

AUTENTICIDADE DE MEL DE MELATO DE BRACATINGA (*Mimosa scabrella* Bentham) A PARTIR DE PEPTÍDEOS MARCADORES IDENTIFICADOS POR LC-ESI-QqQ-MS/MS

B. Silva¹, S. S. Tchewonpi², J. Bönick³, L.V. Gonzaga¹, H. M. Rawel², A.C.O. Costa¹

1 – Departamento de Ciências dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias – CEP: 88034-000 – Florianópolis – SC – Brasil, Telefone: (48) 99600-3580 – e-mail: (bibianaengenheira@hotmail.com).

2 – Instituto de Ciências Nutricionais - Universidade de Potsdam - Nuthetal OT Bergholz-Rehbrücke, Alemanha.

3 – Instituto de Processamento de Grãos e Cereais – IGV - Nuthetal OT Bergholz-Rehbrücke, Alemanha.

RESUMO – A discriminação de méis de melato é uma questão relevante, visto que possuem elevado valor de mercado, o que pode gerar episódios de fraudes por adulteração. Além disso, o interesse pela qualidade e elucidação de suas características, principalmente relativos à bioatividade aumentou de forma significativa. Este estudo teve como objetivo estabelecer marcadores específicos de autenticidade de mel de melato de bracatinga (MMB) por meio de análise proteômica, a fim de contribuir para o processo de indicação geográfica deste mel e favorecer ainda mais sua valorização. A estratégia adotada neste estudo incluiu a identificação não-direcionada das proteínas por LC-ESI-Triple-TOF-MS/MS; digestão *in silico*; e quantificação direcionada dos peptídeos por LC-QqQ-MS/MS. Dentre os marcadores selecionados, o peptídeo QNIDVVAR da MRJP 4 (proteína de geleia real, do inglês *Major Royal Jelly Protein*) poderia ser usado para diferenciar MMB frente a outros méis de origem floral, além da possibilidade de utilizá-lo na discriminação da origem botânica.

ABSTRACT – The discrimination of honeydew honeys has become a relevant topic, since they have a high market value. In addition, the interest in the quality and characteristics, mainly related to bioactivity, increased significantly. This study aimed to establish specific markers of bracatinga honeydew honey authenticity through proteomic analysis, to contribute with the geographical indication and the appreciation. The strategy used was based on the untargeted identification of proteins by LC-ESI-Triple-TOF-MS/MS, *in silico* digestion and targeted peptides quantification by LC-QqQ-MS/MS. The selected marker peptides highlighted that the peptide QNIDVVAR from MRJP 4 could be used to differentiate bracatinga honeydew honey from floral honeys as a potential marker for its quantification for discrimination of botanical origin.

PALAVRAS-CHAVE: MRJP; análise proteômica; modo SRM; indicação geográfica; rastreabilidade de alimentos.

KEYWORDS: MRJP; proteomic analysis; SRM mode; geographical indication; food traceability.

1. INTRODUÇÃO

A adulteração de méis tem sido recorrente e o preço mais elevado dos méis de melato em comparação aos méis florais é um atrativo para a prática (MAZUCHOWSKI; RECH; TORESAN, 2014). Outros fatores, além da adição de substâncias, como o clima, práticas apícolas, manipulação, embalagem e tempo de armazenamento também podem alterar a composição do mel. Embora estudos envolvendo a autenticidade de méis florais sejam frequentes (KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2020; SCHIEVANO et al., 2019), existem poucos estudos a respeito da autenticidade de méis de melato (AZEVEDO et al., 2017; BERGAMO et al., 2018).



