



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**Producción de apitoxina en Uruguay: estudio de la influencia de diferentes factores productivos sobre el porcentaje de melitina y cantidad de apitoxina**

**VALENTINA MICAELA RODRÍGUEZ BATISTA**

TESIS DE MAESTRÍA EN PRODUCCIÓN ANIMAL opción PRODUCCIÓN ANIMAL

**URUGUAY**

**2025**



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



Facultad de Veterinaria  
Universidad de la República  
Uruguay

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**Programa de Posgrados**

**Producción de apitoxina en Uruguay: estudio de la influencia de diferentes factores productivos sobre el porcentaje de melitina y cantidad de apitoxina**

**VALENTINA MICAELA RODRÍGUEZ BATISTA**

Enrique Nogueira; DMTV, PhD.

Catherine Fagúndez; QF, PhD

Mirel Cabrera; Bioquím., PhD

**Director de Tesis**

**Co-directoras**

**2025**

## INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE LA DEFENSA DE TESIS

**Presidente:** PhD. Pablo Cabral

**Segundo Miembro:** PhD. María Laura Lavaggi

**Tercer Miembro:** PhD. Julio César Moreira de Brito

## Foto del acta escaneada luego que se defiende la tesis

### ACTA DE DEFENSA DE TESIS DE MAESTRIA

|                                  |                                   |
|----------------------------------|-----------------------------------|
| Materia: 10002 TESIS DE MAESTRIA | Orientación: Producción Animal.   |
| Período: septiembre 2025         |                                   |
| Fecha evaluación: 12/09/2025     | Hora: 10:00 Lugar: Salón aula 102 |

#### Tribunal:

Presidente: Pablo Cabral (presidente)

2° Integrante: Maria Laura Lavaggi

3<sup>er</sup> Integrante: Julio César Moreira de Brito.

| C.I.        | Nombre                              | Concepto  | Nota |
|-------------|-------------------------------------|-----------|------|
| 4888504 - 4 | Valentina Micaela Rodríguez Batista | EXCELENTE | 12   |

Nota: La calificación mínima para aprobar la defensa es Aceptable (A)

Dr PABLO CABRAL

Dr. Júlio César Moreira de Brito



Maria Laura Lavaggi Destro



TRIBUNAL

FIRMA

---

---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a la Facultad de Veterinaria (FVet) de la Universidad de la República (Udelar), por continuar abriéndome las puertas para seguir mi formación y también a las distintas instituciones que me brindaron oportunidades a través de cursos, pasantías y congresos. A quienes trabajan en el Campo N°2 de Facultad de Veterinaria en Libertad, San José, y en el apiario del departamento de Rivera. A la Unidad de Farmacología y Toxicología de FVet, por facilitarnos el uso del HPLC para analizar las muestras de esta tesis.

Un agradecimiento muy especial a mis tutores Enrique Nogueira, Catherine Fagúndez y Mirel Cabrera, por estar siempre con su guía, enseñanza y buena disposición para que esta maestría saliera adelante. A la Comisión Académica de Posgrado, por la beca que me permitió realizar mis estudios de posgrado, y también a la Beca Santander y la Beca de Movilidad de la Udelar, gracias a las cuales pude realizar pasantías en la Fundación Ezequiel Díaz y en la Universidad Federal de Minas Gerais, experiencias que fueron muy enriquecedoras.

Gracias a mis compañeros de la Unidad Animales de Granja del Departamento de Producción Animal de FVet, y a quienes trabajan en el área de apicultura, por el apoyo, la enseñanza y la ayuda en los trabajos de campo. En especial a Bibiana Freire, Gustavo Castro, Pablo Juri, José Anzola, Carina Chao y Agustín Pérez, a este último, un agradecimiento especial por su colaboración y buena disposición con la parte estadística. También a los tesisistas que mostraron interés en el tema y colaboraron en el procesamiento de las muestras. A Martín Nesta, por su colaboración y buena disposición siempre que fue requerida en los trabajos de campo.

Una mención especial a Vanesa, enfermera, y al doctor Rodrigo, del centro Gremca de Playa Pascual, que me atendieron con mucha calidez cuando me picó la abeja.

Gracias a mis amigos, por estar siempre ahí, por bancarme y alentarme en cada paso. Y por último y más importante, a mi familia, gracias por su amor incondicional, su apoyo constante y por creer en mí siempre. Sin ustedes, esto no hubiera sido posible.

## ÍNDICE

|                                                                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Foto del acta escaneada luego que se defiende la tesis.....                                                                                           | 4         |
| <b>AGRADECIMIENTOS.....</b>                                                                                                                           | <b>5</b>  |
| <b>ÍNDICE.....</b>                                                                                                                                    | <b>6</b>  |
| <b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS.....</b>                                                                                                                | <b>8</b>  |
| <b>RESUMEN.....</b>                                                                                                                                   | <b>9</b>  |
| <b>SUMMARY.....</b>                                                                                                                                   | <b>10</b> |
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>                                                                                                                              | <b>11</b> |
| <b>MARCO TEÓRICO.....</b>                                                                                                                             | <b>13</b> |
| 1. Apicultura.....                                                                                                                                    | 13        |
| 1.1. Importancia de la apicultura.....                                                                                                                | 13        |
| 1.2. Productos de la colmena.....                                                                                                                     | 13        |
| 1.3. Apicultura en Uruguay (sector apícola en Uruguay).....                                                                                           | 14        |
| 2. Biología de la abeja.....                                                                                                                          | 15        |
| 2.1. Insectos eusociales y castas.....                                                                                                                | 15        |
| 2.2. Polietismo etario.....                                                                                                                           | 16        |
| 2.3. Aparato del veneno.....                                                                                                                          | 17        |
| 3. Apitoxina.....                                                                                                                                     | 18        |
| 3.1. Generalidades del veneno de abejas.....                                                                                                          | 18        |
| 3.2. Composición de la apitoxina.....                                                                                                                 | 19        |
| 3.3. Actividad biológica de los componentes.....                                                                                                      | 21        |
| 3.4. Usos terapéuticos y cosméticos de la apitoxina.....                                                                                              | 22        |
| 4. Producción de apitoxina.....                                                                                                                       | 24        |
| 4.1. Métodos de extracción de apitoxina.....                                                                                                          | 24        |
| 4.2. Métodos de análisis de la apitoxina.....                                                                                                         | 24        |
| 5. Factores de variación de la apitoxina y sus componentes.....                                                                                       | 26        |
| <b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>                                                                                                                | <b>30</b> |
| <b>HIPÓTESIS.....</b>                                                                                                                                 | <b>31</b> |
| <b>OBJETIVOS.....</b>                                                                                                                                 | <b>32</b> |
| Objetivo general:.....                                                                                                                                | 32        |
| Objetivos específicos:.....                                                                                                                           | 32        |
| <b>ESTRATEGIAS DE LA INVESTIGACIÓN.....</b>                                                                                                           | <b>33</b> |
| <b>METODOLOGÍA DE TRABAJO.....</b>                                                                                                                    | <b>34</b> |
| Ensayo 1. Determinación de la influencia del uso de protección sobre los vidrios colectores sobre la cantidad y composición de la apitoxina.....      | 39        |
| Ensayo 2. Determinación de la influencia del horario de extracción (diurno o nocturno) sobre la cantidad y composición de la apitoxina cosechada..... | 40        |
| Ensayo 3. Determinación de la cantidad y composición de la apitoxina obtenida mediante el uso de diferentes trampas de extracción.....                | 41        |
| Ensayo 4. Determinación de la influencia del estado de madurez de las abejas sobre la composición del veneno.....                                     | 43        |

|                                                                                                                                                       |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Ensayo 5. Determinación de la cantidad de apitoxina cosechada mediante el uso de trampas de techo con diferentes áreas.....                           | 44        |
| <b>RESULTADOS.....</b>                                                                                                                                | <b>46</b> |
| Ensayo 1. Determinación de la influencia del uso de protección sobre los vidrios colectores sobre la cantidad y composición de la apitoxina.....      | 46        |
| Ensayo 2. Determinación de la influencia del horario de extracción (diurno o nocturno) sobre la cantidad y composición de la apitoxina cosechada..... | 47        |
| Ensayo 3. Determinación de la cantidad y composición de la apitoxina obtenida mediante el uso de diferentes trampas de extracción.....                | 49        |
| Ensayo 4. Determinación de la influencia del estado de madurez de las abejas sobre la composición del veneno.....                                     | 50        |
| Ensayo 5. Determinación de la cantidad de apitoxina cosechada mediante el uso de trampas de techo con diferentes áreas.....                           | 51        |
| <b>DISCUSIÓN.....</b>                                                                                                                                 | <b>53</b> |
| Ensayo 1. Determinación de la influencia del uso de protección sobre los vidrios colectores sobre la cantidad y composición de la apitoxina.....      | 53        |
| Ensayo 2. Determinación de la influencia del horario de extracción (diurno o nocturno) sobre la cantidad y composición de la apitoxina cosechada..... | 56        |
| Ensayo 3. Determinación de la cantidad y composición de la apitoxina obtenida mediante el uso de diferentes trampas de extracción.....                | 59        |
| Ensayo 4. Determinación de la influencia del estado de madurez de las abejas sobre la composición del veneno.....                                     | 61        |
| Ensayo 5. Determinación de la cantidad de apitoxina cosechada mediante el uso de trampas de techo con diferentes áreas.....                           | 63        |
| <b>CONCLUSIONES.....</b>                                                                                                                              | <b>67</b> |
| <b>FACTORES DE INTERFERENCIA Y PERSPECTIVA DE MEJORA.....</b>                                                                                         | <b>68</b> |
| <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>                                                                                                                              | <b>69</b> |

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

|                                                                                                                            |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Precio internacional de exportación de la miel natural.....                                                      | 14 |
| Figura 2. Valor promedio de explotación y volumen neto exportado en Uruguay desde enero del 2011 a octubre de 2024.....    | 15 |
| Figura 3. Aparato del veneno de la abeja.....                                                                              | 17 |
| Tabla 1. Composición promedio de los principales componentes de la apitoxina....                                           | 20 |
| Figura 4. Actividades biológicas estudiadas en el veneno de abeja.....                                                     | 21 |
| Figura 5. Componentes de un HPLC.....                                                                                      | 26 |
| Figura 6. Trampas de electroestimulación y sus componentes.....                                                            | 35 |
| Figura 7. Cromatograma del estándar de melitina.....                                                                       | 37 |
| Figura 8. Curva de calibración de la melitina para cada HPLC.....                                                          | 38 |
| Figura 9. Cromatograma de una muestra de apitoxina.....                                                                    | 38 |
| Figura 10. Diagrama de la división de las colmenas para obtener dos colmenas, una de abejas jóvenes y otra de maduras..... | 43 |
| Figura 11. Cantidad de apitoxina (mg) según protección de los vidrios colectores de apitoxina.....                         | 46 |
| Figura 12. Porcentaje de melitina (%) según protección de los vidrios colectores de apitoxina.....                         | 47 |
| Figura 13. Cantidad de apitoxina (mg) según extracción diurna o nocturna.....                                              | 48 |
| Figura 14. Porcentaje de melitina (%) según extracción diurna o nocturna.....                                              | 48 |
| Figura 15. Cantidad de apitoxina (mg) según tipo de trampa.....                                                            | 49 |
| Figura 16. Porcentaje de melitina (%) según tipo de trampa .....                                                           | 50 |
| Figura 17. Porcentaje de melitina (%) según categoría de abejas .....                                                      | 51 |
| Figura 18. Cantidad de apitoxina (mg) según el área de la trampa.....                                                      | 52 |

## RESUMEN

La apitoxina, es uno de los productos apícolas de creciente interés debido a sus aplicaciones terapéuticas y cosméticas. Su producción, sin embargo, enfrenta desafíos vinculados a su alta variabilidad en cantidad y composición para que sean aptos para su comercialización. En Uruguay, hasta el momento no se han definido lineamientos que permitan estandarizar y optimizar su extracción. Esta tesis tuvo como objetivo principal determinar la variación en la cantidad de apitoxina y su porcentaje de melitina, en función de distintos factores productivos, más específicamente en los métodos de extracción y la edad de las abejas obreras. Este estudio se desarrolló durante el 2024 y 2025, bajo un diseño experimental a campo utilizando colmenas comerciales de dos apiarios (Rivera y San José). La apitoxina fue colectada mediante trampas de estimulación eléctrica y posteriormente analizada para determinar su peso a través de balanza analítica y su concentración de melitina mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Se realizaron cinco ensayos experimentales, abordando variables como el tipo de protección de los vidrios colectores, el momento del día de la recolección, el tipo y área de las trampas y la edad de las abejas. Los resultados obtenidos evidenciaron que ciertos factores tienen un impacto significativo en la producción y calidad de la apitoxina. En el primer ensayo, se determinó que los vidrios colectores sin protección de látex presentaron mayor cantidad de veneno ( $p < 0,05$ ) y con un porcentaje superior de melitina ( $p < 0,05$ ), en comparación con los vidrios cubiertos de látex. Esto sugiere que la utilización de látex con talco interno o externo no es una medida de manejo eficiente. En el segundo ensayo donde se comparó la extracción diurna y nocturna con trampa de techo, no se encontraron diferencias significativas para ambos parámetros estudiados ( $p > 0,05$ ), sugiriendo que bajo las condiciones en que se llevó adelante el ensayo, ambos momentos de extracción son equivalentes. El tercer ensayo mostró que las trampas ubicadas en el techo de las colmenas logran cosechar más apitoxina que aquellas ubicadas externamente ( $p < 0,05$ ), aunque no hubo diferencias significativas en cuanto a la composición de melitina ( $p > 0,05$ ). El cuarto ensayo reveló uno de los resultados más importantes de la investigación, mostrando que las abejas jóvenes secretan mayor proporción de melitina que abejas maduras ( $p < 0,05$ ). Finalmente, el quinto ensayo evaluó la cantidad de apitoxina cosechada en función del área activa de la trampa de techo. Los resultados mostraron que la trampa del 100% fue la más eficiente ( $p < 0,05$ ). En orden de eficiencia la siguen las trampas del 40 y 60%, sin mostrar diferencias entre ellas, luego se ubica la trampa del 20% y la trampa del 80% no mostró diferencias significativas con las últimas tres trampas mencionadas. En conclusión, esta investigación proporciona evidencia clave para diseñar estrategias prácticas que optimicen la recolección de apitoxina en Uruguay y permite contar con lineamientos productivos que contribuyan a la creación de protocolos productivos.

**Palabras claves:** Apitoxina, melitina, producción apícola, métodos de extracción, edad de las abejas, estandarización

## SUMMARY

Bee venom (apitoxin) is an apicultural product of growing interest due to its therapeutic and cosmetic applications. Its production, however, faces challenges related to the high variability in both quantity and composition, limiting its potential for commercialization. In Uruguay, no official guidelines have yet been established to standardize and optimize its extraction. The main objective of this thesis was to determine the variation in the amount of apitoxin and its melittin content as a function of various production-related factors—more specifically, the extraction methods and the age of worker bees. This study was carried out during 2024 and 2025 under a field-based experimental design using commercial hives from two apiaries (Rivera and San José). Apitoxin was harvested using electric stimulation devices and subsequently analyzed to determine its weight using an analytical balance and its melittin concentration via high-performance liquid chromatography (HPLC). Five experimental trials were conducted, addressing variables such as the type of protection used on the collector glass plates, the time of day of collection, the type and surface area of the traps, and the age of the bees. The results demonstrated that certain factors have a significant impact on apitoxin production and quality. In the first trial, it was found that collector glasses without latex coverings yielded a greater amount of venom ( $p < 0.05$ ) and a higher percentage of melittin ( $p < 0.05$ ), compared to glasses covered with latex. This suggests that the use of latex with either internal or external talc is not an efficient management practice. In the second trial, which compared day and night extraction using roof-mounted traps, no significant differences were found in either parameter studied ( $p > 0.05$ ), suggesting that, under the conditions in which the trial was conducted, both extraction times are equivalent. The third trial showed that traps located on top of the hives collected more apitoxin than those placed externally ( $p < 0.05$ ), although there were no significant differences in melittin composition ( $p > 0.05$ ). The fourth trial revealed one of the most important findings of the research, showing that young worker bees produce venom with a higher melittin concentration than older bees ( $p < 0.05$ ). Finally, the fifth trial evaluated the quantity of apitoxin collected in relation to the active surface area of the roof-mounted trap. Results showed that the 100% trap was the most efficient ( $p < 0.05$ ). In order of efficiency, it was followed by the 40% and 60% traps, which did not differ significantly from each other, then the 20% trap, and finally, the 80% trap, which did not significantly differ from the three aforementioned traps. In conclusion, this research provides key evidence for designing practical strategies to optimize apitoxin collection in Uruguay and offers production guidelines that contribute to the development of standardized harvesting protocols.

**Keywords:** Apitoxin, melittin, apicultural production, extraction methods, bee age, standardization

## INTRODUCCIÓN

La apicultura es “la práctica dedicada a gestionar colonias de abejas con fines agrícolas” para obtener diversos beneficios (Rivera-Gomis *et al.*, 2019). A través de esta actividad, de una colmena se pueden obtener productos como miel, polen, propóleos, cera, jalea real y veneno. Además, las abejas como insectos polinizadores son altamente eficientes y esenciales para la reproducción de plantas y cultivos y por lo tanto, contribuyen en la producción mundial de alimentos. Esto implica que tengan un papel fundamental en la preservación y el mantenimiento del equilibrio ecológico y la biodiversidad de diferentes hábitats (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2021; Rivera-Gomis *et al.*, 2019).

En Uruguay, la apicultura se lleva adelante como tal desde la llegada de los colonizadores en el siglo XIX, quienes introdujeron las primeras colonias de abejas (Cordara, 2005). Con el tiempo, las abejas europeas que estaban establecidas sufrieron un proceso de introgresión con abejas africanizadas desde Brasil, ocurriendo la africanización en la población de abejas locales, lo que generó la abeja criolla polihíbrida actual (Branchiccela *et al.*, 2014). La apicultura uruguaya se practica de forma sostenida desde sus inicios y la mayoría de los apicultores se dedican a la producción de miel a granel. Sin embargo, las fluctuaciones en los precios del mercado internacional y los bajos valores actuales de la miel (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca [MGAP], 2024), abren la posibilidad de explorar otros productos de la colmena. El veneno de abejas es una de las posibilidades, ya que es altamente valorizado en el mercado internacional y podría tomarse como una alternativa o complemento viable para los apicultores del país.

Las abejas hembras poseen un complejo sistema morfofuncional denominado aparato del veneno, encargado de la síntesis, secreción y liberación del mismo. En las reinas, el veneno se utiliza exclusivamente para eliminar a otras abejas reinas al momento del nacimiento, porque solo puede haber una reina por colmena. En cambio, en las obreras, se emplea como un mecanismo de defensa colectivo contra otras especies cuando las abejas salen de la colmena en busca de recursos, pero tras la picadura pierden el aguijón y otras estructuras abdominales, que les provoca su muerte (De Roodt *et al.*, 2005).

El veneno es una mezcla compleja de sustancias bioactivas en solución, siendo el agua su componente mayoritario, con una proporción de entre el 80 y el 88% (Banks & Shipolini, 1986; Owen *et al.*, 1990). Una vez que los compuestos volátiles se evaporan al contacto con el aire, el veneno pasa a denominarse apitoxina (FAO, 2021). Esta también es una mezcla compleja, en la que predominan los péptidos y las enzimas (Demolin & Leite, 2005). La melitina es un péptido compuesto por 26 residuos de aminoácidos y presenta una masa molar de 2846,46 g/mol. Constituye el componente mayoritario de la apitoxina, representando entre el 40% y el 60% del veneno seco total (FAO, 2021).

La apitoxina ha sido utilizada con fines medicinales y cosméticos (Demolin & Leite, 2005). Se ha reportado su potencial como agente antitumoral, analgésico, antiinflamatorio, cicatrizante y en el tratamiento de enfermedades

neurodegenerativas, entre otros usos terapéuticos (Kim *et al.*, 2019; Silva *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2018).

Para ser utilizado como herramienta terapéutica, es fundamental conocer la composición cuali-cuantitativa de por lo menos sus principales componentes. Para ello, se han desarrollado diversos métodos para su caracterización, sin embargo, en la actualidad la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por su sigla en inglés) es la técnica elegida por la industria frente a otras técnicas disponibles. Este método presenta como ventaja la capacidad de separar de forma rápida y precisa los componentes de la apitoxina. Además, permite la cuantificación de ellos, lo que lo convierte en un método cuali-cuantitativo (Pacifikovfi *et al.*, 1995).

La práctica de la extracción de veneno presenta varias limitaciones, siendo la cantidad de apitoxina cosechada por colmena una de las principales. En los estudios realizados hasta el momento, los valores reportados generalmente se encuentran por debajo de los 100 mg de apitoxina por colmena. Por ejemplo, Aradena *et al.* (2011), en una investigación llevada a cabo en Idesia (África), reportaron valores de entre 60 y 80 mg por colmena. En el caso de Villalobos *et al.* (2019), obtuvieron entre 52 y 62 mg en colmenas evaluadas en Guanajuato, México. Por otro lado, Argena *et al.* (2021) informaron valores de entre 40 y 80 mg en colmenas de Salónica, Grecia. Flanjak *et al.* (2024) reportaron entre 30 y 130 mg por colmena en un estudio realizado en Osijek, Croacia. Finalmente, Modanesi *et al.* (2015) registraron valores de entre 25 y 49 mg en colmenas ubicadas en Botucatu, Brasil. Estos valores se consideran bajos si se pretende alcanzar volúmenes adecuados para la exportación, donde las cantidades comercializadas suelen ser en kilogramos. Además, para cumplir con los estándares de calidad exigidos internacionalmente con fines terapéuticos, es necesario asegurar una composición adecuada de los principales componentes de la apitoxina. Hay diversos factores a lo largo de la cadena productiva que pueden influir en la cantidad y composición de la apitoxina obtenida (Ferreira Junior *et al.*, 2010; Flanjak *et al.*, 2021; Haggag *et al.*, 2015). Entre ellos se reportan factores biológicos propios de la abeja, ambientales, de manejo al momento de la extracción o posterior a la cosecha (FAO, 2021; Nowar, 2016). La complejidad y variabilidad de estos factores ha dificultado el desarrollo de uno o más protocolos estandarizados para la extracción de veneno. Aunque existe consenso en que la estimulación eléctrica es el método más eficiente (Li *et al.*, 2013; Morse & Benton, 1964), aún no se han desarrollado lineamientos claros ni protocolos específicos para su aplicación, como ocurre en otras áreas de la apicultura donde sí existen manuales técnicos, como el Bee Book de la International Bee Research Association (De Graaf *et al.*, 2020).

Por lo tanto, en el presente trabajo el objetivo fue estudiar algunos de los factores que podrían influir directamente en la cantidad y composición del veneno de abejas, con el propósito de avanzar hacia el diseño de protocolos estandarizados para su extracción en Uruguay.

## MARCO TEÓRICO

### 1. Apicultura

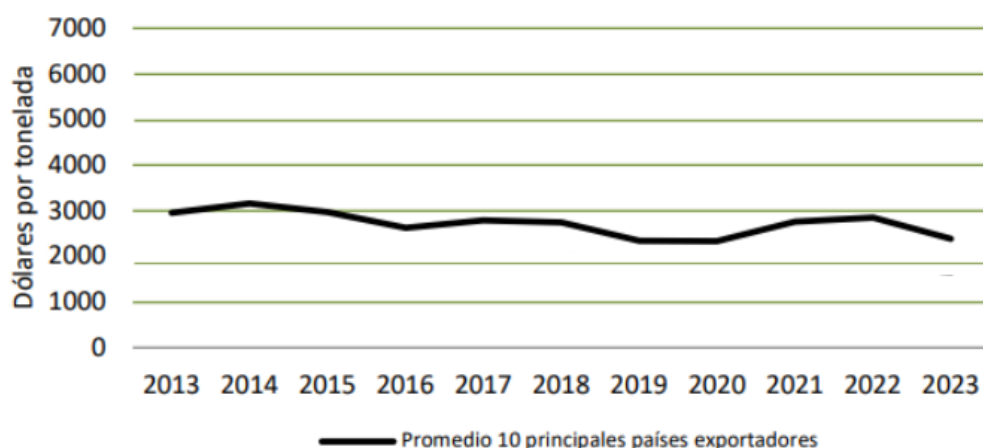
#### 1.1. Importancia de la apicultura

La apicultura es definida por la Organización Mundial de la Sanidad Animal (OMSA) como “la práctica de gestionar colonias de abejas melíferas con objetivos agrícolas” (Rivera-Gomis *et al.*, 2019). Esta práctica es llevada adelante por apicultores y está extendida por casi todo el mundo. La apicultura está estrechamente relacionada con los servicios que las abejas brindan al ecosistema, siendo la polinización un proceso esencial para la reproducción vegetal y por lo tanto, para la producción mundial de alimento (FAO, 2021; Rivera-Gomis *et al.*, 2019). Aunque algunas especies de plantas pueden presentar otros mecanismos de polinización, la mayoría depende de insectos, entre los cuales las abejas se destacan como los polinizadores más eficaces (Wilson-Rich *et al.*, 2014). Estudios indican que la ausencia del servicio de polinización brindado por las abejas podría reducir entre un 5% y un 8% la producción agrícola global (Das *et al.*, 2018; Khalifa *et al.*, 2021). Este impacto no solo afectaría la disponibilidad de alimentos para el consumo humano, sino que también a otros sectores productivos como la ganadería y la floricultura que también dependen de la polinización (Gallai *et al.*, 2009). Gallai *et al.* (2009), llevaron adelante un estudio en 2005 en donde calcularon que el valor económico directo de los servicios de polinización para ese año se estimó en 153.000 millones de euros anuales, cifra que equivale aproximadamente al 9,5% del valor total de la producción alimentaria mundial, para el año estudiado. Si bien es una cifra elevada, vale mencionar que en ese estudio ni siquiera está contemplado el valor asociado a la producción ganadera, por lo que la cifra real podría ser considerablemente mayor. Más allá de su importancia económica, las abejas desempeñan un papel clave en la conservación de los ecosistemas naturales, al posibilitar la reproducción de una gran variedad de especies vegetales. Esto contribuye a mantener el equilibrio ecológico y la biodiversidad de numerosos hábitats (Rivera-Gomis *et al.*, 2019).

#### 1.2. Productos de la colmena

Las abejas, además de su rol fundamental en la polinización, producen diversos productos apícolas. Estos productos son la cera, la jalea real, el veneno, el polen, el propóleo y la miel. Cada uno de ellos cumple una función importante dentro de la colmena, pero a través de la apicultura y especialmente mediante manejos adecuados, es posible que las abejas produzcan más de lo ellas requieren para su consumo y así poder extraerlos sin afectar su normal funcionamiento (FAO, 2021). La miel quizás es el producto apícola de mayor relevancia y tradición en el mercado. Ha sido utilizado desde hace miles de años como endulzante culinario y por sus propiedades terapéuticas (Molan, 2001). Sin embargo, a lo largo del tiempo y especialmente en los últimos años, los mercados han mostrado inestabilidad que se ve reflejado en los bajos y fluctuantes precios en los principales exportadores de miel (figura 1) (MGAP, 2024). Si bien hay diversos factores que provocan estas

variaciones, algunos ejemplos son el avance de la agricultura y los contaminantes utilizados y se transmiten a la miel o también la creciente práctica de adulterar la miel, que ha generado repercusiones significativas en el comercio apícola (O'Neal, 2018). Como consecuencia de la inestabilidad, muchos apicultores han comenzado a considerar con mayor interés la posibilidad de incorporar a su actividad la comercialización de otros productos a su explotación.



