

Extracción de antioxidantes de polen apícola asistida por microondas y ultrasonido

Rodríguez Ibeth¹, Peña Daniel², Díaz Consuelo³

RESUMEN

El polen apícola se caracteriza por su contenido alto en antioxidantes, para aprovechar estos compuestos bioactivos se han evaluado diferentes métodos de extracción. Utilizando un microondas casero modificado (EAM) y un baño de ultrasonido (EAU) con etanol como solvente se evaluó la extracción de antioxidantes de polen apícola. Se obtuvieron entre 15.89 y 35.17 mg de GAE/g (compuestos fenólicos totales aparentes) por el método de Folin Ciocalteu mediante EAM y entre 33.9 y 36.01 mg de GAE/g mediante EAU. Se evaluó la exactitud de los métodos de extracción mediante porcentajes de recuperación, donde se obtuvieron valores entre 47.97 y 132.27% empleando la EAM y entre 84.37 y 102.88% con la EAU. La EAM se logró en solo 6 segundos y la EAU en 30 min, demostrando que la EAM podría ser un método rápido y económico.

Palabras clave- Antioxidantes, Extracción asistida por microondas, Fenoles totales, Polen apícola.

I. INTRODUCCIÓN

El polen apícola es la aglutinación del polen de las flores mezclado con néctar y sustancias salivares de las abejas [1]. Es uno de los productos más importantes de la cadena apícola en Colombia, ya que su producción es significativa, 36 kg por colmena al año [2]. Además de las propiedades nutricionales, el polen apícola ha sido estudiado por sus propiedades antioxidantes, antimicrobianas, antitumógenicas, quimioprotectoras y anti-inflamatorias, principalmente asociadas con compuestos fenólicos (flavonoides y ácidos fenólicos), carotenoides y vitamina E [3-11].

La inclusión o la utilización del polen apícola como suplemento ha sido poco investigada, algunos autores han evaluado sensorialmente productos con inclusión de polen apícola, encontrando que las inclusiones mayores al 1,5 %

¹ Rodríguez Ibeth: ibrodriguez@unal.edu.co, estudiante de Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia.

² Peña Daniel: dapenac@unal.edu.co, estudiante de Química, Universidad Nacional de Colombia

³ Díaz Amanda Consuelo: amcdiazmo@unal.edu.co, Profesora Asociada, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, Universidad Nacional de Colombia.

Este proyecto hace parte del “Programa estratégico en alternativas para la generación de valor en productos apícolas en Colombia a través de la innovación y el desarrollo tecnológico” financiado por COLCIENCIAS y ejecutado en el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos-ICTA.

generan rechazo en los consumidores [7], además la disponibilidad biológica de sus nutrientes no es conocida ya que la exina, capa externa del grano de polen, está compuesta por polisacáridos muy resistentes a la degradación gástrica [12].

Los extractos de compuestos bioactivos podrían ser una alternativa para enriquecer alimentos con antioxidantes [8]-[12]-[13]. Los métodos de extracción alternativos como la extracción asistida por microondas (EAM) y la extracción asistida por ultrasonido (EAU) son tecnologías que disminuyen los tiempos de extracción y pueden evitar la degradación de compuestos bioactivos, la EAM es una tecnología eficiente debido a que las ondas generan cambios en la estructura celular y ha sido ampliamente estudiada para la extracción de antioxidantes de diferentes matrices [14-16]. Sin embargo, la eficiencia del proceso de extracción depende de diferentes factores como la relación soluto-solvente, composición del solvente, características y contenido de agua de la matriz, la potencia, la temperatura y el tiempo de extracción. En este trabajo se evaluaron diferentes condiciones de EAM para obtener antioxidantes de polen apícola y se compararon con la EAU.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Polen Apícola

Las muestras de polen seco fueron suministradas por el apiario “los cerezos” en el Municipio de Viracachá, departamento de Boyacá, Colombia, zona de páramo altoandino, las muestras fueron almacenadas en bolsas de polietileno y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta el momento del análisis.

B. Extracción asistida por ultrasonido (EAU)

Se utilizó un baño de ultrasonido LC 30H ELMA de 35 kHz de frecuencia y 250 watts (Alemania), para la extracción se tomó 1 g de polen molido con 10 mL de etanol como solvente, se sometió a ultrasonido por 10 min y centrifugó, el sobrenadante fue filtrado en papel filtro Whatman de 8 a 10 micrómetros de poro, ésta operación se realizó 3 veces sobre el sólido, y en el último lavado se agitó en vortex por 1 min. Se llevó a un volumen de 50 mL y almacenó en congelación (-20°C±3°C) hasta su análisis. Se realizaron 5 réplicas.

