

Valoración de la calidad microbiológica de polen apícola sometido a diferentes procesos térmicos

Carlos Mario Zuluaga, Marta Cecilia Quicazán y Juan Carlos Serrato

RESUMEN

El polen es un alimento nutricional y bioactivo de alto valor que los apicultores recolectan y destinan a consumo humano. Sin embargo, se han encontrado deficiencias en su recolección, secado y almacenamiento, que generan cargas de microorganismos alteradores por encima de la referencia de normativas internacionales. En este trabajo, polen del Altiplano Cundiboyacense fue sometido a procesos térmicos como secado y tratamiento en autoclave para evaluar el efecto del procesamiento sobre la inocuidad del grano. La efectividad del secado fue evaluada mediante conteos en placa y pruebas de esterilidad comercial para los ensayos en autoclave. Se encontró que el secado a 40°C, comúnmente utilizado por los apicultores, no reduce las cargas microbiológicas a niveles inferiores a los establecidos por normativas. Solamente a 60°C se encontraron resultados por debajo del límite sugerido. En los tratamientos en autoclave, un empleo de una temperatura de 121°C con al menos un tiempo de 10 minutos elimina por completo la carga microbiana. Se requiere un fortalecimiento de las Buenas Prácticas de Manufactura de polen, particularmente en la etapa de recolección, como estrategia para reducir su contaminación.

Palabras Clave— actividad antioxidante, apicultura, bioprocesos, compuestos bioactivos

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]. Tradicionalmente, las abejas colectan polen en exceso previendo periodos de escasez [2]. Los apicultores han diseñado sistemas de trampas para la cosecha del polen en exceso para destinarlo a consumo humano [3].

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

Además del reconocimiento del polen como fuente nutricional de proteína y grasa, reportes recientes han mostrado una importante cantidad de compuestos bioactivos tales como carotenoides, vitaminas, flavonoides y compuestos fenólicos [4] - [11]. A estos compuestos bioactivos les han sido atribuidas propiedades benéficas tales como antioxidante, anti-inflamatorio, antimicrobiano, anti-mutagénico, anti-histopatológico, antinoceptivo, e inclusive, anti-cancerígeno, sugiriendo el uso del polen como suplemento dietario [12] - [22].

Hoy en día, el polen es usualmente consumido directamente sin mayor procesamiento que el secado. El grano de polen, una vez cosechado por el apicultor, tiene un contenido de humedad que oscila entre 20% y 30% [23]; en consecuencia, debe ser inmediatamente sometido a procesos de reducción de humedad hasta que el contenido de agua sea reducido a entre 5% y 8% para prevenir contaminación microbiológica [24]. Teniendo en cuenta la riqueza nutricional del polen, una variedad de microorganismos pueden crecer en el producto. Si las prácticas de recolección, almacenamiento y comercialización no son apropiadas, diferentes microorganismos alteradores y/o patógenos pueden desarrollarse [25].

Sin embargo, aunque el secado es una técnica antigua y es comúnmente usada para deshidratar alimentos, es un proceso que aún genera mucha controversia cuando es empleado para secar polen. Varios autores sugieren el uso de relativamente bajas temperaturas (por debajo de 50°C) y bajos tiempos de secado (no más de seis horas) para prevenir la degradación de los componentes encontrados en el grano, particularmente bioactivos [23], [24], [26], [27]. Por otra parte, solo pocos países han establecido estándares de calidad concernientes a polen: Argentina (Código Alimentario Argentino. Capítulo X. Art. 785), Brasil (Instrucao Normativa n.3, de 19 de Janeiro de 2001), Bulgaria (Bulgarian standard 2567111-91), China (NY 5137-2002 y GB/T 19330- 2008), Mexico (Norma Mexicana NMX-FF-094-1998-SCFI: Productos alimenticios no industrializados para consumo humano - Polen - (Pollínis)), Polonia (PN-R-78893 “Obnoza pylkowe”-Polish legislation for bee-pollen), y Suiza (Swiss Food Manual: Pollen Bienenprodukte, BAG-Swiss Federal Office for Public

Health).

