



TÍTULO DE PATENTE No. 391342

Titular(es): SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA - TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

Domicilio: Arcos de Belen Núm. 79 piso 3, Colonia Centro, 06010, Delegación Cuauhtémoc, Ciudad de México, MÉXICO

Denominación: PROCESO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA AUTENTICIDAD DE MIELES MEDIANTE EL ESTABLECIMIENTO DE SU PERFIL PROTEICO Y DESARROLLO DE UN MARCADOR MOLECULAR PARA MIELES DE DISTINTO ORIGEN ENTOMOLÓGICO.

Clasificación: **CIP:** G01N33/02; A23L21/25; C12Q1/00; G01N27/447
CPC: G01N33/02; A23L21/25; C12Q1/007; G01N27/447; A23V2002/00; Y02A40/90

Inventor(es): JESÚS MANUEL RAMÓN SIERRA; DENIS ISRAEL MAGAÑA ORTIZ; JORGE CARLOS RUIZ RUIZ; ELIZABETH DE LA LUZ ORTIZ VÁZQUEZ

SOLICITUD

Número:
MX/a/2015/017884

Fecha de Presentación:
21 de Diciembre de 2015

Hora:
09:08

Vigencia: Veinte años

Fecha de Vencimiento: 21 de diciembre de 2035

Fecha de Expedición: 22 de marzo de 2022

La patente de referencia se otorga con fundamento en los artículos 1º, 2º fracción V, 6º fracción III, y 59 de la Ley de la Propiedad Industrial.

De conformidad con el artículo 23 de la Ley de la Propiedad Industrial, la presente patente tiene una vigencia de veinte años improrrogables, contada a partir de la fecha de presentación de la solicitud y estará sujeta al pago de la tarifa para mantener vigentes los derechos.

Quien suscribe el presente título lo hace con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracción I, 9, 10 y 119 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V, inciso a), 4º y 12º fracciones I y III del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 4º, 5º fracción V, inciso a), 16 fracciones I y III y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º y 5º fracción I Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento. Su integridad y autenticidad, se podrá comprobar en www.gob.mx/impj.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

SUBDIRECTORA DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y QUÍMICA

EMELIA HERNÁNDEZ PRIEGO



Cadena Original:
EMELIA HERNANDEZ PRIEGO|00001000000506482277|SERVICIO DE ADMINISTRACION
TRIBUTARIA|56||MX/2022/33927|MX/a/2015/017884|Título de patente normal|1027|RGZ|Pág(s)
1|g14K4cxy1t7V08qrrd11r20If6A=

Sello Digital:
sBBYywFwYFEzrh3rr54iYVT+qB2t9aWMw25J9nanekegUCnwDIQShjUPSaaw8ESdADleqpQuUiVCha0cC+u6UQ/KWu
MySL/LB+iqnjbzYTTBImUPWGOQsv6z0LLih5nOPm1Wp8AM42tpHqVHMDDUEWkxoprCZBqUhJKPIUovnrObgpfQPp
oa3/PtTRpUUUF9++rZ60qna6k0sxJy7x0L7CCIHI7+1kPI++Fgc4e8xvJY/Mh5yVEThEyOX5Vrk2VgtHpLj5nDKNGb
7SHDDBTO6q6CyszceYE64qXLG+n4g1gg1u5NylZpnqDVswMwPKRNx1ZrPgdq3BSMZ8Ccl5A==



MX/2022/33927

Proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico y desarrollo de un marcador molecular para mieles de distinto origen entomológico

Campo técnico de la invención

5 La presente invención corresponde al campo de la ciencia y la tecnología de los alimentos, en particular al control de calidad de alimentos de origen natural, especialmente a la caracterización de mieles de diferente origen entomológico, en detalle tiene como alcance la determinación de las proteínas ausentes o presentes en diferentes mieles producidas por diversas especies de abejas con o sin aguijón para establecer un criterio de autenticidad de

10 mieles de alto valor económico. De tal modo, la presente invención permite corroborar el origen entomológico y calidad de las mieles elaboradas por distintos tipos de abejas, empleando para este fin la determinación del patrón proteico que las abejas imparten a las mieles que estas elaboran. Además la presente invención corresponde al establecimiento de una técnica que hace uso del patrón proteico presente en la miel como un marcador “tipo

15 barcoding” que permite vincular cada tipo de miel en particular respecto a su organismo productor a nivel de especie.

Antecedentes de la invención

La miel es un alimento natural con invaluable propiedades nutricionales, terapéuticas y antimicrobianas cuyo uso se remonta a los tiempos de las primeras civilizaciones. Es un

20 compuesto obtenido a partir de una mezcla heterogénea del polen, néctar, exudaciones de plantas que las abejas modifican mediante sus secreciones de sus glándulas bucales. Esta sustancia ha servido de alimento desde tiempos ancestrales en diferentes culturas debido al alto contenido nutricional y medicinal que posee.

La finalidad de esta memoria técnica es desarrollar un método sencillo para determinar el

25 origen entomológico de diferentes mieles y por tanto, establecer su autenticidad. El término origen entomológico se entenderá como la determinación, a partir de ciertos componentes presentes en la miel, de la especie de abeja que produjo la sustancia orgánica a estudiar, ya que las diferentes especies de abejas alrededor del mundo producen mieles con notables

Los usuarios potenciales son los distribuidores, compradores y certificadores de mieles con alto valor agregado ya que el método descrito en la presente invención permite determinar la autenticidad de dichos productos naturales de forma sencilla, a bajo costo y de manera confiable.

5 De igual modo las posibles aplicaciones de la presente invención pueden extenderse a productos derivados de la miel como aditivos, endulzantes naturales y cualquier alimento que utilice miel como componente. La identificación de una proteína presente en diferentes tipos de miel también permite la autenticación del tipo de miel que se ha utilizado como componente de algún alimento y funciona como parámetro de calidad.

10 La miel es un producto natural de alta demanda a nivel mundial, además de sus cualidades antioxidantes y antimicrobianas, se considera un alimento funcional debido a que una cucharada de miel proporciona en promedio 64 calorías. Esta característica se debe a los numerosos compuestos de este producto orgánico entre los que se destacan carbohidratos, ácidos orgánicos, proteínas y compuestos polifenólicos.

15 Los carbohidratos representan aproximadamente 60 a 80% de la miel, son principalmente monosacáridos o azúcares simples que el organismo puede asimilar. Cabe mencionar que existen aproximadamente 25 tipos diferentes de carbohidratos en este producto natural (Doner, LW. 1977. "The sugars of honey—a review." Journal of the Science of Food and Agriculture 28(5): 443-456). Entre los otros compuestos que contienen la miel se encuentran: proteínas, enzimas, aminoácidos libres, minerales, vitaminas, compuestos aromáticos, polifenoles, ácidos orgánicos (Bogdanov, Stefan, et al. (2008) "Honey for Nutrition and Health: A Review" Journal of the American College of Nutrition 27(6): 677-689.). Por otra parte, existen reportes de que la miel posee elementos vivos de naturaleza microbiana como bacterias, hongos y levaduras.

