

# Caracterização química e propriedades bioativas de amostras de veneno de abelha obtidas no Nordeste de Portugal

## Chemical characterization and bioactive properties of bee venom samples from Northeast of Portugal

Filipa Sobral, Ricardo C. Calhelha, Soraia Falcão, Miguel Vilas-Boas\* e Isabel C.F.R. Ferreira

Centro de Investigação de Montanha (CIMO), ESA, Instituto Politécnico de Bragança, Campus de Santa Apolónia, 1172, 5301-855 Bragança, Portugal.  
(\*e-mail: mvboas@ipb.pt)  
<http://dx.doi.org/10.19084/RCA16237>

Recebido/received: 2016.12.22  
Recebido em versão revista/received in revised form: 2017.03.13  
Aceite/accepted: 2017.03.13

### RESUMO

O veneno de abelha (VA) ou apitoxina é um produto apícola que tem sido utilizado desde os tempos ancestrais para múltiplas finalidades, nomeadamente em medicina tradicional na apiterapia. Trata-se de uma mistura complexa de substâncias que lhe conferem propriedades bioativas. No presente trabalho, analisaram-se cinco amostras de VA obtidas a partir de *Apis mellifera iberiensis* de dois apiários diferentes (Aveleda e Milhão, na região de Bragança). Foram caracterizadas quimicamente e avaliadas quanto às suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e citotóxicas. A análise das amostras por LC-DAD-ESI/MS<sup>n</sup> demonstrou que a melitina (MEL) era o composto maioritário, seguido da fosfolipase A2 (PLA2) e da apamina (APA). Todas as amostras demonstraram atividade antioxidante, medida pela capacidade captadora de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica, e anti-inflamatória, determinada pela capacidade de diminuir a formação de NO em macrófagos de rato (RAW 264,7). No entanto, não foi observada uma relação direta entre as propriedades bioativas mencionadas e o perfil químico (qualitativo ou quantitativo) das amostras. Os resultados obtidos evidenciam, sim, que existem concentrações específicas, nas quais estes compostos são mais ativos (e.g., presentes na única amostra obtida no apiário de Aveleda). As amostras de VA demonstraram também propriedades citotóxicas semelhantes para todas as linhas celulares tumorais testadas (MCF-7, NCI-H460, HeLa e HepG2), sendo as linhas MCF-7 (carcinoma de mama) e HeLa (carcinoma cervical) as mais suscetíveis. Apesar disso, as amostras estudadas parecem não ser adequadas para o tratamento de carcinoma de mama, hepatocelular e cervical porque, nas concentrações ativas, as amostras também foram tóxicas para células não tumorais (cultura primária de células de fígado de porco, PLP2). Relativamente ao carcinoma do pulmão, o VA deve ser utilizado abaixo da concentração tóxica para as células não tumorais. Em geral, o presente estudo evidenciou o enorme potencial bioativo do VA, sendo o primeiro trabalho realizado com amostras Portuguesas.

**Palavras-chave:** Veneno de abelha, *Apis mellifera iberiensis*, Atividade antioxidante, Potencial anti-inflamatório, Citotoxicidade.

### ABSTRACT

Bee venom (BV) or apitoxin is an apiculture product that has been used since ancient times for several applications namely in the traditional medicine apitherapy. It is a complex mixture of substances responsible for different bioactive properties. In the present work, five bee venom samples obtained from *Apis mellifera iberiensis* from two different apiaries in Bragança (Aveleda and Milhão) were chemically characterized and evaluated for their antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties. The LC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> analysis of the samples showed that melittin was the most abundant compound, followed by phospholipase A2 and apamin. All the samples revealed antioxidant activity, measured by the free radicals scavenging activity, reducing power and lipid peroxidation inhibition, and anti-inflammatory activity, determined by the capacity to inhibit NO formation in murine macrophages (RAW 264,7). However, it was not observed a direct relation between the mentioned bioactive properties and the chemical profile (qualitative or quantitative) of the samples. The results highlight that there are specific concentrations in which these compounds are more active (e.g.,

in the single sample obtained from Aveleda apiary). The BV samples also showed similar cytotoxicity for all the tested tumor cell lines (MCF-7, NCI-H460, HeLa and HepG2), being MCF-7 (breast carcinoma) and HeLa (cervical carcinoma) the most susceptible ones. Nevertheless, the studied samples seem to be not suitable to treat breast, hepatocellular and cervical carcinoma because at the active concentrations, the samples were also toxic for non-tumor cells (porcine liver primary culture, PLP2). Regarding the non-small lung cell carcinoma, BV should be used under the concentration toxic for non-tumor cells. Overall, the present study corroborates the enormous bioactive potential of BV being the first report on samples from Portugal.