Na região Sul do Brasil, em intervalos de dois anos é produzido o mel de melato de bracatinga (MMB), um produto obtido a partir da interação entre a cochonilha *Stigmacoccus paranaensis* Foldi, a árvore bracatinga e as abelhas *Apis mellifera*. O MMB ainda não possui origem controlada, o que dificulta a rastreabilidade, controle da cadeia produtiva e consequente valorização do produto. Neste sentido, algumas agências em Santa Catarina - EPAGRI, SEBRAE, UFSC e FAASC - estão buscando a Indicação Geográfica (IG) do MMB. A diferenciação atualmente é realizada por meio de sua composição química, entretanto, a especificidade ainda não é garantida, surgindo uma alternativa inovadora, por meio da caracterização de proteínas, até então não explorada. Em geral, pouco se sabe sobre o perfil quali e quantitativo de proteínas no mel, apenas alguns estudos que demonstram valores entre 0,04 a 1,6 % (WANG et al., 2009; WON et al., 2009). Em relação à composição, em méis florais, o grupo de proteínas da geleia real (MRJP) é destacado por alguns autores (BILAL; AZIM, 2018; ZHANG et al., 2019). No entanto, a caracterização proteica e peptídica em méis de melato é inédita, até o presente momento.

A caracterização e autenticação de alimentos por meio de análise proteômica foi reportada para diversas matrizes (BÖNICK; HUSCHEK; RAWEL, 2017; HUSCHEK et al., 2018). A identificação de peptídeos marcadores utilizando espectrometria de massas pelo modo SRM (monitoramento de reação selecionada do inglês *Selected Reaction Monitoring*) é uma abordagem interessante, considerando a falta de dados a respeito da composição peptídica em méis. Essas informações podem contribuir para o conhecimento sobre as proteínas do mel e a diferenciação do MMB, e consequentemente dar suporte à aprovação da IG. Neste contexto, este estudo propõe uma abordagem proteômica baseada no modo SRM, desenvolvida e aplicada para seleção e quantificação de peptídeos marcadores em amostras de MMB em comparação aos de origem floral.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes e amostras

Bicarbonato de amônio, 1,4-ditiotreitól, ureia, acetonitrila e ácido fórmico grau LC-MS foram adquiridos da Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Alemanha. Iodoacetamida e tripsina de pâncreas bovino foram obtidos da Sigma Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A. O padrão interno (PI) utilizado foi o peptídeo sintetizado LLGFGINADENQR derivado da β -conglutina (*Lupinus albus*; entrada no banco de dados *UniProt*: Q6EBC1 CONB2_LUPAL).

Três favos de mel de melato de bracatinga (MMB) foram coletados das cidades de Bom Retiro, Santa Terezinha e Água Doce, em Santa Catarina. Os favos foram drenados, homogêneos e armazenados em frascos de polipropileno. Para comparação, 3 amostras de mel floral (MFB) de vassourinha (*Scoparia dulcis*), guamirim (*Myrcia* sp.) e multifloral foram fornecidas por apicultores das mesmas cidades. Por fim, também foram adquiridas 3 amostras de MF de um supermercado na Alemanha (MFA), sendo estes de acácia (*Acacia decora*), girassol (*Helianthus annuus*) e acácia bastarda (*Robinia pseudoacacia*), totalizando nove ($n = 9$) amostras de mel. Todas as amostras foram armazenadas a -20 ± 2 °C, até sua análise.

2.2 Extração e digestão de proteínas de MMB

Amostras de mel ($1 \pm 0,2$ g) foram misturadas com 10 mL de tampão de extração (bicarbonato de amônio 100 mmol L^{-1} , ditiotreitól 5 mmol L^{-1} e ureia 4 mol L^{-1} , pH = 8,2). A solução foi agitada por 1 h em temperatura ambiente. Após duas etapas de centrifugação (5 min a 4000 g e 5 min a 7000 g), foram adicionados $5 \mu\text{g g}^{-1}$ ($100 \mu\text{L}$) do PI. Da mesma forma, uma matriz em branco foi preparada (sem amostra) e submetida ao protocolo de digestão. A alquilação foi realizada adicionando $100 \mu\text{L}$ de iodoacetamida $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ e incubando por 20 min a 50 °C no escuro. Para a digestão, $1640 \mu\text{L}$ de tampão de digestão (acetonitrila 18%, bicarbonato de amônio 100 mmol L^{-1}) e $200 \mu\text{L}$ de tripsina (4 mg mL^{-1}) foram adicionados e a solução foi incubada durante a noite a 37 °C. A digestão foi interrompida pela adição de $100 \mu\text{L}$ de ácido fórmico 40%. SPE usando cartuchos C18 Chromabond (Machery Nagel, Düren, Alemanha) foi realizada para limpar o extrato e isolar os peptídeos de outros compostos de mel. O eluente foi evaporado sob corrente N_2 e ressuspensão usando $450 \mu\text{L}$ de acetonitrila 50% com 0,1% de ácido fórmico e $50 \mu\text{L}$ de 0,1% de ácido fórmico (HUSCHEK et al., 2018).