En contraste, la experiencia nos ha mostrado que tratamientos de secado realizados a bajas temperaturas pueden llevar a una eliminación incompleta de microorganismos alteradores, siendo un alimento no adecuado para consumo. Este aspecto es particularmente marcado en polen de origen tropical, donde las cargas microbiológicas del ambiente circundante a los apiarios son usualmente altas, aún si se aplican las Buenas Prácticas de Manufactura (BPM). En cualquier caso, un balance entre una mínima pérdida del valor nutricional y bioactivo del polen y, a su vez, una exitosa reducción en la carga microbiológica debe ser encontrada cuando se procesa polen, como ocurre con otra clase de alimentos (por ejemplo, leche). A pesar que se han reportado diferentes técnicas novedosas para reducir la humedad en polen, como la liofilización, en un mediano plazo aún no parece ser una opción tecnológica o económicamente viable para los apicultores colombianos.

En este estudio diferentes tratamientos térmicos, mediante el empleo de secadores de aire indirecto y autoclave, fueron llevados a cabo, con el fin de evaluar la reducción de la carga microbiológica del polen por debajo de límites de referencia de normativas internacionales, particularmente mohos y levaduras, así como microorganismos mesófilos. Inicialmente un secado con aire caliente fue realizado a tres temperaturas diferentes (40°C, 50°C y 60°C). Por otra parte, un tratamiento en autoclave fue hecho, evaluando diferentes niveles de temperatura y tiempo de tratamiento.

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 conducido en un horno a tres diferentes temperaturas: 40, 50 y 60°C. 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% [28], como lo sugieren las normativas existentes en diferentes países (Switzerland, Brazil, Argentina) [26].

El segundo tratamiento consistió en el empleo de un autoclave (Nasco, USA). Dos factores fueron seleccionados: temperatura y tiempo, siendo evaluados a diferentes condiciones: 110°C durante 36 min, 115°C y 20 min y 121°C a 5, 10 y 15 min.

C. *Análisis microbiológicos*

La caracterización de la calidad microbiológica del polen fue realizada de acuerdo a los procedimientos establecidos por la American Public Health Association [29]. Una dilución de muestra fue realizada mediante el peso de 11 g de polen y disolviéndolo en 90 mL de agua peptona 0.1% estéril. Luego, se llevaron a cabo diluciones sucesivas tomando 1 mL de las soluciones preparadas y disolviéndolas en 9 mL de agua peptona estéril tantas veces como fuera necesario.

- *Mesófilos aerobios*: 1 mL de las primeras tres diluciones fueron tomados y colocados en cajas de petri estériles y adicionándoles medio de crecimiento SPC (Standard Plate Count) hasta solidificación. Las cajas fueron incubadas a 37°C por 48 h. El conteo fue realizado y reportado como UFC/ g polen (Unidades Formadoras de Colonias).
- *Mohos y levaduras*: 1 mL de inóculo fue colocado en cajas de Petri estériles y luego se adicionaron 20 mL de agar OGY (Oxytetracyclin Glucose Yeast). Las cajas fueron incubadas a 25°C por siete días. El conteo fue realizado y reportado como UFC/ g polen.
- *Esterilidad comercial*: Esta prueba fue solamente realizada para los pólenes tratados en autoclave. Cuatro bolsas fueron usadas en cada tratamiento para evaluar esterilidad comercial. Tres de ellas fueron incubadas tanto a 37°C como a 55°C por 10 días. Al finalizar este periodo, 2 g de polen de cada bolsa fueron agregados a un tubo con 10 mL de caldo BHI (Brain Heart Infusion). Este proceso fue repetido cinco veces más para obtener en total seis tubos. Tres tubos fueron incubados en condiciones aeróbicas y los otros tres en condiciones anaeróbicas a 37°C y luego 55°C. Después de 72 H, se emplearon láminas de microscopía para evidenciar la ausencia de microorganismos [30].

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Diferentes tratamientos térmicos a polen apícola fueron llevados a cabo empleando para ello secado con aire caliente y una combinación de calor y presión mediante autoclave. Para los ensayos de secado, se realizaron los análisis de conteo de mesófilos aerobios y mohos y levaduras. Los resultados obtenidos fueron adicionalmente comparados con el polen fresco. La información se presenta en la Tabla 1, incluyéndose con los valores de referencia para polen de acuerdo con [26].