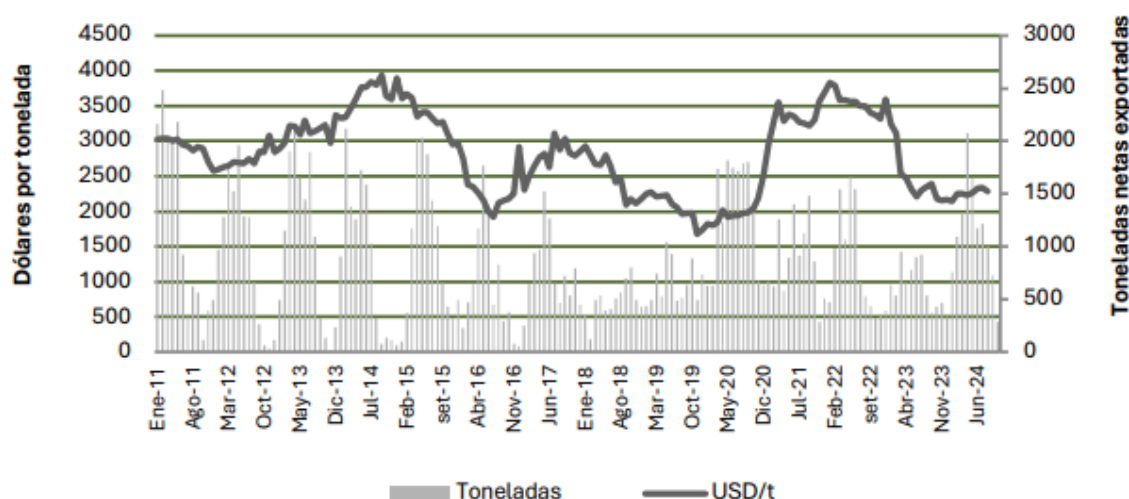
**Figura 1. Precio internacional de exportación de la miel natural.** Fuente: Figura modificada del Sector apícola: situación y perspectiva (MGAP, 2024).

Los productos de la colmena pueden clasificarse en dos grupos: por un lado, aquellos que las abejas sintetizan directamente, como la cera, la jalea real y el veneno y por otro, aquellos que provienen de la recolección y transformación de recursos del ambiente, como la miel, el propóleo y el polen. Si bien todos tienen un origen natural, los productos del segundo grupo dependen en mayor medida del trabajo de las abejas adultas, cuya actividad está fuertemente condicionada por la oferta floral disponible en un momento y lugar determinados. Esta variabilidad influye directamente en su composición (Bobis, 2022; Rivera-Mondragón *et al.*, 2023). En esta misma línea, el entorno floral también puede influir en las características de algunos productos sintetizados por las abejas a través de sus glándulas, como la jalea real y el veneno (FAO, 2021; Montenegro, 2016).

### 1.3. Apicultura en Uruguay (sector apícola en Uruguay)

La apicultura en Uruguay continúa vigente a pesar de momentos de crisis que no le fueron ajenos a lo largo del tiempo. Los datos publicados en el Anuario Estadístico Agropecuario 2024 del MGAP, que toman los datos del Registro Nacional de Propietarios de Colmenas, basado en los datos de la Declaración Jurada de 2023, se contabilizaron 2.824 apicultores registrados y un total de 646.679 colmenas distribuidas en los 19 departamentos del país. No obstante, existe una mayor concentración de colmenas en la zona del litoral del país (MGAP, 2024). La producción apícola en Uruguay se orienta mayoritariamente a la venta de miel a granel. Aunque el país no se encuentra entre los principales exportadores mundiales, alrededor del 90% de la miel producida se destina al mercado externo.

Sin embargo, el precio de exportación tiende a ser fluctuante y, en general, bajo, lo que genera incertidumbre y dificulta la planificación y sostenibilidad del sector (figura 2) (MGAP, 2024). Esto genera la necesidad de buscar otras posibilidades de generación de recursos mediante la explotación intensiva de la apicultura, con un enfoque en el bajo impacto sobre la vida animal.



**Figura 2. Valor promedio de explotación y volumen neto exportado en Uruguay desde enero del 2011 a octubre de 2024.** Fuente: Sector apícola: situación y perspectiva (MGAP, 2024).

## 2. Biología de la abeja

### 2.1. Insectos eusociales y castas

Las abejas melíferas son insectos eusociales, lo que implica que viven en grupos altamente organizados, con superposición de generaciones dentro de una misma colmena, división del trabajo reproductivo y cuidado cooperativo de las crías. Construyen panales de cera compuestos por celdas hexagonales, en los cuales se desarrolla su metamorfosis completa, que incluye las etapas de huevo, larva, pupa y adulto (Wilson-Rich *et al.*, 2014).

Los huevos permanecen en esta fase durante tres días antes de eclosionar y dar lugar a la etapa larval, la cual se extiende por seis días. Posteriormente, se inicia la fase de pupa, cuya duración varía según la casta adulta resultante. En el caso de la abeja reina, esta etapa dura aproximadamente seis días, emergiendo como adulto el día dieciséis. Las obreras, en cambio, presentan una etapa de pupa de once días, alcanzando el estadio adulto el día veintiuno. Por último, los zánganos completan su desarrollo en aproximadamente veinticuatro días, con una fase de pupa que se extiende por catorce días (Wilson-Rich *et al.*, 2014).

La abeja reina es la hembra fértil, generalmente es única en la colmena y en condiciones normales vive en promedio de dos a cuatro años. Su función principal es la reproducción y para ello tiene un aparato reproductor completamente desarrollado. Además, produce feromonas esenciales para la regulación social dentro de la colonia. Las obreras, son los individuos más numerosos de la colonia,

son hembras pero tienen el aparato reproductor atrofiado, no obstante, cumplen otras tareas fundamentales dentro de la colonia. El promedio de vida de esta casta es de seis a ocho semanas durante la temporada apícola, pero pueden vivir entre tres a seis meses fuera de la temporada apícola. Si bien tiene una vida relativamente corta en comparación con la abeja reina, los trabajos que realizan también son fundamentales para mantener la estructura y funcionalidad de la colonia. Estas funciones se organizan mediante una división del trabajo asociada a su desarrollo anatómico y fisiológico. La tercera casta corresponde a los zánganos, los machos de la colonia, donde su función es casi exclusivamente reproductiva. Comúnmente en una colonia, se desarrollan en primavera y verano, para realizar los vuelos de apareamiento y luego son desplazados de la colmena por las obreras y mueren. Aunque se producen cientos de ellos, solo algunos logran fecundar a la reina. Los huevos producidos por la reina pueden estar fecundados o no fecundados. Estos últimos darán origen a los zánganos, mientras que de aquellos huevos fecundados podrán resultar en obreras o reinas, dependiendo de la alimentación. Las futuras reinas reciben exclusivamente jalea real, mientras que las obreras y los zánganos son alimentadas con jalea real solo los primeros tres días y luego con una mezcla de miel y polen (Montenegro, 2016; Wilson-Rich *et al.*, 2014).

## **2.2. Polietismo etario**

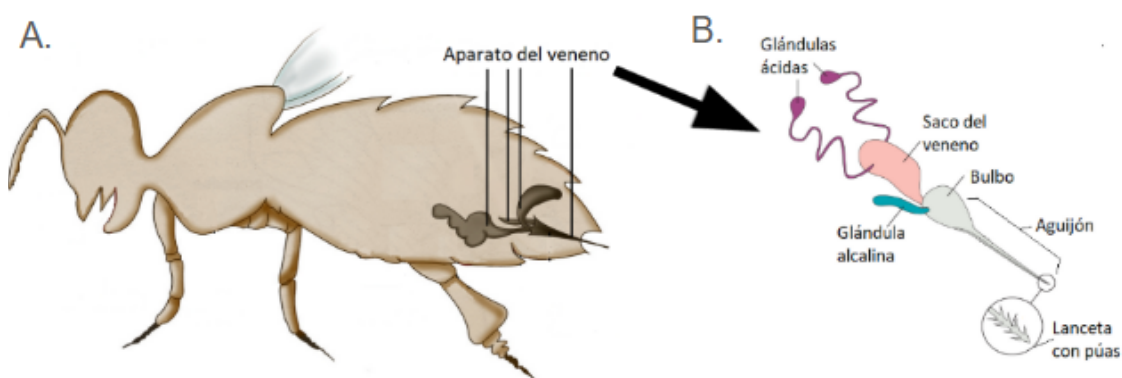
Las abejas reinas pueden vivir entre tres y cuatro años en los países con climas más fríos, aunque en nuestras latitudes no suelen superar los dos años ya que fuera de la temporada de primavera-verano disminuyen su postura.

Las obreras presentan tres etapas funcionales durante su vida, aunque algunos autores describen una subdivisión adicional en la etapa inicial (Nowigridzji, 1984). Tomando la división de trabajo de las abejas obreras en tres etapas, esta casta posee adaptaciones morfológicas que optimizan sus tareas en cada etapa. La primera etapa va desde el día que eclosionan como adultas hasta el día doce. En esta primera etapa las abejas obreras realizan tareas internas como nodrizas, alimentando a las larvas, además cumplen funciones de limpiadoras (al retirar abejas muertas y/o desechos) y como ventiladoras, ya que regulan la temperatura y humedad del panal. La segunda etapa va desde el día trece al veintiuno y la función que cumple es la de construir el panal a través de la producción de cera y también realizan el proceso de alimento, para todas las larvas y para las abejas reina y las obreras. En la tercera etapa, que comienza aproximadamente a partir del día veintidós, las abejas obreras, durante la temporada apícola, comienzan a salir al exterior. Inicialmente actúan como guardianas cerca de la colmena y, posteriormente, como pecoreadoras, recolectando recursos del entorno como néctar, polen, agua y resinas (Le Conte, 2012; Nowogrodzki, 1984; Robinson, 2009). La comunicación es clave en esta organización y para ello las abejas obreras adultas realizan danzas para transmitir información sobre las fuentes de alimento, así como emitir feromonas y señales táctiles mediante sus antenas (Wilson-Rich *et al.*, 2014). Si bien las funciones están definidas por el momento de su desarrollo, las tareas pueden ajustarse según las necesidades de la colonia. Factores como las

interacciones entre obreras, las feromonas mandibulares de la reina y las feromonas de la cría pueden modificar el ritmo del desarrollo comportamental (Le Conte *et al.*, 2000), por lo que la programación normal se puede alterar mediante el retraso, cuando las obreras permanecen más tiempo realizando una tarea, el salteo de etapa, cuando no realiza alguna función ya que no es necesaria o hay otras más urgentes, y el rejuvenecimiento, cuando vuelve a realizar tareas que corresponden a etapas más tempranas. Estos cambios implican un uso no lineal de sus estructuras funcionales, ya sea activando precozmente órganos aún no maduros, o desactivando otros ya desarrollados. Estos mecanismos están mediados por mensajes químicos y afectan la producción de la hormona juvenil, que regula estas adaptaciones (Robinson, 2009; Sullivan *et al.*, 2000).

### 2.3. Aparato del veneno

El aparato del veneno es una adaptación del aparato ovipositor típico de los insectos himenópteros, por lo que solo está presente en las abejas hembras (reinas y obreras). Aunque tanto reinas como obreras poseen este aparato, sus funciones difieren. La reina lo utiliza principalmente para eliminar a sus hermanas reinas recién nacidas, ya que solo puede haber una reina por colmena. Esto ocurre al momento de nacer, dado que en sus primeros días ya tienen el aparato del veneno completamente funcional. En cambio, las obreras utilizan el veneno con fines defensivos de la colonia. Al momento de nacer, no presentan veneno, sino que lo van sintetizando durante las primeras tres semanas de vida, previo a su salida al ambiente como pecoreadoras (Bridges & Owen, 1984; Dotimas & Hider, 1987). Este aparato, en ambos tipos de abejas, se encuentra alojado en la base del noveno segmento abdominal (figura 3.A) y está constituido por tres componentes principales. Este aparato del veneno, presenta una parte glandular, donde se sintetiza el veneno; una parte de reservorio, donde este se almacena; y finaliza en el aguijón por donde se exterioriza e inyecta el veneno cuando la abeja pica (figura 3.B) (De Roodt *et al.*, 2004; Dotimas & Hider, 1987; Valderrama-Hernández, 2003).



**Figura 3. Aparato del veneno de la abeja.**

A. Esquema de la abeja y su aparato del veneno. Fuente: figura modificada de (La abeja, s.f.).

B. Esquema del aparato del veneno de la abeja y sus principales partes que la componen. Fuente: figura modificada de (Hildebrandt *et al.*, 2023).

La parte glandular está formada por la glándula ácida, responsable de la síntesis de los componentes del veneno. Esta glándula presenta una estructura altamente ramificada, dispuesta de forma entrelazada, similar a un ovillo de lana (Dotimas & Hider, 1987). A su vez, se conecta con un bulbo que forma parte del canal del veneno, el cual desemboca en el saco del veneno, donde se acumula el veneno sintetizado. La glándula de Dufour o glándula alcalina, también forma parte del aparato, aunque se consideran glándulas anexas y no participan directamente en la síntesis del veneno (Dotimas & Hider, 1987). El aparato finaliza en el aguijón, compuesto por cuatro partes que convergen en una punta hueca y afilada. Normalmente se mantiene retraído dentro del abdomen, pero se exterioriza y circula el veneno mediante la acción de diversos músculos cuando la abeja pica. En las obreras, el aguijón presenta lancetas con púas que, al penetrar al individuo picado, impiden su fácil remoción, permitiendo que se profundice hasta aproximadamente la mitad de su longitud y facilite así la inoculación de más veneno. Como resultado de este proceso, se desprenden el saco del veneno que al momento de picar sigue bombeando veneno y además se desprenden otras estructuras abdominales asociadas, lo que provoca la muerte de la abeja poco tiempo después de picar (Dotimas & Hider, 1987; Martin *et al.*, 2005). No obstante, en algunas ocasiones, las obreras logran retirar el aguijón sin comprometer su anatomía, evitando así la muerte inmediata (De Roodt *et al.*, 2005).

Dado que en cada colonia existe una única reina y miles de obreras, la producción de veneno con fines productivos se centra principalmente en estas últimas.

### **3. Apitoxina**

#### **3.1. Generalidades del veneno de abejas**

El veneno es una compleja mezcla de diferentes sustancias bioactivas que se encuentran en solución acuosa (Banks & Shipolini, 1986). Diversos estudios han determinado que el contenido de agua del veneno fresco oscila entre el 80 y el 88%, siendo el compuesto mayoritario del producto secretado (Owen *et al.*, 1990).

El veneno de abeja es un líquido incoloro o transparente, con un olor aromático, un pH ácido que varía entre 4,5 y 5,5. Sin embargo, la solución acuosa del veneno seco no mantiene este valor de acidez, lo que sugiere que los compuestos volátiles son los responsables de conferir esa característica ácida.

Una vez que los compuestos volátiles presentes en el veneno se evaporan al contacto con el aire, pasa a denominarse apitoxina (FAO, 2021).

El veneno de abeja expuesto a temperatura ambiente, en menos de 20 minutos pierde entre un 65 a 70% de su peso original, resultando como apitoxina. Esta se presenta como un polvo blanquecino y debe ser almacenada en frasco color ámbar a temperatura inferior a 0°C para conservar su potencia. Es soluble en agua, pero no en alcohol, y precipita en medios alcalinos como el amonio. La apitoxina, puede cambiar su color natural debido a procesos de oxidación de sus proteínas,

adquiriendo una tonalidad amarillenta que, hasta puede llegar a tornarse marrón (FAO, 2021; Devi *et al.*, 2016).

### 3.2. Composición de la apitoxina

La apitoxina es una compleja mezcla de diferentes compuestos nitrogenados, predominantemente péptidos y enzimas (Tabla 1), entre los cuales se destacan la melitina, fosfolipasa A2, apamina, adolapina, hialuronidasa y el péptido degranulador de mastocitos (MCD), entre otros (Demolin & Leite, 2005). Si bien la composición cualitativa del veneno es similar entre las distintas especies del género *Apis*, se observan variaciones importantes en las proporciones relativas de sus componentes. En cuanto a los péptidos, se han identificado los siguientes: melitina, melitina-F, apamina, péptido MCD, secapina, tertiapina, adolapina, inhibidor de proteasa, promina A y B, minimina y cardiopéptido. Además, el veneno contiene enzimas como fosfolipasa A2, hialuronidasa, ácido fosfomonoesterasa (fosfatasa ácida), glucosidasa y lisofosfolipasa; aminos biógenas como histamina, dopamina, noradrenalina y leucotrienos; seis tipos de fosfolípidos; carbohidratos como glucosa y fructosa; y aminoácidos tales como ácido aminobutírico y ácido aminoisobutírico (Rady *et al.*, 2017).

A continuación, se describen los principales componentes del veneno:

a) Melitina: es un péptido de naturaleza alcalina compuesto por 26 residuos de aminoácidos. Representa entre el 40 y el 60% del peso seco del veneno, aunque hay reportes de valores superiores a este (Flanjak, *et al.*, 2021). Presenta una masa molar de 2846,46 g/mol. Adopta una conformación helicoidal cilíndrica, con dos hélices conectadas por una bisagra central, una de carácter polar y la otra apolar. Esta estructura le permite modificar su conformación dependiendo del medio y concentración en la que se encuentre (FAO, 2021; Dotimas & Hider, 1987).

b) Apamina: péptido globular constituido por 18 residuos de aminoácidos, contiene dos enlaces disulfuro que le confieren rigidez estructural. Su proporción en el veneno seco se sitúa entre 2 y 3% (FAO, 2021).

c) Péptido degranulador de mastocitos (MCD): estructuralmente similar a la apamina, está formado por 22 residuos de aminoácidos y también posee dos puentes disulfuro. Este péptido se puede encontrar en concentraciones cercanas al 2% (FAO, 2021).

d) Fosfolipasa A2: enzima con un peso molecular aproximado de 40 kDa, constituida por 166 residuos de aminoácidos, de los cuales 93 son de carácter polar y 73 no polar, lo que le confiere una marcada polaridad. Esta enzima representa el 40% del total de las enzimas presentes en el veneno, pero su proporción específica corresponde al 10 a 12% del veneno seco (Peña *et al.*, 2006).

e) Hialuronidasa: enzima compuesta por 349 residuos de aminoácidos, con un

punto de disulfuro que estabilizan su estructura. Presenta tres sitios potenciales de N-glicosilación, a los que se unen cadenas de carbohidratos. Se encuentra en una proporción del 1 al 2% del veneno seco (Abd El-Wahed *et al.*, 2018).

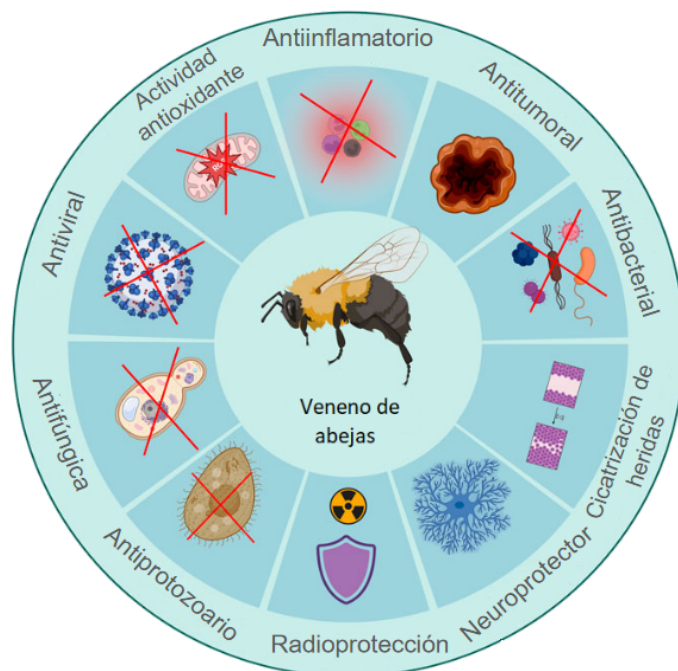
f) Otros componentes: también están presentes sustancias biógenas como histamina, serotonina, dopamina, noradrenalina, bradiquinina y leucotrienos, todas en pequeñas cantidades. Además, se han identificado otros péptidos como secaparina (25 residuos de aminoácidos), que puede representar hasta el 2% del contenido total, y tertiapina (21 residuos de aminoácidos con dos puentes disulfuro), cuya estructura guarda similitud con la apamina y el péptido MCD. Entre las aminas, destacan acetilcolina, histamina, serotonina y catecolaminas, las cuales poseen propiedades inflamatorias y vasoactivas que contribuyen a la reacción local tras la inoculación del veneno y a su vez facilitan su absorción (De Roodt *et al.*, 2005; Dotimas & Hider, 1987; Habermehl, 1981; Peña *et al.*, 2006).

| <b>Grupo químico</b> | <b>Compuesto</b>               | <b>% en el peso seco del veneno</b> |
|----------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| <b>Enzimas</b>       | Fosfolipasa A2                 | 10.0-12.0                           |
|                      | Fosfolipasa B                  | 1.0                                 |
|                      | Hialuronidasa                  | 1.5-2.0                             |
|                      | Fosfomonoestearasa ácida       | 1.0                                 |
|                      | $\alpha$ -Glucosidasa          | 0.6                                 |
|                      | Fosfatasa                      | 1.0                                 |
|                      | Lisofosfolipasa                | 1.0                                 |
| <b>Péptidos</b>      | Melitina                       | 40.0-50.0                           |
|                      | Melitina F                     | 0.01                                |
|                      | Anamina                        | 2.0-3.0                             |
|                      | Péptido MCD                    | 2.0-3.0                             |
|                      | Secapina                       | 0.5-2.0                             |
|                      | Pamina                         | 1.0-3.0                             |
|                      | Minimina                       | 2.0-3.0                             |
|                      | Adolapina                      | 1.0                                 |
|                      | Procamina A. B                 | 1.4                                 |
|                      | Inhibidor de proteasa          | $\leq 0.8$                          |
|                      | Tertiapina                     | 0.1                                 |
|                      | Cardiopéptido                  | $\leq 0.7$                          |
| <b>Fosfolípidos</b>  | Totales                        | 1.0-3.0                             |
| <b>Aminas</b>        | Histamina                      | 1.5                                 |
|                      | Dopamina                       | 0.1-1.0                             |
|                      | Noradrenalina                  | 0.1-0.7                             |
|                      | Neurotransmisores              | 0.1-1.0                             |
| <b>Aminoácidos</b>   | $\alpha$ -aminoácidos          | 0.1-0.7                             |
|                      | $\gamma$ -aminobutírico ácidos | 0.1-1.0                             |
| <b>Carbohidratos</b> | Fructosa                       |                                     |
|                      | Glucosa                        | 2.0-4.0                             |
| <b>Feromonas</b>     | Totales                        | 4.0-8.0                             |

**Tabla 1. Composición promedio de los principales componentes de la apitoxina** (Rady *et al.*, 2017).

### 3.3. Actividad biológica de los componentes

La mayoría de los componentes del veneno de las abejas posee una o varias actividades biológicas de interés con estudios en desarrollo o algunos ya culminados, sin embargo, la mezcla de los mismos en la apitoxina muestra sinergismo en sus actividades, generando así un perfil biológico diferente (Abdu Al-Sami, 2012). Además, también se conoce que la toxicidad de la mezcla obtenida de la abeja es menos tóxica que los componentes individuales mezclados en un orden de 10 veces (Bava *et al.*, 2023). Las actividades biológicas que se reportan del veneno de abejas son variadas y muchas de ellas aún están en etapas de investigación, a modo de ejemplo se pueden ver en la figura 4.



**Figura 4. Actividades biológicas estudiadas en el veneno de abeja.** Fuente: figura adaptada de (Sadek *et al.*, 2024).

Con respecto a las propiedades terapéuticas potenciales de los componentes del veneno de abeja, la melitina es el péptido más estudiado y con mayor número de actividades biológicas reportadas. Se ha descrito su acción frente a biopelículas de patógenos multirresistentes, donde puede potenciar el efecto de antibióticos de manera sinérgica (Mirzaei *et al.*, 2023). También se le atribuye actividad antiinflamatoria, ya que inhibe la producción de aniones superóxido por neutrófilos, proceso asociado a la inflamación crónica (Dotimas & Hider, 1987). Además, se ha reportado su potencial antitumoral en estudios celulares, vinculándola a la inducción de apoptosis en células cancerígenas (Carpena *et al.*, 2020).

Si nos enfocamos en otro péptido como es la apamina esta es una neurotoxina de

bajo peso molecular que bloquea canales de potasio dependientes de calcio en tejidos nerviosos, mostrando potencial para el tratamiento de trastornos neurológicos (Gu *et al.*, 2020). Otros péptidos como la secapina y la tertiapina parecen carecer de toxicidad significativa en mamíferos, lo que sugiere que su función primaria podría ser defensiva frente a artrópodos.

Con respecto a las enzimas estudiadas, la fosfolipasa A2 actúa sobre los fosfolípidos de membrana, contribuyendo a la acción lítica de la melitina y potenciando sus efectos. Junto a la histamina, se la asocia a la respuesta inflamatoria (Dotimas & Hider, 1987; Damianoglou *et al.*, 2010; FAO, 2021). En lo que refiere a la enzima hialuronidasa, al degradar el ácido hialurónico de la matriz extracelular, facilita la difusión de otros componentes del veneno en los tejidos, aumentando la permeabilidad celular.

Finalmente, las aminas biógenas como histamina y serotonina, aunque presentes en bajas concentraciones, contribuyen a la vasodilatación y aumento de permeabilidad capilar, favoreciendo la difusión del resto de componentes (Dotimas & Hider, 1987).

En lo que respecta a los mecanismos moleculares que provocan hay descritos varios. Un ejemplo es la lisis celular, la cual la melitina lo logra disolviendo membranas celulares, y en combinación con la fosfolipasa A2 genera poros que conducen a la ruptura de la célula. Otro tipo es la modulación de la inflamación, para ello, la melitina inhibe la producción de radicales superóxido, mientras que la histamina y la fosfolipasa A2 desencadenan procesos inflamatorios. En lo que respecta a la actividad de neurotoxicidad selectiva, lo provoca la apamina que bloquea los canales iónicos, afectando la señalización neuronal. La facilitación de difusión, lo provoca la hialuronidasa que degrada la matriz extracelular, permitiendo la entrada de otros componentes.

Los efectos adversos y toxicidad que provoca el veneno de abejas es tal, pese a su potencial terapéutico, ya que varios componentes presentan efectos tóxicos importantes. La melitina es responsable del dolor asociado a la picadura de abeja, al activar nociceptores primarios (Chen *et al.*, 2015). También puede afectar células musculares, hepáticas y eritrocitos. La fosfolipasa A2 y la hialuronidasa son enzimas inmunogénicas, capaces de inducir reacciones alérgicas e incluso hipersensibilidad severa. El péptido degranulador de mastocitos (MDP) estimula la liberación de histamina, lo que puede potenciar reacciones alérgicas. En conjunto, si bien el veneno presenta efectos terapéuticos potenciales, también implica riesgos de toxicidad sistémica y reacciones adversas, que deben ser cuidadosamente considerados en su aplicación biomédica.

