

Evaluación del efecto de tratamientos térmicos sobre las características bioactivas y estructurales de polen apícola

Carlos Mario Zuluaga, Marta Cecilia Quicazán y Juan Carlos Serrato

RESUMEN

El polen es un producto nutricional y bioactivo de alto valor, sin embargo, el sistema gastrointestinal humano no asimila adecuadamente estos compuestos una vez ingresan al organismo. Se evaluaron las condiciones de secado a 40, 50 y 60°, así como una combinación de presión/temperatura a 121°C durante 5, 10 y 15 minutos, como estrategia para mejorar los indicadores bioactivos. Se evaluó el contenido de fenoles, flavonoides y carotenoides totales. Finalmente, una Calorimetría Diferencial de Barrido fue realizada para estimar indirectamente un rompimiento de la capa externa de polen. Se encontró un incremento significativo del contenido de flavonoides y polifenoles en el secado. En el tratamiento en autoclave, los bioactivos fueron incluso superiores que en el polen fresco, pero inferiores que en el polen seco. En todos los casos, hubo una reducción de carotenoides por efecto de la temperatura. El DSC en conjunto con los compuestos bioactivos, indicaron una modificación estructural del polen. Los resultados deben ser cotejados con pruebas microbiológicas para establecer las condiciones de proceso que reduzcan los impactos en el contenido de bioactivos y garanticen la inocuidad del alimento.

Palabras Clave— apicultura, calorimetría, compuestos fenólicos, flavonoides

I. INTRODUCCIÓN

El polen es el gametofito masculino de las flores usado como medio para la reproducción de las plantas. Diferentes insectos, entre ellos las abejas, aprovechan el polen como fuente de proteína, lípidos, vitaminas y minerales [1]. Cuando las abejas visitan las flores, ellas cubren su cuerpo con polvo polínico de la planta, formando pellets con su saliva. Luego, las abejas fijan los pellets a la corbícula de sus patas traseras para transportarlo a la colmena y así proveer nutrientes a sus crías [2].

Carlos Mario Zuluaga: cmzuluagad@unal.edu.co, estudiante de Doctorado en Ingeniería - Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia.

Marta Cecilia Quicazán: mcquicazand@unal.edu.co, Profesora, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia

Juan Carlos Serrato: jserratob@unal.edu.co, Profesor, Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Nacional de Colombia.

Este trabajo fue desarrollado en marco del Proyecto de Investigación: Establecimiento de procesos de conservación y transformación de polen apícola para la obtención de alimentos con características funcionales, financiado por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - COLCIENCIAS

En años recientes, el reconocimiento del valor nutricional y bioactivo del polen ha promovido su incursión como alimento para humanos, en particular, por su apreciable contenido de proteína (23.8 %), (lípidos) 6.9% y fibra dietaria (14.5%) [3]. Los apicultores, a fin de comercializarlo, han diseñado trampas dispuestas en la colmena para recolectar el exceso de polen, que luego es sometido a un proceso básico de adecuación, particularmente secado y remoción de impurezas, antes de ser puesto en el mercado [4].

En contraste, diferentes reportes muestran una disponibilidad reducida de nutrientes y compuestos bioactivos una vez el polen es ingerido, principalmente debido a la fuerte estructura química que cubre la capa externa del grano [5]. Muchas dudas se han planteado acerca de la habilidad del sistema gastrointestinal humano para romper la capa externa del polen y absorber las sustancias que se encuentran dentro. Simulaciones de la digestión humana sugieren que el polen es parcialmente digerido, entre 48% y 59% [6].

La capa externa del polen es conocida como exina, la cual es muy fuerte y firme, constituida por esporopolenina, un compuesto el cual preserva las sustancias que están en el interior del grano de oxidación, radiación y degradación química debido a la luz UV [7]. La estructura de la esporopolenina ha sido extensivamente estudiada, está hecha primariamente de carbono, hidrógeno y oxígeno, con una fórmula empírica $C_{90}H_{144}O_{27}$ [8]. Una estructura propuesta de la esporopolenina es un copolímero lipídico de ácidos p-hidroxicinámicos (ferúlico y p-cumárico) y ácidos grasos, entrelazados con éteres y ésteres [9], así como carotenoides [10], tocoferoles, pro-vitamina A y vitamina D [11].

