

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

**EFFECTO DE LA MADUREZ DE LAS ABEJAS Y DE LA LOCALIZACIÓN DE LA
TRAMPA COLECTORA SOBRE LA COMPOSICIÓN DE LA APITOXINA**

por

Carina CHAO RINALDIS

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias

Orientación: Higiene, Inspección - Control
y Tecnología de los Alimentos

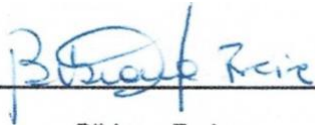
MODALIDAD: Ensayo experimental

MONTEVIDEO URUGUAY 2025

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por.

Presidente de mesa:



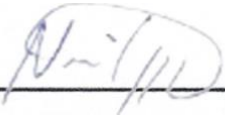
Bibiana Freire

Segundo miembro:



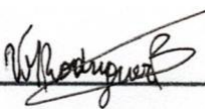
Enrique Nogueira

Tercer miembro (tutor):



Nadia Coppola

Cuarto miembro:



Valentina Rodríguez

Quinto miembro:



Catherine Fagúndez

Fecha: 17 de diciembre del 2025

Autor:



Carina Chao

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Universidad de la República, casa de estudios que me ha hecho crecer y madurar académica y personalmente. A la Unidad de Animales de Granja y a todos sus docentes, que me abrieron las puertas para poder trabajar con lo que me gusta, las abejas.

A mi tutor y co-tutores, Enrique Nogueira, Valentina Rodríguez Batista y Catherine Fagúndez, que me dieron las herramientas imprescindibles.

A toda mi familia, en especial a mi padre, mi madre y mis hermanos, que me han sostenido en todo a lo largo de todos estos años de carrera universitaria.

A amigos y amigas que he hecho a lo largo de este camino, sin ellos no sería quien soy hoy.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	2
RESUMEN	5
SUMMARY.....	6
1) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	7
1.1 Biología de las abejas Apis mellifera	7
1.2 Polietismo etario	9
1.3 Productos de la colmena.....	11
1.4 Veneno de abeja	14
1.4.1 Qué es la apitoxina	14
1.4.2 Aparato del veneno.....	14
1.4.3 Características de la apitoxina	15
1.4.4 Composición del veneno de abeja	16
1.4.5. Usos y terapéutica	18
1.4.5 Métodos de extracción.....	19
1.4.6 Métodos de cuantificación de la apitoxina	20
1.5 Planteamiento del problema	21
2) HIPÓTESIS.....	23
3.1. Objetivos Generales:	23
3.2. Objetivos Específicos:.....	23
4) MATERIALES Y MÉTODOS	24
Determinación de la composición de la apitoxina obtenida mediante el uso de diferentes trampas de extracción.....	28
Determinación de la influencia del estado de madurez de las abejas sobre la composición del veneno	30
5) RESULTADOS	32
Determinación de la composición de la apitoxina obtenida mediante el uso de diferentes trampas de extracción.....	32

Determinación de la influencia del estado de madurez de las abejas sobre la composición del veneno	33
6) DISCUSIÓN	34
7) CONCLUSIONES.....	38
9) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico de una abeja obrera.	7
Figura 2. Castas dentro de la colmena.	8
Figura 3. Esquema representativo de la división de tareas de las abejas obreras.	10
Figura 4. Productos de la colmena.....	12
Figura 5. Esquema representativo de la glándula del veneno y su reservorio.....	15
Tabla 1. Composición del veneno de abeja.....	18
Figura 6. Métodos de extracción	20
Figura 7. Cromatografía de una muestra de apitoxina	21
Figura 8. Trampas de electroestimulación y sus componentes	25
Figura 9. Cromatograma del estándar de melitina	27
Figura 10. Curva de calibración de la melitina para el HPLC.....	27
Figura 11. Diagrama de la metodología de extracción según el lugar de la trampa	29
Figura 12. Diagrama de la división de las colmenas	31
Figura 13. Porcentaje de melitina (%) según tipo de trampa	32
Figura 14. Porcentaje de melitina (%) según categoría de abejas	33

RESUMEN

El veneno de abeja es un producto de interés creciente en farmacología y cosmética por sus propiedades terapéuticas, siendo la melitina su principal componente bioactivo, cuya concentración determina la calidad del producto. En la colonia de *Apis mellifera*, la división de tareas está regida por el polietismo etario, donde las abejas pasan por distintas etapas fisiológicas y conductuales a medida que envejecen, lo que puede influir directamente en la actividad de la glándula del veneno. La optimización de la cosecha requiere comprender los factores biológicos que modulan su composición, especialmente aquellos relacionados con la fisiología del insecto.

Esta investigación tuvo como objetivo principal determinar la variación en la concentración de melitina en la apitoxina cosechada, en función de la madurez de las abejas (jóvenes vs. maduras) y la localización de la trampa colectora en la colmena. El estudio se desarrolló en Uruguay utilizando colonias de abejas, donde se implementó la técnica de electroestimulación para la recolección de la apitoxina y la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) para la cuantificación de melitina. Los resultados obtenidos indicaron que la localización de la trampa (externa, interna o de techo) no generó diferencias significativas en la composición del veneno. Por el contrario, se encontró una diferencia significativa relacionada con la edad: las abejas jóvenes produjeron apitoxina con una concentración de melitina sustancialmente mayor (62,20%) que la producida por las abejas maduras (46,98%). En conclusión, se establece que el factor de la madurez de la abeja, intrínsecamente ligado al polietismo etario, es el elemento determinante en la calidad de la apitoxina cosechada, sugiriendo la necesidad de ajustar las prácticas de producción para maximizar el rendimiento del veneno de mayor concentración.

SUMMARY

Bee venom is a product of growing interest in pharmacology and cosmetics due to its therapeutic properties, with melittin being its principal bioactive component, whose concentration determines product quality. In the *Apis mellifera* colony, the division of labor is governed by age polyethism, where bees undergo different physiological and behavioral stages as they age, which may directly influence the activity of the venom gland. Optimizing the harvest requires understanding the biological factors that modulate its composition, especially those related to insect physiology. This research's main objective was to determine the variation in the melittin concentration in harvested apitoxin, based on bee maturity (young vs. mature) and the location of the collector trap in the hive. The study was conducted in Uruguay using bee colonies, where the electro-stimulation technique was implemented for apitoxin collection and High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) for melittin quantification. The results obtained indicated that the trap location (external, internal, or roof) did not generate significant differences in the venom composition. Conversely, a significant difference was found related to age: young bees produced apitoxin with a substantially higher melittin concentration (62.20%) than that produced by mature bees (46.98%). In conclusion, it is established that the factor of bee maturity, intrinsically linked to age polyethism, is the determining element in the quality of harvested apitoxin, suggesting the need to adjust production practices to maximize the yield of higher concentration venom.

1) REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Biología de las abejas *Apis mellifera*

Las abejas melíferas co-evolucionaron con las angiospermas hace más de 100 millones de años (Kane & Faux, 2021) y hace 30 millones de años con la forma actual (Tautz, 2008) La supervivencia de estos insectos polinizadores depende directamente de las plantas, y a su vez, su actividad de polinización condiciona el éxito reproductivo de numerosas especies vegetales (Fontana & Zanotelli, 2021).

Las abejas melíferas se clasifican taxonómicamente dentro del orden Hymenoptera y familia Apidae, siendo Apinae una de las subfamilias principales. A su vez, dentro de Apinae se agrupan las tribus de abejas eusociales más conocidas, como Apini, Bombini y Meliponini (Michener, 2007). Las abejas melíferas son los insectos más conocidos debido a su importancia en la polinización de cultivos, a su compleja organización social y a la producción de miel. Además, constituyen los principales polinizadores de plantas silvestres y de numerosos cultivos en los ecosistemas terrestres, y, aunque la polinización entomófila en cultivos no es la más importante, el 35% de la producción global de alimentos dependen de especies polinizadoras (Klein *et al.*, 2007).

Las abejas son insectos holometábolos, es decir que su metamorfosis pasa por las etapas de huevo, larva, pupa y adulto (Fig. 1). Existen dos tipos de huevos: los fecundados, de los cuales se desarrollan a las hembras (reina y obreras), y los no fecundados donde dan origen a los machos (zánganos). A su vez, en la colonia existen castas reproductivas y no reproductivas, la primera está conformada por la reina y los zánganos y la segunda casta por las obreras (Michener, 2007), y cada una tiene una o más funciones especiales en la colonia (Fig. 2).



Figura 1. Ciclo biológico de una abeja obrera. (Fuente: Grupo INSSOC, s.f. como se cita en Macri, 2023).

Los zánganos son los machos de la colonia y su función principal es fecundar a la reina virgen (Lobos & Pavez, 2021). Su número en la colonia varía según la época del año,

llegando a los 300 zánganos en verano cuando la colmena se encuentra fuerte con entrada de recursos, y en invierno cuando hay escasez de recursos y la colmena comienza a bajar en población, las obreras los echan de la colmena (Yadav *et al.*, 2017). La reina es la única hembra fértil de la colmena, su función es de reproducción y la oviposición, que darán abejas obreras, zánganos o nuevas reinas, dependiendo de si los huevos son fecundados o no, como vimos anteriormente, y de la alimentación proporcionada por las obreras. Para el desarrollo de una reina, se alimenta la larva exclusivamente con jalea real a lo largo de toda su vida. Una vez que la reina emerge de su estado pupal, sale de la colmena y copula con más de una docena de zánganos, almacena el esperma en la espermateca, para luego volver y dedicarse a la puesta de huevos el resto de su vida, aproximadamente de 3 a 5 años. La oviposición varía según varios factores, en períodos climáticos favorables donde hay una buena entrada de polen y néctar, la reina puede llegar a poner hasta 1500 huevos por día (Lobos & Pavez, 2021; Yadav *et al.*, 2017).