2.3 Análise proteômica não-direcionada de proteínas de MMB



As proteínas foram analisadas usando um sistema LC-MS/MS de alta resolução, composto pelo sistema exigent micro UHPLC 200 e um ESI-Triple TOF (espectrometria de massas modo triplo tempo de voo, do inglês *Liquid Chromatography-TripleTime of Flight Mass Spectrometry*) 5600 © MS/MS (Applied Biosystems/MDS Sciex, Concord, Canadá) operando no modo de aquisição dependente de dados (DDA), com ionização em modo positivo. A separação foi realizada por uma coluna C₁₈ de núcleo fundido Halo[®] (2,7 µm, 90 Å, 0,5 x 50 mm) a uma vazão de 15 µL min⁻¹ e temperatura de 35 °C. O volume de injeção foi de 7 µL. A fase móvel foi composta por eluente A (ácido fórmico a 0,1%) e eluente B (acetonitrila com ácido fórmico a 0,1%). O gradiente da fase móvel foi programado da seguinte forma: 95–70% A de 0 a 36 min, 70–40% A de 36 a 41 min, 40–10% A de 41 a 42 min, 10% A de 42 a 46 min, 10–95% A de 46 a 47 min. O tempo de equilíbrio da coluna entre cada corrida foi de 4 min. O modo DDA empregado para a coleta de dados do MS permite a aquisição de massas no intervalo de 400 a 1200 Da (com detector TOF) para íons precursores e uma faixa de massa de 200 a 1200 Da para íons de produtos em alta resolução. Os critérios adotados para a DDA consideraram íons com estados de carga na faixa de 2 a 5, que excedem 150 número de aquisições por segundo. Os dados foram adquiridos e processados pelo analista de *software* SCIEX Protein Pilot Software (HUSCHEK et al., 2018).

2.4 Seleção de peptídeos teóricos - digestão *in silico*

A digestão *in silico* com tripsina foi realizada usando o *software Skyline* (MacCoss Lab Software, Universidade de Washington). As configurações foram selecionadas para limitar o comprimento dos peptídeos de 5 a 20 aminoácidos. Aminoácidos N-terminais e peptídeos contendo metionina e cisteína foram excluídos para evitar modificações como alquilação e oxidação. Os resíduos de cisteína foram reduzidos e carbamidometilados. Para as configurações de transição, apenas os íons y foram considerados e as cargas precursoras foram definidas em 2+. Pelo menos 3 transições foram selecionadas para cada peptídeo. A seletividade dos peptídeos foi estabelecida com o algoritmo *BLAST* (Ferramenta Básica de Busca por Alinhamento Local, do inglês *Basic Local Alignment Search Tool*; do banco de dados *UniProt Universal Protein Resource*). O candidato a peptídeo que confirmou 100% de identidade foi selecionado para posterior quantificação.

2.5 Análise proteômica direcionada de peptídeos marcadores de MMB

As proteínas de mel foram analisadas usando um sistema Agilent Infinity 1260 equipado com um Agilent G6470A Triplo Quadrupolo (QqQ) LC/MS (Agilent Technologies Sales & Services GmbH & Co.KG, Waldbronn, Alemanha) acoplado a uma fonte ESI operando no modo de ionização positiva. Os peptídeos foram separados usando uma coluna analítica Kinetex C8 (2,6 µm, 100 Å, 150 x 4,60 mm; Phenomenex, Torrance, CA, E.U.A.), mantida a uma temperatura de 30 °C. A fase móvel foi constituída pelo eluente A (ácido fórmico a 0,1%) e eluente B (acetonitrila) com vazão de 0,5 mL min⁻¹.