20 En años recientes las actividades antimicrobianas de la miel se han atribuido a números factores como su acidez (tiene un pH ácido de 3.0 a 3.5), una baja actividad de agua y la presencia de peróxido de hidrógeno. No obstante, se ha demostrado recientemente que no son éstas las únicas propiedades de la miel que le confieren notables características para combatir diversas afecciones en animales y seres humanos. En la miel más estudiada en términos de actividad antibacteriana y antifúngica, miel de Manuka, se ha establecido
25 que la actividad antibacteriana no ligada a la presencia de peróxido de hidrógeno desempeña un papel sustancial en la erradicación de agentes patógenos y se ha designado a esta fracción como factor único de Manuka, UMF, por sus siglas en inglés (Stephens, JC. Schlothauer, R. "Honey analysis." U.S. Patent Application 13/141,287). Asimismo, numerosos estudios han demostrado que a diluciones sustanciales las mieles de diferentes orígenes siguen teniendo actividad antimicrobiana. Sin duda alguna, otros componentes
30 de la miel influyen de manera determinante en sus propiedades terapéuticas y medicinales. Entre dichos compuestos se encuentran enzimas, péptidos bioactivos y compuestos fenólicos.

Existe información previa sobre las proteínas presentes en la miel. Por ejemplo, la patente US 4900564 describe un proceso de elaboración de vinos utilizando proteínas presentes en este producto natural. Para llevar a cabo dicho proceso se utiliza miel de la abeja europea *Apis mellifera* y el extracto proteico obtenido

es adicionado a diversos jugos de frutas con el fin de estabilizar los compuestos volátiles del vino obtenido. En esta patente algunas proteínas son propuestas como producidas por las abejas pero no se menciona que podrían ser utilizadas como marcadores de autenticidad del origen de la miel. Tampoco se analizan las proteínas de mieles producidas por diferentes tipos de abejas (Lee, CY & Kime, RW. (1990). Stabilization of wine with honey and SO sub (2). US Patent 4900564).

Entre las enzimas relevantes de la miel se encuentra la glucosa oxidasa. Esta enzima cataliza la oxidación de la D-glucosa produciendo D-glucono-1,5-lactona y peróxido de hidrógeno; un agente antimicrobiano, posteriormente ocurre la hidrólisis de D-glucono-1,5-lactona dando como resultado la formación del ácido glucónico (Snow, M. J., & Manley-Harris, M. "On the nature of non-peroxide antibacterial activity in New Zealand manuka honey" (2004). Food Chemistry, 84(1):145-147).

Aun cuando no existen muchos estudios sobre las proteínas y péptidos antimicrobianos de la miel, algunos autores han reportado que en la miel de Manuka se presenta la defensina-1 de la abeja la cual es un péptido catiónico antimicrobiano (AMP por sus siglas en inglés cationic antimicrobial peptide), cuyo mecanismo de acción aún no se encuentra descrito con claridad (Kwakman, P. H. S., *et al.* (2011) "Medical-grade honey enriched with antimicrobial peptides has enhanced activity against antibiotic-resistant pathogens" European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases 30(2): 251-257.). Existen otros reportes en donde la actividad antimicrobiana de la miel se debe al efecto de proteasas las cuales son responsables de la permeabilización de las membranas como es el caso de la aspártico proteasa.

La presente invención describe cómo la proteína Major Royal Jelly Protein puede ser utilizada como marcador de autenticidad ya que los aminoácidos que la componen varían en diferentes híbridos de abejas europeas como las abejas africanizadas (Sano, O., Kunikata, T., Kohno, K., Iwaki, K., Ikeda, M., & Kurimoto, M. (2004). Characterization of royal jelly proteins in both Africanized and European honeybees (*Apis mellifera*) by two-dimensional gel electrophoresis. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(1), 15-20) y en abejas sin aguijón como la especie *Melipona beecheii*. Esta proteína aparece en el perfil electroforético de abejas con aguijón y sin aguijón; y por tanto puede ser empleada como marcador molecular del origen entomológico.

Por otra parte, los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios provenientes de las plantas, concentrados en semilla, flores y cáscara de frutos. Los compuestos polifenólicos en las plantas, poseen función de defensa contra agentes patogénicos (Treutter, D. (2006). "Significance of flavonoids in plant resistance: a review" Environmental Chemistry Letters, 4(3):147-157). Estos compuestos son responsables de la mayoría de las características organolépticas de los alimentos y bebidas que se derivan de plantas, particularmente el olor y sabor (Tapas, A. R., Sakarkar, D. M., & Kakde, R. B. "Flavonoids as nutraceuticals: a review" (2008). Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 7(3):1089-1099). Algunos autores han reportado que estos compuestos poseen efecto antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio, antialérgico,

antimutagénico, antiviral, antineoplásico, antitrombótico y acción vasodilatadora (Miller, AL. "Antioxidant flavonoids: structure, function and clinical usage" (1996) *Alternative Medicine Review* 1(2): 103-11).

Las propiedades antes mencionadas pueden variar de acuerdo al origen entomológico de la miel, a las propiedades geográficas y climatológicas, así como al tipo de flora que las abejas utilizan para la producción de su alimento. El comercio de mieles de abejas sin aguijón se ha incrementado debido a que se les atribuye mayor actividad nutracéutica comparada con la miel de la abeja europea, *A. mellifera*, lo que ha potenciado el surgimiento de un mercado para estos productos de origen natural y orgánico. El aumento de la demanda también ha provocado la comercialización de productos adulterados o falsificados en mercados locales de México, Guatemala y Venezuela (Medina, M., Ortiz, J. "El cultivo de abejas sin aguijón, una visión general en Veracruz". (1999) *Agroentorno*: 29-30). Lo anterior indica la necesidad de establecer parámetros que permitan determinar no sólo la autenticidad de estos productos sino también su origen entomológico.

Hasta ahora algunos autores han propuesto para llevar a cabo la autenticación de diferentes mieles el uso de parámetros fisicoquímicos como los contenidos de agua, azúcares reductores, acidez, cenizas, así como la actividad de la enzima diastasa (Vit, P., Medina, M., Enríquez, M.E. "Quality standards for medicinal uses of Meliponinae honey in Guatemala, Mexico and Venezuela". (2004). *Bee World* 85(1):2-5). Se ha establecido que estos parámetros fisicoquímicos pueden ser correlacionados hasta con un 96% de confianza con el origen entomológico de una miel. Sin embargo, estos protocolos han sido reportados para determinar la calidad de mieles de *A. mellifera* y no se han estandarizado para mieles de abejas sin aguijón, cuya producción es más variable y de tipo artesanal. Para lograr el alto índice de confianza antes mencionado sería necesario realizar muestreos grandes y durante periodos prolongados para poder reducir la variabilidad climática, geográfica y botánica de la miel de abejas sin aguijón. Debido a la producción a menor escala de este producto dichos estudios se ven limitados por aspectos económicos y de mano de obra especializada en dichos análisis.

La composición de metabolitos secundarios como fenoles y flavonoides, determinada por cromatografía de líquidos de alta resolución, también ha sido propuesta para establecer el origen entomológico de mieles. También se ha reportado el uso de flavonoides y compuestos orgánicos como el metilglioxal para determinar el origen floral de diversas mieles de *Apis mellifera*, su tiempo de almacenamiento y su posible adulteración con base a las proporciones de distintos flavonoides y su concentración por kilogramo de miel (Stephens, JC. Schlothauer, R. "Honey analysis." U.S. Patent Application 13/141,287). Sin embargo, estos compuestos se asocian más al origen geográfico de la miel, ya que su cantidad y composición es influenciada por factores climáticos, de suelo y botánicos. De esta forma una misma miel puede presentar diferentes composición y cantidad de metabolitos secundarios dependiendo de la época de recolección del producto (Vit, P., Persano-Oddo, L., Marano, M. L., Salas de Mejias, E. "Venezuelan stingless bee honeys characterized by multivariate analysis of physicochemical properties". (1998). *Apidologie* 29:377-389).