C. Extracción asistida por microondas (EAM)

Basado en la metodología descrita por [16-17] con algunas modificaciones se utilizó un microondas marca Whirlpool de 1350W de potencia y 60 Hz de frecuencia modificado para la extracción, se sometieron las muestras a

diferentes potencias (135, 270 y 405 W), tiempos de extracción (6 s, 30 s y 1 min) y ciclos de tratamiento (1 ciclo corresponde a un tratamiento independiente), utilizando etanol grado alimenticio (obtenido en la Empresa de Licores de Cundinamarca) como solvente al 48, 76.8 y 96%, en volúmenes de 10, 50 y 100 mL/g de polen en ensayos independientes, los tratamientos se realizaron por triplicado. Los extractos obtenidos se filtraron y en los casos necesarios se concentró el extracto en un rotaevaporador IKA HB 05.06 CN a una temperatura de 50°C y se llevaron a un volumen de 50 mL y almacenaron en congelación (-20°C ± 3°C) hasta su análisis.

D. Medición de fenoles totales aparentes (FT)

Los compuestos fenólicos reducen el complejo fosfotungstato-fosfomolibdato del reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac), en sales de molibdeno de color azul, cuantificables por espectrofotometría [18]. En la evaluación se utilizaron 500 µL del extracto, 25 mL de agua destilada, 2 mL de carbonato de sodio al 10%, después de un reposo de 2 minutos, se adicionaron 500 µL del reactivo de Folin, a las 2 horas de reacción en oscuridad, se realizó la lectura a 765 nm en un espectrofotómetro UV visible Thermo Scientific Genesys 10S (USA), utilizando como blanco agua destilada. La cuantificación se obtuvo mediante una curva de calibración con ácido gálico, los resultados son expresados en mg GAE/g de polen.

E. Actividad antioxidante – ABTS

El radical catiónico ABTS•+ es un cromóforo que absorbe a una longitud de onda de 734 nm y se genera por una reacción de oxidación del ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etil benzotiazolin-6-sulfonato de amonio) (Sigma Aldrich) con persulfato de potasio [19]. En la evaluación se utilizaron 10 µL de extracto y 1 mL de la solución de ABTS•+. A los 6 min de reacción en oscuridad, se leyó el cambio en la absorbancia respecto a la solución sin reaccionar a una longitud de onda de 734 nm en un espectrofotómetro UV visible. La cuantificación se obtuvo mediante una curva de calibración usando como antioxidante trolox. Los resultados se expresan como µmol trolox/g polen.

F. Actividad antioxidante - FRAP (poder antioxidante reductor de hierro)

La metodología se realizó mediante el principio de reducción del complejo férrico-2, 4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) (Sigma Aldrich) incoloro al complejo ferroso coloreado [20]. Para la medición se tomaron 20 µL del extracto, 450 µL de reactivo de FRAP y 735 µL de agua destilada, a los 30 minutos de reacción en oscuridad se realizó la medida en un espectrofotómetro UV visible, a 593 nm. Los resultados se obtienen mediante la construcción de una curva patrón usando como antioxidante trolox. Los resultados son expresados en µmol trolox/g polen.

G. Evaluación de la exactitud mediante porcentaje de recuperación

Para evaluar el método EAM, fueron establecidas las condiciones de extracción de compuestos fenólicos de acuerdo a las referencias [14-17], 405 W de potencia, relación soluto solvente de 1:10 W/V, 6 s de tiempo de extracción, 96% de etanol grado alimenticio, 1 y 3 ciclos de extracción. En el caso del método EAU se sometieron las muestras a las mismas condiciones mencionadas anteriormente.

Se realizó una matriz blanco que consistió en recolectar polen de las diferentes extracciones, y secarlo a 70°C por 2 horas, a 1 g de matriz blanco se le adicionó ácido gálico (Panreac al 99%), para una concentración final de 0.5 mg de GAE/mL que corresponde al nivel 3 de la curva de calibración y se analizó por Folin Ciocalteu, a otro gramo de matriz blanco, se le adicionó trolox (Sigma Aldrich) para una concentración final de 0.6 mg de trolox/mL que corresponde al nivel 3 de la curva de calibración y se analizó por ABTS y FRAP. Al final se hallaron porcentaje de recuperación de cada antioxidante por los tres métodos. Los tratamientos se realizaron por triplicado.

