. *Methods in enzymology*, 541, 105–114. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420119-4.00009-4>.

Estrella, A., Sánchez, E. E., Galán, J. A., Tao, W. A., Guerrero, B., Navarrete, L. F. & Rodríguez-Acosta, A. (2011). Characterization of toxins from the broad-banded water snake *Helicops angulatus*

(Linnaeus, 1758): isolation of a cysteine-rich secretory protein, Helicopsin. *Archives of toxicology*, 85(4), 305–313. <https://doi.org/10.1007/s00204-010-0597-6>.

Eyer, M., Neumann, P., & Dietemann, V. (2016). A look into the cell: Honey storage in honeybees, *Apis mellifera*. *PLoS ONE*, 11(8), 1–20. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0161059>.

Evans, J. D., Aronstein, K., Chen, Y. P., Hetru, C., Imler, J.-L., Jiang, H., ... Hultmark, D. (2006). Immune pathways and defence mechanisms in honeybees *Apis mellifera*. *Insect Molecular Biology*, 15(5), 645–656. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2006.00682.x>.

FAO. (2001). Codex standard for honey, revised in 2001 (No. Codex Stan 12-1981). Retrieved from: [www.fao.org/input/download/standards/310/cxs\\_012e.pdf](http://www.fao.org/input/download/standards/310/cxs_012e.pdf). Date of Access: 12/03/2019.

FAO. (2009). Bees and Their Role in Forest Livelihoods. Definitions and Uses of Honey. *NON-WOOD FOREST PRODUCTS 19, BEES AND THEIR ROLE IN FOREST LIVELIHOODS A Guide to the Services Provided by Bees and the Sustainable Harvesting, Processing and Marketing of Their Products*, (December 2001), 81–88. <https://doi.org/ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/012/i0842e/i0842e16.pdf>.

Ferrier, P. M., Rucker, R. R., Thurman, W. N., & Burgett, M. (2018). Economic Effects and Responses to Changes in Honeybee Health, (246).

Frolov, A., & Hoffmann, R. (2008). Separation of Amadori peptides from their unmodified analogs by ion- pairing RP-HPLC with heptafluorobutyric acid as ion-pair reagent. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 392(6), 1209–1214. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2377-1>.

Fujiwara, S., Imai, J., Fujiwara, M., Yaeshima, T., Kawashima, T., & Kobayashi, K. (1990). A Potent Antibacterial Protein in Royal Jelly. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(19), 11333–11337. Retrieved from pm:2358464.

Gan, Y., Xiao, Y., Wang, S., Guo, H., Liu, M., Wang, Z. & Wang, Y. (2019). Protein-Based Fingerprint Analysis for the Identification of *Ranae Oviductus* Using RP-HPLC. *Molecules*, 24(9), 1687. <https://doi.org/10.3390/molecules24091687>

Gätschenberger, H., Azzami, K., Tautz, J., & Beier, H. (2013). Antibacterial Immune Competence of Honeybees (*Apis mellifera*) Is Adapted to Different Life Stages and Environmental Risks. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066415>.

Ghosh, S., Pandey, N. K., Singha Roy, A., Tripathy, D. R., Dinda, A. K. & Dasgupta, S. (2013). Prolonged glycation of hen egg white lysozyme generates non amyloid structures. *PLoS One*, 8(9): e74336. doi: 10.1371/journal.pone.0074336.

Ghosh-Moulick, R., Bhattacharya, J., Roy, S., Basak, S. & Dasgupta, A. K. (2007). Compensatory secondary structure alterations in protein glycation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and*

*Proteomics*, 1774(2), 233-242. 10.1016/j.bbapap.2006.11.018.

Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Milzani, A., Fanti, P., Rossi, R. (2013). Analysis of GSH and GSSG after derivatization with N-ethylmaleimide. *Nature Protocols*, 8, 1660–1669. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.095>.

Hellwig, M., Rückriemen, J., Sandner, D. & Henle, T. (2017). Unique Pattern of Protein-Bound Maillard Reaction Products in Manuka (*Leptospermum scoparium*) Honey. *Journal of agricultural and food chemistry*, 65(17), 3532–3540. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b00797>.

Herraiz, T. (1997). Sample preparation and reversed phase-high performance chromatography analysis of food-derived peptides. *Analytica Chimica, Acta* 352, 119-139. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(97\)00199-2](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(97)00199-2).