Además, el proceso descrito por Schlothauer y Stephens no ha sido validado para la determinación de las distintas mieles producidas por diferentes especies de abejas, en particular a las abejas sin aguijón.

La concentración y proporciones de los monosacáridos fructosa y glucosa con el disacárido maltosa, analizada por cromatografía de líquidos de alta resolución, fueron propuesta como predictores de origen entomológico (Vit, P., Soler, C., Tomás-Barberán, F.A. "Phenolic profiles of *Apis mellifera* and *Melipona* spp. honeys from Venezuela".. (1997). Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung 204:43-47). Las proporciones monosacáridos-disacárido con valores de 11-12 se consideran distintivas de mieles provenientes de *Scaptotrigona* spp., valores menores a 3 pertenecen a mieles provenientes del género *Trigonini* y valores mayores a 15 son indicativos de mieles provenientes del género *Meliponini*.

En un estudio más reciente se empleó la espectroscopía de resonancia magnética nuclear-H para diferenciar el origen tanto geográfico como entomológico de mieles. Desde el punto de vista metabolómico esta técnica resultó adecuada para determinar el origen de mieles en áreas geográficas limitadas así como para discernir entre especies, ya que los espectros de resonancia presentan regiones que sirven como marcadores de origen y como indicadores de especie (Schievano, E., Stocchero, M., Morelato, E., Facchin, C., Mammi, S. (2012). An NMR-based metabolomic approach to identify the botanical origin of honey. *Metabolomics* 8(4):679-690). Si bien algunas las técnicas anteriores son útiles para determinar el origen entomológico de mieles, carecen de simplicidad en cuanto a la cantidad de muestras necesarias para los estudios, el tiempo de estudio, la instrumentación analítica, los costos de reactivos, mantenimiento e infraestructura necesaria, así como el personal capacitado para la ejecución de los análisis.

Por lo tanto se hace necesaria la implementación de una metodología analítica simplificada en los aspectos antes mencionados, que permita su adecuado uso como parámetro de calidad, autenticidad y determinación de origen entomológico de mieles con requerimientos sencillos de material de laboratorio, personal con formación científica básica y sin necesidad de equipos costosos.

En la presente invención se describe la caracterización de diferentes mieles a partir de la determinación de los tamaños de las proteínas presentes en dichos productos naturales, así como por medio de la identificación molecular de las secuencias de aminoácidos que conforman las proteínas. Existen diferentes métodos para visualizar o identificar proteínas como la degradación secuencial de Edman, la detección por Western blot, la purificación por sistemas cromatográficos o los procesos electroforéticos. Por tanto, en la presente invención se ejemplifica un proceso de electroforesis sólo por fines de simplicidad y esto no limita sus alcances.

La electroforesis es el proceso que permite el movimiento de moléculas cargadas en una solución o una matriz sólida aplicando un campo eléctrico. La movilidad de las moléculas a analizar depende de su carga, su forma y su tamaño. Asimismo, la electroforesis se ve influenciada por la temperatura, la intensidad del

campo eléctrico y las propiedades de la solución utilizada para promover la movilidad de las moléculas (buffer).

La electroforesis es un proceso estándar para el análisis y la purificación de moléculas grandes como proteínas, ácidos nucleicos y azúcares complejos. Este procedimiento se lleva a cabo bajo el principio que las moléculas con diferentes propiedades se moverán a diferentes velocidades en el mismo campo eléctrico (Kavoosi G. and Ardestani SK. (2012). "Gel Electrophoresis of Protein - From Basic Science to Practical Approach" in Gel Electrophoresis - Principles and Basics, Magdeldin S. (Ed.). InTech Publishers).

De manera general la electroforesis puede utilizar diversos materiales como matrices de separación entre estos se encuentran la celulosa, el acetato o geles a base agarosa, almidón o acrilamida. Los geles de acrilamida son la matriz más empleada para la separación de proteínas y péptidos. Entre los campos de aplicación de la electroforesis se encuentran la bioquímica, la biología, la química de proteínas, la farmacología, la medicina forense, la investigación clínica, la veterinaria, la biología molecular y el control de la calidad de alimentos (Westermeier R. Naven T. Höpker, HR. (2008). Proteomics in practice: a guide to successful experimental design. John Wiley & Sons.).

Dentro del análisis electroforético existen tres métodos básicos de separación los cuales serán brevemente descritos.

a) Electroforesis zonal: en este método se utiliza un sistema de amortiguadores a pH constante, en cuyo sistema la separación es realizada por el tamaño de la molécula.

b) Isotacoforesis: la separación es realizada con un sistema de amortiguadores a diferentes pH. La muestra migra entre un electrolito con una alta movilidad y un ion con baja movilidad todos ellos viajan a la misma velocidad.

c) Electroenfoco: en este método la separación toma lugar a través de un gradiente de pH, este método es exclusivo para sustancia anfotéricas tales como péptidos y proteínas.

Varios compuestos son utilizados para la elaboración de geles de electroforesis, los más utilizados para la separación de proteínas son los geles de almidón y poliacrilamida. Estos últimos presentan varias ventajas entre la que podemos citar: que la poliacrilamida es químicamente inerte, los geles poseen una estabilidad sobre un amplio rango de pH, temperatura, y fuerza iónica, además de ser transparentes, lo cual nos permite una mejor resolución. Finalmente, la poliacrilamida permite obtener un amplio rango de tamaño de poro en el gel (5-20%) a diferencia del almidón el cual su uso es más limitado (Garfin DE. (2008) One-dimensional gel electrophoresis. Methods in Enzymology. 463:497-513.).

Los geles de poliacrilamida resultan de la polimerización de largas cadenas de acrilamida monoméricas con el entrecruzamiento con N,N-metilenebisacrilamida. Además de este compuesto se han utilizados otros,

como es el caso de diacrilamidapiperazina y la N,N-dialitartardiamina, esta última incrementa el tamaño de los poros para electroforesis de electroenfoque.

5 La porosidad del gel la determina la proporción relativa de acrilamida y bis acrilamida, siendo menor el poro cuando exista mayor concentración de bis-acrilamida. El porcentaje total de acrilamida/bis acrilamida determinará el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del porcentaje de acrilamida/bis acrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango de 5 a 10% y de 20% para péptidos. Un menor porcentaje es adecuado para la separación de proteínas de gran tamaño (Garfin DE. (2008) One-dimensional gel electrophoresis. Methods in Enzymology. 463:497-513).

10 El proceso detallado de la invención involucra el procedimiento de electroenfoque en geles de poliacrilamida para la determinación del perfil de proteínas de la miel.

Se entiende por "perfil de proteína" o de manera similar, "perfil proteico" al conjunto de bandas conformadas por cadenas de aminoácidos de diferente tamaño que son detectables en un gel de acrilamida por un proceso de tinción.

15 La presente invención se refiere tanto a los procesos de tinción convencionales como el uso del colorante Coomassie Brilliant Blue, el empleo nitrato de plata u cualquier otro método de tinción que utilice una interacción química con las proteínas para su visualización.

