

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

*Programa de Doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias
por la Universidad de Córdoba*



**FACTORES DE INFLUENCIA EN LA CALIDAD
MICROBIOLÓGICA DEL POLEN APÍCOLA**

**INFLUENCING FACTORS ON THE MICROBIOLOGICAL
QUALITY OF BEE POLLEN**

TESIS DOCTORAL

Juan Ramón Cabello Cívico

Directores:

Dra. Salud Serrano Jiménez

Dr. José Manuel Flores Serrano

Córdoba, a 28 de Abril del 2022

TITULO: *FACTORES DE INFLUENCIA EN LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA
DEL POLEN APÍCOLA*

AUTOR: *Juan Ramón Cabello Cívico*

© Edita: UCOPress. 2022
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)



FACTORES DE INFLUENCIA EN LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL POLEN APÍCOLA

TESIS DOCTORAL

para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Córdoba presentada por
el Licenciado en Veterinaria y Máster en Agroalimentación D. *Juan Ramón*

Cabello Cívico

El Doctorando

**CABELLO
CIVICO JUAN
RAMON -
52484309B**

Firmado
digitalmente por
CABELLO CIVICO
JUAN RAMON -
52484309B
Fecha: 2022.04.28
19:54:38 +02'00'

Fdo.: Juan Ramón Cabello Cívico

VºBº Los Directores

**SERRANO
JIMENEZ SALUD
- 30534130C**

Firmado digitalmente
por SERRANO JIMENEZ
SALUD - 30534130C
Fecha: 2022.04.27
21:15:46 +02'00'

Fdo.: Prof. Dra. Salud Serrano

Jiménez

**FLORES SERRANO
JOSE MANUEL -
29477858T**

Firmado digitalmente por
FLORES SERRANO JOSE
MANUEL - 29477858T
Fecha: 2022.04.28
09:10:05 +02'00'

Fdo.: Prof. Dr. José Manuel Flores

Serrano

Córdoba a 28 de Abril, 2022



Salud Serrano Jiménez, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba, y José Manuel Flores Serrano, Profesor Titular de Universidad del Departamento de Zoología de la Universidad de Córdoba

INFORMAN

Que la tesis Titulada “**Factores de influencia en la calidad microbiológica del polen apícola**” de la que es autor D. Juan Ramón Cabello Cívico, ha sido realizada bajo nuestra dirección y cumple los requisitos académicos exigidos por la Legislación vigente para optar al título de Doctor por la Universidad de Córdoba.

Y para que conste a los efectos oportunos firman el presente informe en Córdoba a 28 de Abril del 2022.

SERRANO
JIMENEZ
SALUD -
30534130C

Firmado digitalmente por SERRANO JIMENEZ SALUD - 30534130C
Fecha: 2022.04.27 21:16:13 +02'00'

Fdo.: Prof^a. Dra. Salud Serrano

Jiménez

FLORES
SERRANO
JOSE
MANUEL -
29477858T

Firmado digitalmente por FLORES SERRANO JOSE MANUEL - 29477858T
Fecha: 2022.04.28 18:24:48 +02'00'

Fdo.: Prof. Dr. José Manuel

Flores Serrano



TÍTULO DE LA TESIS:

FACTORES DE INFLUENCIA EN LA CALIDAD MICROBIOLÓGICA DEL POLEN
APÍCOLA

DOCTORANDO: JUAN RAMÓN CABELLO CÍVICO

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE TESIS

La tesis doctoral llevada a cabo por Juan Ramón Cabello Cívico explora la seguridad alimentaria del polen apícola desde el punto de vista de su microbiología. La ausencia de normativa microbiológica en particular y de calidad en general, genera un vacío legal en cuanto a los criterios exigibles. Algunos países imponen criterios desde su normativa nacional y ciertos autores sugieren criterios para ello.

Se realizaron cuatros ensayos sucesivos para obtener datos acerca de la ecología microbiana del polen apícola, sus factores de influencia y tratamientos descontaminantes. La primera cuestión que se abordó fue sondear la carga microbiológica del polen producido en una situación real, similar a lo que acontece en un apiario profesional. Los datos confirmaron la alta carga microbiológica del polen fresco producido, llegando a niveles de 10^7 Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) para enterobacterias y microorganismos aerobios mesófilos y 10^8 UFC/g para mohos y levaduras.

En el segundo ensayo se estudió la influencia del uso de la trampa cazapolen, que es el dispositivo usado en la colmena para la recolección del polen apícola. Concretamente, se esterilizó el cajón donde se deposita y almacena el polen que se desprende de las abejas hasta el momento de la recolección por parte del apicultor. La esterilización del cajón de la trampa cazapolen no consiguió reducir la carga microbiológica del polen, obteniendo valores máximos de $2,4 \times 10^6 \pm 7,1 \times 10^4$ UFC/g para enterobacterias, $1,9 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^7$ UFC/g para microorganismos aerobios mesófilos y $4,3 \times 10^8 \pm 2,8 \times 10^8$ UFC/g para mohos y levaduras, lo que descarta este utensilio como origen principal de la contaminación del polen.

En el tercer ensayo se se evaluaron distintos diseños de las trampas cazapolen, diferentes tiempos de permanencia del polen en los cajones hasta

la recolección, o aspectos climatológicos y ambientales. Ninguno de estos factores influyó significativamente en la reducción de la carga microbiológica.

Se propone en el cuarto ensayo la ozonización del polen como método de choque para reducir la carga microbiológica del polen apícola. Para ello se comparó la eficacia de tratamientos de ozonización y desecación, por separado y a diferentes tiempos, al igual que la ozonización combinada con el secado. De esta manera se seleccionó un método combinado con 30 minutos de ozonización, seguido de un periodo de desecación de 15 minutos. Los resultados mostraron una reducción de la carga microbiológica de 2 ciclos logarítmicos para enterobacterias y aerobios mesófilos y 3 ciclos logarítmicos para mohos y levaduras.

Ya definido el método de choque óptimo para reducir la carga microbiológica inicial, se planteó la posibilidad de conservar el polen fresco en frigorífico (4°C), por lo que se evaluó la vida útil del polen tratado con este método y conservado en condiciones de refrigeración. Tal y como se recoge en el artículo publicado en *Foods* (2021,10, 2593. <https://doi.org/10.3390/foods10112593>), los resultados mostraron que los valores microbiológicos conseguidos tras el tratamiento inicial se mantuvieron hasta tres semanas. Tras este último periodo, la carga de enterobacterias adquirió valores de $3,6 \times 10^4 \pm 6,3 \times 10^4$ UFC/g, para microorganismos aerobios mesófilos los valores se situaron en $5,9 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^5$ UFC/g, y para levaduras y mohos la carga microbiológica se situó en $8,4 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^7$ UFC/g. Estos valores experimentaron un incremento paulatino, aunque lento, hasta la sexta semana, situándose la carga final de enterobacterias en $2,4 \times 10^5 \pm 5,9 \times 10^5$ UFC/g, para microorganismos aerobios mesófilos de $9,6 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^5$ UFC/g, y para levaduras y mohos de $1,1 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^7$ UFC/g.

En este estudio, toda vez que el ozono provoca oxidación, y podría afectar a componentes bioactivos importantes del polen, como los flavonoides (ácido cafeico, crisina, caempferol, luteolina, naringerina, ácido p-cumárico, quercetina, rutina) se evaluaron los posibles efectos del tratamiento con ozono sobre este grupo de polifenoles presentes en el polen. Los resultados evidencian que el tratamiento de ozonización aplicado no reduce el contenido en polifenoles del polen fresco.

Finalmente, los resultados del análisis sensorial revelan, a través del perfil descriptivo, que el ozono no influye en los atributos sensoriales del polen apícola a la dosis y tiempo de exposición empleados, frente al tratamiento único por desecación por aire caliente a 42°C, que sí influye modificando dichos atributos en función del tiempo de exposición.

En nuestra opinión, el resultado más destacable de esta tesis doctoral es que la ozonización combinada con un tratamiento de desecación (30 minutos/15 minutos) podría aumentar la vida útil del polen fresco en refrigeración y disminuir la carga microbiana previa a su conservación en congelación, garantizando la seguridad alimentaria de este producto, manteniendo su contenido en polifenoles como componentes bioactivos y asegurando el perfil descriptivo sensorial del polen fresco.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 28 de abril de 2022

Firma de los directores

SERRANO JIMENEZ
SALUD - 30534130C
Firmado digitalmente
por SERRANO JIMENEZ
SALUD - 30534130C
Fecha: 2022.04.27
21:16:34 +02'00'

Fdo.: Salud Serrano Jiménez

FLORES SERRANO
JOSE MANUEL -
29477858T
Firmado digitalmente por FLORES
SERRANO JOSE MANUEL -
29477858T
Fecha: 2022.04.28 09:08:24 +02'00'

Fdo.: José Manuel Flores Serrano

“Difunde el amor donde quiera que vayas. Que nadie se aleje de ti, sin que al irse se sienta un poco mejor, y más feliz.”

Santa Teresa de Calcuta

A mis padres y hermana,

A los Dinki-Winki

Agradecimientos

Deseo expresar mi más sincera gratitud y reconocimiento a todas las personas que han hecho posible la realización de este Trabajo de Investigación:

A la Dra. Salud Serrano Jiménez, Profesora Titular del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba, y codirectora de esta Tesis. Por su confianza plena, y por haber apostado por este trabajo en épocas delicadas de mi vida. Eternamente gracias.

Al Dr. José Manuel Flores Serrano, Profesor Titular del Departamento de Zoología de la Universidad de Córdoba, y codirector de esta Tesis.

Al Grupo de Investigación AGR-202 "Calidad integral de alimentos (CIAL)", del Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba; en particular, a Rosa Moreno e Inma Rodríguez. Y a Loli Muñoz, personal de administración. Por su disposición, amabilidad, entrega y cariño desplegado ante este trabajo y hacia mí.

Al Catedrático de la Universidad de Córdoba, D. Diego Santiago Laguna. *In Memoriam*. En su momento, fue mi maestro con sus ideas de superación, su buen hacer, incentivándome en su deseo de sembrar en todo momento ganas de luchar, de aumentar la fe en mi mismo, y en el Señor. Se fue mi amigo Diego un Sábado Santo, víspera de la Resurrección del Redentor, esa en la que tanto creía. Con su partida, me dejó un poco huérfano.

A mis padres, por su confianza y apoyo incondicional durante todo el tiempo que ha durado la realización de esta Tesis Doctoral. En especial, agradezco a mi hermana Araceli por ser mi amiga, mi fiel confidente y pilar fundamental desde que tengo conciencia. Y a José Carlos.

A los Dinki-Winki (mi Manijero, Raúl, Juanlu y Esteban) por aguantar mis neuras y las insufribles conversaciones hablando de abejas, aerobios mesófilos, y cargas microbianas, sin prestarme mucha atención. Nos quedan muchas cervezas por tomar. Y a mi Moscas, Rafalito y Chema. Los quiero una jartá.

A Wolfgang Amadeus Mozart, Johann Sebastian Bach, Ludwig van Beethoven y Serguéi Rachmaninov. Sus obras son la banda sonora de mi vida, la etérea compañía del alma durante la elaboración de esta tesis.

Y finalmente a ti Señor. Tú eres mi Luz y mi Salvación.

Tabla de Contenidos

CONTENIDO

RESUMEN	3
SUMMARY.....	9
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.	15
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES.....	27
2.1. Historia del Polen Apícola	27
2.2. La Abeja	31
2.3. Definición de Polen Botánico	36
2.3.1. <i>Características Estructurales del Polen Botánico</i>	36
2.4. Definición del Pellet de Polen Apícola o Corbicular	37
2.5. Procedimiento de Recolección del Polen Apícola. La Trampa Cazapolen	40
2.6. Condiciones de Manejo, Procesamiento del Polen en el Apiario y Transporte a la Planta de Procesado	46
2.7. Manufactura del Polen en la Planta de Procesado	48
2.7.1. <i>Características de la Planta de Procesado del Polen</i>	48
2.7.2. <i>Almacenamiento y Desección del Polen</i>	49
2.7.3. <i>Tamizado y Limpieza del Polen Desechado</i>	52
2.7.4. <i>Envasado y Almacenamiento del Polen Desechado</i>	53
2.7.5. <i>Congelación del Polen y Envasado del Polen Congelado</i>	55
2.8. El Pan de Abeja.....	56
2.9. Composición Físico-Química del Polen Apícola	59
2.9.1. <i>Introducción</i>	59
2.9.2. <i>El Contenido de Humedad y a_w</i>	61
2.9.3. <i>Hidratos de Carbono</i>	62
2.9.4. <i>Proteínas y Aminoácidos</i>	63
2.9.5. <i>Lípidos y Ácidos Grasos</i>	67
2.9.6. <i>Fibra</i>	69
2.9.7. <i>Minerales</i>	70
2.9.8. <i>Vitaminas</i>	70

2.9.9. Polifenoles	72
2.9.10. pH y Acidez Valorable	72
2.10. Propiedades Físicas del Polen	73
2.10.1. Peso, Forma y Tamaño.....	73
2.10.2. Color.....	74
2.11. Marco Legal del Polen Apícola	77
2.11.1. Antecedentes Legales	79
2.11.2. Situación Actual.....	79
2.12. El Sector Apícola en la UE y en España	81
2.13. Perspectivas del Mercado del Polen Apícola a Nivel Mundial y Nacional	83
2.14. Polen de Abeja: Perspectivas de Futuro	90
2.15. Demanda Creciente del Polen de Abeja en la Industria Farmacéutica y Nutracéutica	91
2.16. Valor Nutricional	91
2.17. Aplicaciones Terapéuticas del Polen	92
2.18. Aplicaciones en la Industria Alimentaria	94
2.19. Efectos Adversos	96
2.20. Higienización Alimentaria por Tratamiento con Ozono. Mecanismos de Acción y Aplicaciones.	97
2.20.1. Ventajas e Inconvenientes del Tratamiento con Ozono.....	98
2.20.2. Mecanismos de Acción Antimicrobiana del Ozono.....	99
2.20.3. Aspectos Nutricionales y Sensoriales del Tratamiento con Ozono	100
2.20.4. Aplicaciones Específicas del Ozono en la Industria Alimentaria para Controlar el Crecimiento de Microorganismos y Prolongar la Vida Útil de los Productos Alimenticios	101
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	105
CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	109
4.1.- Diseño Experimental del Muestreo.....	109
4.2. Preparación de las Muestras.....	111

4.2.1 Adquisición y Mantenimiento de las muestras.....	111
4.2.2. Identificación.....	112
4.3. Métodos de Análisis Microbiológicos.....	112
4.3.1. Preparación de las Muestras para su Análisis.....	112
4.3.2. Homogeneización de las Muestras.....	113
4.3.3. Preparación de las Diluciones Decimales.....	113
4.4. Análisis Microbiológico.....	113
4.4.1. Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos.....	113
4.4.2. Recuento de Enterobacterias Lactosa Positivas (coliformes).....	114
4.4.3. Recuento de Estafilococos Coagulasa Positivos.....	115
4.4.4. Recuento de Enterobacterias.....	116
4.4.5. Recuento de Mohos y Levaduras.....	116
4.5. Determinación de la Actividad de Agua (a_w).....	116
4.6. Deseccación del polen.....	117
4.7. Ozonización.....	118
4.8. Metodología del Análisis Sensorial.....	119
4.9. Análisis de Polifenoles.....	120
4.10. Análisis Estadístico.....	123
4.11. Descripción de los Ensayos.....	124
4.11.1. Primer ensayo. Condiciones Higiénicas del Polen e Influencia del Tiempo de Recogida (24, 48 y 72 horas).....	124
4.11.2. Segundo Ensayo. Influencia de la Esterilización del Cajón de la Trampa Cazapolen en la Calidad Higiénica del Polen Apícola.....	125
4.11.3. Tercer Ensayo: Influencia de los Factores Climatológicos- Ambientales y el Diseño de Trampas Cazapolen en la Calidad Higiénica del Polen Apícola.....	126
4.11.4. Cuarto Ensayo. Tratamientos Descontaminantes del Polen Apícola por Deseccación, Ozonización y Combinación de Ambos Métodos. Ensayo de Vida Útil. Efecto de los Tratamientos sobre el Contenido en Polifenoles y Características Sensoriales.....	128
CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	133

5.1. Primer Ensayo. Condiciones Higiénicas del Polen e Influencia del Tiempo de Recogida (24, 48 y 72 horas).	133
5.2. Segundo Ensayo. Influencia de la Esterilización del Cajón de la Trampa Cazapolen en la Calidad Higiénica del Polen Apícola	149
5.3. Tercer ensayo. Influencia de los Factores Ambientales-Climatológicos, y Diseño de Trampas Cazapólenes en la Calidad Higiénica del Polen Apícola.	156
<i>5.3.1. Apartado A. Efecto de las Condiciones del Entorno sobre la Carga Microbiológica del Polen de Abejas</i>	<i>156</i>
<i>5.3.2. Apartado B. Influencia de los Factores Climáticos y su Relación con el Medio.....</i>	<i>159</i>
<i>5.3.3. Influencia del Diseño de Trampas Cazapólenes en la Calidad Higiénica del Polen Apícola.....</i>	<i>163</i>
5.4. Cuarto Ensayo. Tratamientos Descontaminantes del Polen Apícola por Deseccación con Aire Caliente, Ozonización y Combinación de ambos Métodos. Ensayo de Vida Útil. Efecto de los Tratamientos sobre el Contenido en Polifenoles y Características Sensoriales.	166
<i>5.4.1. Tratamiento Térmico: Polen de Abeja Secado con Corriente de Aire Caliente.....</i>	<i>167</i>
<i>5.4.2. Polen de Abeja Expuesto al Tratamiento con Ozono</i>	<i>168</i>
<i>5.4.3. Evaluación de la Vida Útil del Polen de Abeja con Tratamiento Combinado por Secado con Aire Caliente y Exposición al Ozono durante 15/30 minutos, respectivamente.</i>	<i>169</i>
<i>5.4.4. Estudio del Contenido en Polifenoles presentes en el Polen de Abeja tras el Tratamiento (Deseccación y Ozono) durante 30 Minutos.</i>	<i>172</i>
<i>5.4.5. Evaluación Sensorial del Polen Apícola Procesado.</i>	<i>174</i>
CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES	179
CHAPTER 7. CONCLUSSIONS	183
CAPÍTULO 8. ÍNDICE DE TABLAS Y DE FIGURAS.....	187
CAPÍTULO 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.	201
CAPÍTULO 10. ANEXOS	241

Resumen

RESUMEN

El polen apícola constituye el segundo producto en importancia obtenido de las colmenas de abejas melíferas, y además un recurso bioactivo de excelente valor nutricional, con una demanda creciente en una sociedad como la actual que busca el consumo de productos naturales. Aunque actualmente el polen de abeja tiene una tendencia alcista en su consumo humano en los países desarrollados, bien como suplemento alimenticio o bien como alimento de acuerdo con la legislación de cada país, en este momento no existe un criterio común en la Unión Europea (UE) para su comercialización, y en muchos de los países que componen la Unión, ni siquiera está establecida una norma de calidad, existiendo un vacío legal relacionado con la seguridad microbiológica del producto. Esta situación afecta a países productores de polen como España y Grecia, que abastecen las necesidades de países importadores como Francia, Alemania y otros del norte europeo. El polen generalmente se comercializa y se consume después de someterlo a un proceso de desecación, siendo también la congelación y la liofilización técnicas aceptables para su conservación.

El proceso de desecación conlleva una depreciación en las características organolépticas con respecto al polen fresco, que provocan incluso un rechazo por parte del consumidor. Por ello, existe una tendencia creciente a la comercialización como polen fresco congelado. El problema radica en que el polen de abeja para su consumo en fresco posee una alta carga microbiológica, que puede incluir algunos géneros patógenos para la salud humana. Por lo que, si se propone la comercialización como polen fresco congelado, impera la necesidad de aplicar tratamientos y métodos de conservación que reduzcan la carga microbiológica hasta niveles aceptables. Así, uno de los objetivos de esta tesis es conseguir datos que faciliten el establecimiento de criterios legales para determinados microorganismos (aerobios mesófilos, enterobacterias, coliformes, estafilococos toxigénicos, mohos y levaduras, principalmente) que subsanen la situación actual de vacío legal y ausencia de una norma higiénica para el polen apícola.

En el presente trabajo hemos abordado el problema, marcando una ruta experimental que comienza con un primer ensayo destinado a la determinación de la carga microbiológica del polen producido en una situación real, similar a lo que acontece en un apiario profesional. Los datos

confirmaron la alta carga microbiológica del polen fresco producido, llegando a niveles de 10^7 Unidades Formadoras de Colonias por gramo (UFC/g) para enterobacterias y microorganismos aerobios mesófilos y 10^8 UFC/g para mohos y levaduras. Esta elevada carga supera ampliamente los valores sugeridos por algunos autores como aceptables, como por ejemplo los propuestos por Campos *et al.* (2008), confirmando también con distintas publicaciones, la alta carga microbiológica del polen fresco, con el subyacente riesgo para el consumidor, más aún si no se extreman los cuidados en la conservación, congelándolo inmediatamente y evitando la ruptura de la cadena de frío hasta el momento del consumo.

Como consecuencia de los anteriores datos, se introdujeron actuaciones que pudieran reducir la carga microbiológica, con el fin de garantizar la inocuidad para el consumo humano del polen fresco congelado. En este sentido, en el segundo ensayo se estudió la influencia del uso de la trampa cazapolen, que es el dispositivo usado en la colmena para la recolección del polen apícola. Concretamente, se esterilizó el cajón donde se deposita y almacena el polen que se desprende de las abejas hasta el momento de la recolección por parte del apicultor. La esterilización del cajón de la trampa cazapolen no consiguió reducir la carga microbiológica del polen, obteniendo valores máximos de $2,4 \times 10^6 \pm 7,1 \times 10^4$ UFC/g para enterobacterias $1,9 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^7$ UFC/g para microorganismos aerobios mesófilos y $4,3 \times 10^8 \pm 2,8 \times 10^8$ UFC/g para mohos y levaduras, lo que descarta este utensilio como origen principal de la contaminación del polen, y presupone que el origen de la elevada carga microbiológica podría deberse al propio polen botánico, al entorno, a la abeja, a la permanencia del polen en la trampa cazapolen hasta su recogida, o al manejo del producto hasta que se le aplica un método de conservación.

En el tercer ensayo se abordan otros factores que pudieran influir sobre la contaminación microbiológica del polen. En concreto, se evaluaron distintos diseños de las trampas cazapolen, diferentes tiempos de permanencia del polen en los cajones hasta la recolección, o aspectos climatológicos y ambientales. Ninguno de estos factores influyó significativamente en la reducción de la carga microbiológica.

Se propone en el cuarto ensayo la ozonización del polen como método de choque para reducir la carga microbiológica del polen apícola. Para ello se comparó la eficacia de tratamientos de ozonización y desecación, por separado y a diferentes tiempos, al igual que la ozonización combinada con el

secado. De esta manera se seleccionó un método combinado con 30 minutos de ozonización, seguido de un periodo de desecación de 15 minutos. Los resultados mostraron una reducción de la carga microbiológica de 2 ciclos logarítmicos para enterobacterias y microorganismos aerobios mesófilos y 3 ciclos logarítmicos para mohos y levaduras. Por tanto, a través del método combinado se redujo la carga microbiológica inicial de enterobacterias de $6,0 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^7$ UFC/g a $1,0 \times 10^4 \pm 3,5 \times 10^4$ UFC/g, de $1,1 \times 10^6 \pm 3,5 \times 10^6$ UFC/g en el contenido inicial de microorganismos aerobios mesófilos a $1,4 \times 10^4 \pm 2,7 \times 10^4$ UFC/g, y de $2,4 \times 10^8 \pm 6,6 \times 10^8$ UFC/g en el contenido inicial de mohos y levaduras a $6,5 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^6$ UFC/g.

Ya definido un método de choque adecuado para reducir la carga microbiológica inicial, se planteó la posibilidad de conservar el polen fresco en frigorífico (4°C), por lo que se evaluó la vida útil del polen tratado con este método y conservado en condiciones de refrigeración. Los resultados mostraron que los valores microbiológicos conseguidos tras el tratamiento inicial se mantuvieron hasta tres semanas. Trascurrido este último periodo, la carga de enterobacterias adquirió valores de $3,6 \times 10^4 \pm 6,3 \times 10^4$ UFC/g, para microorganismos aerobios mesófilos los valores se situaron en $5,9 \times 10^4 \pm 1,3 \times 10^5$ UFC/g, y para levaduras y mohos la carga microbiológica se situó en $8,4 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^7$ UFC/g. Estos valores experimentaron un incremento paulatino, aunque lento, hasta la sexta semana, situándose la carga final de enterobacterias en $2,4 \times 10^5 \pm 5,9 \times 10^5$ UFC/g, para microorganismos aerobios mesófilos de $9,6 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^5$ UFC/g, y para levaduras y mohos de $1,1 \times 10^7 \pm 2,1 \times 10^7$ UFC/g.

En este estudio, toda vez que el ozono provoca oxidación, y podría afectar a componentes bioactivos importantes del polen, como los flavonoides (ácido cafeico, crisina, caempferol, luteolina, naringerina, ácido p-cumárico, quercetina, rutina) se evaluaron los posibles efectos del tratamiento con ozono sobre este grupo de polifenoles presentes en el polen. Los resultados evidencian que el tratamiento de ozonización/desecación aplicado no reduce el contenido en polifenoles del polen fresco.

Finalmente, los resultados del análisis sensorial revelan, a través del perfil descriptivo, que el ozono no influye en los atributos sensoriales del polen apícola a la dosis y tiempo de exposición empleados, frente al tratamiento único por desecación por aire caliente a 42 °C, que sí influye modificando dichos atributos en función del tiempo de exposición.

Como conclusión podemos decir que la ozonización combinada con un tratamiento de desecación (30 minutos/15 minutos) podría aumentar la vida útil del polen fresco en refrigeración y disminuir la carga microbiológica previa a su conservación en congelación, garantizando la seguridad alimentaria de este producto, manteniendo su contenido en polifenoles como componentes bioactivos y asegurando el perfil descriptivo sensorial del polen fresco.

Palabras clave: Polen apícola; trampa cazapolen; descontaminación microbiana; ozono; vida útil; polifenoles; análisis sensorial.

Summary

SUMMARY

Bee pollen is the second most important product obtained from honeybee hives, and it is also a bioactive resource of excellent nutritional value, with a growing demand in today's society, which seeks to consume natural products. Although there is currently an upward trend in human consumption of bee pollen in developed countries, either as a food supplement or as food in accordance with the legislation of each country, at the moment there is no common criterion in the European Union (EU) for its commercialisation, and in many of the countries that make up the Union, not even a quality standard has been established, leaving a legal vacuum related to the microbiological safety of the product. This situation affects pollen-producing countries such as Spain and Greece, which supply the needs of importing countries such as France, Germany and other northern European countries. Pollen is generally marketed and consumed after undergoing a drying process, with freezing and freeze-drying also being acceptable techniques for preservation.

The drying process leads to a depreciation of the organoleptic characteristics compared to fresh pollen, which may even lead to rejection by the consumer. For this reason, there is a growing trend towards marketing as fresh frozen pollen. The problem is that bee pollen for fresh consumption has a high microbiological load, which may include some genera pathogenic to human health. Therefore, if marketing as fresh frozen pollen is proposed, there is a need for treatments and preservation methods to reduce the microbiological load to acceptable levels. Thus, one of the objectives of this thesis is to obtain data to facilitate the establishment of legal criteria for certain microorganisms (mainly aerobic mesophiles, enterobacteria, coliforms, toxigenic staphylococci, moulds and yeasts) to remedy the current situation of legal vacuum and absence of a hygienic standard for bee pollen.

In the present work we have approached the problem, marking an experimental route that begins with a first test aimed at determining the microbiological load of the pollen produced in a real situation, similar to what happens in a professional apiary. The data confirmed the high microbiological load of the fresh pollen produced, reaching levels of 10^7 Colony Forming Units per gram (CFU/g) for enterobacteria and mesophilic aerobic microorganisms and 10^8 CFU/g for moulds and yeasts. This high load far exceeds the values suggested by some authors as acceptable, such as those proposed by Campos *et al.* (2008), also confirming with different publications, the high

microbiological load of fresh pollen, with the underlying risk for the consumer, even more so if care is not taken in conservation, freezing it immediately and avoiding breaking the cold chain until the moment of consumption.

As a consequence of the above data, actions were introduced to reduce the microbiological load in order to guarantee the safety of fresh frozen pollen for human consumption. In this sense, in the second trial, the influence of the use of the pollen trap, which is the device used in the hive for the collection of bee pollen, was studied. Specifically, the box where the pollen released by the bees is deposited and stored until the time of collection by the beekeeper was sterilised. The sterilisation of the pollen trap box failed to reduce the microbiological load of the pollen, obtaining maximum values of $2.4 \times 10^6 \pm 7.1 \times 10^4$ CFU/g for enterobacteria, $1.9 \times 10^7 \pm 1.8 \times 10^7$ CFU/g for mesophilic aerobic microorganisms and $4.3 \times 10^8 \pm 2.8 \times 10^8$ CFU/g for moulds and yeasts. This rules out this tool as the main source of pollen contamination, and assumes that the origin of the high microbiological load could be due to the botanical pollen itself, to the environment, to the bee, to the pollen remaining in the pollen trap until it is collected, or to the handling of the product until a preservation method is applied to it.

The third trial addresses other factors that could influence the microbiological contamination of pollen. Specifically, different designs of the pollen traps, different residence times of the pollen in the boxes until collection, or climatic and environmental aspects were evaluated. None of these factors significantly influenced the reduction of the microbiological load.

In the fourth trial, ozonisation of pollen was proposed as a shock method to reduce the microbiological load of bee pollen. For this purpose, the effectiveness of ozonisation and drying treatments, separately and at different times, as well as ozonisation combined with drying, were compared. A combined method with 30 minutes of ozonisation followed by a drying period of 15 minutes was selected. The results showed a reduction of the microbiological load of 2 logarithmic cycles for enterobacteria and mesophilic aerobes and 3 logarithmic cycles for moulds and yeasts. Therefore, through the combined method the initial microbiological load of enterobacteria was reduced from $6.0 \times 10^6 \pm 1.4 \times 10^7$ CFU/g to $1.0 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^4$ CFU/g, from $1.1 \times 10^6 \pm 3.5 \times 10^6$ CFU/g in the initial content of mesophilic aerobic microorganisms to $1.4 \times 10^4 \pm 2.7 \times 10^4$ CFU/g, and from $2.4 \times 10^8 \pm 6.6 \times 10^8$ CFU/g in the initial content of moulds and yeasts to $6.5 \times 10^5 \pm 1.2 \times 10^6$ CFU/g.

Once the optimal shock method to reduce the initial microbiological load had been defined, the possibility of keeping the pollen fresh in refrigeration (4°C) was considered, so the shelf life of pollen treated with this method and kept under refrigerated conditions was evaluated. The results showed that the microbiological values achieved after the initial treatment were maintained for up to three weeks. After this last period, the load of enterobacteria reached values of $3.6 \times 10^4 \pm 6.3 \times 10^4$ CFU/g, for mesophilic aerobic microorganisms the values were $5.9 \times 10^4 \pm 1.3 \times 10^5$ CFU/g, and for yeasts and moulds the microbiological load was $8.4 \times 10^6 \pm 1.9 \times 10^7$ CFU/g. These values increased gradually, although slowly, until the sixth week, with the final load of enterobacteria at $2.4 \times 10^5 \pm 5.9 \times 10^5$ CFU/g, for mesophilic aerobic microorganisms at $9.6 \times 10^4 \pm 1.4 \times 10^5$ CFU/g, and for yeasts and moulds at $1.1 \times 10^7 \pm 2.1 \times 10^7$ CFU/g.

In this study, since ozone causes oxidation, and could affect important bioactive components of pollen, such as flavonoids (caffeic acid, chrysin, kaempferol, luteolin, naringerin, p-coumaric acid, quercetin, rutin), the possible effects of ozone treatment on this group of polyphenols present in the pollen were evaluated. The results show that the ozonisation treatment applied does not reduce the polyphenol content of fresh pollen.

Finally, the results of the sensory analysis reveal, through the descriptive profile, that ozone does not influence the sensory attributes of bee pollen at the dose and exposure time used, compared to the single treatment by hot air drying at 42°C, which does have an influence by modifying these attributes as a function of exposure time.

In conclusion, ozonisation combined with a drying treatment (30 minutes/15 minutes) could increase the shelf life of fresh pollen under refrigeration and reduce the microbiological load prior to frozen storage, guaranteeing the food safety of this product, maintaining its polyphenol content as bioactive components and ensuring the descriptive sensory profile of the fresh pollen.

Keywords: Bee pollen; pollen trap; microbial decontamination; ozone; shelf life; polyphenols; sensory analysis.

Capítulo 1. Introducción

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN.

El término apicultura deriva del latín, y está compuesto por las voces «apis» que quiere decir «abeja» más el sufijo latino «cultūra» que hace referencia a «cultivo», «tratado» o «crianza», pero el término apicultura, tal y como se le conoce en la actualidad, es un neologismo de origen francés. Según la Real Academia Española, la apicultura es la “cría de abejas” o el “conjunto de técnicas y conocimientos relativos a la cría de abejas” (Real Academia Española, s.f. definiciones 1 y 2). El término fue descrito por primera vez en el diccionario francés de Louis-Nicolas Bescherelle, publicado en el año 1845 (Etimologías de Chile, s.f. etimología de apicultura). Esta ciencia no solo se encarga de la cría de las abejas, sino que además se ocupa de estudiarlas, y se encamina a brindar a estos himenópteros los cuidados que se necesitan para obtener cada uno de los productos que las abejas pueden elaborar o incluso recolectar, tales como la miel, la jalea real, el polen, la cera, el propóleos y la apitoxina (veneno). La apicultura es practicada tanto por los apicultores profesionales (orientados a la producción de miel fundamentalmente), como por aficionados (no profesionales), para el autoconsumo básicamente. El sector apícola juega un papel primordial en la economía agraria, reconociendo el beneficio de esta actividad, principalmente por los productos de la colmena (miel, cera, polen, y jalea real), y sobre todo, resulta muy destacable la actividad polinizadora de las abejas, repercutiendo en la conservación de la biodiversidad, en el aumento de la producción de cultivos, y en el control indirecto de plagas, ya que las abejas compiten por el alimento con los insectos fitófagos (Ballesteros& Vásquez, 2007).



Figura 1. Abeja pecoreando flor de *Cistus albidus*. Fuente: el autor.

El polen recolectado por las abejas es la fuente de proteínas para la colmena, lo acopian en grandes cantidades, y lo utilizan en sus funciones nutritivas, como por ejemplo alimentar a las larvas, ya que se necesita entre 125 y 140 miligramos (mg) de polen para criar una larva de obrera. De igual forma, las abejas jóvenes consumen entre 3,4 a 4,3 mg diariamente, y la abeja obrera consume entre 160 a 180 mg de polen durante toda su vida útil (Almagro, s.f. diapositiva 51). La abeja obrera lo consume y utiliza para los procesos de reparación celular y tisular (Bedascarrasbure *et al.*, 2020).

El polen de abeja es uno de los productos que se extraen de la colmena, con un carácter altamente nutritivo. Y aunque las abejas llevan a la colmena parte del polen adherido sobre la superficie del insecto, la mayor parte lo transportan en forma de pellets, que son pequeñas bolas de polen manipulado por las abejas. Cada pellet está compuesto principalmente por polen de origen botánico, néctar y secreciones propias de la abeja. Debido a sus metabolitos naturales activos, tiene amplias propiedades nutricionales y terapéuticas, considerando al polen apícola por parte de algunos autores, como un auténtico tesoro para la nutrición humana (Li *et al.*, 2018). El polen se califica a menudo como "*el mejor producto alimenticio del mundo*" (Bobis *et al.*, 2010). Hay investigadores que han considerado al polen de abeja como el alimento perfecto que nos ofrece la madre naturaleza, al contener casi todos los nutrientes requeridos en la alimentación humana (Campos *et al.*, 2021). Los componentes nutricionales que forman parte del polen de abeja incluyen carbohidratos, proteínas, lípidos, vitaminas, minerales, polifenoles, y un pequeño porcentaje de otros constituyentes (Li *et al.*, 2018).