**Keywords:** Bee venom, *Apis mellifera iberiensis*, Antioxidant activity, Anti-inflammatory potential, Cytotoxicity.

## INTRODUÇÃO

O veneno de abelha (VA) ou apitoxina é uma ferramenta única no reino animal e possui um papel primordial de defesa para a colmeia. O VA é produzido na glândula do veneno das abelhas (*Apis mellifera*) que se localiza na cavidade abdominal, sendo uma mistura complexa de vários compostos responsáveis pela proteção das abelhas contra uma ampla diversidade de predadores e de outros artrópodes ou vertebrados (Liu *et al.*, 2002; Oršolić, 2009).

Os compostos ativos do VA incluem proteínas e péptidos (melitina (MEL), apamina (APA), adolapina, péptido desgranulador de mastócitos, secapina, procamina, inibidor de protease, tertiapina e outros pequenos péptidos), enzimas (fosfolipase A2 (PLA2), hialuronidase, fosfomonoesterase ácida, lisofosfolipase e  $\alpha$ -glucosidase), assim como componentes não peptídicos, tais como aminas fisiologicamente ativas (histamina, dopamina e noradrenalina), aminoácidos (ácido aminobutírico e ácido  $\alpha$ -amina), açúcares (glucose e frutose), fosfolipídios e compostos voláteis (Park *et al.*, 2010; Gajski & Garaj-Vrhovac, 2013; Liu *et al.*, 2014). Mas, os principais componentes do VA são histamina, catecolaminas, poliaminas, MEL e PLA2 (Oršolić *et al.*, 2003). Por outro lado, a MEL, o péptido desgranulador de mastócitos e a APA são os componentes mais estudados do VA por serem responsáveis pela maior parte dos seus efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e anti-neoplásicos (Jagua-Gualdrón, 2012).

O VA tem sido usado como medicamento tradicional para tratar infecções inflamatórias crônicas (artrite, reumatismo e dor nas costas) (Chang e Bliven, 1979; Son *et al.*, 2007; Vasileiadou *et al.*, 2010) e doenças de pele (Escrig *et al.*, 1997; Han *et al.*, 2012a,b). Os compostos individuais do VA têm demonstrado as mesmas propriedades,

como é o caso do péptido desgranulador de mastócitos (Banks *et al.*, 1990), da MEL (Srivastava *et al.*, 2012; Rayahin *et al.*, 2014) e da PLA2 (Ximenes *et al.*, 2012), que possuem capacidade para reduzir as citocinas pró-inflamatórias e outros mediadores de inflamação.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Recolha e preparação das Amostras

As cinco amostras de VA foram recolhidas entre Maio e Junho de 2014, a partir de colmeias de *Apis mellifera iberiensis* localizadas em dois apiários diferentes próximos de Bragança: Milhão (quatro amostras) e Aveleda (uma amostra), que se encontram a cerca de 26 km um do outro. Para a recolha foi utilizado o equipamento BeeWhisper 0412, colocado à entrada da colmeia.

Após recolha, as amostras foram armazenadas a  $-18^{\circ}\text{C}$  e liofilizadas para as análises posteriores.

### Caracterização química

A caracterização química das amostras de VA foi determinada pela análise de três péptidos (MEL, PLA2 e APA) por LC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup> de acordo com os autores (Sobral *et al.*, 2016).

### Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das soluções aquosas de VA foi avaliada por diferentes ensaios *in vitro*: efeito captador de radicais livres (ensaio do DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), poder redutor (ensaio ferricianeto/azul da Prússia) e inibição da peroxidação lipídica (ensaio  $\beta$ -caroteno/linoleato e

TBARS – espécies reativas do ácido tiobarbitúrico em homogeneizados cerebrais) (Sobral *et al.*, 2017).

### Citotoxicidade e anti-inflamatória

A citotoxicidade foi avaliada em quatro linhas celulares humanas tumorais: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular), utilizando o método da sulforrodamina B (SRB). A citotoxicidade para células normais foi avaliada utilizando uma cultura primária estabelecida a partir de células de fígado de porco (PLP2) (Abreu *et al.*, 2011).