Con base en el potencial nutricional y bioactivo del polen y la dificultad de aprovechar estos compuestos debido a su compleja estructura, sería interesante desarrollar un proceso que mejorara la disponibilidad de tales compuestos en el polen. Algunas técnicas de procesamiento de alimentos (deshidratación osmótica, atmósferas modificadas, freído, microondas, congelación, pasterización, entre otras) ocasionan modificaciones microestructurales de los alimentos y pueden influenciar la liberación de ciertos compuestos en la matriz alimentaria, para facilitar su absorción durante la digestión

[12]-[13]. Una manera rápida y sencilla de evaluar modificaciones estructurales de diferentes materiales, es la calorimetría diferencia del barrido (DSC), mediante la evaluación de la variación del flujo de calor [14].

A pesar del potencial productivo del polen en Colombia y de su riqueza nutricional y bioactiva, se requiere de la innovación en procesos y productos para poder generar valor en la cadena productiva de la apicultura [15]. No obstante el interés en estos aspectos tanto de productores y consumidores, no han sido llevados a cabo estudios a profundidad sobre tratamientos sobre el polen apícola para adecuarlo como alimento para humanos, principalmente porque en los países reconocidos por una alta producción de polen aún no es un sector económicamente interesante en comparación a otras áreas agrícolas como aceite, vino o ganado, con más tradición e investigación. Sin embargo, esto ignora el gran valor de la apicultura para la sociedad, la importancia del manejo y cría de las abejas para la conservación de la biodiversidad y la generación de desarrollo sostenible [16]. En consecuencia, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de tratamientos térmicos tales como el secado con flujo indirecto de aire y el uso combinado de temperatura/presión mediante autoclave sobre la estructura del grano de polen y el contenido de compuestos bioactivos.

II. MATERIALES Y METODOS

A. Polen apícola

Las muestras de polen fueron recolectadas en el Municipio de Viracachá, departamento de Boyacá, Colombia. El polen fue almacenado en bolsas de polietileno y mantenido en refrigeración hasta el momento de análisis.

B. Tratamientos térmicos

Dos tratamientos térmicos se realizaron de manera independiente. El primero, fue un secado con aire caliente a tres diferentes temperaturas: 40, 50 y 60°C manteniendo constante la velocidad del aire de secado (4 m/s) y la cantidad de polen a secar (1 kg). Además, estudios previos mostraron que para estas temperaturas, un tiempo de secado de 6 h es suficiente para lograr un contenido final de humedad menor que 8% [17], como lo sugieren las normativas existentes en diferentes países (Switzerland, Brazil, Argentina) (Argentina, 1990; Brasil, 2001; Campos et al., 2008).

El segundo tratamiento consistió en el empleo de un autoclave (Nasco, USA) a 121°C. Los ensayos fueron realizados a tres diferentes tiempos de exposición: 5, 10 y 15 minutos. La temperatura fue establecida a 121°C, ya que estudios previos con polen colombiano han mostrado que temperaturas inferiores no logran una eliminación satisfactoria de toda la carga microbiológica [18].

C. Calorimetría Diferencial de Barrido

El procedimiento fue llevado a cabo como es reportado por Buitink et al [19]. Aproximadamente 10 mg de muestra son colocados en un contenedor de muestra para este tipo de

ensayos, el cual fue sellado y puesto en el equipo, bajo un ambiente hermético y adiabático. Los termogramas fueron registrados entre 25 y 200°C en un sistema modulado a una tasa de 10°C/min empleando nitrógeno como purga. Se empleó un DSC 2910 Modulado (TA Instruments, USA), con un Software Thermal Solutions.