Actualmente aparece una tendencia en el cambio de los hábitos alimentarios que se manifiesta de forma más destacada en los países desarrollados, donde las personas aspiran a tener una dieta más sana y nutritiva. Estas dietas incluyen productos naturales entre los cuales se encuentran la miel, el polen y la jalea real (Serra-Bonvehí & Jordá-Escolá, 1997; González *et al.*, 2005). En esta situación la creciente importancia del estilo de vida con una mayor conciencia medioambiental y en pro de la salud, hace que se incremente la demanda de alimentos poco procesados de origen natural, que contengan ingredientes bioactivos. Por ello, en las últimas décadas han cobrado especial importancia los productos apícolas, de los cuales el polen de abeja se produce en cantidades relativamente importantes (Kieliszek *et al.*, 2017).

El deseo de utilizar las valiosas propiedades de los productos apícolas contribuye al desarrollo de la apiterapia como un área específica de tratamiento, resultando esta forma de medicina alternativa, y sobre todo en estas tres últimas décadas, objeto de investigaciones científicas documentadas. La ampliación de los conocimientos sobre los productos apícolas y su utilización está asociada a la mejora progresiva de los métodos apícolas, aumentando cada vez más el número de investigadores que dedican su trabajo y esfuerzo a estas cuestiones. El trabajo de estos expertos demuestra cómo los productos apícolas son sustancias naturales, que contienen multicomponentes necesarios para el correcto desarrollo de las reacciones vitales básicas (Bobis *et al.*, 2010).

Todas estas afirmaciones vienen refrendadas en el Informe sobre las Perspectivas y Desafíos del Sector Apícola de la Unión (2017/2115(INI)) de la Comisión de Agricultura y Desarrollo Rural (Parlamento Europeo, 2018). El informe considera que los productos apícolas como el polen, los propóleos, la cera de abeja, el veneno de abeja y la jalea real, contribuyen de manera significativa al bienestar de la población existiendo una demanda al alza de los consumidores que buscan un estilo de vida natural. Estos productos juegan un papel destacado en la industria de la salud y cosmética constituyendo, por tanto, un recurso adicional con el que los apicultores pueden mejorar su situación económica.

Zuluaga (2015a) informa que a nivel mundial no existen cifras consolidadas de producción de polen. Sin embargo, Wu expresa en la Asamblea General de Apimondia celebrada en Estambul en octubre del 2017, que el principal productor de polen a nivel mundial es China, que produce unas 5000 toneladas (t), de las que exporta 2000 t (Stefanov, 2017. 2m48s). La aparición del polen chino en los mercados hace pocos años, tuvo escasos resultados debido a su sabor poco apetitoso y a su precario procesamiento (Laverde *et al.*, 2010).

El desarrollo de la producción de polen a escala industrial es reciente (Campos *et al.*, 2021). En Europa, el principal productor y exportador es España, con una producción de entre 1000 t y 1500 t, según los años, procedente de floraciones silvestres de jaras y matas (*Cistus* y *Helianthemum*), además de encinas (*Quercus ilex*). El polen español es mundialmente reconocido por sus valores gustativos entre otros atributos, y es muy difícil la competencia por parte del polen procedente de otros países con el polen de origen español (Pajuelo Consultores Apícolas, s.f.).

Se espera que el mercado de exportaciones a nivel mundial para el polen de abeja crezca a una tasa compuesta anual de aproximadamente un 5,6% en el periodo de 2022-2027 (Delmarva's News Leader, 21 de junio 2021). El consumo de este producto está impulsado por una demanda constante de artículos naturales caracterizados por sus propiedades saludables o terapéuticas (Barreto *et al.*, 2005). Además, esta promoción va ligada a una creciente preocupación por la calidad sanitaria de los alimentos. Los apicultores deben vigilar constantemente determinadas etapas de la cadena apícola y aplicar buenas prácticas de producción y elaboración para satisfacer la demanda de polen de abejas y prevenir los efectos perjudiciales para la salud de los consumidores (de Melo *et al.*, 2015).

Una cuestión importante relativa al criterio de calidad del polen es su pureza y seguridad microbiológica. Desde el punto de vista higiénico, la seguridad microbiológica es el principal criterio de calidad. Es importante controlar la calidad microbiológica del polen, especialmente la ausencia de gérmenes y hongos patógenos (Bogdanov, 2016). Cabe destacar que el deterioro de la calidad del producto puede ser resultado de la negligencia de los apicultores en cuanto a las normas de higiene y la manipulación inadecuada del producto en las primeras etapas de la producción. Esas actividades pueden hacer que el producto se vuelva perjudicial para la salud (Deveza *et al.*, 2015). Debido a su origen geográfico y floral, durante la producción y comercialización, el polen se encuentra expuesto a la contaminación por microorganismos, incluyendo patógenos (Hong-Sun *et al.*, 1998; Goulson & Hughes, 2015; Graystock *et al.*, 2016), que pueden afectar su calidad sanitaria y transmitir enfermedades (Graystock *et al.*, 2013).

Dado que el polen se consume de manera directa y generalmente no recibe tratamiento que disminuya su carga microbiana previamente a su consumo, es indispensable mantener un control y vigilancia por parte de las autoridades sanitarias, apicultores y comerciantes para reducir las fuentes de contaminación. No obstante, es difícil que el producto se encuentre libre de microorganismos (Pridal *et al.*, 1997). Desde su cosecha y antes de su comercialización el alimento debe ser sometido a análisis microbiológicos para garantizar una calidad sanitaria adecuada y proteger de enfermedades al consumidor (Álvarez & Campos, 2017).

Las propiedades nutritivas y terapéuticas del polen le permiten ser un suplemento alimenticio de alto valor, sin embargo, poco se conoce acerca de su inocuidad (Álvarez & Campos, 2017). Ésta es una propiedad que involucra la

ausencia de agentes nocivos para la salud en el alimento, los cuales pueden ser físicos como la presencia de alambres, uñas, patas de insectos, cabellos, fragmentos de vidrio, etc., que pueden causar atragantamiento, obstrucción en vías respiratorias o daño en dientes, tráquea u otra área de contacto con el cuerpo; compuestos químicos como los plaguicidas, entre los que se incluyen acaricidas, ácidos orgánicos, insecticidas, fungicidas, herbicidas y bactericidas. Se han encontrado 150 plaguicidas diferentes en colmenas (Mullin *et al.*, 2010).

Los peligros biológicos son de gran importancia. La presencia de microorganismos en el polen puede influir en la calidad y la seguridad alimentaria. Se encuentran presentes bacterias, virus, protozoos, hongos y levaduras (García-García *et al.*, 2006; Belhadj *et al.*, 2014; Graystock *et al.*, 2016) que provienen de las abejas recolectoras, de la miel, del néctar o de fuentes externas. El aparato digestivo de las abejas, la manipulación humana, los equipos y recipientes, el aire y la tierra son las principales fuentes de contaminación microbiana. Si la recolección, el almacenamiento y la comercialización no son apropiados, el desarrollo de bacterias y hongos con potencial patógeno o de deterioro es posible (González *et al.*, 2005). Existe en el polen la presencia de microorganismos oportunistas (Tabla 1) que son causantes de infecciones nosocomiales (Álvarez & Campos, 2017).

Tabla 1. Principales bacterias presentes en el polen. Elaboración propia a partir de Álvarez & Campos, 2017.

Grupo bacteriano	Características	Referencias
<i>Arthrobacter</i> sp	Especies oportunistas	García-García <i>et al.</i> (2006)
<i>Bacillus</i>	Ambiental, esporulado	Foot, (1957); Haydak, (1958)
<i>Citrobacter diversus</i>	Coliforme oportunista	Belhadj <i>et al.</i> (2014)
<i>Clostridium</i> sp	Especies patógenas	Serra & Escolà, (1997)
<i>Enterobacter cloacae</i>	Coliforme oportunista	García-García <i>et al.</i> (2006)

<i>Escherichia coli</i>	Coliforme	Serra-Bonheví & Jordá-Escolá (1997)
<i>Klebsiella</i>	Coliforme, especies oportunistas	García-García et al. (2006)
<i>Listeria sp</i>	Especie patógena	Brindza et al.(2010)
<i>Micrococcus sp</i>	Piel y suelo, oportunista	García-García et al.(2006)
<i>Proteus mirabilis</i>	Patógeno oportunista	Belhadj et al. (2014)
<i>Pseudomona ssp</i>	Especies oportunistas deterioradoras de alimentos	García-García et al.(2006)
<i>Salmonella sp</i>	Salmonelosis	Serra &Escolà, (1997)

Para tener una regulación sanitaria y protección del consumidor es necesario el establecimiento de criterios microbiológicos en los alimentos, los cuales son una evidencia del cumplimiento de las disposiciones sanitarias que deben ser efectuadas (Fernández-Escartín, 2008). En un análisis de mercado del polen una de las amenazas principales es la falta de estándares de calidad (Almagro, s.f. diapositiva 40).

A raíz del interés que despierta este producto con nuevas revelaciones sobre sus propiedades nutricionales y terapéuticas, se han elaborado algunas normativas individuales en muchos países, especialmente en lo que respecta al uso del polen apícola. Por ejemplo, Argentina (Artículo 785 - Res 1550, 12.12.90), Brasil (Legislación: Instrução Normativa n.3, de 19 de enero de 2001), China (Legislación: NY 5137-2002 y GB/T 19330-2008), Suiza (Legislación: Manual Suizo de Alimentación: PollenBienenprodukte, BAG Oficina Federal de Salud Pública de Suiza) se encuentran entre los países con altos índices de producción de polen y en los que se han elaborado

reglamentos al respecto, y regulaciones relacionadas con el producto (Ghosh& Jung, 2017).

Otros países europeos, como Bulgaria, o Polonia (Legislación: PN-R-78893 "Obnozapyłkowe" -Legislación polínica de las abejas), también han implementado regulaciones oficiales (Shahali, 2015; Thakur & Nanda, 2020). Así mismo, hay países del continente americano que poseen una normativa específica para el polen apícola, como por ejemplo Cuba, Uruguay y El Salvador. Sin embargo, no existe un acuerdo internacional específico sobre las normas relativas a la calidad de los productos apícolas (de Melo *et al.*, 2015).

Tabla 2. Países con reglamentación respecto al polen. Elaboración del autor a partir de Campos & Anjós (2015). Diapositiva 58.

País	Reglamentación
Argentina	Argentina artículos 782, 784, 785
Armenia	Badalyan
Bulgaria	Ivanov
Brasil	Brasil 200, 2001
Cuba	Cuba-nrag 16 18
Polonia	Szczesna
Rusia	Elena
Suiza	Conf. Suisse DFI 17.022.108
Turquía	Sorkun
Uruguay	Decreto 105 001

Para aprovechar las propiedades dietéticas y terapéuticas beneficiosas del polen, su calidad debe ser controlada y respetada rigurosamente (Estevinho *et al.*, 2011). En la actualidad no existe ningún documento normativo europeo para los productos apícolas, aparte de la miel. El Comité

Técnico de Productos Alimenticios de la Organización Internacional de Normalización estableció un subcomité sobre productos apícolas, el ISO/TC34/SC19 bajo cuya responsabilidad directa se ha empezado a normalizar el producto a través de la norma ISO/CD 24382, que en la actualidad se encuentra en estado de desarrollo (*International Organization for Standardization, s.f.*). En este momento, debido a la falta de normativa, el polen de abeja se caracteriza por la heterogeneidad de sus propiedades nutricionales, y los posibles riesgos para la salud alimentaria (*Végh et al., 2021*).

Campos et al. (2016) afirmaron que el Grupo de Trabajo sobre el polen de abeja de la Comisión Internacional de la Miel, estaba finalizando una propuesta de “Métodos estándar para el análisis del polen” que hoy ya es una realidad. En esta última publicación *Campos et al. (2021)*, afirman que “existe la necesidad de una directiva internacional para el control de calidad del polen” y “proponen metodologías optimizadas basadas en las principales habilidades desarrolladas en el campo, que se pueden utilizar en un futuro cercano para llenar ese vacío”.

Diversas organizaciones internacionales, como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) y la Organización Mundial del Comercio (OMC), se encargan de establecer normas de calidad e inocuidad de los alimentos; sin embargo, hasta la fecha estos organismos tampoco han diseñado normas mundiales armonizadas sobre la inocuidad del polen de abeja. Existe una necesidad urgente de revisar las directrices sobre el polen de abeja mediante la evaluación de la fuente botánica, los límites máximos de residuos (LMR) de metales pesados y plaguicidas, la carga microbiana y las técnicas de procesamiento antes de introducir el polen de abeja en el mercado. Además, el etiquetado del polen de abeja y de cualquier alimento que contenga polen de abeja debería incluir las declaraciones de riesgo alergénico para evitar los riesgos para las personas alérgicas (*Takhur & Nanda, 2020*).

Diversos autores describen la composición química del polen corbicular de diferentes orígenes tanto botánico como geográfico (*Pidek, 2004; Almeida-Muradian et al., 2005*). Sin embargo, se ha dedicado poca atención a la contaminación microbiológica del polen apícola, y a los riesgos que desde el punto de vista microbiano están relacionados con su consumo

(Delaplane *et al.*, 2013; Nardoni *et al.*, 2016). Los estudios realizados respecto de la microbiología del polen son limitados.

Las investigaciones existentes de otros países incluyen bacterias de los géneros *Clostridium*, *Listeria*, *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* (García-García *et al.*, 2006; Belhadj *et al.*, 2014) reconocidos patógenos para humanos y hongos con capacidad toxigénica como *Aspergillus*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Mucor* (González *et al.*, 2005; Belhadj *et al.*, 2014). Adicionalmente la EFSA (European Food Safety Authority) publicó un informe científico sobre la evaluación del riesgo de múltiples factores de estrés en las abejas, incluyendo entre los factores estresantes la contaminación microbiana del pan de abeja (European Food Safety Authority, 2014).

Debido al importante impacto que el polen de abeja está ganando en el campo de la nutrición humana, una evaluación de los aspectos microbiológicos, así como el establecimiento de pautas para una futura norma microbiológica es de vital importancia para garantizar la seguridad del producto.

El polen de abeja se comercializa y se consume después de ser secado para garantizar la estabilidad y la seguridad a largo plazo. Sin embargo, los tratamientos de secado, en especial si se lleva a cabo a temperaturas superiores a 40 °C o 50 °C podría afectar las características organolépticas del polen, y el contenido tanto de flavonoides como de polifenoles (Collin *et al.*, 1995; Canale *et al.*, 2016). Es necesario investigar los posibles peligros microbiológicos vehiculados por el polen de abeja, que es el primer paso de una evaluación integral del riesgo para este producto alimenticio no convencional (Mauriello *et al.*, 2017).

Capítulo 2. Antecedentes

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1. Historia del Polen Apícola

La historia de los productos de la colmena está enmarcada dentro del comienzo de la actividad apícola como actividad recolectora por parte del hombre (Kieliszek *et al.*, 2017). Los primeros agricultores y ganaderos del Neolítico ya utilizaban la cera de las abejas para fabricar cosméticos, medicinas, impermeabilizar recipientes e incluso como aglutinante en flechas. Se han identificado elementos de cera y miel en restos arqueológicos de más de 9000 años en Turquía, y se cree que desde la península de Anatolia, la apicultura se fue extendiendo a Europa, Oriente Próximo, y el norte de África (Sáenz, 2015). Los primeros indicios que demuestran el uso de productos apícolas por parte de los humanos proceden de las pinturas rupestres del levante español (Kieliszek *et al.*, 2017). En el año 2021 se descubre en Castellote, provincia de Teruel (España), una pintura rupestre de una recolección de miel de hace 7.500 años. Este descubrimiento constituye hasta ahora la pintura rupestre más clara y elaborada, representando la mejor escena de recolección de miel de cuantas se han encontrado en el arte prehistórico levantino. Esta pintura muestra a una figura de persona subida a una escalera para obtener la miel de una colmena (Diario de Teruel, 2021).



Figura 2. Humano recolectando miel. Castellote. Teruel. Fuente: <https://www.lacomarca.net/descubierta-abrigo-castellote-mejor-representacion-recolectores-miel-arte-levantino/>

Otras pinturas rupestres descubiertas en los años 20 del siglo pasado son las de la Cueva de la Araña, en la provincia de Valencia. La pintura muestra a una figura humana de un recolector-cazador, que introduce su mano en una colonia silvestre, tomando la miel de abejas salvajes. La pintura

es datada entre los años 8000-5000 a.C., es decir, al final de la Edad de Piedra (Edad Neolítica) (Nayik *et al.*, 2014). En la actualidad, en algunas zonas del planeta persisten pueblos indígenas que todavía se ocupan de la búsqueda de nidos de abejas que viven en la naturaleza para obtener sus productos (Kieliszek *et al.*, 2017).

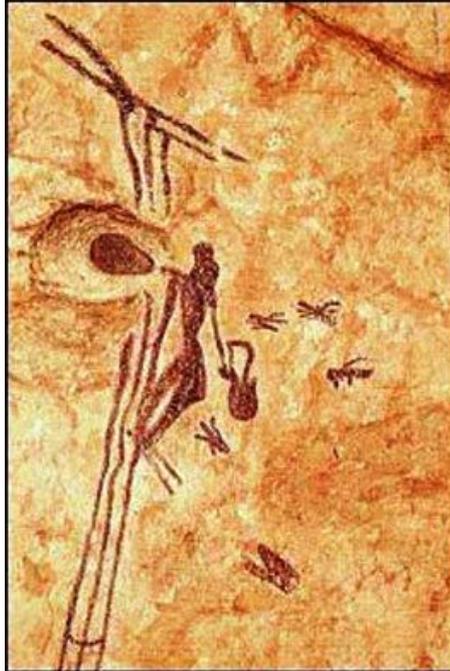


Figura 3. Figura humana recolectando miel. Cueva de la Araña. Fuente: <https://www.auladehistoria.org>

Según la mitología del antiguo Egipto, las abejas nacieron de las lágrimas del dios del sol Ra, que al caer al suelo se transformaron en abejas, que luego construyeron panales y fabricaron miel (Pérez, 2019). Son muy pocos los textos del antiguo Egipto donde se hace referencia a las abejas, que corroboran la anterior afirmación. Únicamente en el Papiro Salt 825 se reseña su origen: *“Ra lloró de nuevo. El agua de su ojo cayó en el suelo y se convirtió en una abeja. Cuando la abeja había sido creada, su tarea fue las flores de cada planta. Así es como la cera llegó a ser y como la miel llegó a ser de sus lágrimas”* (Montes, 2014).

Los antiguos egipcios consideraban la miel como un alimento que se reservaba a los faraones y personajes importantes del imperio, llegando la apicultura a ser una ciencia sacerdotal (Rodríguez, 2010). Así mismo, ya describían al polen como *“el polvo que da la vida”* (Bogdanov, 2016).



(4)



(5)

Figuras 4 y 5. Abejas en relieve talladas en las columnas del Templo de Karnak. Tebas. Egipto. Fuente: el autor.

El consumo y la producción de semillas de plantas y de polen, son ya alabados en las Sagradas Escrituras, donde en el primer libro del Pentateuco, en *Génesis 1:29*, podemos leer: *“Y dijo Dios: He aquí que os he dado toda planta que da semilla, que está sobre toda la tierra, y todo árbol en que hay fruto y que da semilla; os serán para comer”*.

En la antigua Grecia los gránulos de polen que lleva la abeja adheridos a sus patas, se consideraron estaban hechos de cera ([MARNYS[®], 2021](#)). El mismo [Aristóteles](#) (384 a. C- 322 a. C) en su obra *“Investigación sobre los Animales”* señala lo siguiente: *“La abeja lleva la cera y el alimento de abejas alrededor de sus patas, y la miel la vomita en los alveolos”*. Y *“Pero hay también otro alimento que algunos llaman cerinto: es una sustancia de calidad inferior a la miel y cuyo gusto azucarado recuerda al higo. La transportan en sus patas, como hacen con la cera”*. Observa Aristóteles, que se asemejan las bolas de polen a la cera en la dureza, pero en realidad son pelotitas de polen corbicular.

En la antigua república romana, previa al periodo imperial, el poeta [Virgilio](#) (S.I. a.C) en sus famosas *“Geórgicas”*, relataba así la función de la abeja con el polen: *“A las más viejas corresponde el cuidado de las colmenas, construir los panales y fabricar las artísticas celdillas; las más jóvenes se recogen fatigadas, entrada ya la noche, con las patas cargadas de tomillo: indistintamente pacen los madroños y los glaucos sauces y la casia y el rojo azafrán y el frondoso tilo y los oscuros jacintos. Para todas a la vez el descanso de las tareas y para todas a la vez el trabajo”*. Virgilio también recoge la idea de Aristóteles, *“de colocar a las abejas por encima de los hombres de los*

tiempos primitivos por que la Gran Ley Natural alcanzaba en ellas una expresión más perfecta y sólida que entre los humanos". Ya en el periodo imperial, Plinio el Viejo (S. I d.C.) en su obra "Naturalis Historia" recoge la siguiente semblanza evocadora, que nos lleva a reflexionar sobre la idea que se tenía en el mundo antiguo acerca de las abejas: "Pero entre todos los insectos el primer puesto es para las abejas y también, con todo derecho, nuestra mayor admiración pues son los únicos de esta clase de animales creados para el bien del hombre. Recogen la miel, jugo dulcísimo y finísimo y muy saludable además, fabrican panales y cera, de múltiples usos en la vida, soportan la fatiga, realizan obras, tienen un estado, capacidad de decisión individual y jefes comunes, y lo que es más admirable tienen costumbres al margen de los demás animales, pues no son ni una especie doméstica ni salvaje"

Si bien Hipócrates y Pitágoras entre otros autores clásicos, creían que el polen tenía un efecto terapéutico, las primeras referencias escritas (en cuanto a la aplicación terapéutica del polen) se registran en los libros de médicos musulmanes y judíos de la España islámica de los siglos XII y XIII, aunque se presume que el polen al que se refiere en estos escritos puede no haber sido el recolectado por las abejas. Moisés ben Maimón, más conocido como Maimónides (1135-1204) recomienda su uso como tónico astringente y sedante. A principios de 1200, Ibn al-Baitar, describió al polen como alimento afrodisiaco, también beneficioso para el estómago, devolviendo el ardor de la sangre y la curación de inflamaciones producidas por comer ciertos alimentos (Bogdanov, 2016).

Se empezó a utilizar el sustantivo "polen" (del lat. cient. *pollen*, y este del lat. *pollen*, -inis "flor de harina") por primera vez por John Ray en su obra "*Historia plantarum*" (1686). Los primeros trabajos sobre el mecanismo de búsqueda de alimento y sobre la elaboración del pellet de polen se llevaron a cabo por Meehan en 1873 (Bogdanov, 2016).

El polen comenzó a utilizarse a gran escala para el consumo humano sólo después de la Segunda Guerra Mundial, cuando se mejoraron los dispositivos recolectores del polen en la colmena (trampas cazapolen), y este producto se hizo más accesible (Campos *et al.*, 2010).

Este alimento empezó a adquirir fama a raíz de la utilización del mismo por deportistas de élite. Desde hace años se viene utilizando para incrementar el rendimiento de deportistas, en especial, los de alta competición. Existen numerosos casos que avalan la bondad del producto.

Quizás la primera noticia que trascendió de las bondades del polen corbicular a nivel deportivo, fue en los Juegos Olímpicos de Munich en 1972. Se dio la circunstancia, de que los atletas finlandeses lo tomaban por consejo de su equipo deportivo y médico. Estas olimpiadas se recuerdan por el acopio de medallas que obtuvieron estos atletas (Bueno, s.f.).

2.2. La Abeja

Las abejas son insectos originarios de un grupo de avispas depredadoras relacionadas con la superfamilia *Sphecoidea* que alteraron su dieta, dejando de utilizar insectos y ácaros, para hacer uso del néctar y del polen, como fuentes de nutrientes. Esto provocó la modificación de sus características anatómicas y fisiológicas a lo largo de los años, para adaptarse al nuevo hábito alimenticio. Durante este proceso evolutivo surgieron varias especies de abejas, conociéndose en la actualidad unas 20.000 especies, aunque se cree que existen muchísimas más aún por descubrir. Únicamente un 2% de las especies son sociales, y producen miel. Entre las especies productoras de miel destaca el género *Apis* entre las más conocidas y difundidas (Sousa, 2007).



Figura 6. Abeja masticando polen de jara blanca. Fuente: el autor.

De los millones de insectos existentes en el mundo, las abejas están entre los más estudiados. El conocimiento de su morfología funcional, y de su fisiología sensorial, ha ocupado las investigaciones de generaciones de biólogos durante el siglo pasado y el actual (Allevato, 2005). La abeja occidental *Apis mellifera* o productora de miel, es originaria de Europa, y fue llevada al continente americano por los colonizadores europeos (Guzmán *et al.*, 2011). Es la principal especie polinizadora para aumentar la productividad

de los cultivos (Rubiano, 2016). Las abejas europeas han sido seleccionadas por los apicultores por su marcado comportamiento de almacenamiento y producción de miel, su docilidad y su tendencia reducida a producir enjambres (Roblero, 2013).

Tabla 3. Descripción taxonómica de la abeja. Fuente: Sousa 2007.

Taxonomía	
Reino	Animal
Filum	Arthropoda
Clase	Insecta
Orden	Himenoptera
Suborden	Aprocrita
Superfamilia	Apoidea
Familia	Apidae
Género	Apis
Especie	Mellifera

En una colonia de abejas podemos encontrar una jerarquía bien diferenciada (Quero, 2004). Todo enjambre está constituido por tres tipos de individuos o castas (Cepero, 2016), que no sólo se diferencian entre sí por su morfología o fisiología, sino también por su papel biológico en la colmena (Zarco, 2014). Podemos definir una casta, como “cualquier grupo de individuos en una colonia dada que es tanto morfológicamente diferente como especializado en su conducta” (Hölldobler & Wilson, 1990). Las castas tienen una población cuya cantidad fluctúa dependiendo de las condiciones de alimentación disponible (Duttman *et al.*, 2013).

La **abeja reina**, es la única hembra fértil y fecunda, y por esta condición se convierte en el centro y vida de la colmena (Ruiz, 2003). Se distingue del resto de castas de la colmena por su longitud, que es de 16 milímetros (mm) aproximadamente, y por las alas, que a pesar de ser del mismo tamaño que las de una obrera, se ven cortas en relación al cuerpo (Lara, 2019).

Posee aguijón, pero sólo lo utiliza para la lucha con otras reinas. En el momento de su surgimiento como adulta, la reina elimina a las demás larvas reales, y en caso de surgir dos reinas en el mismo instante, se desarrolla un combate a muerte, en donde la vencedora se convierte en la única reina (Herrero, 2004).

La función biológica de la abeja reina en la colmena es la reproducción y cohesión del enjambre, controlando a la población a través de las feromonas, que también son utilizadas para la inhibición de la fertilidad de las obreras (Duttmann *et al.*, 2013).

Las **abejas obreras** son el elemento productor y directivo del enjambre, y constituyen casi la totalidad de la población de la colmena, siendo responsables de la mayoría de las funciones (Rubiano, 2016). Se les denomina obreras, ya que realizan el trabajo, producen miel y cera, fabrican panales, colectan polen, limpian la colmena, mantienen el orden. Son infecundas, y las más pequeñas del enjambre (Rodríguez, 2012). Estas cumplen diferentes tareas, en función de la edad (Sánchez, 2016). Las nodrizas alimentan a las larvas de la colmena, y las aseadoras limpian la colmena, sacan las larvas y abejas muertas, eliminando suciedad y cualquier cuerpo extraño. Las ventiladoras, se ocupan de ventilar la colmena manteniendo estables la temperatura y la humedad interna. Las crías, para desarrollarse necesitan entre 34 °C y 36 °C y una humedad entre el 65% al 75%. La cera, es producida por el cuerpo de las abejas (Lara, 2019). Otras funciones de las obreras son las de guardianas, pecoreadoras, y exploradoras. Las guardianas protegen la colmena, y es una etapa previa al pecoreo, siendo su función evitar la entrada de abejas de otras colmenas, insectos y animales ajenos a la colmena. Las pecoreadoras, son las encargadas de salir de la colmena a colectar polen, néctar, agua y propóleos. El polen y el propóleos, es transportado en las patas traseras, y el néctar lo llevan en el buche. Y finalmente las exploradoras, buscan fuentes de alimento, y nuevas ubicaciones donde vivir. Son las más viejas de la colmena. Cuando encuentran alimento, agua o nueva morada, regresan a la colmena y avisan a sus semejantes por medio de danzas (Lara, 2019).

Los zánganos son machos que nacen de un huevo no fecundado. Cumplen la función de fecundar a la reina (Herrero, 2004). Su vida es corta, necesitando de las obreras para su alimentación, además también dependen del clima y la calidad del alimento para su desarrollo (Duttmann *et al.*, 2013). Viven aproximadamente tres meses, pero cuando la colonia no dispone de un suministro adecuado de alimento, se les expulsa de la colmena. Incluso las obreras van atrás ellos, realizando una matanza masiva de zánganos, para economizar reservas (Duttmann *et al.*, 2013). La morfología externa e interna de la abeja melífera, se corresponde de forma general con la de los demás insectos, existiendo diferencias que mejoran la comprensión de su etología

(Ruppert & Barnes, 2000). Entre las tres castas existen diferencias morfológicas (Figura 7).

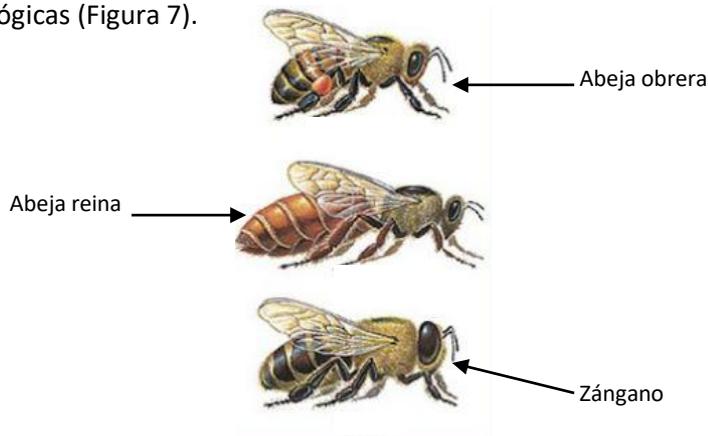


Figura 7. Clasificación jerárquica y distinción morfológica de la abeja según la casta. Fuente: Manzano, 2014

La más pequeña es la obrera. Los zánganos son más globosos y con mayor tamaño en su abdomen y ojos, y la reina tiene un abdomen alargado debido al desarrollo de su aparato reproductor (Rubiano, 2016). El cuerpo de la abeja se divide en tres tagmas: cabeza, tórax y abdomen. El exoesqueleto es de quitina, que estabiliza, protege las tres grandes partes en el que se divide su cuerpo (Rubiano, 2016). La cabeza es una caja quitinosa, de forma de triángulo invertido, albergando los órganos de la visión, las antenas y el aparato bucal (Llorente, 2008). Los ojos compuestos son prominentes y están formados por numerosas facetas hexagonales, y cada una de ellos por miles de ojos simples (Padilla *et al.*, 2007). El aparato bucal de la abeja es la estructura anatómica más importante a la hora de formar el pellet de polen (Figura 8). Es de tipo lamedor. Se compone del labio superior o labro, la epifaringe, oculta por el labro, y un par de mandíbulas. Las mandíbulas de la obrera son anchas en sus extremos, con forma de cuchara, y estrechas en el medio (Corona, 2016).

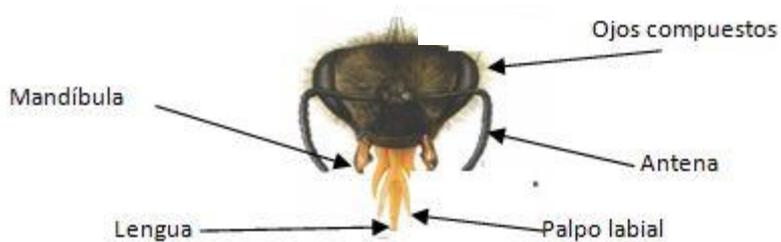


Figura 8. Morfología general de la cabeza. Fuente: Lara (2019).

La estructura anatómica de mayor interés desde el punto de vista de transporte del pellet de polen a la colmena, es el tercer par de patas (Figura 9). Son las más grandes y se encuentran situadas en el metatórax (Llorente, 2008). Estas patas tienen unos dispositivos para almacenar el propóleo y el polen, llamados corbículas o cestillos, que se encuentran en la parte exterior de la tibia (Vásquez *et al.*, 2012). Estos cestillos tienen unos pelos curvados y fuertes, que permiten a la abeja retener el propóleos o el polen recogidos de los brotes o flores de plantas que visitan las abejas (Lesur, 2012).

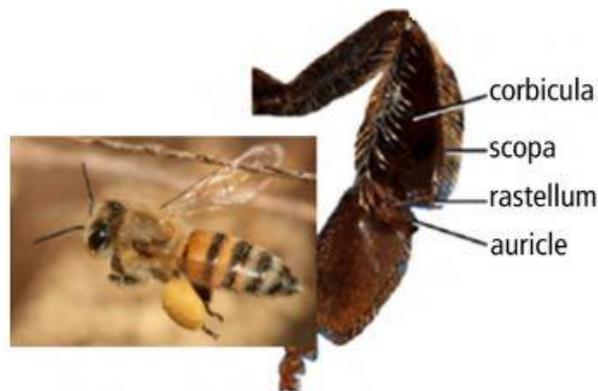


Figura 9. Imagen de la corbícula de la abeja. Fuente: Bedascarrasbure *et al.* (2020).

Los cestillos del polen únicamente los poseen las abejas obreras. La reina y los zánganos carecen de ellos, ya que no los necesitan. En el tercer par de patas, aparece otro dispositivo, que se emplea a modo de pinza que recoge las laminillas de cera que se elaboran en las glándulas cereras. Estas laminillas pasan posteriormente a las mandíbulas para su amasado, y posterior construcción de los panales (Lara, 2019).

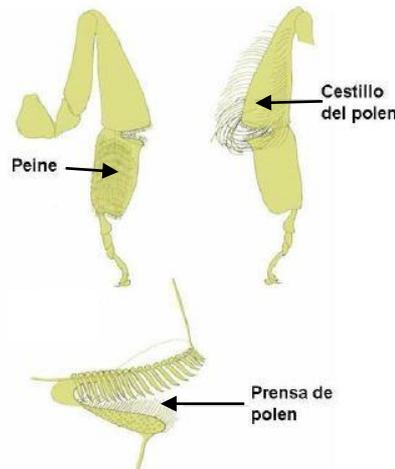


Figura 10. Morfología del tercer par de patas. Fuente: Llorente (2008).

2.3. Definición de Polen Botánico

El polen como término botánico proviene del latín "pollen-inis" que significa "polvo muy fino" y fue un término utilizado por Linneo e incorporado al castellano por Cavanilles (Sáenz, 1978). Básicamente, en la planta, el polen es la estructura microscópica granular, que se encuentra en la antera del estambre en las angiospermas (Steven, 2014).

Estos granos se forman en el interior de los estambres (Figura 11), en unos recipientes denominados sacos polínicos y cuando llegan a su maduración son liberados (Besora, s.f.). Son las células reproductivas masculinas de las plantas (Schmidt *et al.*, 1992; Krell, 1996).

