



## Producción y caracterización del veneno de abejas en Chulucanas, Piura

Production and characterization of bee venom in Chulucanas, Piura

Jorge Murakami<sup>1,\*</sup>; Giovanni López<sup>2</sup>; Maryam Paredes<sup>2</sup>; Gianina Cuya<sup>2</sup>; Michael Talledo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Alimentos Naturales del Perú Srl, Piura 457, Perú.

<sup>2</sup> Instituto de Medicina Tropical Alexander von Humboldt, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima 31, Perú.

### RESUMEN

Este estudio describe la producción y purificación del veneno de las abejas en la zona norte del Perú mediante el análisis del contenido de partículas interferentes durante los meses posteriores al fenómeno de El Niño costero (FNC). Se evaluaron los cambios en las cantidades de proteínas de veneno producidos por colmena y su principal componente, la melitina. Se instalaron colmenas con abejas (n=60) *Apis mellifera* en el bosque seco de Chulucanas (Piura, Perú) y se extrajo el veneno por electroestimulación. Se observaron las partículas interferentes por estereoscopia y se purificó el veneno por ultrafiltración. El contenido proteico se midió por fluorometría y se caracterizó por cromatografía líquida. Se encontró que durante los meses posteriores al FNC los cristales de veneno tuvieron partículas interferentes en un 23,4 % del peso seco. Sin embargo, las partículas principalmente cera y própolis fueron disminuyendo con el transcurso de los meses (hasta 6 % del peso seco de veneno) sin alterar el contenido de melitina (42,6 % del contenido del veneno). Para el empleo de cristales de venenos puros y seguros, se conoció la permanencia de las partículas interferentes durante los meses posteriores al FNC. A pesar de existir un bajo rendimiento proteico durante los primeros meses, las características fisicoquímicas de la melitina no se afectaron.

**Palabras clave:** veneno de abejas; apitoxina; fenómeno El Niño costero; melitina; *Apis mellifera*.

### ABSTRACT

This study describes the production and purification of bee venom in the northern of Peru and the content of interfering particles was evaluated after the coastal El Niño phenomenon. Likewise, changes in the amounts of proteins produced by hive and its main component, melittin, were evaluated. Honey bee (*Apis mellifera*) hive (n=60) were installed in the dry forest of Chulucanas (Piura, Peru) and the venom was extracted by electrostimulation. Interfering particles were observed and was purified by ultrafiltration. The protein content was measured by fluorometry and characterized by liquid chromatography. We found that the crystals of bee venom had interfering particles in 23.4 % of the dry weight. However, the particles mainly wax and propolis were decreasing over the course of the months (up to 6 % of the dry weight of venom) without altering the content of melittin (42.6 % of the content of the bee venom). For the use of safe bee venom crystals, it was possible to know the interfering particles during the months after the coastal El Niño phenomenon. Despite a low protein yield during the first months, the physicochemical characteristics of melittin were not affected.

**Keywords:** bee venom; apitoxin; coastal El Niño phenomenon; melittin; *Apis mellifera*.

### 1. Introducción

La apicultura en América se remonta al siglo XVII, con el ingreso de abejas *Apis mellifera ligustica*. En el Perú, la comercialización de miel y polen recién cobró valor económico a mitad del siglo XX (Crane, 1999). Los bosques secos de Chulucanas (Piura) son, el hábitat típico de especies de algarrobo (*Prosopis pallida*), sapote (*Capparis scabrada*), faique (*Acacia macracantha*), hualtaco (*Loxopterygium huasango*) que hacen propicia la crianza de abejas (Rodríguez et al., 2005). Algunos

productos de las abejas son recomendados para enfermedades donde se han descrito efectos iguales o superiores que el tratamiento estándar (Hellner et al., 2008), como la miel y el própolis en la cicatrización (Moolenaar et al., 2006). El veneno de abejas, al poseer proteínas bioactivas, ha demostrado tener efectos antiinflamatorios y antinociceptivos (Kwon et al., 2002; Park et al., 2004; Yang et al., 2010; Gu et al., 2015). Estas proteínas son sintetizadas por las células secretoras de la glándula ácida (Bridges y Owen, 1984), y son almacenado en el saco de veneno