### **3.4. Usos terapéuticos y cosméticos de la apitoxina**

El interés por la apitoxina se debe a su amplio espectro de efectos biológicos que pueden ser empleados con beneficios para diferentes usos terapéuticos y cosméticos. Sin embargo, es importante aclarar que la mayoría de las investigaciones se encuentran en fase *in vitro* o *in vivo* en modelos animales, y los estudios clínicos en humanos son aún preliminares y restringidos.

En relación a las enfermedades inflamatorias y autoinmunes, se ha estudiado la apitoxina en patologías inflamatorias como la artritis reumatoide. En modelos animales, la melitina mostró efecto analgésico y antiinflamatorio (Yang *et al.*, 2024). Se ha explorado también su uso combinado con fármacos convencionales (por ejemplo dexametasona) con resultados sinérgicos. Ensayos clínicos preliminares en humanos aplicando apitoxina mediante acupuntura reportaron mejoría del dolor, aunque los resultados deben tomarse con cautela debido a las limitaciones metodológicas y el bajo número de pacientes (Son *et al.*, 2007).

Por otro lado, en la dermatología y cosmética, en modelos animales, preparados tópicos de apitoxina y melitina mostraron efectos beneficiosos en dermatitis atópica, atribuidos a propiedades inmunomoduladoras (An *et al.*, 2018). También se reportó reducción de lesiones cutáneas en ratones. En dermatología estética, productos cosméticos que contienen pequeñas dosis de veneno de abeja han mostrado reducir arrugas faciales y favorecer la cicatrización de heridas, gracias a sus efectos antiinflamatorios y antimicrobianos (Abd El-Wahed *et al.*, 2018; Han *et al.*, 2015; Kim *et al.*, 2015). No obstante, se requiere más evidencia clínica para confirmar su seguridad y eficacia en humanos.

En lo que respecta a la neuroprotección y enfermedades neurodegenerativas, en estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que la apitoxina tiene efectos neuroprotectores, principalmente mediante la modulación de la actividad microglial (Cho *et al.*, 2012). En modelos animales de Parkinson idiopático, se reportó enlentecimiento de la progresión de la enfermedad al aplicar veneno mediante acupuntura. Algunos ensayos clínicos iniciales mostraron resultados prometedores, pero aún limitados. También se están investigando aplicaciones potenciales en esclerosis múltiple y esclerosis lateral amiotrófica (Silva *et al.*, 2015).

Por otra parte, se mostró la melitina con actividad antitumoral en estudios celulares, donde induce apoptosis, necrosis y detención del ciclo celular, además de inhibir procesos asociados a angiogénesis y metástasis (Kim, 2013; Rady *et al.*, 2017). Sin embargo, la alta toxicidad sistémica limita su aplicación directa, por lo que se están evaluando sistemas de liberación controlada como liposomas o nanopartículas.

En modelos *in vitro*, también se describieron efectos antiprotazoarios frente a organismos como *Leishmania*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* y *Toxoplasma*, mediante alteración de membranas y activación de vías de muerte celular programada (Memariani & Memariani, 2021).

A pesar de todos los potenciales beneficios que muestra la apitoxina y algunos de sus componentes y que en muchos de ellos se reportan resultados prometedores, la apitoxina enfrenta limitaciones que impiden su aplicación clínica amplia, como la alta toxicidad sistémica, la baja especificidad de acción sobre tejidos diana. La necesidad de sistemas de administración controlada (nanopartículas, liposomas, conjugados), la escasez de estudios clínicos robustos y controlados en humanos.

Por ello, la apitoxina debe considerarse aún un recurso en investigación biomédica experimental, con potencial pero con importantes desafíos por resolver antes de su uso consolidado.

## **4. Producción de apitoxina**

### **4.1. Métodos de extracción de apitoxina**

En condiciones normales, generalmente las abejas mueren tras inocular su veneno debido a la pérdida del aguijón y otras estructuras abdominales asociadas. Por esta razón, para la producción de veneno se han desarrollado diversos métodos de extracción cuyo objetivo es maximizar tanto la cantidad como la calidad del veneno recolectado, minimizando al mismo tiempo la mortalidad de las abejas. Las técnicas más comúnmente utilizadas incluyen la inducción por narcosis, la extracción manual, pero la extracción mediante dispositivos eléctricos es el método más utilizado a nivel comercial (De Graaf *et al.*, 2020). El método de estimulación eléctrica, se basa en la aplicación de una corriente eléctrica de bajo voltaje (20-30 V) a través de una rejilla metálica dispuesta sobre uno o varios vidrios, que se pueden colocar en diferentes partes de la colmena. Cuando la abeja entra en contacto con la varilla de metal y cierra el circuito, recibe una descarga leve que induce la picadura sobre el vidrio, liberando el veneno sin desprenderse el aguijón y evitando la muerte del insecto (Sadek *et al.*, 2024).

Para llevar adelante este procedimiento se requiere de un equipo generador de corriente, cables que lo conectan a una bandeja que contiene la rejilla con varillas metálicas y el o los vidrios colectores que se colocan adjuntos. Este dispositivo puede colocarse en el interior de la colmena (reemplazando transitoriamente los cuadros del alza de miel, entre la cría o en el techo de la colmena) o en su entrada próxima a la piquera (Flanjak *et al.*, 2021; Kekeçoğlu *et al.*, 2022). El veneno depositado sobre el vidrio se seca a temperatura y humedad ambiente entre 12 a 24 horas. Para obtener la apitoxina, se raspan los vidrios con una espátula metálica obteniendo un polvo o pequeñas hebras, que luego se almacenan en frascos color ámbar con cierre hermético y se conserva en un lugar fresco y seco a temperaturas entre -4°C y 8°C. La cantidad de apitoxina cosechada a través de este método de extracción es variable según los trabajos reportados, pero en general están por debajo de los 130 mg de apitoxina por colmena (Argena *et al.*, 2021; Flanjak *et al.*, 2024; Villalobos & Jaime, 2019). La frecuencia de extracción recomendada es de cada 15 a 21 días; sin embargo, estudios experimentales que evaluaron intervalos más cortos entre extracciones observaron una disminución de apitoxina por cosecha (FAO, 2021; Kekeçoğlu *et al.*, 2022).

### **4.2. Métodos de análisis de la apitoxina**

La apitoxina se utiliza en la industria farmacéutica para diversas formulaciones médicas o cosméticas por lo que es fundamental conocer su composición. Al ser una sustancia de origen natural, su composición puede variar según diversos factores. La melitina es el principal componente y se considera marcador de calidad debido a su alto porcentaje dentro de la apitoxina. Además, este es el componente más estudiado hasta el momento y para el cual se reporta la mayor evidencia de efectos biológicos en medicina y cosmética. Pero se podrían incluir otros componentes importantes para el control de calidad, como la apamina, el péptido

degranulador de mastocitos (MCD) y la fosfolipasa A2.

La evaluación de la calidad de la apitoxina requiere considerar toda la cadena productiva, incluyendo factores biológicos, ambientales y antrópicos que influyen en su contenido, por lo que el seguimiento de protocolos bien documentados es fundamental para su trazabilidad. Para su comercialización en la industria farmacéutica, es indispensable realizar análisis cuali-cuantitativos que permitan identificar y cuantificar sus principales componentes.

Entre las técnicas analíticas desarrolladas, destaca la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) por su rapidez, precisión y eficiencia en la separación de compuestos. Un estudio comparativo con electroforesis capilar demostró que ambas técnicas son efectivas, aunque el HPLC presenta ventajas en tiempo, eficiencia y costos, siendo actualmente el método más adecuado para el control de calidad de la apitoxina (Ferreira Junior *et al.*, 2010; Pacfikovfi *et al.*, 1995; Rodriguez-Batista *et al.*, 2024).

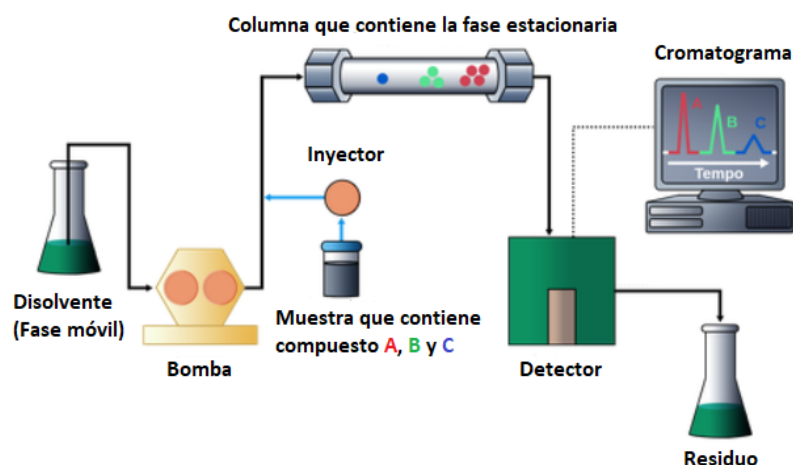
La cromatografía líquida de alta resolución es una técnica derivada de la cromatografía tradicional, que permite analizar mezclas complejas con alta sensibilidad y precisión. Su principio se basa en la interacción diferencial que tienen los analitos de la muestra con las fases móvil y estacionaria dentro de una columna cromatográfica. La diferencia de afinidades produce la separación de los componentes de la muestra.

En un sistema HPLC (figura 5), la fase móvil está compuesta por uno o varios disolventes que se mezclan y se desplazan a través de una bomba a alta presión, a través de la columna que contiene la fase estacionaria. La muestra a analizar se introduce junto con la fase móvil y avanza por la columna impulsada por la bomba de presión. Los distintos componentes de la muestra interactúan con la fase estacionaria con diferentes grados de afinidad. Aquellos que presentan mayor afinidad se desplazan más lento, mientras que los que tienen menor afinidad lo hacen más rápidamente, lo que genera la separación de los compuestos. El tiempo de retención se define como el intervalo que transcurre desde la inyección de la muestra hasta que el analito es detectado por el sistema. Este valor es característico para cada compuesto en condiciones cromatográficas específicas y permite su identificación.

La separación depende de varios factores, como la naturaleza de las fases móvil y estacionaria, el flujo del solvente y las características químicas de los analitos de la muestra. Es importante destacar que la separación no ocurre en una sola fase, sino como resultado del equilibrio dinámico entre las moléculas en movimiento y su interacción con ambas fases.

El HPLC cuenta con un detector, que registra los compuestos a medida que eluyen de la columna. Los más comunes son los detectores UV/visible, que miden la absorbancia de los analitos. También pueden emplearse detectores de fluorescencia o acoplados a espectrometría de masas (MS) para mejorar la sensibilidad y la especificidad del análisis. El HPLC también cuenta con un registrador y sistema de datos, que sirve para recopilar y procesar la señal generada por el detector. Los resultados se visualizan en forma de cromatogramas, que representan la intensidad

de la señal en función del tiempo y permiten interpretar tanto la presencia (análisis cualitativo) como la cantidad (análisis cuantitativo) de los compuestos detectados (Ahmed, 2024).



**Figura 5. Componentes de un HPLC.** Fuente: figura adaptada de Labster. (s.f.).

Para el análisis cuali-cuantitativo de la apitoxina, Rybak-Chmielewska y Szczęśna (2004) reportaron que la columna C18 es de elección porque logra la mejor separación de sus principales componentes como son la melitina, apamina y fosfolipasa A2. Es una fase estacionaria que se caracteriza por presentar alta eficiencia y versatilidad y se usa para análisis de compuestos orgánicos, fármacos y sustancias bioactivas. Este tipo de columna cromatográfica está compuesta por partículas de sílice modificadas con cadenas de octadecilsilano (C18). Se utiliza principalmente en cromatografía de fase reversa, en la cual la fase móvil es polar y se busca separar compuestos de naturaleza no polar (uHPLCs, s.f.).

## 5. Factores de variación de la apitoxina y sus componentes

El veneno de abeja, se encuentra entre los productos sintetizados por las abejas. Aunque todas las abejas melíferas hembras tienen la capacidad de producirlo, su composición no es constante. Al igual que ocurre con muchos otros productos de origen natural, la composición del veneno está influido por múltiples factores. Estos factores de variación pueden agruparse en cuatro grandes grupos: factores biológicos propios de las abejas, condiciones ambientales, protocolos de extracción de veneno de abeja y manejo postcosecha (An *et al.*, 2011; Araneda *et al.*, 2011; Ferreira Junior *et al.*, 2010; Haggag *et al.*, 2015).

Dentro de los factores biológicos, uno de los aspectos a considerar es el ecotipo de las abejas, el cual puede influir en la cantidad y composición del veneno cosechado. Hussein *et al.* (2019) evaluaron la cantidad de apitoxina cosechada en catorce extracciones cada veintidós días a través de trampas de electroestimulación en colonia de abejas *Apis mellifera carnica* y *ligustica*, pero no encontraron diferencias significativas entre estos ecotipos en las condiciones en que llevaron adelante su ensayo. La edad de las abejas es otro factor biológico que ha sido ampliamente

estudiado en relación con la variación en la composición de la apitoxina. Bachmayer *et al.* (1972), mediante la extracción directa del saco de veneno, observaron que la síntesis de melitina alcanzó un máximo entre los días 8 y 11 de vida de las abejas obreras, seguido de una disminución marcada. Este estudio se realizó sobre un grupo de 30 abejas y abarcó hasta los veinticinco días de vida de las abejas. Por su parte, Owen *et al.* (1990) analizaron la concentración de fosfolipasa A2 y reportaron que esta enzima aumenta durante los primeros 10 días de vida, manteniéndose estable posteriormente. Cabe señalar que este estudio se llevó a cabo únicamente durante la temporada de verano y también utilizó la disección del saco de veneno de abejas obreras. Más recientemente, Baracchi & Turillazzi (2010) evaluaron la composición del veneno en función del rol de las abejas dentro de la colonia, comparando nodrizas, guardianas y pecoreadoras. Encontraron que las abejas nodrizas presentaban un mayor porcentaje de apamina y un menor porcentaje de melitina en comparación con las abejas más viejas (guardianas y pecoreadoras). Este ensayo fue realizado con 10 abejas por grupo, a las cuales se les extrajo una gota de veneno directamente del aguijón utilizando un capilar, y luego se analizó la muestra mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF). Estos resultados difieren de lo reportado por Bachmayer *et al.* (1972) en relación con la melitina, lo que podría atribuirse a diferencias metodológicas, estacionales o ecológicas entre los estudios. Dado que la melitina es uno de los péptidos con mayor cantidad de reportes sobre su actividad biológica y creciente interés en la industria farmacéutica, es de nuestro interés profundizar en el estudio de su variación según la edad de las abejas, utilizando para ello veneno recolectado mediante electroestimulación, una técnica que permite obtener muestras de mayor volumen sin necesidad de sacrificar a las abejas.

Kazlauskas *et al.* (2016) señalaron que el comportamiento de enfermedad, típicamente descrito en mamíferos, también puede manifestarse en insectos como las abejas mediante respuestas análogas, aunque sus sistemas neuroendocrinos difieren considerablemente. En estos casos, se han descrito cambios de comportamiento asociados a infecciones bacterianas, virales o parasitarias, como la reducción de la actividad, del forrajeo y del consumo, vinculada a una pérdida de apetito (Asarian & Langhans, 2010; Kazlauskas *et al.*, 2016). Esta disminución del consumo podría afectar el metabolismo energético de las abejas y, de manera indirecta, impactar en la síntesis de veneno (Arnold *et al.*, 2013). Como ocurre en otros sistemas de producción animal y particularmente en las abejas melíferas, un deficiente estado de salud y nutrición reduce la eficiencia en la síntesis de compuestos biológicamente activos, y entonces el veneno no constituye una excepción.

En cuanto a los factores ambientales, estos comprenden todos los elementos del entorno que afectan directa o indirectamente a las abejas. Entre los más relevantes se encuentran la disponibilidad y diversidad de recursos florales. La deficiencia de alimentos provocada por sequías, inundaciones o baja floración afecta la calidad nutricional del alimento disponible, lo cual impacta negativamente en la producción de veneno, al igual que ocurre con todos los productos de la colmena. Los

productos de secreción de la abeja son ricos en proteínas y péptidos, por lo que requieren un esfuerzo metabólico considerable que se podría ver reducido en condiciones de déficit alimentario (Bobis, 2022; Rivera-Mondragón *et al.*, 2023). Las condiciones climáticas generadas por la estacionalidad también condicionan indirectamente la producción de veneno, siendo uno de los efectos la disponibilidad de alimentos como se mencionó anteriormente (Neov *et al.*, 2019; Pirk *et al.*, 2016). Frente a las diferentes condiciones climáticas posibles, se han observado variedad de adaptaciones biológicas. Asimismo, la presencia de contaminantes ambientales, como pesticidas o metales pesados, puede afectar tanto la salud de las abejas como la calidad del veneno (Costa, *et al.*, 2025; Maggi *et al.*, 2016; Martin-Culma & Arenas-Suárez, 2018).

El tercer grupo de factores corresponde a los protocolos de extracción empleados, que abarca las decisiones del apicultor, que intencionadamente o no, afectan el rendimiento y la composición de la apitoxina. Entre estas decisiones se incluyen la frecuencia de extracción del veneno (FAO, 2021; Kekeçoğlu *et al.*, 2022), el tipo y ubicación de la trampa de recolección (externa o de piquera, interna colocada entre los cuadros del alza de miel, entre la cría o en el techo de la colmena) (De Graaf *et al.*, 2020; Flanjak, *et al.*, 2021). El uso de protección de los vidrios colectores, es otra técnica utilizada en algunos casos de extracción de veneno, antiguamente se utilizaban una lámina de nylon, tafetán o de polietileno (Benton & Morse, 1966; Gunnison, 1966), pero actualmente en el caso de cubrir los vidrios se utiliza el látex. La finalidad de esta práctica según los reportes, es disminuir la contaminación del veneno con partes de las abejas como patas u otras sustancias que libera la abeja cuando pica actuando como barrera física.

En relación a la estimulación eléctrica, existen múltiples parámetros modificables, como el voltaje, o la duración de impulsos eléctricos y la duración de los descansos entre impulsos, el tiempo en que se coloca la trampa en la colmena para la cosecha de veneno. Pero ocurre que para esto a nivel general no hay consenso generalizado sobre su uso. De hecho, el BeeBook suele estandarizar todos los métodos de recolección y de colecta para los productos apícolas, pero en el caso del veneno en la sección destinada a este tema, sólo cita a un autor como es Bogdanov (2017) y este, señala los componentes que se debe tener en cuenta para la recolección de veneno, pero se presentan algunos parámetros con rangos amplios, sin dar ningún tipo de protocolo estandarizado (De Graaf *et al.*, 2020). En este sentido hay diversos protocolos reportados, por ejemplo, el protocolo de electroestimulación que reporta en su investigación Sobral *et al.* (2016) utiliza una corriente de 1,8V con intervalos de 50 segundos de descarga y 10 segundos de descanso durante 40 minutos. En cambio, Viana *et al.* (2021) emplearon impulsos eléctricos de 45V, con pulsos cada 1 segundo a 14mA, aunque no se especifica la duración total del procedimiento. Estas diferencias metodológicas reflejan una falta de estandarización, lo que dificulta la comparación entre estudios y genera incertidumbre sobre si las variaciones observadas se deben al factor en cuestión o a una combinación de múltiples condiciones no controladas.

Por último, los factores postcosecha también tienen un impacto en la composición

del veneno. Las decisiones sobre almacenamiento, secado y procesamiento pueden afectar la estabilidad de los compuestos bioactivos, como la melitina y la apamina. Factores como la temperatura de secado, el tiempo de exposición al aire y las condiciones de conservación (refrigeración, congelación) pueden alterar significativamente su composición final (Devi *et al.*, 2016).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El veneno de abeja es uno de los productos apícolas sintetizados por las abejas hembras, y en este trabajo se aborda su producción en las abejas obreras. Estas nacen con el saco de veneno vacío y lo van llenando progresivamente hasta aproximadamente la tercera semana de vida adulta, cuando se convierten en abejas pecoreadoras y comienzan a recolectar recursos. En esta etapa, el veneno se utiliza principalmente como mecanismo de defensa colectiva de la colonia, ya que, en condiciones normales, cuando la abeja pica, muere (Bridges & Owen, 1984; Dotimas & Hider, 1987). El veneno de abeja es una mezcla compleja de sustancias químicas en solución (Banks & Shipolini, 1986) y, cuando los compuestos volátiles se evaporan, el residuo seco se denomina apitoxina (FAO, 2021).

Por ser un producto natural, la apitoxina presenta una importante variabilidad en su composición, influida por múltiples factores a lo largo de la cadena productiva, desde aspectos biológicos de la abeja hasta condiciones ambientales y técnicas de extracción. Para que su producción sea rentable con fines comerciales, es necesario obtener una cantidad suficiente y con calidad adecuada para su uso, especialmente en las industrias farmacéutica y cosmética (An *et al.*, 2018; Silva *et al.*, 2015; Son *et al.*, 2007).

Resulta entonces fundamental conocer la composición del veneno cosechado, prestando especial atención a componentes como la melitina, la apamina y la fosfolipasa A<sub>2</sub>, responsables de gran parte de su actividad biológica. Sin embargo, actualmente no existen protocolos estandarizados que aseguren la obtención de apitoxina con una composición estable, particularmente en lo que respecta a estos componentes principales. La bibliografía refleja una diversidad de metodologías de extracción y de factores evaluados, lo que genera resultados inconsistentes y limita la posibilidad de comparación entre investigaciones (De Graaf *et al.*, 2020; FAO, 2021; Ferreira Junior *et al.*, 2010).

En el caso de Uruguay, la apicultura constituye un rubro en el sector agroexportador, aunque depende en gran medida de la venta de miel a granel, con precios internacionales inestables. En este contexto, la apitoxina representa un producto de alto valor agregado que podría diversificar la oferta nacional y responder a la demanda de los mercados farmacéuticos y cosméticos. No obstante, no existen estudios locales que analicen las condiciones productivas específicas del país. Por ello, surge la siguiente pregunta de investigación:

¿Qué factores biológicos (edad de las abejas) y técnicos (método y condiciones de extracción) afectan de manera significativa la cantidad y composición de la apitoxina obtenida en condiciones de producción apícola en Uruguay?

Responder a esta pregunta permitirá identificar lineamientos que orienten la estandarización de los procesos de extracción y contribuyan a optimizar la producción de apitoxina, adaptándola a las exigencias comerciales y fortaleciendo el desarrollo del sector apícola nacional.

## **HIPÓTESIS**

El estudio de diferentes factores que afectan la producción de apitoxina (en cantidad de apitoxina y porcentaje de melitina) permite identificar condiciones óptimas en la extracción de veneno para el desarrollo de lineamientos que contribuyan a protocolos estandarizados en Uruguay. Por ello en el presente trabajo se estudiaron 5 factores y se definieron para cada uno de ellos una hipótesis particular:

- 1) La protección con látex de los vidrios colectores va a aumentar la cantidad de apitoxina cosechada y el porcentaje de melitina de la misma.
- 2) La cosecha nocturna o diurna va a determinar diferencias en la cantidad y en la composición de la apitoxina colectada.
- 3) El lugar dónde se coloca la trampa va a determinar diferencias en la cantidad y en la composición de la apitoxina colectada.
- 4) La apitoxina de abejas jóvenes o maduras van a tener diferentes porcentajes de melitina.
- 5) El área efectiva de la trampa de techo no afecta la cantidad de la apitoxina cosechada.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general:**

Determinar la variación en el porcentaje de melitina y cantidad de apitoxina extraída en Uruguay, debido a la influencia de factores referidos a los métodos de extracción y factores etarios.

### **Objetivos específicos:**

- 1) Determinar el porcentaje de melitina y la cantidad de apitoxina de acuerdo a la protección o no de los vidrios colectores de apitoxina.
- 2) Determinar el porcentaje de melitina y la cantidad de apitoxina cosechada de acuerdo a si la extracción es diurna o nocturna.
- 3) Determinar el porcentaje de melitina y la cantidad de apitoxina obtenida según diferentes trampas para su extracción.
- 4) Determinar el porcentaje de melitina en la apitoxina de acuerdo a la maduración de las abejas.
- 5) Determinar la cantidad de apitoxina obtenida de acuerdo al área de trampa de techo.

## **ESTRATEGIAS DE LA INVESTIGACIÓN**

El presente trabajo se llevó a cabo entre los años 2024 y 2025. Se trató de un estudio con modalidad ensayo experimental, que buscó contribuir a la producción de apitoxina en Uruguay. Se estudió la cantidad de apitoxina y el porcentaje de melitina que esta presentaba, debido a la influencia de algunos factores en los métodos de extracción y la edad de las abejas. Para este estudio, se diseñaron, adaptaron y ejecutaron una serie de ensayos a campo, utilizando colmenas de dos apiarios, uno comercial ubicado en el Dpto. de Rivera (31°15'51.4"S 55°43'10.0"W) y uno experimental ubicado en el Campo Experimental N°2 de Facultad de Veterinaria, en el Dpto. de San José (34°40'01.0"S 56°31'42.6"W) en Uruguay. Las colmenas seleccionadas para los ensayos en todos los casos estaban con los manejos sanitarios al día, sin signos clínicos de enfermedades y con un estado de desarrollo de un mínimo de 35.000 a 40.000 abejas adultas. Para la obtención de la apitoxina se utilizaron equipos de estimulación eléctrica conectados a diferentes trampas de acuerdo al ensayo (piquera, internas y de techo). Las colmenas que fueron cosechadas y los vidrios utilizados en cada colmena fueron identificados para su posterior procesamiento en el laboratorio. Los vidrios una vez que llegaban al laboratorio eran secados durante 24 horas previo a su raspado. Luego del raspado la apitoxina de cada colmena fue pesada y de acuerdo al ensayo, preparadas para su análisis mediante HPLC, con el fin de determinar la concentración de melitina.

## METODOLOGÍA DE TRABAJO

A continuación, se describen en primer lugar las cinco etapas generales que fueron comunes a los ensayos realizados. Luego, se presentan las particularidades metodológicas correspondientes a cada uno de los cinco ensayos desarrollados en este trabajo.

### **Etapla I. Selección de colmenas e identificación de las mismas**

Las colmenas utilizadas en 4 de los 5 ensayos fueron del Campo Experimental N°2 de Facultad de Veterinaria ubicadas en el departamento de San José de Uruguay (34°40'01.0"S 56°31'42.6"W), donde hay a lo largo del año entre 140 y 160 colmenas. Las mismas están numeradas y son revisadas periódicamente, además previo a cada ensayo se evaluaron nuevamente. Mediante inspección visual y se valoraron las reservas, el estado de desarrollo de la cría y de abejas adultas (poblaciones entre 35.000 y 40.000 abejas adultas) de acuerdo a Delaplane *et al.* (2013) y se tomaron muestras para monitorear el porcentaje de varroa forética (Dietemann *et al.*, 2013).

En el ensayo que se utilizaron colmenas comerciales en el departamento de Rivera de Uruguay (31°15'51.4"S 55°43'10.0"W), el apiario contaba con 120 colmenas que previamente fueron identificadas por un profesional que asesora a apicultores en la zona para que cumplieran con los requisitos de controles sanitarios, uniformidad genética (reinas hermanas) y similar estado de desarrollo (poblaciones entre 35.000 y 40.000 abejas adultas). Además previo al ensayo las colmenas fueron revisadas e identificadas (grupo y número).

### **Etapla II. Extracción de apitoxina**

Se utilizaron dos equipos de emisión de corriente eléctrica marca EXAP, ambos inalámbricos, con batería recargable y una autonomía de 10 horas (Figura 6.A).