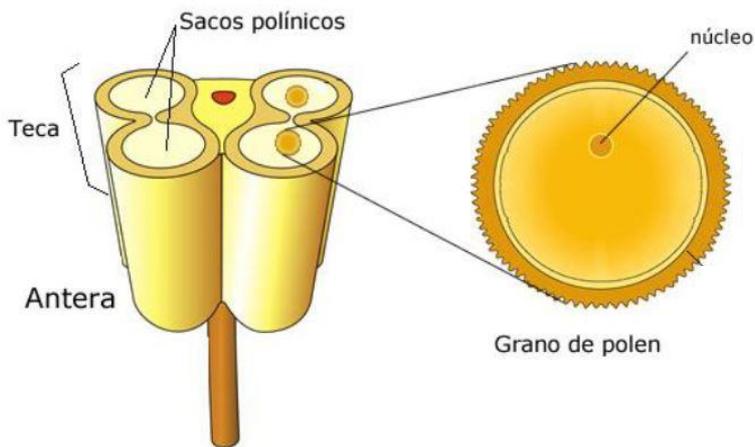


Figura 11. Esquema del estambre y del polen. Fuente: Besora s.f.

2.3.1. Características Estructurales del Polen Botánico

Cada estructura granular (Figura 12) posee dos núcleos, uno vegetativo, que va a originar el tubo de fertilización y otro con una célula generativa (Fuenmayor, 2009). Estructuralmente la pared del polen está dividida en capas: la intina es una capa porosa compuesta principalmente por celulosa, hemicelulosa y pectinas (Kovacik *et al.*, 2009) con espesor entre 0,5-1,2 micrómetros (μm) (Özler *et al.*, 2011) y desde el punto de vista estructura es similar a la pared celular de una planta (Blackmore *et al.*, 2007). Y la capa externa conocida como exina es muy flexible, elástica, fuerte y firme, está hecha de esporopolenina un compuesto que proporciona resistencia química al polen y preserva los compuestos que están dentro de gránulo (Rowley *et al.*, 1999; Rowley & Skvarla, 2000).

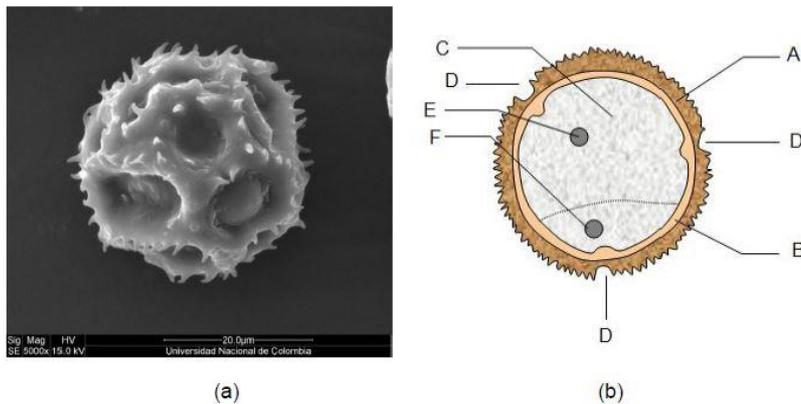


Figura 12. Distintas representaciones de un grano de polen. *Nota:* (a) Imagen por microscopía electrónica de barrido de un grano de polen donde se hace visible la exina. (b) Estructura del polen. (A) exina; (B) intina; (C) citoplasma; (D) aperturas; (E) núcleo vegetativo; (F) núcleo de la célula vegetativa. Fuente: Zuluaga (2015a).

A su vez, la exina está subdividida en una capa externa llamada sexina y una interna conocida como nexina, ambas compuestas principalmente por esporopolenina y otros componentes hasta ahora desconocidos (Scott & Stead, 1994; Suzuki *et al.*, 2008). Tanto la intina como la exina protegen el interior del grano de la oxidación, daños por radiación y degradación química producida por exposición a luz UV, entre otros (Atkinet *al.*, 2011; del Risco *et al.*, 2012). Se sabe que la exina es rica en compuestos antioxidantes, mientras que en la intina están los demás compuestos nutricionales y bioactivos (Wakil *et al.*, 2010).

2.4. Definición del Pellet de Polen Apícola o Corbicular

Al no disponer de definiciones legales en España, tomaremos de algunos autores el concepto de este producto comercial apícola. Según Peris (1984) *"el polen apícola es el resultado de la aglutinación del polen de las flores efectuado por las abejas pecoreadoras mediante néctar y sus propias sustancias salivares, que el hombre utiliza tras su recolección en las trampas cazapolen y subsiguiente elaboración (deseccación, limpieza y envasado)"*. Se diferencia el polen apícola del polen floral, en que éste último es el recogido a mano directamente de la planta.

A las abejas pecoreadoras, durante sus visitas a las flores, se les adhieren cientos o miles de granos de polen utilizando un débil campo

electrostático generado entre la flor (con carga negativa) y el cuerpo de la abeja (con carga positiva) (Clarke *et al.*, 2017).



Figura 13. Abeja con polen adherido a su cuerpo. Fuente: Bogdanov (2016).

La abeja pecoreadora humedece sus patas delanteras con su larga lengua, mastica el polen adicionando secreciones digestivas propias, y cepilla el polen que ha recolectado en su cabeza, cuerpo, y en su primer y segundo par de patas, transfiriéndolo al último par de patas. Primero pasa el polen a los peines de las patas posteriores, lo cepilla y comprime y traslada a la superficie externa de la tibia que en la mayoría de las otras abejas presenta escopa o cepillo de polen), el polen es depositado en una concavidad pulida, rodeada de formaciones pilosas, que es la corbícula o canasta de polen (Diaz-Moreno *et al.*, 2009; Mărgăoan *et al.*, 2010).



Figura 14. Distintos planos del pellet de polen en las corbículas. Fuente: https://www.ecured.cu/Corb%C3%ADcula_o_cesto_de_polen

La abeja utiliza néctar, miel y secreciones de sus glándulas hipofaríngeas para humedecer el polen seco, mejorando su adhesión (Hodges, 1952). Esta secreción contiene diferentes enzimas, por ejemplo, β -glucosidasa,

amilasa y catalasa. Una carga de polen contiene hasta un 10% de néctar, que es necesario para facilitar el empaquetamiento (Bogdanov, 2016). Las dimensiones de un gránulo o pellet de polen oscilan entre 1 y 4,4 milímetros (mm), es decir, característicamente distinto del polen aéreo (Saavedra *et al.*, 2013). Así, las abejas transportan el polen en forma de pellets alojándolo en la cesta de polen y lo almacenan dentro de los alveolos para su posterior consumo satisfaciendo con el polen las necesidades de proteínas de la colonia (Di Pasquale *et al.*, 2013).



Figura 15. Abeja obrera transportando polen en sus patas. Fuente: <https://m.facebook.com/mielesyabejas/photos>

La importancia del polen para las abejas radica en que es su única fuente de proteínas, grasas, vitaminas y minerales y es su principal alimento durante su fase larval (Seeley, 2006). La producción de polen de las plantas tiene una especial relevancia para la productividad de las colonias de abejas, ya que con el polen preparan estos insectos una especie de papilla (papilla vasta o sustancia blanca) en cuya composición también participan la miel, el néctar, agua y la saliva de las propias abejas. Esta sustancia blanca sirve de alimento a las larvas, durante los tres últimos días de vida larvaria, hasta el momento de la operculación de la celdilla, paso previo al inicio de la metamorfosis. El polen también servirá de alimento para las abejas jóvenes. (Martínez & Cobo, 1988).



Figura 16. Alimentación de larvas por abejas nodrizas. Fuente: <https://agrolink.com.ar>

Son sólo las jóvenes, las denominadas nodrizas, las que producen por medio de sus glándulas la jalea real durante los diez primeros días de vida para alimentar a las larvas. El polen que consumen las nodrizas es el ensilado (pan de abeja). Si el suministro de polen es deficitario, o si falla, dejan de producir jalea real (Martínez & Cobo, 1988).

Los efectos de la escasez de polen se manifiestan tanto a nivel individual, como colectivo. A nivel individual los individuos aparecen de menor tamaño, con carencias en su desarrollo morfológico, con una menor esperanza de vida, y con un aumento en la susceptibilidad a las enfermedades. A nivel colectivo existe un debilitamiento general de la colmena, una disminución en la puesta de huevos por parte de la reina, y como consecuencia una disminución poblacional, una falta de renovación generacional, y pueden aparecer problemas de canibalismo. Se estima que el periodo de recuperación de una colmena con déficit de polen se establece entre las 2 y las 12 semanas (Almagro, s.f. Dispositiva 52).

Y es en ciertos periodos del año, fundamentalmente en primavera (cuando la oferta polinífera es más abundante y variada), la estación del año ideal en la que se pueden obtener cantidades considerables de polen como producto comercial (Martínez & Cobo, 1988).

Este producto es originalmente cosechado por las abejas obreras como parte natural de su alimentación. Los apicultores recolectan una porción del polen que las abejas traen a la colmena, que posteriormente es secado y comercializado para el consumo humano (Block *et al.*, 1994).

2.5. Procedimiento de Recolección del Polen Apícola. La Trampa Cazapolen

El polen es un elemento fundamental para la alimentación de las abejas. A tenor de esta consideración, adquiere especial relevancia no forzar la obtención del producto en la colmena con el fin de no debilitar a la misma. El debilitamiento de la colmena se va a producir cuando se fuerza la producción de polen, con la consecuente reducción de las puestas e incluso la mortalidad de las larvas.

El procedimiento de recolección del polen apícola que transportan las abejas en sus patas traseras, se realiza a través de la utilización de una trampa cazapolen. La trampa cazapolen consiste en una caja generalmente realizada en madera que se sitúa en la entrada de la piquera, bloqueando la entrada y obligando a las abejas a pasar a través de ella, traspasando una rejilla. Ésta

permite el paso de las abejas al interior de la colmena pero no de los pellets de polen que transportan, que caen a un cajón inferior, aislado por un tamiz (Figura 17). Aproximadamente se capturan el 90% de los pellets de polen que transportan las abejas (Besora, s.f.). El tipo más habitual de trampa cazapolen en la apicultura española es la frontal de entrada o de piquera, ya que es sencilla su manipulación, y la que menos afecta a la colonia. En detalle, los elementos de la trampa cazapolen frontal de entrada son los siguientes:

1.- Caja: Es una estructura de madera que contiene las diferentes partes necesarias.

2.- Una rejilla con un espesor aproximado de 4 mm y con orificios de 4,5 mm de diámetro, preferiblemente de material plástico. La forma de los agujeros es redonda para afectar lo menos posible a las abejas a su paso (Figura 17).

3.-Tamiz horizontal. Justo bajo la rejilla hay un tamiz horizontal de metal con agujeros de 3 mm, que da paso del polen corbicular a un cajón inferior donde poder recogerlo, pero las abejas no pueden pasar al cajón (Figura 17).

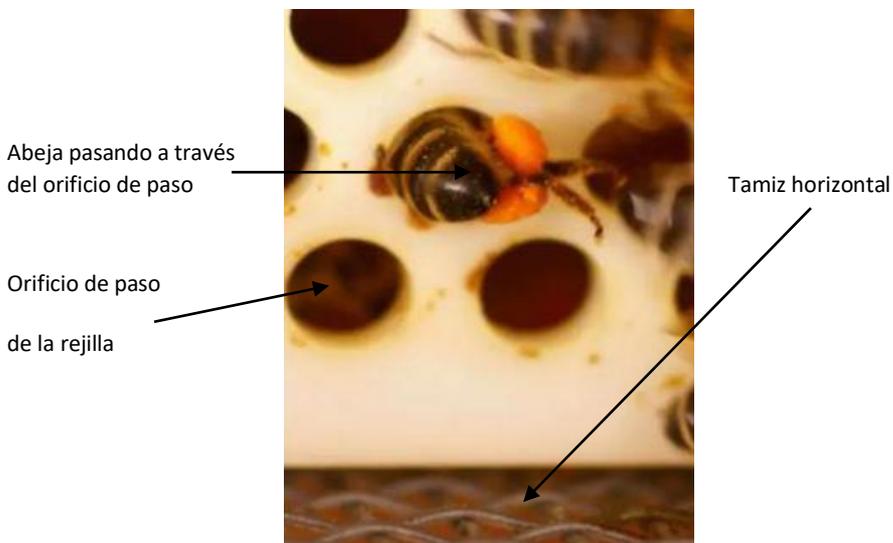


Figura 17. Detalle de la rejilla de plástico y del orificio de paso de la abeja hacia la colmena con el pellet de polen en sus patas. *Nota:* El tamiz horizontal de metal con agujeros de 3 mm, (parte inferior de la figura) permite que el polen corbicular se deposite en el cajón. Fuente: el autor.

4.-Cajón de acumulación. Situado inferiormente, con apertura frontal o lateral, y con una capacidad aproximada de 1 a 2 kilogramos (kg) de polen fresco. Hay que considerar que para la obtención de 1 kg de polen, se precisan de 60.000 vuelos de abeja, ya que cada abeja recolecta aproximadamente unos 15 miligramos (mg) de polen en cada vuelo. Normalmente el fondo y los laterales son perforados para mejorar la pérdida de humedad del polen recolectado. Suelen ser de malla metálica fina o de chapa metálica. Este último material mejora la fortaleza de la estructura (Figura 18).



Figura18. Cajón de acumulación. *Nota:* En la Figura 18(a) se observa la estructura perforada del fondo del cajón. En la Figura 18(b) se observa la chapa metálica perforada que recubre el fondo del cajón. Fuente: el autor.

5.- Salida de zánganos. Tras la rejilla de plástico, debe existir una salida para zánganos que en este caso son agujeros laterales en la estructura del cajón (Figura 19).

6.- Tejadillo de madera. Estructura de madera que cubre la trampa cazapolen (Besora, s.f.).

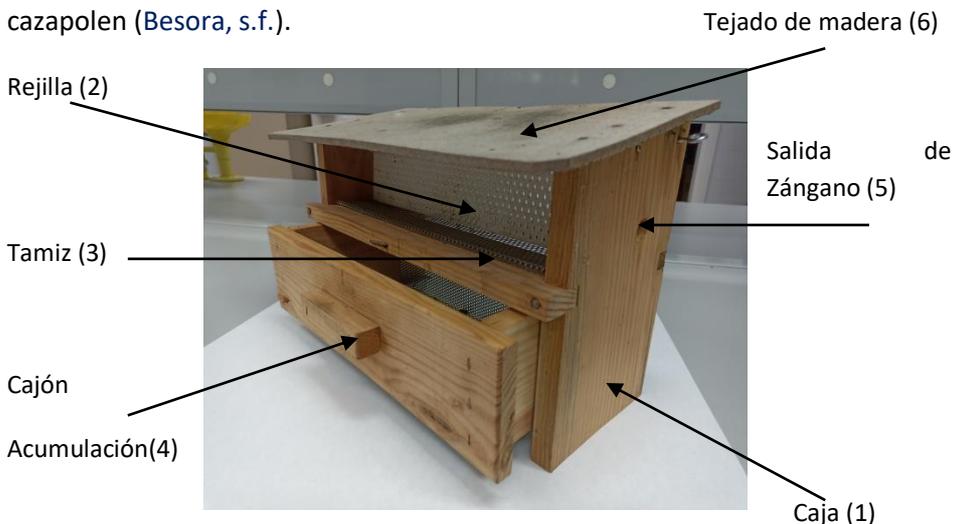


Figura 19. Imagen-resumen de las partes de una trampa cazapolen. Fuente: El autor.

La colonia de abejas puede recolectar entre 50 g y más de 250 g de polen al día o 15-40 kg al año con la ayuda de una trampa cazapolen, fijada a la entrada de las colmenas (Komosinska-Vassev *et al.*, 2015).

Podemos determinar tres tipos de trampa cazapolen, en función de su posición en las colmenas:

-Trampa cazapolen frontal de entrada o de piquera: Cuando se colocan en la piquera de la colmena. Se han descrito anteriormente, siendo éstas las más utilizadas en la apicultura española (Figura 20) (Besora, s.f.).



Figura 20. Trampa cazapolen frontal de entrada o piquera. Fuente: www.apiterapeuta.com

-Trampa cazapolen de bajera o de fondo: Más utilizada en los países del norte de Europa. Se sitúa en la parte inferior de la colmena, bajo el cuerpo de la colmena. La trampa cazapolen de fondo es una trampa de polen extraíble con una rampa en dos posiciones (permitiendo o impidiendo el paso de las abejas) y rejilla de plástico. El cajón del polen, tiene una bandeja de acero inoxidable, y un cajón recolector (Figura 21) (Besora s.f.)

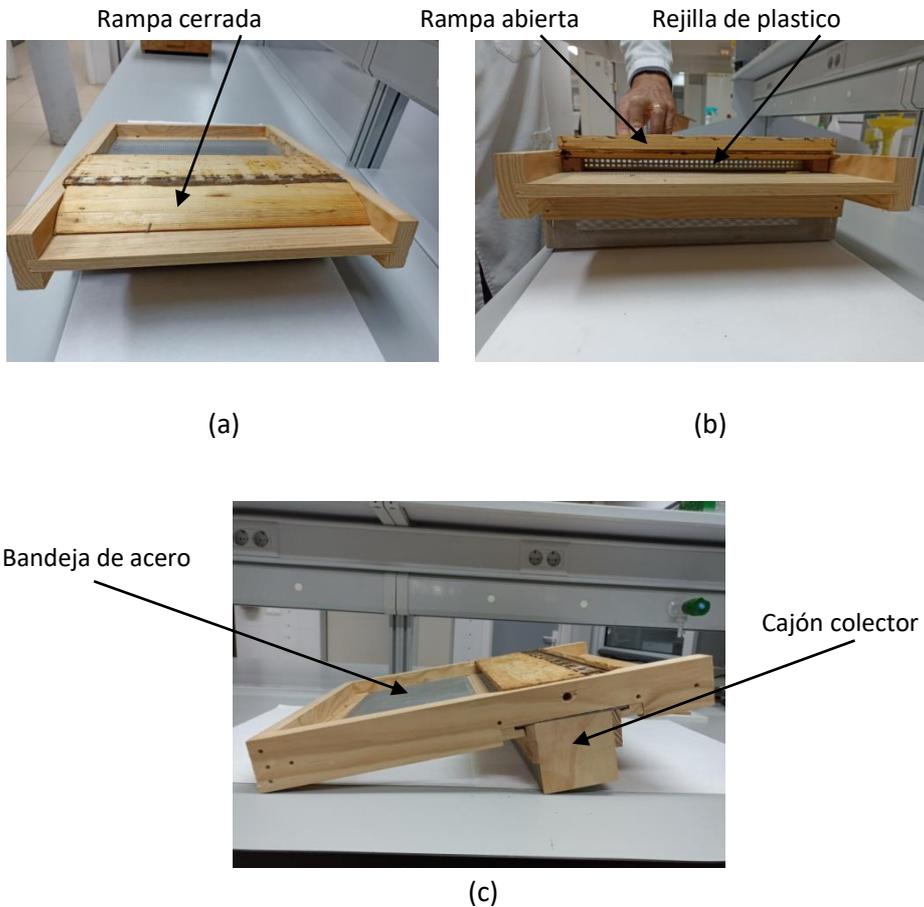


Figura 21. Trampa cazapolen de fondo. *Nota:* (a) Trampa cazapolen de fondo con la rampa cerrada, que permite el paso de la abeja directamente a la colmena. (b) Trampa cazapolen de fondo con la rampa abierta, que obliga a la abeja a pasar por la rejilla, y que el polen caiga en el cajón. (c) Perfil de la trampa cazapolen de fondo, con la bandeja de acero y el cajón colector dispuesto bajo la rejilla. Fuente: El autor.

-Trampa cazapolen superior o encimera: situada encima del alza, y bajo la entretapa. Este tipo de trampa es menos utilizada y más incómoda de manejar, y requiere una preparación especial de la colonia, ya que la abeja está acostumbrada a entrar por la parte inferior de la colmena. Se necesitan unos días con la piquera cerrada y la trampa sin rejilla, para acostumbrar a la abeja a entrar por la parte superior. Otro inconveniente es la obtención de un polen menos limpio (Figura 22) (Besora, s.f.).

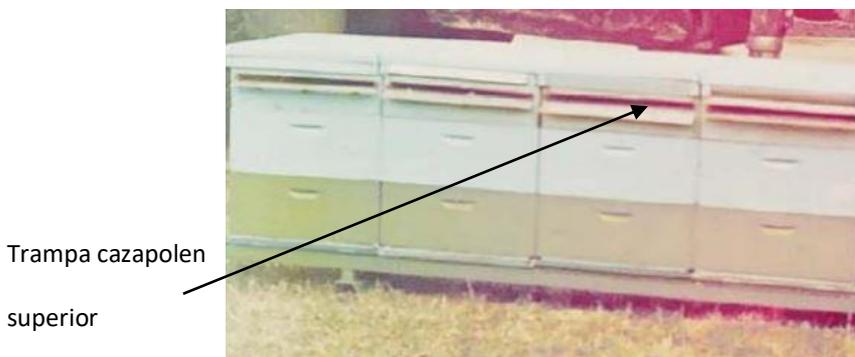


Figura 22. Trampa cazapolen superior. Fuente: Besora s.f.

Está comprobado que las abejas, al notar que se les quita el polen, de forma instintiva, disminuyen el tamaño de la bolita que transportan, con la finalidad de salvar la dificultad que supone la rejilla de la trampa cazapolen, y así poder introducir algo de polen en la colmena. Para un adecuado manejo es conveniente dejar que metan suficiente polen para la alimentación de las crías y de las abejas jóvenes. De aquí la razón de que la permanencia de la trampa cazapolen en la colmena no debe de ser prolongada. Además, las trampas cazapolen se deben colocar en colonias fuertes. La trampa cazapolen ideal, es aquella que puede recoger el polen de manera higiénica y segura. La de piquera es higiénica y práctica, pero recibe una cantidad significativa de suciedad resultante de la limpieza interna de la colmena. Las abejas aseadoras eliminan de forma continua desde el interior hacia el exterior de la colmena las partículas de suciedad y restos de cadáveres de cría que ensucian la trampa cazapolen. Se recomienda elegir una trampa que se pueda colocar y quitar fácilmente.

Además, la trampa cazapolen debe ser fácil de manejar, permitiendo un mejor saneamiento y buena ventilación, además de posibilitar el vuelo de los zánganos, y que esté protegida de las inclemencias climáticas (Campos *et al.*, 2021).



Figura 23. Disposición de trampas cazapolen frontales en colmenas del apiario experimental de Alcolea. Fuente: El autor.

Lo habitual en una explotación apícola es disponer todas las colmenas juntas, en la época en que se va a recolectar el polen de abeja (Figura 24).



Figura 24. Disposición de un colmenar en la Sierra de Córdoba. Fuente: El autor.

2.6. Condiciones de Manejo, Procesamiento del Polen en el Apiario y Transporte a la Planta de Procesado

En las etapas de cosecha y recolección de polen, los aspectos más deficientes están relacionados con las trampas cazapolen y el diseño de las colmenas.

En el caso de las trampas cazapolen en general están diseñadas en materiales inadecuados (madera o plástico), que dificultan su limpieza, ocasionando un incremento desmedido de la población de microorganismos. Otro aspecto está relacionado con el reducido tamaño del sitio específico de la trampa por donde debe pasar la abeja (Figura 25), lo que puede causar mutilación, y los restos de estos traumatismos caen directamente al cajón de almacenamiento del polen.



Figura 25. Abejas intentando pasar a través de la rejilla. Fuente: El autor

En referencia a la manera como está diseñada la colmena, en ocasiones no existe la suficiente elevación de ésta con respecto al suelo, con lo que es común encontrar otros insectos en el cajón de polen o la

proliferación de moho, por las altas condiciones de humedad del suelo y un reducido flujo de aire al interior (Zuluaga *et al.*, 2012; Durán *et al.*, 2014).

La recolección del polen (Figura 26) debe realizarse diariamente, aunque es habitual que se haga cada dos días, y excepcionalmente hay apicultores que lo recolectan en periodos más espaciados. No existe un consenso firme por parte de la comunidad científica sobre este procedimiento (Campos *et al.*, 2021).



Figura 26. Recolección de polen en apiario. Fuente: El autor.

El polen recogido de la trampa cazapolen se puede pasar a un cubo, siempre de plástico alimentario, y de allí a recipientes de transporte apilables (Figura 27) que a su vez deben ser: I) de materiales de uso alimentario. II) De fácil limpieza y desinfección. III) Apilables facilitando así el almacenamiento y transporte. IV) Poco profundos, para evitar que los pellets de polen fresco se compacten (La tienda del apicultor, s.f.).

La capa de polen en los recipientes de transporte no debe ser superior a los 20 cm de profundidad, evitando así deformaciones y compactaciones en los pellets de la parte inferior.



Figura 27. Envases apilables de transporte del polen. Caja perforada alimentaria especial para polen. Fuente: www.latiendadelapicultor.com

El polen que aparece compactado por la humedad (Figura 28) debe de separarse del polen destinado a su procesamiento. El polen apelmazado solo debe utilizarse para la alimentación de las abejas. Otro factor a considerar es que el cajón recolector no debe ser expuesto a la contaminación del suelo (Campos *et al.*, 2021).



Figura 28. Polen compactado por la humedad. Fuente: Campos *et al.* (2021).

En el proceso de transporte desde el colmenar al área de procesamiento se debe evitar en todo momento que el producto se contamine con polvo, la transferencia de olores o humedad, así como que se exponga el polen a la acción de altas temperaturas, que puedan interferir con la calidad del producto a procesar. También se debe evitar que la materia prima se molture o desmenuce. Es necesario evitar el efecto de la humedad y de la temperatura. Se recomienda el empleo de un vehículo cerrado para el transporte o bien toda la carga deberá cubrirse con una lona limpia que impida el ingreso de polvo y de otros contaminantes. El vehículo empleado para el transporte deberá estar perfectamente limpio (Gurini *et al.*, 2020).

2.7. Manufactura del Polen en la Planta de Procesado

En este apartado se van a describir tanto las características generales que deben reunir la planta de procesado del polen, como las distintas actuaciones que se realizan en las instalaciones de procesado para la conservación del polen.

2.7.1. Características de la Planta de Procesado del Polen

El apicultor debe contar con una sala de recepción del producto y salas de procesamiento, además de verificar los siguientes preceptos: I) Que la

maquinaria en contacto con la materia prima sea de acero inoxidable. II) Que la manipulación, los procesos de limpieza y desinfección, y la utilización tanto del calor como de los deshumidificadores, tengan un control preciso. III) Además, el agua utilizada en los procesos de limpieza y desinfección del habitáculo debe tener un origen conocido (Campos *et al.*, 2021).

La limpieza, desinfección y control de plagas en la planta de procesado deberá realizarse según los procedimientos implementados en el establecimiento. Estos procedimientos deberán detallar las tareas y operaciones de saneamiento que se van a realizar antes (saneamiento preoperacional) y durante (saneamiento operacional) el procesamiento del polen, previniendo la contaminación directa de este. Deberán estar por escrito y llevar un registro de los productos químicos aplicados (Gurini *et al.*, 2020).

Las principales actuaciones sobre el polen en la planta de procesado van dirigidas a aumentar su vida útil, bien sometiendo al polen a un proceso de desecación (e intervenciones posteriores), o bien el polen se congela y se conserva como polen fresco congelado.

2.7.2. Almacenamiento y Desecación del Polen

Inmediatamente después de que el polen llega del apiario y previo a su secado, es necesario almacenarlo en congelación un mínimo de 48 horas a una temperatura de -18 °C para evitar la proliferación de algunos contaminantes biológicos como larvas de polillas y hongos. Previamente al secado, se deberá realizar una evaluación sensorial del polen, para detectar si se ha producido fermentación. En cuanto a su almacenamiento en congelación, se debe realizar en el mismo recipiente en el que ha sido transportado, con una altura de la capa no superior a los 20 cm para evitar el apelmazado.

Así mismo será conveniente que el polen esté contenido a su vez en un recipiente secundario, evitando así que en el caso supuesto de la ruptura del primer recipiente, pueda entrar el contacto el polen con otros elementos del congelador. El tiempo, la humedad y la temperatura favorecen el crecimiento de levaduras y mohos, generando un deterioro microbiológico. La humedad inicial del polen se medirá con un humidímetro para cereales (Figura 29) (Gurini *et al.*, 2020).

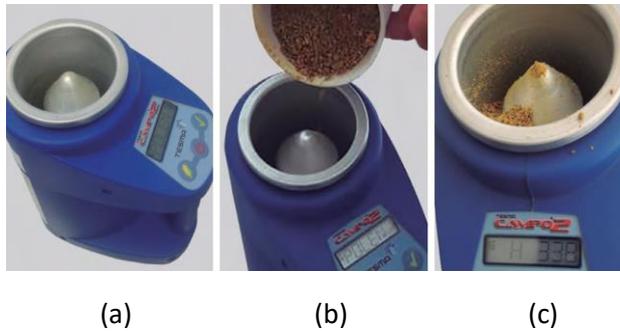


Figura 29. (a) Humidímetro. (b) Colocando polen en humidímetro. (c) Resultado de la medición. Fuente: Gurini *et al.* (2020).

El proceso de conservación tradicional habitual del polen es mediante desecación, siendo un proceso que aún genera mucha controversia. La desecación consiste en someter al polen a la acción deshidratadora de aire caliente, con el consecuente descenso de la humedad y disminución de su actividad de agua (a_w) de tal forma que se inhibe el crecimiento de microorganismos, y permite conservar el producto a temperatura ambiente facilitando su comercialización (Barajas-Ortiz *et al.*, 2011). Varios autores sugieren el uso de temperaturas relativamente bajas (no mayores a 50 °C) y tiempos cortos (no más de 6 horas) para prevenir la degradación de los componentes nutricionales y bioactivos encontrados en el grano (Almeida-Muradian *et al.*, 2005; Campos *et al.*, 2008, 2010; Bogdanov, 2011; Mesa, 2015). El polen congelado que se va a desecar, no debe someterse a una temperatura de 42 °C de forma inmediata. Es fundamental respetar un periodo de descongelación del material para evitar dañar el producto por choques térmicos. Se sugiere que después de sacar el polen del congelador, se transfiera a un refrigerador por aproximadamente 2 horas para descongelarlo antes de su desecación (Campos *et al.*, 2021).

Para este proceso de desecación se precisa disponer de un secadero de polen con termostato regulable, manteniendo la temperatura entre 40 °C y 42 °C. Incluso la legislación brasileña establece como máxima temperatura de secado 42°C (Brasil, 2001). En cualquier caso, la última decisión la tiene el manipulador, que con su experiencia, decide finalmente cuándo el polen se ha secado en un grado óptimo.

El equipo está revestido interiormente por acero inoxidable con estantes que albergan bandejas, de acero inoxidable, de fondo perforado, que facilita el paso del aire caliente (Figura 30a). El acero inoxidable es un material

que facilita la limpieza y desinfección de forma eficaz. El polen fresco se expande superficialmente sobre estas bandejas adquiriendo un grosor no superior a 2 cm (Figura 30b). La deshidratación tiene como objetivo la eliminación del agua hasta alcanzar una humedad máxima del 4-8% (Campos *et al.*, 2008). Para algunos países tropicales a menudo se recomienda una humedad máxima sea del 4% (Thakur & Nanda, 2020). Previamente a sacar el polen del secadero se aconseja hacer pasar aire frío seco unos 10–14 minutos, evitando así que los pellets de polen salgan calientes y absorban humedad del ambiente.



(a)



(b)

Figura 30. Equipo de desecación de polen. *Nota:* (a) Se observan las bandejas de acero inoxidable perforadas. (b) Se observan las bandejas con polen. Fuente: Gurini *et al.* (2020).

El polen se pesa al ingresar a la planta y después del secado, lo que permite calcular la pérdida de humedad (Figura 31).



Figura 31. Pesada de polen. Fuente: Gurini *et al.* (2020).

2.7.3. Tamizado y Limpieza del Polen Desechado

Se eliminarán las impurezas que dan mal aspecto al producto y pueden generar malos olores o gustos: restos vegetales (pajuelas, fragmentos de hojas, etc.), animales (fragmentos de abejas, patas, alas, cabezas, momias de larvas producidas por el hongo *Ascosphaera apis*), minerales, piedrecitas y granos aglomerados por exceso de humedad en alguna parte del proceso.

Son dos operaciones que confieren al polen una mejor presentación. Con el tamizado, se retira el polvillo y con la limpieza se retiran las impurezas que dan un mal aspecto al producto. En general, estos procesos se realizan a nivel manual y a nivel industrial (mediante limpiadoras mecánicas).

- Manual: Se elimina con una criba las partículas mayores (abejas enteras, briznas de hierba, granza) (Figura 32). El proceso de criba es ineficiente, ya que tanto las partes de insectos, restos momificados de cadáveres de cría, material vegetal u organismos vivos con tamaño inferior a la malla del tamiz empleado quedan en el producto. Posteriormente y ayudados por un pincel, pinzas o una placa de material plástico electrizado por frotamiento retiramos las patas y demás restos quitinizados. Seguidamente separamos las motas y restos de pupas mediante una corriente de aire soplante o aspirante.

Este proceso manual de eliminación de impurezas macroscópicas se suele realizar en producciones pequeñas, o en aquellas destinadas al autoconsumo.



Figura 32. Procesamiento del polen desecado. Primer cribado del polen. Fuente: Campos *et al.* (2021).

- Mecánica: Se utilizan tanto mesas densimétricas (separan mediante cribas los distintos componentes según su peso y tamaño), como aventadoras, que eliminan mediante corriente de aire aquellas partículas que no son polen).

En este último procedimiento, se hace caer el polen desde una tolva (en la que está almacenado) a una corriente de aire que permita caer los pellets de polen y empuje las impurezas menos pesadas fuera del contenedor de caída (Figura 33).



Figura 33. Aventadora-limpiadora de polen. Fuente: Gurini *et al.* (2020).

Y en un proceso ya más industrializado, el polen desecado se hace pasar por una cinta sinfín y desde esta cinta se aspiran las impurezas mediante un tubo de plástico conectado a un aspirador, revisándose toda la partida para dejarla sin impurezas (Figura 34).



Figura 34. Limpieza de preenvasado. Cinta transportadora de limpieza manual por aspirado. Fuente: <https://www.latiendadelapicultor.com/blog/polen-produccion-manejo-y-comercializacion/>

2.7.4. Envasado y Almacenamiento del Polen Desechado

El envasado del polen seco para su almacenamiento y comercialización al por mayor, se realiza utilizando una bolsa de plástico atóxico, apta para envasado primario de alimentos, la cual queda protegida

por empaques secundarios como pueden ser bidones metálicos (Figura 35) o plásticos atóxicos de primer uso, o cartón de uso alimentario. Antes de cerrarlo se debe extraer el aire de la bolsa con ayuda de una bomba de vacío. El almacenamiento debe realizarse en condiciones secas con temperatura suave, y protegido de la luz (Brasil, 1997).



Figura 35. Bidones metálicos de 150 Kg de polen. *Nota:* Siempre en bolsa de plástico interna (grosor mínimo 0.1mm, 400 galgas). Fuente: Gómez-Pajuelo (2020).

Para la comercialización del polen se utiliza el envase de vidrio (Figura 36), que es la forma habitual con la que llega al consumidor el polen desecado. Se mejoran las condiciones de conservación si el envasado se realiza al vacío, o en atmósfera modificada con nitrógeno (Bogdanov, 2016). Se puede conservar dos años, en un lugar lo más frío y seco posible, ya que las temperaturas altas favorecen el desarrollo de microorganismos (Gurini *et al.*, 2020).