Hermanns, R., Mateescu, C., Thrasyvoulou, A., Tananaki, C., Wagener F. & Cremers N. (2020). Defining the standards for medical grade honey. *Journal of Apicultural Research*, 59:2, 125-135. DOI: 10.1080/00218839.2019.1693713.

Howard, A. F., & Barrows, E. M. (2014). Self-pollination rate and floral-display size in *Asclepias syriaca* (Common Milkweed) with regard to floral-visitor taxa. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 1–16. <http://doi.org/10.1186/1471-2148-14-144>.

Hubert, J., Erban, T., Kamler, M., Kopecky, J., Nesvorna, M., Hejdankova, S., ... Zurek, L. (2015). Bacteria detected in the honeybee parasitic mite *Varroa destructor* collected from beehive winter debris. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 640–654. <https://doi.org/10.1111/jam.12899>.

Ilyasov, R. A., Gaifullina, L. R., Saltykova, E. S., Poskryakov, A. V., & Nikolaenko, A. G. (2013). Defensins in the honeybee antiinfectious protection. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 49(1), 1–9. <https://doi.org/10.1134/S0022093013010015>.

INDAP. (2007). Plan Nacional de Competitividad Apícola para la agricultura familiar campesina. Retrieved from: [http://www.indap.gob.cl/docs/default-source/default-document-library/plan\\_nacional\\_apicola.pdf?sfvrsn=0](http://www.indap.gob.cl/docs/default-source/default-document-library/plan_nacional_apicola.pdf?sfvrsn=0).

Intergovernmental Services, S.-P. P. on B. and E. (2018). Item 11 of the provisional agenda\* REVIEW OF POLLINATORS AND POLLINATION RELEVANT TO THE CONSERVATION AND SUSTAINABLE USE OF BIODIVERSITY IN ALL ECOSYSTEMS, BEYOND THEIR ROLE IN AGRICULTURE AND FOOD PRODUCTION Note by the Executive Secretary\*\*, (June), 1–72. Retrieved from: <https://www.cbd.int/doc/c/3bf6/6dd2/f2282b216e6ae4bd24943d44/sbstta-22-inf-21-en.pdf>.

Ioannou, A., & Varotsis, C. (2019). Probing hemoglobin glyco-products by fluorescence spectroscopy. *RSC Advances*, 9, 37614-37619. doi: 10.1039/C9RA05243G.

Iqbal, S., Alam, M. M. & Naseem, I. (2016). Vitamin D prevents glycation of proteins: an in vitro study. *FEBS Letters*, 590(16):2725-36. doi: 10.1002/1873-3468.12278.

Irish, J., Carter, D. A., Shokohi, T., & Blair, S. E. (2006). Honey has an antifungal effect against *Candida* species. *Medical Mycology*, 44(3), 289–291. <https://doi.org/10.1080/13693780500417037>.

Jackson, T. R., Springall, J. S., Rogalle, D., Masumoto, N., Ching Li, H., D'Hooge, F., Perera, S. P., Jenkins, A. T., James, T. D., Fossey, J. S. & van den Elsen, J. M. (2008). Boronate affinity saccharide electrophoresis: a novel carbohydrate analysis tool. *Electrophoresis*, 29(20), 4185–4191. <https://doi.org/10.1002/elps.200800178>.

Jacques, A., Laurent, M., Ribière-Chabert, M., Saussac, M., Bougeard, S., Budge, G. E., ... Chauzat, M. P. (2017). A pan-European epidemiological study reveals honeybee colony survival depends on beekeeper education and disease control. *PLoS ONE*, 12(3), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172591>.

Josic, D., & Kovac, S. (2010). Reversed-phase High Performance Liquid Chromatography of proteins. *Current protocols in protein science*, Chapter 8. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0807s61>.

Jull, A. B., Cullum, N., Dumville, J. C., Westby, M. J., Deshpande, S., & Walker, N. (2015). Honey as a topical treatment for wounds. The Cochrane database of systematic reviews, (3), CD005083. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD005083.pub4>.

Kaškonienė, V. & Venskutonis, P. R. (2010). Floral markers in honey of various botanical and geographic origins: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 9(6), 620-634.