A atividade anti-inflamatória foi avaliada numa linha celular de macrófagos de rato (RAW 264.7), através da inibição da produção de óxido nítrico (NO) (Sobral *et al.*, 2016).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caraterização química das amostras de veneno de abelha

Os compostos químicos identificados nas cinco amostras de VA estudadas são apresentados no Quadro 1. A melitina foi o composto mais abundante em todas as amostras, enquanto a apamina foi o composto encontrado em concentração mais baixa (Quadro 1). A amostra VA2 foi a que apresentou níveis mais elevados de melitina (86,72±0,50 µg/mL), de fosfolipase A2 (11,36±0,18 µg/mL) e de apamina (1,80±0,03 µg/mL), seguida da amostra VA4. Pelo contrário, as amostras VA5 e, principalmente VA1, apresentaram as menores concentrações de todos os compostos.

### Atividade antioxidante das amostras de veneno de abelha anti-inflamatória das amostras de veneno de abelha

Todas as amostras revelaram atividade antioxidante e anti-inflamatória e, aparentemente, não existe relação com nenhum dos componentes individuais identificados e quantificados nessas amostras. A amostra VA5 revelou ter a maior atividade captadora de radicais livres DPPH, o maior poder redutor, bem como a maior capacidade de inibição da peroxidação lipídica e da produção de NO (Quadro 2). Entre as amostras de VA estudadas, a amostra VA5 foi a única a ser recolhida num apiário diferente (Aveleda). Deve ainda realçar-se que a atividade anti-inflamatória de todas as amostras de VA (valores de EC<sub>50</sub> <8 µg mL) foi mais elevada do que a observada para o controlo positivo, que foi a dexametasona (valores de EC<sub>50</sub>=15,5±1,96 µg/mL; Quadro 2).

A falta de correlação entre a concentração de melitina, fosfolipase A2 e apamina, e os resultados *in vitro* das atividades antioxidante e anti-inflamatória, evidencia que há concentrações específicas em que estes compostos se tornam mais ativos. A concentrações mais elevadas ou mais baixas, as atividades anteriormente mencionadas diminuem, provavelmente, devido a efeitos antagonistas.

### Citotoxicidade das amostras de veneno de abelha

As amostras de VA estudadas demonstraram citotoxicidade semelhante para todas as linhas celulares tumorais testadas: carcinoma de mama (MCF-7), pulmão (NCI-H460), cervical (HeLa) e hepatocelular (HepG2) (Quadro 2). As linhas celulares

**Quadro 1** - Caraterização química das amostras de veneno de abelha (VA) através da análise de péptidos por LC/DAD/ESI-MS<sup>n</sup>

	VA 1	VA 2	VA 3	VA 4	VA 5
Apamina (µg/mL)	0,94±0,01 <sup>d</sup>	1,80±0,03 <sup>ab</sup>	1,61±0,17 <sup>b</sup>	1,95±0,02 <sup>a</sup>	1,25±0,04 <sup>c</sup>
Fosfolipase A2 (µg/mL)	4,98±0,01 <sup>d</sup>	11,36±0,18 <sup>a</sup>	9,02±0,62 <sup>c</sup>	10,08±0,34 <sup>b</sup>	5,98±0,11 <sup>d</sup>
Melitina (µg/mL)	35,64±0,09 <sup>e</sup>	86,72±0,50 <sup>a</sup>	70,58±3,99 <sup>c</sup>	80,74±0,34 <sup>b</sup>	52,20±0,66 <sup>d</sup>

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre amostras (p <0,05).