O gradiente de fase móvel foi programado da seguinte forma: 95% A de 0 a 5 min, 95–5% A de 5 a 15 min, 5% A de 15 a 18 min, 5–95% A de 18 a 18,01 min, 95% A de 18,01 a 21 min. O tempo de equilíbrio da coluna entre corridas foi de 4 minutos e o volume de injeção de 0,3 µL. A detecção foi realizada no modo de SRM, no qual uma transição específica foi monitorada em um tempo específico, de acordo com o tempo de retenção dos peptídeos.

Após a aplicação do modo SRM, os tempos de retenção e as energias de colisão ideais para as transições identificadas foram determinados usando o *software Skyline*. Depois disso, a abundância relativa do peptídeo de quantificação foi avaliada considerando a razão entre a área do padrão interno e das transições analisadas. O método foi validado em termos de linearidade, de acordo com Rogniaux et al. (2015); especificidade, LOD e LOQ, recuperação e repetibilidade de acordo com as recomendações da ICH (2005).

2.6 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em três repetições independentes e os dados reportados como média e desvio padrão. A ANOVA seguida do teste de *Tukey* foi realizada usando o *software* GraphPad Prism 6 (versão 6.01, GraphPad Inc. CA, E.U.A.). Os dados foram considerados estatisticamente significantes quando as médias dos resultados comparados diferiram no nível de significância de 5%.

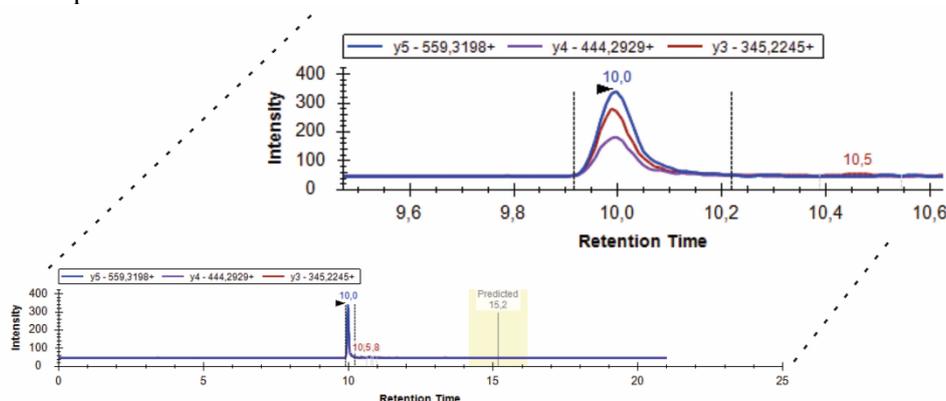
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise proteômica não-direcionada foi realizada nas amostras de méis brasileiros (MMB e MFB) após digestão com tripsina. Foram identificadas as proteínas MRJP dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 em todas as amostras de MMB e nas amostras de MFB apenas a proteína MRJP 4 não foi identificada. Foram identificados entre 3 e 55 peptídeos para essas proteínas. Como a MRJP 4 foi identificada apenas em MMB; foi inicialmente considerada um possível marcador e, portanto, escolhida para análise direcionada de seus peptídeos.

A busca no banco de dados *UniProt* mostrou que 9 grupos de proteínas (todas MRJP) originárias das abelhas *Apis mellifera* foram encontrados. Apenas cinco deles são validados ou revisados pelo banco de dados. Todas as 9 MRJPs são essencialmente diferentes em sua sequência, de modo que é possível diferenciá-las com base na análise de peptídeos. Os peptídeos da MRJP 4 identificados foram testados quanto à sua adequação como marcadores por digestão *in silico* com o software *Skyline*. Somente peptídeos presentes em todas as entradas da MRJP 4 (organismo: OS = *Apis mellifera*) foram considerados para verificar a exclusividade via *software Skyline*, usando a sequência da proteína obtida do banco de dados *UniProt*. Após um teste preliminar para a detecção dos possíveis marcadores, três peptídeos foram selecionados para MRJP 4, sendo: QAAIQSGEYDR, QNIDVVAR, NEYLLALSDR.