D. Determinación de carotenoides totales

El contenido de carotenoides totales fue estimado de acuerdo a Rodríguez-Amaya *et. al.* y Schulte *et.al.* [20]-[21]. 200 mg de polen fueron pesados en un tubo Falcon. Luego, 2 mL de acetona fueron agregados, agitados por un minute y centrifugados a 9000 RPM por cinco minutos; esto proceso fue repetido tres veces más. La solución fue filtrada, transferida cuantitativamente y llevada a volumen con acetona a 25 mL. La absorbancia fue medida con un espectrofotómetro JASCO Modelo V-530 UV / VIS, utilizando el *software* Spectra Manager (Jasco, Italy), a 450 nm con acetona como blanco. La curva de calibración fue hecha con β -caroteno y los resultados fueron expresados como mg β -caroteno/ kg polen.

E. Preparación de los extractos etanólicos

Se pesó 1 g de muestra y se le adicionó 30 mL de etanol al 96%, para someterlo a agitación constante durante 30 minutos, posteriormente se dejó en reposo en la oscuridad durante 24 h y pasado este tiempo se filtró la muestra en balones aforados de 100 mL y se almacenó en congelación hasta su análisis.

F. Determinación de fenoles totales

Los fenoles totales se determinaron por el método Folin-Ciocalteu, el cual es una mezcla de ácidos de coloración amarilla (fosfowolfrámico y fosfomolibdico), que se reducen al interaccionar con los compuestos fenólicos, dando origen a óxidos de coloración azul (óxidos de wolframio y molibdeno) [22], medidos mediante espectrofotometría a 765 nm. Para la medición se tomaron 500 μ L del extracto y se mezclaron con 500 μ L del reactivo de Folin y 2 mL de carbonato de sodio al 10%, se llevaron a 50 mL y se almacenaron en oscuridad por 2 h, seguidamente se realizó la medida en un espectrofotómetro UV visible. Los resultados se obtienen mediante la construcción de una curva patrón con ácido gálico. Los resultados se expresan como mg ácido gálico/g polen.

G. Determinación del contenido total de flavonoides.

4 mL de agua destilada, 0.3 mL de una solución 5% de NaNO₂ y 1 mL del extracto fueron mezclados. Después de cinco minutos 0.3 mL de una solución 10% de AlCl₃ fue agregada, y un minuto luego 2 mL de NaOH 1 M y 2.4 mL de agua destilada. La absorbancia de la solución final fue leída a 510 nm con un espectrofotómetro JASCO Modelo V-530 UV / VIS, utilizando el *software* Spectra Manager (Jasco, Italy). Los resultados son expresados como equivalentes de quercetina: mg equivalentes-quercetina/ g polen [23].

H. Análisis estadístico.

Los resultados de compuestos bioactivos fueron analizados mediante estadística descriptiva (promedio y desviación estándar). Posteriormente, con el fin de establecer diferencias significativas, una prueba ANOVA con un nivel de confianza del 95% fue llevada cabo. El análisis de datos fue realizado en MATLAB (The Mathworks, USA).

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de caracterización bioactiva son presentados en la Tabla 1. Estos resultados son presentados junto a los valores encontrados para polen fresco; tanto el promedio como la desviación estándar fueron calculados para todos los datos y evaluados estadísticamente mediante una prueba ANOVA:

En lo que respecta a los compuestos bioactivos, un incremento en los valores de fenoles y flavonoides totales fue observado en comparación al polen fresco, sin embargo todas las muestras secas en el rango de 40°C a 60°C no tuvieron diferencias significativas entre sí. El contenido de polifenoles en polen fresco (15.0 ± 2.1 mg GAE / g) es comparable a los del desierto de Sonora (USA) (15.91 - 34.85 mg GAE/g) [24] o India (18.29 mg GAE/g) [25], y es mayor al reportado de Portugal (10.50 - 16.80 mg GAE / g) [26], Rumania (3.76 - 8.87 mg GAE / g) [27], España (8.50 -14.60 mg GAE/g) [28] y Alagoas - Brasil (3.60 - 8.10 mg GAE / g) [29]. Entre tanto, el polen seco con valores que oscilan entre 23.10 a 23.50 mg GAE/g puede ser comparable al polen de Argelia (21.90 - 26.68 mg GAE / g) [30].