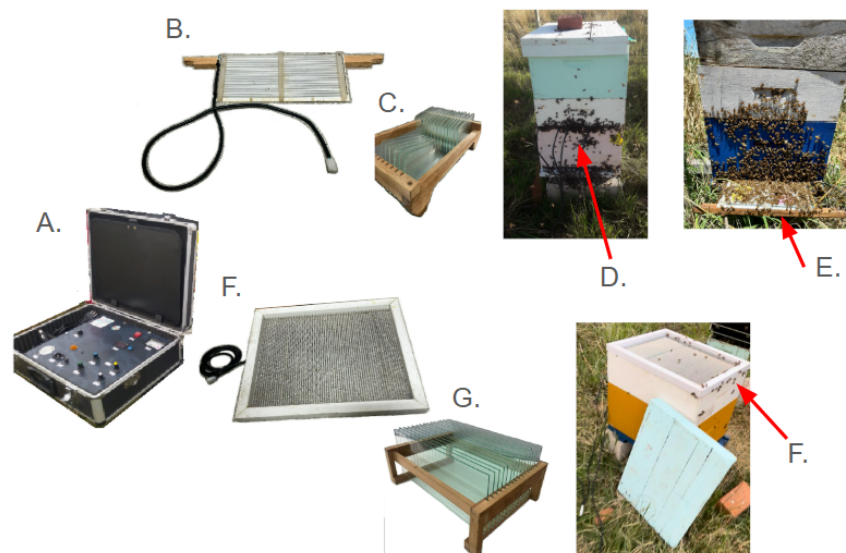
El protocolo de electroestimulación fue el mismo en todos los ensayos: se aplicaron pulsos eléctricos de 50 voltios de tensión máxima durante 5 segundos, seguidos de 10 segundos de descanso, en un período total de 30 minutos por colmena.

De acuerdo con el fabricante del equipo, el estímulo consiste en la aplicación de un pico de voltaje de aproximadamente 50 V a una frecuencia de 300 Hz, con una caída exponencial de la tensión a lo largo de cada ciclo. La corriente máxima alcanzada en el punto de mayor voltaje es de 3 mA, disminuyendo hasta 1 mA hacia el 30 % del ciclo, lo que permite generar un impulso suficiente para inducir la liberación de veneno sin provocar daños ni mortalidad en las abejas. Los equipos se conectaron mediante cables a trampas de extracción de veneno, compuestas por una parrilla de varillas metálicas con una separación de 0,5 cm entre ellas.

Se emplearon dos tipos de trampas, que variaron según el ensayo.

El primer modelo de trampa tenía un diseño rectangular, compuesto por un cabezal de madera de 48 cm similar al de los cuadros de colmena tipo Langstroth, seguido por una placa de acrílico de 30 cm de largo por 13 cm de ancho. A una distancia de

1 cm por encima de esta placa, y de forma paralela, se ubicaba la parrilla metálica, dividida en dos secciones cuadradas de 12,5 cm de lado cada una (figura 6.B). En el extremo opuesto al cabezal de madera se añadió un tope de plástico para sostener los vidrios, colocados por debajo de la parrilla, sobre la placa de acrílico. Estos vidrios eran cuadrados de 12 cm de lado y 0,5 cm de espesor (figura 6.C). Este tipo de trampa, en los ensayos que lo requerían, se clasificó en trampas internas o externas, según su ubicación en la colmena. Las trampas internas se colocaron en sustitución de un cuadro dentro de la cámara de cría (figura 6.D), mientras que las externas se ubicaron a continuación de la piquera, fuera de la colmena (figura 6.E). Las trampas de techo eran de forma rectangular, con dimensiones de 48 cm de largo por 39 cm de ancho. La parrilla metálica interna medía 45 cm de largo por 36 cm de ancho y estaba rodeada por un marco de acrílico de 3 cm de ancho, que facilitaba su manipulación (figura 6.F). Sobre la parrilla metálica se colocaban tres vidrios de 36 cm de largo, 15 cm de ancho y 0,5 cm de espesor (figura 6.G). Estas trampas se instalaron de manera transitoria durante el tiempo de extracción, en reemplazo del techo original de la colmena (figura 6.F).



**Figura 6. Trampas de electroestimulación y sus componentes** (Fuente propia del autor).

- A. Consola de emisión de electricidad inalámbrica.
- B. Trampa de extracción externa o interna.
- C. Vidrios colectores correspondientes a la trampa externa o interna.
- D. Trampa interna ubicada en el alza melaria de la colmena.
- E. Trampa externa colocada en la piquera de la colmena.
- F. Trampa de techo.
- G. Vidrios colectores correspondientes a la trampa de techo.
- H. Trampa de techo instalada sobre una colmena.

Cada vidrio utilizado fue identificado previamente con el tratamiento correspondiente y el número de colmena.

Una vez finalizada la extracción, los vidrios fueron transportados al laboratorio y secados durante 24 horas a temperatura y humedad ambiente.

### **Etapas III. Cosecha y almacenamiento de la apitoxina**

Transcurridas las 24 horas de los vidrios en el laboratorio, se procedió al raspado de la apitoxina depositada sobre los mismos. El raspado de la apitoxina se realizó en una campana de extracción y además se utilizaron medidas de bioseguridad adecuadas (gafas, guantes y mascarilla N95). Una vez raspados los vidrios de cada colmena, la apitoxina obtenida fue colocada en recipientes con la identificación de grupo y número de colmena y fue pesada cuando fuera necesario en una balanza analítica de precisión Liang Ping® FA2104 (capacidad máxima: 210 g; resolución: 0,0001 g), perteneciente a la Departamento de Clínica y Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (UdelaR). Luego se guardaron en freezer (-4°C).

### **Etapas IV. Medición de melitina por HPLC**

Para evaluar la composición cuali-cuantitativa de las muestras de apitoxina, cuando el ensayo así lo requiera, se realizaron análisis mediante HPLC. Se utilizaron dos equipos HPLC y dos columnas cromatográficas diferentes.

En el ensayo 1 se empleó un sistema HPLC-UV (Dionex Ultimate 3000), equipado con una bomba LPG 3400 estándar, un autosampler WPS 3000 PL, un detector DAD 3000 y loops de hasta 200 µL. Equipamiento que pertenece a la Unidad Académica de Farmacología del Departamento de Clínica y Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria - UdelaR. La columna cromatográfica utilizada fue una C18 de fase reversa (Hibar® 5 µm, 150 x 4.6 mm, Purospher STAR, Merck), perteneciente al Departamento de Clínica y Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria - UdelaR.

Para los ensayos 2, 3 y 4 se utilizó un equipo HPLC Shimadzu Nexera 40 UHPLC, equipado con una bomba de alta presión, un inyector automático (autosampler), y un detector de arreglo de diodos (DAD). El volumen de inyección fue de 50 µL y la detección se realizó a 220 nm, equipo perteneciente a la Unidad Académica de Toxicología del Departamento de Patobiología de la Facultad de Veterinaria - UdelaR. La columna cromatográfica empleada en estos ensayos fue una Agilent Technologies ZORBAX Eclipse Plus C18 (5 µm, 150 x 4,6 mm), perteneciente al Departamento de Clínica y Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria - UdelaR.

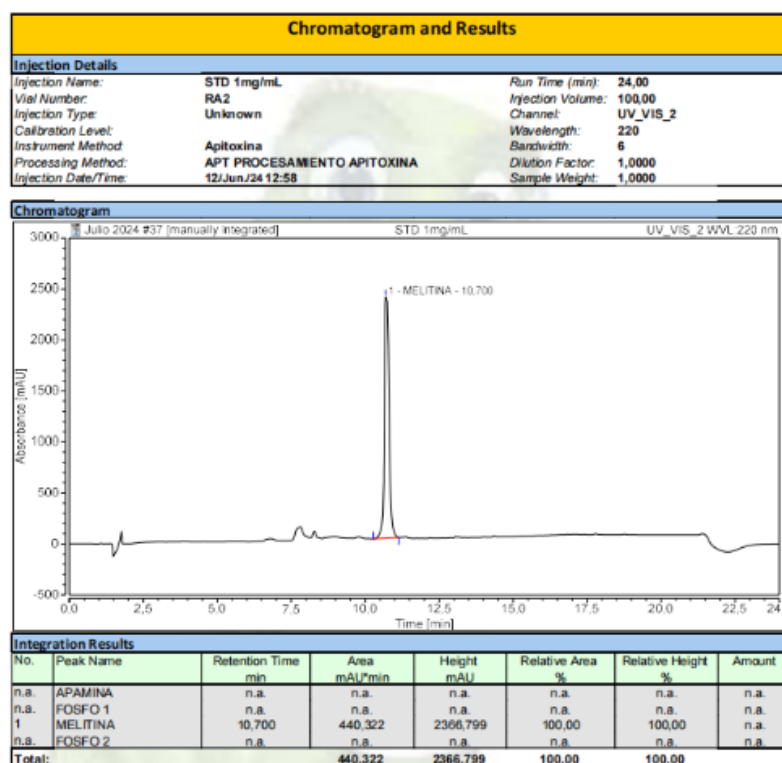
Para la preparación de las muestras para el análisis en el HPLC, se tomó cada muestra de apitoxina y se pesó 5 o 10 mg por muestra, según el volumen del matraz aforado utilizado, de 5 o 10 mL respectivamente. Luego de pesada la apitoxina, se solubilizó la apitoxina con una solución de ácido fórmico al 0,1% en agua hasta enrasar. Posteriormente las muestras se filtraron con jeringas y filtros de 0,45 µm.

Para la preparación de las fases móviles se emplearon solventes aptos para HPLC: acetonitrilo, ácido trifluoroacético (TFA) y agua (marca Carlo Erba). Los materiales de laboratorio utilizados incluyeron sistema de filtración, botellas reservorio,

probetas, bomba de vacío, tubos Falcon®, viales de 1,5 mL para HPLC, filtros de jeringa de 0,45 µm y jeringas.

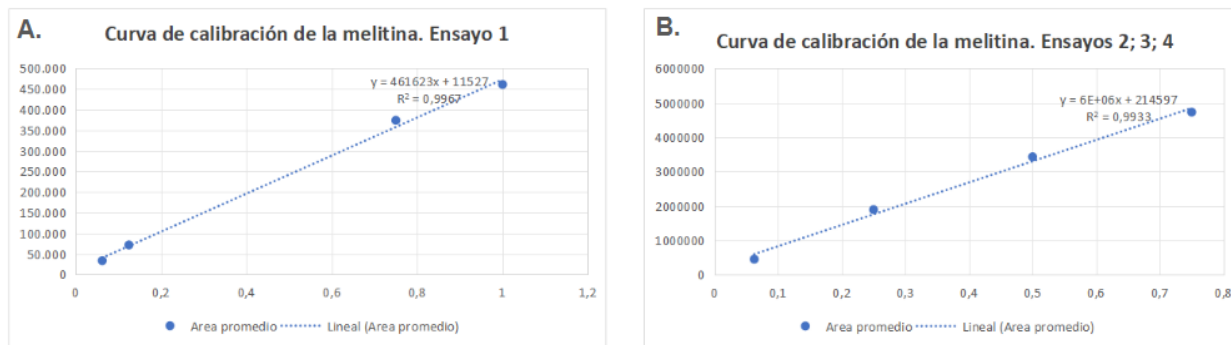
Las muestras fueron cargadas en viales y analizadas en el HPLC con una columna C18. El método y las condiciones de análisis fueron las descritas por Rodríguez-Batista *et. al.*, 2024, el cual necesita de un sistema de gradiente binario: fase A (TFA 0,1% en agua) y fase B (TFA 0,1% en acetonitrilo). El programa de elución consistió en un gradiente de fase B del 5% al 70% en 15 minutos, seguido de una fase isocrática al 70% durante 5 minutos, y una disminución del gradiente hasta el 5% entre los minutos 20,01 y 24. La temperatura de la columna fue de 25°C. La detección se realizó a una longitud de onda fija de 220 nm.

La cuantificación de melitina se realizó mediante el uso de un estándar con pureza del 100% obtenido mediante la purificación de apitoxina por HPLC preparativo (figura 7). Este estándar se cuantificó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H RMN) cuantitativa en D<sub>2</sub>O, empleando el método PULCON, con identificación de señales características del triptófano.



**Figura 7. Cromatograma del estándar de melitina.** Fuente: propia del autor

En el ensayo 1, se prepararon soluciones del estándar de melitina con concentraciones de 1; 0,75; 0,125 y 0,0625 mg/mL. La ecuación de la recta obtenida fue:  $y = 461623 x + 11527$  (figura 8.A). Para los ensayos 2, 3 y 4, la curva de calibración se realizó con concentraciones de 0,75; 0,5; 0,25, 0,0125 y 0,0625 mg/mL y la ecuación correspondiente a la recta fue  $y = 6 \times 10^6 x + 214597$ . Las ecuaciones de la recta resultante, se utilizaron para calcular las concentraciones de melitina en las muestras de apitoxina de los ensayos, (figura 8.B.).

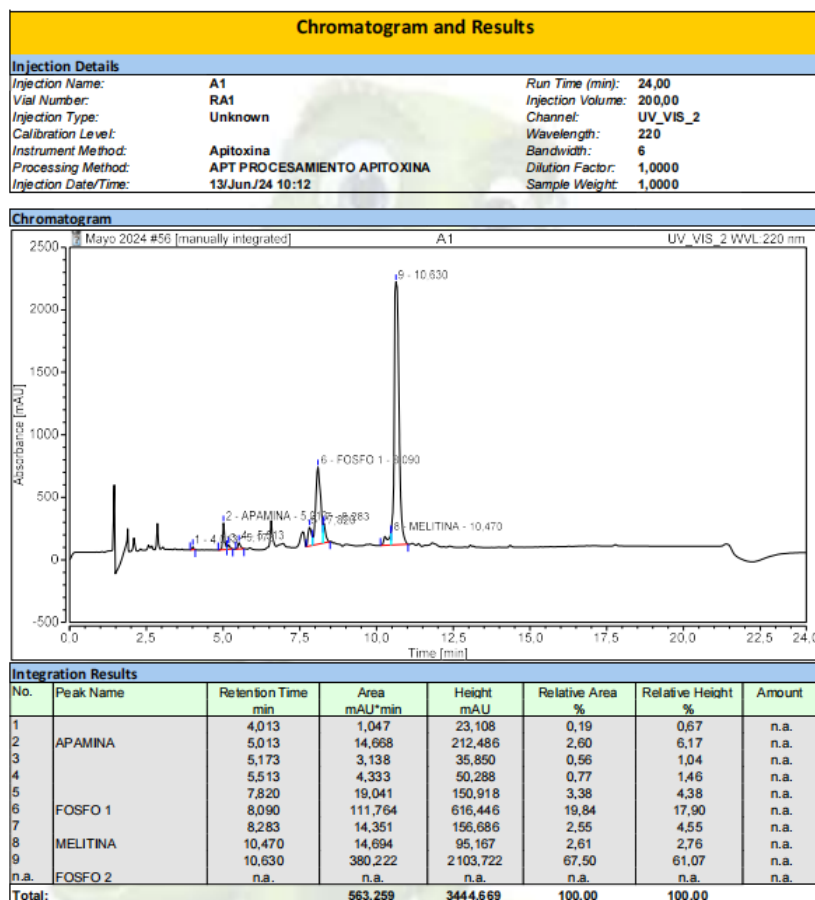


**Figura 8. Curva de calibración de la melitina para cada HPLC.** Fuente: propia del autor

A. Curva de calibración de la melitina para el ensayo 1.

B. Curva de calibración de la melitina para los ensayos 2, 3 y 4.

A continuación, se realizaron las corridas cromatográficas para cada muestra de apitoxina. La identificación del pico correspondiente a la melitina se basó en su tiempo de retención, y se determinó el área bajo la curva en el cromatograma de cada muestra (figura 9). Finalmente, a partir de la ecuación de la curva de calibración, se calculó la concentración de melitina en cada muestra analizada.



**Figura 9. Cromatograma de una muestra de apitoxina.** Fuente: propia del autor

Todos los análisis se realizaron con esta metodología, permitiendo obtener la composición cuantitativa de melitina para cada una de las muestras recolectadas.

## **Etapas V. Tratamiento estadístico de los resultados**

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa RStudio. En cada ensayo, se elaboraron gráficos de dispersión con la media correspondiente a cada tratamiento. Los datos de las variables evaluadas se ajustaron a un modelo adecuado con el objetivo de determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos, fijando un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Además, en los casos que fue necesario, se aplicaron pruebas post hoc apropiadas.

### **Ensayo 1. Determinación de la influencia del uso de protección sobre los vidrios colectores sobre la cantidad y composición de la apitoxina**

#### **Preparación de colmenas:**

El ensayo se realizó en mayo de 2024 en un predio forestal en el Dpto. de Rivera (31°15'51.4"S 55°43'10.0"W). El apiario contaba con 120 colmenas comerciales, con uniformidad genética (reinas fecundadas provenientes de una misma cabaña la primavera anterior) y con manejo sanitario para varroosis. Se evaluaron las colmenas de acuerdo a Delaplane *et al.* (2013) y seleccionaron 60 colmenas con poblaciones entre 35.000 y 40.000 abejas adultas.

#### **Preparación de los grupos:**

Las 60 colmenas seleccionadas fueron divididas en tres grupos de 20 colonias al azar:

- Grupo Control: Vidrios sin protección
- Grupo Látex con talco externo (LátexTExt): Vidrios protegidos con guantes de látex sin talco en contacto con el vidrio
- Grupo Látex con talco interno (LátexTInt): Vidrios protegidos con guantes de látex con el talco en contacto con el vidrio

Cada colmena fue identificada con las iniciales del tratamiento correspondiente y numeradas del 1 al 20.

#### **Extracción de apitoxina:**

Se realizó según etapa II.

Se utilizaron en los tres grupos trampas externas colocadas en la entrada de la colmena. Cada trampa tenía dos vidrios adjuntos de forma cuadrada con 12 cm de lado. Los vidrios estaban o no cubiertos con látex, según el tratamiento asignado. En el caso de los vidrios con protección de látex, estos se cubrieron utilizando guantes de examen de látex de la marca Modern®. Los guantes se colocaron de manera que la superficie del vidrio donde las abejas picaban quedará lisa y tensa. Para lograrlo, los vidrios se introdujeron dentro del guante y mediante cinta adhesiva se fijaron tanto la zona de los dedos como el excedente de la abertura para la mano, en el lado opuesto al área de picado de la trampa. En el grupo

LatexTExt, el talco quedó expuesto hacia el exterior; mientras que en el grupo LatexTInt, el talco quedó orientado hacia el vidrio. En el grupo control los vidrios se colocaron sin protección.

#### **Cosecha de apitoxina:**

Se realizó según etapa III.

Concluida la extracción del veneno, se retiró la protección de látex que presentaban los vidrios de los grupos LatexTExt y LatexTInt, para que pudieran continuar con el proceso de secado, al igual que el grupo de vidrios sin protección.

#### **Determinación de la concentración de melitina:**

Se realizó según etapa IV.

#### **Diseño experimental y estadística:**

Se llevó a cabo un diseño experimental completamente aleatorizado, donde los factores fueron vidrios sin proteger, vidrios protegidos con látex con talco en contacto con el vidrio colector o vidrios protegidos solo con látex.

Las variables respuestas estudiadas fueron la cantidad de apitoxina cosechada y la concentración de melitina. La unidad experimental en cada caso fue la colmena, con un total de 60 unidades experimentales, distribuidas en 20 repeticiones por grupo.

Se utilizó el programa estadístico RStudio para los análisis estadísticos. Para la variable cantidad de apitoxina cosechada se ajustó un modelo lineal generalizado mixto, utilizando la función gls() del paquete nlme en RStudio, incorporando una estructura de varianza heterogénea (varIdent) para permitir varianzas distintas en cada nivel del tratamiento. Posteriormente se verificó que los supuestos estadísticos se cumplieron (homogeneidad de varianzas (homocedasticidad) y normalidad de los errores) y luego se realizó un ANOVA fijando un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Por último se procedió a realizar un test de Tukey.

En el caso de la otra variable en estudio, la concentración de melitina se ajustó a un modelo lineal, luego se verificaron los supuestos estadísticos y se realizó un ANOVA, fijando un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Posteriormente se realizó un test de Tukey con el objetivo de evaluar cuál o cuáles de los tratamientos tuvieron mejores resultados.

### **Ensayo 2. Determinación de la influencia del horario de extracción (diurno o nocturno) sobre la cantidad y composición de la apitoxina cosechada**

#### **Preparación de colmenas:**

El ensayo se llevó a cabo en marzo de 2025 en el apiario experimental del campo N°2 de Facultad de Veterinaria ubicado en el departamento de San José - Uruguay (34°40'01.0"S 56°31'42.6"W), para el cual se utilizaron 30 colmenas que estaban con similar estado de desarrollo y de reservas.

#### **Preparación de los grupos:**

Las 30 colmenas seleccionadas fueron divididas en 2 grupos al azar:

- Grupo diurno (D): extracción de veneno entre las 15:00 y 17:00 horas
- Grupo nocturno (N): extracción de veneno entre las 20:00 y 22:00 horas

Las colmenas que participaron en el ensayo ya estaban numeradas, por lo que se relacionaron sus números con los tratamientos D y N, se les asignó un nuevo número correlativo del 1 al 15 para cada tratamiento.

#### **Extracción de apitoxina:**

Se realizó según etapa II.

Se utilizaron para ambos grupos trampas de techo a las que se les colocaron los tres vidrios adjuntos sin protección. Estas trampas se colocaron en cada colmena durante el tiempo de extracción, en sustitución del techo de la colmena. Para cada trampa se le colocaron tres vidrios de forma rectangular con 36 cm de largo y 15 cm de ancho. Estos vidrios no tenían protección de látex y se ubicaron por encima de la parrilla metálica. A cada vidrio se lo identificó de acuerdo a su grupo, mediante la letra (D y N) correspondiente al tratamiento y el número asignado a la colmena (del 1 al 15).

#### **Cosecha de la apitoxina:**

Se realizó según etapa III.

#### **Determinación de la concentración de melitina:**

Se realizó según etapa IV.

#### **Diseño experimental y estadística:**

Se llevó a cabo un diseño experimental completamente aleatorizado, en el cual el factor fue el momento del día en que se realizó la extracción de veneno (día o noche). Las variables respuesta fueron la cantidad de apitoxina cosechada y la concentración de melitina que las muestras presentaban. La unidad experimental fue cada colmena, con un total de 30 unidades experimentales, distribuidas en 15 repeticiones por grupo.

Se utilizó el programa estadístico RStudio, se ajustaron ambas variables a un modelo lineal, se verificó que cumplieran con los supuestos de homocedasticidad y normalidad de los errores y luego se realizó un ANOVA, fijando un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

### **Ensayo 3. Determinación de la cantidad y composición de la apitoxina obtenida mediante el uso de diferentes trampas de extracción**

#### **Preparación de colmenas:**

El ensayo se llevó a cabo en diciembre de 2025 en el apiario experimental del campo N°2 de Facultad de Veterinaria ubicado en el departamento de San José - Uruguay (34°40'01.0"S 56°31'42.6"W), para el cual se utilizaron 30 colmenas que estaban con similar estado de desarrollo y de reservas.

### **Preparación de lo grupos:**

Las 30 colmenas seleccionadas fueron divididas en 3 grupos al azar:

- Grupo E (trampa externa)
- Grupo I (trampa interna colocada en el alza de miel)
- Grupo T (trampa de techo)

Las colmenas que participaban en el ensayo ya estaban numeradas por lo que se relaciona su número con el tratamiento al que fué asignada E, I y T y con un número correlativo del 1 al 10.

### **Extracción de apitoxina:**

Se realizó según etapa II.

Se utilizaron los tres tipos de trampas correspondientes a cada tratamiento. En el grupo E, se utilizaron trampas externas, colocadas en la piquera de la colmena y a cada trampa se le colocaron dos vidrios de forma cuadrada con 12 cm de lado. En el grupo I correspondiente a las trampas internas, se utilizó el mismo diseño de las trampas externas, pero estas estaban colocadas verticalmente dentro del alza, en sustitución de un cuadro ubicado por encima de la cámara de cría. A cada trampa se le adjuntaron dos vidrios de forma cuadrada con 12 cm de lado. El grupo T, utilizó trampas de techo, colocadas en sustitución del techo de la colmena. Los vidrios utilizados para estas colmenas, fueron tres por cada una de ellas y tenían forma rectangular con 36 cm de largo y 15 cm de ancho. Los vidrios utilizados en todos los casos, no tenían protección de látex y estaban identificados según el número de colmena (1 al 10) y el tipo de trampa correspondiente (E, I o T).

### **Cosecha de la apitoxina:**

Se realizó según etapa III.

### **Determinación de la concentración de melitina:**

Se realizó según etapa IV.

### **Diseño experimental y estadística:**

Se utilizó un diseño totalmente al azar, en donde la unidad experimental fue cada colmena donde se sacó veneno, el tratamiento aplicado fue el tipo de trampa utilizado y las variables a medir fueron el peso de apitoxina de cada colmena y la concentración de melitina que las muestras presentaban.

Se utilizó el programa estadístico RStudio y se ajustó un modelo lineal, se verificó que cumplieran con los supuestos de homocedasticidad y normalidad de los errores y se le realizó un ANOVA, fijando un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Posteriormente se realizó un test de Tukey para conocer cuál de los tres tratamientos presentó mejores resultados.

#### **Ensayo 4. Determinación de la influencia del estado de madurez de las abejas sobre la composición del veneno**

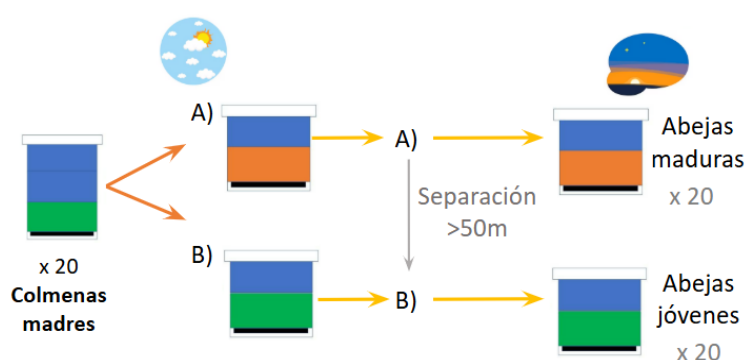
##### **Preparación de colmenas:**

El ensayo se llevó a cabo en diciembre de 2024 en el apiario experimental del campo N°2 de la Facultad de Veterinaria en el departamento de San José en Uruguay (34°40'01.0"S 56°31'42.6"W). Para ello, se utilizaron 20 colmenas con similar estado de desarrollo. Es importante destacar que, si bien se realizaron dos ensayos durante este mes (diciembre 2024), las colmenas utilizadas en este ensayo fueron distintas de las usadas en el ensayo 3.