localizado en la región posterior del abdomen (Kheyri et al., 2013). Los cristales de veneno son de color blanco grisáceo, de olor picante y de sabor amargo (Omar, 2017). Contiene melitina en un 50-60 % y fosfolipasa A2 en un 10-12 % del peso seco (Gajski y Garaj-Vrhovac, 2013; Dong et al., 2015), ambas proteínas son reconocidas por incrementar la actividad lítica tisular durante la picadura (Noah et al., 2013). Otros péptidos en la apitoxina son la apamina (1-2 %) y el péptido degranulador de mastocitos (1-3 %); el resto son lípidos y carbohidratos equivalente a 1-2 % del peso seco del veneno (Stuhlmeier, 2007).

La extracción del veneno de abejas o apitoxina se hace diseccionando quirúrgicamente el aguijón junto el aparato de veneno lo que trae como consecuencia la muerte de la abeja (Li et al., 2013; Saba et al., 2017). Sin embargo, para procesos productivos se emplea métodos de electroestimulación para contraer la musculatura del saco de veneno (Benton et al., 1963; Hamedani et al., 2005; Lee et al., 2008; Matysiak et al., 2011; Pereira et al., 2016). Aunque solo es producido por la abeja reina y por las obreras, la recolección de veneno se debe iniciar en apiarios con colmenas pobladas con obreras adultas alrededor de 16-20 días de vida adulta y con fuentes energético-proteicas disponibles (Danneels et al., 2015). La producción de apitoxina para la formulación de productos seguros y eficaces en medicina alternativa y complementaria no considera el uso de aditivos para su conservación (Lee et al., 2018), exige, además, garantizar el contenido de proteína con sus características fisicoquímicas eliminando las impurezas adquiridas del entorno cercano al apiario (Abrantes et al., 2017). Son las impurezas del interior o exterior de la colmena lo que podría afectar la cantidad y calidad de proteínas en la apitoxina.

Este estudio describe la producción del veneno de abejas obtenida de apiarios con vegetación silvestre de Piura. El estudio se realizó desde noviembre del 2016 a noviembre del 2017 en los bosques secos de la ciudad de Chulucanas con la presencia inusual del fenómeno de El Niño costero (Imarpe, Senamhi, IGP, Indeci, ANA, 2017). Se comprobó que el veneno de abejas acumuló partículas y micropartículas contaminantes, disminuyó el rendimiento de extracción y el contenido proteínico. Se describen recomendaciones a considerar para la población de la colmena y la purificación.

## 2. Material y métodos

### 2.1. Ubicación de colmenas

En noviembre del 2016 se trasladaron colmenas a tres diferentes zonas del bosque seco de

Chulucanas, a una altura cercana de los 254 m s. n. m. y donde existió la floración de sapote. Un primer apiario estuvo ubicado en las coordenadas S5° 09' 13.6" W80° 22' 32.3" (24,5 km de Chulucanas). El segundo apiario estuvo ubicado en las coordenadas S5° 11' 12" W79° 58' 14" (23,7 km de Chulucanas). El tercer apiario estuvo ubicado en las coordenadas S4° 59' 30.0" W80° 7' 44.0" (11,8 km de Chulucanas). Los apiarios estuvieron conformados por 25 colmenas pobladas con colonias de *Apis mellifera* cuya edad estaban entre 20-40 días. De estas colmenas, 20 estuvieron destinadas a la producción de veneno y otras 5 para asistir a las colmenas productoras del veneno, es decir, supliendo de panales de cría o de reservas (miel y polen) a la colmena que la requería. La temperatura ambiental se tomó de la estación del Servicio Nacional de Meteorología e Hidrología (Senamhi) (Miraflores, Piura). Durante el periodo de lluvias sucedidas por el fenómeno de El Niño costero se revitalizaron las colmenas con alimento artificial consistente en jarabe de azúcar al 50 % del volumen, en cantidades que oscilaban entre 1-2 litros por colmena por semana.