La presente invención entonces se refiere al proceso de autenticación de diferentes mieles mediante el uso de electroforesis para la visualización de su perfil de proteínas y no se ve limitada por el tipo de electroforesis o el tipo de tinción utilizado.

20 Las proteínas de diferentes mieles pueden ser extraídas mediante diversos protocolos pero el método de extracción no limita la aplicación de la invención aquí presentada. Los métodos incluyen, pero no están limitados a éstos, la utilización de sales como sulfato de amonio, ácidos como el ácido tricloroacético y técnicas cromatográficas como cromatografía de exclusión molecular, de afinidad, de capa fina y de alta resolución.

25 En la presente invención se demuestra que la proteína conocida como Major Royal Jelly Protein 1 es un marcador molecular adecuado para determinación del origen entomológico de la miel, esta proteína es muy abundante a pesar de largos períodos de almacenamiento y no presenta grandes cambios moleculares, sólo oxidaciones en algunos aminoácidos. Las proteínas Major Royal Jelly fueron inicialmente identificadas en la jalea real de *Apis mellifera*, pero se han encontrado en diferentes especie de insectos himenópteros. Existen
30 diferentes enzimas e isoformas con diferente actividad biológica como antiinflamatoria, anticancerígena y antimicrobiana (Buttstedt, A., Moritz, R. F., & Erler, S. (2014). Origin and function of the major royal jelly proteins of the honeybee (*Apis mellifera*) as members of the yellow gene family. Biological Reviews, 89(2), 255-269).

Por tanto, puede ser utilizada para determinar la presencia de miel de abejas europeas (*Apis mellifera*), abejas africanizadas y abejas sin aguijón. Esto permitiría establecer el primer estándar de calidad basado en esta proteína. Aunque existen diversos reportes sobre la presencia de la proteína Major Royal Jelly en miel, de sus propiedades antiinflamatorias y en la curación de heridas e infecciones causadas por bacterias (Bean, A., Molan, P., Cursons, R., & Wilkins, R. (2011). "Anti-inflammatory proteins and methods of preparation and use thereof." U.S. Patent Application 13/997,031., Brudzynski, K. Sjaarda, C. Hemming, S. "isolated honey glycoprotein for use as an antimicrobial agent." WO 2015/16A981, Chua, L. S., Lee, J. Y., & Chan, G. F. (2013). Honey proteico extractor and determination by mass spectrometry. Analytical and Bioanalytical Chemistry, A05(10), 3063-307A) hasta el momento no se ha determinado que esta proteína se encuentra en diversos tipos de miel de diferente origen entomológica y de diferente origen geográfico. Tampoco se ha establecido su secuencia para mieles de abejas sin aguijón.

El presente método de la determinación del perfil electroforético es descrito por los autores previamente en la publicación Ramón-Sierra, J. M., Ruiz-Ruiz, J.C., & Ortiz-Vázquez, E. (2015). Electrophoresis characterisation of proteico as a method to establish the entomological origin of stingless bee honeys. Food Chemistry, 183, 43-48

Descripción detallada de la invención

En la presente memoria técnica se describe un proceso que permite identificar el origen entomológico de diversos tipos de miel con base en el perfil proteico presentes en la misma. Este perfil se mantiene en forma consistente para una misma especie de abeja, irrespectivamente de la localización geográfica o del tipo de néctar empleado para la elaboración de la miel. A continuación se describe el proceso de esta invención:

a) **Extracción proteica:** una cantidad de 500 mg de una muestra de miel se mezcla con 50 μ L de buffer de acetatos (acetato de sodio 1.59 M pH 5.3) y 30 μ l de NaCl (0.5 M), posteriormente se le adiciona desoxicolato de sodio (DOC) en concentraciones del 0.1% al 1%, preferentemente 0.1 al 0.5%, pero de manera óptima del 0.1 al 0.2% la muestra se agita e incuba por primera vez por 10 minutos a temperatura ambiente; posteriormente

se le adiciona ácido tricloroacético (TCA) en concentraciones del 50% al 80 %, pero preferentemente del 70% al 80%, y se incuba por segunda vez a -20 °C durante 20 min, después se centrifuga a 2,000 × g por 30 min; luego se lava el pellet (precipitado) con 2 volúmenes de acetona en tres ocasiones; posteriormente la muestra se deja secar y se resuspende en un volumen de 150 µL de buffer de fosfatos. (Peterson GLA, 1997. Simplification of the protein assay method of Lowry, which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83: 346–356).

5

10

15

20

25

30

- b) **Determinación de la concentración proteica:** Para la determinación de la concentración de la proteína presente se emplea un método estándar (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*, 72:248–254).
- c) **Obtención del perfil proteico por electroforesis:** El perfil proteico se determina mediante un sistema electroforético desnaturizante discontinuo SDS-PAGE descrito por Bizani *et al* 2005. Es decir, se utilizan 2 tipos de geles, un gel concentrador al 4% y un gel separador al 12% (variando del 10 al 12% de acrilamida). Para llevar a cabo la electroforesis se utiliza 1 a 10 µg (preferentemente de 5 a 10 µg) de las proteínas previamente extraídas las cuales se mezclan con un buffer denominado buffer de corrida (62.5 mM de buffer Tris-HCl pH 6.8, 2.5 % SDS, 0.002 % de azul de bromofenol, 0.7135 M (5%) de beta-mercaptoetanol y 10 % de glicerol), estas muestras se incuban a 95°C durante 5 min. La electroforesis se corre a 100 Volts durante 2 horas (tomando en cuenta que el voltaje es inversamente proporcional al tiempo). (Bizani, D. Dominguez, APM. Brandelli, A. (2005). Purification and partial chemical characterization of the antimicrobial peptide cerein 8A. *Letters in Applied Microbiology*, 41(3):269-273).
- d) **Tinción de los geles electroforéticos:** Posteriormente los geles se incuban durante 2 horas en una solución de fijación que contiene 25% de metanol, 10% de ácido acético y 0.03% de formaldehído, esto con el fin de que las proteínas no se liberen del gel. Posteriormente los geles se lavan en tres ocasiones con una solución de etanol al 30% en agua durante 20 minutos. Después de estos lavados el gel se incuba por segunda vez

en oscuridad durante un minuto en una solución de 0.01 % de tiosulfato de sodio. Esta última solución se retira y el gel de interés se lava en tres ocasiones con agua destilada estéril. Posteriormente, el gel se incuba por tercera vez en oscuridad durante 20 minutos en una solución de 0.2 % de nitrato de plata y 0.14 % de formaldehído. La solución de plata se retira y el revelado final se lleva a cabo utilizando una solución con 6% de carbonato de sodio, 0.03% de formaldehído y 0.03% de tiosulfato de sodio. El gel se agita hasta que las bandas sean visibles.

e) **Determinación del perfil proteico electroforético:**

Una vez que el gel electroforético es teñido, se procede a la identificación de las bandas proteicas de la muestra de miel. El perfil proteico se define como el número de bandas presentes en cada carril del gel, el peso molecular de las mismas y las relaciones matemáticas que existen entre la posición relativa de distintas bandas. Para la determinación del número de bandas únicamente se tomaron en cuenta aquellas que resultaron nítidas y definidas. La determinación del peso molecular se realiza empleando una función logarítmica con base a un marcador de pesos moleculares conocidos. Las relaciones matemáticas empleadas en la comparación de los diversos perfiles consiste en la determinación de las proporciones que existen en las diferencias entre los pesos moleculares de las bandas sucesivas del mismo perfil proteico, normalizándolas con base en la mínima diferencia encontrada entre los pesos moleculares de bandas sucesivas. Este proceso de normalización se requiere para evitar la posible fluctuación en los pesos moleculares generados en el perfil proteico. En la tabla 1 se muestra la relación de pesos moleculares estandarizados y normalizados, obtenidos mediante la presente invención, de los perfiles proteicos para las mieles: *Melipona beecheii*, *Apis mellifera*, *Trigona (Frieseomelitta) nigra nigra*.

f) **Identificación del origen entomológico:**

Se realiza una comparación entre el patrón de bandeo obtenido en el perfil proteico con una serie de perfiles proteicos estandarizados y normalizados, tabla 1, con esta información se identifica el género y especie de la abeja productora.