H. Análisis estadístico

Se utilizó el programa STATGRAPHICS 15 CENTURION en la Universidad Jorge Tadeo Lozano para realizar el análisis de varianza mediante la prueba de Kruskal Wallis y el análisis de correlación de Pearson.

III. RESULTADOS

A. Precisión y exactitud de los métodos de extracción

Se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de recuperación obtenidos por EAU y EAM utilizando la prueba de Kruskal Wallis y chi-cuadrado (Tabla 1, p valor < 0.05) evaluados con los métodos ABTS, FRAP y FT. La obtención de antioxidantes mediante EAU es precisa ya que se obtuvieron coeficientes de variación entre (0.9 y 2.3%) y exacta de acuerdo a la prueba t student donde no se encontraron diferencias significativas con respecto a 100% a un nivel de confianza del 95% [21], la alta eficiencia de la EAU puede deberse a que durante la cavitación generada por las ondas ultrasónicas, pueden cambiar enlaces químicos y por lo tanto, aumentar la liberación de compuestos bioactivos [22]. En cuanto a la EAM Se encontraron diferencias significativas con respecto a 100% a un nivel de confianza del 95% aplicando la prueba t student, posiblemente debido a la degradación térmica de algunos flavonoides, en algunos tratamientos se superaron los 50°C (Fig. 1).

En diferentes trabajos de extracción de antioxidantes a partir de matrices ricas en compuestos fenólicos [23-24] se reporta que los métodos EAM y EAU comparados con los métodos convencionales (soxhlet y maceración) presentan ventajas en términos de tiempos cortos de extracción y bajo consumo de solvente. Aunque el método EAM no fue exacto en el presente estudio si presenta ventajas con respecto al ultrasonido en cuanto al tiempo.

Se deben evaluar condiciones de EAM a temperaturas más bajas con el fin de evitar la degradación térmica, aunque otros autores han reportado resistencia de algunos flavonoides a 100°C, los autores en la referencia [25] evaluaron la estabilidad de 22 compuestos fenólicos sometidos a tratamientos con microondas a 500 W de potencia, con temperaturas de 50 – 175°C, utilizando metanol como solvente, y 20 minutos de tratamiento, sólo la Epicatequina, el Resveratrol y Miricetina presentaron cambios significativos por encima de 125°C, ya que son fácilmente oxidables a 100°C. En el polen se han reportado flavonoides como Pinocembrina, Kempferol, Galangina, Isorhamnetina, Quercetina, Naringenina, Apigenina, Crisina, dihidroxi-7-metoxiflavona y ácidos fenólicos como ácido caféico, como la composición de flavonoides depende del origen floral y geográfico [5], es posible que en el polen evaluado se encuentren otros flavonoides sensibles a temperaturas por debajo de 100°C.

B. Evaluación de diferentes condiciones de extracción

Se evaluaron diferentes condiciones de EAM (Ver Tabla 2), la temperatura no se podía controlar y fue medida un minuto después de cada tratamiento. De acuerdo al análisis (Ver Tabla 3) por Kruskal Wallis y Chi-cuadrado hay

diferencias significativas entre las medianas de los tratamientos para las 3 variables (p valor < 0.05). A medida que aumenta la potencia disminuye la cantidad de FT y la actividad antioxidante medida por FRAP, posiblemente debido a la degradación térmica como se mencionó anteriormente.

Tabla 1. Mediana, mínimo y máximo entre paréntesis de los porcentajes de recuperación de antioxidantes patrón mediante EAM y EAU.

	EAM 1 ciclo ^a	EAM 3 ciclos ^a	EAU
	Mediana	Mediana	Mediana
% trolox ABTS	87.39 (73.22-89.32)	73.54 (69.96-89.80)	99.11 (97.86-102.88)
% trolox FRAP	127.14 (81.33-132.27)	118.11 (104.41-122.03)	85.68 (84.37-87.25)
% GAE FT	66.43 (53.35 - 74.85)	53.39 (47.97-68.73)	99.69 (94.66-102.46)

^aLas condiciones de EAM fueron: 405 W de potencia, relación soluto solvente de 1:10 w/v, 6 s de tratamiento, 96% de etanol grado alimenticio con 1 y 3 ciclos.