### 2.2. Extracción de veneno de abeja

Se ingresó a los apiarios durante horas de la tarde. Se empleó el método de electroestimulación para la extracción masiva de veneno sin sacrificar abejas. Los electrodos fueron dispuestos paralelamente sobre vidrios asépticamente limpios de 156 cm<sup>2</sup> y soportados en diez parrillas aisladas, colocadas dentro del piso de las piqueras de diez colmenas. Las parrillas fueron conectadas a un generador de pulsos de voltaje del tipo electromecánico. Se aplicó a los electrodos 29,4 voltios para estimular brevemente las abejas por 7 segundos, al momento de hacer contacto, pequeñas gotas de veneno se fueron acumulando. Se abrió el circuito de manera automática durante 13 segundos y el proceso de electroestimulación finalizó al cumplir los 10 minutos y luego de una pausa de 10 minutos se repitió el proceso dos veces. Los vidrios que contenían las gotas de veneno fueron transportados hasta el laboratorio protegidos de la luz, luego de deshidratarse fueron raspados con una cuchilla limpia. Para favorecer un descanso no menor a 15 días de cada apiario, se alternaron las sesenta colmenas en tres apiarios de veinte colmenas cada una. La mortandad de abejas se cuantificó acabado cada proceso de electroestimulación.

### 2.3. Recolección, inspección y purificación de los cristales de veneno de abeja

Se recolectó y pesaron los cristales con una balanza analítica de resolución mínima 0,001 g

(VWR-USA) en un espacio aséptico irradiado previamente con luz UV-C. Se conservaron los cristales protegiéndolos de la luz y congelándolos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el día de su estudio. La inspección de elementos particulados se realizó haciendo pasar los cristales por un tamiz de  $100\text{ }\mu\text{m}$  (Corning®-USA), los elementos retenidos se visualizaron en un estereoscopio a 400 veces de aumento (Fisher Scientific, Rochester, NY). Una fracción de apitoxina tamizada se diluyó en agua apirógena y se centrifugó a  $3000g$  por 10 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se filtró a través de una membrana de  $0,22\text{ }\mu\text{m}$ , midiéndose la concentración de proteína con kit para ensayos de proteínas (*Qubit™ Protein Assay Kit*, de su traducción al inglés) y el fluorómetro *Qubit 2.0* (Life Technologies, Carlsbad, CA). Se determinó el nivel proteico calculando: miligramos de proteína/1 g de veneno. La caracterización de los componentes se realizó por cromatografía líquida de Ultra Alto Rendimiento (Ultra-High Performance Liquid Chromatography, de su traducción al inglés) (Thermo Fisher Scientific, USA), equipado con una columna *Phenomenex Aeris PEPTIDE 2.6u. XB-C18* y un salva columna *Phenomenex*.

## 2.4. Análisis estadístico

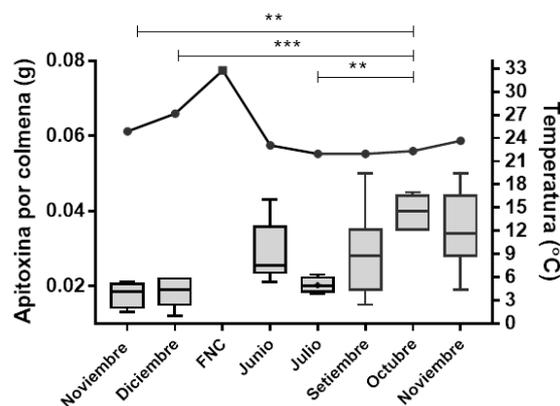
La comparación de la producción de veneno de abeja por colmena fue realizada con el test de Mann Whitney *U* en análisis de dos colas, y un *p* menor a 0,05 fue considerado como significancia estadística.