Figura 36. Envase de vidrio con polen desecado. Fuente: www.naturitas.es

De igual forma, el consumidor puede adquirir el polen desecado en envases al vacío, en bolsas de plástico herméticas (Figura 37), que evitan la

oxidación por parte del aire y la disminución de la actividad antioxidante debido al contacto con el oxígeno (Bogdanov, 2016).



Figura 37. Envase de plástico para polen envasado al vacío. Fuente: www.dieteticacentral.com

2.7.5. Congelación del Polen y Envasado del Polen Congelado

Otro método de conservación del polen alternativo a la desecación es la congelación del polen fresco. El polen que llega a la planta de procesamiento, después de eliminar las impurezas macroscópicas, debe estar contenido en un recipiente de polietileno estéril y colocarse inmediatamente en un congelador (Figura 38). El polen de abeja permanecerá allí durante un mínimo de 48 horas para destruir posibles ácaros, huevos o larvas de la polilla de la cera (*Galleria spp.*) y otros insectos. La congelación tendrá la propiedad de estabilizar y controlar el desarrollo de microorganismos relacionados con la microbiota normal contenida en el polen (Ibrahim & Spivak, 2006).

El polen fresco que se congela inmediatamente después de su recolección en el apiario, presenta una serie de ventajas: este producto es indispensable para la cría de abejorros, insectos esenciales para la polinización en invernaderos. Además, presenta menos gastos de manipulación, y menos trabajo. Para el consumo humano, el polen congelado es más palatable para el consumidor: en aroma, gusto, vista y textura, y se mejora la conservación de compuestos biológicos termolábiles. Pero el polen congelado presenta un importante inconveniente. Solo son válidas las partidas de humedad inicial no excesiva, con un máximo del 20%, ya que puede generar riesgos para la salud del consumidor debido a su elevada carga microbiológica (Gómez Pajuelo, 2020).

En congelación, además se desea preservar las potenciales propiedades biológicas que confieren al polen su carácter terapéutico. El uso de sistemas de congelación supone un coste adicional que sólo puede justificarse si, efectivamente, la calidad del polen obtenido es superior a la del preservado por el sistema tradicional de secado (Ecocolmena, 2021). La congelación seguida de un almacenamiento a -20 °C en nitrógeno puro garantiza una alta calidad biológica del polen de abeja conservado hasta 6 meses. Sin embargo, el polen almacenado durante períodos más largos debe ser secado por liofilización y almacenado a -20 °C en nitrógeno puro para preservar su máxima calidad biológica (Bogdanov 2015).



Figura 38. Imagen de polen fresco congelado en envases herméticos de polietileno estéril. Fuente: Gómez-Pajuelo (2020).

2.8. El Pan de Abeja

En las colmenas las abejas rara vez consumen el polen directamente, sino después de que haya sido almacenado en los panales (Standifer *et al.*, 1980), es lo que se conoce como pan de abejas. Se considera como tal el polen recolectado por las abejas y ensilado en las celdillas de los panales. Para ello las abejas transportan los pellets de polen (polen corbicular) al interior de las colmenas, donde son depositados directamente en las celdillas de los panales. Posteriormente lo apisonan con la cabeza. El polen almacenado se mezcla con enzimas digestivas secretadas por las abejas, miel y ácidos orgánicos. Además, en condiciones anaeróbicas, el polen almacenado sufre un proceso de fermentación del ácido láctico causada por bacterias (*Pseudomonas spp.* y *Lactobacillus spp.*) y levaduras (*Schaccharomyces spp.*) (Tomás *et al.*, 2017; Di

Cagno *et al.*, 2019; Detry *et al.*, 2020; Mărgăoan *et al.*, 2020), a lo que se añade su mantenimiento a temperatura de 33 °C- 35 °C y la elevada humedad, hacen que el polen experimente cambios y se convierta en el pan de abejas (Figura 39) (Aylanc *et al.*, 2021).

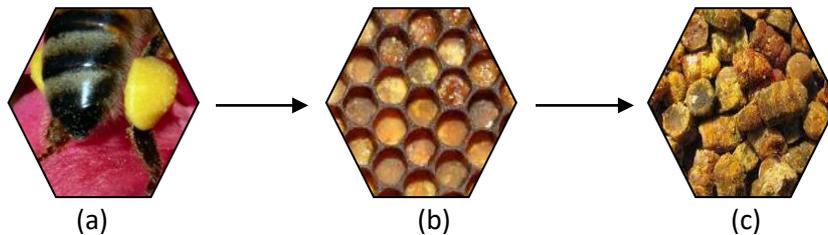


Figura 39. Cadena del pan de abeja: desde la recolección del polen por las abejas hasta la formación del pan de abeja. (a) Recolección del polen por parte de las abejas. (b) Fermentación del polen en las celdillas. (c) Pan de abeja. Creación del autor tomando como fuente Aylanc *et al.* (2021).

A medida que el polen se convierte en pan de abeja pasa por una serie de procesos bioquímicos, que se completan en aproximadamente una semana: I) microorganismos en crecimiento, como bacterias del ácido láctico, *Escherichia*, bacterias aeróbicas y levaduras en la primera mitad del día, II) Las bacterias utilizan los nutrientes, y se produce una caída del pH, III) Se produce una pérdida de bacterias *Streptococcus* y crecimiento de bacterias *Lactobacillus*, y IV) muerte de bacterias de ácido láctico y algunas levaduras debido al ácido láctico producido (Khalifa *et al.*, 2020).

El pan de abeja contiene proteínas y aminoácidos, carbohidratos, lípidos, vitaminas, minerales y ácidos fenólicos y polifenoles (Zuluaga *et al.*, 2015b; Tomás *et al.*, 2017). Es similar al polen de abeja, pero con un mayor contenido y riqueza en nutrientes (Adaskeviciute *et al.*, 2019).

Otro aspecto muy interesante es que la ruptura de la pared multicapa en el polen apícola durante la fermentación y la formación del pan de abeja, favorece la digestibilidad y el grado de absorción del pan de abeja en humanos (Mizarahi & Lensky, 2013; Zuluaga *et al.*, 2015b; Kieliszek *et al.*, 2017; Khalifa *et al.*, 2020). La celulosa que forma la capa interna (intina) del polen corbicular es degradada por bacterias, reduciendo la relación de celulosa del pan de abeja, con respecto al polen apícola (Benavides-Guevara, *et al.*, 2017). Estudios recientes han apuntado que tanto el pan de abeja como el polen corbicular poseen propiedades antiinflamatorias, antiobesidad, anticancerígenas, antimicrobianas, antioxidantes y neuroprotectoras, así como gastroprotectoras y antienvjecimiento (Bakour *et al.*, 2017; Sobral *et*

al., 2017; Tomás *et al.*, 2017; Selamoglu, 2018; Othman *et al.*, 2019; Bacha *et al.*, 2020; Eleazu *et al.*, 2020; Kurek-Gorecka *et al.*, 2020;).

Por otra parte, durante el proceso de transformación del polen apícola en pan de abeja se forman algunos productos nuevos: algunas de las proteínas del polen se reducen a aminoácidos por las enzimas digestivas de la abeja, por lo que el contenido de proteínas del polen es mayor, mientras que en pan de abeja se puede encontrar una mayor cantidad de aminoácidos (Kieliszek *et al.*, 2017).

Las diferencias también se van a manifestar en el contenido de azúcares, ya que al mezclarse el polen con miel cuando se almacena en las celdas del panal, dará como resultado que el pan de abeja es más rico en azúcar (Khalifa *et al.*, 2020; Thakur & Nanda, 2020).

Además, el alto contenido de ácido láctico del pan de abejas, debido a la acción metabólica de los microorganismos lo protege contra la acción microbiana, además de contribuir a sus propiedades nutricionales (Khalifa *et al.*, 2020; Mayda *et al.*, 2020). Igualmente, el pan de abeja tiene un contenido más rico en vitaminas que el polen, que puede resultar de la degradación del polen (Khalifa *et al.*, 2020). Con respecto a los ácidos grasos, tanto el pan de abeja como el polen corbicular tienen un contenido similar (Kieliszek *et al.*, 2017)

En conjunto, todo lo anteriormente expuesto, nos habla de cualidades mejoradas del pan de abeja respecto al polen corbicular inicial, que sería más parecido al originario de la planta. Algunas de las diferencias entre el polen apícola y el pan de abejas se encuentran reflejadas en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición del polen apícola y del pan de abeja. Fuente: Aylanc *et al.* (2021).

Composición	Polen apícola	Pan de abeja	Referencia
Carbohidratos	13%-55%	24%-35%	Campos <i>et al.</i> (2010); Khalifa <i>et al.</i> (2020)
Proteínas	10%-40%	14%-23%	Campos <i>et al.</i> (2010)
Lípidos	1%-13%	2%-14%	Bakour <i>et al.</i> (2017)
Fibra	14%-31%	3%-20%	Anjos <i>et al.</i> (2019a)

Vitaminas	0,02%-0.7%	0,4%-3%	Farag& El-Rayes (2016)
Aminoácidos	3,2%	n.i.*	Yang <i>et al.</i> (2013)
Flavonoides	0.2%-3,2%	n.i.*	Bogdanov (2011)
Ácido láctico	0,6%	3%	Kieliszek <i>et al.</i> (2017)
Acidez libre (mEq/kg)	105-146	400	Bakour <i>et al.</i> (2017)
pH	4-6,3	3,8-4,2	Khalifa <i>et al.</i> (2020)

Nota: *n.i.: No información

A pesar de todas las ventajas nutricionales del pan de abeja, su consumo es muy reducido. Entre otros aspectos, es debido a que el proceso de obtención es más complicado que para obtener polen apícola y se precisa de técnicas más laboriosas, incluyendo la destrucción de panales. Como resultado, el pan de abeja tiene un precio más elevado desde el punto de vista comercial que el polen corbicular, la miel o la cera de abejas (Aylanc *et al.*, 2021).

2.9. Composición Físico-Química del Polen Apícola

2.9.1. Introducción

Recientemente, el polen de abeja ha demostrado una gran atención en la elaboración de alimentos, ya que es un producto sin parangón respecto a su composición en nutrientes saludables (Sattler *et al.*, 2015; Thakur & Nanda, 2018). El polen de abeja es conocido como un superalimento natural debido a sus propiedades nutricionales y medicinales (Thakur & Nanda, 2020).

A tenor de su composición nutricional y físico-química, el polen se configura como una excelente fuente de aminoácidos esenciales, ácidos grasos omega-3 (ω -3), vitaminas del complejo B, minerales y polifenoles. También se tiene constancia de contenidos apreciables de flavonoides, que actúan como agentes protectores del organismo por su capacidad antioxidante. Estudios de varios investigadores han demostrado que los flavonoides obtenidos de polen de diferentes orígenes geográficos contienen compuestos con diversa relevancia nutricional, de ahí la importancia de su caracterización y diferenciación (Saric *et al.*, 2009).

Sin embargo, existe una enorme variación en la composición debido a los diferentes orígenes botánicos y geográficos, variación que sigue siendo un

reto para promover el mercado del polen de abeja. Para fomentar el consumo del polen de abeja, se necesita una caracterización exhaustiva basada en las características físico-químicas, nutricionales y funcionales según la fuente geográfica y floral (Thakur & Nanda, 2020).

Además, está compuesto por todos los aminoácidos y ácidos grasos esenciales, aminoácidos libres, vitaminas principalmente del complejo B, minerales esenciales y carotenoides (Mărgăoan *et al.*, 2014; de Melo *et al.*, 2016; Ghosh & Jung, 2017; Thakur & Nanda, 2018).

La fructosa, seguida de la glucosa y la sacarosa, componen los principales azúcares y casi el 1% de los azúcares restantes en el polen incluyen la arabinosa, la isomaltosa, la melibiosa, la melezitosa, la ribosa, la trehalosa y la turanosa (Chantarudée *et al.*, 2012; Liolios *et al.*, 2018).

Las fuentes vegetales del polen de abeja, determinadas por el análisis palinológico, afectan de forma significativa a sus propiedades nutricionales, físicoquímicas y funcionales (Nogueira *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2014; Thakur & Nanda, 2018).

El polen es aclamado por sus excelentes propiedades nutricionales y terapéuticas, y actualmente se consume comercialmente como suplemento dietético. Al haber sido reconocido por ley como aditivo alimentario en países como Argentina, Brasil y Suiza, donde se han instituido oficialmente sus normas estándar de calidad físico-química y microbiológica, otros países han establecido los parámetros físico-químicos del polen para su ingesta saludable (Fuenmayor *et al.*, 2014; Canale *et al.*, 2016). Por lo tanto, se ha incrementado el interés científico sobre el polen de abejas, realizándose numerosos estudios para caracterizar el polen de diversos orígenes florales de diferentes regiones de numerosos países como Brasil, China, Grecia, India, Portugal, Rumania, España, Sudáfrica, Arabia Saudita, etc. para identificar sus peculiaridades (Yang *et al.*, 2013; Liolios *et al.*, 2016; Sagona *et al.*, 2017; de Melo *et al.*, 2018a; de Melo *et al.*, 2018b; Gardana *et al.*, 2018; Liolios *et al.*, 2018; Thakur & Nanda, 2018; Isik *et al.*, 2019; Liolios *et al.*, 2019).

Previamente a estos estudios, Campos *et al.* (2008) sugirieron unos métodos analíticos estándar para el análisis físico-químico de polen. En la actualidad, Campos *et al.* (2021) han elevado una propuesta de métodos analíticos estándar más actuales para caracterizar desde el punto de vista físico-químico al polen de abeja.

En la Tabla 5 se presenta el valor sugerido por Campos *et al.* (2008) en macronutrientes en polen seco.

Tabla 5. Valor sugerido en macronutrientes. Elaboración del autor tomando como fuente Campos *et al.* (2008).

Componente	Contenido Min-Max g/100 g de peso seco	Sugerencia para la normativa estandar
Proteínas	10-40	No menos de 15g/100g
Lípidos	1-13	No menos de 1.5/100g
Clorhidratos totales	13-55	No menos de 40g/100g
Fibra dietaria total	0,3-20	-
Cenizas.	2-6	No más de 6g/100g

2.9.2. El Contenido de Humedad y a_w

La concentración de agua es un factor importante que afecta a la cantidad de componentes restantes en cualquier producto, mientras que la calidad y la vida útil están estrechamente asociadas a la a_w (Nogueira *et al.*, 2012). Los mayores valores de a_w estimulan el crecimiento de microorganismos, en particular levaduras y mohos, que puedan producir micotoxinas y ocratoxinas. Además se incrementan las actividades enzimáticas del polen de abeja que pueden ser una causa fundamental de la toxicidad del producto, pudiendo crear unas condiciones de riesgo para el consumidor (Feás *et al.*, 2012).

Sin embargo, las legislaciones aún no han fijado las normas para su valor. Por lo general, las diversas perspectivas de la calidad e inocuidad de los alimentos, incluida la absorción de humedad, las actividades enzimáticas, etc., se ven afectadas por valores más altos de a_w aumentando así la importancia de las condiciones higiénicas durante la manipulación, el secado y procesamiento del polen de abeja para reducir al mínimo la probabilidad de contaminaciones de origen humano (Thakur & Nanda, 2020).

El polen de abeja fresco puede contener al menos un 7% y un máximo de hasta un 30% de contenido de humedad. El polen, debido a su naturaleza altamente higroscópica, siempre corre el riesgo de contaminación fúngica lo que pone en duda la seguridad microbiológica del polen de abeja (Carpes *et al.*, 2009).

Se debe evitar el secado al sol o a la sombra debido a la proliferación de microorganismos, y el secado por debajo del 3% que es indeseable, debido a la decoloración, y a la generación de sabores desagradables derivados del aumento de la tasa de reacciones químicas como el pardeamiento de Maillard, la deshidratación de la fructosa, la pérdida de compuestos aromáticos y la oxidación de los lípidos (Nogueira *et al.*, 2012).

Por lo tanto, el polen seco debe tener un contenido de humedad que varía entre el 5% y el 9%, lo que retiene los nutrientes del polen y garantiza la seguridad (de Arruda *et al.*, 2013). La congelación es otra técnica para preservar los nutrientes del polen, pero el polen debe consumirse o procesarse rápidamente después de su descongelación, mediante liofilización, desecación y secado asistido por microondas (Conte *et al.*, 2017).

2.9.3. Hidratos de Carbono

Los carbohidratos son el mayor constituyente del polen de abeja, que representa casi 2/3 del peso total del polen en seco (Li *et al.*, 2018). La mayor parte de los carbohidratos se debe a la incorporación de miel o néctar por parte de la abeja durante la formación de los gránulos; sin embargo, las especies vegetales y las condiciones de crecimiento y cosecha son factores importantes que determinan su proporción. Los hidratos de carbono muestran una enorme variación cuantitativa del 18,50% al 82,80% en el polen en todo el mundo (Thakur & Nanda, 2020).

El polen está formado por monosacáridos (fructosa y glucosa), disacáridos (sacarosa, turanosa, maltosa, rehalas) y trisacáridos (erlosa), con una relación fructosa/glucosa que varía entre 1,20-1,5. La mayor cantidad de azúcares reductores se registra en el polen recolectado por las abejas, que lo hace diferente del polen de origen botánico (Carpes *et al.*, 2009).

Liolios *et al.* (2018) informaron de un promedio de 42,10% de azúcares totales en treinta muestras de polen monofloral de Grecia, que variaban entre el 34,70% y el 63,50% del contenido. Entre los polisacáridos, la esporopolenina está presente en la exina, la capa exterior del grano de polen, que proporciona una estructura rígida y esculpida, y es muy resistente a los procesos de degradación física, biológica y química no oxidantes, incluida la acetólisis, contribuyendo así a encapsular y proteger el contenido de polen, incluidos los compuestos bioactivos. La capa interna de polen conocida como intina está compuesta por celulosa y pectina. Sin embargo, estos polisacáridos no son

responsables de aportar ningún valor nutritivo, sino que su importancia radica en la regulación de varias funciones biológicas.

2.9.4. Proteínas y Aminoácidos

Las proteínas son uno de los componentes mayoritarios del polen, después de los carbohidratos, y satisfacen las necesidades nutricionales de las abejas. La proporción de proteínas varía en el polen recogido de diversas fuentes florales. Incluso, el contenido de proteínas varía en el polen unifloral de distintos emplazamientos geográficos. En el polen de la colza (*Brassic napus*), en India, el porcentaje proteico es de un 19,63%. Sin embargo en Brasil, este porcentaje proteico en polen de colza aumenta hasta un 23%, y en China es de un 27,3%. El polen del cocotero (*Cocos nucifera*) registra en India un porcentaje de proteína del 25,39%, y sin embargo, en Brasil, este porcentaje oscila entre el 10,3% y el 20,3 %. En el polen del maíz (*Zea mays*) el porcentaje proteico en Grecia es del 14,86%, aumentando en China al 17,9% y en Egipto del 23,3% (Yang *et al.*, 2013; Liolios *et al.*, 2016; de Melo *et al.*, 2018a; Thakur & Nanda, 2018).

La posible explicación puede venir por la mezcla con néctar que realiza la propia abeja al elaborar el pellet de polen. Además, el polen de abeja, al secarse, puede contener un porcentaje de proteína que oscila entre el 2,5% al 62%, dependiendo del origen botánico. Una proporción tan alta de proteína, potencia el papel del polen corbicular como un nuevo suplemento dietético, ideal para las personas que adoptan para su alimentación una dieta vegetariana (Campos *et al.*, 2010).

El polen de abeja contiene predominantemente aminoácidos de forma ligada y únicamente, una décima parte de las proteínas totales están disponibles como aminoácidos libres cuya composición también se ve afectada por el origen botánico y las condiciones de procesamiento y almacenamiento (Domínguez-Valhondo *et al.*, 2011). La especie vegetal afecta a la composición de los aminoácidos más en términos cuantitativos que cualitativos.

Los principales aminoácidos presentes en el polen de diferentes países, y de los que existen estudios realizados, son el ácido glutámico, la prolina, y el ácido aspártico. Las abejas melíferas son directamente responsables del nivel de prolina que parece aumentar durante el almacenamiento debido a su síntesis en presencia de glutamato deshidrogenasa a partir de ácido glutámico (Verslues & Sharma, 2010).

El contenido de aminoácidos libres debe ser de un mínimo del 2%, lo cual es esencial para la estandarización del polen de abeja en el mercado europeo. Además de esto, el "índice de prolina" debe ser <80%, crítico para indicar la frescura del polen (Canale *et al.*, 2016).

El polen de abeja también contiene un alto nivel de aminoácidos esenciales (AAE), lo que proporciona un gran valor nutritivo tanto para las abejas como para los seres humanos (Yang *et al.*, 2013; da Silva *et al.*, 2014). Según los estudios anteriores, entre los AAE, la leucina y la lisina se notificaron en las mayores cantidades de varios países (Tabla 6).

Desde el punto de vista de la nutrición humana, la lisina (el aminoácido limitante de los cereales) está presente en cantidad adecuada y, lo que es interesante, el triptófano se presenta en una cantidad sorprendentemente mayor (0,70-14,80 g/100 g) en el polen de abejas chino siendo el aminoácido limitante de las legumbres (Yang *et al.*, 2013). El polen también contiene la treonina (Dong *et al.*, 2018).

Tabla 6. Composición de aminoácidos (g/100g) del polen de abeja de diferentes orígenes botánicos en distintos países. Fuente: elaboración del autor tomando como fuente [Thakur & Nanda \(2020\)](#).

País	Fuente botánica	Aminoácidos esenciales. AE										Referencia
		Arg	His	Ile	Leu	Lys	Met	Fen	Tir	Trip	Val	
Colombia, España e Italia	Multifloral	0,96-4,64	0,49-0,68	0,18-0,64	0,47-1,34	0,39-0,87	0,19-0,21	0,44-0,87	0,10-0,31	0,11-0,15	0,29-0,70	Gardana et al.(2018)
República de Corea	<i>Actinidia arguta</i> y <i>Quercus</i>	1,1-1,5	0,4-0,6	0,9-1,3	1,5-2	0,7-1,2	-----	0,2-1,2	0,4-0,9	-----	0,9-1,4	Ghosh & Jung (2017)
		No esenciales. NE										
		Ala	Asp	Cist	Glut	Gly	Pro	Ser	Tir	Asp	Glut	
Colombia, España e Italia	Multifloral	0,43-1,19	0,21-0,46	0,07-0,09	0,13-0,29	0,08-0,25	16,2-19,8	0,23-0,47	0,36-0,89	0,29-0,49	0,09-0,23	Gardana et al.(2018)
República de Corea	<i>Actinidia arguta</i> y <i>Quercus</i>	1,1-1,4	1,6-2,7	0,1-0,3	2,1-2,2	0,9-1,2	0,7	0,9-1,1	0,6	-----	-----	Ghosh & Jung (2017)

Siendo el precursor de la arserina, la carnosina y la histamina, la histidina adquiere relevancia debido a la respuesta de la histamina en reacciones alérgicas, y su destacado papel en la dilatación y contracción de los vasos sanguíneos (Peachey *et al.*, 2018). La arginina también está presente, y pese que para los adultos la arginina se considera un aminoácido necesario solo en algunas situaciones, para los niños es esencial. En este caso es imprescindible que la dieta aporte una cantidad adecuada para garantizar el desarrollo correcto del sistema inmunitario de los niños.

Así pues, todos los AAE se encuentran en el polen de abeja y estos oscilan entre el 12% y el 45,02% del contenido total de aminoácidos, lo que es comparable al suministro de aminoácidos esenciales (33,9%) según la proteína de referencia de la FAO (Komosinska-Vassev *et al.*, 2015; Thakur & Nanda, 2018).

2.9.5. Lípidos y Ácidos Grasos

Después de los carbohidratos y las proteínas, los lípidos son el tercer componente más importante en proporción del polen de abeja, siendo los lípidos fundamentales para la generación de la jalea real por parte de las abejas nodrizas (Sattler *et al.*, 2015).

El polen de algunas especies botánicas contiene un contenido total de lípidos que varía entre el 1 y el 13% del peso seco del polen (Campos *et al.*, 2008); sin embargo, Martins *et al.* (2011), Odoux *et al.* (2012), de Melo *et al.* (2018a) y Liolios *et al.* (2019) informaron de un contenido de lípidos aún mayor, hasta 13,32%, 24%, 13,50% y 13,60%, respectivamente. Los lípidos en mayor proporción en el polen apícola, son los triglicéridos, carotenoides y esteroides (Mărgăoan *et al.*, 2014; Sattler *et al.*, 2015).

Sin embargo, son pocas las investigaciones que se han centrado en el perfil de los esteroides en el polen de abeja (Mărgăoan *et al.*, 2014). La proporción y el nivel relativo de ciertos ácidos grasos son factores muy importantes para determinar la calidad de los lípidos, porque las abejas necesitan ácidos grasos para la reproducción, el desarrollo y la nutrición.

Tabla 7. Contenido promedio en ácidos grasos en polen en mg/100 mg de lípidos. Polen procedente de Colombia, Estados Unidos y China. Fuente: Zuluaga (2015 a).

	Colombia	Estados Unidos		China
	Fuenmayor <i>et al.</i> (2014)	Loper <i>et al.</i> (1980)	Ching & Ching, (1962)	Xu <i>et al.</i> (2009)
α – linolénico [C18:3n3]	25,68	18,71	31,5	38,6
Palmítico [C16:0]	11,33	26,46	13,4	20,0
Linoleico [C18:2n6c]	8,19	26,2	4,4	13,0
Láurico [C12:0]	4,61	0,9	6,1	
Oleico [C18:1n9c]	2,38	15,78	16,5	5,72
Esteárico [C18:0]	1,88	4,09	12,2	3,02
Homo- γ -linolénico [C20:3n6]	1,62			
Mirístico [C14:0]	1,33	0,22	1,8	4,97
Tricosanoico [C23:0]	1,17			
Rel. Ins/Sat	1,78	1,61	1,17	1,91

El polen de abeja posee casi 20 ácidos grasos, de C4 a C24, entre los que predominan los ácidos grasos ω -3. Los ácidos mirístico, esteárico y palmítico como los principales ácidos grasos saturados, mientras que los ácidos linolénico, linoleico y oleico son los ácidos grasos insaturados más frecuentes que se registran en el polen de abeja (Tabla 7).

Las propiedades bactericidas y antifúngicas de los ácidos linoleico, linolénico, mirístico y láurico obstaculizan principalmente la multiplicación de *Paenibacillus sp* (enfermedad bacteriana de la cría de abejas conocida como de la loque americana) y *Melissococcus pluton* (enfermedad bacteriana conocida como loque europea) las bacterias formadoras de esporas y otros

microorganismos que pueden colonizar los panales de cría, y contribuyen así a la higiene de la colonia (Dong *et al.*, 2015).

El ser humano también necesita lípidos debido a la fracción de ácidos grasos esenciales (AGE). Y los necesita principalmente para el crecimiento, el desarrollo y la prevención de enfermedades (Glick & Fischer, 2013). Muchas funciones biológicas requieren AGEs para regular los niveles de lípidos plasmáticos, la actividad de la insulina, la actividad cardiovascular, la función inmune, etc., asegurando una mejor salud. Glick & Fischer (2013), Kaur *et al.* (2014) y Conte *et al.* (2017) informan de una mayor cantidad de fosfolípidos, tocoferoles y fitosteroles, recomendando un proceso lipolítico intensivo como parámetro de caracterización del polen.

2.9.6. Fibra

La fibra dietética, se refiere a la porción del alimento que permanece intacto en todo el estómago e intestino, por lo que no tiene contribución desde el punto de vista nutritivo, pero es esencial para la salud humana. Las fibras dietéticas son básicamente de dos tipos: solubles e insolubles. La fibra dietética soluble (FDS) reduce los niveles de colesterol y glucosa en la sangre, mientras que la fibra dietética insoluble (FDI), también llamada almidón resistente, favorece el paso de alimentos a través del sistema digestivo, aumentando así el volumen de las heces y evitando el estreñimiento (Thakur & Nanda, 2020).

La fibra dietética proviene de la esporopolenina, la celulosa, la hemicelulosa y la pectina que se encuentran en la cubierta exterior del polen de abeja, mientras que el almidón y otros polisacáridos insolubles como la callosa, la celulosa, la lignina, etc. constituyen la fibra bruta. Sin embargo, los valores más altos y bajos de la fibra bruta se alteran considerablemente debido a los diversos métodos analíticos y a las fuentes vegetales (Thakur & Nanda, 2020).

El polen de abeja es una fuente de fibra útil para la alimentación, con la celulosa y la callosa como la principal porción. Por otra parte, Domínguez-Valhondo *et al.* (2011) estudiaron el polen español, no mostrando variaciones notables en su fibra dietética (14,50%-14,65% de peso seco) y sugirieron la exploración de la fibra del polen en los alimentos procesados para reducir la falta de fibra dietética.

2.9.7. Minerales

El contenido de minerales es esencial para mantener la protección de la célula, las actividades metabólicas, la homeostasis y la salud en general. Por ejemplo, el calcio (Ca), el fósforo (P) y el magnesio (Mg), en combinación, ayudan al desarrollo y mantenimiento del tejido óseo y regulan la presión osmótica de la sangre y de los fluidos intercelulares e intracelulares, mientras que el cobalto (Co), el cobre (Cu), el hierro (Fe), el manganeso (Mn) y el zinc (Zn) son cruciales para el crecimiento, el desarrollo, la función reproductiva y la formación de la sangre del cuerpo. Por lo tanto, la insuficiencia de estos bioelementos puede causar diversos trastornos metabólicos, defectos agudos de crecimiento e incluso provocar enfermedades mortales (Prashanth, 2015; Quintaes & Diez-García, 2015).

El polen de abeja posee un contenido de minerales que oscila entre el 2,5% y el 6,5%. El contenido de minerales se ve afectado en gran medida por muchos factores, principalmente el suelo, el clima, el origen geográfico y las especies botánicas, ya que las distintas especies de plantas, presentan diferentes capacidades de acumular sales minerales en su polen. Elementos como Ca, Cu, Cr, Fe, K, Mg, Mn, Na, P, y Zn han sido estudiados en el polen de abeja a nivel mundial y otros minerales como el boro (B), el molibdeno (Mb) y el selenio (Se) están raramente presentes en el polen de abeja de algunos orígenes florales, que oscilan entre 8,2-14, 0,1-4,6 y <0,01-4,5 mg/kg, respectivamente (Carpes, 2008; Yang *et al.*, 2013; Sattler *et al.*, 2016; Altunatmaz *et al.*, 2017).

Formicki *et al.* (2013) y Yang *et al.* (2013) han sugerido que el tipo de suelo de procedencia de la planta, es la principal causa de la variación en la composición mineral del polen. Otra razón importante de la variación de los minerales es la adición de néctar al polen, que puede alterar el nivel de ciertos minerales (Kostičet *et al.*, 2015). Sin embargo, el proceso de secado no mostró ningún efecto en la cantidad de Ca, Cu, K, Mg, Na, y Zn, según lo observado por de Melo *et al.* (2016).

2.9.8. Vitaminas

Las vitaminas son un grupo de compuestos orgánicos con diversos componentes bioquímicos, que ejercen múltiples funciones, y con una fuerte actividad antioxidante. Aunque las vitaminas se incluyen en la dieta humana en pequeñas proporciones, son microcompuestos vitales para el desarrollo y mantenimiento de la salud (Gey, 1998). Las vitaminas tienen un papel

importante para sintetizar los cofactores vitales, las enzimas y las coenzimas, que son los elementos integrantes de las diversas reacciones metabólicas (Mellidou *et al.*, 2019).

Las vitaminas se encuentran de forma natural en los alimentos, especialmente en verduras y frutas, en alimentos derivados de plantas, o como precursores o pro-vitaminas (Gey, 1998). Los efectos beneficiosos sobre la salud se correlacionan con su consumo diario óptimo. La escasez o el exceso de vitaminas interrumpe algunos procesos metabólicos, y en consecuencia, se pueden desencadenar diferentes enfermedades (Rizvi *et al.*, 2014). Por lo tanto, es necesaria una ingesta adecuada de todas las vitaminas para las funciones de las células y tejidos. Muchos son los estudios que han demostrado que el polen apícola es rico en vitaminas, con un contenido vitamínico ideal que puede satisfacer esta necesidad (de Oliveira *et al.*, 2009; de Melo & Almeida-Muradian, 2010; Tomás *et al.*, 2017).

El polen contiene vitaminas liposolubles (A, D, E, y K) y vitaminas hidrosolubles (complejos C y B), así como otras vitaminas, como la vitamina P o bioflavonoides (Khalifa *et al.*, 2020; Thakur & Nanda, 2020). El polen contiene vitamina E (de Oliveira *et al.*, 2009; Sattler *et al.*, 2015; Khalifa *et al.*, 2020), que es liposoluble, y se considera una vitamina antioxidante. La vitamina E se puede almacenar en el cuerpo, por lo que no se necesita una ingesta diaria. La vitamina E pertenece colectivamente a la familia de los tococromanos, (tocoferoles y tocotrienoles), y el polen contiene especialmente el grupo tocoferoles (α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol), siendo el α -tocoferol e γ -tocoferol los compuestos principales (Rizvi *et al.*, 2014).

La vitamina C, es otra vitamina que se encuentra en el polen apícola, soluble en agua, y con una marcada propiedad antioxidante. Su contenido en polen oscila entre los 14 y 797 microgramos por gramo ($\mu\text{g/g}$) (de Melo & Almeida-Muradian, 2010; Sattler *et al.*, 2015). La vitamina C juega un papel como cofactor en la síntesis de aminoácidos, colesterol, colágeno y algunas hormonas (Grosso *et al.*, 2013).

Por parte de la Comisión Internacional de la Miel (IHC), se sugirió que las especificaciones para la composición vitamínica del polen eran las siguientes: 0,6-1,3 miligramos por 100 g ($\text{mg}/100\text{g}$) de tiamina, 0,6-2 $\text{mg}/100\text{g}$ de riboflavina, 4-11 $\text{mg}/100\text{g}$ de niacina y 0,2-0,7 $\text{mg}/100\text{g}$ de piridoxina, mientras que el complejo vitamínico B también fue examinado por Mărgăoan *et al.* (2010) y se informa de los siguientes niveles de tiamina: 0,6-1,3

mg/100g, riboflavina: 0,6-2,0 mg/100g, niacina: 4,0-11,0 mg/100 g, ácido pantoténico: 0,5-2,0 mg/100g y piridoxina: 0,2-0,7 mg/100 g.

El origen botánico, la estación y las condiciones de elaboración afectan a la composición vitamínica (Farag & El-Rayes, 2016).

2.9.9. Polifenoles

Los compuestos polifenólicos se refieren a los principales metabolitos secundarios de las plantas, que van desde las antocianinas, los flavonoides, los flavonoles, las flavononas, los taninos, etc., hasta los ácidos fenólicos. Los compuestos fenólicos presentan varias propiedades biológicas. Tienen actividad antitumoral, antienvjecimiento, antiinflamatorio, antidiabético, anticancerígeno, ya que presentan una pronunciada actividad reguladora de mecanismos enzimáticos y la transducción de señales, eliminar los radicales libres, quelatar los iones metálicos y activar los factores de transcripción y la expresión de genes (Działo *et al.*, 2016).

La variación de las condiciones climáticas y el origen geográfico influyen en los niveles de compuestos fenólicos de las plantas (Tolić *et al.*, 2017). Cuando el polen se expone a condiciones de frío, habría una mejora en la biosíntesis de los flavonoides durante la generación y el crecimiento del polen (Rezanejad, 2012; Hani *et al.*, 2018).

La composición fenólica del polen de abejas de distintos países difiere en cuanto a su origen geográfico y botánico. La componen los flavonoides (apigenina, epicatequina, hesperetina, isorhamnetina, catequina, caempferol, luteolina, quercetina, naringenina, etc.) y los ácidos fenólicos (ácido clorogénico, el ácido ferúlico, el ácido cafeico, el ácido gálico, el ácido vanílico, el ácido sirínico, el ácido p-cumárico, etc...)