Los resultados se presentan en base húmeda y corresponden a la mediana de 9 datos para EAM y de 15 datos para EAU.

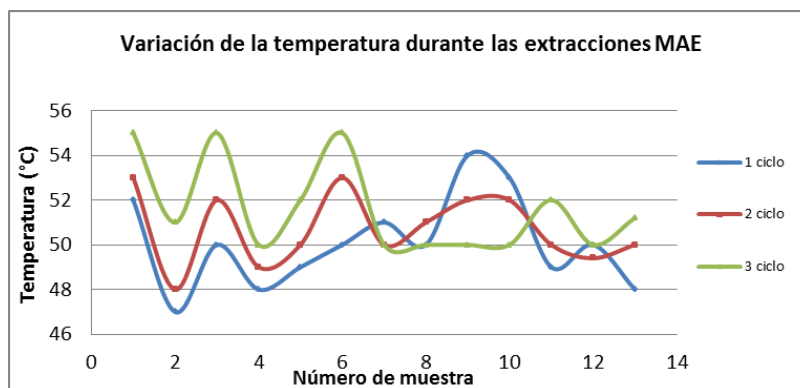


Fig. 1. Temperaturas durante la EAM. Las condiciones de EAM fueron: 405 W de potencia, relación soluto solvente de 1:10 w/v, 6 s de tiempo de extracción, 96% de etanol grado alimenticio.

La mejor capacidad antioxidante y el contenido más alto de FT se lograron mediante EAU. Los resultados en las dos tecnologías de extracción son similares y superiores en algunos casos a los resultados reportados por diferentes evaluaciones del polen Colombiano mediante maceración (Ver Tabla 4). En polen de Rumania [29] se han reportado valores entre 4.4 y 16.4 mg GAE/g mediante extracción por ultrasonido, y en polen de España entre 18.5 y 32.15 mg GAE/g mediante maceración [10]. No se encontraron reportes de fenoles totales aparentes de polen apícola mediante extracción asistida por microondas.

En diferentes estudios sobre extracción de polifenoles, los mejores resultados en EAM se han

obtenido a potencias bajas. Por ejemplo [16] reportó valores de 47.2 and 86.6 mg GAE/g en extractos etanolicos de semillas de uva mediante extracción asistida por microondas con tiempos de 2 a 32 min y potencias de 100 a 200W, valores similares a los obtenidos mediante extracciones convencionales, [31] reportó entre 14.72 y 66.81 mg de GAE/g mediante maceración por 200 min.

Tabla 2. Condiciones de EAM evaluadas

Potencia (W)	Tiempo (s)	%ETOH	Soluto: solvente	T (°C)
135	30	48	1:50	25-27
270	60	76,8	1:100	38,5 - 40
405	6	96	1:10	49 - 52

Tabla 3. Mediana, mínimo y máximo entre paréntesis de capacidad antioxidante del polen apícola mediante EAM y EAU.

	135 W	270 W	405 W	EAU
ABTS μMtrolox/g*	86.25 (80.56 - 97.65)	85.59 (81.82 - 92.60)	95.41 (81.97 - 100.29)	102.61 (110.02 - 105.80)
FRAP μMtrolox/g*	89.99 (81.92-96.92)	93.21 (79.07 - 103.22)	51.49 (49.90 - 54.83)	97.99 (96.84 - 99.60)
Fenoles totales mg GAE/g*	26.33 (23.68 - 35.17)	24.74 (20.28 - 29.50)	17.25 (15.89 - 19.45)	34.66 (33.91 - 36.01)

*Los resultados son presentados en base seca y corresponden a la mediana de 9 datos para EAM y de 15 datos para EAU.

Tabla 4. Actividad antioxidante y contenido de fenoles totales en polen apícola Colombiano extraído mediante maceración.

	FT (mg GAE/g) ^b	ABTS (μmol trolox/g) ^b	FRAP (μmol trolox/g) ^b	Referencia
Polen seco	14.85±0.19 - 21.16 ±0.62	SD	SD	[26]
	17.35±0.97	59±3	61±3	[27]
	13.82 ± 1,2	74 ± 7	96 ± 1	[28]

^bdatos presentados como promedio ± desviación estándar en base seca.