La presente invención permite realizar la identificación del origen entomológico de distintas mieles empleando el perfil proteico de dos formas diferentes. Mediante la comparación visual del perfil proteico de la miel problema con respecto al perfil de una miel de origen entomológico conocido, o bien, calculando el número de bandas y las relaciones matemáticas que existen entre los pesos moleculares de las mismas en la miel problema, y subsecuentemente comparando con respecto a tablas generadas para mieles con un origen entomológico conocido.

El método, motivo de la invención posee las ventajas respecto al estado de la técnica en ser una metodología fácil de aplicar, rápida y reproducible para la determinación del origen entomológico de distintas mieles. Es un método robusto que permite identificar la especie del organismo productor de la miel independientemente del origen geográfico o floral de la misma. El empleo de las relaciones matemáticas entre el número de bandas y el peso molecular de estas, permite extrapolar esta metodología a distintas condiciones electroforéticas (composición del gel o del buffer de corrida), siendo las variaciones compensadas mediante el análisis del patrón de peso molecular. Adicionalmente el contar con perfiles proteicos de mieles de origen entomológico conocido permite generar un indicador de comparación visual, mismo que puede ser empleado para confirmar o rechazar un producto como generado por una determinada especie de abeja. Dado que las proteínas de

la comparación visual
una miel de origen
relaciones matemáticas
la miel problema, y
mieles con un origen

o de la técnica en ser
rminación del origen
identificar la especie
ográfico o floral de la
de bandas y el peso
distintas condiciones
endo las variaciones
cionalmente el contar

mieles empleando el perfil proteico de dos formas diferentes. Mediante del perfil proteico de la miel problema con respecto al perfil de entomológico conocido, o bien, calculando el número de bandas y las relaciones matemáticas que existen entre los pesos moleculares de las mismas en la miel problema, y subsecuentemente comparando con respecto a tablas generadas para mieles con un origen entomológico conocido.

El método, motivo de la invención posee las ventajas respecto al estado de la técnica en ser una metodología fácil de aplicar, rápida y reproducible para la determinación del origen entomológico de distintas mieles. Es un método robusto que permite identificar la especie del organismo productor de la miel independientemente del origen geográfico o floral de la misma. El empleo de las relaciones matemáticas entre el número de bandas y el peso molecular de estas, permite extrapolar esta metodología a distintas condiciones electroforéticas (composición del gel o del buffer de corrida), siendo las variaciones compensadas mediante el análisis del patrón de peso molecular. Adicionalmente el contar con perfiles proteicos de mieles de origen entomológico conocido permite generar un indicador de comparación visual, mismo que puede ser empleado para confirmar o rechazar un producto como generado por una determinada especie de abeja. Dado que las proteínas de

Figura 3. Perfil proteico de miel de *Melipona beecheii* de diferentes regiones geográficas. Donde **Carril M:** marcador de peso molecular. **Ca1:** miel obtenida del meliponario 1 del estado de Campeche. **Ca2:** miel obtenida del meliponario 2 del estado de Campeche. **Yu1:** miel obtenida del meliponario 1 del estado de Yucatán. **Yu2:** miel obtenida del meliponario 2 del estado de Yucatán. **Ch1:** miel obtenida del meliponario 1 del estado de Chiapas.

Ejemplo 1. Determinación del origen entomológico de tres diferentes mieles pertenecientes a diferentes especies de abejas.

El presente ejemplo describe un método, figura 1, para la identificación a nivel especie del organismo productor de mieles de distinto origen entomológico. Empleando para ello la comparación del patrón de bandeo proteico generado en un sistema electroforético. Las variables a evaluar son el número de bandas, los pesos moleculares de las mismas, así como las relaciones matemáticas que se puedan establecer entre estos.

Esta invención se basa en que la mayoría de las proteínas presentes en la miel son aportadas por el organismo productor (Ramón et al 2015). Se ha demostrado que diferentes organismos, inclusive diferentes tejidos en un mismo organismo, presentan diferentes perfiles proteicos.

Como ejemplo de la aplicación de este método se presenta la siguiente evaluación de 3 tipos de miel producidas por diferentes especies de abeja. La separación de las proteínas se realizó mediante la técnica SDS-PAGE, pero el campo de la invención no se limita al empleo de esta técnica en particular.

Las muestras de miel se recolectaron en zonas representativas de la Península de Yucatán dedicadas a la crianza de abejas con aguijón y sin aguijón. Las muestras de miel corresponden a las especies de abeja *Melipona beecheii*, *Apis mellifera*, *Trigona (Frieseomelitta) nigra nigra*.

La extracción proteica se realizó mediante el protocolo descrito por Ramón et al 2015, una vez obtenido la fracción proteica se determinó la concentración de la proteína utilizando el método colorimétrico de Bradford (Bradford, M 1976).

Se generó el perfil proteico de las mieles mediante un sistema electroforético desnaturalizante (SDS-PAGE), empleando dos tipos de geles, el primero (gel separación) se preparó al 12% de acrilamida, mientras que el segundo gel (concentrador) se preparó al 4 %. Los geles se ensamblaron y fueron sumergidos en buffer de corrida. Las muestras se prepararon
5 utilizando buffer de carga con 1 µg de las proteínas previamente extraídas. La electroforesis fue llevada a cabo en un campo eléctrico de 100 V durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente los geles se incubaron 2 horas en una solución de fijación que contenía 25% de metanol, 10% de ácido acético y 0.03% de formaldehído, esto con el fin de que las proteínas no se liberaran del gel.

10 Finalmente, el revelado del gel se realizó mediante tinción con nitrato de plata.

Para llevar a cabo el revelado con nitrato de plata, el gel de interés se lavó en tres ocasiones con una concentración de 30% etanol en agua durante 20 minutos. Después de estos lavados el gel se incubó en oscuridad durante un minuto en una solución de 0.01 % de tiosulfato de sodio. Esta última solución se retiró y el gel de interés se lavó en tres ocasiones con agua
15 destilada estéril. Posteriormente, el gel se incubó nuevamente en oscuridad durante 20 minutos en una solución de 0.2 % de nitrato de plata y 0.14 % de formaldehído. La solución de plata fue retirada y el revelado final se llevó a cabo utilizando una solución con 6% de carbonato de sodio, 0.03% de formaldehído y 0.03% de tiosulfato de sodio. Se procedió al revelado hasta que las bandas fueron visibles.

20 Una vez obtenido el patrón de bandas proteínas, se les calcularon los pesos moleculares mediante el cálculo de la relación frontal (RF) en relación al patrón de peso molecular conocido.