Khaje, N. A., & Sharp, J. S. (2020). Rapid Quantification of Peptide Oxidation Isomers from Complex Mixtures. *Analytical chemistry*, 92(5), 3834–3843. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.9b05268>.

Kiselar, J. G., Wang, X., Dubyak, G. R., El Sanadi, C., Ghosh, S. K., Lundberg, K., & Williams, W. M. (2015). Modification of  $\beta$ -Defensin-2 by dicarbonyls methylglyoxal and glyoxal inhibits antibacterial and chemotactic function in vitro. *PloS one*, 10(8), e0130533.

Klaudiny, J., Albert, Š., Bachanová, K., Kopernický, J., & Šimúth, J. (2005). Two structural y different defensin genes, one of them encoding a novel defensin isoform, are expressed in honeybee *Apis mellifera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35(1), 11–22. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2004.09.007>.

Kobayashi, H., & Imai, K. (2021). Recent Progress in FD-LC-MS/MS Proteomics Method. *Frontiers in chemistry*, 9, 640336. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.640336>.

Kwakman, P. H. S., te Velde, A. A., de Boer, L., Speijer, D., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., &

Zaat, S. A. J. (2010). How honey kills bacteria. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(7), 2576–2582. <https://doi.org/10.1096/fj.09-150789>.

Kwakman, P. H. S., te Velde, A. A., de Boer, L., Vandenbroucke-Grauls, C. M. J. E., & Zaat, S. A. J. (2011). Two major medicinal honeys have different mechanisms of bactericidal activity. *PLoS ONE*, 6(3), 3–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017709>.

Le Conte, Y., Ellis, M., & Ritter, W. (2010). Varroa mites and honeybee health: ¿can Varroa explain part of the colony losses? *Apidologie*, 41(3), 353–363. <https://doi.org/10.1051/apido/2010017>.

Lenhardt, L., Bro, R., Zeković, I., Dramićanin, T. & Dramićanin, M. (2015). Fluorescence spectroscopy coupled with PARAFAC and PLS DA for characterization and classification of honey. *Food Chemistry*, 175, 284-291. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.11.162>.

Lerdon, J., & Navarro, E. (2017). Análisis económico de una unidad productiva de miel, localizada en el sector Antilhue. Economic analysis of a honey production unit located in the Antilhue. *Agro Sur*, 45(2), 1–9. <http://doi.org/10.4206/agrosur.2017.v45n1-01>.

Ley, C. (2018). Marcadores químicos de la miel asociados al estado metabólico e inmune de colonias de *Apis mellifera*. Efecto del parásito *Nosema ceranae* o la aplicación de una composición biocida basada en un extracto vegetal. (Tesis de Magíster). Universidad de Chile, Santiago, Chile.

Li, G., Zhao, H., Liu, Z., Wang, H., Xu, B., & Guo, X. (2018). The wisdom of honeybee defenses against environmental stresses. *Frontiers in Microbiology*, 9(MAY), 1–15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00722>.

Maggi, M., Antúnez, K., Invernizzi, C., Aldea, P., Vargas, M., Negri, P., ... Eguaras, M. (2016). Honeybee health in South America. *Apidologie*, 47(6), 835–854. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0445-7>.

Majtan, J., Klauđiny, J., Bohova, J., Kohutova, L., Dzurova, M., Sediva, M., ... Majtan, V. (2012). Methylglyoxal-induced modifications of significant honeybee proteinous components in manuka honey: Possible therapeutic implications. *Fitoterapia*, 83(4), 671–677. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.02.002>.

Majtan, J., Bohova, J., Prochazka, E., & Klauđiny, J. (2013). Methylglyoxal May Affect Hydrogen Peroxide Accumulation in Manuka Honey Through the Inhibition of Glucose Oxidase. *Journal of Medicinal Food*, 17(2), 290–293. <https://doi.org/10.1089/jmf.2012.0201>.

Manes, N. P. & Nita-Lazar, A. (2018). Application of targeted mass spectrometry in bottom-up proteomics for systems biology research. *Journal of proteomics*, 189, 75–90. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.008>.

Mant, C. T., Chen, Y., Yan, Z., Popa, T. V., Kovacs, J. M., Mills, J. B., Tripet, B. P. & Hodges, R. S. (2007). HPLC analysis and purification of peptides. *Methods in molecular biology*, 386, 3–55. [https://doi.org/10.1007/978-1-59745-430-8\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-59745-430-8_1).