Tabla 1. Recuento de mesófilos aerobios y mohos y levaduras de polen fresco y polen seco.

Muestra	Mesofilos Aerobios (UFC/g) x 10 ⁵	Mohos y Levaduras (UFC/g) x 10 ³
	Polen fresco	> 300
40°C	13 – 24	35 – 52
50°C	< 0.1 – 9	1 – 12
60°C	< 0.1 – 1	1 - 8
Valor de referencia	< 1	< 50

Los resultados microbiológicos indicaron la existencia de una alta carga inicial en el polen fresco. A pesar de realizar adecuadamente las prácticas para la limpieza y mantenimiento de las colmenas en los apiarios, las condiciones ambientales y la biodiversidad de los países tropicales en algunos casos ocasionan una rápida contaminación del producto. Sin embargo, se observó que el proceso de secado reduce considerablemente la carga microbiológica a niveles aceptables.

Se destaca como una elevación en la temperatura de 10 grados, de 40 a 50°C, reduce considerablemente el contenido de bacterias mesófilas y mohos y levaduras. Sin embargo, esta carga microbiológica permanece alta y afecta la calidad del producto, induciendo procesos fermentativos [27]. En otros estudios, Estevinho *et al.* detectó mohos y levaduras en el 60% de las muestras y mesófilos aerobios en el 40%, oscilando en valores entre 2.8×10^3 a 7.6×10^2 UFC/g en polen Potugués [31]. La referencia [32] encontró mohos y levaduras en el 100% de las muestras Brasileñas de polen, en número de cerca de 10^4 UFC/g.

A partir de los resultados obtenidos, puede inferirse que un secado a temperaturas cercanas a los 60°C reduce aceptablemente la carga microbiológica, considerando que el principal objetivo debe ser asegurar la seguridad del alimento. Por otra parte, los resultados de esterilidad comercial para las muestras de polen tratadas en autoclave, son presentadas en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados de esterilidad comercial de polen apícola

Condición	Microorganismos aeróbicos		Microorganismos anaeróbicos	
	35°C	55°C	35°C	55°C
110°C, 36 min	C	C	C	C
115°C, 20 min	C	A	C	A
121°C, 5 min	C	A	A	A
121°C, 10 min	A	A	A	A
121°C, 15 min	A	A	A	A

C: Crecimiento. A: Ausencia

Los resultados mostraron que el tiempo de exposición de las muestras y la temperatura de tratamiento, en efecto disminuyen considerablemente el crecimiento de microorganismos alteradores. A 110°C y 36 minutos se evidenció crecimiento tanto de microorganismos anaerobios como aerobios a las dos temperaturas de incubación de las muestras tomadas. Por otra parte, a 115°C se encontró la ausencia de crecimiento de microorganismos anaerobios, sin embargo, el crecimiento de microorganismos aerobios demuestra la poca eficacia del empleo de esta temperatura para eliminar toda la carga microbiológica.

A pesar de buscarse la menor temperatura posible, que evitara una eventual modificación negativa en las características sensoriales y bioactivas del polen, un tratamiento a 121°C mostró ser efectivo para la eliminación de la carga microbiológica. No obstante, un tiempo de exposición de la muestra de 5 minutos no es suficiente para la eliminación de los microorganismos mesófilos aerobios. En los otros dos tiempos, 10 y 15 minutos, no hubo crecimiento tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas a 35°C y 55°C en los tubos que contiene las muestras en caldo BHI.

Para polen apícola, el autoclave puede ser empleado en algunos casos como etapa previa de procesos biotecnológicos tales como fermentación, para producir pan de abejas artificial. Fuenmayor mencionó la necesidad de emplear un proceso de esterilización antes de la fermentación para asegurar un control del bioproceso, prevenir la competencia de nutrientes entre microorganismos y el posible crecimiento de patógenos u hongos productores de aflatoxinas [33]. En este orden de ideas, un tratamiento a 121°C debería idealmente ser realizado con el mínimo de tiempo posible, por lo cual diez minutos probaron ser un lapso útil en la eliminación de microorganismos, afectando en la menor medida posible los compuestos bioactivos.