Los compuestos polifenólicos del polen de abeja protegen del estrés biótico (crecimiento microbiano) y abiótico (alta temperatura, síntesis de especies reactivas de oxígeno y radiación UV) por su capacidad de neutralizar los radicales libres.

2.9.10. pH y Acidez Valorable

El pH y la acidez valorable son factores críticos durante el almacenamiento del polen porque pueden influir en la estabilidad y la vida

útil. Ambos valores también indican la actividad microbiana dinámica en los alimentos (Nogueira *et al.*, 2012).

El aumento de los niveles de pH y acidez valorable en los alimentos se debe a la fermentación, en particular de las bacterias Gram positivas. El valor del pH varía entre 3,49 y 6,33, lo que demuestra la naturaleza ligeramente ácida natural del polen de abeja. El polen de abeja portugués, griego e indio presenta valores de pH casi similares de 4,3-5,2, 4,70 y 4,74-5,48, respectivamente (Feás *et al.*, 2012; Karabagias *et al.*, 2018; Thakur & Nanda, 2018). Sin embargo, la acidez libre oscila entre 128 y 294 miliequivalentes por kilogramo (meq/kg), lo que demuestra el carácter ácido del polen de abeja brasileño (Martins *et al.*, 2011), mientras que el polen de abeja colombiano tiene una acidez libre de 155 a 402 meq/kg (Fuenmayor *et al.*, 2014), lo que proporciona información sobre la conversión de los azúcares en ácidos orgánicos.

Sin embargo, la acidez libre no es apuntada por Campos *et al.* (2008) como índice de calidad del producto. Además, no se produce ninguna diferencia sustancial en el pH (4,11) y la acidez valorable (256,9 meq/kg) durante el secado (60 °C) del polen en comparación con el polen de abeja fresco (pH- 4,16; acidez valorable-245,6 meq/kg), pero la diferencia es significativa para ambas variables cuando el secado se lleva a cabo a 40 °C (pH - 4,02; acidez - 305,8 meq/kg) y 50 °C (pH - 4,04; acidez - 283,2 meq/kg). Esto indica que las temperaturas por debajo de 60 °C pueden soportar cierta actividad microbiana que aumenta la acidez valorable y disminuye los valores de pH debido a su acción metabólica (Zuluaga-Domínguez *et al.*, 2018).

2.10. Propiedades Físicas del Polen

2.10.1. Peso, Forma y Tamaño

El peso medio de los gránulos de polen de abeja es de aproximadamente 7,5 mg a 8 mg, que varía según la accesibilidad que tenga la abeja a la fuente polinífera durante su visita. El polen de una sola fuente floral puede ser significativamente diferente en forma y tamaño, lo que afecta a la eficacia del envasado de polen (Komosinska-Vassev *et al.*, 2015). Las plantas anemófilas proporcionan polen más ligero y seco, lo que da lugar a gránulos más grandes y sueltos, mientras que el polen corbicular procedente de las plantas entomófilas es más pequeño y compactado (Friedman & Barrett, 2009).

La cantidad de polen que una abeja puede recoger variará con las condiciones climáticas. Se estima que una abeja recoge unos 15 mg de polen por vuelo, como valor promedio. El número de viajes también variará a tenor de la climatología, pero se estima que pueden realizar hasta un máximo de 20 viajes por día, con 8 de promedio, en condiciones favorables (Serra *et al.*, 1985).

El polen fresco puede ser cilíndrico, redondo, triangular o acampanado, mientras que los gránulos de polen seco con un diámetro de 0,01-0,05 mm suelen ser esféricos o en forma de huso (Barene *et al.*, 2015).

Además, la textura de la superficie de los granos de polen proporciona un indicio de su composición botánica debido a la estructura y propiedades distintivas de la exina, que son representativas de determinadas especies de plantas (Wang & Dobritsa, 2018). Por ejemplo, el maíz (*Zea mays*) tiene una exina más espesa cubierta totalmente de tectum, la exina en el género *Brassica* es más delgada y tiene una superficie reticulada, y en el género *Hibiscus* contiene exinas densamente cubiertas de espinas de punta larga (Basarkar, 2017; Wang & Dobritsa, 2018).

2.10.2. Color

La calidad del polen puede juzgarse a grandes rasgos basándose en su color, que está vinculado a pigmentos vegetales como los carotenoides y las antocianinas, que se encuentran de forma inherente en diferentes concentraciones en el polen (Sattler *et al.*, 2015).

El color de un pellet de polen apícola, viene determinado fundamentalmente por el origen botánico de la planta de procedencia, pero puede estar modificado por el contenido de elementos minerales del néctar que la abeja utiliza para aglutinar el polen: a mayor riqueza de sales minerales, el gránulo de polen es más oscuro. También influye el contenido en agua, a mayor contenido en agua, los colores son más vivos. Otro factor a tener en cuenta es la exposición al sol, ya que cuando se expone al sol, los colores son más apagados. El ataque de los hongos, que lo oscurecen, y otros factores, influyen también en el color del polen (Serra *et al.*, 1985).

De forma general, cada pellet de polen va a presentar una coloración uniforme, al contener granos de polen de idéntico origen. De forma general, la abeja pecoreadora trabaja sobre una especie determinada. Pero esto no siempre es así, ya que pueden existir gránulos mixtos de dos o más tipos de

polen, de distinto origen floral. Según *Pérez et al. (1987)* en la mayoría de los casos en los que puede aparecer polenes distintos dentro de un mismo pellet, pertenecen a especies de un mismo género.

Sin embargo, el polen recogido de la misma fuente vegetal puede tener un color diferente y, a veces, el polen de abeja de varios orígenes botánicos puede tener un color similar. *Modro et al. (2009)* informaron de que esas diferencias se deben al estado de la flor.

El color también se ve afectado por la composición química, como lo revela el análisis instrumental del color que muestra la correlación entre los valores de color y los contenidos de Ca, Mg y Fe (*Yang et al., 2013*). Asimismo, los valores de color del polen brasileño fueron recomendados como índices por *de Melo et al. (2016)* para determinar el contenido fenólico total y el potencial antioxidante y antimicrobiano observando la correlación entre estos parámetros.

El brillo natural del polen de antera disminuye debido a la adición de humedad por parte de la abeja, particularmente el néctar, para formar un pellet de polen. El polen de abeja contiene todos los tonos de color, del blanco al negro (*Campos et al., 2021*).

El color que va a predominar en el polen es el amarillo, pero hay especies que lo tienen verde, castaño, azul o rojo (*Root, 1976*). En los años 80 del pasado siglo, *Cobo (1980)* realiza una valoración cromática de distintos pólenes de origen español, y determina el claro predominio de gránulos que varían del amarillo al naranja, con un especial acompañamiento de gránulos de color púrpura y azulado (*Echium sp.* y *Papaver sp.*).

Así mismo, en la Tabla 8, *Gómez (1984)* determina el color de los gránulos de polen, de acuerdo con las familias botánicas presentes.

Tabla 8. Relación entre el color del gránulo de polen y el género de la planta.
Fuente: Gómez (1984).

Color del gránulo de polen	Familia botánica
Naranja vivo y amarillo	<i>Cistaceae</i> y <i>Compositae</i>
Amarillo pálido	<i>Fagaceae</i>
Crema	<i>Ericaceae</i> , <i>Leguminoseae</i> y <i>Compositae</i>
Marrón	<i>Leguminoseae</i> y <i>Polygonaceae</i>
Violeta o púrpura	<i>Borraginaceae</i> y <i>Papaveraceae</i>
Gris al negro	<i>Escrofulariaceae</i> y <i>Liliaceae</i> (gris)

Para determinar el color del polen, se contrasta con la tabla internacional de colores (Pantone Color Formula Guide) (Figura 40) (Almagro, s.f. diapositiva 16).

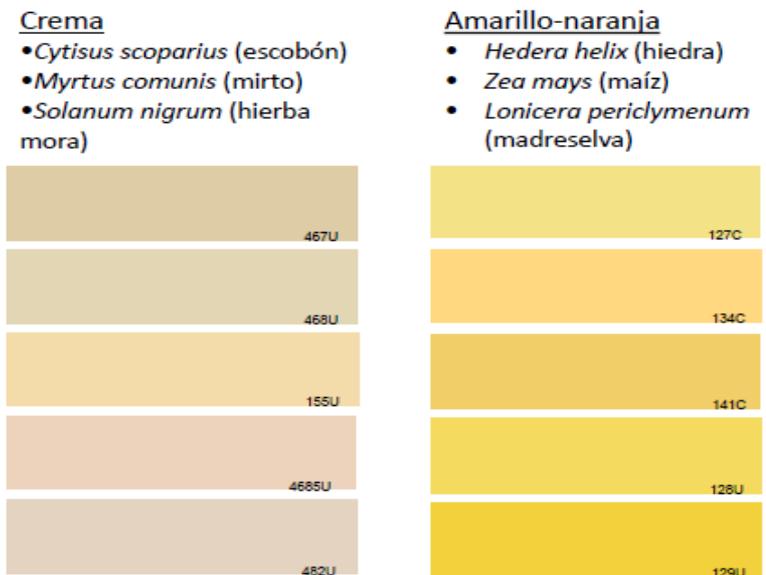


Figura 40. Pantone Color Formula Guide. Fuente: Almagro, s.f. diapositiva 16

Campos *et al.* (2021), proponen que solo pueden evaluarse muestras de color homogéneo, es decir, muestras de polen monofloral. Plantean la evaluación de color mediante el uso de una escala de clasificación de color visual de la Royal Horticultural Society (RHS) (2004) o similar, que representa un sistema de color universal, con los códigos respectivos del color.



Figura 41. Variedad de colores de las cargas de polen de diferentes especies de plantas. (a) gris- *Vicia faba*; (b) amarillo limón- *Brassica napus*; (c) gris oscuro- *Papaver rhoeas*; (d) azul – *Phacelia tanacetifolia*; (e) polen amarillo mezclado-polen mezclado de árboles frutales (*Prunus*, *Pyrus*, *Malus*) y naranja brillante- *Taraxacum officinale*. Fuente: Campos *et al.* (2021).

2.11. Marco Legal del Polen Apícola

En la actualidad existe un vacío legal, una falta de protección jurídica con respecto al polen apícola. Recientemente Campos *et al.* (2021), a tenor del desarrollo industrial de la producción del polen, apuntan la necesidad de una directiva internacional para el control de calidad, y proponen metodologías optimizadas que se basan en los conocimientos que se han desarrollado en el campo del polen, y que podrían utilizarse en un futuro para suplir esta carencia.

La miel sin embargo sí se encuentra respaldada por una normativa, y por el sector científico. Existe un conocimiento exhaustivo de las propiedades de la miel, del valor nutricional, y de su composición. La miel es un alimento que se encuentra registrado en el Codex Alimentario (2001) y existe a nivel europeo una Directiva, la 2001/110/CE relativa a la miel. A nivel español, existe una norma de calidad relativa a la miel, recogida en el R.D. 1049/2003 (Almagro, s.f. diapositiva 28).

El polen apícola no se haya definido en la Directiva relativa a la miel (2001/110/CE). Esta omisión, perjudica la aplicación de una política sectorial eficaz, frenando así las iniciativas de calidad y la lucha contra el fraude y la adulteración (Parlamento Europeo, 2018).

Existe una demanda, para que se modifique la Directiva 2001/110/CE relativa a la miel con el fin de establecer definiciones claras y exponer las principales características distintivas de todos los productos apícolas, como la miel monofloral y multifloral, el propóleo, la jalea real, la cera de abeja, el polen apícola, el pan de abeja y el veneno de abeja, tal como se exige en otros textos aprobados por el Parlamento Europeo (Parlamento Europeo, 2018).

La ausencia de una normativa específica con respecto a los productos apícolas, supone otra amenaza para el mercado apícola, y a la seguridad de la salud pública. En la actualidad, no existen estándares europeos para productos como el polen y la jalea real. Esto da lugar, a que puedan aparecer productos en el mercado con estas etiquetas sin ningún control de calidad. Por estos motivos, un grupo de centros de investigación europeos, asociaciones apícolas, y empresas del sector, procedentes de seis países europeos, empezaron a desarrollar un proyecto de investigación denominado Apifresh, cuyo fin era promover el consumo de productos beneficiosos para la salud, cuya procedencia era la apicultura. El objetivo primordial de este proyecto era dotar a los apicultores europeos de la ayuda científica y tecnológica necesaria para mejorar la calidad de la jalea real y del polen en Europa. Otro objetivo fundamental del proyecto, era promocionar una normativa que permitiera a los productos apícolas de Europa, mejorar las condiciones de competencia con los productos adulterados y de baja calidad, que en su mayoría eran procedentes de importaciones de fuera de la UE (Proyecto europeo FH7 APIFRESH, 2012).

El proyecto planteaba unos ambiciosos objetivos científicos y tecnológicos, cuyo fin era el desarrollo de un método que elaborara el estándar de calidad para el polen y la jalea real. La metodología desarrollada por el proyecto incluiría métodos analíticos que determinarían las propiedades sensoriales (olor, sabor y contaminantes visibles), la carga microbiológica, el contenido en agua, la presencia de metales pesados y pesticidas, y la composición química (Proyecto europeo FH 7 APIFRESH, 2012). Actualmente no existen unas conclusiones ni publicaciones de métodos analíticos por parte del proyecto Apifresh.

2.11.1. Antecedentes Legales

En la Legislación Española no se menciona al polen en el Código Alimentario Español de 1967. Se va a citar por primera vez en el R.D. 2685/1976 del 16 de octubre, por el que se va a aprobar la Reglamentación Técnico-Sanitaria para la Elaboración, Circulación y Comercio de Preparados Alimenticios para regímenes Dietéticos y/o Especiales. Dicho Real Decreto, actualmente derogado, en su Título segundo contemplaba las “condiciones de las industrias, de los materiales y del personal”. En su Artículo 7, fija los “Requisitos higiénico-sanitarios” y en el Artículo 12 determina las “Normas microbiológicas”, entre otras.

2.11.2. Situación Actual

De momento, no existe un requerimiento legal específico de los contenidos microbiológicos del polen, pero se le suelen aplicar los de los preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales (Tabla 9).

Tabla 9. Criterios microbiológicos de preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales. Fuente: Pajuelo Consultores Apícolas (s.f.)

Tipo de microorganismo	Carga microbiológica
Aerobios mesófilos	UFC/g <10.000
Coliformes, <i>Enterobacteriaceae</i> lactosa-positiva	Ausencia de UFC en 0,1g.
<i>E. coli</i>	Ausencia en 1 gramo
Mohos y levaduras	UFC/g <50.000
<i>Clostridium</i> sulfito-reductores	Ausencia de UFC/g.
<i>Streptococcus aureus</i>	Ausencia de UFC/0,1g.
Estafilococos DNAsa(+)	Ausencia en 1 g

Desde el punto de vista comercial, algunos compradores piden los límites del R.D. 2685/1976 (derogado) sobre Reglamentación de preparados alimenticios para regímenes dietéticos, en el que los límites máximos admitidos se exponen en la Tabla 10.

Tabla 10. Límites de distintos tipos de microorganismos según el R.D. 2685/1976 (derogado). Fuente: Pajuelo Consultores Apícolas (s.f)

Tipo de microorganismo	Límite del R.D. 2685/1976
Aerobios mesófilos	Máximo 50.000 UFC/g
Coliformes, <i>Enterobacteriaceae</i> lactosa-positiva	Ausencia en 0.01 g
<i>E. coli</i>	Ausencia en 1 g
Mohos y levaduras	Máximo 300/g
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia en 30 g

O también los de la *Pharmacopea Europaea* III.5.1.4, en la que el criterio microbiológico para preparaciones farmacéuticas de aceptación se refleja en la Tabla 11.

Tabla 11. Criterios microbiológicos de *Pharmacopea Europaea* III. 5.1.4. Fuente: Pajuelo Consultores Apícolas (s.f.)

Tipo de microorganismo	Límite <i>PharmacopeaEuropaea</i> III.5.1.4.
Aerobios mesófilos	< 50.000 UFC/g
Coliformes, <i>Enterobacteriaceae</i> lactosa-positiva	< 5.000 UFC/g
<i>E. coli</i>	Ausencia en 1 gramo
Mohos y levaduras	< 50.000 UFC/g
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia en 10 g

El contenido en *Salmonella sp* es un parámetro importante, por sus posibles consecuencias sobre la salud humana. Por ello, desde hace algunos años, los compradores están de acuerdo en pedir ausencia de *Salmonella* en 25 g (Pajuelo Consultores Apícolas, s.f.). Por su parte, Campos *et al.* (2008), sugirieren a su vez una serie de valores microbiológicos, siguiendo los

métodos y niveles de la A.O.A.C. (Association of Analytical Communities) (Tabla 12).

Tabla 12. Valores microbiológicos sugeridos por Campos *et al.* (2008).

Tipo de microorganismo	Valores microbiológicos
Mohos y levaduras	< 50.000 UFC/g
Aerobios mesófilos	< 100.000 UFC/g
<i>Enterobacteriaceae</i>	Máximo de 100 en 1 g
<i>E. coli</i>	Ausencia
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausencia en 1 g
<i>Salmonella sp.</i>	Ausencia en 10 g

2.12. El Sector Apícola en la UE y en España

El Informe sobre las Perspectivas y Desafíos para el Sector Apícola de la UE, realizado por la Comisión de Agricultura y Desarrollo Rural, establece al sector apícola como parte integrante de la agricultura europea, y en la UE representa a más de 620.000 apicultores, considerando que la apicultura está muy extendida como afición o para consumo propio, pero también como actividad profesional (Parlamento Europeo, 2018)

Así mismo, el sector apícola es esencial para la UE y contribuye de manera significativa a la sociedad, tanto desde el punto de vista económico (supone aproximadamente 14.200 millones de euros al año) como desde el punto de vista ambiental, manteniendo el equilibrio ecológico y la diversidad biológica, habida cuenta de que un 84% de las especies vegetales y un 76% de la producción de alimentos dependen de la polinización efectuada por las abejas domésticas y salvajes (Parlamento Europeo, 2018).

Las abejas y los demás polinizadores efectúan la polinización favoreciendo la reproducción de numerosas plantas cultivadas y silvestres, garantizando la producción y seguridad alimentarias y preservando de manera gratuita la biodiversidad en Europa y en el mundo. En la UE la polinización es un fenómeno que a menudo se da por sentado y cuya importancia no se reconoce lo suficiente, mientras que en Estados Unidos, por ejemplo, se

destinan 2.000 millones de euros anuales a la polinización artificial. Europa alberga aproximadamente el 10 % de la diversidad mundial de abejas. Según el Instituto Nacional Francés de Investigación Agronómica, la mortalidad de las abejas supondría un coste de 150.000 millones de euros, el equivalente al 10 % del valor de mercado de los alimentos, lo que demuestra la necesidad de proteger a los insectos polinizadores (Parlamento Europeo, 2018).

Estudios de la FAO demuestran que el aumento de la densidad y la variedad de insectos polinizadores tiene una repercusión directa en la productividad de las cosechas y que, a escala global, puede ayudar a los pequeños agricultores a aumentar su productividad media en un 24 % (Parlamento Europeo, 2018).

En España, la apicultura es una actividad ganadera con características muy diferentes a las del resto de sectores, estando generalmente instalada en zonas donde no pueden hacerlo otras actividades agrarias. Tiene un papel esencial en el mantenimiento del medio rural, así como en la polinización de las floraciones silvestres y los cultivos. El conjunto de la actividad apícola (sobre todo miel, polen y cera, aunque se está experimentando un importante auge de otros productos) representa en su conjunto el 0,44% sobre la producción final ganadera y el 0,17% de la producción final agraria. Además del interés económico de los productos apícolas, la apicultura juega un importante papel medioambiental, contribuyendo al equilibrio ecológico, la conservación de los ecosistemas, al mantenimiento de la biodiversidad y a la fijación de la población en el medio rural (Plan nacional de medidas de ayuda a la apicultura. España 2020-2022. 2021).

En los últimos años el sector viene manteniendo un crecimiento constante, tanto en el número de colmenas, de explotaciones y de apicultores. En el ámbito comunitario España destaca por su censo de colmenas (alrededor del 16% de las colmenas de la UE), así como por el hecho de que el 80% de las colmenas españolas se encuentra en manos de apicultores profesionales (aquellos que gestionan más de 150 colmenas).

El grado de profesionalización de la apicultura en España es el más alto de toda la UE con alrededor de un 18% de apicultores profesionales. Este perfil, unido a datos productivos y de comercio exterior de gran relevancia refleja la importancia del sector apícola español (Plan nacional de medidas de ayuda a la apicultura. España 2020-2022. 2021).

Las colmenas censadas en España, basándonos en el Registro de Explotaciones Apícolas en España (REGA, abril 2021) para la campaña del 2021 ascienden a 3.049.065 colmenas, lo que supone un ligero descenso del 1,7% respecto al 2020. En la Figura 42, se ofrece la distribución del número de colmenas por Comunidades Autónomas (CCAA) en el año 2021 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA), 2021).

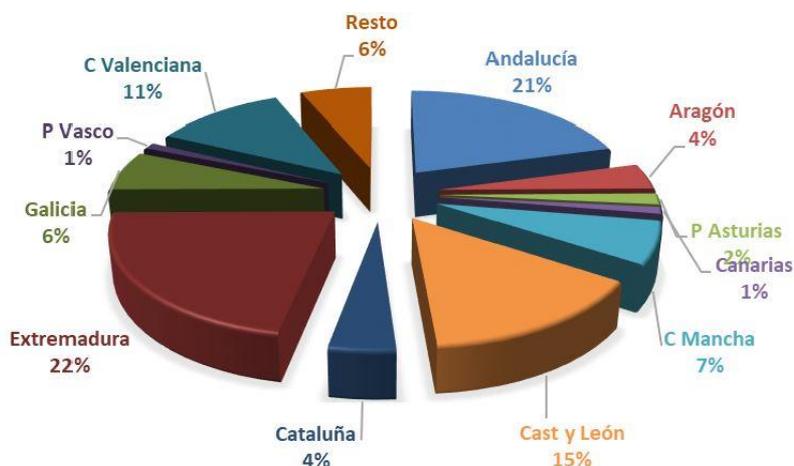


Figura 42. Gráfico de porcentaje de distribución del número de colmenas por CCAA en España. Fuente: MAPA (2021)

En España se encuentran censados según el REGA de marzo del 2021 unos 35.300 apicultores, aumentando en un 4,3% el número con respecto al ejercicio anterior. El número de explotaciones apícolas ha registrado un aumento en torno al 47% en el periodo 2010/2021. Hay que destacar la diversidad existente en las distintas CCAA. Hay de hecho dos apiculturas distintas: en la zona norte y noreste se caracteriza por el alto grado de aficionados y de pequeños apicultores no profesionales, que en su mayoría no practican la transhumancia. Sin embargo, en la actividad apícola practicada en el centro y sureste de la península, tiene un mayor grado de profesionalización y es mayoritariamente transhumante (MAPA, 2021).

2.13. Perspectivas del Mercado del Polen Apícola a Nivel Mundial y Nacional

En el año 2015, el valor de las exportaciones a nivel mundial alcanzó una cifra ligeramente superior a los 300 millones de dólares (M\$). Esta cifra se ha ido incrementando año tras año, llegando a superar los 900 M\$ en el año 2020 (Figura 43).

Debido a la tendencia de aumento de consumo del polen apícola, las perspectivas del mercado global de este producto hacen prever que el valor

de las exportaciones del polen a nivel mundial alcance una cifra de muy superior a los 1000 M\$ para el 2026 (Tridge, s.f.).

Los inversores son bastante optimistas sobre la industria del polen de abeja debido a una mayor sensibilización de la población para su consumo. Además, aparecen otros mercados emergentes como son los países en vías de desarrollo, especialmente las regiones de América Latina, África y Oriente Medio, donde se pretende introducir suplementos de polen (Profshare Market Research, s.f.).

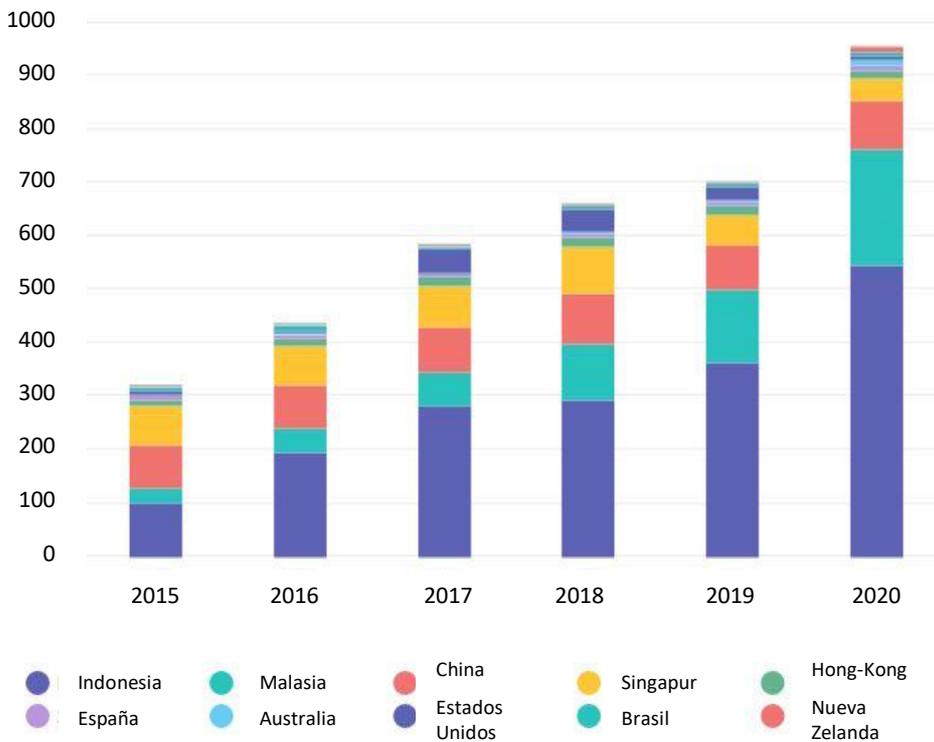


Figura 43. Incremento por países del valor de las exportaciones a nivel mundial en en M\$. *Nota:* los principales países exportadores están identificados en la leyenda inferior. Fuente: Tridge, s.f.

En el mercado mundial del polen, los países asiáticos como Indonesia, Malasia, China, Singapur y la Región Administrativa Especial de Hong Kong (de la República Popular China) son los principales exportadores y ocupan el 90,77% de la participación en el valor de las exportaciones en 2020 (Tabla 13) (Tridge, s.f.).

Tabla 13. Rango de países exportadores de polen apícola en 2020. *Nota:* El valor de las exportaciones se expresa en millones de dólares (M\$). Fuente: Tridge, s.f.

Rango	País	Participación en el valor de las exportaciones en 2020	Valor de las exportaciones	Crecimiento del valor de las exportaciones en el periodo 2019-2020
1	Indonesia	54,42%	544,73 M\$	+49,57%
2	Malasia	21,67%	216,94 M\$	+60,38%
3	China	9,1%	91,10 M\$	+10,72%
4	Singapur	4,15%	41,49 M\$	-27,59%
5	Hong-Kong	1,43%	14,32 M\$	-13,7%
6	España	1,25%	12,47 M\$	+36,82%
7	Australia	0.87%	8,66 M\$	+134,78%
8	Estados Unidos	0.79%	7,93 M\$	-66,92%
9	Brasil	0.76%	7,65 M\$	+52,97%
10	Nueva Zelanda	0.74%	7,44 M\$	+203,29%

Así mismo, el principal importador en 2020 fue China con un valor de importación de casi 547 millones de dólares. Otros países como Tailandia o Países Bajos, tienen una participación elevada en dicho valor de importación. El primer país americano en valor de importación es Estados Unidos, siendo Francia el segundo país europeo en participación en dicho valor (Tabla 14) (Tridge, s.f.).

Tabla 14. Rango de países importadores de polen apícola en 2020. *Nota:* El valor de las importaciones se expresa en millones de dólares (M\$). Fuente: Tridge,s.f.

Rango	País	Participación en el valor de las importaciones en 2020	Valor de las importaciones	Crecimiento del valor de las importaciones en un año 2019-2020
1	China	56,02%	546,93M\$	+65,47%
2	Hong Kong	15,01%	146,57 M\$	-22,32%
3	Singapur	5,58%	54,46 M\$	-35,79%
4	Tailandia	4,23%	41,32 M\$	-60,57%
5	Países Bajos	2,81%	27,44 M\$	-0,6%
6	Estados Unidos	2,52%	24,59 M\$	+8,45%
7	Taiwán	1,26%	12,32 M\$	-8,66%
8	Macao	1,11%	10,80 M\$	-45,58%
9	Francia	1,02%	9,96 M\$	+21,85%
10	Vietnam	1%	9,75 M\$	-54,6%

La compañía neozelandesa Comvita©, ocupa el primer lugar en términos de participación en los ingresos en el mercado mundial de polen de abeja, ocupando el 1,68% del mercado mundial en 2016. Y la compañía norteamericana Stakich©, con una cuota de mercado del 1,57%, ocupa el segundo lugar. Salvo estas empresas multifuncionales, la característica fundamental y que define al sector del polen de abeja, es la gran cantidad de productores individuales de polen de abeja a pequeña escala en todo el mundo. Es un sector muy atomizado, y la atomización va a ser una de las singularidades principales del mercado (Profshare Market Research, s.f.).

La producción apícola en España se sitúa en un nivel consolidado, en cuanto a que nuestro país es uno de los líderes en producción y exportación de productos apícolas, tanto a nivel europeo como mundial, con una participación en el valor mundial de las exportaciones de polen apícola en

2020 del 1,25% y con un crecimiento del valor de las exportaciones en el periodo 2019-2020 del 36,82% (Tabla 13).

En la actualidad, esta posición de liderazgo proyecta un gran potencial para los diversos productos de la colmena, y su valor agregado. Productos apícolas, como el polen, el propóleo, jalea real, la cera de abeja, y la apitoxina, desde el punto de vista económico, pueden ser muy interesantes, a pesar de que ocupan un volumen de producción muy inferior respecto al producto estrella de la colmena, que es la miel (Almagro s.f. Diapositiva 36). Si bien en España el consumo de polen apícola es reducido, la mayor parte de la producción de nuestro país es exportada principalmente a países de la UE. Entre estos países destacan Alemania y Francia, con un valor de exportación de 2,13 M\$, y 2,85 M\$ respectivamente. Estados Unidos es otro país destacado en cuanto al valor de exportación (Tridge,s.f.).

Entre las comunidades autónomas españolas con una mayor producción de polen apícola destaca Extremadura con un 44%, Castilla y León con un 38%, seguida de Andalucía con un 9%, y Castilla La Mancha con un 6%. El 3% restante de la producción, se reparte entre el resto de las comunidades autónomas españolas (Almagro, s.f. Diapositiva 36) (Fig. 44).

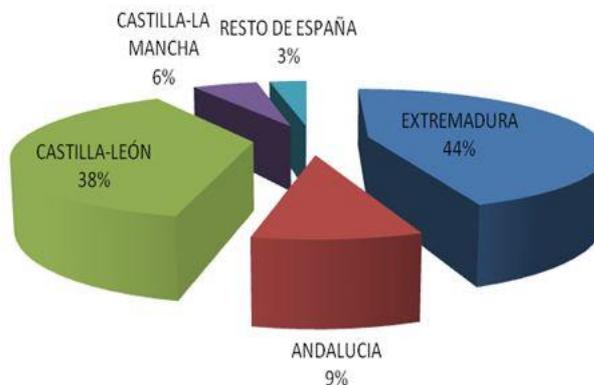


Figura 44. Distribución de la producción de polen por Comunidades Autónomas (CC.AA.). Nota: Elaboración propia, tomando como fuente Almagro s.f. Diapositiva 36

En España, y según apuntó el Plan Nacional de Medidas de Ayuda a la Apicultura (2021), las cotizaciones en la campaña 2017/2018 ascienden del orden del 9,67% en el polen a granel, y de un 8,04% en el polen envasado (Fig. 45).

Factores de Influencia en la Calidad Microbiológica del Polen Apícola

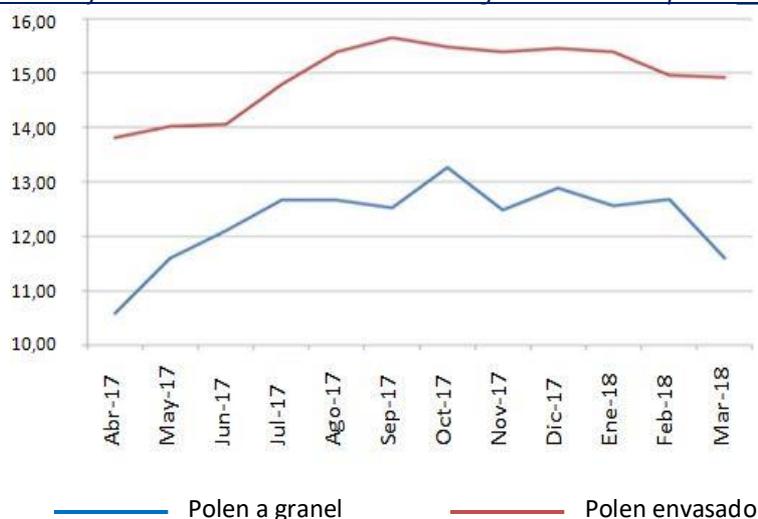


Figura 45. Evolución de precios del polen en Euros/kg (€/kg) en el periodo de Abril del 2017 a Marzo del 2018. Fuente: SG Estadística. MAGRAMA. Actual MAPA.

En cuanto a su evolución en las últimas campañas, las cotizaciones del polen registran subidas desde febrero de 2017, si bien, el año 2018 lo inician con descensos que continúan en el 2019 (-14,88% en el polen a granel y -5,05% en el polen envasado). Los descensos de precios de la campaña 2018/2019 se destacan aún más en la campaña 2019/2020 con un -41,52% en polen a granel, y -32,62% en el polen envasado (Figura 46).

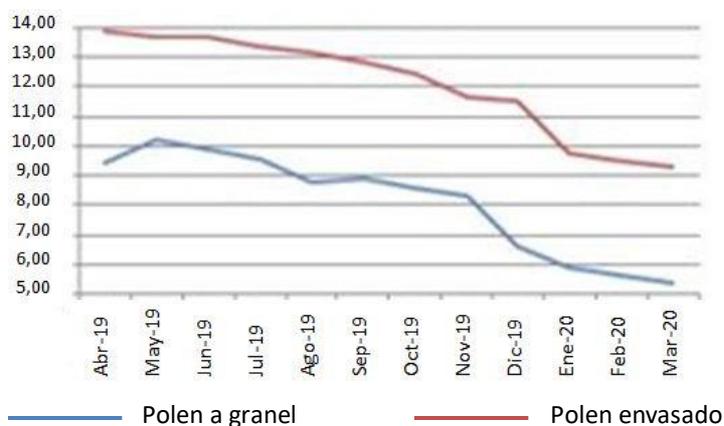


Figura 46. Evolución de precios del polen (Abril 2019-Marzo 2020) en €/kg. Fuente: SG Estadística MAPA

En la última campaña 2020/2021, las cotizaciones del polen registran subidas importantes (Tabla 15). Un incremento del 15,27% en el polen a granel en marzo de 2021 respecto a abril 2020 (0,84 €/kg más) y un

incremento del 16,86% en el polen envasado en marzo de 2021 respecto a abril 2020 (1,62 €/kg más) (Unión de Uniones de Agricultores y Ganaderos, 2021).