Las abejas obreras son hembras estériles, cuyo aparato reproductor se encuentra poco desarrollado. Son los individuos más numerosos dentro de la colmena y su población varía a lo largo del año, con poblaciones que pueden llegar hasta los 40.000 individuos en la colonia. Su vida media varía dependiendo de la época del año, siendo de 65 días en primavera-verano y hasta 90- 120 días en otoño-invierno (Lobos & Pavez, 2021). Las obreras adultas realizan tareas de acuerdo a su edad, mediado por factores externos e internos a la colmena (Yadav *et al.*, 2017), este fenómeno es llamado polietismo etario.

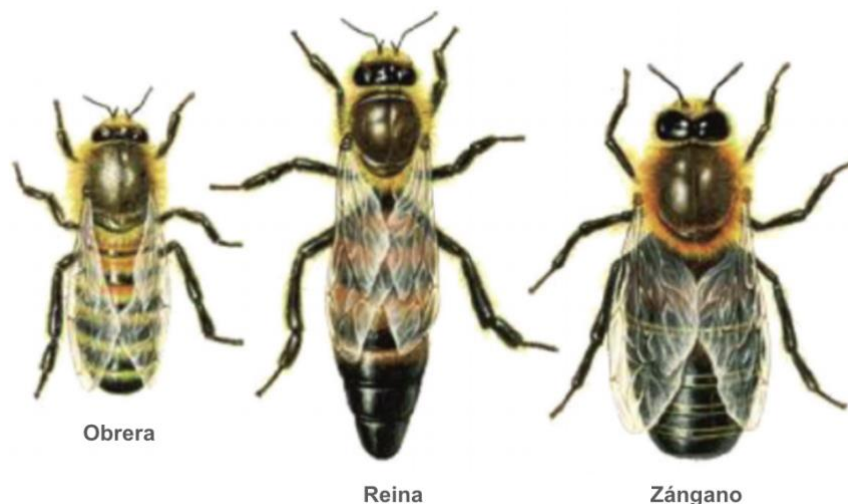


Figura 2. Castas dentro de la colmena. (Fuente: Honeybee castes. 2006 Encyclopædia Britannica, Inc., como se cita en Yadav *et al.*, 2017)

1.2 Polietismo etario

La eusociabilidad es un avance evolutivo significativo que implica varias características dentro de la colonia: generaciones superpuestas, cuidado cooperativo de las crías y división del trabajo (Wilson, 1971). Las abejas melíferas, como insectos eusociales, constituyen un claro ejemplo de este concepto: mediante la especialización de tareas y la toma de decisiones colectivas de miles de individuos, cuya función varía a lo largo de su vida, logran conformar una colonia altamente integrada que funciona como un superorganismo (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2021; Kane & Faux, 2021).

La división de trabajo en abejas es uno de los fenómenos comportamentales más investigados (Johnson, 2010). Las obreras realizan una gran variedad de tareas a lo largo de su vida, comenzando en su etapa juvenil con actividades dentro de la colmena en el área de cría principalmente y progresan gradualmente hacia la periferia a medida que aumentan en edad (Fig. 3). Finalmente, en su etapa de mayor madurez, salen de la colmena para realizar la tarea de pecoreo en busca de recursos. Este cambio progresivo de funciones dependiente de la edad se conoce como polietismo etario (Seeley, 1982; Winston, 1987; Robinson, 2009).

Luego de que una obrera emerge de su celda, realizará tareas de limpieza de celda, permanecerá inactiva o hará tareas de aseo hasta los 2-4 días (grupo I), ya que no puede volar ni picar (Winston, 1987, como se cita en Johnson, 2009). No es una tarea exclusiva de esta fase del desarrollo, otras obreras de diferente edad van a realizar esta misma tarea. Desde los 2 a los 11 días (grupo II), las obreras, llamadas nodrizas, hacen numerosas tareas en el centro de la colmena como cuidar a la reina formando una cohorte alrededor de ella para alimentarla, cuidar y alimentar a la cría, operculares celdas. Desde los 11 a 20 días de edad (grupo III) cambian el área en la que trabajan siendo ésta más amplia dentro de la colmena y también cambiando de tareas, como la construcción y mantenimiento de la colmena, recibiendo procesando y almacenando néctar y polen. Por último, desde los 21 días en más (grupo IV), sale de la colmena como pecoreadora, trayendo sus cuatro principales recursos: Néctar, polen, agua y propóleo (Seeley, 1982).

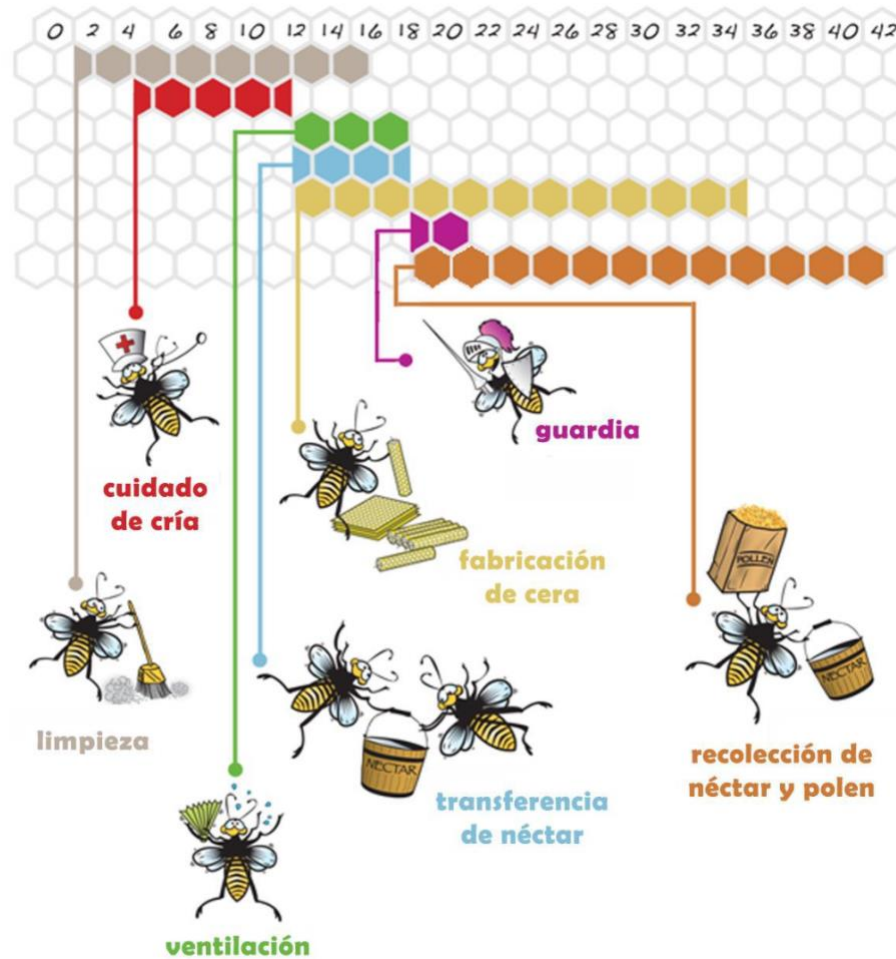


Figura 3. Esquema representativo de la división de tareas de las abejas obreras. (Fuente: Grupo INSSOC, s.f. como se cita en Macri, 2023).

Estos cambios comportamentales están acompañados de cambios fisiológicos incluida la actividad neuroendocrina, que permiten aumentar la eficiencia de la tarea que desarrollan en cada etapa, como son cambios en el metabolismo, el desarrollo de glándulas de secreción que las utilizan para funciones específicas, y cambios en la dieta. La hormona juvenil (HJ) y la vitelogenina (Vg) pueden modular la división de tareas. Las abejas jóvenes que trabajan dentro de la colmena presentan títulos bajos de ambas hormonas, que van incrementándose hasta llegar al pico máximo en pecoreadoras en primavera y verano. Además, niveles elevados de la hormona octopamina incrementa la probabilidad de pecoreo (Robinson, 2009).

1.3 Productos de la colmena

Las abejas melíferas son conocidas por los beneficios de sus productos (Figura 4), como resultado su crianza desde hace miles de años, además de ser importantes agentes polinizadores de cultivos y ecosistemas (Alarcón *et al.*, 2016). De las tres castas que vimos anteriormente, son las obreras las que generan estos productos, siendo las pecoreadoras las que van en busca de recursos como néctar floral y extrafloral, polen de los estambres de las flores y resinas vegetales, y las que realizan tareas dentro de la colmena que procesan estos compuestos (Vit, 2004).

La miel (Fig. 4.2) está compuesta principalmente por carbohidratos, siendo la glucosa y la fructosa los monosacáridos que predominan, representando el 85% de los sólidos totales que la convierten en una solución altamente concentrada de azúcares disueltos en agua (Galindo, 2019). La miel es producida a partir del néctar de las flores o de partes vivas de las plantas o de excreciones de insectos chupadores de plantas que las abejas recogen y llevan a la colmena para transformarla y combinarla con sustancias específicas propias, que luego la depositan en celdas, deshidratan y almacenan (Codex Alimentarius, 2001), siendo la principal fuente energética para las abejas obreras.

El polen apícola (Fig. 4.3) es el resultado de compactar el polen de las flores con néctar y sustancias salivares de abejas obreras. Es recolectado en las anteras de las flores y se deposita en los panales cerca de la cría, que es utilizado para su alimentación. Es el principal suministro de proteína pudiendo llegar hasta 35% según el origen floral de éste (Vit, 2004).