Matiacevich, S. & Buera, P. (2006). A critical evaluation of fluorescence as a potential marker for the Maillard reaction. *Food Chemistry*, 95, 423–430. [10.1016/j.foodchem.2005.01.027](https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.027).

Matthiesen, R. & Bunkenborg, J. (2013). Introduction to mass spectrometry-based proteomics. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1007, 1–45. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-392-3\\_1](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-392-3_1).

Moghadam, M., Ganji, A., Varasteh, A., Falak, R. & Sankian, M. (2015). Refolding process of cysteine-rich proteins: Chitinase as a model. *Reports of biochemistry & molecular biology*, 4(1), 19–24.

Monago-Maraña, O., Durán-Merás, I., Galeano-Díaz, T. & Muñoz de la Peña, A. (2016). Fluorescence properties of flavonoid compounds. Quantification in paprika samples using spectrofluorimetry coupled to second order chemometric tools. *Food chemistry*, 196, 1058–1065. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.10.041>.

Morais, M. P., Fossey, J. S., James, T. D. & van den Elsen, J. M. (2012). Analysis of protein glycation using phenylboronate acrylamide gel electrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 869, 93–109. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-821-4_9).

Müller, U., Vogel, P., Alber, G., & Schaub, G. A. (2008). The Innate Immune System of Mammals and Insects. In *Trends in Innate Immunity* (Vol. 7, pp. 21–44). Basel: KARGER. <https://doi.org/10.1159/000135684>.

Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., vanEngelsdorp, D., & Pettis, J. S. (2010). High Levels of Miticides and Agrochemicals in North American Apiaries: Implications for Honeybee Health. *PLoS ONE*, 5(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>.

Nazarian, H., Taghavizad, R., & Majd, A. (2010). Origin of honey proteins and method for its quality control. *Pakistan Journal of Botany*, 42(5), 3221–3228. <https://doi.org/10.2307/2965437>.

Neumann, P., & Carreck, N. L. (2010). Honeybee colony losses. *Journal of Apicultural Research*, 49(1), 1–6. <http://doi.org/10.3896/IBRA.1.49.1.01>.

Obayashi, H., Nakano, K., Shigeta, H., Yamaguchi, M., Yoshimori, K., Fukui, M., ... Kondo, M. (1996). Formation of Crossline as a Fluorescent Advanced Glycation End Product in Vitro and in Vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 226, 37–41. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.1308>.

ODEPA. (2018). Comisión Nacional de Apicultura, Subcomisión Calidad y Mercado. Retrieved from:

[https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/07/Presentacion\\_Calidad\\_Mercado20180614.pdf](https://www.odepa.gob.cl/wp-content/uploads/2018/07/Presentacion_Calidad_Mercado20180614.pdf).

Oldroyd, B. P. (2007). What's Killing American Honeybees? *PLoS Biology*, 5(6), e168. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050168>.

Olivieri, A. C., Wu, H-L., Yu, R-Q. (2009). MVC2: A MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 96(2), 246-251. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2009.02.005>.

Ollerton, J., Winfree, R., & Tarrant, S. (2011). How many flowering plants are pollinated by animals? *Oikos*, 120(3), 321–326. <http://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.18644.x>.

Paudel, Y. P., Mackereth, R., Hanley, R., & Qin, W. (2015). Honeybees (*Apis mellifera* L.) and Pollination Issues: Current status, impacts and potential drivers of decline. *Journal of Agricultural Science*, 7(6), 93 – 109. <http://doi.org/10.5539/jas.v7n6p93>.

Pereira Morais, M. P., Kassar, O., Flower, S. E., Williams, R. J., James, T. D. & van den Elsen, J. (2019). Analysis of Protein Glycation Using Phenylboronate Acrylamide Gel Electrophoresis. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1855, 161–175. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1\\_16](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_16).

Preston, G. W., & Phillips, D. H. (2016). Quantification of a peptide standard using the intrinsic fluorescence of tyrosine. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408(9), 2187–2193. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9334-1>.