As sequências de aminoácidos geradas foram comparadas com as entradas do banco de dados *UniProt* usando o algoritmo BLAST. A pesquisa considerou MRJP 4 de todas as espécies de abelhas para tornar a pesquisa a mais robusta possível. A análise BLAST mostrou que dos três peptídeos monitorados na MRJP 4, o peptídeo QNIDVVAR era específico para esta proteína. O peptídeo selecionado foi confirmado por LC-MS/MS no modo SRM. A Figura 1 apresenta o cromatograma do peptídeo QNIDVVAR e suas transições correspondentes.

Figura 1 – Cromatograma de íons extraídos para o peptídeo QNIDVVAR de MRJP 4 com as transições correspondentes.



Fonte: o próprio autor.

Os outros dois peptídeos selecionados foram usados para garantir a identidade da proteína e também apresentaram alta intensidade e baixa susceptibilidade à degradação. Os peptídeos selecionados (qualificadores e quantificadores) e suas transições SRM, além dos parâmetros otimizados por LC-MS/MS, são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – Peptídeos marcadores de MMB com as transições correspondentes, tempos de retenção e energia de colisão otimizados.

	MRJP 4			PI ^a
Sequência	QAAIQSGEYDR	QNIDVVAR*	NEYLLALSDR	LLGFGINADENQR
TR (min)	9,7	10,0	10,9	11,0
Q1 (m/z)	619,3 (2+)	457,8 (2+)	597,3 (2+)	723,9 (2+)
Q3 (m/z)	639,3/582,3/453,2/512,3	559,3/444,3/345,2	950,5/787,5/674,4/407,2	846,4/661,3/546,3
EC	20,2/17,2/17,2/23,2	15,2/21,2/15,2	16,5/19,5/16,5/16,5	29,4/26,4/32,4

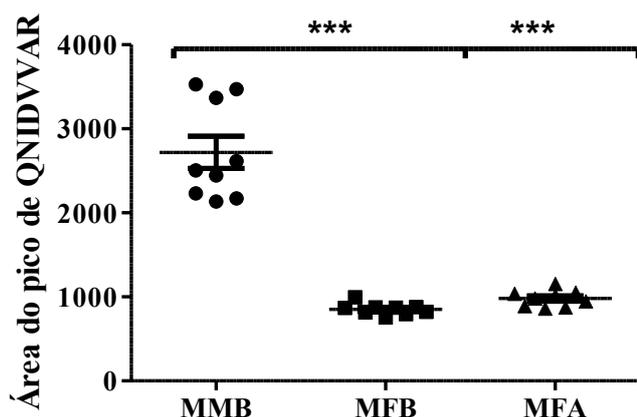
MRJP, proteína de geleia real; TR, tempo de retenção, EC, energia de colisão.

^aPI, padrão interno, peptídeo da proteína β -conglutina. *Peptídeo selecionado para quantificação.

Fonte: o próprio autor.

O método desenvolvido foi validado e considerado confiável e preciso (dados não mostrados). A Figura 2 mostra a quantificação de MRJP 4 em amostras de mel. As quantidades do peptídeo QNIDVVAR foram calculadas com base nas áreas de pico nos cromatogramas de SRM.

Figura 2 – Quantificação relativa do peptídeo QNIDVVAR de MRJP 4 em amostras de mel.



MMB, mel de melato de bracatinga; MFB, mel floral brasileiro; MFA, mel floral alemão.

*** $p < 0,0001$, intervalo de confiança de 95%.

Fonte: o próprio autor.

O peptídeo QNIDVVAR foi encontrado em todas as amostras, apesar da análise não-direcionada por LC-MS/MS ter apontado a presença desta proteína apenas em MMB. A sensibilidade do instrumento e o modo de detecção, bem como a quantidade analisada, devem ser considerados. Isto explica por que a análise proteômica por LC-QqQ-MS/MS (direcionada) mostrou uma concentração significativamente maior de QNIDVVAR em MMB, como mostrou a Figura 2. Portanto, a MRJP 4 foi escolhida como marcador de MMB, considerando que foi encontrada uma resposta significativamente maior ($p < 0,05$) de um peptídeo único em comparação com todos os outros méis avaliados. O estabelecimento de marcadores pode tornar o MMB mais atrativo para os mercados doméstico e internacional, pois permite a rastreabilidade e maior garantia de autenticidade. A mesma abordagem pode ser estendida a outros méis de melato a fim de identificar peptídeos marcadores.