El propóleo (Fig. 4.5) es una sustancia resinosa que las abejas recolectan a partir de exudados de plantas, yemas y flores, que le añaden una mezcla de secreciones salivares, cera y polen hasta obtener el producto final. Las abejas las utilizan para sellar agujeros, reconstruir la colmena, barnizar las paredes. El propóleo tiene innumerables propiedades medicinales estudiadas que lo lleva a tener un valor agregado para la apiterapia (Lobos & Pavez, 2021; Vit, 2004).

La cera (Fig. 4.1) es producida por cuatro pares de glándulas ceríparas encontradas en la parte ventral del abdomen y se sintetiza a partir de la reducción de azúcares. La cera recién secretada es de color blanquecino y presenta una alta plasticidad, lo que permite moldearse para que la abeja obrera construya panales y opercule la miel. Luego con el tiempo comienza a cambiar su color a amarillento e, incluso, oscuras en ceras más viejas (Lobos & Pavez, 2021; Vit, 2005).



Figura 4. Productos de la colmena: 1) Cera de abeja en bloque; **2)** Miel operculada en cuadros de media alza, pronta para extraer; **3)** Polen. (Fuente: Productos de la Colmena: Beneficios, Usos y Conservación, 2025). **4)** Jalea real (FAO, 2021); **5)** Propóleo. (Fuente: FAO, 2021) **6)** Apitoxina. (Fuente: Valentina Rodríguez Batista)

La jalea real (Fig. 4.4) es una secreción de las glándulas hipofaríngeas y mandibulares de las nodrizas más jóvenes, de aspecto lechoso, consistencia gelatinosa, color blanco marfil y sabor ácido, que sirve de alimento para todas las larvas en los primeros 3 días. La reina es alimentada con jalea real durante todos los estadios larvales y en toda su vida adulta (Lobos & Pavez, 2021; Vit, 2005).

Por último, el veneno de abeja (Fig. 4.6) es secretado por la glándula del veneno o glándula ácida, que posteriormente es almacenado en el saco del veneno listo para su función, que es la de defender a su colmena. Las obreras nacen con el saco vacío y lo van completando durante las primeras 2 a 3 semanas de vida, mientras que las reinas ya nacen con el saco del veneno completo. Los machos no presentan aparato del veneno (Vit, 2005).

En Uruguay, en la última década, datos extraídos del Anuario estadístico Agropecuario (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca [MGAP], 2024) han constatado que, a pesar del creciente número de productores y colmenas en el país, la producción de miel por año ha bajado considerablemente, así como los precios de miel a granel para

exportación por tonelada, en forma fluctuante, no siendo la apicultura la actividad primaria para el productor, teniendo que recurrir a otros rubros agropecuarios (Pereyra, 2024). Es así que el productor apícola debería pensar en explotar otros productos de la colmena como es la apitoxina, en la que en este último tiempo se ha puesto en la mira para la industria farmacéutica, pudiendo ser un producto con una creciente demanda.

1.4 Veneno de abeja

1.4.1 Qué es la apitoxina

El veneno es una compleja mezcla de diferentes sustancias bioactivas en solución (Banks & Shipolini, 1986). Cuando los componentes volátiles se evaporan pasa a llamarse apitoxina (FAO, 2021). Dentro del orden Hymenoptera, existe un grupo taxonómico llamado Aculeata que incluye avispas, hormigas y abejas, y están caracterizadas por la modificación del aparato ovopositor en un aguijón (Brady, 2009). Las abejas hembras son las que presentan aparato del veneno, siendo las obreras las que lo utilizan únicamente para la defensa de la colmena (Michener, 1974). Estas nacen con el saco del veneno vacío para comenzar a completarlo desde el tercer día de adulta con su máxima producción en la segunda o tercera semana de vida. Situación diferente pasa en las reinas, que nacen con el saco completo ya que la función es eliminar a sus hermanas cuando nacen, lo cual difiere con las obreras (Dotimas & Hider, 1987).

1.4.2 Aparato del veneno

El aparato del veneno (Fig. 5) se localiza en la región posterior del abdomen y puede dividirse en dos partes principales: el primero es el aguijón, una estructura musculosa y quitinosa, responsable de la inoculación del veneno; la segunda parte consiste en una porción glandular asociada al aguijón, y ambos conectados por un saco cuya función es de almacenamiento (Arruda, 2007). La parte del aguijón es compleja y consiste en una estructura similar a una aguja dentada, la cual está formada por 4 estiletos que se estrechan y convergen en una punta filosa y hueca. El reservorio o saco del veneno es el sitio en el que desemboca un canal central que proviene de la glándula de veneno. Su pared es gruesa, laminada y cuticular, lo que le da eficiencia para el almacenamiento (Dotimas & Hider, 1987). La porción glandular se compone de dos estructuras: la glándula ácida o glándula del veneno propiamente dicha y la glándula básica o de Dufour. La glándula ácida es una estructura altamente especializada en la síntesis y secreción del veneno (Bridges & Owen, 1984), presenta morfología ramificada que puede variar significativamente entre poblaciones (Arruda, 2007) y está revestida por células que secretan prácticamente todos los componentes del veneno. Lo vierte en canales internos que convergen en un canal central, el cual lo lleva al saco del veneno para su almacenamiento. Por otro lado, la glándula básica o de Dufour se encuentra asociada al saco de veneno (Dotimas & Hider, 1987).

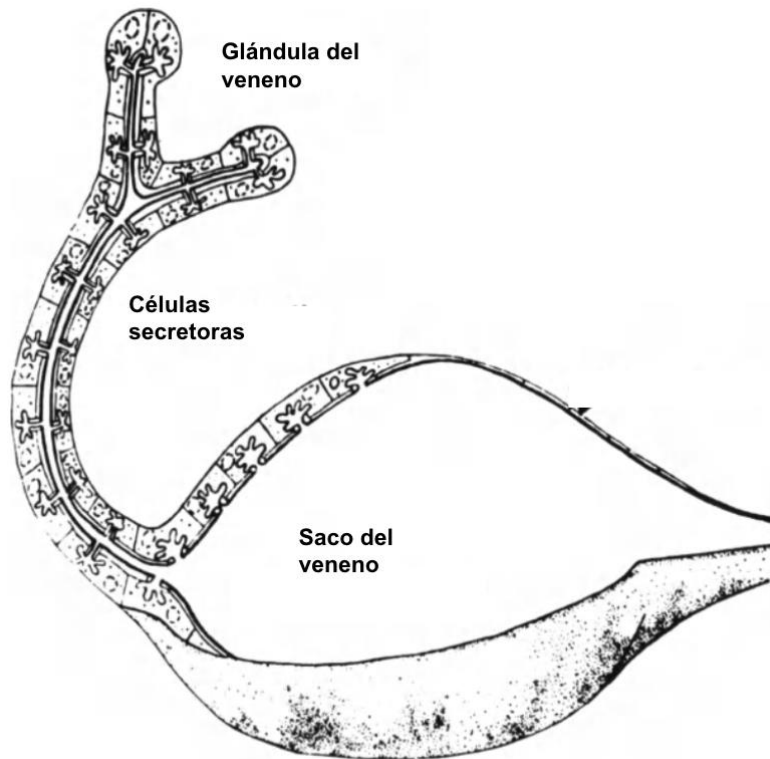


Figura 5. Esquema representativo de la glándula del veneno y su reservorio (Fuente: Owen & Bridges, 1976)

El aparato del aguijón normalmente permanece retraído en el abdomen. Cuando la abeja se dispone a picar, lo proyecta mediante una serie de músculos específicos para agujonear. Ante una amenaza, como forma de defensa individual y colectiva de la colmena, las abejas pican y la estructura dentada hace que el aparato del aguijón quede incrustado para poder inocular más veneno, lo que provoca la muerte de la abeja ya que, además, se desprenden otras estructuras internas que hacen incompatibles con su vida y terminan muriendo; sin embargo, en ocasiones, cuando logra retirar íntegro el aguijón, sobrevive (Dotimas & Hider, 1987).

1.4.3 Características de la apitoxina

El veneno de abeja es un líquido acuoso, incoloro y transparente. Presenta un olor penetrante y distintivo. La apitoxina es soluble en agua, no así en alcohol ni soluciones alcalinas. Tiene un pH de 4.5-5.5. Para obtener la apitoxina, se deja secar el veneno a temperatura ambiente, perdiendo entre 65-70% de su peso original y adquiere una coloración blanca amarillenta, aunque se pueden ver preparaciones comerciales con un

color marrón que podría ser por la oxidación de algunos componentes (FAO, 2021; Banks & Shipolini, 1986).

1.4.4 Composición del veneno de abeja

La composición y cantidad de apitoxina producida por una colonia está determinada por diversos factores ambientales y biológicos como el ecotipo de la abeja, la alimentación, el clima, geografía, época del año, hora del día, tipo de trampa, tiempo entre extracciones, entre otros (Flanjak *et al.*, 2021; Junior *et al.*, 2010). Por ejemplo, desde el punto de la variación estacional, se ha visto que la melitina y la fosfolipasa A2 varían de manera sincronizada, aumentando o disminuyendo en los mismos meses (Junior *et al.*, 2010).

El veneno de abeja es una compleja combinación de proteínas, péptidos, aminoácidos, enzimas y otros componentes bioactivos (FAO, 2021), donde el agua es el componente mayoritario que se encuentra entre un 80 a 88% de la composición total (Owen, *et al.*, 1990). Los componentes se pueden separar y clasificar por el peso molecular (De Lima & Brochetto-Braga, 2002), por la carga y la hidrofobicidad, dependiendo de sus diferentes propiedades fisicoquímicas (Dotimas & Hider, 1987).

Los péptidos más importantes son la melitina, apamina y el péptido degranulador de mastocitos (MCD), entre otros péptidos en menor concentración (FAO, 2021).