Para diferenciar el origen entomológico, se toma en cuenta el número de bandas obtenidas, el peso molecular de las mismas y las relaciones matemáticas que existen entre los pesos
25 moleculares de distintas bandas. Esto permite identificar en forma reproducible al organismo productor de la miel en estudio, constituyendo un eficaz método para identificación del organismo productor.

La figura 2 muestra los perfiles proteicos de las mieles evaluadas, donde se puede observar que todas las mieles poseen un patrón de bandeado único. Es posible identificar el organismo productor de diferentes mieles en función del número de bandas proteicas que presenta, el peso molecular de las mismas y las relaciones matemáticas que existen entre la posición de distintas bandas, Tabla 1. Así mismo el número de bandas que se presentan en los perfiles proteicos es bastante limitado, por lo cual el proceso de comparación resulta un método simple y eficiente. Cabe mencionar que el presente método tiene una variación de 1 a 2 kDa. Tomando en cuenta los datos generados por el presente ejemplo, se puede decir que el método utilizado en la presente invención puede discriminar origen entomológico de miel.

10 **Tabla 1. Relación de pesos moleculares de los perfiles proteicos de las diferentes mieles evaluadas.**

<i>Melipona beecheii</i>	<i>Apis mellifera</i>	<i>Trigona (Frieseomelitta) nigra nigra</i>
75 kDa	90 kDa	86 kDa
70 kDa	83 kDa	75 kDa
65 kDa	72 kDa	65 kDa
60 kDa	33 kDa	50 kDa
25 kDa	10 kDa	31 kDa
		20 kDa
		17 kDa
		14 kDa
		9 kDa
		5 kDa

Ejemplo 2. Reproducibilidad del método de autenticidad de mieles utilizando productos de diferente origen geográfico.

15 En el presente ejemplo se demuestra la reproducibilidad del método previamente descrito. Para validar la reproducibilidad del método y determinar si el perfil proteico varía de acuerdo a la región geográfica donde la muestra es colectada se analizaron diferentes mieles de la especie de *Melipona beecheii* de distinta procedencia geográfica en el año 2015: Dos de las muestras fueron tomadas del Estado de Yucatán en los municipios de Cantamayec (Yu1) y

Maní (Yu2), otra muestra fue tomada en el estado de Campeche en el municipio de Calkiní (Ca1 y Ca2) y la última muestra en el estado de Chiapas en el municipio de Aldama (Ch1).

Para fines del presente ejemplo se procedió al análisis de 4 µg de proteína procedente de cada una de las mieles. La obtención del perfil proteico de las mieles se realizó mediante electroforesis por la metodología SDS-PAGE en forma análoga a la descrita en el ejemplo 1. En este caso la tinción se realizó mediante Azul de Coomassie.

Como puede verse en la Figura 3, el perfil proteico de estas mieles procede de *M. beecheii* resulta comparable al descrito para esta especie en el ejemplo 1. El patrón de bandeo del extracto proteico es semejante con el proceso mostrado en el ejemplo 1 y además diferentes muestras de esta miel a pesar de ser tomadas de diferentes localidades mantienen el número de bandas con los pesos moleculares constantes (tabla 2). Lo anterior permite concluir que el método permite discriminar el origen entomológico de la miel sin que haya variación por el origen geográfico del lugar donde se recolectaron las muestras. Así mismo se demuestra que el tipo de revelado empleado plata vs Coomassie.

15

Tabla 2. Relación de pesos moleculares de los perfiles proteicos de la miel de *Melipona beecheii* de diferentes regiones geográficas. Valores correspondientes a los pesos moleculares observados en la figura 3.

	Ca1	Ca2	Yu1	Yu2	Ch1
20	75 kDa				
	70 kDa				
	65 kDa				
25	60 kDa				
	25 kDa				

30

Reivindicaciones

1. Un proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico caracterizado porque comprende las etapas de:
- 5
- a) Extraer proteínas de una muestra de 500 mg de miel mezclada con 50 μ L de buffer de acetato de sodio con 30 μ L de NaCl, desoxicolato de sodio 0.1% al 1%, la muestra se agita y se incuba por primera vez, posteriormente se le adiciona ácido tricloroacético en concentraciones del 50% al 80 %, y se incuba por segunda vez, posteriormente se centrifuga, se lava y se resuspende;
 - 10 b) Determinar la concentración de proteína por el método de Bradford;
 - c) Obtener un perfil proteico mediante electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida del 10 al 12% a 100 Volts durante 2 horas;
 - 15 d) Realizar una tinción de los geles mediante una primera incubación de 2 horas, posteriormente se lavan los geles, se realiza una segunda incubación de los geles en oscuridad durante un minuto, nuevamente se lavan los geles, se realiza una tercera incubación en oscuridad durante 20 minutos y se realiza un revelado;
 - e) Determinar un perfil proteico electroforético para obtener bandas distintivas con pesos moleculares y;
 - 20 f) Identificar un origen entomológico mediante una comparación entre el perfil proteico obtenido con los perfiles proteicos estandarizados y normalizados.
2. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso a) de la reivindicación 1, caracterizado porque el buffer de acetato de sodio tiene 1.59 M y pH 5.3.
- 25 3. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso a) de la reivindicación 1, caracterizado porque el NaCl tiene 0.5 M.
4. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso a) de la reivindicación 1, caracterizado porque la primera incubación se realiza durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- 30

5. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso a) de la reivindicación 1, caracterizado porque la segunda incubación se realiza durante 20 minutos a -20°C .
6. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso a) de la reivindicación 1, caracterizado porque la centrifugación se realiza a 2000 g durante 30 min.
7. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso a) de la reivindicación 1, caracterizado porque el precipitado obtenido se lava con dos volúmenes de acetona por tres ocasiones.
8. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso a) de la reivindicación 1, caracterizado porque el precipitado se resuspende con 150 μL de buffer de fosfatos.
9. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso c) de la reivindicación 1, caracterizado porque para la determinación del perfil proteico se utiliza 1 a 10 μg de proteína.
10. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con la reivindicación 9, caracterizado porque la proteína se mezcla con un buffer de corrida.
11. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque la mezcla se incuba a 95°C durante 5 minutos.
12. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con la reivindicación 10, caracterizado porque el buffer de corrida está formado por 62.5 mM de buffer Tris-HCl, pH 6.8, 2.5 % SDS, 0.002 % de azul de bromofenol, 0.7135 M (5%) de beta-mercaptoetanol y 10 % de glicerol.

13. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso d) de la reivindicación 1, caracterizado porque la primera incubación se realiza en una solución de fijación de 25% de metanol, 10% de ácido acético y 0.03% de formaldehído.
- 5 14. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso d) de la reivindicación 1, caracterizado porque la segunda incubación se realiza en una solución de 0.01 % de tiosulfato de sodio.
15. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso d) de la reivindicación 1, caracterizado
10 porque después de la segunda incubación se retira el tiosulfato de sodio y el gel se lava en tres ocasiones con agua destilada estéril.
16. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso d) de la reivindicación 1, caracterizado porque la tercera incubación se realiza en una solución de 0.2% de nitrato de plata y
15 0.14% de formaldehído.
17. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso d) de la reivindicación 1, caracterizado porque el revelado se realiza con una solución con 6% de carbonato de sodio, 0.03% de formaldehído y 0.03% de tiosulfato de sodio.
- 20 18. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso e) de la reivindicación 1, caracterizado porque para la determinación del número de bandas únicamente se tomaron en cuenta aquellas que resultaron nítidas y definidas.
19. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el
25 establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso e) de la reivindicación 1, caracterizado porque el perfil proteico estandarizado y normalizado para *Apis mellifera* es: 90 kDa, 83 kDa, 72 kDa, 33 kDa, 10 kDa.

20. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso e) de la reivindicación 1, caracterizado porque el perfil proteico estandarizado y normalizado para *Melipona beecheii* es: 75 kDa, 70 kDa, 65 kDa, 60 kDa, 25 kDa.
- 5 21. El proceso para la determinación de la autenticidad de mieles mediante el establecimiento de su perfil proteico de conformidad con el paso e) de la reivindicación 1, caracterizado porque el perfil proteico estandarizado y normalizado para *Trigona (Frieseomelitta) nigra nigra* es: 86 kDa, 75 kDa, 65 kDa, 50 kDa, 31 kDa, 20 kDa, 17 kDa, 14 kDa, 9 kDa, 5 kDa.

Resumen

La presente invención se refiere a un proceso para la determinación del origen entomológico de la miel mediante el establecimiento de su perfil proteico. El proceso descrito permite identificar el origen entomológico de la miel discriminando entre las distintas especies de abeja que le pueden dar origen. El proceso se basa en la obtención y comparación de un perfil proteico procedente de la miel. Se ha determinado que el perfil proteico generado es único para cada especie de abeja y la comparación entre distintos perfiles (ya sea en forma visual o matemática) permite obtener una “huella proteica” que permite saber si dos mieles han sido generadas por la misma especie de abeja. En caso de contarse con patrones de mieles conocidos, la presente invención permite el desarrollo de bases de datos de patrones con los cuales puede evaluarse la autenticidad y origen de mieles con aplicación comercial.