## 3. Resultados y discusión

### 3.1. Producción de veneno de abejas durante la floración silvestre

La producción de veneno se programó inicialmente en el periodo del 2016 a noviembre del 2017. Sin embargo, de enero a mayo del 2017 se suspendió la producción de apitoxina debido al aumento de las temperaturas del clima y al fenómeno de El Niño costero. En junio, al disminuir la temperatura a  $23\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se retomó la producción de veneno; pero, debido a la escasez de la floración del sapote se reforzaron las colmenas con alimento artificial. A partir de setiembre la temperatura promedio fue de  $22\text{ }^{\circ}\text{C}$ , coincidiendo con los primeros brotes de la flor de algarrobo y del faique. Hasta el mes de noviembre del 2017, se hicieron un total de treinta y seis extracciones de veneno de abejas. Se encontraron diferencias en la recolección de veneno de abejas en los meses de julio y octubre ( $p=0,02$ ) (Figura 1). La disminución de la floración del sapote durante los meses de mayo y junio disminuyeron el aporte polínico para la producción

de veneno. A pesar de ello, la floración primaveral del algarrobo y faique aumentó la producción de veneno de octubre ( $0,040\text{ g}$  por colmena), estando mayores que las producciones de noviembre y diciembre del 2016 ( $p=0,008$  y  $p=0,0005$  respectivamente) (Figura 1).



**Figura 1.** Recolección de veneno de abeja entre noviembre del 2016 y noviembre del 2017 en tres apiarios del bosque seco de Chulucanas. Se recolectó apitoxina los primeros dos meses del 2016 (noviembre y diciembre). Durante el FNC la temperatura alcanzó los  $31\text{ }^{\circ}\text{C}$  y no se recolectó apitoxina. La línea representa la temperatura promedio del clima. Los asteriscos representan el poder de significancia estadística.

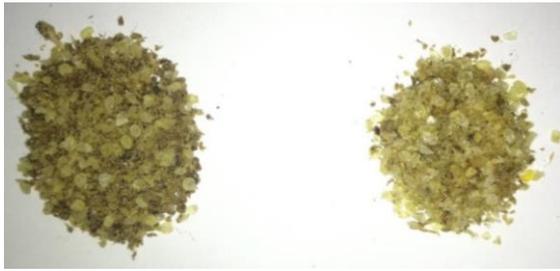
La alimentación artificial pudo sostener la producción de veneno durante el mes de junio ( $0,029\text{ g}$  por colmena) y julio ( $0,020\text{ g}$  por colmena). Durante los siete meses se ingresaron 36 veces a los diferentes apiarios. Se emplearon las mismas condiciones de electroestimulación en los tres apiarios y la mortalidad de abejas no superó las 80 a 100 abejas por cada colmena.

### 3.2. Interferentes en el veneno de abeja posterior al FNC

Otro importante hallazgo fue el que durante los meses de junio a setiembre se pudo observar elementos particulados grandes que fueron identificados al estereoscopio como resinas de própolis y escamas de cera (Figura 2).

Estos elementos particulados estuvieron presentes, formando el 23,4 % del peso seco de veneno en el mes de junio, y el 14,3 % del peso seco de veneno recolectado durante el mes de setiembre. En los meses de octubre y noviembre estos elementos solo alcanzaron el 6 % del peso seco de veneno. Durante el transcurso de estos meses, la resina fue disminuyendo cualitativamente. Esto significó, que desde el mes de junio existió acúmulo de interferentes en el veneno que se asoció a la actividad de las abejas en recubrir el interior de las colmenas y la construcción de nuevos panales

debido al ingreso de néctar (Simone-finstrom et al., 2017).



**Figura 3.** Elementos particulados en el veneno de abeja posterior al fenómeno de El Niño costero. Partículas de própolis con escamas de cera, identificados en los meses de junio (izquierda) y setiembre (derecha). Nótese la abundancia de própolis. Derecha. Escamas de cera con menos própolis durante los meses de octubre y noviembre.

### 3.3. Gradual aumento en el rendimiento de purificación de veneno por la floración silvestre

Al terminar el FNC en el bosque seco de Chulucanas se midieron los efectos en el contenido proteico de la apitoxina. Las concentraciones de proteína fueron de 1,49 mg/mL en el mes de junio y de 11,9 mg/mL en el mes de octubre, encontrándose un contenido proteico de 119,2 mg/g en el mes de junio y 476 mg/g en el mes de octubre.