La melitina es el componente principal del veneno, representando entre 40 y 60% del peso seco, y el más estudiado respecto a sus actividades biológicas (FAO, 2021). Está compuesto por 26 residuos de aminoácidos entre alcalinos y apolares. Es un péptido anfifílico, es decir, que tiene parte de su estructura polar y parte apolar, lo que permite interactuar con membranas lipídicas y aumentar la permeabilidad de los eritrocitos y otras membranas celulares, por lo que se la conoce por su citotoxicidad y capacidad de provocar lisis celular (De Lima & Brochetto-Braga, 2002; Banks & Shipolini, 1986), lo que desencadena una fuerte respuesta inflamatoria acompañada de dolor, enrojecimiento y edema (Guha *et al.*, 2021). La melitina y fosfolipasa A2 por separado tienen características tóxicas, aunque son mucho más potentes en sinergismo (Dotimas & Hider, 1987).

En cuanto a la apamina, es un péptido de 18 residuos de aminoácidos en su estructura, que comprende el 2-3% del veneno seco. Es neurotóxico, se une con alta afinidad a receptores de la membrana post-sináptica, y bloquea selectivamente el canal de potasio dependiente de calcio (De Lima & Brochetto-Braga, 2002). Este bloqueo impide la correcta repolarización neuronal y genera un estado de hiperexcitabilidad en las neuronas. Como consecuencia, la apamina puede provocar temblores, espasmos

musculares y alteraciones en la coordinación motora, contribuyendo así a los efectos neurotóxicos característicos del veneno de abeja (Gu et al., 2020).

El péptido degranulador de mastocitos (MCD) se compone de 22 residuos de aminoácidos y comprende el 2% del veneno seco. Su función principal es la de activar los mastocitos, induce su degranulación y liberación de histamina (De Lima & Brochetto-Braga, 2002; Banks & Shipolini, 1986). Como resultado, se producen efectos locales como vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, enrojecimiento, edema, picazón y dolor. En individuos sensibles, esta acción puede contribuir además al desarrollo de reacciones alérgicas más intensas (Buku, 1999).

Otros componentes son las proteínas (enzimas), que son las de alto peso molecular, tienen la capacidad de generar una fuerte respuesta inmunológica y las responsables de la hipersensibilidad en personas (Dotimas & Hider, 1987). La Fosfolipasa A2 es el segundo compuesto más importante, constituyendo aproximadamente el 11% aproximadamente de peso seco. Actúa sinérgicamente con la melitina. Esta enzima destruye los fosfolípidos y provoca la lisis celular (Junior *et al.*, 2010). La hialuronidasa es una enzima que degrada el ácido hialurónico. Junto con la fosfolipasa A2 y la histamina, es responsable de la respuesta inflamatoria ante el veneno (FAO, 2021). Hay otros componentes con menor importancia y de menor proporción, como las aminas (noradrenalina, dopamina, histamina, serotonina, entre otros) que actúan, en general, acelerando la propagación del veneno por los tejidos celulares. Por último, el veneno contiene más de 20 compuestos volátiles, muchos identificados como feromonas de alarma (Dotimas & Hider, 1987).

Grupo químico	Compuesto	% en el peso seco del veneno
Enzimas	Fosfolipasa A2	10,0-12,0
	Fosfolipasa B	1,0
	Hialuronidasa	1,5-2,0
	Fosfomonoestearasa ácida	1,0
	α-Glucosidasa	0,6
	Fosfatasa	1,0
	Lisofosfolipasa	1,0
	Péptidos	Melitina
Melitina F		0,01
Apamina		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		≤0,8
Tertiapina		0,1
Cardiopéptido		≤0,7
Fosfolípidos		Totales
Aminas	Histamina	1,5
	Dopamina	0,1-1,0
	Noradrenalina	0,1-0,7
	Neurotransmisores	0,1-1,0
Aminoácidos	α-aminoácidos	0,1-0,7
	γ-aminobutírico ácidos	0,1-1,0
Carbohidratos	Fructosa	
	Glucosa	2,0-4,0
Feromonas	Totales	4,0-8,0

Tabla 1. Composición del veneno de abeja. (Fuente: Modificado de Rady *et al.*, 2017)

1.4.5. Usos y terapéutica

La apiterapia es una forma de medicina alternativa cuyos orígenes datan desde la antigua Grecia y China (Hwang, 2015). Hay bibliografía científica de hace más de 100 años que han sugerido que la apitoxina posee un efecto antiinflamatorio y antirreumático (Billigham *et al.*, 1973; Walker, 1907).

Este producto se ha utilizado en tratamientos crónicos como la artritis, tendinitis, fibrosis, enfermedades reumáticas, para cáncer y patología de la piel, así como estudios iniciales han demostrado resultados favorables para enfermedades neurodegenerativas como el alzhéimer o parkinson (Al-Ameri *et al.*, 2022). En medicina veterinaria, el uso de apitoxina

puede llegar a ser un potencial terapéutico para el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas, autoinmunes, neurodegenerativas e infecciones (FAO, 2021).

El veneno de abeja no es reconocido oficialmente como una droga con fines terapéuticos, por lo que no hay estándares de calidad. El análisis de pureza se puede llevar a cabo mediante análisis cuantitativos de los principales componentes, como la melitina, apamina o fosfolipasa A2 (FAO, 2021).

1.4.5 Métodos de extracción

Diferentes métodos de colecta de veneno han sido descritos, como la narcosis o la extracción manual, pero la electroestimulación es el método más eficiente para el productor (Fig. 6.1), ya que permite la colecta de grandes cantidades en poco tiempo, estimando un gramo de veneno cada 20 colmenas, según Morse & Benton (1964). El método de electroestimulación utiliza un equipo que emite corriente eléctrica al que se conectan las trampas colectoras. Estas trampas se componen de una rejilla con varillas metálicas con uno o más vidrios adjuntos, según el tamaño y diseño. La abeja cuando se posa en la rejilla cierra el circuito y recibe una pequeña descarga eléctrica, aguijonea el vidrio y la apitoxina queda depositada en el vidrio sin ocasionar la muerte de la abeja. La trampa colectora (Fig. 6.2) puede localizarse en diferentes lugares de la colmena, tanto en el interior como en la entrada de la misma (Li *et al.*, 2013; Morse & Benton, 1964; FAO, 2021). Una vez que el veneno es depositado sobre el vidrio y contacta con el aire, comienza a cristalizarse, aunque generalmente se seca durante 12 hs, 24 hs o hasta 72 hs, según las condiciones de temperatura y humedad de la habitación. Luego se realiza un raspado para arrastrar el veneno ya seco como un polvo blanco-amarillento. Debe ser almacenado en frascos color ámbar y en lo posible con cierre hermético y se debe conservar en un lugar seco y fresco. La frecuencia con la que se puede extraer en una colmena puede ser cada 15 a 21 días, no obstante, a través de experimentaciones se han sometido a las colmenas en una frecuencia superior, en detrimento de su calidad (FAO, 2021).



Figura 6. Métodos de extracción. 1) Trabajo de campo en el apiario del Campo Experimental N° 2 de Facultad de Veterinario. Equipo de corriente eléctrica utilizándose para cosechar veneno. **2)** Trampas de techo prontas para extraer veneno. (Fuente: Carina Chao)

Como se mencionó anteriormente, la composición y cantidad de veneno producida en una colonia está determinada por diversos factores externos e internos a la colonia (Junior *et al.*, 2010), por lo que hay trabajos realizados en los que han utilizado sus propios protocolos y tipos de trampas (Flanjak *et al.*, 2021), por lo que no se ha llegado a un consenso internacional de protocolos o pautas generales para su extracción, como existe en casi todos los campos de investigación en la apicultura, donde la comunidad científica acuerda protocolos de trabajo, que luego se publican en el Bee Book de la International Bee Research Association (<https://ibra.org.uk/>).

1.4.6 Métodos de cuantificación de la apitoxina

Se desarrollaron diferentes métodos para su caracterización, en los cuales se describen pruebas biológicas, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, entre otros, pero para ello se debe invertir mucho tiempo para obtener resultados. Es por ello que se comenzaron a sustituir estos métodos por la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Fig. 7), método que presenta no sólo una disminución

en la cantidad de tiempo empleada para el análisis, sino que también ofrece una alta eficiencia de separación de los componentes (Pacáková *et.al.*, 1995).

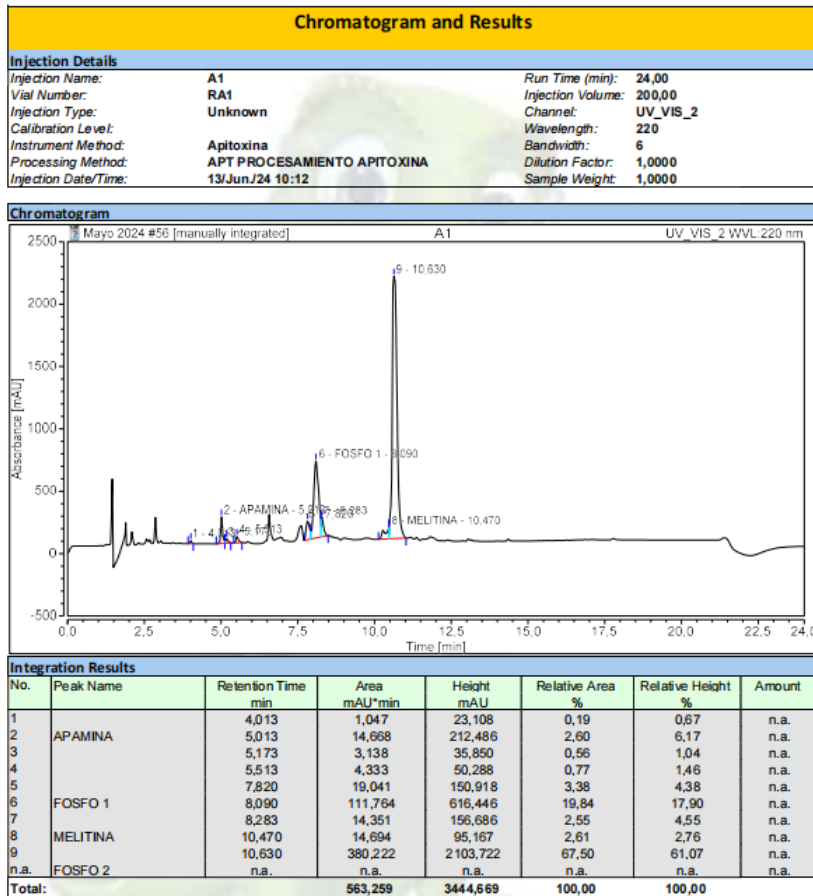


Figura 7. Cromatografía de una muestra de apitoxina (Fuente: Propia del autor).