**Quadro 2** - Propriedades bioativas das amostras de veneno de abelha (VA)

	VA1	VA2	VA3	VA4	VA5	Trolox
Atividade antioxidante (valores de EC <sub>50</sub> , µg/mL)						
Atividade captadora de radicais DPPH	487±7 <sup>b</sup>	451±6 <sup>c</sup>	491±1 <sup>b</sup>	512±16 <sup>a</sup>	346±4 <sup>d</sup>	42
Poder redutor	326±16 <sup>a</sup>	238±10 <sup>d</sup>	306±1 <sup>b</sup>	291±2 <sup>c</sup>	225±5 <sup>e</sup>	41
Inibição da descoloração do β-caroteno	710±10 <sup>b</sup>	545±9 <sup>d</sup>	826±9 <sup>a</sup>	666±23 <sup>c</sup>	435±15 <sup>e</sup>	18
Inibição de TBARS	1,45±0,08 <sup>c</sup>	1,22±0,05 <sup>d</sup>	2,38±0,20 <sup>a</sup>	1,70±0,03 <sup>b</sup>	1,07±0,10 <sup>e</sup>	23
Atividade anti-inflamatória (valores de EC <sub>50</sub> , µg/mL)						
	Dexametasona					
Produção de NO	6,77±0,13 <sup>b</sup>	5,76±0,06 <sup>c</sup>	5,81±0,94 <sup>c</sup>	7,91±0,17 <sup>a</sup>	4,85±0,02 <sup>d</sup>	15,5±1,96
Atividade citotóxica						
	Elipticina					
Para linhas celulares tumorais (valores de GI <sub>50</sub> , µg/mL)						
MCF-7	4,16±0,49 <sup>a</sup>	4,44±0,43 <sup>a</sup>	4,02±0,38 <sup>a</sup>	4,51±0,21 <sup>a</sup>	4,49±0,42 <sup>a</sup>	1,21
NCI-H460	16,00±2,34 <sup>a</sup>	17,68±0,53 <sup>a</sup>	18,18±0,86 <sup>a</sup>	19,68±1,80 <sup>a</sup>	17,98±0,86 <sup>a</sup>	1,03
HeLa	4,54±0,22 <sup>ab</sup>	2,83±0,41 <sup>c</sup>	4,41±0,01 <sup>ab</sup>	3,51±0,81 <sup>bc</sup>	4,80±0,15 <sup>a</sup>	0,91
HepG2	10,6±1,89 <sup>a</sup>	12,19±1,40 <sup>a</sup>	5,43±0,08 <sup>c</sup>	6,55±0,11 <sup>bc</sup>	9,85±0,36 <sup>ab</sup>	1,10
Para células de fígado não tumorais (valores de GI <sub>50</sub> , µg/mL)						
PLP2	15,03±0,28 <sup>a</sup>	13,86±0,10 <sup>a</sup>	10,11±0,91 <sup>b</sup>	12,94±1,21 <sup>ab</sup>	14,66±0,66 <sup>a</sup>	2,29

Valores de EC<sub>50</sub> para a atividade antioxidante: concentração da amostra que providencia 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no poder redutor. Valores de EC<sub>50</sub> para a atividade anti-inflamatória: concentração da amostra que providencia 50% da inibição da produção de NO em relação ao controle negativo (100 %). Valores de GI<sub>50</sub> para a citotoxicidade: concentração de amostra para atingir 50% de inibição do crescimento em linhas celulares tumorais humanas ou na cultura primária de células de fígado (PLP2). Em cada linha, letras diferentes significam diferenças estatisticamente significativas entre amostras ( $p < 0,05$ ).

MCF-7 e HeLa foram as mais suscetíveis à ação das amostras de VA, tendo em conta os valores de GI<sub>50</sub> obtidos (<5 µg/mL). No caso da linha celular HeLa, o mesmo valor de GI<sub>50</sub> foi obtido por Oršolić (2009) para VA proveniente da Eslovénia (3 µg/mL). Por outro lado, amostras comerciais de VA revelaram menor atividade contra a linha celular HeLa [GI<sub>50</sub>=9,7 µg/mL (Kim *et al.*, 2015) e ~20% da viabilidade celular para 60 µg/mL, (Gajski *et al.*, 2014)].

Deve realçar-se a existência de toxicidade das amostras de VA em relação às células de fígado não tumorais (PLP2; Quadro 2) e que apenas para as NCI-H460 as concentrações de GI<sub>50</sub> obtidas (valores entre 16,00±2,34 e 19,68±1,80 µg/mL) foram superiores às observadas nas PLP2 (valores de GI<sub>50</sub> entre 10,11±0,91 e 15,03±0,28 µg/mL). Portanto, as amostras estudadas parecem não ser adequadas

para o tratamento do carcinoma de mama, hepatocelular e cervical, e em relação ao carcinoma do pulmão, estas devem ser aplicadas a baixo da concentração tóxica para as células não tumorais. A toxicidade do VA para células não tumorais não é novidade, tendo sido já descrita em linfócitos por diferentes autores (Lee *et al.*, 2007; Gajski & Garaj-Vrhovac, 2008; Garaj-Vrhovac & Gajski, 2009).

## CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou o amplo potencial bioativo do veneno de abelha (VA) incluindo propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e citotóxicas, e constitui o primeiro documento de estudo com amostras Portuguesas. Apesar da identificação das moléculas peptídicas mais abundantes

no VA (melitina, fosfolipase A2 e apamina), alguns outros componentes minoritários em conjunto com efeitos antagonistas/sinérgicos dos compostos em concentrações específicas, podem ser responsáveis pelas bioatividades observadas, contribuindo assim para os diferentes resultados obtidos nas amostras de VA estudadas.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT, Portugal) pelo suporte financeiro ao CIMO (Pest-OE/AGR/UI0690/2013).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu, R.M.; Ferreira, I.C.F.R.; Calhela, R.C.; Lima, R.T.; Vasconcelos, M.H.; Adegas, F.; Chaves, R. & Queiroz, M.J.R. (2011) – Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno [3,2-*b*]pyridine-2-carboxylate derivatives: *In vitro* evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 46, n. 12, p. 5800-5806. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.09.029>
- Banks, B.E.; Dempsey, C.E.; Vernon, C.A.; Warner, J.A. & Yamey, J. (1990) – Anti-inflammatory activity of bee venom peptide 401 (mast cell degranulating peptide) and compound 48/80 results from mast cell degranulation *in vivo*. *British Journal of Pharmacology*, vol. 99, n. 2, p. 350-354. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1990.tb14707.x>
- Chang, Y.H. & Bliven, M.L. (1979) – Anti-arthritis effect of bee venom. *Agents and Actions*, vol. 9, n. 2, p. 205-211. <http://dx.doi.org/10.1007/BF02024736>
- Escrig, V.; Ubeda, A.; Ferrandiz, M.L.; Darias, J.; Sanchez, J.M.; Alcaraz, M.J. & Paya, M. (1997) – Variabilin: a dual inhibitor of human secretory and cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> with anti-inflammatory activity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 282, n. 1, p. 123-131.
- Gajski, G.M.; Čimborá-Zovko, T.; Rak, S.; Rožman, M.; Osmak, M. & Garaj-Vrhovac, V. (2014) – Combined antitumor effects of bee venom and cisplatin on human cervical and laryngeal carcinoma cells and their drug resistant sublines. *Journal of Applied Toxicology*, vol. 34, n. 12, p. 1332-1341. <http://dx.doi.org/10.1002/jat.2959>
- Gajski, G. & Garaj-Vrhovac, V. (2008) – Genotoxic potential of bee venom (*Apis mellifera*) on human peripheral blood lymphocytes *in vitro* using single cell gel electrophoresis assay. *Journal of Environmental Science and Health*, vol. 43, n. 11, p. 1279-1287. <http://dx.doi.org/10.1080/10934520802177862>
- Gajski, G. & Garaj-Vrhovac, V. (2013) – Melittin: a lytic peptide with anticancer properties. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, vol. 36, n. 2, p. 697-705. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2013.06.009>
- Garaj-Vrhovac, V. & Gajski, G. (2009) – Evaluation of the cytogenetic status of human lymphocytes after exposure to a high concentration of bee venom *in vitro*. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, vol. 60, n. 1, p. 27-34. <http://dx.doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1896>
- Han, S.M.; Lee, G.G. & Park, K.K. (2012a) – Acute dermal toxicity study of bee venom (*Apis mellifera* L.) in rats. *Toxicological Research*, vol. 28, n. 2, p. 99-102. <http://dx.doi.org/10.5487/TR.2012.28.2.099>
- Han, S.M.; Lee, G.G. & Park, K.K. (2012b) – Skin sensitization study of bee venom (*Apis mellifera* L.) in guinea pigs. *Toxicological Research*, vol. 28, n. 1, p. 1-4. <http://dx.doi.org/10.5487/TR.2012.28.1.001>
- Jagua-Gualdrón, A. (2012) – Cáncer y terapéutica con productos de la colmena. Revisión sistemática de los estudios experimentales. *Revista de la Facultad de Medicina*, vol. 60, n. 2, p. 79.
- Kim, Y.W.; Chaturvedi, P.K.; Chun, S.N.; Lee, Y.G. & Ahn, W.S. (2015) – Honeybee venom possesses anti-cancer and antiviral effects by differential inhibition of HPV E6 and E7 expression on cervical cancer cell line. *Oncology Reports*, vol. 33, n. 4, p. 1675-1682. <http://dx.doi.org/10.3892/or.2015.3760>
- Lee, Y.J.; Kang, S.J.; Kim, B.M.; Kim, Y.J.; Woo, H.D. & Chung, H.W. (2007) – Cytotoxicity of honeybee (*Apis mellifera*) venom in normal human lymphocytes and HL-60 cells. *Chemico-Biological Interactions*, vol. 169, n. 3, p. 189-197. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2007.06.036>