Priego Capote, F. & Sanchez, J. C. (2009). Strategies for proteomic analysis of non-enzymatically glycosylated proteins. *Mass spectrometry reviews*, 28(1), 135–146. <https://doi.org/10.1002/mas.20187>.

Rabie, E., Serem, J. C., Oberholzer, H. M., Marques A. R. & Bester M. J. (2016). How methylglyoxal kills bacteria: An ultrastructural study. *Ultrastructural Pathology*, 40:2, 107-111. DOI: 10.3109/01913123.2016.1154914.

Rader, R., Bartomeus, I., Garibaldi, L. A., Garratt, M. P. D., Howlett, B. G., Winfree, R., ... Woyciechowski, M. (2016). Non-bee insects are important contributors to global crop pollination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(1), 146–151. <http://doi.org/10.1073/pnas.1517092112>.

Raj, P. A., & Dentino, A. R. (2002). Current status of defensins and their role in innate and adaptive immunity. *FEMS Microbiology Letters*, 206(1), 9–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(01\)00496-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(01)00496-7).

Randolt, K., Gimple, O., Geissendörfer, J., Reinders, J., Prusko, C., Muel er, M. J., ... Beier, H. (2008). Immune-related proteins induced in the hemolymph after aseptic and septic injury differ in honeybee worker larvae and adults. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 69(4), 155–

167. <https://doi.org/10.1002/arch.20269>.

Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G. & Deber C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6), 1760-1765. DOI: 10.1073/pnas.0813167106.

Rawel, H. M., Frey, S. K., Meidtner, K., Kroll, J. & Schweigert, F. J. (2006). Determining the binding affinities of phenolic compounds to proteins by quenching of the intrinsic tryptophan fluorescence. *Molecular nutrition & food research*, 50(8), 705–713. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200600013>.

Recio, I. & Visser, S. (1999). Two ion-exchange chromatographic methods for the isolation of antibacterial peptides from lactoferrin: In situ enzymatic hydrolysis on an ion-exchange membrane. *Journal of Chromatography A*, 831(2), 191-201. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(98\)00950-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(98)00950-9).

Rees, J., Moniatte, M., & Bulet, P. (1997). Novel antibacterial peptides isolated from a European bumblebee, *Bombus pascuorum* (Hymenoptera, apoidea). *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(5), 413–422. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(97\)00013-1](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(97)00013-1).

Relf, J. M., Chisholm, J. R., Kemp, G. D., & Smith, V. J. (1999). Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *European journal of biochemistry*, 264(2), 350–357. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00607.x>

Richards, A. J. (2001). Does low biodiversity resulting from modern agricultural practice affect crop pollination and yield? *Annals of Botany*, 88(2), 165–172. <http://doi.org/10.1006/anbo.2001.1463>.

Rosenkranz, P., Aumeier, P., & Ziegelmann, B. (2010). Biology and control of *Varroa destructor*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 103(SUPPL. 1), S96–S119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2009.07.016>.

Sakamoto, S., Putalun, W., Vimolmangkang, S., Phoolcharoen, W., Shoyama, Y., Tanaka, H., & Morimoto, S. (2018). Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*, 72(1), 32–42. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1144-z>.

Saraswat, S., Snyder, B., & Isailovic, D. (2012). Quantification of HPLC-separated peptides and proteins by spectrofluorimetric detection of native fluorescence and mass spectrometry. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 902, 70–77. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2012.06.018>.

Schägger, H. (2006). Tricine–SDS-PAGE. *Nature Protocols*, 1, 16–22.

Shahin-Kaleybar, B., Niazi, A., Afsharifar, A., Nematzadeh, G., Yousefi, R., Retzl, B., Hellinger, R., Muratspahić, E. & Gruber, C. W. (2020). Isolation of Cysteine-Rich Peptides from *Citrullus colocynthis*. *Biomolecules*, 10(9), 1326. <https://doi.org/10.3390/biom10091326>.

Shahnawaz, M., Thapa, A., & Park, I. S. (2007). Stable activity of a deubiquitylating enzyme (Usp2-cc) in the presence of high concentrations of urea and its application to purify aggregation-prone peptides. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 359(3), 801–805. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.05.186>.

Shahzad, A., & Cohrs, R. J. (2012). In vitro antiviral activity of honey against varicella zoster virus (VZV): A translational medicine study for potential remedy for shingles. *Translational biomedicine*, 3(2), 2. doi: 10.3823/434.