1.5 Planteamiento del problema

Colectar veneno de abeja a pesar de la creciente demanda en el mercado, es una actividad poco explotada en la apicultura (Serrinha *et al.*, 2019). Esto puede ser una consecuencia de la falta de tecnología en una colecta estandarizada y un mercado con poca organización (Flanjak *et al.*, 2021). Es importante la necesidad de protocolos para la extracción de veneno como para el desarrollo de productos de uso terapéutico controlados, pero hay factores biológicos y de extracción que hacen variar la composición y cantidad de veneno obtenido.

Datos llevados a cabo por el Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca de Uruguay hicieron notar que el precio de la miel a granel para exportación, es el rubro más

importante, pero está decreciendo en los últimos años, por lo que se necesitan explotar otros productos de la colmena, como podría ser el veneno de abeja, debido a la importancia de los efectos biológicos que se le atribuye.

La apitoxina está compuesta por sustancias bioactivas como son la melitina, apamina, fosfolipasa A2, entre otras. Hay muchas investigaciones con respecto a los usos terapéuticos de la apitoxina, lo más estudiado son las patologías articulares, pero se han visto usos para patologías neurodegenerativas, de la piel, contra el cáncer, entre otras. Por lo que es importante identificar y caracterizar la apitoxina, utilizando diferentes técnicas como el HPLC, uno de los métodos analíticos cuali-cuantitativo principales.

Sin embargo, los factores de variación juegan un papel importante en la composición del veneno. El poder definir uno o más protocolos para la cosecha de apitoxina es esencial para que los trabajos futuros que se realicen sobre las fuentes de variación, que puedan ser comparables y poder entender cómo afectan los principales factores a la composición de la apitoxina, lo que permitiría la optimización de los procesos de extracción y direccionar su biosíntesis según las exigencias del mercado para obtener apitoxina con las características requeridas.

2) HIPÓTESIS

- La composición de la apitoxina varía según la madurez de las abejas.
- La composición de la apitoxina varía según al lugar dónde se coloque la trampa colectora.

3) OBJETIVOS

3.1. Objetivos Generales:

Determinar la variación de la apitoxina cosechada de acuerdo a la madurez de las abejas y de la localización de la trampa colectora.

3.2. Objetivos Específicos:

- Determinar la composición de la apitoxina de acuerdo a si son abejas maduras o inmaduras.
- Determinar la composición de la apitoxina cosechada de acuerdo a la localización de la trampa colectora en la colmena.

4) MATERIALES Y MÉTODOS

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 los dos ensayos desarrollados en este trabajo.

Etapas I. Selección e identificación de colmenas

Las colmenas utilizadas 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). Las mismas están numeradas y son revisadas periódicamente, además previo a cada ensayo se evaluaron nuevamente. 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.

Etapas 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. El protocolo de electroestimulación fue el mismo en los dos ensayos: 50 voltios durante 5 segundos, seguidos de 10 segundos de descanso, en un período total de 30 minutos por colmena. Estos 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. 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. 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 (Fig. 8.C), mientras que las externas se ubicaron a continuación de la piquera, fuera de la colmena (Fig. 8.A). 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 8.B). Sobre la parrilla metálica se colocaban tres vidrios de 36 cm de largo, 15 cm

de ancho y 0,5 cm de espesor. Estas trampas se instalaron de manera transitoria durante el tiempo de extracción, en reemplazo del techo original de la colmena.

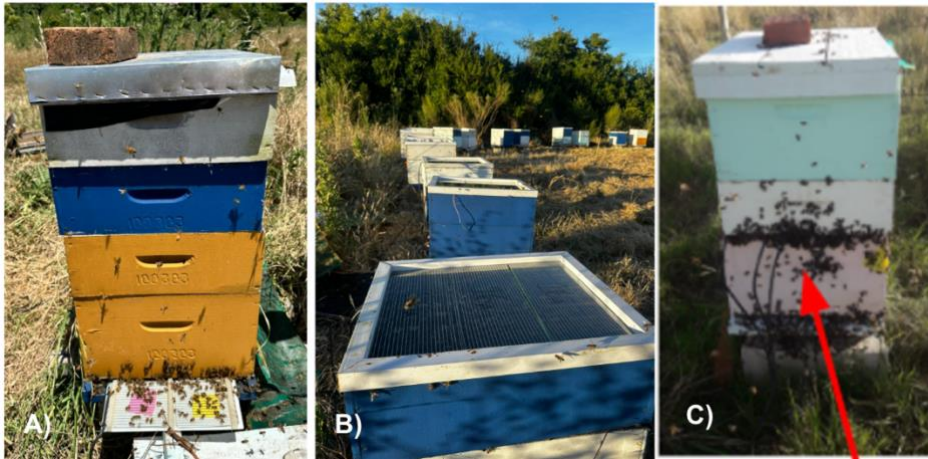


Figura 8. Trampas de electroestimulación y sus componentes (Fuente: Propia del autor)

- A. Trampa externa colocada en la piquera de la colmena.
- B. Trampa interna ubicada en el techo de la colmena.
- C. Trampa interna ubicada en el alza melaria de la 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 requería, se realizaron análisis mediante HPLC.

Para los ensayos 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 μ L 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 μ m, 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 μ m.

Para la preparación de las fases móviles se emplearon solventes aptos para HPLC: acetonitrilo, metanol, 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 μ m 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 (Fig. 9). Este estándar se cuantificó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (1 H RMN) cuantitativa en D₂O, empleando el método PULCON, con identificación de señales características del triptófano.

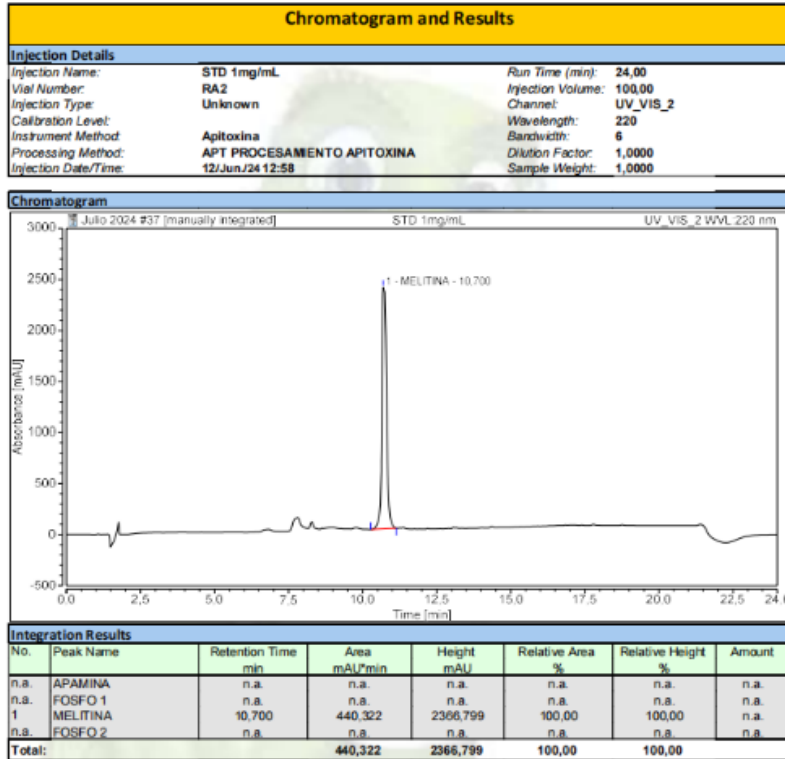


Figura 9. Cromatograma del estándar de melitina (Fuente: Propia del autor)

Para los ensayos, 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 (Fig. 10).

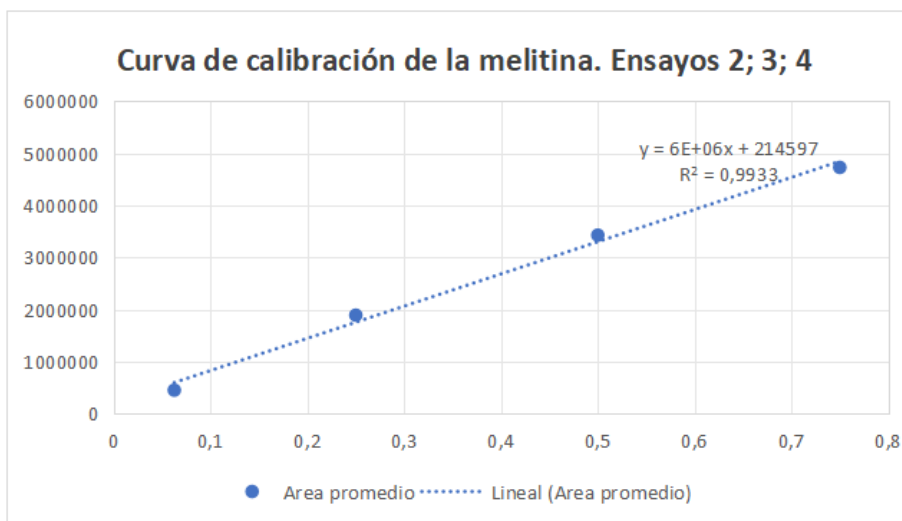


Figura 10. Curva de calibración de la melitina para el HPLC (Fuente: Propia del autor)

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 (Fig. 9). Finalmente, a partir de la ecuación de la curva de calibración, se calculó la concentración de melitina en cada muestra analizada

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

Etapa 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.