IV. CONCLUSIONES

El efecto de tratamientos térmicos tales como secado y uso de autoclave sobre las características microbiológicas de polen apícola fue evaluado. Se encontró que las temperaturas de 40°C y 50°C pudieron eliminar las cargas de microorganismos mesófilos y mohos y levaduras por debajo del valor de referencia, aunque los resultados mostraron también que estas condiciones aún no son suficientes para asegurar la estabilidad del producto. Por el contrario, a 60°C los resultados obtenidos sugieren esta temperatura como la opción más adecuada para secar polen de origen tropical. Por otra parte, los tratamientos en autoclave mostraron un efecto positivo con respecto a la eliminación total de la carga microbiológica. No se encontró crecimiento en las pruebas de esterilidad comercial en los tiempos de 10 y 15 minutos, a 121°C. Considerando que un tratamiento con el menor tiempo de exposición posible favorecería la conservación de los compuestos nutricionales y bioactivos, un tratamiento de 10 minutos es suficiente para reducir la carga microbiológica. Se espera que este trabajo sea una herramienta importante para catalogar y reconocer el polen Colombiano como una fuente segura y benéfica de compuestos nutritivos.

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] O. Barth, *O polen no mel Brasileiro*. Graficas Luxor, Rio de Janeiro, Brazil; 1989.
- [3] C. Fuenmayor, C. Zuluaga, C. Diaz, M. Quicazán, M.S. Cosio, and S. Mannino. Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Rev. MVZ Córdoba*, vol. 19, no. 1, pp.4003–4014. 2014.
- [4] K. Oliveira, M. Moriya, R.A.B. Azedo, L.B. de Almeida-Muradian, E.W. Teixeira, M.L.T.M.F. Alves, and A.C. de C.C. Moreti.. Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. *Quim. Nova* Vol.32, pp. 1099–1102. 2009.
- [5] F. Schulte, J. Mäder, L. Kroh, U. Panne, and J. Kneipp.. 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
- [6] A. Giorgi, M. Madeo, J. Baumgartner, and G.C. Lozzia. The Relationships between Phenolic Content, Pollen Diversity, Physicochemical Information and Radical Scavenging Activity in Honey. *Molecules*. vol. 16. no. 12. pp. 336–347. 2011.
- [7] M. Morais, L. Moreira, X. Feás, and L. Estevinho. Honeybee-collected pollen from five Portuguese Natural Parks: Palynological origin, phenolic content, antioxidant properties and antimicrobial activity. *Food Chem. Toxicol.* vol. 49, no. 5. pp. 1096–1101. 2011.
- [8] Freire, K., A. Lins, M. Dórea, F. Santos, C. Camara, and T. Silva. 2012. Palynological Origin, Phenolic Content, and Antioxidant Properties of Honeybee-Collected Pollen from Bahia, Brazil. *Molecules* 17(2): 1652–1664.
- [9] R. Margaoan, L. Marghitas, D. Dezmirean, O. Bobis, L. Tomos, C. Mihai, and V. Bonta. Honeybee-collected Pollen from Transylvania: Palynological Origin, Phenolic Content and Antioxidant Activity. *Bull. UASVM Anim. Sci. Biotechnol.* vol. 70. no. 2. pp. 311–315. 2013.
- [10] E. Ulusoy, and S. Kolayli. Phenolic Composition and Antioxidant Properties of Anzer Bee Pollen. *J. Food Biochem.* vol. 38. no. 1. pp. 73–82. 2013.
- [11] V. De Arruda, A.A.S. Pereira, A.S. de Freitas, O.M. Barth, and L.B. de Almeida-Muradian. Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botanical composition. *J. Food Compos. Anal.* vol. 29. no. 2. pp. 100–105. 2013.
- [12] S. Carpes, G. Mourao, S. Alencar, and M. Masson. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Brazilian J. Food Technol.* vol. 12. no.3. pp. 220–229. 2009.
- [13] B. LeBlanc, O. Davis, S. Boue, A. DeLucca, and T. Deeby. Antioxidant activity of Sonoran Desert bee pollen. *Food Chem.* vol. 115. no. 4. pp. 1299–1305. 2009.