Por otra parte, el contenido de flavonoides del polen fresco colombiano (4.99 ± 1.29 mg QE/g) está dentro de los valores reportados por otros autores: 2.66 a 5.48 mg QE/g (Desierto de Sonora - USA, [24]), 3.80 a 7.60 mg QE/g (España, [28]), 5.71 a 14.57 mg QE/g (Argelia, [30]), 2.55 a 6.29 mg QE/g (Rumania, [27]). El contenido de flavonoides del polen seco osciló entre 7.30 a 7.42 mg QE/g, lo cual puede ser comparable a lo reportado para el polen del sur de Brasil (8.92 ± 0.55 mg QE/g) [31].

Como se comentó, la estructura del polen contiene la mayoría de los compuestos fenólicos y flavonoides en la capa externa. Ha sido descrito como el polen usualmente contiene más compuestos fenólicos y una mayor actividad antioxidante con respecto a la altitud [24]-[32]. El altiplano Cundiboyacense está localizado en una región de alta montaña con un extremo índice de luz UV; esto explicaría los altos valores de compuestos fenólicos y flavonoides. Los contenidos de compuestos fenólicos en polen son mayores que en muchas frutas o vegetales, por ejemplo, las ciruelas contienen 3.69 mg/g (GAE), fresas 2.25 mg/g (GAE), manzanas 1.18 mg/g (GAE), espárragos 0.64 mg/g (GAE), ajo 0.48 mg/g (GAE), tomate 0.24 mg/g (GAE), y champiñones 0.11 mg/g (GAE) [33]. La cantidad de compuestos fenólicos del polen es comparable a la mora 21.67 mg/g (GAE), capulí 14.94 mg/g (GAE), y banano 10.10 mg/g (GAE) [34]-[35].

En contraste, el contenido de carotenoides totales de hecho no tuvo una reducción progresiva con la temperatura, siendo no significativo entre las muestras que fueron sometidas a secado. Los carotenoides son compuestos intermediarios o precursores de la vitamina A para humanos y algunos mamíferos, y puede ser almacenados en el hígado y grasa corporal. Los carotenoides son altamente sensibles a la luz y oxígeno [36]. El incremento de los valores de flavonoides y polifenoles y la reducción de carotenoides sugiere un rompimiento de la capa de exina, liberando compuestos que hasta el momento se encontraban ligados a otras moléculas. Sin embargo, debido a la sensibilidad de los carotenoides cuando quedan expuestos sin la protección de la exina, comienzan probablemente a ser degradados. Barajas *et. al.* no encontró diferencias significativas entre el contenido de carotenoides del polen fresco y seco a 35°C. No obstante, a 45°C sí fueron encontradas pérdidas de caroteno. Aún así, las mejores condiciones de secado de polen no fueron determinadas claramente en este estudio [36].

Con respecto a los pólenes tratados en autoclave, un incremento significativo en el contenido de compuestos fenólicos fue encontrado en comparación al polen fresco. Sin embargo, estos valores fueron menores que los obtenidos con polen seco, excepto el tratado por 15 minutos. También, el contenido de flavonoides no mostró diferencias significativas en comparación al polen fresco. Estos resultados sugieren que un rompimiento de la exina fue lograda, en los que los compuestos bioactivos fueron liberados y gradualmente degradados debido a la alta temperatura. Esta condición es observada con mayor presencia en la reducción significativa de los carotenoides totales, siendo el valor menor aquel obtenido a 15 minutos de tratamiento.

Finalmente, los resultados de los ensayos de DSC son presentados en la Figura 1, para la observación del flujo de calor en función de la temperatura, y la Figura 2, para la observación de la primera derivada del flujo de calor con respecto a la temperatura.