Tabla 15. Evolución de precios del polen en la temporada 2020-2021. Fuente: www.uniondeuniones.org

TIPOS DE POLEN	Abr 20 (€/kg)	Mar-21 (€/kg)	Mar 21/Abr 20. En %	Mar 21/Abr 20. En €/kg
Polen a granel	5,5	6,34	15,27%	0,84
Polen envasado	9,5	11,12	16,86%	1,62

En la Figura 47, se muestra la evolución de precios del polen desde Abril del 2020 a Marzo del 2021.

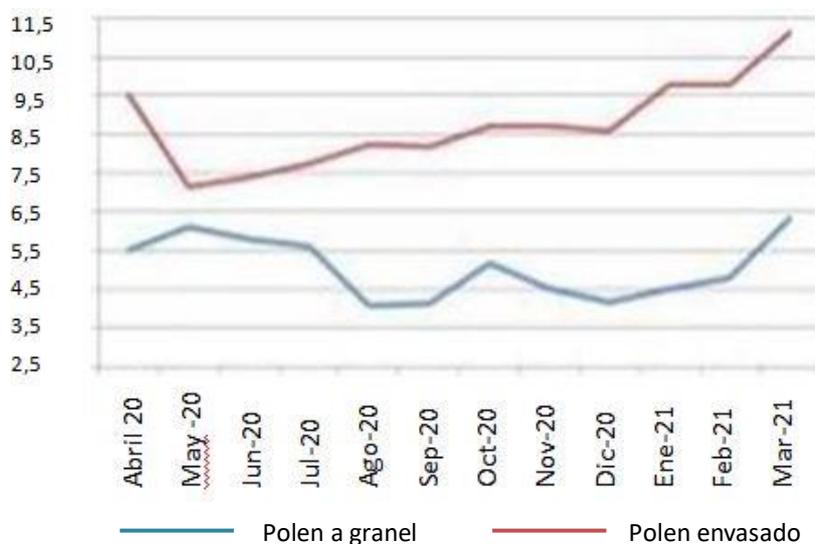


Figura 47. Evolución precios en €/kg del polen (Abril 2020-Marzo 2021). Fuente: SG Estadística. MAPA

En la Figura 48 se puede observar como los pronunciados descensos del precio del polen desde el último trimestre del 2017 cambian a subidas desde el inicio de esta última campaña 2020-2021.

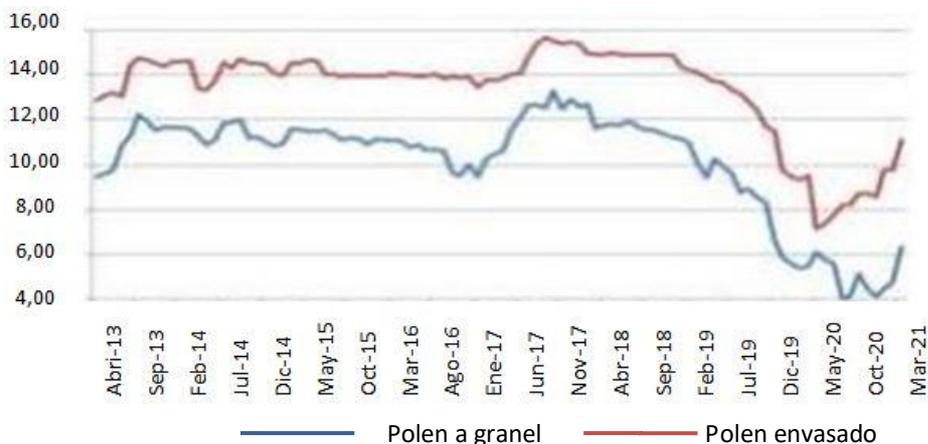


Figura 48. Evolución de precios del polen (Abril 2013-Marzo 2021). Fuente: SG Estadística. MAPA

El Programa Nacional de Medidas de Ayuda a la Apicultura España 2020-2022, refleja en un estudio económico dos modelos que se pueden considerar característicos de las particularidades de producción en nuestro país. Se trata de dos explotaciones profesionales de 500 colmenas. Una de ellas realiza venta de miel al por mayor y la otra desarrolla la venta de miel y polen, también al por mayor. En la primera, el rendimiento neto se sitúa en 13.219,06 €, lo que supone un 45,76% de la renta de referencia (que en 2019 se fija en 28.884,88 €). El 65,01% de los ingresos de esta explotación corresponden a la venta de miel. El coste de producción de la miel se sitúa en 2,92€/kg. En cambio, en la segunda, con venta de miel y polen, el rendimiento neto es de 19.582,61 € (67,69% de la renta de referencia), de los que el 29,52% corresponden a los ingresos de venta de miel y el 39,65% a los ingresos derivados del polen. El coste de producción de la miel se sitúa en 2,73€/kg y el del polen en 6,68 €/kg. Por tanto, es evidente la necesidad de aprovechar la diversificación de la producción apícola (Plan nacional de medidas de ayuda a la apicultura. España 2020-2022. 2021).

2.14. Polen de Abeja: Perspectivas de Futuro

La demanda de polen de abeja está aumentando entre la población debido al interés en mantener los estándares de salud y también en la acción para proporcionar una nutrición de bajo volumen y alta intensidad. En el mercado mundial de alimentos y bebidas, la demanda de polen de abeja está aumentando en los suplementos nutricionales y productos de suplementos

dietéticos. La reducción de la artritis y el nivel de colesterol se atribuye a la aplicación de polen de abeja. En el mercado mundial del polen de abeja, América del Norte y Europa tienen una estimable participación en la producción y el consumo de polen de abeja debido a la presencia del polen en suplementos dietéticos y nutracéuticos. Además, las estrategias promocionales comerciales ayudan a incrementar la conciencia sobre los beneficios para la salud entre los consumidores ([Transparency market research, s.f.](#)).

2.15. Demanda Creciente del Polen de Abeja en la Industria Farmacéutica y Nutracéutica

En el mercado mundial de polen de abeja, la demanda está creciendo a un buen ritmo en la industria farmacéutica, alimentaria y nutracéutica siendo en esta última, donde el requerimiento de este producto aumenta a un ritmo creciente. El nutracéutico es uno de los sectores más rápidos de desarrollo de la industria alimentaria en términos de innovación, incremento y marketing, creando situaciones proclives para la progresión del mercado de polen de abeja. La demanda de polen está aumentando, debido a la creciente preferencia de los consumidores por los suplementos dietéticos naturales, que nutren y a su vez protegen contra enfermedades crónicas como la artritis ([Transparency market research, s.f.](#)).

2.16. Valor Nutricional

Hoy en día los consumidores preocupados por la salud prefieren consumir los productos de valor añadido, que permiten sustituir los ingredientes alimentarios convencionales, por un componente de alto valor nutritivo, complementando así los productos procesados existentes. La dieta humana debería proporcionar la energía y los nutrientes esenciales, necesarios para el desarrollo y la salud física y mental en cantidades que cumplan las normas ([Kieliszek et al., 2017](#)).

Debido al excelente perfil de nutrientes, el polen de abeja puede complementar y proporcionar a la dieta humana una importante ingesta diaria de nutrientes. La composición media del polen de abeja, examinada por [Camposet al. \(2008\)](#), y reflejada por [Zuluaga \(2015a\)](#) en la Tabla 16, se compara con las necesidades nutricionales de un adulto medio.

Tabla 16. Composición del polen y necesidades nutricionales del ser humano. Realización del autor tomando como fuente Zuluaga (2015a).

Componentes principales	Cantidad(g.kg⁻¹)	% IDR para 15 g de polen	R.D.I.
Carbohidratos			
Fructosa, glucosa, sacarosa	130–550	1-46	320
Fibra bruta	3-200	0,3-18	30
Proteína	100-400	5,4-22	50
Grasa	10-130	0,1-4	80
Vitaminas			
Ac. Ascórbico (Vit. C)	0,07-0,56	2-15	100
β Caroteno (provitamina A)	0,01-0,20	30-600	0,9
Tocoferol (Vit. E)	0,04-0,32	8-66	13
Niacina (Vit. B ₃)	0,04-0,11	7-20	15
Piridoxina (Vit. B ₆)	0,002-0,007	4-13	1,4
Tiamina (Vit. B ₁)	0,006-0,013	15-32	1,1

Nota. La composición de los hidratos de carbono procede de Campos *et al.* (2008) y la de los minerales de Bogdanov (2014). La ingesta diaria requerida (IDR) proviene de los informes del Comité Científico para la Alimentación, 2010. Se han asumido los valores medios de la IDR. La IDR se indica en g.día⁻¹ para los hidratos de carbono y en mg.día⁻¹ para las vitaminas y los minerales.

El aporte de carbohidratos y grasas es comparativamente pequeño; sin embargo, la fibra y la proteína crudas pueden contribuir significativamente hasta el 60% y el 70% de la IDR, respectivamente, en función de la fuente floral y la ubicación.

Además, la ingesta diaria de 50 g de polen de abeja proporciona todas las vitaminas esenciales (excepto la piridoxina y el ácido pantoténico) y los minerales (excepto el calcio) suficientes para cumplir con el requisito de más del 50% de la IDR.

2.17. Aplicaciones Terapéuticas del Polen

Respecto a sus propiedades terapéuticas, en Europa, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (European Food Safety Authority - EFSA) afirma que no se ha investigado lo suficiente, y no se han llevado los suficientes ensayos clínicos que demuestren sus bondades, por lo que no se pueden afirmar sus beneficios. Es necesario llevar a cabo una investigación

más profunda y se requieren más estudios clínicos (Almagro, s.f. Diapositiva 24)

El polen de abeja no se ajustó a las declaraciones de salud con arreglo al Reglamento (CE) Nº 1924/2006 de la UE de la EFSA (Mateescu, 2011; Onisei *et al.*, 2018). Tan solo en Alemania ha reconocido por la German Federal Board of Health al polen de abeja como un nutraceutico (Campos *et al.*, 2003). En el resto de países de la Unión Europea no se considera como tal (Almagro, s.f. Diapositiva 24).

El polen de abeja es un valioso producto apiterapeutico, muy apreciado por la medicina natural debido a sus aplicaciones médicas. Demuestra una serie de acciones como antifúngica, antimicrobiana, antiviral, antiinflamatoria, hepatoprotectora, inmunoestimulante, anticancerosa y de analgésico local (Komosinska-Vassev, 2015). También facilita el proceso de la cicatrización de heridas producidas por quemaduras (Kroyer & Hegedus 2001; Almaraz-Avarca *et al.*, 2004).

Estudios farmacológicos experimentales, realizados en ratas y conejos, mostraron que el polen tiene una actividad hipolipidémica, disminuyendo el contenido de lípidos totales del plasma y triacilglicerolos. Además, la disminución en la concentración de lípidos en suero se correlacionó con el contenido de hormonas tales como la insulina, testosterona y tiroxina (Júzwiak *et al.*, 1989; Manning, 2001).

Los estudios clínicos realizados, confirmaron la actividad hipolipidémica del polen, disminuyendo el contenido de las sustancias lipídicas en el suero sanguíneo de pacientes del 20 al 35% (Kassyanenko *et al.*, 2010). En pacientes con arteriosclerosis, con miopía significativa y atrofia óptica parcial, el polen disminuyó el nivel de colesterol en el suero sanguíneo y aumentó el campo de visión, favoreciendo una mayor agudeza visual (Machoy-Mokrzynska *et al.*, 1992).

El polen y sus extractos, especialmente los solubles en grasa, se aplican con éxito en las condiciones post-infarto, así como en los trastornos de la circulación sistémica y la hipertensión arterial. Por otra parte, pequeñas dosis de polen dado a personas de avanzada edad, permiten tanto la inhibición de los cambios ateroscleróticos de los vasos sanguíneos, y la mejora del flujo sanguíneo cerebral (Wang *et al.*, 1987). La actividad hipoglucémica del polen se atribuye principalmente a la presencia de ácidos grasos insaturados, fosfolípidos y fitoesteroles. Además se confirmó una disminución

de la capacidad de agregación plaquetaria y un aumento de la actividad del sistema fibrinolítico en las personas que toman polen. Indica el efecto antiaterosclerótico que protege de las enfermedades del corazón y los accidentes cerebrovasculares (Samochowiec & Wójcicki, 1981). Se requieren más estudios sobre las vías metabólicas y las interacciones biomédicas para establecer la bioactividad del polen de abeja en el control de las funciones corporales y la prevención de enfermedades. Impulsar la práctica clínica y fomentar la búsqueda de productos de polen de abeja juega un papel importante en el fomento de futuras innovaciones y posibles aplicaciones (Khalifa *et al.*, 2021).

2.18. Aplicaciones en la Industria Alimentaria

Por sus reconocidas propiedades nutricionales y terapéuticas, el polen de abeja se suele consumir como suplemento dietético natural, ya sea en forma fresca o seca. Recientemente, el camino de la investigación se centra en la utilización del polen de abeja en los sistemas alimentarios, no sólo como un ingrediente nutritivo, sino también como un componente funcional para mejorar las características de calidad del producto (Takhur & Nanda, 2020).

Yerlikaya (2014) incorporó el polen de abeja a las bebidas lácteas fermentadas e informó de que el polen mostraba actividad antimicrobiana cuando se añadía en el rango de 10-20 mg/ml. La suplementación de las bebidas fermentadas con polen también mejoró la viabilidad probiótica y la viscosidad de la bebida sin afectar los atributos sensoriales. De manera similar, la leche de acidófilos y el yogur probiótico también se enriquecieron con polen de abeja, con lo que aumentó la producción de ácido láctico, independientemente del nivel de grasa (Glušac *et al.*, 2015).

El uso de polen de abeja en los productos de panadería es una tendencia. Krystyjan *et al.* (2015) fortificaron galletas. Al sustituir la harina de trigo por un 10% de polen de abeja, las galletas preparadas contenían niveles significativamente mayores de proteína, azúcar, minerales, polifenoles, fibra y potencial antioxidante; sin embargo, se necesitaba un 5% de polen para proporcionar un sabor similar al de las muestras de control de las galletas.

Por otra parte, Conte *et al.* (2018) complementaron el pan sin gluten con polen de abeja, mostrando una mejora de las propiedades tecnofuncionales, y un aumento de la aceptabilidad organoléptica general del pan sin que se destruyera el desarrollo de la masa y los atributos de la levadura cuando se enriquece con polen de abeja al 3-5%. Estos estudios

pueden servir de base para seguir explorando el polen de abeja como un ingrediente prometedor en otros productos de panadería.

Algunos estudios recientes recomendaron el polen de abeja como sustituto antioxidante natural para inhibir la oxidación de la grasa en la morcilla y las salchichas de cerdo refrigeradas, y lo que se atribuye al mayor potencial antioxidante son los niveles más altos de compuestos fenólicos (de DeFlorio Almeida *et al.*, 2017; Anjos *et al.*, 2019a).

Recientemente, ha sido publicado un estudio de Novaković *et al.* (2021) para determinar si la adición de diferentes concentraciones de polvo de polen (0, 0,5, 1 y 1,5 g/100g) a las salchichas estilo Frankfurt tenía influencia sobre el potencial antioxidante y los cambios oxidativos durante el almacenamiento, sin afectar la calidad de las salchichas. Después del almacenamiento en frío de las salchichas se lograron reducciones de poblaciones de bacterias psicrotróficas con mayores cantidades de polen (1,0 y 1,5 g/ 100 g), y se lograron buenas propiedades antioxidantes. En cuanto a los parámetros de calidad, se obtuvieron cambios estadísticamente significativos en cuanto al color, pero sin alterar otras características sensoriales de los productos. Además, la incorporación de polen no provocó cambios en términos de análisis del perfil de textura de las salchichas. Concluyeron que el componente natural, el polvo de polen de abeja, se puede usar como antioxidante en las formulaciones de salchichas, pero se necesitan más estudios para estimar si puede el polen ser un reemplazo adecuado de los antioxidantes sintéticos.

Karabagias *et al.* (2018) informaron de un aumento del contenido fenólico total y de la capacidad antioxidante del yogur de polen de abeja, además de la mejora de la cohesión del producto final y de las características organolépticas.

Así pues, las aplicaciones del polen de abeja en los productos alimenticios se basan en una garantía completa de su valor nutritivo, sus compuestos bioactivos, sus tecno-funcionalidades, y sus atributos organolépticos. También es necesario comparar el efecto de la adición del polen de abeja mono y multifloral a los productos alimenticios para comprender mejor el impacto de la fuente botánica en la calidad del producto (Thakur & Nanda, 2020).

2.19. Efectos Adversos

La ingesta de polen de abeja es muy recomendable como suplemento dietético natural debido a sus extraordinarios nutrientes alimenticios y saludables; sin embargo, también hay una serie de riesgos asociados a su ingesta debido a la presencia de posibles contaminantes como toxinas bacterianas y fúngicas, metales pesados, plaguicidas y reacciones alérgicas (Thakur & Nanda, 2018). Unas malas y antihigiénicas condiciones de producción y almacenamiento del polen de abeja pueden favorecer el deterioro microbiano debido al desarrollo de levaduras, mohos, bacterias ácido lácticas y enterobacterias, que crecen de forma óptima a temperaturas moderadas. El incremento de microorganismos aumenta el riesgo para la salud relacionado con la ingesta de polen fresco, mientras que el polen de abeja después del secado se considera microbiológicamente seguro (Mauriello *et al.*, 2017).

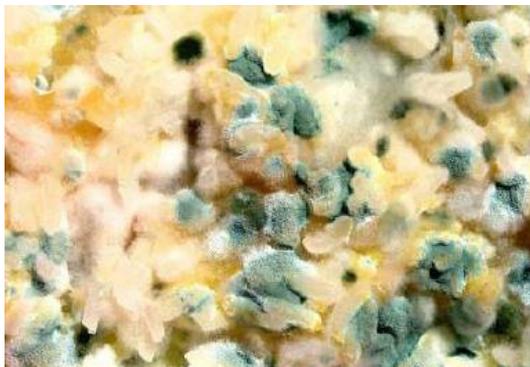


Figura 49. Polen fresco en el que se han desarrollado mohos. Fuente: Pajuelo Consultores Apícolas (s.f).

Al exponerse al medio ambiente (contaminación antropogénica, agua y contaminación telúrica), en el polen de abeja se pueden acumular metales pesados tóxicos. Son varias las investigaciones que informan de la presencia de metales pesados como el arsénico (As), el cadmio (Cd), el mercurio (Hg), el plomo (Pb) y el estroncio (Sr) (Roman, 2009; Kostić *et al.*, 2015; Dinkov & Stratev, 2016; de Oliveira *et al.*, 2016).

La exposición del polen de abeja contaminado con plaguicidas para consumo humano puede dar lugar a varias enfermedades crónicas como el déficit neurológico, enfermedades respiratorias, cáncer, etc. (Mesnage & Seralini, 2018). La contaminación por micotoxinas es más preocupante cuando la ocratoxina A se encuentra entre las sustancias tóxicas peligrosas generadas por *Aspergillus* (Bogdanov, 2015). El polen de abeja obtenido a partir de

Echium vulgare (conocida vulgarmente por viborera), *Symphytum officinale* (conocida vulgarmente como oreja de asno) y *Senecio jacobea* (hierba de Santiago) posee alcaloides de pirrolizidina asociados a lesiones hepatotóxicas (Kempf *et al.*, 2010). Además, las reacciones alérgicas, incluida la anafilaxis, suelen ser reacciones de hipersensibilidad inmediata mediada por la inmunoglobulina E (Ig E) que se identifican después de la ingestión de polen, ya que los granos de polen individuales se recogen de plantas polinizadas por insectos, así como de malezas o árboles polinizados por el viento, que pueden causar las reacciones alérgicas debidas a la ingestión accidental de polen en el aire (Makris *et al.*, 2010; Jagdis & Sussman, 2012; Choi *et al.*, 2015).

De forma relativamente reciente, McNamara & Pien (2019) informaron de la relación entre la anafilaxis inducida por el ejercicio y el consumo de polen en personas alérgicas, debido a la reducción del umbral de degranulación de los mastocitos durante el ejercicio, a causa de la mayor permeabilidad gastrointestinal o de los efectos osmóticos. Recomendaron estos autores a estas personas, que no hicieran ejercicio durante 4 a 6 horas después de haber tomado polen. Teniendo todos estos factores en cuenta, se puede afirmar que los principales riesgos que se esconden tras la alergia al polen de abeja son la mezcla de polen de abeja con alérgenos de polen transportados por el aire, las sustancias alergénicas de reacción cruzada por hongos, la contaminación con pesticidas y el ejercicio rápido después de su ingestión.

2.20. Higienización Alimentaria por Tratamiento con Ozono. Mecanismos de Acción y Aplicaciones.

El ozono (O₃) tiene uso como descontaminante de alimentos en nuestro continente desde hace varios años. En Estados Unidos la Food and Drug Administration (FDA) declaró al ozono como seguro (GRAS) para su uso en agua embotellada en 1982. Y después de varios años, en 1997 se nombró como sustancia GRAS para usar como desinfectante o sanitizante de alimentos cuando se emplea de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación. Una resolución final publicada en junio del 2001 por la FDA, aprobó las aplicaciones del ozono en las formas gaseosa o acuosa, como agente antimicrobiano en el procesamiento de alimentos (FDA, 2001).

El problema de la contaminación microbiológica de los alimentos requiere de un control continuo en cada etapa del proceso de producción. Alimentos más seguros, y “más sanos”, de mayor calidad y menos procesados

son en la actualidad los principales retos a los que se enfrenta el desarrollo de las tecnologías alimentarias para la elaboración de productos alimenticios que satisfagan las expectativas del consumidor. El ozono se ha instaurado como un elemento descontaminante que se utiliza para controlar y eliminar la presencia de microorganismos en los productos alimentarios, así como eliminar olores indeseables. La tecnología del tratamiento con ozono puede aplicarse a todo tipo de alimentos, desde frutas, especias, verduras, mariscos, productos cárnicos, hasta bebidas (Brodowska *et al.*, 2018).

El tratamiento con ozono es un método químico descontaminante de alimentos que consiste en exponer los alimentos contaminados al ozono en fase acuosa y/o gaseosa. Durante la ozonización, la inactivación de los microorganismos se dará en fase gaseosa a una presión y caudal constantes, y con una concentración de ozono especificada en función del nivel de contaminación (Brodowska *et al.*, 2014). Los efectos bactericidas del ozono se han confirmado sobre una amplia variedad de microorganismos, tanto Gram positivos como Gram negativos, así como su actuación sobre esporos bacterianos (Guzel-Seydim *et al.*, 2004; Kunicka-Styczynska & Smigielski, 2011). Por tanto, la aplicación del ozono mejora la seguridad microbiológica de los productos alimentarios y prolonga su vida útil sin cambiar sustancialmente sus propiedades nutricionales, químicas o físicas (Brodowska *et al.*, 2018).

2.20.1. Ventajas e Inconvenientes del Tratamiento con Ozono.

La principal ventaja del tratamiento con ozono es que está libre de residuos químicos, en contraste con los métodos químicos como el formaldehído o el alcohol etílico que dejan compuestos residuales que pueden poseer o tienden a poseer propiedades cancerígenas de claro impacto negativo en la salud humana (Pirani, 2010; Patil & Bourke, 2012; Tapp & Rice, 2012; Brodowska *et al.*, 2014). Otra de sus ventajas, es que puede aplicarse a todo tipo de alimentos, desde frutas, bebidas, mariscos, o productos cárnicos (Peleg, 1976; Strittmatter *et al.*, 1996; Guzel-Sedydim *et al.*, 2004; Tapp & Rice, 2012). Una cuestión clave es que independientemente del estado del producto, puede utilizarse tanto para productos congelados como frescos, dado que se ha comprobado que el ozono reduce la contaminación por microorganismos (tanto patógenos como no patógenos) de un producto alimentario sin tener efectos desfavorables en su calidad visual, textural y nutricional y en la prolongación de su vida útil, y puede recomendarse e incorporarse a la cadena de suministro. Además, el tratamiento con ozono se considera una tecnología de procesamiento de alimentos que es rentable y

ecológica. La utilización del ozono puede ser beneficiosa desde el punto de vista económico debido a los menores costes de adquisición y mantenimiento de las unidades de suministro de ozono, en comparación con el coste de otras tecnologías (Greene *et al.*, 2012; Glowacz *et al.*, 2014).

En cuanto a los inconvenientes, los microorganismos presentan una sensibilidad diferente al ozono dependiendo de varios factores: el tipo de producto, el microorganismo concreto, el nivel inicial de contaminación, el estado fisiológico de las células bacterianas, así como el estado físico del ozono (Restaino *et al.*, 1995; Miller *et al.*, 2013). La efectividad del tratamiento está estrechamente determinada por estos factores, que pueden ser limitantes a la hora de elegir una dosis de ozono lo suficientemente efectiva. Los posibles efectos colaterales de la ozonización en los alimentos son la reducción del contenido de vitaminas, polifenoles y compuestos volátiles, los cambios de color y la pérdida de firmeza, agua y peso (Miller *et al.*, 2013). No obstante, la mayoría de estos cambios también pueden producirse por métodos tradicionales de conservación, como la cocción, el encurtido, el enlatado, el secado, la congelación, etc. (Brodowska *et al.*, 2018).

2.20.2. Mecanismos de Acción Antimicrobiana del Ozono.

El ozono tiene un amplio espectro de actividades antimicrobianas, resultado de su alta reactividad, que se debe a su vez al poder oxidante de los radicales libres. Debido a su inestabilidad tanto en la fase gaseosa como en la acuosa, el ozono se descompone en radicales superóxido, hidropoxi e hidroxilo (Manousaridis *et al.*, 2005; Pirani, 2010). Sin embargo, el principal inactivador de microorganismos es el ozono molecular (Hunt & Marinas, 1997; Pirani, 2010).

La inactivación de las bacterias durante el tratamiento con ozono es un proceso complejo, ya que se trata de un ataque a los constituyentes de la membrana celular (grasas insaturadas, enzimas respiratorias, proteínas), las envolturas celulares (peptidoglicanos), el citoplasma (enzimas y ácidos nucleicos), las cubiertas de las cápsidas de los virus y los esporos (proteínas y péptidoglicanos) (Guzel-Seydim *et al.*, 2004; Pirani, 2010; Greene *et al.*, 2012).

Distintos autores argumentan que existen probablemente dos mecanismos principales de inactivación de microorganismos por ozono. El primero, sería la oxidación de grupos sulfidrilos y aminoácidos de enzimas, péptidos y proteínas para producir péptidos más pequeños durante la exposición al ozono, y el segundo implicaría la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados a peróxidos ácidos. La inactivación de los microorganismos se

produce debido al daño de la célula en su envoltura, o su desintegración, lo que conduce a la posterior fuga del contenido celular y a la lisis de la célula (Victorin, 1992; Greene *et al.*, 2012).

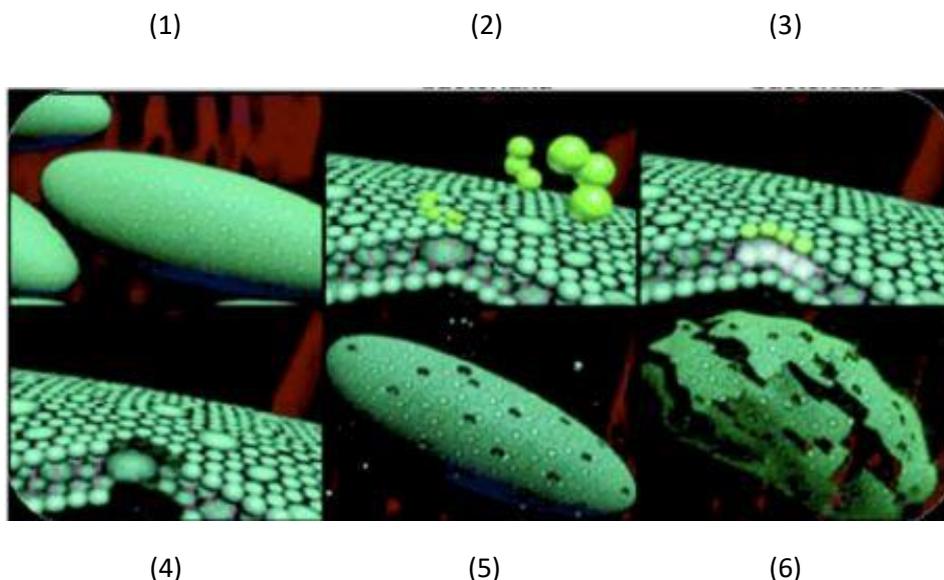


Figura 50. Acción del ozono sobre la pared bacteriana (1). Bacteria intacta (2). Molécula de ozono acercándose a la pared bacteriana (3). Moléculas de ozono penetrando en la pared bacteriana (4). Moléculas de ozono rompen la pared bacteriana (5). Bacteria dañada (6). Destrucción de la pared celular. Fuente: <https://fudesa.org.ar>

2.20.3. Aspectos Nutricionales y Sensoriales del Tratamiento con Ozono

Con frecuencia se apunta a los efectos negativos sobre la textura, el contenido químico y los atributos sensoriales de los productos alimentarios tratados con ozono (Tiwari & Muthukumarappan, 2012). Las propiedades sensoriales y nutricionales de todos los productos alimentarios procesados se ven afectadas por las técnicas de esterilización o descontaminación, no siendo el tratamiento con ozono una excepción (Caldo *et al.*, 2014). El impacto del ozono en la calidad y el valor nutricional de un producto ha sido objeto de estudio por varios investigadores (Barth *et al.*, 1995; Pérez *et al.*, 1999; Achen & Yousef, 2001; Skog & Chu, 2001; Guzel-Seydim *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005; Fonseca & Rushing, 2006; Bialka & Demirci 2007; Tzortzakis *et al.*, 2007; Tiwari & Muthukumarappan, 2012).

A dosis inferiores a 1parte por millón (ppm) (correspondiendo 1ppm a 1,96 mg/m³), los cambios en la composición química de los alimentos tratados

se consideran insignificantes. A dosis altas se producen pérdidas nutricionales considerables, y el deterioro de propiedades sensoriales (Naitoh *et al.*, 1988; Zagon *et al.*, 1992; Zhao & Cranston, 1995; Guzel-Seydim *et al.*, 2004; Akbas & Ozdemir, 2006).

A diferencia de los tratamientos térmicos, el tratamiento con ozono no deterioró la calidad de las proteínas, ni causó daños en los aminoácidos (aa) (Erdman, 1997).

2.20.4. Aplicaciones Específicas del Ozono en la Industria Alimentaria para Controlar el Crecimiento de Microorganismos y Prolongar la Vida Útil de los Productos Alimenticios

Las distintas publicaciones se caracterizan por una importante divergencia. Algunos estudios afirman que el tratamiento con ozono reduce de forma sustancial la contaminación microbiana, y en el lado opuesto se postula la ineficacia del tratamiento. Esta diversidad de resultados puede deberse a los diferentes tipos de productos utilizados para el estudio. Por lo tanto, la eficacia del ozono debe evaluarse en función del producto y del grupo de microorganismos (Miller *et al.*, 2013).

Además del control del crecimiento de los microorganismos, la prolongación de la vida útil de los productos alimentarios que se tratan con ozono es un criterio fundamental para la aplicación de esta tecnología higienizante.

La eliminación del deterioro por microorganismos es una de las principales razones para utilizar el tratamiento con ozono en la conservación de frutas y verduras recién cortadas, así como en la carne, aves de corral, los productos lácteos y el marisco (Barth *et al.*, 1995; Abad *et al.*, 1997; Pérez *et al.*, 1999; Achen & Yousef, 2001; García *et al.*, 2003; Jaksch *et al.*, 2004; Beltrán *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005; Fonseca & Rushing, 2006; Gil *et al.*, 2006; Bialka & Demirci, 2007; Tzortzakis *et al.*, 2007; Hildebrand *et al.*, 2008). Es innegable que en la mayoría de los estudios realizados, el ozono fue eficaz en la reducción tanto de bacterias como de mohos (Brodowska *et al.*, 2018).

Capítulo 3. Objetivos

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

El objetivo general de esta Tesis es conocer la calidad microbiológica del polen apícola en el momento de su recogida, teniendo en cuenta los posibles factores de influencia en su carga microbiana, y ensayar un método de descontaminación que permita garantizar un nivel de seguridad alimentaria suficiente para el consumo humano. Para ello, se proponen los siguientes objetivos específicos:

1. Aportar nuevos datos sobre microbiología del polen apícola fresco que contribuyan al establecimiento de criterios microbiológicos para la calidad del mismo.
2. Conocer la influencia del diseño de la trampa cazapolen, las condiciones climatológicas-ambientales y el tiempo de recogida sobre la microbiología y el volumen de producción del polen apícola.
3. Conocer la influencia de la esterilización del cajón de la trampa cazapolen en la microbiología del polen apícola.
4. Comparar la eficacia y los efectos descontaminantes de la ozonización con la desecación y probar la eficacia del tratamiento combinado en el polen apícola.
5. Realizar ensayo de vida útil del polen apícola tratado.
6. Analizar la influencia de los tratamientos descontaminantes en los atributos sensoriales y el contenido en polifenoles del polen apícola.

Capítulo 4. Material y Métodos

CAPÍTULO 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

4.1.- Diseño Experimental del Muestreo

El estudio microbiológico se ha realizado sobre 436 muestras de polen apícola cosechado durante la primavera de los años 2015, 2016 y 2017. El polen procede de dos apiarios experimentales que posee el Departamento de Zoología de la Universidad de Córdoba.

El primer apiario está ubicado en una finca perteneciente al Campus Universitario de Rabanales, y cuyas coordenadas son 37° 55' 33,5" N, 4° 43' 26,1" O. Es una zona de laboreo experimental y todos los cultivos que existen alrededor se mantienen como agricultura convencional. El colmenar está situado en una zona mixta. El área de 3 kilómetros (km) donde tiene lugar la principal actividad de forrajeo de las abejas (Visscher & Seeley, 1982) se encuentra entre el río Guadalquivir (sur) y las estribaciones de Sierra Morena (norte). Hay pequeños arroyos en las proximidades, con un caudal bajo o nulo durante el experimento, por lo que el colmenar dispone de un abrevadero permanente surtido con agua potable procedente de la red local de suministro. En el territorio se disponen zonas naturales, zonas agrícolas, zonas residenciales, una granja de animales y una pequeña zona industrial. Los espacios naturales presentan una vegetación mediterránea dominada por encinas (*Quercus ilex*). El estrato arbustivo y herbáceo con mayor atractivo para las abejas está formado principalmente por las familias *Cistaceae*, *Boraginaceae*, *Myrtaceae*, *Lamiaceae*, *Asteraceae* y *Ericaceae*. La zona agrícola incluye cultivos de cereales y, en menor medida, de girasol.

El principal cultivo leñoso es el olivo (*Olea europea*). En las zonas no cultivadas hay eucaliptos (*Eucalyptus* sp.), langosta negra o pseudoacacias (*Robinea* sp.) y las herbáceas *Boraginaceae*, *Lamiaceae*, *Cruciferae* y *Asteraceae* (Talavera *et al.*, 1987).

El segundo de los apiarios está ubicado en la finca "Porrillas", propiedad de la Diputación Provincial de Córdoba, en el término municipal de Alcolea y la ubicación de la finca es 37° 56,36' 85'' N y 4° 41,19' 63'' O. La altitud media de la zona es 120 metros sobre el nivel del mar (msnm) y está rodeada de árboles de sombra y una densa cubierta de matorral en flor, predominando la vegetación mediterránea formada por *Quercus illex*, *Pinus pinaster*, *Populus* sp., *Echium* sp., *Cistus* sp., *Retama* sp., *Foeniculum vulgare* y *Asteraceae*. Hay un curso natural de agua disponible para el colmenar a escasos metros del mismo. Este arroyo también está próximo a un cruce de

paso de animales, y se utilizaba como abrevadero, principalmente de ovejas y cabras.

Los datos climáticos proceden de la estación meteorológica situada en el Campus Universitario de Rabanales (Instituto de Agricultura Sostenible. Estación Agrometeorológica de Rabanales-BG Olivo). Los datos de temperatura y humedad relativa se registraron durante los distintos períodos de estudio.