C. Correlación entre el contenido de fenoles totales y la actividad antioxidante.

En varios estudios se ha relacionado la actividad antioxidante con el contenido de compuestos fenólicos del polen, como se mencionó anteriormente, sin embargo, no siempre se encuentra una correlación positiva [29], al realizar la prueba de correlación de Pearson se encontró una correlación positiva y significativa entre el contenido de FT y la actividad antioxidante medida FRAP (Fig. 2) y se obtuvo una correlación negativa en el caso de la actividad antioxidante medida por ABTS (-0.0248). Los polifenoles se ven favorecidos en la reacción estioquímica con ABTS pero la reacción es más lenta con múltiples -OH porque no permiten el acceso al radical por impedimento estérico [30], por lo tanto, es posible que por esta razón la correlación sea negativa.

Los métodos de actividad antioxidante están basados en reacciones químicas que dependen de muchos factores y no pueden definirse como métodos para la cuantificación de antioxidantes [30], el radical oxidado ABTS actúa sobre polifenoles donadores de átomos de hidrógeno, el complejo férrico en FRAP actúa sobre los polifenoles capaces de donar electrones, por esta razón es posible encontrar diferencias entre los métodos.

IV. CONCLUSIONES

Se lograron porcentajes de recuperación entre 47.97 y 132.27% mediante EAM en sólo 6 segundos y entre 84.37 y 102.88% mediante EAU en 50 minutos por los métodos ABTS, FRAP y FT siendo mayor su eficiencia de extracción pero mayor el tiempo de tratamiento requerido. Los valores obtenidos de actividad antioxidante por ABTS 80.56 – 105.80 μMol trolox/g y por FRAP 49.9 – 103.22 μMol trolox/g y el contenido de fenoles totales aparentes por Folin Ciocalteau 15.89-36.01 mg GAE/g en polen apícola obtenidos por EAM y EAU son similares a los obtenidos por métodos convencionales (maceración).

Se deben evaluar condiciones de tiempo y relación soluto/solvente a potencias bajas en el método de EAM.

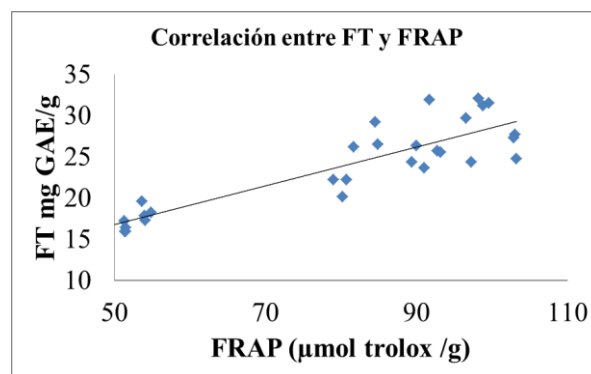


Fig. 2. Correlación entre FT y FRAP

V. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo brindado por el Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos ICTA, de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

VI. REFERENCIAS

[1] Almeida-Muradian L, Pamplona LC, Coimbra SI, Barth OM. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. Journal of food composition and analysis. 2005;18(1):105-11.