Determinación de la 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 2024 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 3 grupos al azar (Fig. 11):

- 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 fue asignada E, I y T y con un número correlativo del 1 al 10.

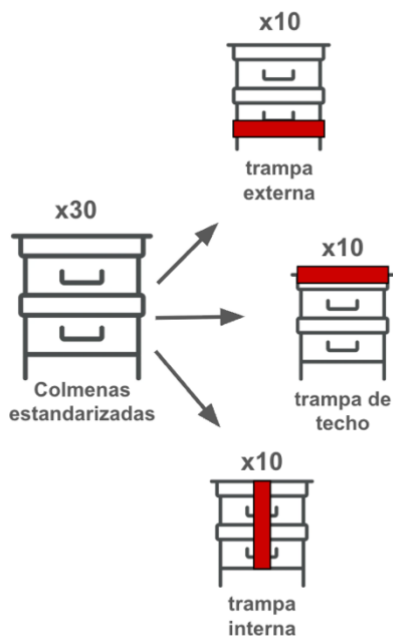


Figura 11. Diagrama de la metodología de extracción según el lugar de la trampa. De arriba a abajo: Grupo con trampa externa (piquera), grupo con trampa de techo, grupo con trampa interna en media alza (Fuente: Propia del autor).

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

la variable a medir fue 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.

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 anterior.

Preparación de los 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 dividida en dos. 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) (Fig. 12). Las “colmenas hijas” fueron identificadas con el mismo número que las “colmenas madres”, pero agregándoles la letra A.

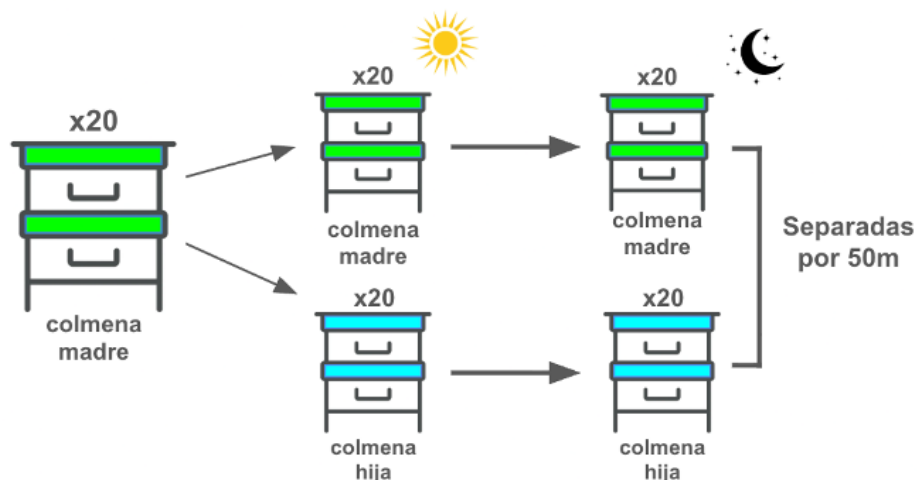


Figura 12. Diagrama de la división de las colmenas. De la colmena madre, se dividen en dos, una de abejas jóvenes y otra de maduras (Fuente: Propia del autor).

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 le 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% ($\alpha = 0,05$).

5) RESULTADOS

Determinación de la composición de la apitoxina obtenida mediante el uso de diferentes trampas de extracción

La distribución de los datos se representa en la figura 13, 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.

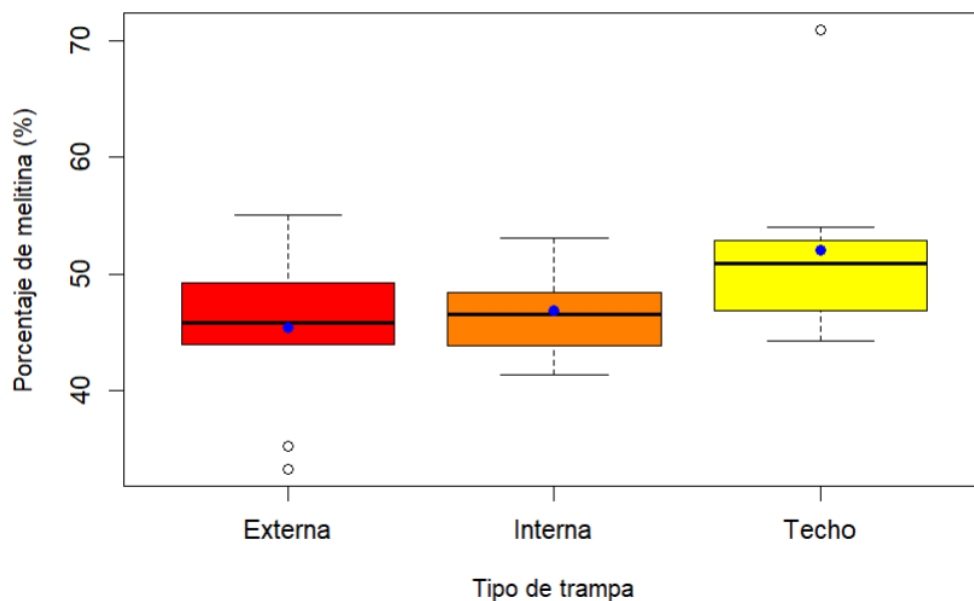


Figura 13. Porcentaje de melitina (%) según tipo de trampa. Porcentaje de melitina para el grupo E (trampa externa), para el grupo I (trampa interna) y para el grupo T (trampa de techo). La mediana de los datos se indica con la línea negro en cada caja y la media para cada grupo está señalada con un punto azul.

Determinación de la influencia del estado de madurez de las abejas sobre la composición del veneno

La distribución de los datos obtenidos para cada categoría de abejas estudiada, se pueden ver en la figura 14. 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).

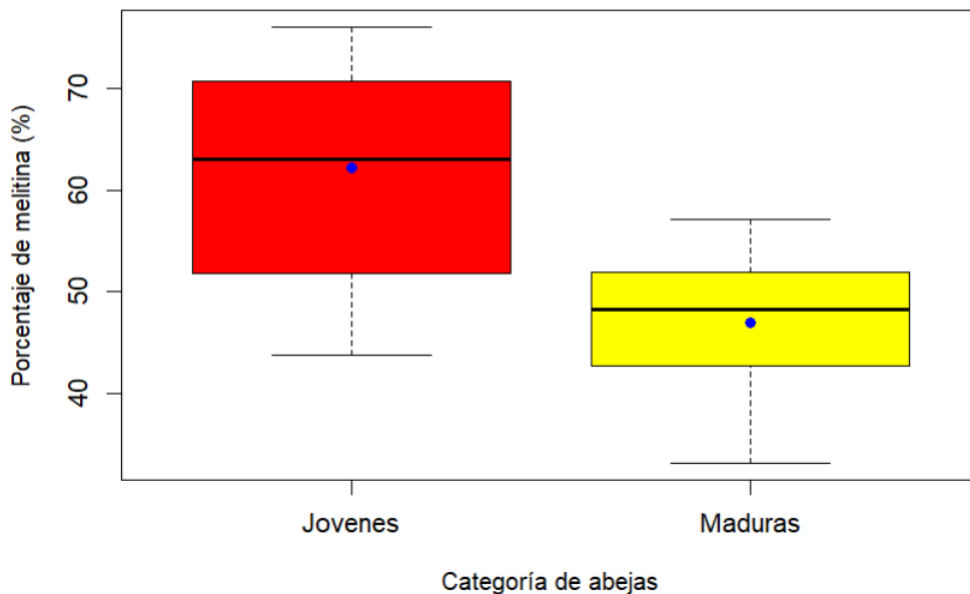


Figura 14. Porcentaje de melitina (%) según categoría de abejas. Para la categoría de las abejas jóvenes y maduras. La mediana de los datos se indica con la línea negro en cada caja y la media con un punto azul para cada grupo.

6) DISCUSIÓN

El origen de las muestras, los métodos de colecta y las condiciones de extracción tienen un efecto significativo en la concentración de melitina en el veneno de abeja (Kekeçoğlu et al., 2022).

Ensayo sobre la determinación de la concentración de melitina según el lugar de las trampas de veneno.

Los resultados sobre el lugar de las trampas de techo no dieron diferencias significativas entre los tres grupos. Aunque, observando la distribución de los datos del gráfico, las medias entre el grupo de la trampa de techo y el grupo de la trampa externa (piquera) podrían tener una diferencia entre ellas, siendo éstas los grupos de ensayo realizado en el trabajo de Pérez *et al.* (2023), donde la ubicación del apiario y la metodología fue la misma, pero dos años antes.

Pérez *et al.* (2023), llevó a cabo el mismo protocolo de extracción que utilizamos nosotros, en el mismo apiario de la Facultad de Veterinaria, pero del año 2022, ubicado en Libertad, San José, Uruguay, con la única diferente de los grupos de muestra, que fueron dos trampas comparado con los tres tipos de trampas con las que realizamos el ensayo. Sus resultados dieron que el promedio de melitina para la trampa de techo fue de 72,63% y para la trampa piquera de 62,37% ($p < 0.05$), dando diferencias significativas. A pesar de que en nuestro ensayo fueron tres grupos (trampa piquera 43,38%, trampa de techo 52,08%), no dieron diferencias significativas. Esto puede deberse a la alta dotación de colmenas en 2024 comparado con el 2022, esto lleva a más pecoreadoras en busca de floraciones y por lo tanto menos recursos por colmena.