Al ser un producto con un marcado carácter estacional en lo relativo a su obtención, la época de recogida se circunscribió al periodo primaveral, y más concretamente, al espacio de tiempo comprendido entre los meses de abril y mayo de los años 2015, 2016 y 2017. Dependiendo de las circunstancias climatológicas (días de lluvias o jornadas de calor inapropiadas para la época) se obtuvieron mayores o menores cantidades. Un factor primordial a la hora de escoger las colmenas para extraer las muestras de polen era su fortaleza. En esta situación de partida, las colmenas escogidas para la extracción de las muestras fueron las más “fuertes”, las que tenían una población abundante de abejas, aquellas con un buen estado sanitario, colmenas que contaban con la presencia de abejas reinas jóvenes y prolíficas, y carentes de piqueras adicionales. De esta manera, era previsible que se pudiera obtener una mayor cantidad de polen. El método de obtención de las distintas muestras de polen se describe a continuación.

Una vez seleccionadas las colmenas, se instaló la trampa cazapolen colgándola en la piquera de las mismas. Este proceso se realizó el viernes anterior a la primera semana en la que se obtenían las primeras muestras de polen. Se dejaba abierta la rejilla de paso de la trampa cazapolen durante el fin de semana con el fin de que las abejas se familiarizaran con el nuevo dispositivo adherido a la piquera. Al comenzar el lunes de la semana siguiente (primera semana de obtención de muestras), se encajaba el cajón-recolector en la parte inferior de la trampa cazapolen, y posteriormente se cerraba la rejilla. Durante las 24 horas siguientes (de lunes a martes) el polen que las abejas metían en la colmena era recogido dentro del cajón recolector. El martes se abría el cajón recolector y se depositaba una malla metálica (previamente esterilizada) sobre el polen ya existente, a fin de poder diferenciar la muestra correspondiente a ese periodo de 24 horas. El proceso de depositar la malla estéril sobre el polen se repetía el miércoles, con lo cual podíamos diferenciar las muestras correspondientes al periodo entre las 24 y las 48 horas. La muestra correspondiente a un tercer y último periodo, entre

las 48 horas y las 72 horas, quedaban por encima de esta segunda rejilla. El jueves se retiraba el cajón-recolector del cazapolen. De esta forma, el polen situado en el fondo del cajón y cubierto por la primera malla es el correspondiente a 72 horas de permanencia, el polen situado a nivel medio (entre las dos mallas metálicas estériles) llevaba 48 horas en el cajón, y el polen más superficial (el situado sobre la segunda malla) corresponde a 24 horas de permanencia. Con el fin de mantener unas adecuadas condiciones higiénicas, el cajón-recolector que contiene el polen diferenciado se introducía en bolsas de plástico estériles que protegían al cajón en el trayecto desde el apiario al laboratorio, lugar donde serían procesadas posteriormente las muestras. En el periodo de tiempo comprendido entre el jueves y el lunes de la semana siguiente, la rejilla de la trampa cazapolen permanecía abierta a fin de que la abeja pudiera meter polen, evitando así “agotar” la colmena.

Se trata de un procedimiento cíclico (ya que el lunes de la siguiente semana se volvía a cerrar la rejilla y se instalaba el cajón estéril) que se repite semanalmente. Esta técnica se llevó a cabo durante todo el periodo de floración. Los muestreos finalizaban a finales del mes de mayo, debido a las altas temperaturas que se registran en Córdoba en esas fechas.

4.2. Preparación de las Muestras

La preparación de las muestras es un procedimiento común para todos los ensayos.

4.2.1 Adquisición y Mantenimiento de las muestras

Las muestras fueron recogidas del apiario y trasladadas al laboratorio de acuerdo a las indicaciones del protocolo de recogida de muestras diseñado a tal efecto (Anexo A). Una vez llegaban los cajones al laboratorio se procedía a la extracción cuidadosa de los cajones de las bolsas. En condiciones higiénicas (utilizando pinzas estériles y con la ayuda de un mechero de alcohol) se limpiaban las muestras de los distintos días procedentes de los cajones. Se eliminaron elementos extraños, restos de abeja, restos momificados de larvas, partes de hierbas, briznas del campo, y de todo elemento distinto del polen. Directamente se determinaba la actividad de agua de cada muestra, y con posterioridad, el polen era depositado en recipientes de plástico estériles de un solo uso, y mantenido a una temperatura de -20 °C, hasta el momento de su análisis o estudio. Para las distintas muestras a analizar en el laboratorio se llevó a cabo un proceso de

homogeneización de todo el polen de un mismo día, a fin de que las fracciones alícuotas fueran representativas.

4.2.2. Identificación

Cada envase de plástico estéril fue debidamente identificado usando el mismo código. El código de identificación fue el siguiente: el número identificativo de la colmena de donde se extrae el cajón, fecha de recogida del cajón, y número ordinal de día de procedencia del polen (siendo 1 el polen que lleva hasta 24 horas en el cajón, 2 el polen que lleva 48 horas, y siendo 3 el polen que lleva hasta 72 horas en el cajón). Dependiendo de los ensayos de los distintos años (de los que se hablará más adelante en apartado “4.11. Descripción de los ensayos”), en el primer ensayo, la nomenclatura es la referida anteriormente. En el segundo ensayo, se añade a la nomenclatura anterior, la procedencia del polen (de cajones esterilizados o sin esterilizar) y en el tercer ensayo, se añade a la nomenclatura el tipo de trampa cazapolen de la que se extrae el polen.

Tabla 17. Modelo de nomenclatura para la conservación de las muestras del tercer ensayo. *Nota:* número de identificación de la colmena, fecha de recogida, tipo de cazapolen y número de días que permaneció el polen en el cazapolen (1 es hasta 24 horas, 2 hasta 48 horas y 3 hasta 72 horas).

Nº colmena	Fecha recogida	Tipo cazapolen	Nº ordinal día procedencia
9	04/05/2017	Normal (N)	3

4.3. Métodos de Análisis Microbiológicos

El análisis microbiológico del polen permitió conocer el estado higiénico del mismo. Se siguió la metodología propuesta por *Gomes et al.* (2010).

4.3.1. Preparación de las Muestras para su Análisis

Normalmente, el análisis microbiológico de las muestras era realizado al día siguiente de la obtención de las mismas. De no ser factible la realización del análisis en ese día, las muestras de polen se congelaban a temperatura de -20 °C hasta su análisis. Previo a su análisis se sacaban del congelador y se mantenían en refrigeración durante 24 horas.

4.3.2. Homogeneización de las Muestras

Al ser el polen apícola un alimento sólido se sometió previamente a una trituración en Stomacher® 400 circulator (Seward, UK) utilizando para ello un diluyente estéril (Agua de peptona). De las distintas cantidades de polen obtenido en los distintos días, se utilizaban 10 g, y el resto se reservaba, por si hubiera que repetir el análisis. Los siguientes pasos se realizaron en condiciones de esterilidad.

4.3.3. Preparación de las Diluciones Decimales

Una vez obtenida la primera dilución a partir de la homogeneización de 10 g de polen con 90 ml de Agua de Peptona, se procedió a la obtención de una serie de diluciones decimales en función de la carga microbiana esperada.

Se tomaron una serie de tubos de ensayo previamente esterilizados con 9 ml con agua de peptona. Utilizando una micropipeta, se toma 1 ml de la dilución 10^{-1} , y se deposita en un tubo de ensayo con los 9 ml del diluyente. El contenido de este tubo, se va a homogeneizar a través de la acción de un agitador vórtex para obtener la dilución 10^{-2} . Así sucesivamente se obtienen el resto de diluciones hasta el orden 10^{-5} .

4.4. Análisis Microbiológico

4.4.1. Recuento de Microorganismos Aerobios Mesófilos

Los microorganismos que se investigan mediante esta técnica son mesófilos, por la temperatura de incubación ($30\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) y aerobios, ya que no se va a limitar la disponibilidad de oxígeno. Este tipo de análisis es útil para conocer la calidad higiénica general del polen apícola.

El medio de cultivo elegido es el Plate Count Agar (sus siglas en inglés son PCA) (Oxoid® UK Código CM 463) indicado para el recuento del número total de microorganismos en alimentos. La dosificación para la preparación del medio del medio de cultivo es de 22,5 g/l. La preparación del medio de cultivo PCA se realiza mediante el método habitual, disolviendo la cantidad de medio de cultivo proporcionalmente a la cantidad de agua destilada utilizada. Posteriormente, el medio de cultivo se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

El método utilizado es la siembra en masa. Como primer paso, ya tenemos obtenidas las diluciones decimales, que en nuestro caso van desde la 10^{-1} a la 10^{-5} , en función de la contaminación esperada para las distintas

muestras de polen. En condiciones estériles, de cada una de las diluciones se toma 1 ml y se siembra en la placa de Petri, por duplicado. A cada placa se le añadieron aproximadamente 12-15 ml de medio de cultivo, ya atemperado a una temperatura aproximada de 44 °C-47 °C, mezclando de forma cuidadosa con el contenido de la placa (inoculo más PCA). Para ello se agita con movimientos suaves circulares, entre 5 a 10 movimientos en diferentes sentidos: de arriba a abajo, de izquierda a derecha.

Posteriormente se dejan reposar las placas sobre la mesa hasta que el medio de cultivo solidifique. Las placas se llevaron a incubar a una estufa de cultivo, en posición invertida, apilando hasta seis placas. La temperatura de incubación en la estufa fue de 30 °C, y el periodo de permanencia en la misma fue de 72 horas.

Una vez transcurrido el tiempo indicado se sacan las placas de la estufa y se procede al recuento de colonias en cada placa. Se realiza el recuento de las placas con un número de unidades formadoras de colonias comprendidas entre 30 y 300 (García, 2016).

4.4.2. Recuento de Enterobacterias Lactosa Positivas (coliformes)

Los coliformes en sí, no son un grupo taxonómico, sino más bien un grupo de microorganismos utilizados como marcadores. Los coliformes son enterobacterias fermentadoras de lactosa con producción de gas. En el grupo de coliformes están incluidos varios géneros, como por ejemplo, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, y *Citrobacter*. Se suelen utilizar, por su frecuencia en heces, como índice de contaminación fecal.

El medio de cultivo utilizado para el recuento de coliformes en nuestro estudio es el caldo lactosado bilis verde brillante, y sus siglas en inglés son BGBL (Brilliant Green Bile Lactose, Oxoid®UK Código CM 31). Con la presencia del verde brillante y de la bilis de buey, vamos a obtener la inhibición de la casi totalidad de microorganismos Gram positivos, y de los Gram negativos, distintos de los coliformes, que pueden crecer sin restricciones. El elemento fermentado será la lactosa, en caso de crecer coliformes.

El gas producido se va a recoger mediante las campanas Durham, que se colocaron de forma invertida en el interior de los tubos.

La dosificación es de 40g/l de agua destilada. El medio de cultivo se preparó de la forma habitual, y cuando se disolvió, se dosificó en tubos de ensayo, a razón de 10 ml por tubo. En cada tubo se introdujo una campana

Durham en su interior, invertida. Los tubos se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

Posteriormente se dosifica 1 ml de la dilución 10^{-1} por triplicado en los tubos preparados con el medio BGBL y con la campana Durham. Así mismo y por triplicado, se dosificó 1 ml de las diluciones correspondientes a 10^{-2} y 10^{-3} , en los tubos con el caldo. De esta forma, tendremos por cada muestra nueve tubos de BGBL: tres tubos para cada una de las tres diluciones.

Dichos tubos se incubaron a 31°C durante un periodo de 48 horas, realizándose la primera lectura de resultados durante las primeras 24 horas. Se consideraron tubos positivos aquellos con gas contenido en la campana Durham (al menos en una décima parte de su volumen), sedimento blanquecino en el fondo del tubo y turbidez. Y para la obtención del resultado, se recurrió a la tabla del número más probable expresando el resultado en microorganismos por gramo (García, 2016).

4.4.3. Recuento de *Stafilococos Coagulasa Positivos*

Recuentos elevados de *Staphylococcus aureus* en un alimento son señal de falta de higiene en su manipulación. Además, las cepas enterotoxigénicas pueden ser causa de intoxicaciones alimentarias.

El medio de cultivo Baird Parker (Oxoid® Código CM 275) es el medio de elección. Este medio se esteriliza en autoclave. Posteriormente se atempera a 50°C, añadiéndole, en condiciones de esterilidad, una emulsión de yema de huevo con telurito estéril (Oxoid® Código SR 54), en la proporción de 50 ml de la emulsión anteriormente mencionada por cada litro del medio de cultivo. Se agita de forma suave hasta homogeneizar el medio de cultivo. Posteriormente se preparan las correspondientes placas de Petri.

Se va añadiendo a cada placa de Baird Parker, y por duplicado, 0,1 ml de la dilución 10^{-1} , preparada a partir de nuestras muestras de polen. El inóculo se extiende sobre la superficie del medio con un asa Drigalski. Posteriormente, estas placas se incuban a 35 °C durante 24 y 48 horas. *Staphylococcus aureus* crece en este medio en forma de colonias de color negro, brillantes, convexas, y con un halo alrededor de aclaramiento. Para confirmar la presencia de *Staphylococcus aureus* se debe realizar la prueba de la coagulasa. Para este fin, se tomarían cinco colonias, que posteriormente se inoculan en tubos con caldo cerebro-corazón, BHI (siglas en inglés de brain heart infusion). Estos tubos se van a incubar a 35 °C durante 24 horas.

Finalmente, se añade 0,1 ml de cada tubo a tubos que contienen 0.3 ml de plasma de conejo, incubados a 35 °C durante 4 a 6 horas.

Se va a considerar positivo si el volumen del coagulo es mayor que la mitad original del líquido. Para dar el recuento final se van a considerar solo las colonias confirmadas, los estafilococos coagulasa positivos (García, 2016).

4.4.4. Recuento de Enterobacterias

Están incluidas en esta familia bacterias no fermentadoras de lactosa, como *Salmonella*, *Shigella*, o *Erwinia* (esta última la fermenta excepcionalmente); y bacterias que sí fermentan la lactosa, como *Escherichia*, *Enterobacter*, o *Citrobacter*.

Las enterobacterias son indicadoras de contaminación fecal y se utilizan con frecuencia como marcadores en alimentos para poner de manifiesto su estado higiénico. El método empleado para la detección de enterobacterias es el recuento sin preenriquecimiento.

El método consiste en la preparación de una serie de diluciones decimales. Se siembra por duplicado 1 ml de cada dilución en placas de Petri. A continuación se añaden unos 10 ml del medio de cultivo Violet Red Bilis Glucose (siglas del medio VRBG, Oxoid® CódigoCM 485) atemperado a 44 °C-47 °C a cada una de las placas, y se homogeneiza con el contenido. Una vez frías las placas, se les va a añadir una nueva capa de VRBG, de unos 15 ml, sobre la anterior. Una vez solidificado se invierten las placas y se inoculan a 37 °C durante 24 horas. Las colonias típicas son de color rosa-rojizo o púrpura, con o sin halo y precipitación (García, 2016).

4.4.5. Recuento de Mohos y Levaduras

Los hongos pueden ocasionar deterioro de los alimentos. Además, son productores de micotoxinas. Así mismo, las levaduras y mohos pueden ser origen de reacciones alérgicas.

La técnica de recuento de las colonias de mohos y levaduras se basa en la siembra en superficie de 0.1 ml, utilizando un asa Drigalsky utilizando el medio de cultivo Potato Dextrose Agar (PDA, Oxoid® Código CM 139). Se siembran por duplicado las distintas diluciones. Las placas se incuban a 25 °C durante cinco días (García 2016).

4.5. Determinación de la Actividad de Agua (a_w)

La a_w es un parámetro relacionado con el contenido de agua de un alimento, en concreto con el agua disponible ligada al soluto. Es un parámetro

que determina su vida útil e indica el agua disponible para el crecimiento de los microorganismos y la actividad enzimática durante la conservación de un alimento. La medida de la a_w es un factor importante que va asociado al crecimiento, supervivencia y actividad enzimática de los microorganismos, determinando así su alterabilidad y la estabilidad microbiológica de un alimento. La determinación de la a_w en las distintas muestras de polen apícola se basa en un método higrométrico, en el que vamos a utilizar un medidor de dicha actividad de agua. El aparato Novasina® IC-500 AW-LAB (Figura 51) va a permitir, gracias a un dispositivo captador, determinar la humedad relativa del aire (%HR), la humedad relativa del producto (%HR) o la a_w de una muestra.



Figura 51. Aparato Novasina® IC-500 AW-LAB. Fuente: El autor.

Procedimiento

Calibrando previamente el aparato, se vierte el polen en la cápsula epw a aproximadamente 2/3 de su capacidad. La cápsula permanecerá siempre seca al igual que la cubeta de medida.

Una vez ubicada la cápsula en la cubeta de medida, y ayudándonos de unas pinzas, se ajustará el cabezal del captador sobre la cubeta de medida, y se gira ligeramente en el mismo sentido de las agujas del reloj. Se ejerce una ligera presión hacia abajo. La medida se obtendrá cuando la lectura del aparato sea estable, y el aparato produzca la señal.

4.6. Deseccación del polen

El proceso de desecación del polen consiste en eliminar el agua que contiene el polen hasta dejarlo a un contenido aproximado de un 8%.

Procedimiento

El polen se deposita sobre un equipo de desecación (Mauro Valla[®], Italia) (Figura 52) consistente en una estructura cilíndrica de acero inoxidable, que posee un sistema de ventilación que hace que ascienda una corriente de aire caliente y resistencia eléctrica que calienta el aire. La temperatura del aire se puede graduar a través de la resistencia. La muestra de polen se deposita en una rejilla, en la parte superior del dispositivo, que permite el paso del aire caliente, que deseca el polen. Se puede controlar la permanencia del polen y la temperatura del aire de desecación. El polen se sometió a desecación por 15, 30 y 45 minutos a 45°C.



(a)

(b)

Figura 52. Equipo de desecación. (a) Equipo secador. (b) Muestra sometida a desecación. Fuente: El autor.

4.7. Ozonización

Diversas muestras de polen fueron tratadas con ozono a fin de poder comprobar el poder biocida que el ozono tiene sobre los microorganismos. Para ello se empleó un dispositivo generador de ozono portátil Multifuncional Ozono Care/Life[®] Vida10 (Figura 53).



Figura 53. Equipo de ozonizado con muestra tratada con ozono. Fuente. El autor.

Este dispositivo bombea ozono a una bolsa de plástico estéril donde se encuentra el polen. Las muestras de polen se sometieron a 30 y 60 minutos de ozonización con un flujo de ozono de 200 mg/hora.

4.8. Metodología del Análisis Sensorial

El método utilizado en el presente proyecto va a ser el análisis descriptivo cuantitativo. La técnica trata de caracterizar atributos sensoriales en términos cuantitativos según su orden de aparición (Stone *et al.*, 1974). Esta prueba tiene un carácter analítico y deberá ser realizada por jueces seleccionados y entrenados (Costell & Durán, 1981). Para la obtención de resultados válidos, se requieren prolongados periodos de entrenamiento del panel.

El análisis descriptivo cuantitativo (QDA) surge en los años 70 por Stone & Sidel (1993) como respuesta a la falta de tratamiento estadístico de los datos obtenidos con los métodos descriptivos anteriores.

El número de catadores recomendado es entre 10 y 12, aunque para determinadas categorías de productos deba ser aumentado hasta 20 (Stone & Sidel, 1993).

Las distintas etapas necesarias para establecer un programa QDA son:

- Planificación: que tenga en cuenta el objetivo, los productos a ensayar, la cantidad de producto necesaria, la disponibilidad de productos y el tiempo requerido.
- Selección de los miembros del panel: se puede realizar entre consumidores o personal cualificado. Las pruebas utilizadas son las de diferencia.
- Sesiones de entrenamiento: estas sesiones de entrenamiento incluyen la identificación de los descriptores y su selección. La constitución de la ficha descriptiva que se va a utilizar. La utilización de referencias para definir y cuantificar las escalas de intensidad La utilización y la familiarización de los catadores con ellas.
- Ensayo piloto sobre productos.
- Análisis de los resultados.

Preparación de la muestra

El polen se presenta en vasos de plástico de unos 60 ml de capacidad, tapados e identificados con códigos aleatorios de tres cifras. La cantidad de muestra es de 20 g aproximadamente y la temperatura de servicio de 20 °C.

A cada catador se le suministra además: un vaso de agua, una servilleta, una cuchara por muestra y una ficha para la recogida de los resultados.

La prueba sensorial

La metodología sigue la propuesta por Galán-Soldevilla *et al.* (2005) y la ficha descriptiva utilizada (Anexo B) es una adaptación de Baldi *et al.* (2004) y Galán-Soldevilla *et al.* (2005).

Se evaluaron 27 atributos sensoriales: dos de apariencia (color y defectos visuales), seis de olor (intensidad global de olor, floral, campo, tostado, animal y humedad), cuatro de textura (textura táctil, textura en boca, contenido acuoso y contenido de polvo polínico), diez sensaciones olfato-gustativas (cuatro sabores básicos: dulce, ácido, salado y amargo; y seis de aroma (intensidad global de aroma, floral, campo, tostado, animal y humedad), tres sensaciones trigeminales (picor, frescor y astringencia), la persistencia y el retrogusto. Cada atributo sensorial se puntúa en una escala estructurada de 5 puntos (1 baja intensidad, 5 alta intensidad del atributo valorado), excepto los atributos de textura.

El Panel de cata

La prueba la realizan ocho catadores pertenecientes al Departamento de Bromatología y Tecnología de la Universidad de Córdoba, seleccionados y entrenados siguiendo las recomendaciones descritas en la norma internacional ISO 8586-1:1993, Guía para la Selección, Entrenamiento y Comprobación de catadores.

4.9. Análisis de Polifenoles

Se utilizaron diez muestras de polen de abeja (segundo ensayo, primavera 2016, se hablará más adelante). De cada muestra se obtuvieron tres submuestras. Las primeras submuestras se sometieron a desecación durante 30 minutos. Las segundas se expusieron al ozono durante 30 minutos y el tercer grupo se estableció como control, sin tratamiento alguno. Todas las muestras se congelaron posteriormente hasta su análisis. En cada grupo se evaluó la presencia y concentración de 11 polifenoles pertenecientes a diferentes grupos estructurales; tres ácidos fenólicos: ácido gálico (ácido hidroxibenzoico), ácido cafeico y ácido p-cumárico (ácidos hidroxicinámicos) y siete flavonoides agliconas: dos flavonas (luteolina y crisina), tres flavanonas

(quercetina, rutina (quercetina 0-3-rutósido) y kaempferol), un flavonol (Naringerina), una isoflavona (Genisteína) y un trihidroxi-estilbeno (resveratrol) usando LC-MS / MS. Las muestras de polen se homogeneizaron moliéndolas hasta obtener un polvo fino, utilizando un mortero común. A continuación, se mezcló 1 g de polen con 10 ml de solución etanólica (Etanol: agua en proporción 80: 20v /v) en un tubo de polipropileno y se sonicó en un baño de agua ultrasónico durante 20min a temperatura ambiente. Posteriormente, se llevó a cabo una centrifugación a 4000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se transfirió a un matraz de 50 ml. Este procedimiento se repitió dos veces más y los sobrenadantes se combinaron y se llevaron a un volumen final de 50 ml con etanol / agua (80/20 v / v). A 0,8 ml de extracto filtrado a través de un filtro de nailon de 22 μm , se le adicionó 0,2 ml de una solución acuosa con 0,1% de fórmico ácido antes de la cuantificación en HPLC-MS/MS.

Las condiciones de trabajo para la cuantificación fueron las siguientes:

Se utilizó un sistema Agilent con un cromatógrafo modelo 1200 y un analizador triple cuadrupole modelo 6410 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA). El análisis LC se realizó con una columna bifeni Kinetex 2.6 μm de 100 x 3 mm i.d. y, 100 \AA de tamaño de partícula (Phenomenex, Torrance, CA, USA). La fase móvil A fue 0,1% de ácido fórmico en agua y la fase móvil B fue metanol (MeOH) siguiendo el gradiente indicado en la Tabla 18. La columna fue mantenida a 25 $^{\circ}\text{C}$, el flujo varió entre 0,2 y 0,35 mL min^{-1} y el volumen de inyección fue 10 μL .

El Sistema usó una fuente de ion electrospray (ESI) operando en modo negativo en las condiciones siguientes: temperatura de gas de secado (325 $^{\circ}\text{C}$), flujo de gas de secado (9 Lmin^{-1}), presión del nebulizador (35 psi) y voltaje capilar (-4000 V).

El gas nitrógeno se usó en el nebulizador y en la célula de colisión. La identificación de cada polifenol se basó en la detección de dos monitores de reacción seleccionados (SRMs transiciones) un cuantificador de transición (SRM1) y un cualificador de transición (SRM2) por análisis de inyección de flujo de cada analito estándar (Tabla 19).

Tabla 18. Gradiente de fase móvil.

Tiempo(min)	MeOH	0.1% Acido fórmico	Flujo(mL.min ⁻¹)
0	5	95	0,35
6	50	50	0,35
9,5	55	45	0,35
10,5	55	45	0,20
12,0	57	43	0,20
15,0	67,5	32,5	0,20
17,0	75,0	25	0,3
22	90	10	0,3
25	5	95	0,35
35	5	95	0,35

Tabla 19. Caracterización de compuestos fenólicos por LC-MS/MS

Segmento de tiempo	Compuesto	Precursor	SRM1 SMR2	Fragme nto (V)	Energíaco lisión (V)	Tpo de perma nencia
1	Acidogálico	169	125	80	10	500
			79	80	20	400
2	Rutina	609	301	180	10	120
			271	180	25	120
2	Acidocafeico	179	135	80	10	140
			89	80	25	140
2	p- Acidocoumar ico	163	119	80	15	120
			93	80	30	120
3	Quercetina	301	151	140	13	55
			179	140	10	50
3	Kaempferol	285	117	160	55	55
			211	160	30	50
3	Luteolina	285	133	100	30	55
			175	100	17	50
3	Naringenina	271	119	100	30	50
			107	100	25	55
3	Genisteina	269	133	100	33	55
			63	100	40	50
3	Chrysin	253	143	90	30	55
			107	90	25	50
3	Resveratrol	227	143	110	25	55
			185	110	13	50

Tabla 20. Recuperaciones (%), precisión (RSD%) y límite de cuantificación (LOQ). *Nota:* Los recuentos son la media de tres determinaciones independientes a 30 y 500 ng/ml, equivalente a 1.8 y 31.2 µg/g.

	Recuperación media (R) y RSD				LOQ (µg/g)
	30ng/ml		500ng/ml		
	% R	% RSD	% R	% RSD	
Cafeico	71,2	12	75,8	10	0,14
Gálico	89,5	9	100,7	6	0,6
p-Coumarico	80,7	8	89,8	1	0,17
Chrysin	83,05	4	89,5	4	0,36
Kaempferol	96,5	20	80,7	16	0,37
Luteolina	103,3	5	98,75	1	0,66
Naringerina	97,3	8	84,2	5	0,71
Quercetina	101,9	11	90,85	6	0,67
Rutina	111,6	10	103	1	0,38
Resveratrol	74,25	15	90,05	14	0,5
Genisteina	88,1	16	100,4	13	0,2

La identidad de los compuestos se evaluó comparando su transición de iones en MS/MS, el tiempo de retención y la relación SRM1/ SMR2 con la de los estándares. La cuantificación se llevó a cabo mediante un método de adición estándar en el rango de 20 a 800 ng/mL con buena linealidad ($r^2 > 0,995$) para cada compuesto en cada muestra de polen. Se obtuvieron recuperaciones que variaron de 71,2% a 111,6% para todos los polifenoles a niveles de fortificación de 30 y 500 ng/mL y los límites de cuantificación (LOQ) calculados sobre la base de diez veces la relación señal / ruido, fueron inferiores a 0,8 µg/g. Este análisis se realizó en las instalaciones del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA) en Murcia.

4.10. Análisis Estadístico

Los datos se procesaron estadísticamente utilizando el programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Software estadístico para Windows, IBM Corp, 2016. Versión 22.0. IBM Corp, Armonk, NY, Estados Unidos. Todas las variables disponibles fueron probadas para comprobar si los datos traspasaban los supuestos para que las pruebas paramétricas regulares reportaran resultados válidos. Se aplicaron estadísticas paramétricas cuando fue posible. Cuando los datos resultaron no estar distribuidos normalmente, o

no había homogeneidad de varianza (heteroscedasticidad), se utilizó estadística no paramétrica. Las pruebas se especifican en los resultados.

4.11. Descripción de los Ensayos.

4.11.1. Primer ensayo. Condiciones Higiénicas del Polen e Influencia del Tiempo de Recogida (24, 48 y 72 horas).

Con este primer ensayo se pretendió obtener información sobre la carga microbiana que podíamos encontrar en polen de abejas recolectado a partir de colmenas con un manejo similar al que pueden hacer los apicultores profesionales. También se estudió la influencia de la frecuencia de recogida del polen (24, 48 y 72 horas), en la calidad higiénica del mismo.

El ensayo se prolongó a lo largo de seis semanas, en el periodo comprendido desde el 6 de abril al 17 de mayo del 2015 en el apiario experimental situado en el Campus Universitario de Rabanales. La zona donde se ubicaba el apiario, era una zona de cultivo convencional, y su descripción viene reflejada en el apartado “4.1. Diseño Experimental del Muestreo” del presente capítulo. En este mismo apartado se explica el procedimiento para diferenciar la producción de polen en 24, 48 y 72 horas. Cinco colonias experimentales fueron equipadas con trampas cazapolen frontales de entrada o piquera fabricadas en madera, y ya descritas en el punto “2.5. Procedimiento de Recolección del Polen Apícola” del presente trabajo. Las trampas cazapolen se limpiaron y esterilizaron antes de instalarlas y después de recolectar el polen. En primer lugar, se eliminó toda la suciedad gruesa residual con una espátula raspadora. Seguidamente, se limpiaron las trampas con agua y detergente, esterilizándose con posterioridad en autoclave. Los cajones de la trampa cazapolen eran limpiados y esterilizados semanalmente antes de volver a instalarlos en la trampa cazapolen.

4.11.1.1 Recolección de Muestras de Polen de Apícola

Las muestras de polen fresco, se recolectaron dentro de los dos meses de la temporada de floración (abril y mayo), durante un período de muestreo de 72 horas (en el apartado “4.1. Diseño Experimental del Muestreo” se explica el procedimiento para diferenciar la producción de polen en 24, 48 y 72 horas). El procedimiento de recolección de muestras de polen de abeja fresco es el descrito en el apartado “4.2.1 Adquisición y Mantenimiento de las muestras” del presente capítulo. Para el proceso de recogida de cajones con

polen, se siguió el protocolo de recolección elaborado para este fin (Anexo A). Tras procesar el polen, todos los cajones se limpiaban con agua y detergente, y se esterilizaban en autoclave. Los cajones estériles eran nuevamente depositados en la trampa cazapolen a la semana siguiente.

4.11.1.2. Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se llevó a cabo de acuerdo a lo expuesto en el apartado “4.4. Análisis microbiológico” del presente capítulo.

4.11.1.3. Actividad del Agua

La medición de la a_w se realizó a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), tal y como se describe en el apartado “4.5. Determinación de la Actividad de Agua” del presente capítulo.

4.11.2. Segundo Ensayo. Influencia de la Esterilización del Cajón de la Trampa Cazapolen en la Calidad Higiénica del Polen Apícola

En este segundo ensayo se pretendió obtener información de la posible influencia en la carga microbiológica del polen, al utilizar material estéril que está en contacto directo con el polen (utilización de cajones estériles), frente al método habitual del apicultor, que mantiene el mismo cajón en la trampa cazapolen, sin someterlo a ningún proceso de limpieza, desinfección o esterilización.

Las muestras de polen fresco, se recolectaron dentro de los dos meses de la temporada de floración (abril y mayo), en concreto en el periodo comprendido entre el 18 de abril al 29 de mayo del 2016. Hay que destacar que tanto en la primera semana comprendida del 18 al 24 de abril, como en la cuarta semana, comprendida entre el 9 al 15 de mayo no se obtuvo polen, ya que fueron semanas de elevada precipitación (ver Tabla-Resumen de datos meteorológicos en Anexo D). Para este ensayo se usó el apiario experimental situado en la finca del campus de Rabanales.

Diez colonias experimentales fueron equipadas con trampas cazapolen frontales de piquera fabricadas en madera. Las trampas cazapolen así como el cajón colector, se esterizaron en autoclave previamente a ser instaladas.

En cinco de estas colmenas, se llevó a cabo la práctica tradicional que realiza el apicultor en la recolección del polen. El polen se recogía cada 48 horas. Tras retirar el polen, el cajón que lo contenía no se sometía a ningún

tratamiento de limpieza, desinfección o esterilización. El mismo cajón sin tratar higiénicamente se encajaba de nuevo en el cazapolen, para obtener la colecta de polen de esa semana. En el segundo grupo se siguió la misma dinámica, solo que los cajones de las trampas eran nuevamente esterilizados antes de comenzar el nuevo ciclo semanal.

4.11.2.1. Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se llevó a cabo de acuerdo a lo expuesto en el apartado “4.4. Análisis microbiológico” del presente capítulo.

4.11.2.2. Actividad del Agua

La medición de la a_w se realizó a temperatura ambiente ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), tal y como se describe en el apartado “4.5. Determinación de la Actividad de Agua” del presente capítulo.

4.11.3. Tercer Ensayo: Influencia de los Factores Climatológicos-Ambientales y el Diseño de Trampas Cazapolen en la Calidad Higiénica del Polen Apícola.

Con este tercer ensayo se pretendió obtener información sobre la carga microbiológica que podíamos encontrar en polen de abejas recolectado a partir de colmenas con un manejo comparable al que pueden hacer los apicultores profesionales. Se estudió la influencia de los factores climatológicos-ambientales en la carga microbiológica del polen, ampliándose el trabajo a contemplar si los distintos diseños de la trampa cazapolen influyen en dicha carga microbiológica.

Quince colonias experimentales fueron equipadas con tres tipos diferentes de trampas cazapolen fabricadas en madera. Para este ensayo se usó el apiario ubicado en la finca “Porrilla” perteneciente a la Diputación Provincial de Córdoba, en el término municipal de Alcolea. La descripción del entorno donde estaba ubicado el apiario viene reflejada en el apartado “4.1. Diseño Experimental del Muestreo” del presente capítulo. Cada tipo de trampa de polen se asignó aleatoriamente a cinco colonias y se ajustó durante todo el período de muestreo.

Entre los tres tipos de trampa cazapolen, se realizó el ensayo con la trampa cazapolen frontal de piquera, y la trampa cazapolen de fondo (extraíble con una rampa de dos posiciones que permite o impide el paso de abejas) descritas ambas trampas en el apartado “2.5. Recogida del Polen” del presente trabajo. El tercer tipo de trampa cazapolen denominada “trampa cazapolen frontal de piquera modificada” es una innovación experimental de

la trampa cazapolen frontal de piquera propuesta por D. Antonio Gómez Pajuelo (Pajuelo Consultores Apícolas. Comunicación personal). La novedad consiste en un suplemento posterior, con una rejilla y un cajón trasero, donde caen gran parte de los restos que intentan sacar las abejas de la colmena en sus labores de limpieza, evitando que lleguen hasta el cajón en el que cae el polen. De esta manera intentamos evaluar los efectos de estos residuos sobre la contaminación biológica del polen (Figura 54).