Sharma, G. S., Warepam, M., Bhattacharya, R. & Singh, L. R. (2019). Covalent Modification by Glyoxals Converts Cytochrome C Into its Apoptotically Competent State. *Scientific reports*, 9(1), 4781. doi:10.1038/s41598-019-41282-2.

Shiloach, J., Santambien, P., Trinh, L., Schapman, A. & Boschetti, E. (2003). Endostatin capture from *Pichia pastoris* culture in a fluidized bed: From on-chip process optimization to application. *Journal of Chromatography B*, 790(1–2), 327-336. [https://doi.org/10.1016/S1570-0232\(03\)00097-7](https://doi.org/10.1016/S1570-0232(03)00097-7).

Silva, T. M. S., dos Santos, F. P., Evangelista-Rodrigues, A., da Silva, E. M. S., da Silva, G. S., de Novais, J. S., Ribeiro, F y Camara, C. A. (2013). Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, 29(1), 10-18.

Simon, A., Traynor, K., Santos, K., Blaser, G., Bode, U. & Molan, P. (2009). Medical honey for wound care--still the 'latest resort'? *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 6(2), 165–173. <https://doi.org/10.1093/ecam/nem175>.

Sivakamavalli, J., Nirosha, R., & Vaseeharan, B. (2015). Purification and Characterization of a Cysteine-Rich 14-kDa Antibacterial Peptide from the Granular Hemocytes of Mangrove Crab *Episesarma tetragonum* and Its Antibiofilm Activity. *Applied biochemistry and biotechnology*, 176(4), 1084–1101. <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1631-1>.

Soares, S., Amaral, J. S., Oliveira, M. B. P. P., & Mafra, I. (2017). A Comprehensive Review on the Main Honey Authentication Issues: Production and Origin. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(5), 1072–1100. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12278>.

Spivak, M., & Reuter, G. S. (2003). Resistance to American foulbrood disease by honeybee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie*, 32(6), 555–565. <https://doi.org/10.1051/apido:2001103>.

Steiner, A. M. & Bulaj, G. (2011). Optimization of oxidative folding methods for cysteine-rich peptides: a study of conotoxins containing three disulfide bridges. *Journal of peptide science: an official publication of the European Peptide Society*, 17(1), 1–7. <https://doi.org/10.1002/psc.1283>.

Subdepartamento de Sistemas de Información Pecuaria (SIPEC). (2018). Boletín Apícola número 3. SAG Ministerio de Agricultura. Retrieved from: [https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/boletin\\_apicola\\_traza\\_3-ab-2018.pdf](https://www.sag.gob.cl/sites/default/files/boletin_apicola_traza_3-ab-2018.pdf).

Sunarić S., Živković J., Spasić A., Lalić J. & Matejić J. (2020). Comparative analysis of riboflavin and thiamine in raw and commercial honey. *Czech Journal of Food Sciences*, 38: 179–184.

Szente, L., Szemán, J. & Sohajda, T. (2016). Analytical characterization of cyclodextrins: History, official methods and recommended new techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 347–365, ISSN 0731-7085. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.05.009>.

Thakur, M. (2012). Bees as Pollinators – Biodiversity and Conservation. *International Research Journal of Agricultural Science and Soil Science*, 2(1), 2251–44. Retrieved from <http://www.interestjournals.org/IRJAS>.

The Council of the European Union. (2002). European Commission Council Directive 2001/110/EC of 20 December 2001 relating to honey. *Official Journal of the European Communities*, 10–47. <https://doi.org/10.1093/jac/dkv056>.

Thomas, A., Solymos, E., Schänzer, W., Baume, N., Saugy, M., Dellanna, F. & Thevis, M. (2011). Determination of Vasopressin and Desmopressin in urine by means of liquid chromatography coupled to quadrupole time-of-flight mass spectrometry for doping control purposes. *Analytica Chimica Acta*, 707(1–2), 107–113, <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.09.027>.

Trhlin, M., & Rajchard, J. (2011). Chemical communication in the honeybee (*Apis mellifera L.*): a review. *Veterinarni Medicina*, 56(6), 265–273. <http://doi.org/10.17221/1543-VETMED>.