4. CONCLUSÃO

A espectrometria de massas de alta resolução proporcionou a verificação rápida das proteínas mensuráveis do MMB. Estas pertenciam ao grupo das proteínas da geleia real (MRJP), e os resultados apontaram que a MRJP 4 era exclusiva do MMB. Foi então realizada uma seleção de peptídeos únicos desta proteína para a diferenciação, e os peptídeos selecionados para qualificação foram QAAIQSGEYDR e NEYLLALSDR e para quantificação QNIDVVAR.

Os resultados apresentados neste estudo indicam que o peptídeo QNIDVVAR para quantificação de MRJP 4 pode ser utilizado para diferenciar MMB de MF ($p < 0,0001$), considerando a área de cobertura das amostras coletadas e a peculiaridade deste produto. Experimentos futuros devem considerar o uso do isótopo do peptídeo marcador, o que permitiria a quantificação absoluta dessa proteína em MMB. Essa estratégia, por sua vez, poderia ser usada para estabelecer um intervalo de confiança para essa proteína em MMB; o que, por sua vez, poderia contribuir com a autenticidade e denominação de origem do produto (IG). Para isso, será necessário analisar uma população maior de amostras, considerando diferentes amostras de diferentes localidades geográficas de MMB.



5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, M. S. et al. Proteome comparison for discrimination between honeydew and floral honeys from botanical species *Mimosa scabrella* Benthham by principal component analysis. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 13, p. 4515–4519, 2017.
- BERGAMO, G. et al. Mineral profile as a potential parameter for verifying the authenticity of bracatinga honeydew honeys. **Lwt**, v. 97, n. June, p. 390–395, 2018.
- BILAL, B.; AZIM, M. K. Nematicidal activity of ‘major royal jelly protein’-containing glycoproteins from Acacia honey. **Experimental Parasitology**, v. 192, n. July, p. 52–59, 2018.
- BÖNICK, J.; HUSCHEK, G.; RAWEL, H. M. Determination of wheat, rye and spelt authenticity in bread by targeted peptide biomarkers. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 58, p. 82–91, 2017.
- HUSCHEK, G. et al. Authentication of leguminous-based products by targeted biomarkers using high resolution time of flight mass spectrometry. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, n. October 2017, p. 164–171, 2018.
- ICH, G. **Validation of analytical procedures: Text and methodology**, 2005.
- KARABAGIAS, I. K.; BADEKA, A.; KONTOMINAS, M. G. A decisive strategy for monofloral honey authentication using analysis of volatile compounds and pattern recognition techniques. **Microchemical Journal**, v. 152, n. September 2019, p. 104263, 2020.
- MAZUCHOWSKI, J. Z.; RECH, T. D.; TORESAN, L. **Bracatinga (Mimosa scabrella Benthham): Cultivo, manejo e usos da espécie**. [s.l.: s.n.].
- ROGNIAUX, H. et al. Allergen relative abundance in several wheat varieties as revealed via a targeted quantitative approach using MS. **Proteomics**, v. 15, n. 10, p. 1736–1745, 2015.
- SCHIEVANO, E. et al. NMR carbohydrate profile in tracing acacia honey authenticity. **Food Chemistry**, p. 125788, 2019.
- WANG, J. et al. Rapid Determination of the Geographical Origin of Honey Based on Protein Fingerprinting and Barcoding Using MALDI TOF MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 21, p. 10081–10088, nov. 2009.
- WON, S. R. et al. Immunological characterization of honey major protein and its application. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 1334–1338, 2009.
- ZHANG, Y. Z. et al. Discrimination of the entomological origin of honey according to the secretions of the bee (*Apis cerana* or *Apis mellifera*). **Food Research International**, v. 116, n. 866, p. 362–369, 2019.