- Liu, C.C.; Yang, H.; Zhang, L.L.; Zhang, Q.; Chen, B. & Wang, Y. (2014) – Biotoxins for Cancer Therapy. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 15, n. 12, 4753-4758. <http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.12.4753>
- Liu, X.; Chen, D.; Xie, L. & Zhang, R. (2002) – Effect of honey bee venom on proliferation of K1735M2 mouse melanoma cells in vitro and growth of murine B16 melanomas *in-vivo*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 54, n. 8, p. 1083-1089. <http://dx.doi.org/10.1211/002235702320266235>
- Oršolić, N. (2009) – Potentiation of Bleomycin lethality in HeLa and V79 cells by bee venom. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, vol. 60, n. 3, p. 317-326. <http://dx.doi.org/10.2478/10004-1254-60-2009-1936>
- Oršolić, N.; Šver, L.; Verstovšek, S.; Terzić, S. & Bašić, I. (2003) – Inhibition of mammary carcinoma cell proliferation in vitro and tumor growth in vivo by bee venom. *Toxicol*, vol. 41, n. 7, p. 861-870. [http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101\(03\)00045-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0041-0101(03)00045-X)
- Park, J.H.; Kim, K.H.; Kim, S.J.; Lee, W.R.; Lee, K.G. & Park, K.K. (2010) – Bee venom protects hepatocytes from tumor necrosis factor- $\alpha$  and actinomycin D. *Archives of Pharmacal Research*, vol. 33, n. 2, p. 215-223. <http://dx.doi.org/10.1007/s12272-010-0205-6>
- Rayahin, J.E.; Buhrman, J.S. & Gemeinhart, R.A. (2014) – Melittin–glutathione S-transferase fusion protein exhibits anti-inflammatory properties and minimal toxicity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 65, n. 112-121. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2014.09.012>
- Sobral, F.; Calhelha, R.C.; Barros, L.; Dueñas, M.; Tomás, A.; Santos-Buelga, C; Vilas-Boas, M. & Ferreira, I.C.F.R. (2017) – Flavonoid composition and antitumour activity of bee bread collected in Northeast Portugal. *Molecules*, vol. 22, n. 2, p. 248-260. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules22020248>
- Sobral, F.; Sampaio, A.; Falcão, S.; Queiroz, M.J.R.P.; Calhelha, R.C.; Vilas-Boas, M. & Ferreira, I.C.F.R. (2016) – Chemical characterization, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic properties of bee venom collected in Northeast Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, vol. 94, p. 172-177. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.008>
- Srivastava, R.M.; Srivastava, S.; Singh, M.; Bajpai, V.K. & Ghosh, J.K. (2012) – Consequences of alteration in leucine zipper sequence of melittin in its neutralization of lipopolysaccharide-induced proinflammatory response in macrophage cells and interaction with lipopolysaccharide. *Journal of Biological Chemistry*, vol. 287, p. 1980-1995. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.302893>
- Vasileiadou, K.; Pantazidis, G.; Papadopoulou, K.; Ligoudistianou, C.; Kourelis, A.; Petrakis, S.; Masmanidou, E.; Testa, T.; Kourounakis, A.P.; Hadjipetrou, L.; Papaconstantinou, J. & Yiangou, M. (2010) –  $\alpha$ 1-Acid glycoprotein production in rat dorsal air pouch in response to inflammatory stimuli, dexamethasone and honey bee venom. *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 89, n. 1, p. 63-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexmp.2010.03.008>
- Ximenes, R.M.; Rabello, M.M.; Araújo, R.M.; Silveira, E.R.; Fagundes, F.H.; Diz-Filho, E.B.S.; Buzzo S.C.; Soares V.C.G.; Toyama, D.O.; Gaeta, H.H.; Hernandez, M.Z.; Monteiro, H.S.A. & Toyama, M.H. (2012) – Inhibition of neurotoxic secretory phospholipases A<sub>2</sub> enzymatic, edematogenic, and myotoxic activities by Harpalycin 2, an isoflavone isolated from *Harpalyce brasiliensis* Benth. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, vol. 2012, art. 987517. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/987517>