Tabla 1. Resultados de compuestos bioactivos de los pólenes tratados térmicamente

	Fenoles totales (mg eq-ácido gálico/g)	Carotenoides totales (mg β -caroteno/kg)	Flavonoides totales (mg eq-quercetina/g)
Fresco	15.0 \pm 2.1 ^a	684.5 \pm 82.8 ^c	4.99 \pm 1.79 ^a
40°C	23.5 \pm 2.5 ^c	583.1 \pm 54.0 ^{bc}	7.42 \pm 0.53 ^b
50°C	23.1 \pm 2.8 ^{bc}	549.6 \pm 68.0 ^{bc}	7.40 \pm 0.33 ^b
60°C	23.2 \pm 2.3 ^{bc}	521.8 \pm 84.4 ^{bc}	7.70 \pm 0.37 ^b
5min	20.7 \pm 1.0 ^b	504.9 \pm 81.5 ^{ab}	5.26 \pm 0.19 ^a
10min	21.8 \pm 0.6 ^{bc}	483.5 \pm 60.1 ^{ab}	5.10 \pm 0.44 ^a
15min	23.7 \pm 0.7 ^c	404.5 \pm 64.4 ^a	5.49 \pm 0.59 ^a
Valor p	< 0.01	< 0.01	< 0.01

^A Letras distintas en una misma columna indica diferencias significativas ($p < 0,05$). Resultados reportados en base seca

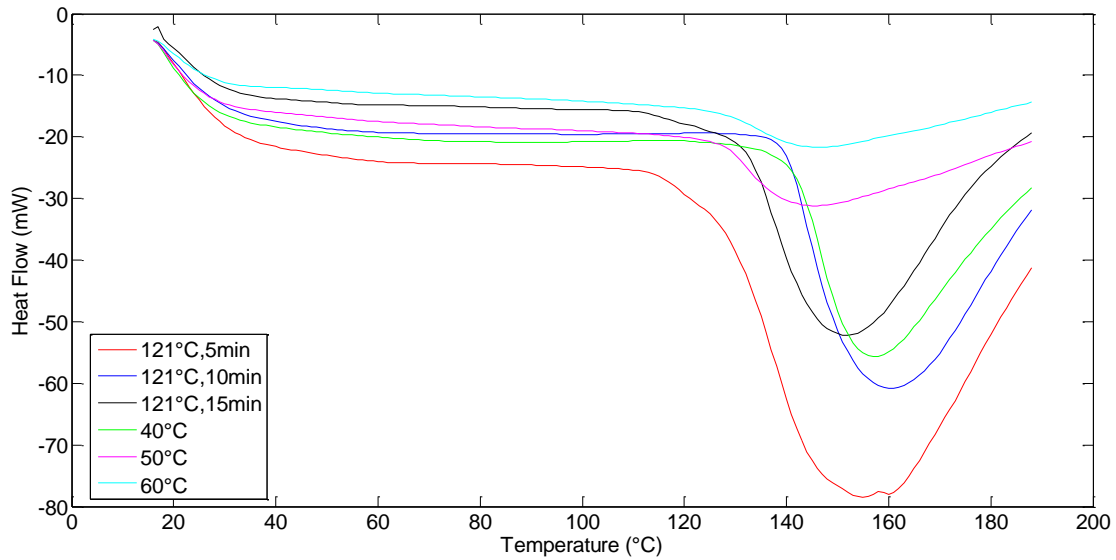


Fig. 1. Resultado de DSC en términos de flujo de calor en función de la temperatura para las muestras de polen sometidas a tratamientos térmicos.