- [2] Martínez T. Diagnóstico de la actividad apícola y de la crianza de abejas en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá, Colombia: Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural Dirección de Cadenas Productivas Instituto Interamericano de cooperación para agricultura IICA; 2006.
- [3] Cabrera C, Montenegro G. Pathogen control using a natural Chilean bee pollen extract of known botanical origin. *Ciencia e Investigación Agraria*. 2013;40(1):223-30.
- [4] Campos M, Frigerio C, Lopes J, Bogdanov S. What is the future of Bee-Pollen. *Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*. 2010;2(4):131-44.
- [5] Chantarudee A, Phuwapraisirisan P, Kimura K, Okuyama M, Mori H, Kimura A, et al. Chemical constituents and free radical scavenging activity of corn pollen collected from *Apis mellifera* hives compared to floral corn pollen at Nan, Thailand. *BMC complementary and alternative medicine*. 2012;12(1):45.
- [6] Feás X, Vázquez-Tato MP, Estevinho L, Seijas JA, Iglesias A. Organic bee pollen: botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*. 2012;17(7):8359-77.
- [7] Khider M, Elbanna K, Mahmoud A, Owayss AA. Egyptian honeybee pollen as antimicrobial, antioxidant agents, and dietary food supplements. *Food Science and Biotechnology*. 2013;22(5):1-9.
- [8] Marinova MD, Tchobanov BP. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from honeybee-collected pollen using plant enzymes. *Enzyme research*. 2011;2010.
- [9] Nogueira C, Iglesias A, Estevinho LM. Commercial bee pollen with different geographical origins: a comprehensive approach. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(9):11173-87.
- [10] Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X, Estevinho LM. Biological activities of commercial bee pollens: Antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food and Chemical Toxicology*. 2014;63:233-9.
- [11] Pulido N, Salazar C, Díaz A, Quicazán M. Evaluación del efecto de la temperatura de secado sobre el contenido total de compuestos fenólicos en polen apícola. *Seminario Internacional: Secado de Productos Agrícolas, Bogotá*. 2012.
- [12] Bogdanov S. *The Bee Pollen Book*. Bulgaria: Bee Product Science. 2011.
- [13] Xu X, Sun L, Dong J, Zhang H. Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide. *Innovative food science & emerging technologies*. 2009;10(1):42-6.
- [14] Ruiz-Montañez G, Ragazzo-Sánchez J, Calderón-Santoyo M, Velázquez-de la Cruz G, Ramírez de León J, Navarro-Ocaña A. Evaluation of extraction methods for preparative scale obtention of mangiferin and lupeol from mango peels (*Mangifera indica* L.). *Food chemistry*. 2014;159:267-72.
- [15] Pellati F, Orlandini G, Pinetti D, Benvenuti S. HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS/MS methods for metabolite profiling of propolis extracts. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2011;55(5):934-48.
- [16] Li Y, Skouroumounis GK, Elsey GM, Taylor DK. Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*. 2011;129(2):570-6.
- [17] Routray W, Orsat V. Microwave-assisted extraction of flavonoids: a review. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;5(2):409-24.
- [18] Slinkard K, Singleton VL. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*. 1977;28(1):49-55.
- [19] Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*. 1999;26(9):1231-7.
- [20] Benzie IF, Strain J. [2] Ferric reducing/antioxidant power assay: Direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods in enzymology*. 1999;299:15-27.
- [21] Miller JN, Miller JC, Jiménez CM, Hornillos RI. *Estadística y quimiometría para química analítica: Prentice Hall Cuarta edición, Madrid*; 2002.
- [22] Mason T, J., Riera, E., Vercet, A y Lopez-Bueza, P. Chapter 13. Application of ultrasound. *Emerging technologies for food processing: Elsevier*; 2005. 340-2 p.
- [23] Nayak B, Dahmoune F, Moussi K, Remini H, Dairi S, Aoun O, et al. Comparison of microwave, ultrasound and accelerated-assisted solvent extraction for recovery of polyphenols from *Citrus sinensis* peels. *Food chemistry*. 2015;187:507-16.
- [24] Lv H, Wang X, He Y, Wang H, Suo Y. Identification and quantification of flavonoid aglycones in rape bee pollen from Qinghai-Tibetan Plateau by HPLC-DAD-APCI/MS. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2015;38:49-54.
- [25] Liazid A, Palma M, Brigui J, Barroso CG. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. *Journal of Chromatography A*. 2007;1140(1):29-34.
- [26] Pulido N, Salazar C, Díaz A, Quicazán M. Evaluación del efecto de la temperatura de secado sobre el contenido total de compuestos fenólicos en polen apícola. *Seminario Internacional: Secado de Productos Agrícolas, Bogotá*. 2012.
- [27] Salazar G, Claudia, Díaz, Moreno, Consuelo. Características bioactivas y sensoriales en procesos de fermentación en fase sólida de polen apícola *Encuentro*

Nacional De Investigacion Y Desarrollo Enid 2014 [Internet]. 2014.

[28] Castro L, Zuluaga, C., Quicazán, M., Pastrana, Y., y de Paula, C. Evaluación de las características nutricionales y bioactivas de hidrolizados enzimáticos de polen apícola. ENID. 2014.

[29] Mărghitaş LA, Stanciu OG, Dezmirean DS, Bobiş O, Popescu O, Bogdanov S, et al. < i> In vitro</i> antioxidant capacity of honeybee-collected pollen of selected floral origin harvested from Romania. *Food Chemistry*. 2009;115(3):878-83.

[30] Schaich K, Tian X, Xie J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. *Journal of Functional Foods*. 2015;14:111-25.

[31] Bucić-Kojić, A., Planinić, M., Tomas, S., Bilić, M., & Velić, D. (2007). Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 81(1), 236-242. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2006.10.027>