##### **Preparación de lo grupos:**

##### **División de una colmena para generar 2 poblaciones de abejas:**

Las colmenas seleccionadas fueron numeradas del 1 al 20 y luego cada una fue particionada. De mañana, a cada colmena se la ahumó y se la colocó al costado del soporte donde estaba localizada y en el mismo se colocó una colmena vacía a la que se le agregó panales vacíos, panales con cría y panales con alimentos (de la colmena que estaba ahí situada), pero no abejas adultas. Luego, la colmena que antes estaba ahí situada, se la trasladó a un nuevo soporte localizado a unos 50 metros. De esta forma de cada colonia se formaron dos, la colmena “madre” que fue trasladada y la colmena “hija” que quedó en el sitio original. En el correr del día las abejas maduras (pecoreadoras) que fueron saliendo de la “colmena madre” regresaron a la “colmena hija”. De esta forma al final del día, se conformaron dos poblaciones de abejas: en la “colmena madre” quedaron abejas jóvenes (< 21 días de edad) que aún no habían salido de la colmena a volar ni orientarse espacialmente y en la “colmena hija” quedaron abejas maduras (pecoreadoras) (figura 10). Las “colmenas hijas” fueron identificadas con el mismo número que las “colmenas madres”, pero agregándoles la letra A.



**Figura 10. Diagrama de la división de las colmenas para obtener dos colmenas, una de abejas jóvenes y otra de maduras. (Fuente propia del autor)**

##### **Extracción de apitoxina:**

Se realizó según etapa II.

Se realizó la cosecha de veneno durante la tarde-noche del mismo día que se

dividieron las colonias, para asegurar que las pecoreadoras estén de vuelta en su colmena hija.

Para este ensayo se utilizaron trampas de techo, colocadas en sustitución del techo de la colmena y se les adjuntaron 3 vidrios a cada trampa. Estos vidrios no tenían protección de látex y tenían forma rectangular con 36 cm de largo y 15 cm de ancho. Cada vidrio estaba identificado con el número correspondiente a la colmena madre y su hija, pero en las colmenas madres se le agregó la letra A.

### **Cosecha de la apitoxina:**

Se realizó según etapa III.

### **Determinación de la concentración de melitina:**

Se realizó según etapa IV.

### **Diseño experimental y estadística:**

Se realizó un diseño experimental de bloques completamente aleatorizado, donde el bloque fue la colmena que dio origen a la partición en dos núcleos. El tratamiento aplicado fue entonces, las abejas maduras y abejas jóvenes que resultaron de la división de la colmena original. La unidad experimental fue cada división de la colmena original. La variable a medir fue la concentración de la melitina para cada colmena.

Se utilizó el programa estadístico RStudio para los análisis estadísticos. Se ajustó un modelo lineal, se verificaron que se cumplieran los supuestos de homocedasticidad y normalidad de los errores y se realizó por ANOVA, fijando un nivel de significancia del 5% ( $\alpha = 0,05$ ).

## **Ensayo 5. Determinación de la cantidad de apitoxina cosechada mediante el uso de trampas de techo con diferentes áreas**

### **Preparación de colmenas:**

El ensayo se llevó a cabo en abril de 2025 en el apiario experimental del campo N°2 de Facultad de Veterinaria en el departamento de San José - Uruguay (34°40'01.0"S 56°31'42.6"W), para el cual se utilizaron 50 colmenas seleccionadas al azar, las cuales presentaban similar estado de desarrollo y de reservas.

### **Preparación de los grupos:**

Las 50 colmenas seleccionadas al azar fueron divididas en 5 grupos de acuerdo al área que se dejaba expuesta y activa de la trampa de techo:

- Grupo 1: área activa 100% (1620 cm<sup>2</sup>)
- Grupo 2: área activa 80% (1296 cm<sup>2</sup>)
- Grupo 3: área activa 60% (972 cm<sup>2</sup>)
- Grupo 4: área activa 40% (648 cm<sup>2</sup>)
- Grupo 5: área activa 20% (324 cm<sup>2</sup>)

Las colmenas que participaban en el ensayo ya estaban numeradas por lo que se relaciona su número con el tratamiento al que fué asignada, 100, 80, 60, 40 y 20 y con un número correlativo del 1 al 10.

### **Extracción de apitoxina:**

Se realizó según etapa II.

La extracción del veneno se realizó utilizando trampas de techo, que se ubicaron en sustitución del techo de la colmena y también se utilizaron tres vidrios por colmena con forma rectangular con 36 cm de largo y 15 cm de ancho, los cuales no tenían sin protección de látex. Para reducir la superficie expuesta en cada nivel de tratamiento, se empleó cartón de 39 mm que dejaba libre hacia el centro, el 80%, 60%, 40% o 20% de la superficie activa de la trampa de techo. En el nivel del 100%, se colocó únicamente la trampa de techo, sin restricción. Cada vidrio estaba identificado según el grupo de tratamiento (100, 80, 60, 40 o 20%) y el número de colmena correspondiente (1 al 10).

### **Cosecha de la apitoxina:**

Se realizó según etapa III.

### **Diseño experimental y estadística:**

Se utilizó un diseño experimental completamente aleatorizado, en el cual los factores fueron el área de exposición de la trampa, con 5 niveles de exposición (20, 40, 60, 80 y 100% de la trampa de techo). La variable de respuesta fue la cantidad de apitoxina cosechada en cada colmena. La unidad experimental fue cada colmena, con un total de 50 unidades experimentales y 10 repeticiones por grupo.

Se utilizó el programa estadístico RStudio, para realizar el análisis de los datos y se realizó un análisis no paramétrico Kruskal-Wallis ya que los datos no cumplían con los supuestos de homogeneidad de varianzas y se fijó un nivel de significancia del 5 % ( $\alpha = 0,05$ ). Luego de encontrar diferencias significativas, se aplicó un test Post-hoc para identificar cuál fue el tratamiento fue el más eficaz.

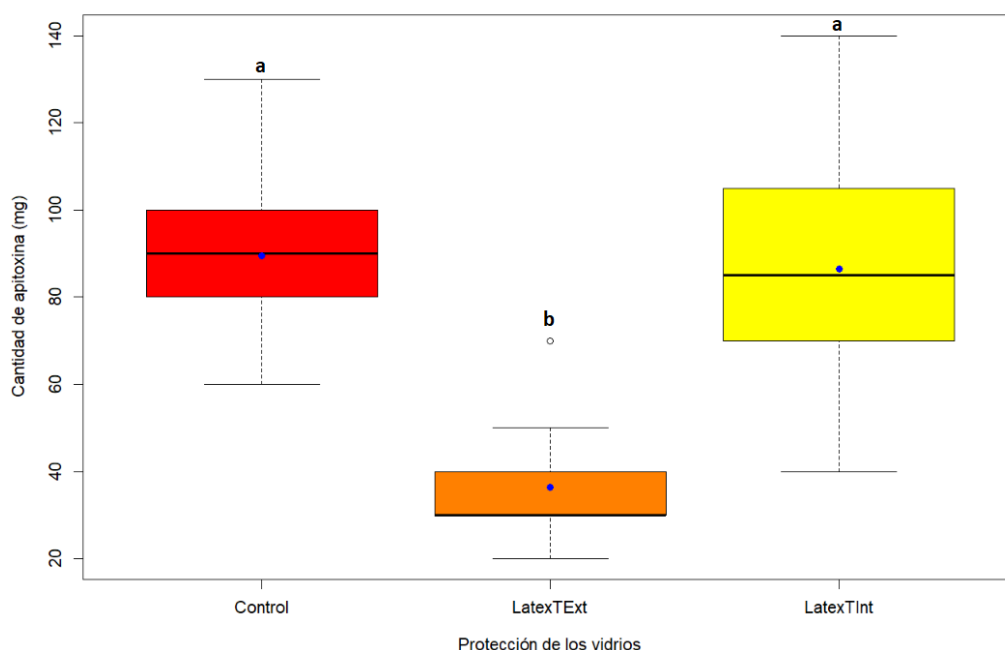
## RESULTADOS

### Ensayo 1. Determinación de la influencia del uso de protección sobre los vidrios colectores sobre la cantidad y composición de la apitoxina

#### Cantidad de apitoxina cosechada:

La distribución de los datos se muestran en la figura 11. La media de apitoxina cosechada para el grupo control (vidrios sin protección) fue de  $89,50 \pm 15,71$  mg. En el grupo LátexTExt, la media fue de  $36,31 \pm 12,11$  mg, y en el grupo LátexTInt, de  $86,50 \pm 29,60$  mg. El tratamiento correspondiente a los vidrios con látex y talco externo presentó la menor variabilidad en sus resultados, mientras que los vidrios con látex y talco interno mostraron una mayor variabilidad.

El análisis de varianza (ANOVA) arrojó un valor de  $p < 0,0001$  ( $p < 0,05$ ), lo que indica diferencias significativas entre los grupos en cuanto a la cantidad de apitoxina recolectada. El test de Tukey (representado con letras en la figura 11) mostró que el grupo control y el grupo con látex y talco interno no difirieron significativamente entre sí (ambos identificados con la letra “a”), mientras que el grupo con látex y talco externo presentó diferencias significativas respecto de los otros dos (letra “b”).

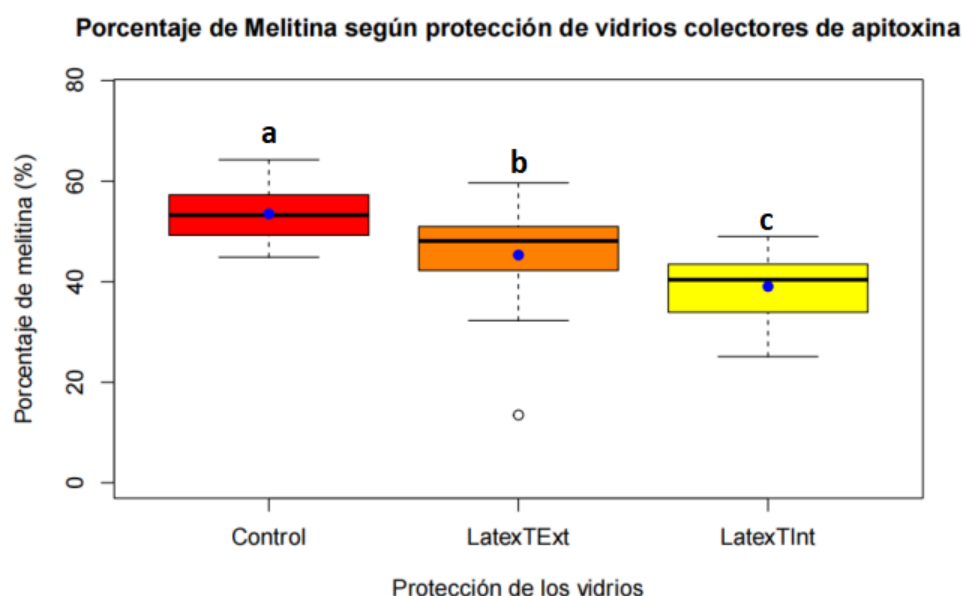


**Figura 11. Cantidad de apitoxina (mg) según protección de los vidrios colectores de apitoxina.** Cantidad de apitoxina (mg) para el grupo control (vidrios sin protección), el grupo LatexTExt (vidrios con látex y talco externo) y el grupo LatexTInt (vidrios con látex y talco interno). La mediana de los datos se indica con la línea negro en cada caja y la media con un punto azul para cada grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

### **Porcentaje de melitina:**

Los valores del porcentaje de melitina para cada grupo se representó en la figura 12. La media del grupo control (vidrios sin protección) fue de  $53,46 \pm 5,12\%$ , en el grupo de los vidrios con látex y talco externo la media fue de  $45,28 \pm 10,40\%$  y para el grupo de los vidrios con látex y talco interno la media de la apitoxina cosechada fue de  $39,02 \pm 6,87\%$ .

El análisis de varianza (ANOVA) mostró diferencias significativas en el porcentaje de la concentración de melitina entre los grupos de tratamiento con un valor de  $p = 0,000001164$  ( $p < 0,05$ ). El test de Tukey, indicó que los tres tratamientos tuvieron diferencias significativas entre sí. Los vidrios sin protección (letra a) tuvieron mayor cantidad de melitina cosechada, seguido del los vidrios con el látex y el talco externo (letra b) y el valor más bajo fue en el grupo donde se colocaron los vidrios con látex y el talco interno (letra c).



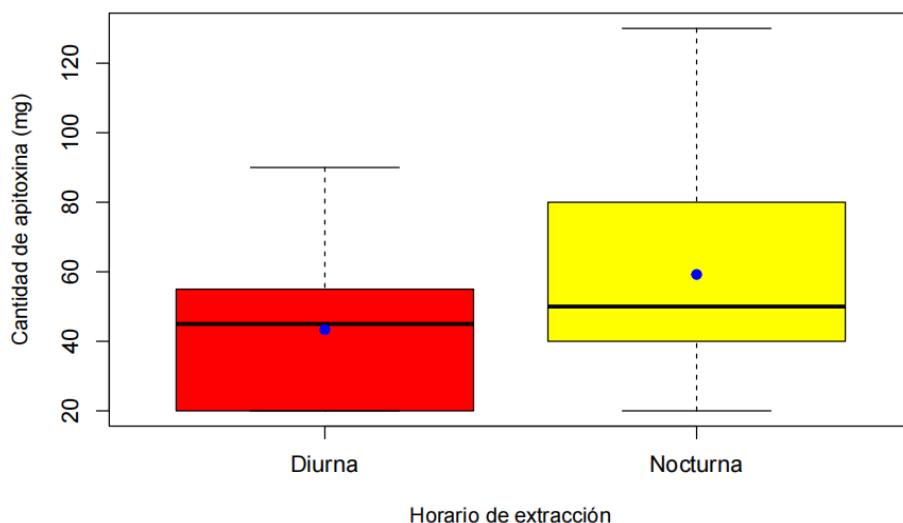
**Figura 12. Porcentaje de melitina (%) según protección de los vidrios colectores de apitoxina.** Porcentaje de melitina (%) para los tres tratamientos aplicados, Control (vidrios sin protección), LatexTExt (vidrios con látex y talco externo) y LatexTInt (vidrios con látex y talco interno). La mediana de los datos se indica con la línea negro en cada caja y la media con un punto azul para cada grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

### **Ensayo 2. Determinación de la influencia del horario de extracción (diurno o nocturno) sobre la cantidad y composición de la apitoxina cosechada**

#### **Cantidad de apitoxina cosechada:**

La distribución de los datos se pueden ver en la figura 13, la extracción nocturna presentó mayor variación en comparación con la extracción diurna. La media del grupo de extracción diurna fue de  $43,33 \pm 22,69$  mg y de  $59,23 \pm 30,12$  mg la extracción de veneno nocturna. Con un valor de  $p = 0,1524$  ( $p > 0,05$ ), por lo que se

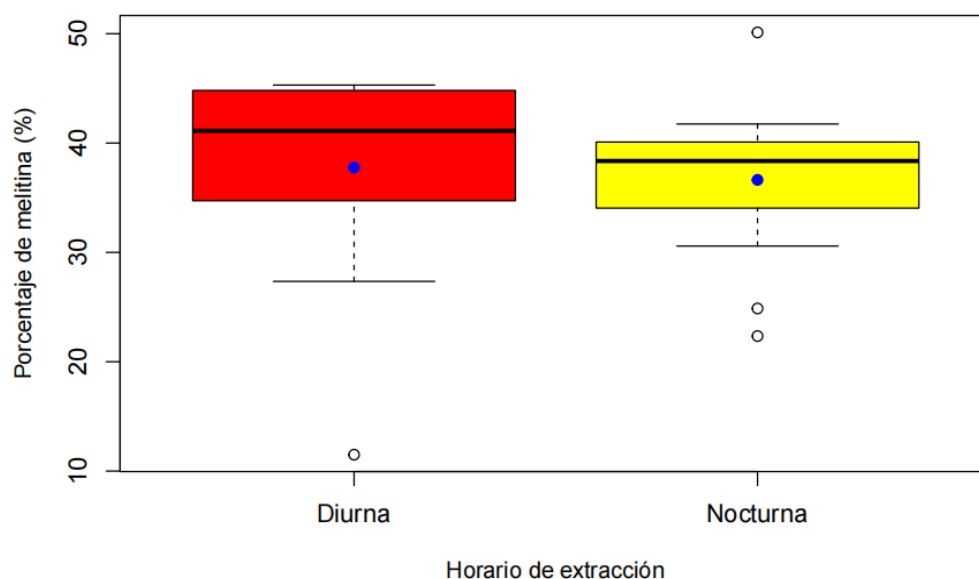
puede asegurar que en las condiciones que se llevó a cabo el ensayo, no presentó diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 13. Cantidad de apitoxina (mg) según extracción diurna o nocturna.** La mediana de los datos se indica con la línea negro en cada caja y la media para cada grupo está señalada con un punto azul.

#### **Porcentaje de melitina:**

La figura 14 muestra la distribución de los datos obtenidos del porcentaje de melitina en dos momentos del día. La extracción diurna presentó mayor variabilidad de sus datos, pero los valores de las medias son similares,  $37,76 \pm 10,16\%$  en la extracción diurna y  $36,63 \pm 7,30\%$  en la extracción nocturna. El valor obtenido del ANOVA fue  $p=0,7508$  ( $p > 0,05$ ), por lo que sugiere que bajo las condiciones en que se llevó adelante el ensayo no existieron diferencias significativas entre los tratamientos.



**Figura 14. Porcentaje de melitina (%) según extracción diurna o nocturna.** La

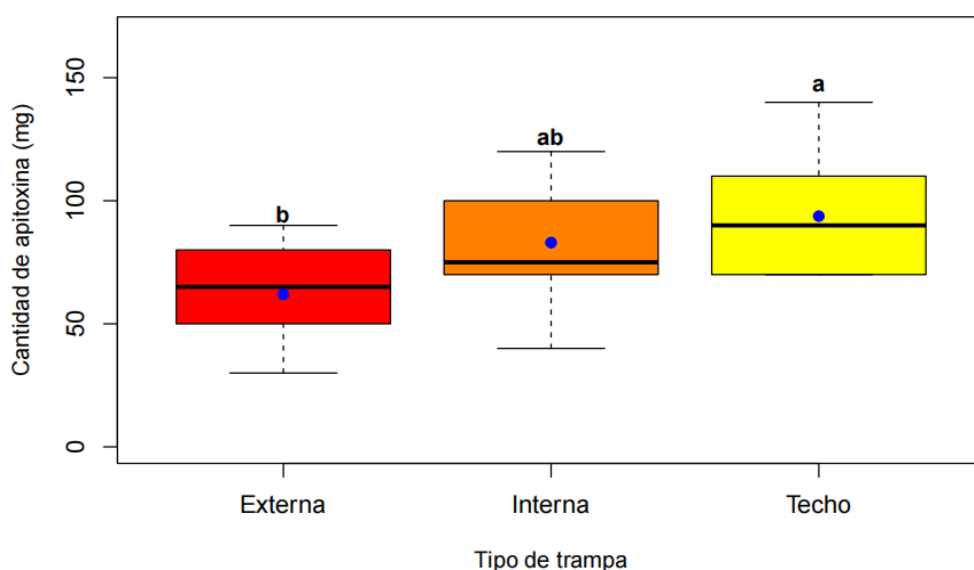
mediana de los datos se indica con la línea negro en cada caja y la media con un punto azul para cada grupo.

### Ensayo 3. Determinación de la cantidad y composición de la apitoxina obtenida mediante el uso de diferentes trampas de extracción

#### Cantidad de apitoxina cosechada:

La distribución de los datos obtenidos se encuentra representada en la figura 15 para los tres tipos de trampas utilizados y las medias en el caso del grupo E (trampa externa) fue de  $62,50 \pm 22,01$  mg. En el caso del grupo I (trampas internas), la media del grupo fue de  $83,50 \pm 26,26$  mg y para la trampa de techo, correspondientes al grupo T el valor de la media fue de  $93,75 \pm 25,59$  mg.

El valor p fue de 0,0324 ( $p < 0,05$ ), lo indica que existe suficiente evidencia estadística para concluir que al menos un tipo de trampa tiene un efecto significativo sobre la cantidad de apitoxina recolectada. El test de Tukey, mostró que la extracción con trampa de techo (letra a), presentó mejores resultados que la trampa externa (letra b). En cambio la extracción con trampa interna (letra ab) no presentó diferencias significativas con ninguno de los otros dos casos, bajo las condiciones en que se llevaron adelante los ensayos.

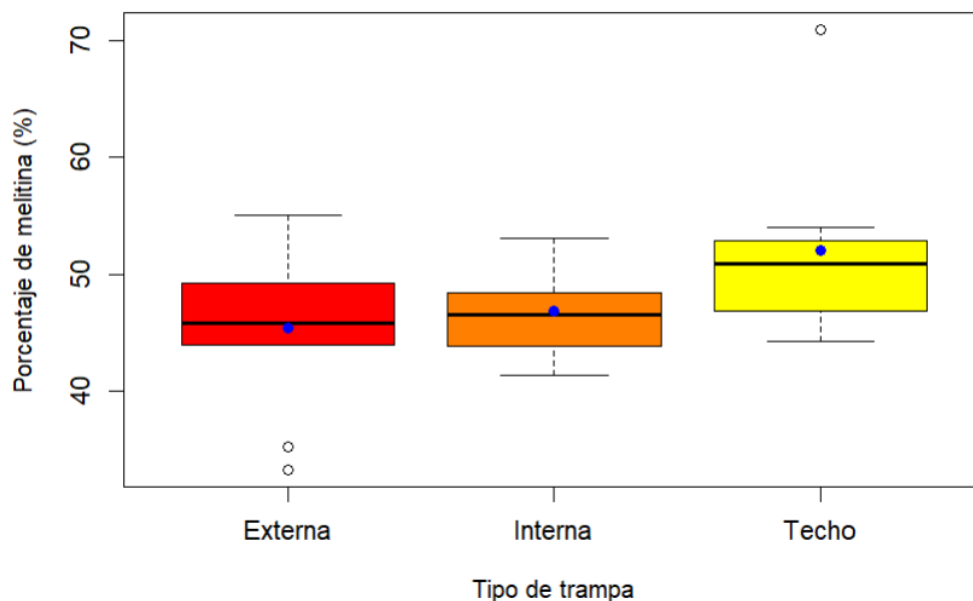


**Figura 15. Cantidad de apitoxina (mg) según tipo de trampa.** Grupo de trampa externa, interna y de techo. La mediana de los datos se indica con la línea negro en cada caja y la media para cada grupo está señalada con un punto azul. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

#### Concentración de melitina:

La distribución de los datos se representa en la figura 16, si bien se puede ver la variabilidad entre los grupos es baja, en el grupo de trampa externa y en el grupo de trampa de techo hay valores outliers los cuales quedan significativamente alejados del resto del conjunto de datos. La media para el grupo E fue de  $45,38 \pm 7,02\%$ , en el caso del grupo I la media fue de  $46,87 \pm 3,9\%$  y de  $52,08 \pm 8,24\%$  en el grupo T.

El resultado del ANOVA, no encontró diferencias significativas entre los grupos para la concentración de la melitina. El valor obtenido para el  $p = 0,100$  ( $p > 0,05$ ). Lo que sugiere que no se puede asumir que haya diferencias entre los tratamientos para esta variable con las condiciones en que se llevaron adelante los ensayos.



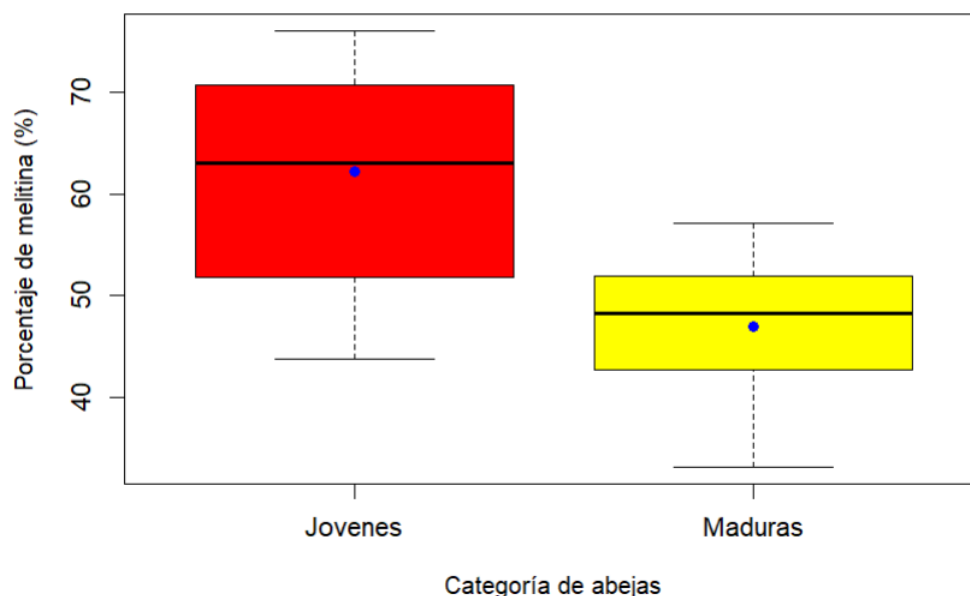
**Figura 16. Porcentaje de melitina (%) según tipo de trampa.** Porcentaje de melitina para el grupo E (trampa externa), para el grupo I (trampa interna) y para el grupo T (trampa de techo). La mediana de los datos se indica con la línea negro en cada caja y la media para cada grupo está señalada con un punto azul.

#### **Ensayo 4. Determinación de la influencia del estado de madurez de las abejas sobre la composición del veneno**

##### **Concentración de melitina:**

La distribución de los datos obtenidos para cada categoría de abejas estudiada, se pueden ver en la figura 17. Los valores para el grupo de abejas jóvenes fueron superiores que para las abejas maduras y eso también se mantuvo en la media de cada grupo, donde para las abejas jóvenes fue de  $62,20 \pm 10,65\%$  y de  $46,98 \pm 7,77\%$  en las abejas maduras.

El ANOVA mostró diferencias significativas en la concentración de melitina entre los grupos de abejas jóvenes y maduras con un valor de  $p = 0,000006092$  ( $p < 0,05$ ), lo que indica que existe suficiente evidencia estadística para afirmar que las abejas jóvenes tienen mayor porcentaje de melitina en comparación con las abejas maduras ( $> 3$  semanas de vida, abejas pecoreadoras).



**Figura 17. Porcentaje de melitina (%) según categoría de abejas.** Para la categoría de las abejas jóvenes y maduras. La mediana de los datos se indica con la línea negro en cada caja y la media con un punto azul para cada grupo.

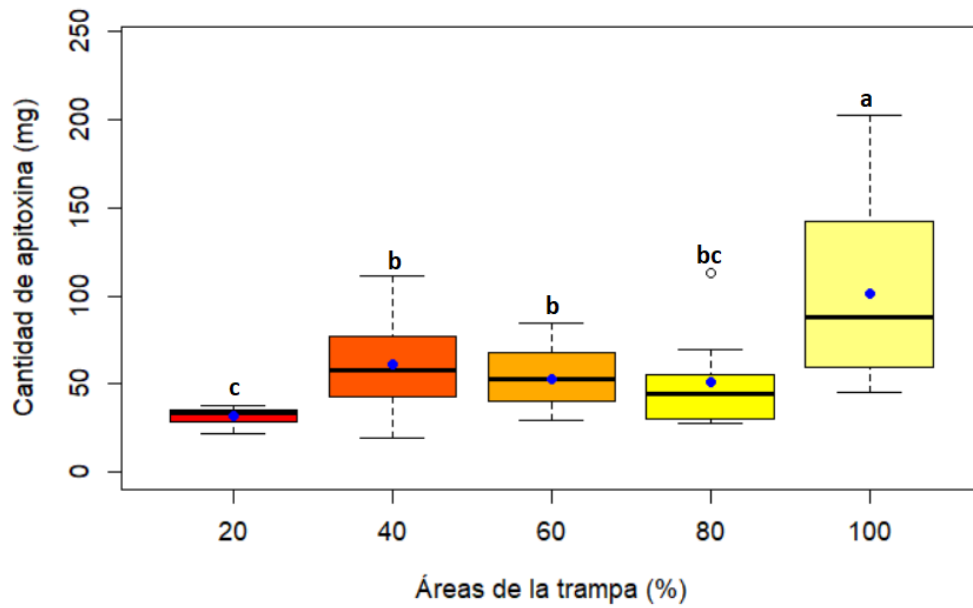
#### **Ensayo 5. Determinación de la cantidad de apitoxina cosechada mediante el uso de trampas de techo con diferentes áreas**

##### **Cantidad de apitoxina cosechada (mg):**

La distribución de los datos en la cantidad de apitoxina cosechada en los cinco niveles de tratamiento está representada en la figura 18. Los valores más altos en los datos, se encuentra en el área del 100% y la media para este nivel fue de  $101,28 \pm 52,97$  mg, en el caso del área del 80% la media fue de  $50,95 \pm 25,45$  mg, la siguiente área estudiada de 60% la media fue de  $52,56 \pm 18,70$  mg, en la trampa con 40% del área la media fue de  $60,98 \pm 27,18$  mg y en el 20% del área la media fue de  $31,78 \pm 5,86$  mg.