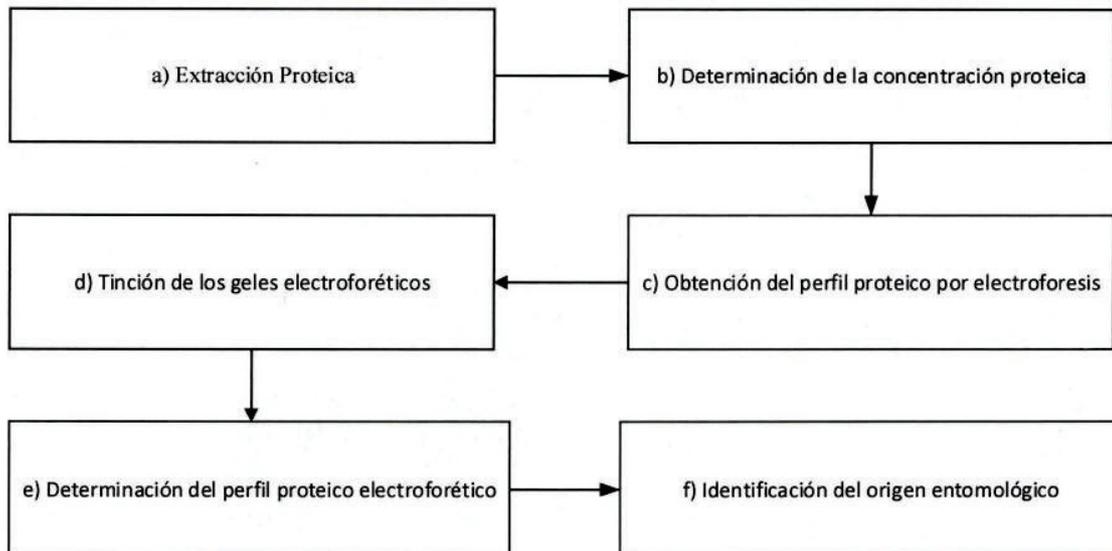


Figura 1

2/3

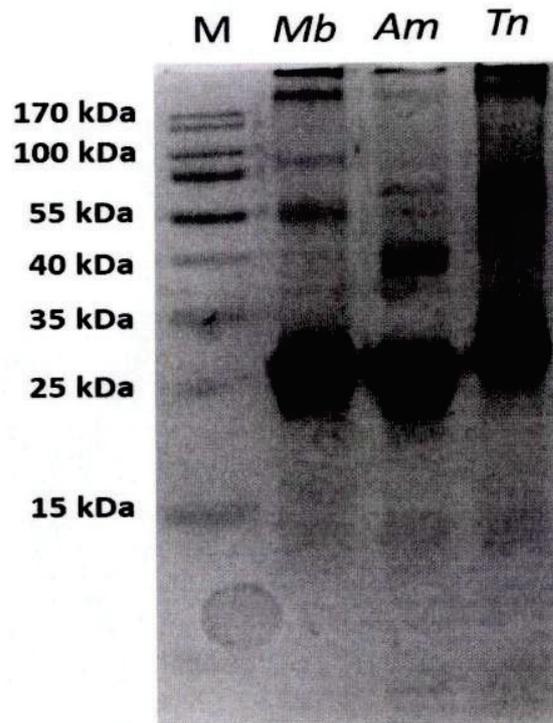


Figura 2

3/3

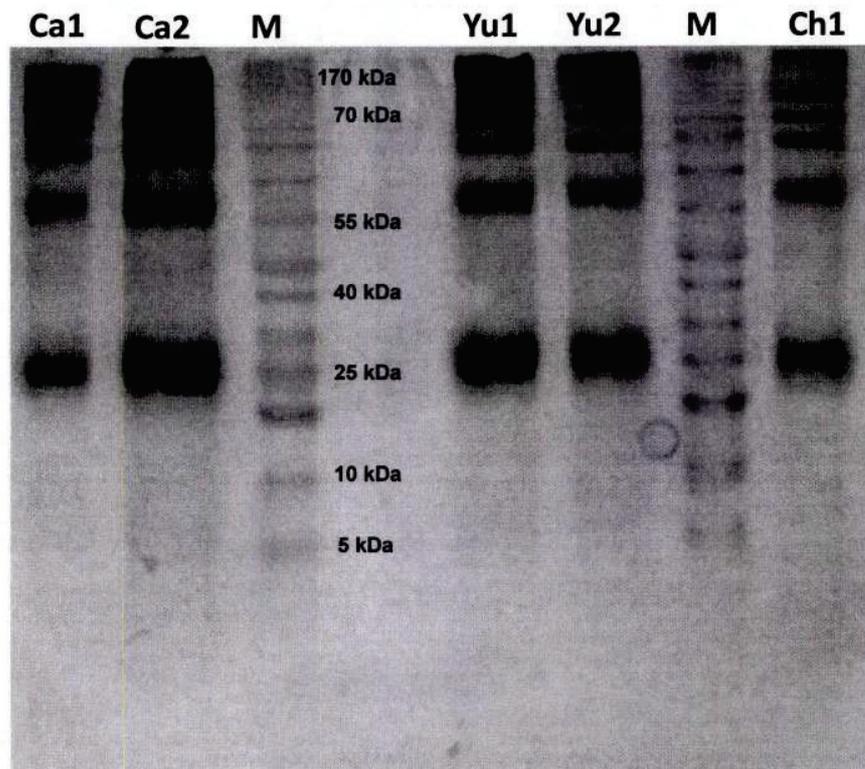


Figura 3

	Thr Ile Asp Gly Glu Ser Tyr Thr Ala Gln Asp Gly Ile Ser Gly Met			
	245	250	255	
	Ala Leu Ser Pro Met Thr Asn Asn Leu Tyr Tyr Ser Pro Val Ala Ser			
	260	265	270	
5	Thr Ser Leu Tyr Tyr Val Asn Thr Glu Gln Phe Arg Thr Ser Asp Tyr			
	275	280	285	
	Gln Gln Asn Asp Ile His Tyr Glu Gly Val Gln Asn Ile Leu Asp Thr			
	290	295	300	
	Gln Ser Ser Ala Lys Val Val Ser Lys Ser Gly Val Leu Phe Phe Gly			
10	305	310	315	320
	Leu Val Gly Asp Ser Ala Leu Gly Cys Trp Asn Glu His Arg Thr Leu			
	325	330	335	
	Glu Arg His Asn Ile Arg Thr Val Ala Gln Ser Asp Glu Thr Leu Gln			
	340	345	350	
15	Met Ile Ala Ser Met Lys Ile Lys Glu Ala Leu Pro His Val Pro Ile			
	355	360	365	
	Phe Asp Arg Tyr Ile Asn Arg Glu Tyr Ile Leu Val Leu Ser Asn Lys			
	370	375	380	
	Met Gln Lys Met Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe			
20	385	390	395	400
	Arg Ile Met Asn Ala Asn Val Asn Glu Leu Ile Leu Asn Thr Arg Cys			
	405	410	415	
	Glu Asn Pro Asp Asn Asp Arg Thr Pro Phe Lys Ile Ser Ile His Leu			
	420	425	430	
25				

SEQ ID NO: 2

Longitud: 11

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

5 Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 1

Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Ile Ser Lys

1 5 10

10

SEQ ID NO: 3

Longitud: 17

Tipo: Aminoácidos

15 Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 2

Val Gly Asp Gly Gly Pro Leu Leu Gln Pro Tyr Pro Asp Trp Ser Phe Ala

20 1 5 10 15

SEQ ID NO: 4

Longitud: 12

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

25 Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 3

Tyr Asp Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Ser Lys

1 5 10

30

SEQ ID NO: 5

Longitud: 13

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

35 Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 4

Leu Leu Thr Phe Asp Leu Thr Thr Ser Gln Leu Leu Lys

1 5 10

SEQ ID NO: 6

Longitud: 25

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

5 Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 5

Thr Ser Asp Tyr Gln Gln Asn Asp Ile His Tyr Glu Gly Val Gln Asn
 1 5 10 15
 10 Ile Leu Asp Thr Gln Ser Ser Ala Lys
 20 25

SEQ ID NO: 7

Longitud: 14

15 Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 6

20 Ser Gly Val Leu Phe Phe Gly Leu Val Gly Asp Ser Ala Leu
 1 5 10

SEQ ID NO: 8

Longitud: 8

Tipo: Aminoácidos

25 Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 7

30 Thr Val Ala Gln Ser Asp Glu Thr
 1 5

SEQ ID NO: 9

Longitud: 13

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

5 Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 8

Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe Arg

1 5 10

10 SEQ ID NO: 10

Longitud: 9

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Apis mellifera*

15 Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 9

Val Asn Glu Leu Ile Leu Asn Thr Arg

1 5

20 SEQ ID NO: 11

Longitud: 11

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Apis mellifera*

25 Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 10

Gly Val Pro Ser Ser Leu Asn Val Ile Ser Lys

1 5 10

30 SEQ ID NO: 12

Longitud: 12

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Apis mellifera*

35 Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 11

Tyr Asp Asp Cys Ser Gly Ile Val Ser Ala Ser Lys

1 5 10

SEQ ID NO: 13

Longitud: 13

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

5 Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 12

Leu Leu Thr Phe Asp Leu Thr Thr Ser Gln Leu Leu Lys

1 5 10

10

SEQ ID NO: 14

Longitud: 25

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

15 Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 13

Thr Ser Asp Tyr Gln Gln Asn Asp Ile His Tyr Glu Gly Val Gln Asn

1 5 10 15

20 Ile Leu Asp Thr Gln Ser Ser Ala Lys

 20 25

SEQ ID NO: 15

Longitud: 14

25 Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 14

30 Ser Gly Val Leu Phe Phe Gly Leu Val Gly Asp Ser Ala Leu

1 5 10

SEQ ID NO: 16

Longitud: 8

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

5 Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 15

Thr Val Ala Gln Ser Asp Glu Thr

1 5

10 SEQ ID NO: 17

Longitud: 13

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Apis mellifera*

15 Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 16

Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe Arg

1 5 10

20 SEQ ID NO: 18

Longitud: 13

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Apis mellifera*

25 Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 17

Met Asn Ala Asn Val Asn Glu Leu Ile Leu Asn Thr Arg

1 5 10

30 SEQ ID NO: 19

Longitud: 13

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Apis mellifera*

35 Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 18

Arg Gln Asp Ala Ile Leu Ser Gly Glu Tyr Asp Tyr Lys

1 5 10

SEQ ID NO: 24

Longitud: 26

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

5 Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 23

	Glu	Tyr	Ile	leu	Val	Leu	Ser	Asn	Lys	Met	Gln	Lys	Met	Val	Asn	Asn
	1			5					10						15	
10	Asp	Phe	Asp	Phe	Asp	Asp	Val	Asn	Phe	Arg						
			20						25							

SEQ ID NO: 25

15 Longitud: 13

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Apis mellifera*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 24

20	Met	Asn	Ala	Asn	Val	Asn	Glu	Leu	Ile	Leu	Asn	Thr	Arg
	1			5						10			

SEQ ID NO: 26

25 Longitud: 13

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Melipona beecheii*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 25

30

SEQ ID NO: 27

Longitud: 13

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

35 Organismo: *Melipona beecheii*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 26

	Leu	Leu	Thr	Phe	Asp	Leu	Thr	Thr	Ser	Gln	Leu	Leu	Lys
	1			5						10			

40

SEQ ID NO: 28

Longitud: 14

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

5 Organismo: *Melipona beecheii*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 27

Leu Thr Ser Asn Thr Phe Asp Tyr Asp Phe Lys Phe Thr Lys

1 5 10

10

SEQ ID NO: 29

Longitud: 25

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

15 Organismo: *Melipona beecheii*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 28

Thr Ser Asp Tyr Gln Gln Asn Asp Ile His Tyr Glu Gly Val Gln Asn

1 5 10 15

20 Ile Leu Asp Thr Gln Ser Ser Ala Lys

20 25

SEQ ID NO: 30

Longitud: 14

25 Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Melipona beecheii*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 29

30 Ser Gly Val Leu Phe Phe Gly Leu Val Gly Asp Ser Ala Leu

1 5 10

SEQ ID NO: 31

Longitud: 16

35 Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

Organismo: *Melipona beecheii*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 30

40 Thr Val Ala Gln Ser Asp Glu Thr Leu Gln Met Ile Ala Ser Met Lys

1 5 10 15

SEQ ID NO: 32

Longitud: 14

Tipo: Aminoácidos

Tipo de molécula: péptido

5 Organismo: *Melipona beecheii*

Nombre de la molécula: MRJP1 péptido 31

Met Val Asn Asn Asp Phe Asn Phe Asp Asp Val Asn Phe Arg

1

5

10

10