El veneno una vez disuelto y filtrado se inyectó en el cromatógrafo encontrándose que el parámetro proteico guardaba un porcentaje de 42,6 % para melitina y un 6,5 % para fosfolipasa A2 (Figura 3). La presencia de interferentes en el mes de junio no alteró la proporción de melitina y fosfolipasa A2, estando en su porcentaje sugerido internacionalmente (40-50 % del peso seco del veneno). A

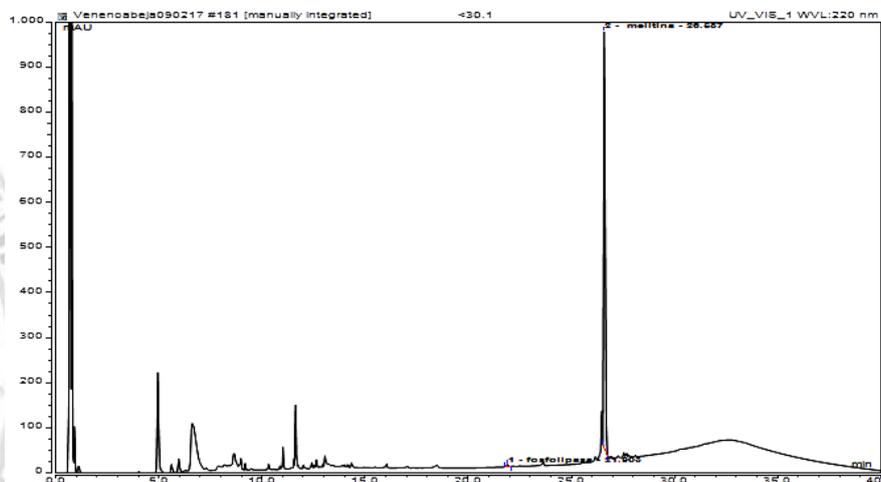
pesar de que el rendimiento proteico se vio afectado en los meses de junio y julio este aumentó finalmente en los meses de octubre y noviembre. Fue la alta actividad de pecoreo de las abejas por construir y restablecer panales lo que incorporó escamas de cera, própolis y algunos granos de polen. Durante los meses de octubre y noviembre no se encontraron ninguno de estos elementos.

### 4. Conclusiones

En la ciudad de Chulucanas, la presencia de periodos largos de sequía (mayo a diciembre) y lluvias torrenciales son cada vez más frecuentes por efecto del fenómeno de El Niño (Keller y Echeverría, 2013) que afectaron la disponibilidad de flores silvestres. Fue sólo el sapote que floreció como única especie para nutrir a las abejas (mayo 2017). A pesar de una corta floración de sapote, la población de abejas fue aumentando por el aporte energético proteico de la floración de algarrobo y otras especies del bosque seco, lo que incidió en el aumento de la recolección del veneno (Figura 1). En los meses de poca floración justifica el revitalizar a las colmenas con alimentación artificial cuando el néctar es escaso.

Aunque existió poca disponibilidad de alimento silvestre para las abejas debido al fenómeno de El Niño, repetitivo cada 10 a 15 años (Takahashi y Martínez, 2017), este estudio demostró la viabilidad de extraer veneno de abeja en el bosque seco de Chulucanas.

El veneno de abejas recolectado durante el mes de junio del 2017 tuvo un aspecto oscurecido debido a impurezas (Figura 2) que afectaron el contenido proteico (solo 230 mg/g en el mes de junio). Sin embargo, no se encontró cambios cualitativos de la melitina ni de la fosfolipasa A2.



**Figura 3.** Cromatograma de apitoxina de Piura posterior al fenómeno de El Niño Costero. Picos de melitina (M) y fosfolipasa A2 (F) presentes en la apitoxina recolectada durante el mes de junio. La separación fue realizada con una columna Aeris PEPTIDE 2.6u. XB-C18 acoplada a un UHPLC.

Las condiciones de electroestimulación utilizadas generaron muy baja mortalidad de las abejas. Sin embargo, se requiere monitorear los contenidos proteicos mínimos deseables (Abrantes et al., 2017) para su uso en medicina alternativa y complementaria. Se requiere hacer ensayos de producción de veneno con la finalidad de disminuir a cero la muerte de abejas, por ejemplo, nuevos prototipos electrónicos con nuevas variables de tiempo e intensidad eléctrica, comparar parrillas horizontales (de piso) y verticales (de marco). Estas últimas, aunque no necesariamente garantizarían mayor cantidad de veneno, si produciría una mayor calidad del contenido proteico.