El análisis no paramétrico Kruskal-Wallis mostró diferencias significativas en la cantidad de apitoxina cosechada para cada trampa, con un valor de  $p = 0,001199$  ( $p < 0,05$ ). Esto indica que existe suficiente evidencia estadística para concluir que al menos uno de los tratamientos utilizados, tuvo un efecto significativo sobre la cantidad de apitoxina recolectada.

Los resultados del análisis post hoc, representados mediante letras en la figura 18, indican que la trampa con 100% de recubrimiento presentó el mayor rendimiento en la recolección de apitoxina (letra a). A continuación, se ubicaron las trampas con recubrimientos del 40% y 60%, las cuales no mostraron diferencias significativas entre sí (letra b). La trampa con 20% de recubrimiento presentó una menor producción y fue clasificada con la letra c. Por su parte, la trampa del 80% no mostró diferencias estadísticas claras respecto a las del 20%, 40% y 60%, por lo que fue asignada a un grupo intermedio (bc) en la prueba post hoc.



**Figura 18. Cantidad de apitoxina (mg) según el área de la trampa.** Para los cinco tratamientos aplicados (20, 40, 60, 80 y 100% del área de la trampa de techo). La mediana de los datos se indica con la línea negro en cada caja y la media con un punto azul para cada grupo. Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos.

## DISCUSIÓN

El objetivo general de este trabajo fue estudiar los factores que influyen en la cantidad y composición del veneno de abeja, con énfasis en el contenido de melitina y en la cantidad de apitoxina cosechada en Uruguay. Los resultados obtenidos en los diferentes ensayos, así como lo reportado en la literatura científica, indican que ambos parámetros presentan una alta variabilidad influenciada por múltiples factores (FAO, 2021; Nowar, 2016). El estudio de estas variables no solo permite generar evidencia empírica local sobre la calidad y cantidad de apitoxina recolectada, sino que también constituye un paso fundamental hacia el diseño de protocolos de extracción más estandarizados y eficientes. La estandarización de la extracción de apitoxina busca establecer márgenes aceptables de calidad y rendimiento que sean replicables a nivel productivo. En este sentido, los resultados obtenidos en esta tesis sugieren que una estrategia de extracción eficiente en el contexto uruguayo requiere no solo decisiones técnicas, sino también un enfoque biológico integral. Factores como la edad y el comportamiento de las abejas se presentan como elementos clave para comprender y controlar la composición del veneno recolectado.

A continuación, se analizan los resultados de cada uno de los ensayos realizados, discutiendo sus implicaciones técnicas y biológicas en el marco del objetivo general y de los objetivos específicos propuesto.

### **Ensayo 1. Determinación de la influencia del uso de protección sobre los vidrios colectores sobre la cantidad y composición de la apitoxina**

Cuando se comenzó a utilizar el sistema de impulsos eléctricos para obtener apitoxina a nivel comercial, surgió la necesidad de cubrir los vidrios dónde se depositaría el veneno, con el fin de evitar su contaminación. En este contexto, se utilizó tafetán de nylon (Benton *et al.*, 1963) o láminas de goma de silicona de 0,12 mm (Barker *et al.*, 1963). Morse y Barker, (1964) observaron que la apitoxina tomaba un color oscuro, luego que esta estuviera en contacto con las láminas de goma y con la tapa de goma de los viales donde se almacenaba.

Más adelante, se hizo común la utilización de látex para la protección de los vidrios, figurando en la metodología de varios trabajos científicos (El-Bassiony *et al.*, 2016; El-Bahnasy *et al.*, 2017; Fouad *et al.*, 2023; Hegazi *et al.*, 2017; Hussein *et al.*, 2019). También se incorporó su uso por parte de los productores de apitoxina considerándose como una buena práctica (Montoya *et al.*, 2019), además de estar extendida en los canales de información que son frecuentados por los apicultores (Apicultura sin Fronteras, 2022; CENITAgropecuaria, 2022; Consorcio Apícola de México, 2019). Sin embargo, no se dispone de evidencia científica que respalde el uso de este material para dicho propósito, ni que demuestre un efecto beneficioso sobre la cantidad y composición de la apitoxina recolectada en comparación con la ausencia de protección.

A nivel de productores es común utilizar guantes de látex envolviendo a los vidrios de las trampas externas como forma de protegerlos, el tamaño de estos vidrios permite introducirlos dentro de un guante dejando una superficie completamente lisa en la cara que contacta con la rejilla metálica. Para envolverlos es mucho más fácil y rápido hacerlo con el talco hacia adentro, pues si se los invierte suelen romperse cuando se introduce el vidrio. En Uruguay, esta técnica es aplicada por algunos apicultores y hasta es difundida mediante videos en plataformas como YouTube, a través de canales como Uruguay Miel. En el video titulado “Extracción de apitoxina. Parte 1 - Tutoriales ApicultoresTV”, se menciona su uso de forma práctica. Este material de divulgación cuenta con el apoyo de diversas instituciones relevantes de Uruguay, como el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), la Agencia Nacional de Desarrollo (ANDE), la Comisión Nacional de Fomento Rural, la Comisión Honoraria de Desarrollo Apícola, el MGAP, el Ministerio de Industria, la Sociedad Apícola Uruguay y la Asociación de Exportadores de Miel de Uruguay (ADEXMI), (Uruguay Miel, 2021).

Existen formas de cosechar apitoxina donde se van a generar una gran cantidad de contaminantes y es necesaria una protección, las trampas que se puedan utilizar en el piso de la colmena pueden generar una gran cantidad de contaminantes como escamas de cera y restos de propóleos (Murakami *et al.*, 2019). En el caso de las trampas de piquera en la medida que las abejas vienen con los recursos del pecoreo, las mismas pueden vomitar, defecar, se pueden desprender partes del polen que trae en las corbículas, por lo que podría estar justificado su uso.

En este estudio se utilizaron trampas externas, ya que son las trampas más comunes empleadas por los productores y recomendadas en diversos canales de difusión (Apicultura sin Fronteras, 2022; CENITAgropecuaria, 2022; Consorcio Apícola de México, 2019). Si bien se sabe que otros tipos de trampas, como las trampas de techo, podrían reducir la presencia de contaminantes, ya que su disposición de los vidrios colocadas contra la gravedad dificulta que partes del cuerpo de las abejas, como aguijones o patas, queden en el veneno, su implementación para este ensayo presenta algunas limitaciones prácticas. Por ejemplo, estas trampas utilizan vidrios rectangulares de 36 cm x 15 cm, lo que no es compatible con la aplicación eficiente del látex utilizando guantes, a diferencia de las trampas externas. En estas últimas, se emplean vidrios cuadrados de 12 cm de lado, cuya superficie puede cubrirse adecuadamente con guantes comerciales de látex como se reporta en artículos científicos o en los canales de difusión de los apicultores (Apicultura sin Fronteras, 2022; CENITAgropecuaria, 2022; Consorcio Apícola de México, 2019).

En este ensayo, se evaluó la utilización de vidrios recubiertos con látex y talco externo, vidrios con látex y talco interno, y vidrios sin protección. Los resultados obtenidos en este ensayo sugieren que los vidrios sin protección combinaron los valores más altos en ambas variables analizadas ( $p < 0,05$ ), lo que indica que la utilización de látex no constituye un manejo efectivo.

La cantidad de apitoxina obtenida sin látex y con el látex con el talco hacia el vidrio están dentro de los valores reportados para una trampa externa, reportados entre 40

y 100 mg (Flanjak *et al.*, 2021; Hussein *et al.*, 2019; Amro & Mohamed, 2023), donde éstos trabajos suelen realizarse dentro de la temporada apícola (primavera y verano). Nuestro ensayo se realizó en el otoño, en colmenas que estaban situadas en una forestación de *Eucaliptus grandis*, por lo que aún mantienen una población alta de abejas y con gran actividad en este momento del año en comparación con las abejas del sur del país en el mismo período del año (Invernizzi *et al.*, 2011; Mendoza *et al.*, 2013).

Hegazi *et al.* (2017) compararon la cosecha de apitoxina utilizando vidrios cubiertos con látex y con lámina de fibra además de evaluar dos ecotipos diferentes de abejas. Estos autores reportaron un promedio de apitoxina de  $106 \pm 14,66$  mg con látex y de  $102 \pm 11,91$  mg con fibra, y si bien el valor con látex es mayor al que obtuvimos, es difícil comparar los trabajos por metodología ya que difieren en varios aspectos y falta información. En ese ensayo los autores reportan que realizaron cuatro extracciones a una sola colmena, no se detalla el estado del desarrollo de esas colmenas, ni las características específicas de los materiales utilizados para cubrir los vidrios, como por ejemplo si el látex tenía talco, ni el protocolo de electroestimulación, tampoco se menciona el secado de los vidrios una vez que se retira el látex como acción previa al raspado y pesado de la apitoxina, sin embargo es el único trabajo que evalúa la utilización de látex en la producción de apitoxina.

El látex es una mezcla compleja de alérgenos potentes (Poley Jr. & Slater, 2000). La alergia al látex de caucho natural (NRLA) continúa siendo un problema de salud mundial, y existe una alta prevalencia en personas con contacto frecuente e intenso con productos de látex como el personal de salud, variando de acuerdo a la profesión en cifras del 15 al 50%, pero es un problema en pacientes con cirugías múltiples o con determinadas predisposiciones como la espina bífida (Parisi *et al.*, 2021). El uso de guantes de látex no representa un problema únicamente por el contacto con la piel de quien lo usa o del paciente al que se contacta, sino que también genera partículas que actúan como aeroalergenos, lo que son un problema en centros hospitalarios dónde se usan frecuentemente guantes de látex (Swanson *et al.*, 1994; Tacquard *et al.*, 2021).

En el presente ensayo, las trampas con látex en contacto directo con el vidrio fueron las que arrojaron valores menores que las otras dos trampas, lo que podría deberse a que quede una mayor o menor cantidad de apitoxina adherida al látex respecto a cuando hay presencia de talco. El porcentaje de melitina en los diferentes tratamientos podría estar indicando contaminación de la apitoxina que queda en el vidrio por el uso de látex y por el talco. Cuando los guantes se retiran de los vidrios para proceder al secado, el látex queda adherido en la zona de contacto con la apitoxina y debe retirarse con cuidado para que no se rompa. Aun así, es posible que parte de la apitoxina quede adherida a los guantes que se retiran y partículas de estos guantes y talco pueden quedar en la apitoxina que permanece en el vidrio, actuando como contaminantes y disminuyendo el porcentaje de melitina de la muestra. Si consideramos que los guantes de látex en su uso habitual liberan partículas que quedan en suspensión y actúan como aeroalergenos (CITA), la interacción química de látex con uno o más componentes de la apitoxina o una

simple adherencia mecánica del guante con la apitoxina depositada es motivo suficiente para que se analice la contaminación de la apitoxina con látex utilizando HPLC-MS o por espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

## **Ensayo 2. Determinación de la influencia del horario de extracción (diurno o nocturno) sobre la cantidad y composición de la apitoxina cosechada**

Este estudio comparó la extracción de veneno en horarios diurnos y nocturnos. Bajo las condiciones experimentales establecidas, no se encontraron diferencias significativas en las variables analizadas ( $p > 0,05$  para ambos parámetros). Desde una perspectiva productiva, estos resultados indican que al no observarse diferencias entre los horarios de cosecha, la elección del momento del día puede basarse en criterios de manejo y/o de seguridad. En este sentido, la extracción nocturna podría representar una opción más segura para el operario, así como para otras personas o animales presentes en el entorno, ya que las abejas muestran menor inquietud durante la noche, lo que reduce el riesgo de incidentes y facilita el manejo.

En cuanto a la calidad del veneno, los porcentajes de melitina obtenidos fueron bajos en ambos tratamientos: 37,76% en la extracción diurna y 36,63% en la nocturna. Estos valores se encuentran por debajo del rango considerado normal para este componente (40–60% en base seca, según FAO, 2021). Una posible explicación para los resultados obtenidos es la época del año en que se realizó el ensayo (marzo de 2025), correspondiente a la transición entre el verano y el otoño en Uruguay. Durante este período, la dinámica poblacional de las colonias de abejas ubicadas en el sur de Uruguay, suele comenzar a variar y entre los cambios más notables, la baja de la postura por parte de la abeja reina, sumado a que comienzan a aparecer las abejas obreras llamadas diutinas, son lo más relevante. Las abejas diutinas, comúnmente conocidas por algunos apicultores como "abejas de invierno", no se encuentran exclusivamente en dicha estación (Omholt & Amdam, 2004). En realidad, su presencia se asocia a períodos de escasez de recursos, independientemente de la estación del año. Se trata de una posible adaptación evolutiva de las abejas africanizadas ante condiciones ambientales desfavorables. Estas obreras se caracterizan por tener una vida significativamente más larga en comparación con las abejas de la temporada apícola activa. Las condiciones que favorecen la aparición de estas abejas no se limitan al frío invernal. De hecho, Mattila *et al.* (2007) sostienen que, si bien el descenso de temperatura es una señal importante, la baja disponibilidad de polen en el ambiente constituye uno de los factores más relevantes para la prolongación de la vida de las obreras. Esta señal es interpretada por la colonia como un indicio para reducir, e incluso detener, la postura de huevos por parte de la reina y las abejas obreras pasan a vivir más tiempo. Asociado a esto, se reportan trabajos como el de Abreu *et al.*, 2000 que sugieren como posibilidad que en este tipo de abeja se podría dar una degradación parcial del veneno almacenado en su saco, lo que explicaría en nuestro trabajo la baja cantidad de veneno y la menor concentración de melitina observadas en este

estudio (Abreu *et al.*, 2000; Omholt & Amdam, 2004).

Debido a este hallazgo, sería de interés repetir el experimento en los primeros meses de la temporada apícola en Uruguay (setiembre, octubre, noviembre o diciembre), cuando las colonias están en plena actividad y se encuentran en su etapa más productiva. Esto permitiría verificar si existen diferencias significativas en la extracción de veneno entre horarios diurnos y nocturnos con abejas en condiciones fisiológicas diferentes.

Kekeçoğlu *et al.* (2022) estudiaron la extracción de veneno en Egipto en dos horarios (diurno y nocturno), y tampoco encontraron diferencias significativas en el porcentaje de melitina ( $p = 0,13$ ). Aunque su diseño metodológico comparte similitudes con nuestro trabajo, como el uso de estimulación eléctrica y la comparación entre distintos horarios de cosecha (13:00–16:00 y 21:00–00:00) también presenta diferencias. Una diferencia importante fue la ubicación de las trampas: en su estudio, estas se colocaron en el alza de miel, mientras que en nuestro ensayo se ubicaron en el techo de la colmena. Si bien ambas son trampas internas, creemos que la trampa de techo permite visualizar el interior de la colmena durante la extracción. Se puede monitorear a través de los vidrios si las abejas están depositando correctamente el veneno, que en comparación con la trampa interna, esta última, se coloca previo al encendido de la electricidad y hasta que no se termina la cosecha y se retiran las trampas con los vidrios, no se ve si las abejas estaban picando o por ejemplo la trampa estaba mal conectada y no estaban recibiendo electricidad. También la trampa de techo es escogida por sobre una trampa interna porque las abejas si reciben una descarga eléctrica excesiva, al caer rápidamente sobre los cabezales de los cuadros de la colmena pueden recuperarse rápidamente y en la trampa interna ante la misma situación pueden tener mayores posibilidades de quedar enganchadas entre las rejillas y que esto provoque su muerte. Continuando con la comparación de los trabajos de Kekeçoğlu *et al.* (2022) y nuestro trabajo, en nuestro estudio se realizó con una única extracción con un tamaño muestral de  $n = 30$ , mientras que Kekeçoğlu *et al.* (2022) realizaron un diseño de medidas repetidas con  $n = 6$ , extrayendo veneno cada 15 días, hasta alcanzar entre 16 y 17 colectas por colmena. Esta frecuencia elevada podría haber influido en generar estrés en las colonias, afectando la cantidad y composición del veneno, como los propios autores reconocen (Kekeçoğlu *et al.*, 2022). Otra diferencia relevante fue el protocolo de estimulación eléctrica, en nuestro estudio se aplicó durante 30 minutos, mientras que en el de Kekeçoğlu *et al.* (2022) fue de 15 minutos. También difirió el manejo posterior del veneno, en nuestro caso, los vidrios se dejaron secar por 24 horas en un ambiente oscuro a temperatura ambiente y, en cambio los vidrios los autores transportaron los vidrios al laboratorio en cadena de frío y se congelaron directamente a  $-18^{\circ}\text{C}$ , sin secado previo, lo que podría haber afectado la composición final del producto. Por último, este mismo estudio analizó la evolución del porcentaje de melitina a lo largo de la temporada, entre mayo y agosto (primavera–verano en Egipto), encontrando valores más altos en agosto. Sin embargo, no extendieron su investigación hacia el otoño, por lo que se desconoce el comportamiento del veneno en periodos similares al de nuestro estudio.

Sanad y Mohanny (2013) evaluaron la influencia del horario y la época del año sobre la cantidad de veneno extraído en Egipto, desde marzo hasta noviembre. Si bien no incluyeron un horario estrictamente nocturno, el intervalo de 16:00 a 18:00 podría considerarse como tal. Los otros rangos de horario estudiados fueron de 9:00 a 11:00, de 13:00 a 15:00 y de 16:00 a 18:00. Estos autores reportaron a través de la prueba de diferencia mínima significativa (LSD por su sigla en inglés) un valor de significancia del 5%, lo que implica que las diferencias fueron significativas entre los distintos horarios de extracción. El mayor rendimiento reportado fue entre las 16:00 y 18:00 (0,166 g/día) y menor rendimiento entre las 13:00 a 15:00 (0,088 g/día). Si bien los autores Sanad y Mohanny (2013) encontraron diferencias significativas entre tratamientos mediante ANOVA, luego aplicaron la prueba LSD con un 5% como límite para establecer comparaciones entre medias. En la presente tesis se utilizó la prueba de Tukey, que es más conservadora, pero ambas tienen finalidades similares. Otro aspecto importante a resaltar es que en los resultados reportados por los autores, no queda claro si el valor informado es del promedio del mes para cada colmena o es el promedio del mes para las cuatro colmenas de un mismo tratamiento. Por otro lado, los autores llevaron adelante un diseño experimental con medidas repetidas en el tiempo, este tipo de diseño en apicultura implica el seguimiento de otros parámetros de la colmena como es el estado de desarrollo (cría y abejas adultas) durante las distintas estaciones del año ya que las colmenas experimentan dinámicas poblacionales cambiantes a lo largo del año. Si bien estos autores estudiaron el área de cría durante todos los meses del ensayo, los resultados denotan colonias de abejas con baja postura de la reina, incluso en colmenas sin tratamiento, en las épocas de mayor producción como son en primavera y verano (1817,4 y 2252,7 cm<sup>2</sup> respectivamente). Por lo que encontrar valores altos en la cantidad de veneno por colmena en colonias con baja postura, hace que los resultados sean por lo menos cuestionables. Además estos resultados pueden estar influenciados también, en parte, por la alta frecuencia de extracción que manejaron los autores y que los mismos no contemplaron la consecuencia productiva que esto genera. Por ejemplo, la recolección de veneno en abejas inmaduras que aún no han completado el saco de veneno, tendrían una composición diferente a la de una abeja pecoreadora (Bachmayer *et al.*, 1972; Owen *et al.*, 1990). Por el hecho de que la síntesis de los componentes del veneno se dan en diferentes momentos de la vida de la abeja y esto podría estar repercutiendo en la cantidad de apitoxina obtenida en los diferentes momentos de la vida (Bachmayer *et al.*, 1972). Por estas razones, en esta tesis se decidió realizar un muestreo con un número elevado de colmenas iniciales y que estas estén estandarizadas a ciertos parámetros, como la cantidad inicial de abejas por colmena, que se fijó entre 35.000 y 40.000 individuos. Cuando se reportan valores de veneno cosechado por colmena y se comparan distintos meses o períodos productivos, es esperable observar una mayor cantidad de apitoxina en aquellos momentos en que hay un mayor número de abejas. Sanad y Mohanny (2013) reportan que se registró mayor cantidad de veneno durante el verano, lo cual tiene sentido con lo comentado anteriormente ya que usualmente se esperaría una mayor producción aquí y menor cantidad de

veneno en otoño por ejemplo.

Por otra parte, Nowar, (2016) investigó la cantidad de veneno en tres horarios diferentes (10:00 – 12:00, 15:00 – 17:00 y 19:00 – 21:00), durante los tres meses de verano y el primer mes del otoño. El mayor rendimiento se obtuvo en el último horario (19:00 – 21:00), seguido por el de la mañana, y por último el de media tarde. No obstante, este estudio no reportó análisis estadístico alguno que permitiera confirmar la significancia de las diferencias observadas, por lo que sus conclusiones deben considerarse descriptivas.

### **Ensayo 3. Determinación de la cantidad y composición de la apitoxina obtenida mediante el uso de diferentes trampas de extracción**

El presente ensayo evaluó la extracción de apitoxina utilizando tres lugares diferentes de trampas eléctricas en la colmena: una trampa externa o de piquera, una trampa colocada en el techo de la colmena y una trampa interna ubicada entre los cuadros en el alza. Las trampas se instalaron en distintas ubicaciones de la colmena (piquera, alza y techo), con el objetivo de comparar la cantidad de apitoxina y su calidad medida a través del porcentaje de melitina. Los resultados obtenidos indican que la trampa de techo permitió recolectar una mayor cantidad de apitoxina en comparación con la trampa externa ( $p < 0,05$ ). No obstante, no se encontraron diferencias significativas entre la trampa interna colocada en el alza y las otras dos. En cuanto al porcentaje de melitina, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ( $p = 0,10$ ), sugiriendo que es lo mismo colocar la trampa en cualquiera de los tres lugares.

Desde un enfoque productivo, la trampa de techo presenta mejores ventajas frente a las otras trampas y pese a tratarse de una trampa interna, su diseño a diferencia de la trampa colocada en el alza permite observar el interior de la colmena a través de los vidrios y monitorear la reacción de las abejas. Por otra parte, la trampa de techo que tiene la parrilla metálica invertida permite que frente a un exceso de corriente, las abejas caigan sobre los cabezales de los cuadros y se recuperan rápidamente, en vez de permanecer en ella y seguir recibiendo corriente, lo que puede ocasionar su muerte, algo frecuente en el proceso de extracción con trampas de piquera. Además en la trampa de techo con la parrilla invertida, se genera poca contaminación de los vidrios colectores respecto a las trampas de piquera donde suelen acumularse restos de abejas, de polen o excreciones. Por otro lado, las trampas externas o de piquera presentan limitaciones operativas, ya que solo pueden emplearse durante el día, cuando las abejas se encuentran activas en el exterior de la colmena y si frente a días nublados o con ligeras lluvias que las abejas no salen de la colmena a pecorear, este método no es eficiente. En cambio, las trampas internas ubicadas en el techo de la colmena permiten realizar extracciones tanto diurnas como nocturnas y con inclemencias climáticas no del todo favorables. Esto se debe a que, al introducir la trampa en el interior, las abejas responden con actividad defensiva y pican los vidrios sin necesidad de salir al exterior.

Los resultados del presente estudio, son consistentes con los presentados por

Pérez *et al.* (2023) durante el 48° Congreso de Apimondia, donde se reportó un estudio similar llevado a cabo en diciembre de 2022, también en el apiario ubicado en Libertad, San José de Uruguay. En ese ensayo se trabajó con 20 colmenas, divididas aleatoriamente en dos grupos (trampa externa y trampa de techo), utilizando el mismo protocolo de electroestimulación (corriente alterna de 50 V, con pulsos de 5 segundos y pausas de 10 segundos durante 30 minutos por colmena). En ese estudio, la trampa de techo presentó un porcentaje promedio de melitina del 72,63%, mientras que la trampa de piquera alcanzó un 62,37%, con diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). Al comparar los resultados de ambos ensayos, se observa que los valores de melitina obtenidos en 2024 fueron notablemente inferiores (52,08% para la trampa de techo y 45,38% para la trampa de piquera). Una posible explicación para esta diferencia puede estar relacionada con la alta densidad de colmenas en el apiario durante 2024, lo cual pudo haber limitado la disponibilidad floral para las abejas pecoreadoras y por tanto, haber afectado la composición del veneno recolectado (Pérez *et al.*, 2023).

Estudios internacionales también coinciden parcialmente con nuestros hallazgos. Amro y Mohamed (2023), en un ensayo realizado durante el verano en Egipto, evaluaron la recolección de veneno con trampas eléctricas colocadas en distintas posiciones de la colmena. Al igual que en el presente trabajo, encontraron que la trampa ubicada en el techo obtuvo un mayor rendimiento ( $p < 0,05$ ). No obstante, a diferencia de nuestros resultados, estos autores reportaron que la trampa de piquera superó a la trampa interna, la cual mostró el menor rendimiento.

Por otro lado, Kekeçoğlu *et al.* (2022) compararon una trampa externa colocada en la piquera con una trampa interna ubicada en el alza, y no hallaron diferencias significativas en el porcentaje de melitina ( $p = 0,76$ ), lo cual concuerda con nuestro resultado ( $p = 0,10$ ). Cabe señalar que en nuestro caso se evaluó un tercer tratamiento, la trampa de techo, lo que amplía el enfoque experimental respecto a ese estudio.

Flanjak *et al.* (2021) también utilizaron una trampa de techo, comparándola únicamente con la trampa externa. Evaluaron tanto el porcentaje de melitina como la cantidad de apitoxina recolectada. En cuanto a la melitina, no encontraron diferencias significativas ( $p = 0,114$ ), la que coincide con nuestro estudio. Sin embargo, reportaron valores promedio más elevados (entre 51% y 69%) en comparación con los nuestros (45% a 52%). Aunque hay diferencias metodológicas y ambientales, ambos estudios se desarrollaron durante el verano, nuestra investigación se realizó hacia el final de la estación (transición entre verano y otoño), momento en que la disminución de recursos alimentarios y la preparación de las colmenas para el invierno podrían haber influido negativamente en la calidad del veneno. Respecto a la cantidad de apitoxina recolectada, Flanjak *et al.* (2021) sí encontraron diferencias significativas ( $p < 0,001$ ), lo cual es consistente con nuestros resultados. Aunque ellos utilizaron solo dos trampas, el análisis estadístico en nuestro caso también indicó diferencias significativas ( $p < 0,001$ ), con el test de Tukey, mostrando que estas diferencias se daban entre la trampa de techo y la trampa externa. Es relevante mencionar que, en el estudio citado, la trampa de

techo consistía en una trampa de piquera adaptada al techo y cubierta con una cúpula transparente, cuyo propósito era potenciar la liberación de feromonas de alarma y así aumentar la recolección de veneno. Los vidrios que se colocan en la trampa utilizada en este estudio pueden cumplir la función mencionada por los otros autores.