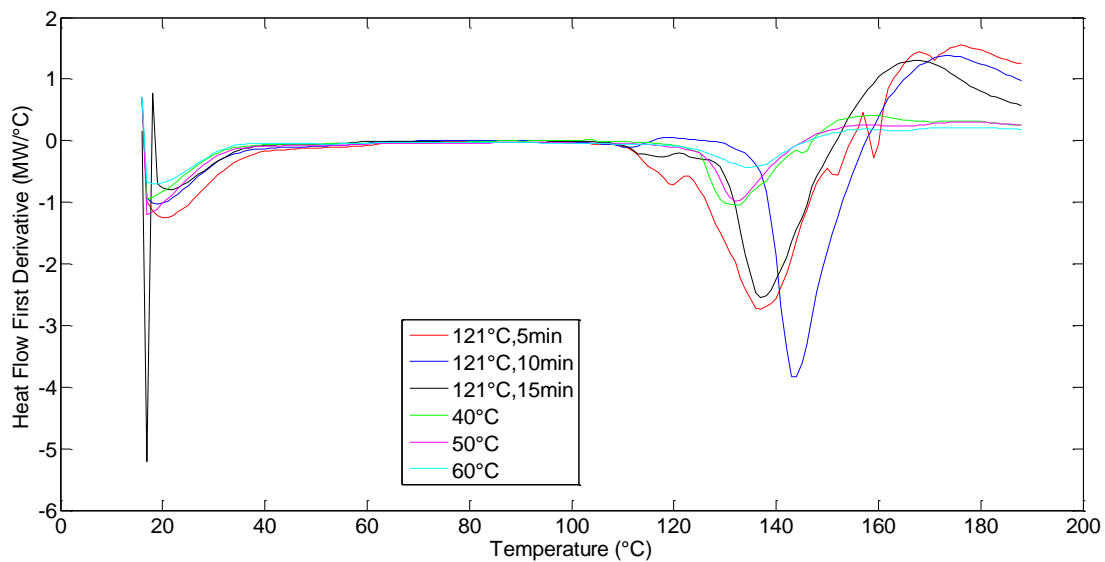


Fig. 2. Resultado de DSC en términos de la primera derivada del flujo de calor en función de la temperatura para las muestras de polen sometidas a tratamientos térmicos.

En la Figura 1 se observan los resultados de DSC para polen húmedo, polen seco y polen estéril. En el eje y está reportado el flujo de calor; a partir del cual se puede observar una reacción exotérmica a 140°C, expresado mediante como una depresión en el gráfico. Este flujo está muy relacionado tanto con la textura del grano, así como el contenido de humedad. Los granos de textura suave y apreciable contenido de humedad, tales como el polen húmedo y el polen estéril (cerca de 30% de humedad), presentan esta depresión a 140°C [19], a diferencia del polen seco, de textura más dura y menor contenido de agua, en el que esta depresión ya no es apreciable.

En la Figura 2 se observa la primera derivada del flujo de calor, donde es posible inferir que los mayores gradientes se encuentran en el polen húmedo. Esto claramente muestra que hay una diferencia estructural en la exina de polen debido al empleo de autoclave que modifica las características térmicas del grano.

IV. CONCLUSIONES

Se evaluó el efecto de tratamientos térmicos como el secado y el uso de un autoclave sobre las características bioactivas de polen colombiano. Se encontró una elevación en el contenido de flavonoides y fenoles totales con respecto a la temperatura de secado, sin embargo, al mismo tiempo se produce una reducción en el contenido de carotenoides. En el caso del empleo de autoclave, el contenido de fenoles y flavonoides, a pesar de ser superiores al encontrado en polen fresco, son inferiores a los obtenidos en el secado. Una reducción aún mayor que en el proceso de secado fue encontrada para el contenido de carotenoides. Para poder definir claramente las condiciones de tratamiento térmico más adecuadas para polen apícola, los resultados acá descritos deben ser relacionados con reportes microbiológicos, con el fin de establecer el tratamiento que menor afectación tenga sobre la calidad nutricional del producto, sin dejar de lado la inocuidad del mismo. Los resultados de DSC muestran claramente diferencias entre los productos acá muestreados, lo cual permite inferir que una degradación de la capa externa del polen se ha logrado y explicando, en parte, el hecho de haber obtenido una variación en cada uno de los tres compuestos bioactivos evaluados en el presente estudio.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a Apiario los Cerezos, el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - COLCIENCIAS, al Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y al Departamento de Ingeniería Química y Ambiental, de la Universidad Nacional de Colombia.