### Agradecimientos

Al ingeniero Antonio Arce García, director de la EEA "San Ramón"- Yurimaguas; al Sr. Abraham Suybate Ruiz, presidente de la Confederación Peruana de Apicultores – Copeapi, por su permanente apoyo moral; al técnico apícola Segundo Silva Gonzaga, por sus aportes en el mejoramiento de la producción del veneno en Chulucanas, así como a todos los apicultores de Moyobamba y al ingeniero Mario Cárdenas Robles, de la empresa Teleingeniería, quien colaboró con la elaboración del manual de procedimientos del equipo extractor de apitoxina.

### Referencias bibliográficas

- Abrantes, A.F. Rocha, T.C.; Lima, A.B. Sales, C.M. 2017. Honeybee venom: influence of collection on quality and cytotoxicity. *Ciência Rural* 47(10): 8-11.
- Benton, A.W.; Morse, R.A.; Stewart, J.D. 1963. Venom collection from honey bees. *Science* 142(3589): 228-230.
- Bridges, A. and Owen, M. 1984. The morphology of the honey bee (*Apis mellifera* L.) venom gland and reservoir. *Journal of Morphology* 181(1): 69-86.
- Crane, E. 1999. The world history of Beekeeping and Honey Hunting. 1ra edició. Edited by Routledge Taylor and Francis group. New York: 675 pp.
- Danneels, E.L.; Van Vaerenbergh, M.; Debyser, G.; Dirk, B. 2015. Honeybee venom proteome profile of queens and winter bees as determined by a mass spectrometric approach. *Toxins* 7(11): 4468-4483.
- 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*. Elsevier 1002: 139-143.
- Gajski, G.; Garaj-Vrhovac, V. 2013. Melittin: A lytic peptide with anticancer properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. Elsevier 36(2): 697-705.
- Gu, S.M.; Park, M.H.; Hwang, C.J. Song, H.S.; Lee, U.S.; Han, S.B. Oh, K.W.; Ham, Y.W.; Song, M.J.; Son, D.J.; Hong, J.T. 2015. Bee venom ameliorates lipopolysaccharide- induced memory loss by preventing NF-kappaB pathway. *Journal of Neuroinflammation*. *Journal of Neuroinflammation* 12(124): 1-15.
- Hamedani, M.; Mirshafiey, A.; Vatanpour, H.; Khorramizadeh, M.R.; Saadat, F.; Berahmeh, A.; Hadji-Ghasemi, F. 2005. In vitro assessment of bee venom effects on matrix metalloproteinase activity and interferon production. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 4(1): 9-14.
- Hellner, M.; Winter, D.; Von Georgi, R.; Münstedt, K. 2008. Apitherapy: Usage and experience in German beekeepers. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* 5(4): 475-479.
- Imarpe, Senamhi, IGP, Indeci, ANA, C. 2017. Estudio Nacional Del Fenómeno El Niño, Produce. Disponible en: [http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe\\_infntco\\_informe\\_tecnico\\_extraordinario\\_001\\_2017.pdf](http://www.imarpe.pe/imarpe/archivos/informes/imarpe_infntco_informe_tecnico_extraordinario_001_2017.pdf)
- Keller, M.; Echeverria, D. 2013. Climate Risk Management for Agriculture in Peru: Focus on the Regions of Junin and Piura. Disponible en: [https://www.iisd.org/sites/default/files/publications/crm\\_peru\\_es.pdf](https://www.iisd.org/sites/default/files/publications/crm_peru_es.pdf)
- Kheyri, H.; Cribb, B.W.; Merritt, D.J. 2013. Venom and hypopharyngeal glands. *Arthropod Structure and Development*. Elsevier 42(2) 107-114.
- Kwon, Y.B.; Lee, H.J.; Han, H.J.; Mar, W.C.; Kang, S.K.; Yoon, O.B.; Beitz, A.J.; Lee, J.H. 2002. The water-soluble fraction of bee venom produces antinociceptive and anti-inflammatory effects on rheumatoid arthritis in rats. *Life Sciences* 71(2): 191-204.