#### **Ensayo 4. Determinación de la influencia del estado de madurez de las abejas sobre la composición del veneno**

El cuarto ensayo se centró en comparar el porcentaje de melitina del veneno cosechado en abejas maduras y jóvenes resultado de la división de colmenas, lo que permitió distinguir entre abejas jóvenes (< tres semanas aprox.) y maduras (> tres semanas aprox.). Los resultados indicaron que las abejas jóvenes presentaron un mayor porcentaje de melitina en comparación con las maduras ( $p < 0,05$ ), confirmando así la hipótesis de que la edad de las abejas influye significativamente en la composición del veneno. Este hallazgo adquiere relevancia práctica, ya que la edad de las obreras al momento de la extracción podría considerarse un factor estratégico en la optimización del contenido de melitina. Biológicamente, las abejas obreras nacen con el saco de veneno vacío y lo comienzan a sintetizar progresivamente durante las tres primeras semanas de vida (Bridges & Owen, 1984; Dotimas & Hider, 1987), período que coincide con el inicio de sus tareas fuera de la colmena. La coexistencia de abejas de distintas edades dentro de una colmena productiva (Wilson-Rich *et al.*, 2014) representa una dificultad para estandarizar la extracción dirigida a una franja etaria específica. Sin embargo, los resultados sugieren que realizar la extracción de apitoxina durante las horas del mediodía, cuando las abejas maduras se encuentran pecoreando, podría aumentar la proporción de abejas jóvenes en contacto con la trampa sin necesidad de dividir la colmena. Aunque se realizó un ensayo que comparó la extracción en distintos momentos del día (diurno vs. nocturno), no se observaron diferencias significativas ni en la cantidad de veneno recolectado ( $p = 0,15$ ) ni en el porcentaje de melitina ( $p = 0,75$ ). Cabe destacar que dicho ensayo se llevó a cabo a finales del verano, momento en que las colmenas del sur del país suelen experimentar una disminución poblacional y una menor disponibilidad floral en el ambiente, lo cual podría haber afectado la nutrición y fisiología de la colonia de abejas (Arnold *et al.*, 2013). Además, es posible que las abejas hayan extendido su longevidad como estrategia adaptativa para maximizar la recolección de recursos antes del invierno, por menos disponibilidad floral y específicamente de polen (Mattila *et al.*, 2007; Montenegro, 2016; Wilson-Rich *et al.*, 2014).

La relación entre tipo de trampa y edad de las abejas también resulta relevante. En los ensayos previos, se observó que las trampas internas (alza y techo) recolectaron mayor cantidad de veneno que la trampa de piquera, la cual es frecuentada principalmente por abejas maduras. Si bien las diferencias en porcentaje de melitina no fueron estadísticamente significativas, los promedios fueron más altos en las trampas internas, lo cual sugiere que estos dispositivos podrían estar recolectando

veneno de abejas más jóvenes.

Diversas investigaciones han abordado la relación entre edad y composición del veneno, aunque muchas veces sin considerar variables metodológicas como el tipo de trampa o el horario de extracción. Estas variables pueden estar influenciadas indirectamente por factores biológicos, como la dinámica poblacional de la colmena y el polietismo etario. En este contexto, la edad de las abejas podría constituir un factor más determinante que otros aspectos experimentales.

Por ejemplo, Baracchi *et al.* (2010) evaluaron la composición del veneno de abejas nodrizas, guardianas y pecoreadoras mediante MALDI-TOF, extrayendo veneno directamente del aguijón. Sus resultados mostraron que las abejas nodrizas tenían menor porcentaje de melitina en comparación con las otras categorías de abejas obreras, lo cual difiere de los resultados de esta tesis. Sin embargo, las diferencias metodológicas, tanto en la obtención de las abejas como en la extracción y análisis del veneno, impiden una comparación directa. Un estudio más antiguo, como el de Bachmayer *et al.* (1972), también identificó la presencia de melitina y promelitina entre los días 8 y 10 de vida de las abejas, seguido de una disminución de su concentración. Si bien este estudio no se extiende más allá del día 20, sus hallazgos coinciden en parte con los observados en el presente trabajo. Por otro lado, Dong *et al.* (2015) realizaron la comparación de la composición del veneno en el día del nacimiento de la abeja y el día 25 de vida. La extracción del veneno se realizó por anestesia de las abejas con hielo, seguido de la extirpación completa del aparato del veneno con pinzas y el saco del veneno luego se centrifugó y se lavó con agua, al sobrenadante se lo analizó por HPLC-IFD. Los autores reportaron un aumento marcado de melitina si comparan ambas extracciones, sin embargo, visto que se estudió la melitina en las abejas recién nacidas y se conoce que estas nacen con el saco del veneno vacío, los valores iniciales bajos no resultan sorprendentes y no invalidan la tendencia identificada en esta tesis (Bridges & Owen, 1984; Dong *et al.*, 2015; Dotimas & Hider, 1987).

En conjunto, los resultados presentados refuerzan la hipótesis de que la edad de las abejas influye de manera significativa en la composición de la apitoxina, particularmente en el contenido de melitina. Esta relación podría tener aplicaciones prácticas relevantes para el desarrollo de protocolos de extracción más eficientes y estandarizados, que apunten a maximizar la calidad del producto.

Si bien el presente trabajo representa un avance importante en esta dirección, aún se requiere evidencia adicional. Estudios como el de Abreu *et al.* (2000), que analizaron el contenido total de proteínas en abejas de distintas edades y los autores, reportan que las abejas de mayor edad (28 días de edad) tienen cantidades de proteínas totales menores que en las abejas jóvenes (desde 14 a 21 días de edad). Estos autores, plantean que esta variación en la cantidad de proteínas totales puede deberse a la degradación o reabsorción de algunos componentes en el saco del veneno. Esto induce la pregunta, de qué sucede con el veneno en abejas con más de treinta o cuarenta días en por lo menos dos épocas del año, una en temporada apícola y otra fuera de la temporada. Para ello, el grupo de trabajo de esta tesis, plantea abordar esta interrogante en futuras investigaciones. Se propone

realizar un ensayo que dure por lo menos treinta y cinco días, extrayendo veneno de abejas de edad conocida y analizando su composición mediante HPLC. El objetivo será caracterizar no solo el contenido de melitina, sino también otros componentes relevantes como apamina, fosfolipasa A2 y el péptido degranulador de mastocitos, lo cual permitirá comprender con mayor precisión la evolución química del veneno a lo largo del desarrollo de las obreras en Uruguay.

En este ensayo se analizó exclusivamente la concentración de melitina presente en el veneno de abejas, sin realizar la cuantificación de la apitoxina cosechada en cada grupo. Esta decisión metodológica respondió a la hipótesis de que, en abejas jóvenes, ellas presumiblemente aún no han completado el saco de veneno, y se esperaba que la cantidad total de veneno cosechado fuera naturalmente menor, atribuible únicamente a un factor etario y no a condiciones experimentales o ambientales externas.

### **Ensayo 5. Determinación de la cantidad de apitoxina cosechada mediante el uso de trampas de techo con diferentes áreas**

Con el objetivo de responder una interrogante práctica sobre la influencia del área de la trampa en la recolección de veneno, se diseñó un nuevo experimento que evaluó diferentes áreas activas de picado de la abeja en las trampas de techo. La hipótesis planteaba que la variación en el área de exposición no afectaría significativamente la cantidad de apitoxina recolectada. Sin embargo, los resultados obtenidos rechazan dicha hipótesis, ya que solo la trampa que cubría el 100% del techo produjo una cantidad significativamente mayor de veneno ( $p < 0,05$ ).

Este experimento con fines productivos buscó optimizar el diseño de las trampas en términos de manejo operativo. El trabajo con vidrios presenta diversas complicaciones, como su fragilidad durante la manipulación, el peso que representa el transporte del material y el tiempo requerido para el raspado del veneno seco. Por ello, se planteó la posibilidad de reducir el área de exposición sin comprometer la cantidad de veneno recolectado. Sin embargo, los resultados indicaron que únicamente la trampa de cobertura total es más efectiva, lo que limita las posibilidades de rediseño sin pérdida productiva.

En relación con estos hallazgos, es pertinente comparar los datos obtenidos con los reportados por Serrinha *et al.* (2019), quienes emplearon trampas de techo con vidrios adjuntos y una área de exposición de 1089 cm<sup>2</sup>, obteniendo tras 16 extracciones una media de 272 mg de veneno recolectado. Es decir que por cada extracción de apitoxina obtuvieron 17 mg en promedio de apitoxina ( $272/16 = 17$ ). En contraposición, en el presente estudio, la trampa que cubría el 100% del techo tenía un área de 1620 cm<sup>2</sup>, y la media de apitoxina recolectada fue de 101,28 mg. Las dimensiones de las trampas difieren, y la comparación debe ser contextualizada cuidadosamente. En primer lugar, entre ambos estudios, las diferencias en el área de las trampas por tamaños y formas de las colmenas diferentes. En el estudio de Serrinha *et al.* (2019), las colmenas eran de base cuadrada (33 x 33 cm), mientras que en nuestro caso eran colmenas tipo Langstroth y las trampas activa eran de

46,5 x 38 cm, teniendo en el primer caso un área activa de trampa de 1089 cm<sup>2</sup> y de 1620 cm<sup>2</sup> en el presente trabajo, lo que incompatibiliza la comparación directa entre los trabajos. Seguido que, el protocolo de extracción también difiere significativamente. Serrinha *et al.* (2019) realizaron extracciones durante una hora, con una frecuencia de 16 extracciones mensuales durante un mes, siendo un régimen intensivo de recolección y eso se puede haber visto reflejado en los resultados que en promedio son muy bajos. Por el contrario, en el presente estudio se llevó a cabo una única extracción, lo que naturalmente genera valores más altos de rendimiento.

Estas consideraciones ponen en evidencia que, si bien el área de la trampa influye en la cantidad de apitoxina obtenida, la frecuencia de extracción y el diseño del ensayo son factores igualmente determinantes. No obstante, los resultados indican que, bajo condiciones controladas y con una única extracción, maximizar el área de exposición es indispensable para obtener rendimientos significativos en la cosecha de veneno.

En este ensayo se realizó únicamente la cuantificación de la apitoxina cosechada, sin analizar la concentración específica de melitina. Esta decisión respondió al objetivo de este ensayo, que fue evaluar el rendimiento en términos de cantidad total de veneno recolectado. En este contexto, la variación en la concentración de melitina no constituía una variable de interés, dado que se trabajó con colmenas que se encontraban ubicadas en un mismo apiario, bajo condiciones ambientales y de disponibilidad alimentaria similares, lo que permitía asumir que no existían diferencias significativas en la composición del veneno, particularmente en lo referente a la proporción de melitina. Por lo tanto, se consideró metodológicamente adecuado focalizar el análisis en la cantidad de apitoxina.

En conclusión de esta sección, los distintos ensayos desarrollados en esta investigación abordan diversos factores con impacto productivo en la producción de apitoxina, tanto en cantidad como en calidad medida a través del porcentaje de melitina. Los objetivos específicos de la presente tesis buscan apuntar a responder interrogantes relevantes para los productores, muchas de las cuales no estaban claramente formuladas y/o abordadas desde la investigación científica.

Uno de los principales aportes fue evaluar si el cubrir los vidrios colectores de apitoxina con guantes de látex era una práctica efectiva, ya que es recomendada por algunos productores pero validación científica era escasa (Hegazi *et al.* 2017; Uruguay Miel, 2021). Los resultados obtenidos en trampas externas con vidrios cubiertos por látex no evidenciaron mejoras en la cantidad ni en el porcentaje de melitina. Por el contrario, los vidrios sin recubrimiento presentaron mejores resultados, lo cual cuestiona su uso.

En cuanto al estudio del efecto del horario de extracción (diurno o nocturno) sobre la cantidad y porcentaje de melitina de la apitoxina cosechada, no se encontraron diferencias significativas. Esto sugiere que la decisión del horario de extracción podría basarse en otros factores. Por ejemplo, por el comportamiento defensivo de las colonias, durante la extracción diurna, es más riesgoso para los animales y las

personas en el entorno de las colmenas, mientras que en una cosecha nocturna reduciría ese riesgo, ya que las abejas se tranquilizaran para el amanecer.

Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los horarios, es importante destacar que los valores obtenidos, especialmente en el porcentaje de melitina, fueron bajos (media de 37,76 y 36,63 %). Estos son valores que se encuentran por debajo de lo reportado comúnmente (40–60% en base seca, según FAO, 2021). Estos valores bajos de melitina se observaron tanto en extracciones diurnas como nocturnas, por lo que no creemos que no respondan al horario en sí, sino posiblemente al momento del año en que se realizó el ensayo, en marzo, fuera de la temporada apícola. Una posible explicación puede ser la dinámica poblacional de las colmenas en esa época en el sur de Uruguay. En particular, se plantea la influencia de la abeja diutina: una abeja obrera longeva que aparece en momentos de escasez floral (no solo en invierno), y cuya fisiología podría afectar la composición del veneno (Mattila *et al.*, 2007; Omholt & Amdam, 2004). Estudios previos como el de Abreu *et al.*, 2010 señalan que estas abejas pueden presentar veneno parcialmente degradado o reabsorbido, lo que coincide con los hallazgos de la presente tesis.

El ensayo sobre los distintos tipos de trampas aportó información valiosa para la toma de decisiones productivas. Si bien este factor ha sido estudiado por diversos autores, muchas veces resulta difícil comparar los trabajos existentes debido a la grandes diferencias que existe en ellos como el empleo de distintos equipos de extracción, los protocolos de electroestimulación usados, los tipos y ubicaciones de las trampas, así como la falta de información sobre el estado de desarrollo de las colonias. Por ello, se consideró necesario estudiar este aspecto bajo nuestras condiciones y con los tipos de trampas que suelen emplear los apicultores locales.

Los resultados obtenidos confirmaron que las trampas internas permiten recolectar una mayor cantidad de veneno que las externas, sin detectar diferencias significativas en su porcentaje de melitina. En particular, la trampa de techo utilizada, fue un modelo diseñado a partir de referencias bibliográficas y adaptado por la Facultad de Veterinaria. Estas trampas poseen un área activa de 1620 cm<sup>2</sup> y presentan varias ventajas logísticas y de seguridad frente a otros tipos, como que permiten trabajar de día o de noche, incluso en días nublados. También reducen la actividad externa de la colmena sobre todo si se emplea por la noche, lo que representa un beneficio en términos de seguridad para el entorno (animales o personas). Los vidrios se colocan por encima de la parrilla metálica, lo que hace que las abejas piquen y depositen su veneno en contra de la gravedad y esto colabora a que la apitoxina depositada tenga menor acumulación de contaminantes de los que normalmente se encuentran con trampas como las externas.

Por otro lado, estas trampas también presentan ciertas desventajas. Los vidrios utilizados son más grandes (36 cm de largo por 15 cm de ancho) que los empleados en trampas externas, lo que vuelve poco práctico el uso de látex como recubrimiento debido a la complejidad logística de su colocación. Sin embargo, dado que en esta tesis se observó que los vidrios con recubrimiento de látex no ofrecen buenos resultados para la cantidad de apitoxina o en el porcentaje de melitina, se

recomienda no emplearlos tampoco en este tipo de trampa. Otra limitación, puede ser el costo de fabricación por la dimensión de la parrilla metálica (45 cm de largo y 36 cm de ancho) y la manipulación de los vidrios, que suelen ser pesados y frágiles, lo cual podría dificultar su implementación a gran escala. En este sentido, en otro ensayo de la tesis se evaluó la posibilidad de reducir el área activa de la trampa, pero los resultados indicaron que al disminuir dicha área también se reduce la cantidad de apitoxina cosechada, lo que en principio limita esta alternativa.

Finalmente, el ensayo sobre la maduración de las abejas demostró ser uno de los más relevantes de la investigación. Se observó que las abejas jóvenes producen una mayor concentración de melitina que las abejas maduras. Este hallazgo permite explicar parte de la variabilidad en la apitoxina reportada por otros estudios y subraya la importancia de considerar la edad de las abejas como un factor crítico en la extracción. Este hallazgo ayuda a interpretar algunos de los resultados obtenidos en los otros ensayos, como los bajos niveles de melitina observados, y destaca la necesidad de considerar el estado etario de la colmena en general al momento de la recolección. Este conocimiento abre nuevas posibilidades para estandarizar protocolos y mejorar la calidad del producto final. Para avanzar en esta línea, será necesario realizar estudios más específicos, analizando la composición del veneno según la edad de las abejas cada cinco días, y comparando estos datos en distintos momentos del año (dentro y fuera de la temporada apícola).

Además de las implicancias prácticas reportadas aquí, los hallazgos de esta tesis permiten identificar nuevas preguntas de investigación orientadas a la mejora continua de la apitoxina como producto apícola de valor.

## CONCLUSIONES

Los ensayos llevados adelante en el marco de esta tesis buscaron responder aspectos relevantes de la producción de apitoxina que han sido poco considerados y/o tratados superficialmente en la literatura científica. Los ensayos se realizaron en colmenas en condiciones de producción, uno de ellos en un apiario comercial en Rivera y los restantes en el apiario experimental en el campo N°2 de la Facultad de Veterinaria (UdelaR) en San José.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de la presente tesis consideramos que: 1) Es desaconsejable la utilización del látex para cubrir los vidrios de las trampas ya que no mejoran la cantidad ni el porcentaje de melitina de la apitoxina cosechada además de generar un costo extra y el riesgo de dejar en la apitoxina un contaminante muy alergeno como es el látex. 2) No hay diferencias en la cantidad de apitoxina ni en el porcentaje de melitina respecto a si se cosecha de día o de noche, por lo que los apicultores pueden realizar indistintamente cualquiera de ellas. 3) La trampa de techo mostró ser mejor que la externa en la cantidad de apitoxina colectada, no existiendo diferencias entre las 3 trampas en el porcentaje de melitina. 4) La apitoxina de abejas jóvenes mostraron un porcentaje de melitina mayor que las abejas maduras, lo que refuerza la idea de que la edad de las abejas es un factor relevante en la variabilidad del porcentaje de melitina lo que podría explicar el mayor porcentaje de melitina en trampas internas que externas por el polietismo etario, y la diferencia que podemos encontrar a lo largo de la temporada, de acuerdo a si hay una gran población de abejas jóvenes o si por razones de disponibilidad de recursos o climáticas la reducción de la cría ocasiona que las abejas sean más longevas (abejas diutinas). 5) La reducción del área efectiva de la trampa redujo la cantidad de apitoxina colectada y de acuerdo a esto debería mantenerse el área actual de la trampa.

## FACTORES DE INTERFERENCIA Y PERSPECTIVA DE MEJORA

Al inicio de esta tesis consideramos una temporada de cosecha de apitoxina basada en que las colmenas estuvieran con una buena población de abejas y una buena actividad de colecta de recursos. Este periodo se extiende de octubre a abril en el Campo Experimental N°2 de Facultad de Veterinaria ubicado en San José, con una pausa en enero y febrero debido a la sequía de verano. En ningún ensayo estandarizamos colmenas, como se realiza habitualmente retirando cuadros de cría por nacer de colonias desarrolladas y aportando a las colonias menos desarrolladas, ya que entendíamos que eso podría afectar la composición etaria de las colonias y por ende a los resultados ya que se estaría envejeciendo la población de la colonia donante y aportando muchas abejas jóvenes a la colmena receptora, lo que hicimos fue partir de un número alto de colmenas y seleccionar aquellas que tenían un grado de desarrollo similar. Sin embargo, el comportamiento de las colonias es diferente en la primavera e inicio del verano que al final del verano e inicio del otoño. Esto nos hace pensar que una misma colonia a lo largo de la temporada va a ir variando su composición etaria y por ende la composición de la apitoxina colectada, de esta forma posiblemente la edad de las abejas termine siendo un factor principal en la variabilidad de la composición de la apitoxina, y la mayor cantidad de abejas jóvenes, maduras, o longevas (diutinas) de una colonia va a ser una respuesta a la cantidad de cría que se esté produciendo y a la cantidad de recursos que se están colectando en determinado período, por lo que se debe profundizar en esta línea, porque entender a fondo este aspecto pasa a ser fundamental para el desarrollo de protocolos para la producción de apitoxina y para la biodirigir la composición de la misma.

En función de lo anterior se considera que a) se debe repetir en primavera algunos ensayos que se realizaron al final del verano e inicio del otoño a efectos de ver si de ese modo se encuentran diferencias en el porcentaje de melitina en los distintos tipos de trampa y en la cosecha diurna y nocturna; b) realizar el seguimiento del porcentaje de melitina de la apitoxina colectada a un grupo de colmenas a lo largo de la temporada, evaluada mediante análisis de imágenes el área de cría; c) en el período final del verano a principio del otoño, evaluar el efecto de la estimulación con jarabe y la suplementación proteica sobre el área de cría y el porcentaje de melitina de la apitoxina colectada; d) recolectar apitoxina de abejas con edad conocida (ej. 7, 14, 21, 28, 35, 42 y 49 días) para ver el porcentaje de cuatro componentes de la apitoxina (melitina, apamina, fosfolipasa y péptido degranulador de mastocitos); e) trabajar con abejas marcadas al nacer e introducidas en colmenas para establecer su duración en primavera e inicio del verano y finales del verano y principios del otoño.

Por otra parte, consideramos que se debe seguir estudiando la posibilidad de disminuir el área de la trampa de techo con los siguientes ensayos: i) repetir el ensayo comparando diferentes áreas en condiciones de producción comercial, donde una trampa con los mismos vidrios es utilizada en varias colmenas, ya que en esas condiciones las abejas van en mayor número y más rápido a la trampa una vez que ya tiene apitoxina depositada y ii) aumentar el tiempo con la trampa encendida a medida que se disminuye el área efectiva.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abd El-Wahed, A.A., Khalifa, S.A. M., Sheikh, B.Y., Farag, M.A., Saeed, A., Larik, F.A., Koca-Caliskan, U., AlAjmi, M.F., Hassan, M., Wahabi, H.A., Hegazy, M.-E. F., Algethami, A. F., Buttner, S., & El-Seedi, H. R. (2018). Bee venom composition: From chemistry to biological activity. In A. Atta-ur-Rahman (Ed.), *Studies in natural products chemistry* (Vol. 60, pp. 459–484). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-444-64181-6.00013-9>
- Abdu Al-Sami, M. (2012). Studies on Bee Venom and Its Medical Uses. *International Journal of Advancements in Research & Technology*, 1(2), 1-15.
- Abreu, R.M.M., Moraes, R.L.M., & Malaspina, O. (2000). Histological aspects and protein content of *Apis mellifera* L. worker venom glands: the effect of electrical shocks in summer and winter. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6, 87-98. <https://doi.org/10.1590/S0104-79302000000100006>
- Ahmed, R. (2024). Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC): Principios, aplicaciones, versatilidad, eficiencia, innovación y análisis comparativo en la química analítica moderna y en las ciencias farmacéuticas. *Investigación clínica*, 14 (9), artículo 18065.
- Amro, A.M., & Mohamed, D.S. (2023). Impact of bee venom collector equipment positions on the productivity of venom extracted from Carniolan, Buckfast, and Italian honeybee hybrids in Upper Egypt. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences. Series A, Entomology*, 16(1), 189–197. <https://doi.org/10.21608/eajbsa.2023.295885>
- An, H.J., Kim, J.Y., Kim, W.H., Gwon, M.G., Gu, H.M., Jeon, M.J., Han, S.M., Pak, S.C., Lee, C.K., Park, I.S., & Park, K.K. (2018). Therapeutic effects of bee venom and its major component, melittin, on atopic dermatitis in vivo and in vitro. *British journal of pharmacology*, 175(23), 4310–4324. <https://doi.org/10.1111/bph.14487>
- Apicultura sin Fronteras. (2022, septiembre 18). Extracción de apitoxina: obtención casera y manipulación para uso en salud humana #apicultura [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=vTtXXjuNb4s>
- Araneda, X., Leichtle, Y., & Morales, D. (2011). Evaluación de dos frecuencias de colecta de apitoxina extraída de colmenas de *Apis mellifera* L. durante la época estival en la Región de La Araucanía. *IDESIA (Chile)*, 29(2), 145–150. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292011000200019>
- Argena, N., Tananaki, C., Thrasyvoulou, A., Goras, G., Kanelis, D., & Liolios, V. (2021). Seasonal variation on bee venom collection. The impact on some biological aspects on *Apis mellifera*. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 72(2), 2861-2868.
- Arnold, P.A., Johnson, K.N., & White, C.R. (2013). Physiological and metabolic consequences of viral infection in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, 216(17), 3350–3357. <https://doi.org/10.1242/jeb.088138>

- Asarian, L., & Langhans, W. (2010). A new look on brain mechanisms of acute illness anorexia. *Physiology & Behavior*, 100(5), 464–471. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2010.04.009>
- Bachmayer, H., Kreil, G., & Suchanek, G. (1972). Synthesis of promelittin and melittin in the venom gland of queen and worker bees: Patterns observed during maturation. *Journal of Insect Physiology*, 18, 1515–1521. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(72\)90230-2](https://doi.org/10.1016/0022-1910(72)90230-2)
- Banks, B.E.C., & Shipolini, R.A. (1986). Chemistry and pharmacology of honey-bee venom. En T., Piek (Ed.). *Venoms of the Hymenoptera: Biochemical, Pharmacological and Behavioural Aspects* (pp. 329-416). Orlando: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-554770-3.50011-5>
- Baracchi, D., & Turillazzi, S. (2010). Differences in venom and cuticular peptides in individuals of *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) determined by MALDI-TOF MS. *Journal of Insect Physiology*, 56(2), 366–375. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.11.013>
- Barker, S.A., Bayyuk, S.I., Brimacombe, J.S., & Palmer, D.J. (1963). Characterization of the products of the action of bee venom hyaluronidase. *Nature*, 199(4894), 693-694. [doi:10.1038/199693a0](https://doi.org/10.1038/199693a0)
- Bava, R., Castagna, F., Musella, V., Lupia, C., Palma, E. & Britti, D. (2023). Therapeutic Use of Bee Venom and Potential Applications in Veterinary Medicine. *Veterinary sciences*, 10(2), 119. <https://doi.org/10.3390/vetsci10020119>
- Benton, A.W., Morse, R.A., & Kosikowski, F.V. (1963). Bioassay and standardization of venom of the honey bee. *Nature*, 198(4877), 295-296. <https://doi.org/10.1038/198295b0>
- Benton, A., & Morse, R. (1966). Recolección de la fracción líquida del veneno de abeja. *Nature*, 210, 652–653. <https://doi.org/10.1038/210652b0>
- Bessis, N., Doucet, C., Cottard, V., Douar, A.M., Firat, H., Jorgensen, C., Mezzina, M., & Boissier, M.C. (2002). Gene therapy for rheumatoid arthritis. *The Journal of Gene Medicine*, 4(6), 581–591. <https://doi.org/10.1002/jgm.325>
- Bieber, T., & Bruijnzeel-Koomen, C. (1990). La cellule de Langerhans dans la physiopathologie de la dermatite atopique [Langerhans cells in the physiopathology of atopic dermatitis]. *Annales de dermatologie et de venerologie*, 117(3), 185–193.
- Bobış O. (2022). Plants: Sources of Diversity in Propolis Properties. *Plants*, 11(17), 2298. <https://doi.org/10.3390/plants11172298>
- Branchiccela, B., Aguirre, C., Parra, G., Estay, P., Zunino, P., & Antúnez, K. (2014). Genetic changes in *Apis mellifera* after 40 years of Africanization. *Apidologie*, 45(6), 752–756. <http://dx.doi.org/10.1007/s13592-014-0293-2>
- Bridges, A., & Owen, M. (1984). The Morphology of the Honey Bee (*Apis mellifera* L.) Venom Gland and Reservoir. *Journal of Morphology*, 181, 69-86. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051810107>