REFERENCIAS

[1] T. Seeley, *Ecología da abelha: Um estudo de adaptação na vida social*. Porto Alegre, Brazil: Paixao; 2006. 256 p.

[2] M. Campos, S. Bogdanov, L. Almeida-Muradian, T. Szczesna, Y. Mancebo, C. Frigerio y F. Ferreira, "Pollen composition and standardisation of analytical methods", *J Apicult Res*, vol. 47, no. 2, pp. 156–163, 2008.

[3] C. Fuenmayor, Zuluaga, C., Diaz, C., Quicazán, M., Cosio, M.S., Mannino, S. Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Rev. MVZ Córdoba*. vol. 19. pp. 4003–4014. 2014.

[4] S. Bogdanov, *The Bee Pollen Book*. Bern, Switzerland: Bee Product Science; 2011. 42 p.

[5] S. Cook, Awmack, C., Murray, D., Williams, I. Are honey bees' foraging preferences affected by pollen amino acid composition? *Ecol. Entomol.* vol. 28. pp. 622–627. 2003.

[6] G. Franchi, Corti, G., Pompella, A. Microspectroscopic evaluation of digestibility of pollen grains. *Plant Foods Hum. Nutr.* vol. 50. pp. 115–126. 1997.

[7] J. Rowley, Skvarla, J. The elasticity of the exine. *Grana*. vol. 39. pp. 1–7. 2000.

[8] S. Atkin, Barrier, S., Cui, Z., Fletcher, P., Mackenzie, G., Panel, V., Sol, V., Zhang, X. UV and visible light screening by individual sporopollenin exines derived from *Lycopodium clavatum* (club moss) and *Ambrosia trifida* (giant ragweed). *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* vol. 102. pp. 209–217. 2011.

[9] S. Barrier, Lobbert, A., Boasman, A., Boa, A., Lorch, M., Atkin, S., Mackenzie, G. Access to a primary aminosporopollenin solid support from plant spores. *Green Chem.* vol. 12. pp. 234–240. 2010.

[10] M. Thomasson, Baldwin, D., Diego-Taboada, A., Atkin, S., Mackenzie, G., Wadhawan, J. Electrochemistry and charge transport in sporopollenin particle arrays. *Electrochem. commun.* vol. 12. pp. 1428–1431. 2010.

[11] C. Del Risco, Pérez, A., Álvarez, V., Rodríguez, G., Leiva, V., Puig, Y., García, R. Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola. *Rev. CENIC Ciencias Biológicas*. vol. 43. pp. 17–21. 2012.

[12] L. Guardño, Sanz, T., Fiszman, S.M., Quiles, A., Hernando, I. Microwave heating effect on rheology and microstructure of white sauces. *J. Food Sci.* vol. 76. pp. E544–E552. 2011.

[13] M. Hernández-Carrión, Guardño, L.M., Carot, J.M., Pérez-Munuera, I., Quiles, A., Hernando, I. Structural stability of white sauces prepared with different types of fats and thawed in a microwave oven. *J. Food Eng.* vol. 104. pp. 557–564. 2011.

[14] R. Mora-Escobedo, Moguel-Ordoñez, Y., Jaramillo-Florez, M., Gutiérrez-López, G. The composition, rheological and thermal properties of Tajonal (*Viguiera dentata*) Mexican honey. *Int. J. Food Prop.* vol. 9. pp. 299–316. 2006.

[15] Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. *Plan Estratégico de Acción 2011-2025*. Bogotá: Cadena de las Abejas y la Apicultura; 2006. 40 p.

[16] R. Vásquez, H. Ballesteros, C. Muñoz, M. Cuellar. *Utilización de la abeja Apis mellifera como agente polinizador en cultivos comerciales de fresa (Fragaria chiloensis) y mora (Rubus glaucus) y su efecto en la producción*. Bogotá, Colombia: Corpoica; 2006. 77 p.

[17] A. Durán. *Diseño de un sistema de secado y separación de impurezas para polen apícola en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2014.