Unique Mānuka Factor Honey Association. Grading System Explained. Available online: <https://www.umf.org.nz/unique-manuka-factor/> (accessed on 7 April 2021).

Valachová, I., Bučeková, M., & Majtán, J. (2016). Quantification of bee-derived peptide. *Czech Journal of Food Sciences*, 34(3), 233–243. <https://doi.org/10.17221/422/2015-CJFS>.

Valdés, A., Castro-Puyana, M. & Marina, M. L. (2020). Isolation of proteins from spent coffee grounds. Polyphenol removal and peptide identification in the protein hydrolysates by RP-HPLC-ESI-Q-TOF. *Food research international (Ottawa, Ont.)*, 137, 109368. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109368>.

Vanbergen, A. J., Garratt, M. P., Vanbergen, A. J., Baude, M., Biesmeijer, J. C., Britton, N. F., ...

Wright, G. A. (2013). Threats to an ecosystem service: Pressures on pollinators. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 11(5), 251–259. <http://doi.org/10.1890/120126>.

Vandamme, L., Heyneman, A., Hoeksema, H., Verbelen, J., & Monstrey, S. (2013). Honey in modern wound care: a systematic review. *Burns: journal of the International Society for Burn Injuries*, 39(8), 1514–1525. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2013.06.014>.

vanEngelsdorp, D., Underwood, R., & Hayes, J. (2007). Losses in the Winter of 2006 – 2007: a report commissioned by the Apiary Inspectors of America. *American Bee Journal*, 147:599–603.

vanEngelsdorp, D., Evans, J. D., Saegerman, C., Mullin, C., Haubruge, E., Nguyen, B. K., ... Pettis, J. S. (2009). Colony collapse disorder: A descriptive study. *PLoS ONE*, 4(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006481>.

Vargas, M., Arismendi, N., Riveros, G., Zapata, N., Bruna, A., Vidal, M., ... Gerding, M. (2017). Viral and intestinal diseases detected in *Apis mellifera* in Central and Southern Chile. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 77(3), 243–249. <https://doi.org/10.4067/S0718-58392017000300243>.

Vivian, J. T., & Callis, P. R. (2001). Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins. *Biophysical journal*, 80(5), 2093-2109.

Wei, Y., Chen, L., Chen, J., Ge, L. & He, R. Q. (2009). Rapid glycation with D-ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SH-SY5Y cells. *BMC Cell Biol.* 13; 10:10. doi: 10.1186/1471-2121-10-10.

Welsh, K. J., Kirkman, M. S., & Sacks, D. B. (2016). Role of Glycated Proteins in the Diagnosis and Management of Diabetes: Research Gaps and Future Directions. *Diabetes Care*, 39(8), 1299–1306. <https://doi.org/10.2337/dc15-2727>.

Witze, E. S., Old, W. M., Resing, K. A. & Ahn, N. G. (2007). Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry. *Nature methods*, 4(10), 798–806. <https://doi.org/10.1038/nmeth1100>.

Woldemariam, G., Kyad, A., Moore, S., Qiu, J., Semin, D., Tan Z. J. & Wypych J. (2020). Development and Validation of a HPLC-UV Method for Urea and Related Impurities. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*, 74(1), 2-14. DOI: <https://doi.org/10.5731/pdajpst.2018.009803>.

Yamamoto, E., Niiijima, J. & Asakawa, N. (2013). Selective determination of potential impurities in an active pharmaceutical ingredient using HPLC-SPE-HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 84, 41-47, ISSN 0731-7085, <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.05.033>.

Yang H., Xiao X., Zhao X., Hu L., Zong J. & Xue X. (2015). Study on fluorescence spectra of thiamine and riboflavin. *IC3ME 2015*, 1458-1466.

Zepp, R. G., Sheldon, W. M., Moran, M. A. (2004). Dissolved organic fluorophores in southeastern US coastal waters: correction method for eliminating Rayleigh and Raman scattering peaks in excitation–emission matrices. *Marine Chemistry*, 89, 15-36.

Zhang, Y. X., Watkins, N. G., Stewart, S. & Caldwell, H. D. (1987). The low-molecular-mass, cysteine-rich outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis* possesses both biovar- and species-specific epitopes. *Infection and immunity*, 55(11), 2570–2573. <https://doi.org/10.1128/iai.55.11.2570-2573.1987>.