- Carpena, M., Nuñez-Estevez, B., Soria-Lopez A., & Simal-Gandara, J. (2020). Bee Venom: an updating review of its bioactive molecules and its health applications. *Nutrients*, 12(11), 1-27. <https://doi.org/10.3390/nu12113360>
- Chen, J., Guan, S.-M., Sun, W., & Fu, H. (2016). Melittin, the major pain-producing substance of bee venom. *Neuroscience Bulletin*, 32(3), 265–272. <https://doi.org/10.1007/s12264-016-0024-y>
- Cho, S.Y., Shim, S.-R., Rhee, H.Y., Park, H.-J., Jung, W.-S., Moon, S.-K., Park, J.-M., Ko, C.-N., Cho, K.-H., & Park, S.-U. (2012). Effectiveness of acupuncture and bee venom acupuncture in idiopathic Parkinson's disease. *Parkinsonism & Related Disorders*, 18(8), 948–952. <https://doi.org/10.1016/j.parkreldis.2012.04.030>
- CENITAgropecuário. (2022, 18 de marzo). Apitoxina veneno de abeja (extracción) [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=wzyjJjov5rs>
- Consortio Apícola de México. (2019, 6 de noviembre). Extractor de apitoxina [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=dCuj1rYCsVs>
- Cordara, J. (2005). La Historia de la Apicultura en el Uruguay. Montevideo: Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad de la Empresa.
- Costa, A. L. G., Brito, J. C. M., Almeida, M. O., Gomes, M. P., & Calaça, P. (2025). Unbounded bees: A systematic review and meta-analysis investigating pesticide contamination in Brazilian bees and hive products. *Journal of Hazardous Materials Advances*, 17, 100632. <https://doi.org/10.1016/j.hazadv.2025.100632>
- Damianoglou, A., Rodger, A., Pridmore, C., Dafforn, T.R., Mosely, J.A., Sanderson, J.M., & Hicks, M.R. (2010). The synergistic action of melittin and phospholipase A2 with lipid membranes: development of linear dichroism for membrane-insertion kinetics. *Protein and peptide letters*, 17(11), 1351–1362. <https://doi.org/10.2174/0929866511009011351>
- Das, A., Sau, S., Pandit, M.K., & Saha, K. (2018). A review on: Importance of pollinators in fruit and vegetable production and their collateral jeopardy from agro-chemicals. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6(4), 1586–1591. [10.13140/RG.2.2.18277.24807](https://doi.org/10.13140/RG.2.2.18277.24807)
- De Graaf, D.C., Brochetto Braga, M.R., Magalhães de Abreu, R.M., Blank, S., Bridts, C.H., De Clerck, L.S., Devreese, B., Ebo, D.G., Ferris, T.J., Hagendorens, M.M., Justo Jacomini, D.L., Kanchev, I., Kokot, Z.J., Matysiak, J., Mertens, C., Sabato, V., Van Gasse, A.L., & Van Vaerenbergh, M. (2020). Standard methods for Apis mellifera venom research. *Journal of Apicultural Research*, 59(5), 1–31. <https://doi.org/10.1080/00218839.2020.1801073>
- De Roodt, A.R., Salomón, O.D., Orduna, T.A., Robles, L.E., Paniagua, J.F., & Alagón, A. (2005). Envenenamiento por picaduras de abeja. *Gaceta Médica de México*, 141(3), 215-222.
- Delaplane, K., Van Der Steen, J., & Guzman-Novoa, E. (2013). Standard methods for estimating strength parameters of Apis mellifera. *Journal of Apicultural Research*, 52(1), 1–12. <http://dx.doi.org/10.3896/IBRA/1.52.1.03>
- Demolin, G.L., & Leite, S. (2005). Apitoxina. *Unimontes Científica*. Recuperado de <https://www.periodicos.unimontes.br/index.php/unicientifica/article/view/2422>

- Devi, A., Sangeeta, N.R., & Kaur, J. (2016). Honey bee venom and its composition: Focusing on different *Apis* species—a review. *Journal of Basic and Applied Engineering Research*, 3(1), 2350–2357.
- Dietemann, V., Nazzi, F., Martin, S. J., Anderson, D., Locke, B., Delaplane, K. S., Wauquiez, Q., Tannahill, C., Frey, E., Ziegelmann, B., Rosenkranz, P., & Ellis, J. D. (2013). Standard methods for varroa research. In V. Dietemann, J. D. Ellis, & P. Neumann (Eds.), *The COLOSS BEEBOOK, Volume II: Standard methods for *Apis mellifera* pest and pathogen research*. *Journal of Apicultural Research*, 52(1). <https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.1.09>
- Dong, J., Ying, B., Huang, S., Ma, S., Long, P., Tu, X., Yang, W., Wu, Z., Chen, W., & Miao, X. (2015). High-performance liquid chromatography combined with intrinsic fluorescence detection to analyse melittin in individual honeybee (*Apis mellifera*) venom sac. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, 1002, 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2015.08.014>
- Dotimas, E.M., & Hider, R.C. (1987). Honeybee venom. *Bee World*, 68(2), 51-70. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1987.11098915>
- El-Bahnasy, S.A., Mahfouz, H.M., El-Shibiny, A.A., & El-Bassiony, M.N. (2017). Effect of some factors on honey bee venom production from different strains. *SINAI Journal of Applied Sciences*, 6(1), 59-66. <https://doi.org/10.21608/sinjas.2017.78689>
- El-Bassiony, M.N., Mahfouz, H.M., Abou El-Enain, H.T., & Badawy, E.A. (2016). Study some factors which affecting of increase secretion of honey bee worker venom gland. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 7(8), 541-547.
- Ferreira Junior, R.S., Sciani, J.M., Marques-Porto, R., Lourenço Junior, A., Orsi, R., Barraviera, B., & Pimenta, D.C. (2010). Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A<sub>2</sub> levels. *Toxicon*, 56(3), 355–360. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.023>
- Flanjak, I., Kovačić, M., Primorac, L., Soldić, A., Puškadija, Z., & Bilić Rajs, B. (2021). Comparison between the quantity and quality of honey bee venom collected in the front and inside of the hive. *Journal of Apicultural Research*, 63(3), 584–589. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1994262>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2021). Good beekeeping practices for sustentable apiculture. Roma: FAO.
- Fouad, S., Monir, R., Ibrahim, F.A., Hegazi, A.G., & El Gendy, A. (2023). Bee venom an ingredient to be added to honey to feel energetic. *Egyptian Journal of Chemistry*, 66(11), 225–231. <https://doi.org/10.21608/ejchem.2023.195717.7632>
- Gallai, N., Salles, J.M., Settele, J., & Vaissière, B.E. (2009). Economic valuation of the vulnerability of world agriculture confronted with pollinator decline. *Ecological Economics*, 68(3), 810–821. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2008.06.014>
- Gu, H., Han, S.M., y Park, K.K. (2020). Therapeutic effects of apamin as a bee venom component for non-neoplastic disease. *Toxins*, 12(3), 195. <https://doi.org/10.3390/toxins12030195>

- Gunnison, A.F. (1966). An Improved Method for Collecting the Liquid Fraction of Bee Venom. *Journal of Apicultural Research*, 5(1), 33-36. <http://dx.doi.org/10.1080/00218839.1966.11100129>
- Habermehl, G.G. (1981). Arthropoda. En *Animales venenosos y sus toxinas* (pp. 21-91). Berlín: Springer.
- Haggag, S.I., Abed Al-Fattah, M.A., Ewies, M.A., & El-Feel, M.A. (2015). Effect of honeybee venom collection from different races on honey area. *Academia Journal of Entomology*, 8(4), 190–192. 10.5829/idosi.aje.2015.8.4.10242
- Han, S.M., Hong, I.P., Woo, S.O., Chun, S.N., Park, K.K., Nicholls, Y.M., & Pak, S.C. (2015). Los efectos beneficiosos del suero de veneno de abeja sobre las arrugas faciales en humanos. *Intervenciones clínicas en el envejecimiento*, 10, 1587–1592. <https://doi.org/10.2147/CIA.S84940>
- Hegazi, A.G., Abd Allah, F.M., Saleh, A.A., Abdou, A.M., & Fouad, E.A. (2017). Antibacterial activity of Italian (*Apis mellifera*) bees venom. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 10(3), 1188-1192.
- Hildebrandt, J.-P., Teuscher, E., & Lindequist, U. (2023). *Natural poisons and venoms, animal toxins* (Cap. 3, pp. 231–249). Founded by Eberhard Teuscher and Ulrike Lindequist. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.
- Hussein A.E., El-Ansari M.K., & Zahra A.A. (2019). Effect of the honeybee hybrid and geographic region on the honey bee venom production. *Journal of Plant Protection and Pathology*, 10(3) 171 - 176. <https://dx.doi.org/10.21608/jppp.2019.40922>
- Invernizzi, C., Santos, L.E., García, E., Daners, G., Di Landro, R., Saadoun, A., & Vique, C.C. (2011). Sanitary and nutritional characterization of honeybee colonies in Eucalyptus grandis plantations. *Archivos de zootecnia*, 60(232), 1303-1314. <http://dx.doi.org/10.4321/S0004-05922011000400045>
- Kazlauskas, N., Klappenbach, M., Depino, A.M., & Locatelli, F.F. (2016). Sickness behavior in honey bees. *Frontiers in Physiology*, 7, 261. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00261>
- Kekeçoğlu M., Çaprazlı T., Samancı A., Samancı T., & Önder E. (2022). Factors affecting quality of honey bee venom. *Journal of Apicultural Science*, 66(1), 5-14. <https://doi.org/10.2478/jas-2022-0001>
- Khalifa, S.A.M., Elshafiey, E.H., Shetaia, A.A., El-Wahed, A.A.A., Algethami, A.F., Musharraf, S.G., AlAjmi, M.F., Zhao, C., Masry, S.H.D., Abdel-Daim, M.M., Halabi, M.F., Kai, G., Al Naggar, Y., Bishr, M., Diab, M.A. M., & El-Seedi, H.R. (2021). Review: Overview of Bee Pollination and Its Economic Value for Crop Production. *Insects*, 12(8), 688. <https://doi.org/10.3390/insects12080688>
- Kim, S.U., & Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *Journal of Neuroscience Research*, 81(3), 302–313. <https://doi.org/10.1002/jnr.20562>
- Kim, C.M.H. (2013). Apitherapy – Bee Venom Therapy. En M. Grassberger, R. A. Sherman, O. S. Gileva, C.M.H. Kim, & K.Y. Mumcuoglu (Eds.), *Biotherapy - History, Principles and Practice. A Practical Guide to the Diagnosis and Treatment of Disease using Living Organisms*. Dordrecht: Springer. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-6585-6\\_4](https://doi.org/10.1007/978-94-007-6585-6_4)

- Kim, J.-Y., Lee, W.-R., Kim, K.-H., An, H.-J., Chang, Y.-C., Han, S.-M., Park, Y.-Y., Pak, S. C., & Park, K.-K. (2015). Effects of bee venom against *Propionibacterium acnes*-induced inflammation in human keratinocytes and monocytes. *International Journal of Molecular Medicine*, 35(6), 1651–1656. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2015.2180>
- Kim, H., Park, S.Y., & Lee, G. (2019). Potential therapeutic applications of bee venom on skin disease and its mechanisms: a literature review. *Toxins*, 11(7), 1-29. <https://doi.org/10.3390/toxins11070374>
- Kumar N.R., Devi A., Handa, K., & Namita. (2014). Comparative Biochemical studies on the poison gland and poison sac of the worker bees of three different *Apis* species (*Apis dorsata*, *Apis mellifera* and *Apis florea*). *International Journal of Therapeutic Applications*, 16, 8-16.
- La abeja (s.f.). Recuperado y adaptado de [https://reader.digitalbooks.pro/content/preview/books/105136/book/OEBPS/Text/10058\\_split\\_004.html](https://reader.digitalbooks.pro/content/preview/books/105136/book/OEBPS/Text/10058_split_004.html)
- Labster. (s.f.). High-performance liquid chromatography (HPLC). Recuperado y adaptado de [https://theory.labster.com/it/niche\\_hplc/](https://theory.labster.com/it/niche_hplc/)
- Le Conte, Y., Mohammadi, A., & Robinson, G.E. (2000). Primer effects of a brood pheromone on honeybee behavioural development. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 268(1468), 163–168. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1345>
- Le conte, Y. (2012). Biología de la abeja. En H. Clément (Dir.), *Tratado de apicultura* (pp. 18-37). Barcelona: Omega
- Li R., Zhang L., Fang Y., Han B., Lu X, Zhou T., Feng M., & Li J. (2013) Proteome and phosphoproteome analysis of honeybee (*Apis mellifera*) venom collected from electrical stimulation and manual extraction of the venom gland. *BMC Genomics*, 14, 766. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-766>
- Maggi, M., Antúnez, K., Invernizzi, C., Aldea, P., Vargas, M., Negri, P., Brasesco, C., De Jong, D., Message, D., Teixeira, E.W., Principal, J., Barrios, C., Ruffinengo, S., Rodríguez Da Silva, R., & Eguaras, M. (2016). Review article: Honeybee health in South America. *Apidologie*, 47(6), 835–854. <https://doi.org/10.1007/s13592-016-0445-7>
- Martin, S.J., Dils, V., & Billen, J. (2005). Morphology of the Dufour gland within the honey bee sting gland complex. *Apidologie*, 36(4), 543–546. <http://dx.doi.org/10.1051/apido:2005041>
- Martin-Culma, N.Y., & Arenas-Suárez, E.N. (2018). Daño colateral en abejas por la exposición a pesticidas de uso agrícola. *Ciencias Agrícolas*, 14, 232-240.
- Memariani, H., & Memariani, M. (2021). Melittin as a promising anti-protozoan peptide: current knowledge and future prospects. *AMB Express*, 11(1), 69. <https://doi.org/10.1186/s13568-021-01229-1>
- Mendoza, Y., Harriet, J., Campa, J., Katz, H., Ramallo, G., Díaz-Cetti, S., & Invernizzi, C. (2013). Control de *Nosema ceranae* en colonias de abejas (*Apis mellifera*) en forestaciones de *Eucalyptus grandis*. *Agrociencia (Uruguay)*, 17(1), 108-113.

- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MAGP). (2024). Anuario Estadístico Agropecuario 2024.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca (MGAP). (2024). Sector apícola: situación y perspectivas.
- Mirzaei, R., Esmaeili Gouvarchin Ghaleh, H., & Ranjbar, R. (2023). Antibiofilm effect of melittin alone and in combination with conventional antibiotics toward strong biofilm of MDR-MRSA and -Pseudomonas aeruginosa. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 1030401. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1030401>
- Molan, P. (2001). Why honey is effective as a medicine. *Bee World*, 82(1), 22-40. <http://dx.doi.org/10.1080/0005772X.2001.11099498>
- Modanesi, M.S., Kadri, S.M., Ribolla, P.P. E. M., Alonso, D., & de Oliveira Orsi, R. (2015). Period and time of harvest affects the apitoxin production in *Apis mellifera* Lineu (Hymenoptera, Apidae) bees and expression of defensin stress related gene. *Sociobiology*, 62(1), 52-55. <https://doi.org/10.13102/sociobiology.v62i1.52-55>
- Montenegro, G. (2016). Manual apícola. Santiago de Chile: Pontificia Universidad Católica.
- Montoya, B.A., Argueta, M., Aldana, J., & Castellanos, M.T. (2019). Estandarización del proceso de obtención de apitoxina, para el cumplimiento de requisitos de exportación. *Masferrer investiga*, 9(4), 49-61.
- Morse, R., & Benton, A. (1964). Notes on Venom Collection from Honeybees. *Bee World*, 45(4), 141-143. <https://doi.org/10.1126/science.142.3589.228>
- Murakami, J., López, G., Paredes, M., Cuya, G., & Talledo, M. (2019). Production and characterization of bee venom in Chulucanas, Piura. *Agroindustrial Science* . 9(2), 205 - 210. <https://doi.org/10.17268/agroind.sci.2019.02.14>
- Neov, B., Georgieva, A., Shumkova, R., Radoslavov, G., & Hristov, P. (2019). Biotic and abiotic factors associated with colony mortalities of managed honey bee (*Apis mellifera*). *Diversity*, 11(12), 237. <https://doi.org/10.3390/d11120237>
- Novak, N., & Bieber, T. (2005). The role of dendritic cell subtypes in the pathophysiology of atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 53(2), 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2005.04.060>
- Nowar, E. (2016). Venom Glands Parameters, Venom Production and Composition of Honeybee *Apis mellifera* L. Affected by Substitute Feeding. *Middle East Journal of Agriculture Research*, 5(4), 596-603.
- Nowogrodzki, R. (1984). Division of labour in the honeybee colony: A review. *Bee World*, 65(3), 109–116. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1984.11098788>
- Omholt, S.W., & Amdam, G.V. (2004). Epigenetic regulation of aging in honeybee workers. *Science of aging knowledge environment*, (26), 28. <https://doi.org/10.1126/sageke.2004.26.pe28>
- O'Neal, S.T., Anderson, T.D., & Wu-Smart, J.Y. (2018). Interactions between pesticides and pathogen susceptibility in honey bees. *Current opinion in insect science*, 26, 57–62. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2018.01.006>

- Owen, M.D., Plaff, L.A., Reisman R.E., & Wypych, Y. (1990). Phospholipase A2 in venoms extract from honey bees (*Apis Mellifera* L.) of different ages. *Toxicon*, 28(7), 813-820. [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(09\)80004-4](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(09)80004-4)
- Pacifikovfi, V., Stulik, K., Thi Hau, P., Jelfnek, I., Vins, I., & Sýkora, D. (1995). Comparison of high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis for the determination of some bee venom components. *Journal of Chromatography A*, 700(1-2), 187-193. [https://doi.org/10.1016/s0731-7085\(00\)00358-7](https://doi.org/10.1016/s0731-7085(00)00358-7)
- Parisi, C.A.S., Kelly, K.J., Ansotegui, I.J., Gonzalez-Díaz, S.N., Bilò, M.B., Cardona, V., Park, H.S., Braschi, M.C., Macias-Weinmann, A., Piga, M.A., Acuña-Ortega, N., Sánchez-Borges, M., & Yañez, A. (2021). Update on latex allergy: New insights into an old problem. *The World Allergy Organization journal*, 14(8), 100569. <https://doi.org/10.1016/j.waojou.2021.100569>
- Pérez Graña, A., Rodríguez-Batista V., Anzola J., Martínez. Z., Juri, P., Nogueira, E., & Fágundez C. (2023, setiembre). Study of the influence of the location of the bee venom extraction trap on its composition [Poster]. 48th Apimondia International Congress, Santiago de Chile, Chile.
- Peña, L., Pineda, M.E., Hernández, M., & Rodríguez-Acosta, A. (2006). Toxinas Naturales: abejas y sus venenos. *Archivos Venezolanos de farmacología y terapéutica*, 25(1), 6-10.
- Pareek, A., Mehlatat, K., Tripathi, K., Pareek, A., Chaudhary, S., Ratan, Y., Apostolopoulos, V., & Chuturgoon, A. (2024). Melittin as a therapeutic agent for rheumatoid arthritis: mechanistic insights, advanced delivery systems, and future perspectives. *Frontiers in immunology*, 15, 1510693. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1510693>
- Pirk, C.W.W., Crewe, R.M., & Moritz, R.F.A. (2016). Risks and benefits of the biological interface between managed and wild bee pollinators. *Functional Ecology*, 31(1), 47–55. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12768>
- Poley Jr, G.E., & Slater, J.E. (2000). Latex allergy. *Journal of allergy and clinical immunology*, 105(6), 1054-1062. <https://doi.org/10.1067/mai.2000.106925>
- Rady, I., Siddiqui, I., Rady, M., & Mukhta, H. (2017). Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer Letters*, 402, 16-21. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.010>
- Rivera-Gomis, J., Bubnic, J., Ribarits, A., Moosbeckhofer, R., Alber, O., Kozmus, P., Jannoni-Sebastianini, R., Haefeker, W., Köglberger, H., Smadis Skerl, M.I., Tiozzo, B., Pietropaoli, M., Lubroth, J., Raizman, E., Lietaer, C., Zilli, R., Eggenhoeffner, R., Higes, M., Muz, M.N., D'Ascenzi, C., Riviere, M.P.; Gregorc, A., Cazier, J., Hassler, E., Wilkes, J., & Formato, G. (2019). Good farming practices in apiculture. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 38(3), 879–890. <https://doi.org/10.20506/rst.38.3.3032>
- Rivera-Mondragón, A., Marrone, M., Bruner-Montero, G., Gaitán, K., de Núñez, L., Otero-Palacio, R., Añino, Y., Wcislo, W. T., Martínez-Luis, S., & Fernández-Marín, H. (2023). Assessment of the Quality, Chemometric and

- Pollen Diversity of *Apis mellifera* Honey from Different Seasonal Harvests. *Foods*, 12(19), 3656. <https://doi.org/10.3390/foods12193656>
- Robinson, G.E. (2009). Division of labor in insect societies. In *Encyclopedia of Insects* (2nd ed., pp. 297–299). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00086-2>
- Rodríguez-Batista, V.M., Nogueira, E., Brito, J.C.M., & Fagundez, C. (2025). Development and validation of a new rapid reversed-phase HPLC method for the simultaneous quantification of melittin and apamin in apitoxin. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 54(1), 7–17. <https://doi.org/10.15446/rcciquifa.v54n1.119550>
- RStudio Team. (2023). RStudio: Integrated development environment for R (Version 2023.06.1). Posit Software, PBC.
- Rybak-Chmielewska, H., & Szczêsna, T. (2004). HPLC study of chemical composition of honeybee (*Apis mellifera* L.) venom. *Journal of Apicultural Science*, 48(2), 103–109.
- Sadek, K.M., Shib, N.A., Taher, E.S., Rashed, F., Shukry, M., Atia, G.A., Taymour, N., El-Nablaway, M., Ibrahim, A.M., Ramadan, M.M., Abdelkader, A., Abdo, M., Imbrea, I., Pet, E., Ali, L. S., & Abdeen, A. (2024). Harnessing the power of bee venom for therapeutic and regenerative medical applications: an updated review. *Frontiers in pharmacology*, 15, 1412245. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1412245>
- Sanad, R.E., & Mohanny, K.M. (2013). The efficacy of a new modified apparatus for collecting bee venom in relation to some biological aspects of honeybee colonies. *Journal of American Science*, 9(10), 177–182.
- Serrinha, V., Correia, S.D., & Marques, G. (2019). Productivity and economic analysis of a new intensive collector in the Portuguese market with implication of open innovation perspective. *Journal of Open Innovation: Technology, Market, and Complexity*, 5(3), 71. <https://doi.org/10.3390/joitmc5030071>
- Silva, J., Monge-Fuentes, V., Gomes, F., Lopes, K., Anjos, L., Campos, G., Arenas, C., Biolchi, A., Gonçalves, J., Galante, P., Campos, L., & Mortari, M. (2015). Pharmacological Alternatives for the Treatment of Neurodegenerative Disorders: Wasp and Bee Venoms and Their Components as New Neuroactive Tools. *Toxins*, 7, 3179–3209. <https://doi.org/10.3390/toxins7083179>
- Sobral, F., Sampaio, A., Falcão, S., Queiroz, M.J.R.P., Calhella, R.C., Vilas Boas, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2016). Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 94, 172–177. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.008>
- Son D.J., Woong J., Hee Y., Sueb H., Kil CH., & Tae, J. (2007). Therapeutic application of anti-arthritis, pain-releasing, and anti-cancer effects of bee venom and its constituent compounds. *Pharmacology & Therapeutics*, 115(2), 246–270. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.04.004>

- Sullivan, J.P., Jassim, O., Fahrbach, S.E., & Robinson, G.E. (2000). Juvenile hormone paces behavioral development in the adult worker honey bee. *Hormones and Behavior*, 37(1–14). <https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1552>
- Swanson, M.C., Bubak, M.E., Hunt, L.W., Yunginger, J.W., Warner, M.A., & Reed, C.E. (1994). Quantification of occupational latex aeroallergens in a medical center. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 94(3), 445–451. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(94\)90199-6](https://doi.org/10.1016/0091-6749(94)90199-6)
- Tacquard, C., Poirot, A., Nicolini, C., Verger, T., Ott, M., Bouaziz, H., Florentin, A., De Blay, F., & Mertes, P. M. (2021). Latex aeroallergen pollution in the operating theatre: should latex allergic patients be scheduled first?. *British journal of anaesthesia*, 127(2), 46–48. <https://doi.org/10.1016/j.bja.2021.04.015>
- uHPLCs. (s.f.). ¿Por qué la columna C18 se utiliza ampliamente en HPLC? Recuperado de <https://uhplcs.com/es/%C2%BFPor-qu%C3%A9-la-columna-C18-se-utiliza-amplemente-en-HPLC%3F/>
- Uruguay miel. (2021, julio 16). Extracción de apitoxina. Parte 1 - Tutoriales ApicultoresTV [Video]. YouTube. <https://www.youtube.com/watch?v=gl0CfOb72EU>
- Valderrama Hernández, R. (2003). Aspectos toxicológicos y biomédicos del veneno de las abejas *Apis mellifera*. *Iatreia*, 16(3), 217–227.
- Viana, G.A., Freitas, C.I.A., Almeida, J.G.L., Medeiros, G.V.D., Teófilo, T.S., Rodrigues, V.H.V., Coelho, W.A.C., & Batista, J.S. (2021). Antioxidant, genotoxic, antigenotoxic, and antineoplastic activities of apitoxin produced by *Apis mellifera* in Northeast Brazil. *Ciência Rural*, 51(4). <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20200545>
- Villalobos, C.M.B., & Jaime, O.A.M. (2019). Extracción de apitoxina con un colector eléctrico en Irapuato, Guanajuato, México. *Agronomía Mesoamericana*, 30(2), 459-467.
- Wilson-Rich, N., Allin, K., Carreck, N. L., & Quigley, A. (2014). *The bee: A natural history*. Princeton University Press. <http://dx.doi.org/10.1515/9781400852192>
- Yang, L., He, X., Zhi, D., Xue, Y., Gong, X., Dong, K., & Tian, Y. (2024). Melittin promotes dexamethasone in the treatment of adjuvant rheumatoid arthritis in rats. *Frontiers in pharmacology*, 15, 1338432. <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1338432>
- Zhang, S., Liu, Y., Ye, Y., Wang, X.-R., Lin, L.-T., Xiao, L.-Y., Zhou, P., Shi, G.-X. & Liu, C.-Z. (2018). Bee venom therapy: Potential mechanisms and therapeutic applications, *Toxicon*. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.04.012>