- Lee, H.S.; Chung, S.H.; Song, M.Y.; Kim, S.S.; Shin, H.D.; Shim, W.J.; Han, A.R.; Lee, J.S. 2008. Effects of bee venom on the maturation of murine dendritic cells stimulated by LPS. *Journal of Ethnopharmacology* 120(2): 215-219.
- Lee, Y.; Kim, S.G.; Kim, I.S.; Lee, H.D. 2018. Standardization of the Manufacturing Process of Bee Venom Pharmacopuncture Containing Melittin as the Active Ingredient. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine* Art.2353280.
- 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*. *BMC Genomics* 14(1): Art.766.
- Matysiak, J.; Schmelzerb, C.; Neubertb, R.; Kokota, Z. 2011. Characterization of honeybee venom by MALDI-TOF and nanoESI-QqTOF mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 54(2): 273-278.
- Moolenaar, M.; Poorter, R.L.; Van der Toorn, P.P.; Lenderink, A.W.; Poortmans, P.; Egberts, A.C. 2006. The effect of honey compared to conventional treatment on healing of radiotherapy-induced skin toxicity in breast cancer patients. *Acta Oncologica* 45(5): 623-624.
- Noah, W.; Palm, R.K.; Rosenstein, S.; Yu, D.S.; Florsheim, R.M. 2013. Bee venom phospholipase A2 induces a primary type 2 response that is dependent on the receptor ST2 and confers protective immunity. *Immunity* 14(39): 1-14.
- Omar, R.E. 2017. Effect of Bee Venom Collection on the Measurement of Brood Rearing Activity of Honey Bee Colony *Apis mellifera* L. *Middle East Journal of Agriculture Research* 6(2): 409-414.
- Park, H.J.; Lee, S.H.; Son, D.J.; Oh, K.W.; Kim, K.H.; Song, H.S.; Kim, G.J.; Oh, G.T.; Yoon, D.Y.; Hong, J.T. 2004. Antiarthritic effect of bee venom: Inhibition of inflammation mediator generation by suppression of NF- $\kappa$ B through interaction with the p50 subunit. *Arthritis and Rheumatism* 50(11): 3504-3515.
- Pereira, A.V.; de Barros, G.; Pinto, E.G.; Tempone, A.G.; Orsi, R.; Dos Santos, L.D.; Calvi, S.; Ferreira, R.S.; Pimenta, D.C.; Barraviera, B. 2016. Melittin induces in vitro death of *Leishmania (Leishmania)* infantum by triggering the cellular innate immune response. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* 22(1): 1-8.
- Rodríguez, R. 2005. El Niño events recorded in dry-forest species of the lowlands of northwest Peru. *Dendrochronologia* 22(3): 181-186.
- Saba, E.; Shafeeq, T.; Irfan, M.; Lee, Y.Y.; Kwon, H.W.; Seo, M.G.; Park, S.J.; Lee, K.Y.; Rhee, M.H. 2017. Anti-Inflammatory Activity of Crude Venom Isolated from Parasitoid Wasp, *Bracon hebetor* Say. *Mediators of Inflammation* 11 pp.

Simone-finström, M. Borba, R.S.; Wilson, M.; Spivak, M. 2017. Propolis Counteracts Some Threats to Honey Bee Health. *Insects* 8(46): 1–20.

Stuhlmeier, K.M. 2007. Apis Mellifera Venom and Melittin Block neither NF- $\kappa$ B-p50-DNA Interactions nor the Activation of NF- $\kappa$ B. Instead They Activate the Transcription of Proinflammatory Genes and the Release of Reactive Oxygen Intermediates. *The Journal of Immunology* 179(1): 655-664.

Takahashi, K.; Martínez, A.G. 2017. The very strong coastal El Niño in 1925 in the far-eastern Pacific. *Climate Dynamics*. Springer Berlin Heidelberg. 27 pp.

Yang, E.J. 2010. Bee venom attenuates neuroinflammatory events and extends survival in amyotrophic lateral sclerosis models. *Journal of neuroinflammation* 7(1): Art.69.