- [14] A. Saric, T. Balog, S. Sobocanec, B. Kusic, V. Sverko, G. Rusak, S. Likic, D. Bubalo, B. Pinto, D. Reali, and T. Marotti. Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystus incanus* L. rich bee pollen. *Food Chem. Toxicol.* vol. 47. no. 3. pp. 547–554. 2009.
- [15] E. Küpeli, E., D. Deliorman, I. Gürbüz, and E. Yesilada. In vivo activity assessment of a “honey-bee pollen mix” formulation. *Pharm. Biol.* vol. 48. no. 3, pp. 253–259. 2010.
- [16] A. Rebiai, and T. Lanez. Chemical composition and antioxidant activity of *Apis mellifera* bee pollen from northwest Algeria. *J. Fundam. Appl. Sci.* vol 4. no. 2. pp. 26–35. 2012.
- [17] M. Khider, K. Elbanna, A. Mahmoud, and A. Owayss. Egyptian Honeybee Pollen as Antimicrobial, Antioxidant Agents, and Dietary Food Supplements. *Food Sci. Biotechnol.* DOI: 10.1007/s1. 2013.
- [18] K. Fatroová-Šramková, J. Nůžková, M. Kačániová, M. Máriássyová, K. Rovná, and M. Stričík. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. *J. Environ. Sci. Heal. Part B.* vol. 48. no. 2. pp. 133–138. 2013.
- [19] D. Aličić, Đ. Šubarić, M. Jašić, H. Pašalić, and Đ. Ačkar. Antioxidant properties of pollen. *Hrana u Zdr. i Boles. Znan. časopis za Nutr. i dijetetiku.* vol. 3. no. 1. pp. 6–12. 2014.
- [20] M. Solgajová, E. Ivanisova, J. Nozkova, H. Francakova, Z. Toht, and S. Drab. Antioxidant activity and polyphenol content of malt beverages enriched with bee pollen. *J. Microbiol. Biotechnol. Food Sci.* vol. 3. no. 3. pp. 281–284. 2014.
- [21] A. Pascoal, S. Rodrigues, A. Teixeira, X. Feás, and L.M. Estevinho. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem. Toxicol.* vol. 63. pp. 233–239. 2014.
- [22] A. Tohamy, E.M. Abdella, R.R. Ahmed, and Y.K. Ahmed. Assessment of anti-mutagenic, anti-histopathologic and antioxidant capacities of Egyptian bee pollen and propolis extracts. *Cytotechnology.* vol. 66. no. 2. pp. 283–297. 2014.
- [23] M. Campos, C. Frigerio, J. Lopes, and S. Bogdanov. What is the future of Bee-Pollen? *J. ApiProduct ApiMedical Sci.* vol. 2. no. 4. pp. 131–144. 2010.
- [24] L. Almeida-Muradian, L. Pamplona, S. Coimbra, and O. Barth. Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets. *J. Food Compos. Anal.* vol 18. no. 1. pp. 105–111. 2005.
- [25] G. González, M.J. Hinojo, R. Mateo, a Medina, and M. Jiménez. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int. J. Food Microbiol.* vol. 105. no. 1. pp. 1–9. 2005.
- [26] 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.
- [27] S. Bogdanov, *The Bee Pollen Book*. Bern, Switzerland: Bee Product Science; 2011. 42 p.
- [28] A. Durán. *Diseño de un sistema de secado y separación de impurezas para polen apícola en Colombia*. Universidad Nacional de Colombia; 2014.
- [29] S. Doores, Y. Salfinger, and M. Tortorello. *Compendium of Methods for The Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, Washington D.C., USA. 2013.
- [30] M. Holguín, B. Rubio, M. Vargas, A. Muñoz, and G. Diaz. *Manual de técnicas de análisis para el control de calidad microbiológico de alimentos para consumo humano*. Instituto de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos - INVIMA, Bogotá, Colombia. 1998.
- [31] L. Estevinho, S. Rodrigues, A.P. Pereira, and X. Feás. Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *Int. J. Food Sci. Technol.* vol. 47. no. 2. pp. 429–435. 2012.
- [32] H. Hervatin. *Avaliacao microbiologica e fisico-quimica do polen apicola in natura e desidratado sob diferentes temperaturas*. Universidade Estadual de Campinas. 2009.
- [33] C. Fuenmayor. *Aplicación de bioprocesos en polen de abejas para el desarrollo de un suplemento nutricional protéico*. Universidad Nacional de Colombia. 2009.