Flanjak *et al.* (2021) comparó la composición de la trampa de techo con respecto a externa (piquera), realizándose en horas diferentes, 5-6 am y 9-10 am, respectivamente. El número de colmenas fue 6 en cada trampa y repitiendo el ensayo 3 veces en distintos días. El método de colecta fue con electroestimulación por 30 minutos, y la cuantificación de melitina fue con HPLC.

Con respecto a la concentración de melitina, los resultados de Flanjak *et al.* (2021) no dieron diferencias significativas entre las trampas, dando como resultado para la de techo entre 58,03% y 66,63%, y para la externa entre 51,66 y 69,50%. Si comparamos con los resultados de las dos trampas correspondientes, éstos fueron levemente menores y sin diferencias significativas. El estudio de Flanjak *et al.* (2021) utiliza un número bajo de colmenas para su ensayo, 6 para cada trampa. Además, en la trampa externa sus resultados tienen valores outliers generando un sesgo en los resultados, que lo justifican con la entrada de abejas que vuelven con néctar o polen y contaminan las muestras a la hora de cosechar el veneno.

También hay que tener en cuenta el horario del día en el que se realizaron el ensayo de Flanjak *et al.* (2021) comparado con nuestros ensayos. Si comparamos con nuestro estudio, donde el horario fue el mismo para todos los grupos, este estudio no mantuvo el horario como una variable constante, ya que la toma de muestras se realizó en diferentes horarios para las diferentes trampas, no pudiendo compararlas. El horario en el que se realizó la toma de muestras para la trampa de techo fue durante la noche y para la trampa de piquera durante el día. Esta variable es importante ya que en la noche se encuentra la población completa en la colmena y en la mañana, una vez que sale el sol, las abejas pecoreadoras ya habrán salido en busca de recursos.

En contraste, la variable horaria se mantuvo constante en nuestros ensayos, realizándose todos en la mañana y así no teniendo tantos factores de variación.

En otro estudio, Kekeçoğlu *et al.* (2022) utilizó trampa externa (de piquera) e interna, con muestras de 16 colmenas para la trampa interna y 17 colmenas para la trampa externa, dando como resultado el porcentaje promedio de melitina de 41,25% y 39,02%, respectivamente, no dando así diferencias significativas. Comparando las metodologías, Kekeçoğlu *et al.* (2022) realizó, en las mismas colmenas dos extracciones en un día (a la 1pm y 4pm) y con un intervalo de 15 días por 4 meses, implicando una variable más para el ensayo. Sus resultados pueden deberse al poco tiempo de espera que se les dan a las abejas para producir veneno nuevamente. La frecuencia podría jugar un papel fundamental en la composición del veneno obtenido, que se ve reflejado en el resultado de las bajas concentraciones.

En el nuestro ensayo, la trampa externa dio en promedio menor porcentaje que en la trampa interna (43,38% y 46,87%, respectivamente), pero sin diferencias significativas en las condiciones que fueron dadas.

La bibliografía es escasa, teniendo a estos dos autores como referencias para la determinación de concentraciones de melitina dependiendo del lugar de las trampas y una referencia obtenida de un libro de resúmenes Además, tanto Kekeçoğlu *et al.* (2022) como Flanjak *et al.* (2021) concluyen que aún falta investigar y estandarizar metodologías de extracción, teniendo en cuenta que aumenta progresivamente la demanda del mercado, respondiendo con productos que no están certificados ni avalados por instituciones científicas.

Ensayo sobre la determinación de la concentración de la apitoxina según la madurez de las abejas.

Rodriguez-batista *et al.* (2022) realizaron un ensayo con una metodología idéntica a nuestro ensayo, salvo el número de colmenas, realizándose con un número menor, 6 colmenas divididas en dos y separadas a 100m de distancia. Sus resultados en el

porcentaje de melitina mostraron para las jóvenes 64,81% y para las maduras 55,81%, mostrando diferencias significativas.

Recordando que nuestros resultados mostraron para las abejas jóvenes 62,20% y para las maduras 46,98%, los números fueron inferiores, pero igualmente hubo diferencias significativas. Esto sugiere una correlación entre la edad de las abejas y la calidad de la apitoxina.

Bachmayer *et al.* (1972) estudiaron la síntesis de promelitina, precursor de la melitina y su conversión a este último, siendo procesos que se incrementan con la maduración de las abejas. Su metodología se basó en marcar 10 abejas por grupos de edad recién emergidas y alimentarlas con un aminoácido radiactivo (leucina), dado que este aminoácido se une a la promelitina que consecutivamente se convierte en la sustancia activa que es la melitina. Por último, se extrajo la glándula de veneno y se analizó mediante cromatografía la presencia del componente radiactivo. Los resultados mostraron que la síntesis de promelitina y melitina fue detectado en abejas recién emergidas, incrementándose hasta alcanzar su pico en el día 8 a 10 de edad, para luego decrecer paulatinamente.

Las diferencias metodológicas son fundamentalmente diferentes, ya que Bachmayer *et al.* (1972) marcó a las abejas en grupos de 10 individuos por edad y además extrajeron el saco del veneno y analizaron dos moléculas marcadas radiactivamente. Mientras que en nuestro ensayo se extrajo veneno electroestimulando 20 colmenas previamente divididas en dos suponiendo que fueron separadas abejas jóvenes con adultas, dando como resultado la concentración de melitina de las abejas jóvenes y viejas de 62,20% y 46,98%, respectivamente, con diferencias significativas.

La superposición de generaciones como una característica de la eusociabilidad de las abejas (Wilson, 2005) representa una dificultad a la hora de realizar ensayos en los que se necesita conocer específicamente su edad. Teniendo en cuenta la biología de la abeja, dividiendo la colmena en dos al mediodía cuando las pecoreadoras están fuera buscando recursos.

En el estudio de Bachmayer *et al.* (1972), solo se estudió hasta el día 21, momento en el que las abejas salen de la colmena a buscar recursos, no pudiendo tener este resultado, siendo importante ya que éstas completaron el saco del veneno y tienen más probabilidad de enfrentarse a utilizarlo ante una amenaza. Además, el método de identificación y cuantificación de los componentes del veneno no se utiliza ya que es un método antiguo y fue sustituido y mejorado con, por ejemplo, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) que se utilizó en el presente estudio.

Un estudio más reciente sobre la composición del veneno y la edad de las abejas fue de Baracchi & Turillazzi (2009), que en sus resultados no constató diferencias significativas

con respecto a la concentración de melitina y la madurez de las mismas, mostrando resultados opuestos a como hemos visto anteriormente.

El estudio citado utiliza 3 grupos de 10 abejas cada uno que fueron sacrificadas con frío; el primer grupo las colecta en los cuadros de cría, donde las denomina nodrizas, otro grupo en la entrada de la piquera denominadas guardianas y el último grupo colectadas al vuelo mientras vuelven a la colmena, denominadas pecoreadoras. La extracción de veneno es llevada a cabo mediante la disección y posterior compresión del saco del veneno hacia un vidrio donde se depositó el veneno. Para el análisis molecular de la composición del veneno utilizaron espectrometría de masas y constataron que las abejas nodrizas tienen bajas concentraciones de melitina comparadas con los otros dos grupos suponiendo los con más días de edad.

Las abejas recién nacidas, su saco del veneno está vacío y a medida que crecen se van sintetizando los componentes del veneno hasta su máxima producción a las tres semanas de edad (Brochetto- Braga, 2003; Dotimas & Hider, 1987),

Los estudios de Bachmayer *et al.* (1972) como Baracchi & Turillazzi (2009) emplearon metodologías en las que la determinación de la edad de las abejas es una aproximación, no siendo exacto al momento de la extracción del veneno y su análisis. Por otro lado, el método de extracción difiere significativamente con nuestro método. En las referencias citadas, la extracción se realiza mediante la disección y análisis del saco del veneno en su totalidad, mientras que en nuestra metodología se basa en la colecta de veneno inoculado sobre las placas de vidrio, la extracción de veneno lo realizan extrayendo el saco del veneno por disección y analizándolo en su totalidad, mientras que nuestra metodología es completamente diferente ya que nuestras muestras son extraídas de la inoculación del veneno en el vidrio, sin la muerte de las abejas, lo que podría suceder que las abejas no hayan inoculado la totalidad del veneno.

7) CONCLUSIONES

Los resultados con respecto a la composición del veneno según la ubicación de las trampas, no dieron diferencias significativas en la concentración de melitina entre grupos, en las condiciones que fueron dadas en la ejecución de los ensayos, Sin embargo, la trampa de techo dio un resultado ligeramente mayor que las trampas de piquera e interna. Esto puede ser conveniente si pensamos productivamente la cosecha de veneno, siendo para el apicultor una trampa más práctica y que la puede utilizar tanto en el día como en la noche, teniendo en cuenta también la cantidad de apitoxina que se puede cosechar. Si hablamos de la trampa externa o de piquera, se puede pensar en reubicar, no de forma horizontal en la piquera sino de forma vertical, reduciendo la contaminación durante la cosecha de polen, parte de abejas, que puede disminuir la pureza de la apitoxina.