[18] C. Salazar. *Evaluación de diferentes condiciones del proceso de fermentación en fase sólida de polen apícola*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 2014.

[19] J. Buitink, Walters-Vertucci, C., Hoekstra, F., Leprince, O. Calorimetric Properties of Dehydrating Pollen. *Plant Physiol.* vol. 111. pp. 235–242. 1996.

[20] D. Rodriguez-Amaya, Kimura, K. *HarvestPlus Handbook for Carotenoid Analysis*. HarvestPlus, Washington D.C., USA. 2004.

[21] F. Schulte, Mäder, J., Kroh, L., Panne, U., Kneipp, J. Characterization of pollen carotenoids with in situ and high-performance thin layer chromatography supported resonant Raman spectroscopy. *Anal. Chem.* vol. 81. pp. 8426–8433. 2009.

[22] W. Brand-Williams, M. Cuvelier, y C. Berset, "Use of free radical method to evaluate antioxidant activity". *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, vol. 28, no. 1, pp. 25–30. 1995.

[23] N. Almaraz-Abarca, Campos, M., Ávila-Reyes, J., Naranjo-Jiménez, N., Herrera-Corral, J., González-Valdez, L. Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interiencia*, vol. 29, pp. 1–12. 2004.

- [24] B. LeBlanc, Davis, O., Boue, S., DeLuca, A., Deeby, T. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chem.* vol. 115, pp. 1299–1305. 2009.
- [25] S. Ketkar, Rathore, A., Lohidasan, S., Rao, L., Paradkar, A., Mahadik, K. Investigation of the nutraceutical potential of monofloral Indian mustard bee pollen. *J. Integr. Med.* 2014.
- [26] M. Morais, Moreira, L., Feás, X., Estevinho, L. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol.* vol. 49, pp. 1096–1101. 2011.
- [27] R. Margaoan, Marghitas, L., Dezmirean, D., Bobis, O., Tomos, L., Mihai, C., Bonta, V. Honeybee-collected Pollen from Transylvania: Palynological Origin, Phenolic Content and Antioxidant Activity. *Bull. UASVM Anim. Sci. Biotechnol.* vol. 70, pp. 311–315. 2013.
- [28] J. Serra-Bonvehí, Soliva-Torrentó, M., Centelles-Lorente, E. Evaluation of polyphenolic and flavonoid compounds in honeybee-collected pollen produced in Spain. *J. Agric. Food Chem.* vol. 49, pp. 1848–1853. 2001.
- [29] S. Carpes, Mourao, G., Alencar, S., Masson, M. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Brazilian J. Food Technol.* vol. 12, pp. 220–229. 2009.
- [30] A. Rebiai, Lanez, T. Chemical composition and antioxidant activity of *Apis mellifera* bee pollen from northwest Algeria. *J. Fundam. Appl. Sci.* vol. 4, pp. 26–35. 2012.
- [31] S. Carpes, Begnini, R., Alencar, S., Masson, M. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. *Ciência e Agrotecnologia.* vol. 31, pp. 1818–1825. 2007.
- [32] R. Stanley, Linskens, H. *Pollen: biology, biochemistry, management.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 1974.
- [33] O. Chun, Kim, D., Smith, N., Schroeder, D., Han, J., Lee, C. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J. Sci. Food Agric.* vol. 85, pp. 1715–1724. 2005.
- [34] V. Kaškonienė, Ruočkusienė, G., Kaškonas, P., Akuneca, I., Maruška, A. Chemometric Analysis of Bee Pollen Based on Volatile and Phenolic Compound Compositions and Antioxidant Properties. *Food Anal. Methods.* 2014.
- [35] C. Vasco, Ruales, J., Kamal-Eldin, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chem.* vol. 111, pp. 816–823. 2008.
- [36] J. Barajas, Cortes-Rodríguez, M., Rodríguez-Sandoval, E. Effect of Temperature on the Drying Process of Bee Pollen From Two Zones of Colombia. *J. Food Process Eng.* vol. 35, pp. 134–148. 2012.