Los resultados sobre la composición del veneno según la madurez de las abejas mostraron diferencias significativas entre abejas jóvenes y maduras, en las condiciones que fueron dados estos ensayos. Se observó que las jóvenes presentaron niveles de melitina superiores que las maduras, siendo un factor importante la edad de las abejas en la variabilidad del porcentaje de melitina, como bien consideramos en nuestra hipótesis, lo que lleva a pensar en la explicación del mayor porcentaje en la trampas internas que la externa. Estos resultados pueden ser importantes a la hora de la estandarización y comercialización del producto. La colecta de veneno en momentos del día donde las abejas maduras están fuera de la colmena o del lugar de la trampa puede afectar significativamente el porcentaje de melitina en el veneno, siendo un valor diferencial a la hora de la comercialización de éste.

Este trabajo es un avance significativo hacia la elaboración de protocolos y estandarización de productos, lo que, a su vez, permite darle un valor agregado a un mercado no tan regulado. Es imprescindible una base académica sólida y aportar resultados como insumo técnico para que investigadores puedan desarrollar y validar dichos protocolos.

9) REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Al-Ameri, D. T., Alhasan, A. S., & Kadkim, H. R. (2022). A review on bee venom and its medical uses. *Natural Volatiles & Essentials Oils*, 2022; 9(1). 555-560.
- Alarcón, R.E., Mestanza, B.S., y Vásquez, O.C. (2016). Características morfológicas, comportamiento higiénico y agresividad de abejas criollas *Apis mellifera* sp. UCV-HACER. *Revista de Investigación y Cultura*, 5(1), 16-23.
- Arruda, V. M., Alves Jr, V. V., Moraes, M., Chaud Netto, J., & Suárez, Y. R. (2007). Análise morfológica da glândula de veneno de *Apis mellifera* L.(Hymenoptera: Apidae) em populações de Mato Grosso do Sul. *Neotropical Entomology*, 36, 203-209. <https://doi.org/10.1590/S1519-566X2007000200006>
- 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(8), 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.), *Venom of the hymenoptera* (1ª ed., pp. 329-416). Academic Press
- 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(4), 366-375. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2009.11.013>
- Billingham, M. E. J., Morley, J., HANSON, J. M., Shipolini, R. A., & Vernon, C. A. (1973). An anti-inflammatory peptide from bee venom. *Nature*, 245(5421), 163-164. <https://doi.org/10.1038/245163a0>
- Brady, S. G., Larkin, L., & Danforth, B. N. (2009). Bees, ants, and stinging wasps (Aculeata). En S. B. Hedges & S. Kumar (Ed.), *The timetree of life* (1ª ed., pp. 264-269). Oxford University Press
- Bridges, A. R., & Owen, M. D. (1984). The morphology of the honey bee (*Apis mellifera* L.) venom gland and reservoir. *Journal of Morphology*, 181(1), 69-86. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051810107>
- Buku A. (1999). Mast cell degranulating (MCD) peptide: a prototypic peptide in allergic and inflammation. *Peptides*, 20(3), 415-420. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(98\)00167-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(98)00167-3)
- De Lima, P. R., & Brochetto-Braga, M. R. (2003). Hymenoptera venom review focusing on *Apis mellifera*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 9, 149-162.
- 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>

- Dotimas, E. M., & Hider, R. C. (1987). Honeybee venom. *Bee World*, 68(2), 51-70. DOI: 10.1080/0005772X.1987.11098915
- Flanjak, I., Kovačić, M., Primorac, L., Soldić, A., Puškadija, Z., & Rajs, B. B. (2024). 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 sustainable apiculture. Roma: FAO
- Fontana, P., & Zanotelli, L. (2021). Api e biodiversità: tutela delle sottospecie autoctone di *Apis mellifera* Linnaeus, 1758. Fondazione Edmund Mach.
- Galindo, P. Y. P., López, G. B., Ortíz, E. M., & García, V. E. B. (2019). Miel de abeja: Propiedades antioxidantes y antimicrobianas. *Revista de divulgación Científica de nutrición ambiental y seguridad alimentaria*, 8(2), 14-18.
- Gu, H., Han, S. M., & 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>
- Guha, S., Ferrie, R. P., Ghimire, J., Ventura, C. R., Wu, E., Sun, L., Kim, S. Y., Wiedman, G. R., Hristova, K., & Wimley, W. C. (2021). Applications and evolution of melittin, the quintessential membrane active peptide. *Biochemical pharmacology*, 193, 114769. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2021.114769>
- Hwang, D. S., Kim, S. K., & Bae, H. (2015). Therapeutic effects of bee venom on immunological and neurological diseases. *Toxins*, 7(7), 2413-2421. doi:10.3390/toxins7072413
- Johnson, B. R. (2009). Division of labor in honeybees: form, function, and proximate mechanisms. *Behavioral ecology and sociobiology*, 64(3), 305-316. <https://doi.org/10.1007/s00265-009-0874-7>
- Junior, R. S. F., Sciani, J. M., Marques-Porto, R., Junior, A. L., Orsi, R. D. O., Barraviera, B., & Pimenta, D. C. (2010). Africanized honey bee (*Apis mellifera*) venom profiling: Seasonal variation of melittin and phospholipase A2 levels. *Toxicon*, 56(3), 355-362. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.023>
- Kane, T. R., & Faux, C. M. (Ed.). (2021). *Honey bee medicine for the veterinary practitioner*. John Wiley & Sons.
- Kekeçoğlu, M., Çaprazlı, T., Samancı, A. E. T., Samancı, T., & Önder, E. Y. (2022). Factors affecting quality of honey bee venom. *Journal of Apicultural Science*, 66(1), 5-14. DOI: 10.2478/JAS-2022-0001

- Klein, A. M., Vaissière, B. E., Cane, J. H., Steffan-Dewenter, I., Cunningham, S. A., Kremen, C., & Tscharntke, T. (2007). Importance of pollinators in changing landscapes for world crops. *Proceedings of the royal society B: biological sciences*, 274(1608), 303-313. <https://doi.org/10.1098/rspb.2006.3721>
- Li, R., Zhang, L., Fang, Y., Han, B., Lu, X., Zhou, T., ... & 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(1), 766. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-766>
- Lobos O., I., Pávez A., P., & Remehue, I. d. I. A. C. R. d. I. (2021). Apicultura en el Territorio Patagonia Verde, región de Los Lagos.
- Macri, I. N. (2023). *La abeja Apis mellifera como bioindicador del impacto ambiental: estudio sobre su fisiología, comportamiento y sociabilidad en un agroecosistema* (Doctoral dissertation, Universidad de Buenos Aires).
- Morse, R. A., & Benton, A. W. (1964). Notes on venom collection from honeybees. *Bee World*, 45(4), 141-143. DOI: 10.1080/0005772X.1964.11097072
- Michener, C. D. (1974). *The social behavior of the bees: a comparative study* (1^a ed.). Harvard University Press.
- Michener, C. D. (2007). *The bees of the world*. JHU press.
- Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. (2020). *Anuario estadístico agropecuario 2024*. DIEA
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, Organización Mundial de la Salud. (2022). Norma para la miel (CXS 12-1981). En *Codex Alimentarius*. https://www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/sh-proxy/en/?lnk=1&url=https%253A%252F%252Fworkspace.fao.org%252Fsites%252Fcodex%252Fstandards%252FCXS%2B12-1981%252FCXS_012s.pdf
- 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)
- Pacáková, V., Štulík, K., Hau, P. T., Jelinek, I., Vinš, 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/10.1016/0021-9673\(94\)01170-J](https://doi.org/10.1016/0021-9673(94)01170-J)
- Pérez Graña, A., Rodríguez-Batista V., Anzola J., Martínez. Z., Juri, P., Nogueira, E., & Fágundez C. (2023, septiembre). 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.

Pereyra, F. (2024). Sector apícola: Situación y perspectivas. En *Anuario OPYPA*. Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca. <https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/Anuarioopypa2024/CP/15/CP15web/C15-Sectorapicola.pdf#page=2.36>

Productos de la Colmena. Beneficios, Usos y Conservación. (2025). Abeja presumida. <https://www.abejapresumida.com/productos-de-una-colmena/>

Rady, I., Siddiqui, I. A., Rady, M., & Mukhtar, H. (2017). Melittin, a major peptide component of bee venom, and its conjugates in cancer therapy. *Cancer letters*, 402, 16-31. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.05.010>

Robinson, G. E. (2009). Division of labor in insect societies. *Encyclopedia of insects*, 297-299. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374144-8.00086-2>

Rodríguez Batista, V. (2022.). Desarrollo de un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de la composición de apitoxina. Tesis de grado. Universidad de la República (Uruguay). Facultad de Veterinaria.

Rodriguez-Batista V., Pérez Graña, A., Anzola J., Fagúndez C., Nogueira, E. (2023). Apitoxin from young bees has higher concentration of mellitin [Poster]. *48th Apimondia International Congress, Santiago de Chile, Chile*.

Seeley, T. D. (1982). Adaptive significance of the age polyethism schedule in honeybee colonies. *Behavioral ecology and sociobiology*, 11(4), 287-293. <https://doi.org/10.1007/BF00299306>

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>

Tautz, J. (2008). *The buzz about bees*. Springer

Vit, P. (2004). Productos de la colmena recolectados y procesados por las abejas: Miel, polen y propóleos. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 35(2), 32-39.

Vit, P. (2005). Productos de la colmena secretados por las abejas: Cera de abejas, jalea real y veneno de abejas. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel*, 36(1), 35-42.

Wilson, E. O. (1971) *The Insect Societies* (Belknap, Cambridge, MA).

Wilson, E. O., & Hölldobler, B. (2005). Eusociality: origin and consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(38), 13367-13371.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0505858102>

Walker, E. (1907) Bee's Stings and Rheumatism. *Nature*, 76(568).
<https://doi.org/10.1038/076568d0>

Yadav, S., Kumar, Y., & Jat, B. L. (2017). Honeybee: Diversity, castes and life cycle. En *Industrial entomology* (pp. 5-34). Singapore: Springer Singapore.