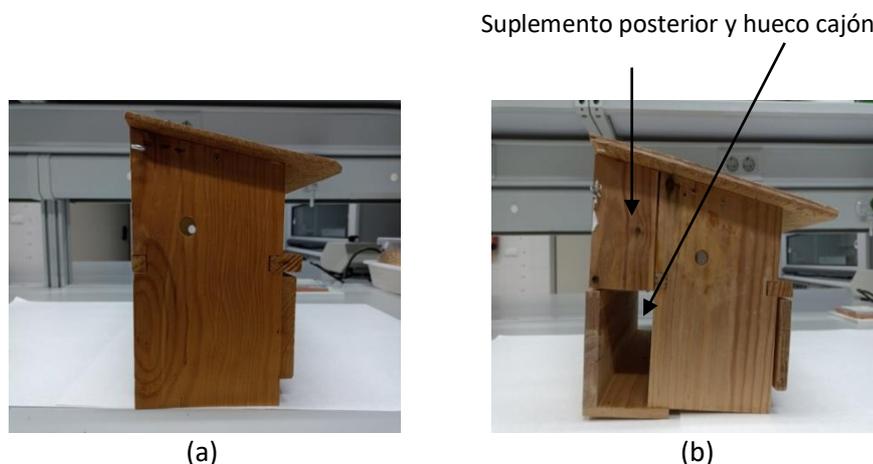


Figura 54. (a) Representación del perfil de una trampa cazapolen frontal de piquera. (b). Representación del perfil de trampa cazapolen frontal de piquera modificada, donde se aprecia el suplemento posterior y el hueco del cajón trasero.

Las trampas cazapolen se limpiaron antes de instalarlas y después de recolectar el polen. En primer lugar, se eliminó toda la suciedad gruesa residual con una espátula raspadora. Se limpiaban con agua y detergente, se enjuagaron con agua tibia limpia. Posteriormente las trampas se esterizaron en autoclave.

Para este ensayo se hicieron tres repeticiones fechadas en la semana del 1 al 7 de mayo, del 8 al 14 de mayo y del 15 al 21 de mayo de 2017. Los datos meteorológicos de los tres periodos se obtuvieron de la estación meteorológica Rabanales-BG Olivo.

4.11.3.1. Recolección de Muestras de Polen Apícola

Las muestras de polen fresco se recolectaron dentro de los meses de la temporada de floración (en concreto en mayo), durante un período de muestreo de 72 horas cada semana. Se siguió el procedimiento de recolección de muestras de polen de abeja fresco descrito en el apartado “4.1. Diseño

Experimental del Muestreo” del presente capítulo. En el proceso de recogida de cajones con polen, se siguió el protocolo de recolección elaborado para este fin (Anexo A). Tras procesar el polen, el cajón se limpiaba con agua y detergente, y se esterilizaba en autoclave. Este cajón estéril, era nuevamente depositado en la trampa cazapolen en el inicio del siguiente periodo de recolección, en la semana siguiente.

4.11.3.2. Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se llevó a cabo de acuerdo a lo expuesto en el apartado “4.4. Análisis microbiológico” del presente capítulo.

4.11.3.3. Actividad de Agua

La medición de la a_w se realizó a temperatura ambiente (25 ± 1 °C), tal y como se describe en el apartado “4.5. Determinación de la Actividad de Agua” del presente capítulo.

4.11.4. Cuarto Ensayo. Tratamientos Descontaminantes del Polen Apícola por Deseccación, Ozonización y Combinación de Ambos Métodos. Ensayo de Vida Útil. Efecto de los Tratamientos sobre el Contenido en Polifenoles y Características Sensoriales

A tenor de los resultados del análisis microbiológico realizado a las muestras de polen en los anteriores ensayos, se pudo confirmar la alta carga microbiológica, potencialmente peligrosa para el consumo humano. Por lo que en este ensayo perseguimos un diseño para aplicar un tratamiento de choque que permitiera reducir la contaminación del polen fresco a niveles seguros para el consumo humano, a la vez que contemplamos el efecto de estos tratamientos sobre las características del polen y la viabilidad del mismo. Para alcanzar estos objetivos propusimos los siguientes items: I) Tratamiento del polen de abeja por desecación con aire caliente, II) Tratamiento del polen de abeja por exposición a ozono fluyente, III) Evaluación de la vida útil del polen de abeja ozonizado, IV) Influencia del ozono en el contenido de polifenoles presentes en el polen de abeja, V) Evaluación sensorial del polen de abeja procesado.

4.11.4.1. Muestreo del Polen de Abeja

Se recogieron muestras de polen de abeja del colmenar experimental de la Universidad de Córdoba (Campus de Rabanales). En este caso, las muestras eran las que se recogían cada dos días del cajón sin tratar

higiénicamente (segundo ensayo), y se mantuvieron congeladas (-20 °C) hasta su análisis.

4.11.4.2. Análisis Microbiológico

El análisis microbiológico se llevó a cabo de acuerdo a lo expuesto en el apartado “4.4. Análisis microbiológico” del presente capítulo.

4.11.4.3. Tratamiento del Polen de Abeja por Deseccación (aire caliente)

Para este ensayo se utilizó un secador de polen de abeja (secador Mauro Valla, Italia). En primer lugar, se crearon cuatro grupos de muestras. Cada grupo constaba de seis muestras de 10 g. Las muestras de polen fueron retiradas del congelador, y se mantuvieron en refrigeración aproximadamente 2 horas para descongelarlo antes de su desecación. Las muestras de polen de abeja de tres grupos se secaron a una temperatura de 42 °C durante 15, 30 y 45 minutos respectivamente. El cuarto grupo se mantuvo como control sin tratamiento alguno. El recuento microbiológico se realizó antes y después del proceso de secado, como se ha indicado anteriormente.

4.11.4.4. Tratamiento del Polen por Ozonización

Para este ensayo se utilizó un generador de ozono con una potencia de flujo de 200 mg/hora (Ozonoplus-10. Vida-10). Las evaluaciones se realizaron en tres grupos de 20 muestras cada uno (10 g/muestra). Dos grupos fueron expuestos a un flujo de ozono de 200 mg/h durante 30 y 60 minutos respectivamente, dentro de un contenedor de polietileno. El tercer grupo se tomó como control y no fue expuesto. El recuento microbiano se llevó a cabo a antes y después de la exposición al ozono, como se ha descrito anteriormente.

4.11.4.5. Evaluación de la Vida Útil del Polen de Abeja Ozonizado/Desechado

En este ensayo se trataron con ozono 18 muestras de 10 g de polen de abeja durante 30 minutos y 15 minutos de desecación, como se ha descrito anteriormente, y se mantuvieron en un frigorífico a 4 °C. Estas muestras se sometieron a análisis microbiológico que consistieron en seis evaluaciones: polen de abeja fresco, polen de abeja recién tratado, y 1, 2, 3 y 6 semanas después de la exposición. El recuento microbiano se realizó como se ha descrito anteriormente.

4.11.4.6. Evaluación de los Polifenoles Presentes en el Polen de Abejas

Para la evaluación de los posibles cambios en compuestos bioactivos del polen, se realizó el análisis de polifenoles, tal y como se describe en el apartado “4.9. Análisis de Polifenoles” del presente capítulo.

4.11.4.7. Evaluación Sensorial del Polen Apícola

El análisis sensorial tal y como se describe en el apartado “4.8. Metodología del Análisis Sensorial” del presente capítulo, obtuvo perfiles descriptivos para el polen fresco y sometido a los distintos tratamientos.

Capítulo 5. Resultados y Discusión

CAPÍTULO 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1. Primer Ensayo. Condiciones Higiénicas del Polen e Influencia del Tiempo de Recogida (24, 48 y 72 horas).

Para un primer acercamiento sobre el conocimiento de las condiciones higiénicas del polen fresco, referidas a la seguridad alimentaria, el presente trabajo estudió los cinco grupos microbiológicos más frecuentes considerados en este tipo de investigaciones: *S. aureus*, coliformes, microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras y enterobacterias (Campos *et al.*, 2008; Arruda *et al.*, 2017), con especial interés por éstas últimas, ya que dentro de este grupo se incluyen algunos agentes patógenos para la salud humana. Puig-Peña *et al.* (2012), al comparar microbiológicamente el polen fresco y el polen seco de abeja, señalaron que el principal problema microbiológico del polen fresco podía detectarse cuando se observaban microorganismos indicadores sanitarios. De Melo *et al.* (2015), obtienen valores de $2,8 \times 10^5$ UFC/g para los coliformes totales. Adjlane *et al.* (2017) recabaron resultados comprendidos entre 1×10^3 y 3×10^5 UFC/g en coliformes totales, y obtuvieron una correlación entre el origen de la muestra y la concentración en coliformes totales, la biota aerobia mesofila, y levaduras y mohos.

La carga de enterobacterias en el polen de las abejas tiene un doble origen. Por un lado, el origen de la contaminación puede estar en el entorno, y de él pasar a las abejas y al polen, por ejemplo cuando visitan una fuente de agua contaminada utilizada por otros animales. Por otra parte, las enterobacterias son parte principal de la microbiota que se presenta en el intestino de las abejas melíferas sanas y también se utilizan como indicador de higiene del procedimiento de manipulación del producto.

Por el contrario, la presencia de aerobios mesófilos tiene una notable relación con la contaminación inicial de las materias primas, así como con las herramientas y materiales utilizados a lo largo de la producción, manipulación y almacenamiento del polen de abeja. Adjlane *et al.* (2017) informaron sobre la concentración de microorganismos aerobios mesófilos en cifras que oscilan entre 1×10^3 UFC/g y $4,2 \times 10^5$ UFC/g, cuantía inferior a la reportada por Belhadjet *et al.* (2012), los cuales notifican una concentración de aerobios mesófilos que se encuentra entre $4,7 \times 10^5$ UFC/g y $6,2 \times 10^5$ UFC/g.

Por último, la carga de mohos y levaduras está relacionada con las condiciones ambientales (Gliński & Jarosz, 1988; Arruda *et al.*, 2017). Adjlane *et al.* (2017) obtienen resultados en concentraciones de levaduras y mohos del orden de entre $1,5 \times 10^4$ y $2,8 \times 10^5$ UFC/g, éste último valor, muy por encima de los valores sugeridos por Campos *et al.* (2008) como aceptables (Tabla 12). De Mello *et al.* (2015) obtuvieron valores de $7,67 \times 10^3$ UFC/g para mohos y levaduras. Nardoni *et al.*, (2016) apuntó que todas las muestras analizadas en su estudio sobre polen italiano eran positivas para al menos un aislado fúngico, y Estevinho *et al.* (2012) y Feás *et al.* (2012) estudiaron los aspectos microbiológicos del polen seco portugués y observaron valores de mohos y levaduras del orden de 10^3 UFC/g y ausencia del resto de microorganismos indicadores

Nuestros resultados pueden consultarse en las en las Figuras 55 a 59 y más detalladamente en el Anexo F. Los resultados incluyen el peso de la muestra recolectada semanalmente en cada trampa cazapolen, la determinación de la a_w en las muestras de polen fresco y los recuentos obtenidos para enterobacterias, aerobios-mesófilos y mohos y levaduras. Ninguna de las muestras analizadas fue positiva en cuanto a la presencia de coliformes y *S. aureus*, coincidiendo así con los resultados de Adjlane *et al.* (2017) que también observaron la ausencia de *S. aureus* y coliformes en su estudio sobre la calidad microbiológica del polen argelino.

Los datos registrados con este ensayo no se ajustaron a una distribución normal (Shapiro-Wilk, $p \leq 0,05$) para ninguna de las variables (ver Tabla 21), por lo que fueron analizadas con estadística no paramétrica.

Tabla 21. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para el estudio de la distribución de los datos obtenidos de las variables incluidas en el ensayo. Ninguna de las variables se ajustó a una distribución normal.

	Estadístico	Shapiro-Wilk	
		gl	Sig
Peso	0,819	148	0,000
Aw	0,954	148	0,000
Enterobacterias	0,251	148	0,000
Aerobios mesófilos	0,536	148	0,000
Levaduras y Mohos	0,477	148	0,000

El peso de las muestras (Figura 55) en las trampas cazapolen se incrementó de forma continua durante las tres primeras semanas del ensayo (semana del 6 al 12 de abril, semana del 13 al 19 de abril y semana del 20 al 26 de abril), para después mostrar una progresiva reducción hasta el final del ensayo (semana del 27 de abril al 3 de mayo, del 4 al 10 de mayo y la semana del 11 al 17 de mayo). La cantidad de polen recogido fue significativamente diferente entre las semanas, excepto para la primera y la última semana, entre las que no se detectaron diferencias significativas (Estadística no paramétrica. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) (Figura 55) (Anexo F).

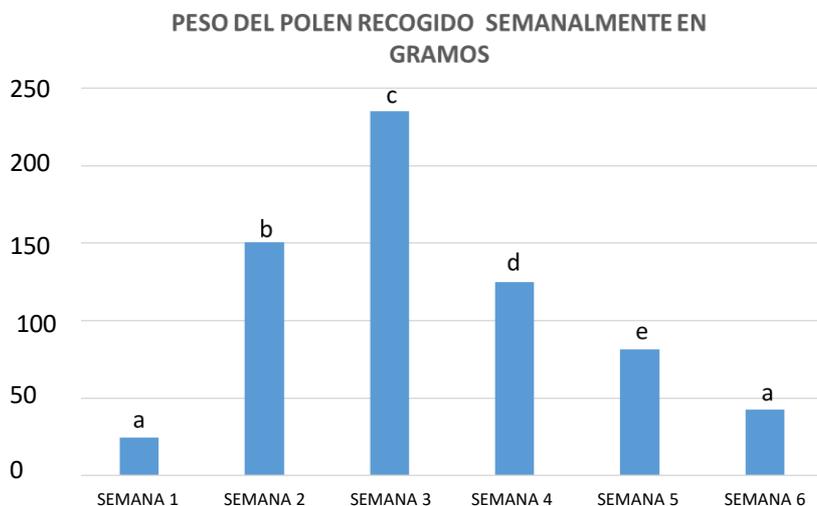


Figura 55. Evolución del peso en gramos del polen recogido semanalmente a lo largo del ensayo destinado a valorar el nivel de contaminación microbiológica del polen de abeja. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas entre semanas (Estadística no paramétrica. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$). Información más detallada puede consultarse en el Anexo F.

Durante la primera semana del ensayo, debido a las condiciones meteorológicas de nublado, se observó como en las distintas colmenas, las abejas introdujeron poco polen, coincidiendo con los datos aportados por Percival (1947) y Louveaux (1958). La escasa cantidad de polen obtenido en esta primera semana podría tener relación con lo reportado por Jáuregui & Vallejo (2012), ya que que en un principio se observa un gran desorden en la colonia: las abejas realizaron reconocimientos hasta que aceptaron el obstáculo de la trampa cazapolen. A partir de la segunda semana, las cantidades de polen fueron aumentando. En estas semanas se incrementó la floración, con mayor oferta polinífera, y una mayor producción, coincidiendo en estos resultados con Jáuregui (2012). Además, a medida que avanzaba el experimento, y coincidiendo con Burgos (2012) y Monroy (2013), las necesidades nutricionales de la colmena se fueron incrementando (mayor cantidad de cría) y las abejas pecoreadoras traían más polen para las colmenas, aumentando la producción en las en las trampas cazapolen. A partir de la cuarta semana (semana del 27 de abril al 3 de mayo) y hasta el final del ensayo, la cantidad de polen recogido fue disminuyendo de forma progresiva.

Hay que destacar las elevadas temperaturas que se registraron en Córdoba durante la semana del 4 al 10 de mayo, y muy especialmente en la semana del 11 al 17 de mayo, superando ampliamente en esta última semana los 40 °C de máxima, siendo temperaturas anormalmente elevadas para la época del año (consultar Tabla-Resumen de las condiciones climatológicas de abril-mayo del 2015 en el Anexo C, quinta y sexta semana de ensayo). Probablemente esta fue la causa de la reducción en el tamaño de la muestra de polen registrada en la segunda mitad del ensayo, ya que gran parte de la vegetación se agostó.

Respecto al resto de variables estudiadas en las muestras de polen del presente ensayo, tanto la evolución de la a_w (Figura 56) como los recuentos microbiológicos de enterobacterias, aerobios mesófilos y mohos y levaduras (Figuras 57 a 59 respectivamente) mostraron una tendencia decreciente a lo largo de las seis semanas que duró el estudio.

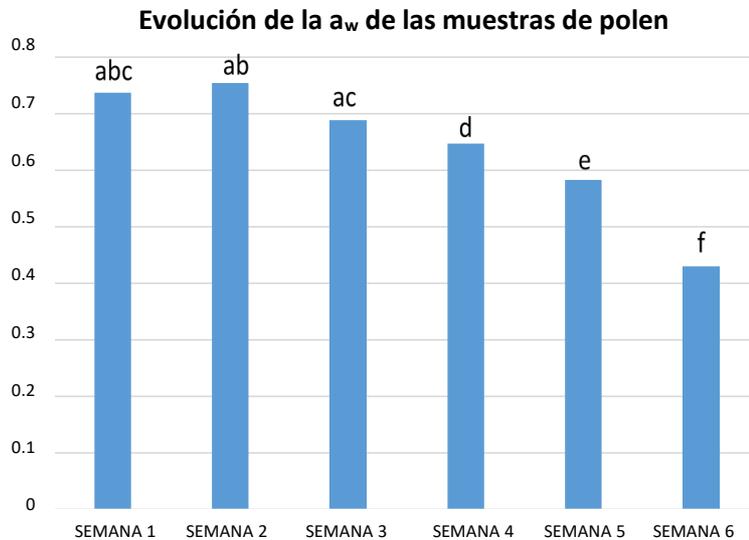


Figura 56. Evolución de la actividad de agua de las muestras de polen recogido a lo largo de las seis semanas del ensayo. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas entre semanas (Estadística no paramétrica. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$). Información más detallada puede consultarse en el Anexo F.

En la Figura 56 se puede apreciar que no existen diferencias significativas en la a_w entre la primera, segunda y tercera semana. Pero si se aprecian diferencias significativas entre la a_w de las muestras de polen correspondientes a la cuarta, quinta y sexta semanas, en claro descenso de los niveles de a_w (Estadística no paramétrica. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$). Estos resultados están en consonancia con los aportados por [Trujillo \(s.f.\)](#) que registró descensos en el contenido en humedad del polen apícola en los distintos periodos de recolección del mismo. Estos valores de actividad de agua coinciden con los obtenidos por [Anjos et al. \(2019b\)](#), de 0,58 a 0,72 para polen fresco congelado. También [De-Melo et al. \(2016\)](#) encuentran valores comprendidos entre 0,66 y 0,82 para polen fresco.

Respecto a la calidad microbiológica, se aprecia un claro descenso en el número de UFC/g a lo largo de las seis semanas del ensayo, tanto para las enterobacterias (Fig. 57), como para los microorganismos aerobios mesófilos (Fig. 58) y los mohos y levaduras (Fig. 59). En el caso de las enterobacterias, [Adjlane et al. \(2017\)](#) encontraron descensos similares. Sin embargo, tanto para los microorganismos aerobios mesófilos como para mohos y levaduras [Anjos et al. \(2019b\)](#) encontraron valores inferiores, del orden de 10^3 UFC/g en el polen fresco.

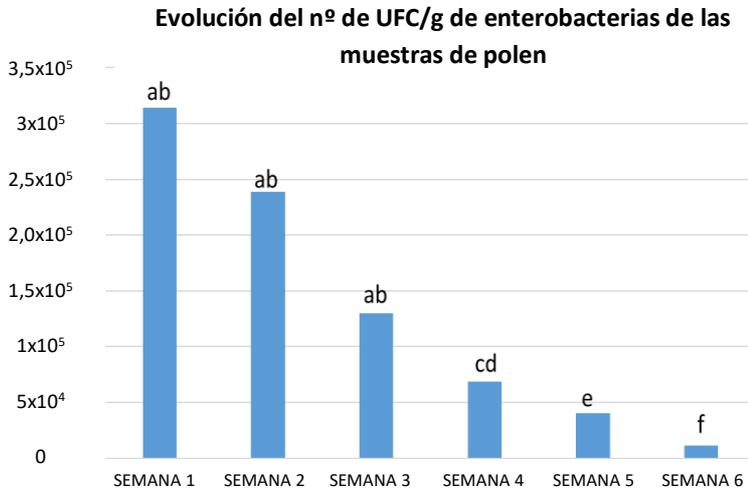


Figura 57. Evolución del nº de UFC/g de enterobacterias en las muestras de polen recogidas a lo largo de las seis semanas del ensayo. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas entre semanas (Estadística no paramétrica. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$). Información detallada en el Anexo F.

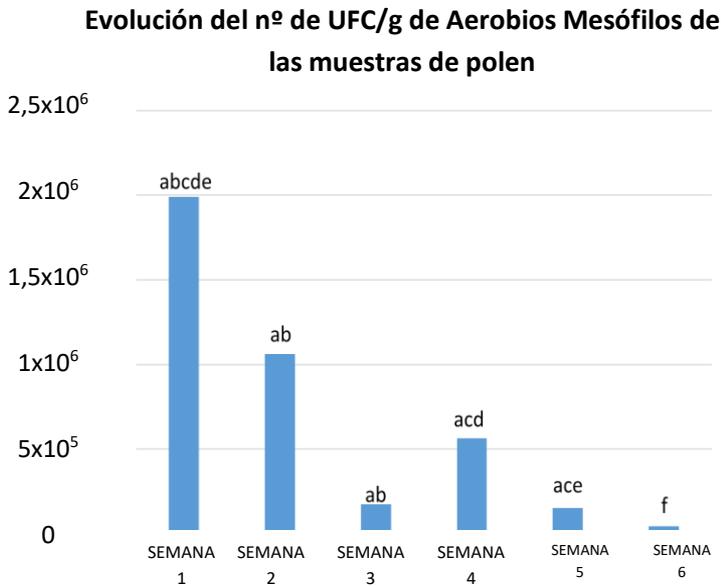


Figura 58. Evolución del número de UFC/g de aerobios mesófilos en las muestras de polen recogidas a lo largo de las seis semanas del ensayo. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas entre semanas (Estadística no paramétrica. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$). Información más detallada puede consultarse en el Anexo F.

Evolución del nº de UFC/g de Mohos y Levaduras de las muestras de polen

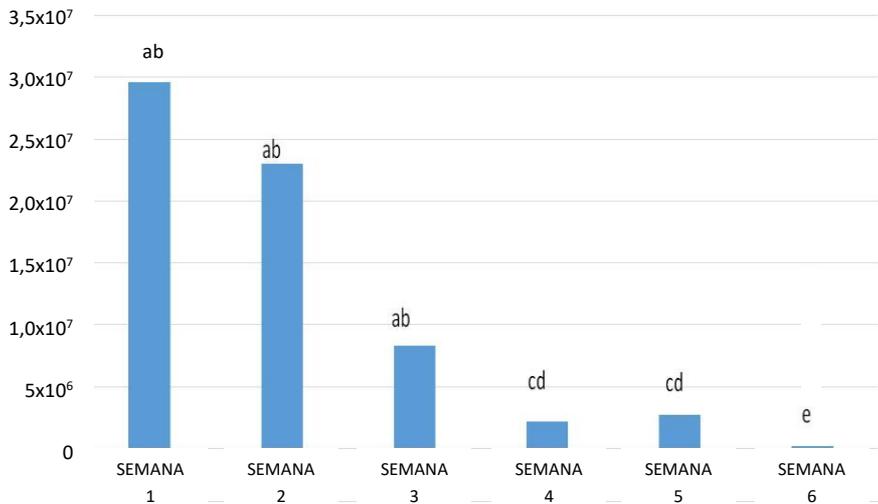


Figura 59. Evolución del número de UFC/g de mohos y levaduras en las muestras de polen recogidas a lo largo de las seis semanas del ensayo. Letras diferentes sobre las columnas indican diferencias significativas entre semanas (Estadística no paramétrica. Prueba de los rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$). Información más detallada puede consultarse en el Anexo F.

Desde que las condiciones ambientales podrían tener influencia sobre las condiciones propias del polen, y sobre el crecimiento de los microorganismos, también se consideraron otras variables externas, como la temperatura media ambiental y la humedad media ambiental durante el tiempo que permaneció el polen en los cajones de los cazapólenes. Estos datos fueron obtenidos de la base de datos de la Estación Agrometeorológica de Rabanales-BG Olivo de la Universidad de Córdoba (Tabla-resumen de datos meteorológicos en Anexo C). En el estudio se encontraron relaciones significativas (Tabla 22) entre estas variables y las variables estudiadas en el polen, y entre estas últimas (Prueba de correlación Rho de Spearman, $p \leq 0,05$). Cabe destacar la correlación significativa negativa entre la temperatura media a la que estuvo sometido el polen durante su permanencia en los cajones de las trampas cazapólen y el posterior crecimiento microbiano. También se encontró correlación significativa entre la humedad media exterior y el posterior crecimiento microbiano, pero en este caso esta correlación fue negativa. En este mismo sentido es interesante la correlación significativa positiva entre la a_w y el crecimiento microbiano.

En resumen, con este aspecto del estudio pudimos confirmar la alta carga microbiana, potencialmente peligrosa para el consumo humano, que mostró el polen apícola recolectado en las trampas cazapólen, coincidiendo en

esta afirmación con lo apuntado por Belhadj *et al.* (2012), Adjlane *et al.* (2017) y Gómez-Pajuelo (2020). Esta carga microbiológica se fue reduciendo a medida que avanzaba el ensayo, probablemente influida por las condiciones ambientales, como muestran las relaciones significativas encontradas entre las temperaturas medias y las humedades medias ambientales con la a_w y la carga microbiológica registrada para las diferentes familias de microorganismos estudiados.

Tabla 22. Correlación entre dos variables ambientales: temperatura media ambiental y humedad ambiental media acumulada durante el tiempo que pasó el polen en el cajón del cazapolen, antes de ser recolectado (Prueba de correlación Rho de Spearman, $p \leq 0,05$). En sombreado aparecen todas aquellas correlaciones que fueron significativas.

Rho de Spearman		Humedad Acumulada	Peso	a_w	Enterobacterias	Aer. Mesofilos	Lev. y mohos
Temperatura media de permanencia	Coeficiente	-0,909	-	-0,723	-0,434	-0,529	-0,469
	Sig. (bilateral)	0,000	0,065	0,000	0,000	0,000	0,000
	N	171	167	162	148	148	148
Humedad media acumulada	Coeficiente de correl.		0,122	0,852	0,609	0,604	0,624
	Sig. (bilateral)		0,115	0,000	0,000	0,000	0,000
	N		167	162	148	148	148
Peso	Coeficiente de correl.			0,374	0,426	0,450	0,523
	Sig. (bilateral)			0,000	0,000	0,000	0,000
	N			164	148	148	148
a_w	Coeficiente de correl.				0,719	0,649	0,765
	Sig. (bilateral)				0,000	0,000	0,000
	N				148	148	148
Enterobacterias	Coeficiente de correl.					0,641	0,677
	Sig. (bilateral)					0,000	0,000
	N					148	148
Aerobios-mesófilos	Coeficiente de correl.						0,711
	Sig. (bilateral)						0,000
	N						148

Otro elemento objeto de estudio de este ensayo, fue determinar la influencia del periodo de permanencia del polen en el cajón de la trampa cazapolen, con la evolución de la carga microbiológica. Para Kieliszek *et al.* (2017) parece que el paso crítico en cuanto a la contaminación microbiológica es la recolección de polen de las trampas cazapolen.

Desde que nosotros colocamos mallas en las trampas cazapólen para diferenciar el tiempo que permaneció el polen en el cajón antes de ser retirado de la trampa cazapolen (el tiempo fue uno, dos y hasta tres días), pudimos analizar la influencia de este factor sobre las variables estudiadas en las muestras de polen, y más concretamente: evolución del peso de la muestra de polen (Figura 60), la determinación de la a_w en las distintas muestras de polen fresco discriminando por días de permanencia (Figura 61), y los correspondientes recuentos obtenidos para enterobacterias, aerobios-mesófilos y mohos y levaduras. Los resultados son presentados más detalladamente en la Tabla 23 y en las Figuras 60 a 64.

Tabla 23. Análisis descriptivo del crecimiento de los microorganismos y de la producción de polen en gramos en el periodo de 24, 48 y 72 horas de permanencia en el cajón. Los resultados se expresan en UFC/g para los recuentos microbiológicos.

Variables objeto de estudio	PERIODO PERMANENCIA	Número de muestras	Media	Desviación standar	Mínimo	Máximo
Tamaño de las muestras de polen en gramos	24 HORAS	27	72,22	66,64	3,31	269,06
	48 HORAS	27	130,61	117,76	0,33	412,69
	72 HORAS	27	129,63	108,07	3,69	407,62
	TOTAL	81	110,82	102,48	0,33	412,69
a_w	24 HORAS	27	0,62	0,11	0,37	0,74
	48 HORAS	25	0,63	0,12	0,38	0,76
	72 HORAS	27	0,67	0,11	0,46	0,81
	TOTAL	79	0,64	0,12	0,37	0,81
Recuento de enterobacterias	24 HORAS	25	4,81 x 10 ⁴	4,28 x 10 ⁴	5,5 x 10 ²	1,5 x 10 ⁵
	48 HORAS	23	8,50 x 10 ⁴	1,05 x 10 ⁵	1 x 10 ³	3,9 x 10 ⁵
	72 HORAS	26	2 x 10 ⁵	2,60 x 10 ⁵	1 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁶
	TOTAL	74	1,11 x 10 ⁵	1,78 x 10 ⁵	5,5 x 10 ²	1,1 x 10 ⁶
Recuento de microorganismos aerobios mesófilos	24 HORAS	25	2 x 10 ⁵	2,48 x 10 ⁵	1,6 x 10 ³	7 x 10 ⁵
	48 HORAS	23	3,61 x 10 ⁵	6,46 x 10 ⁵	5 x 10 ³	3 x 10 ⁶
	72 HORAS	26	1 x 10 ⁶	1,60 x 10 ⁶	2 x 10 ³	4,7 x 10 ⁶
	TOTAL	74	5,31 x 10 ⁵	1,07 x 10 ⁶	1,6 x 10 ³	4,7 x 10 ⁶
Recuento de mohos y levaduras	24 HORAS	25	1,36 x 10 ⁶	1,75 x 10 ⁶	3,5 x 10 ³	6,8 x 10 ⁶
	48 HORAS	23	7 x 10 ⁶	6,5 x 10 ⁶	1 x 10 ⁴	5,4 x 10 ⁷
	72 HORAS	26	1,83 x 10 ⁷	1,2 x 10 ⁷	5,5 x 10 ⁴	7,4 x 10 ⁷
	TOTAL	74	9,05 x 10 ⁶	5,04 x 10 ⁶	3,5 x 10 ³	7,4 x 10 ⁷

El peso del polen recogido (Figura 60) en lo cazapólenes fue significativamente inferior en el primer día, al recogido el segundo y el tercer día. No fueron detectadas diferencias significativas entre estos dos últimos periodos (segundo y tercer día) (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) (Tabla 24). Una posible explicación, de un menor tamaño de la muestra significativamente menor obtenida en las primeras 24 horas, puede deberse a que al cerrar la rejilla de la trampa cazapolen el primer día de la semana (lunes) las abejas se enfrentan a una situación diferente con respecto a los cuatro días anteriores (en los que la rejilla permaneció abierta), situación a la que la abeja le cuesta adaptarse, de ahí que introduzca menos polen.

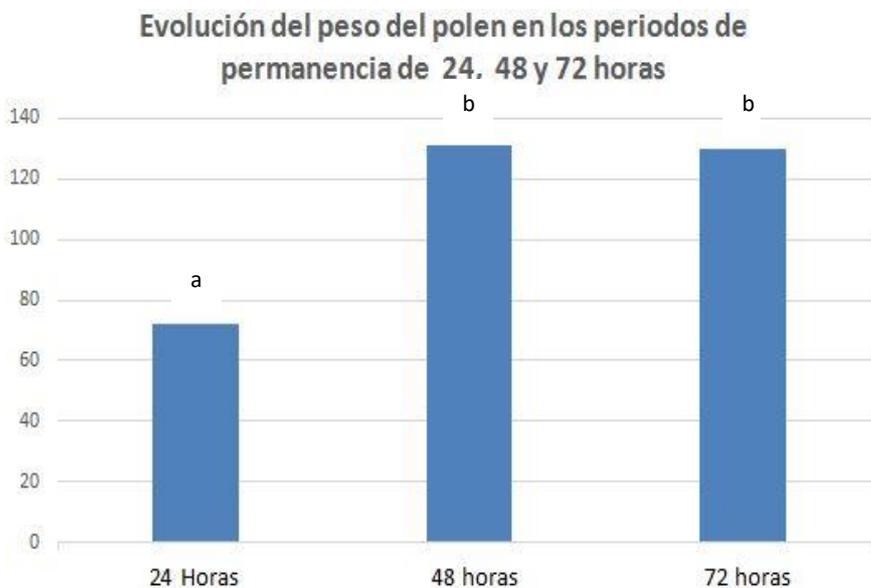


Figura 60. Evolución del peso del polen en gramos recogido según los periodos de 24, 48 y 72 horas de permanencia en el cajón, destinado a valorar el nivel de contaminación microbiológica del polen de abejas. Letras diferentes entre columnas evidencian diferencias significativas. Información más detallada puede consultarse en la Tabla 23.

Tabla 24. Resultados de la comparación por parejas (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) entre el tamaño de las muestras de polen (peso), registrados durante el primer, segundo y tercer día de recolección de polen en las trampas cazapolen.

	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada ^a
Peso 24 horas-Peso 72 horas	-1,111	0,272	-4,082	0,000	0,000
Peso 24 horas-Peso 48 horas	-1,222	0,272	-4,491	0,000	0,000
Peso 72 horas-Peso 48 horas	0,111	0,272	0,408	0,683	1,000

Para la variable a_w (Figura 61), los resultados mostraron una tendencia creciente a lo largo de los tres periodos de recogida del polen en los que se desarrolló el estudio.

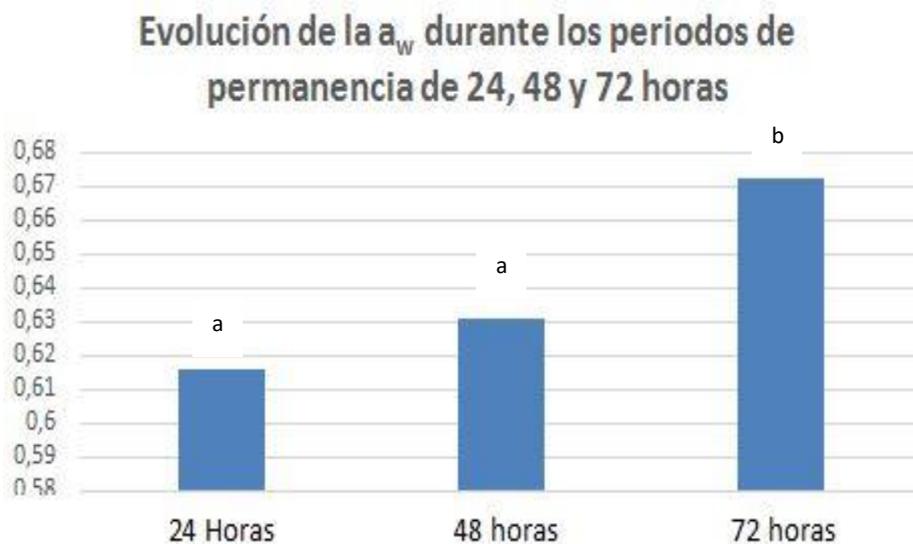


Figura 61. Evolución de la actividad de agua de las muestras de polen con un periodo de permanencia en el cajón de 24, 48 y 72 horas. Letras diferentes entre columnas evidencian diferencias significativas entre los distintos periodos de permanencia. Información más detallada puede consultarse en la Tabla 23.

En el polen que permaneció 72 horas en el cajón de la trampa cazapolen encontramos unos valores de a_w significativamente superiores a los

valores de a_w de las muestras de polen que permanecieron 24 y 48 horas (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) (Tabla 25).

Tabla 25. Resultados de la comparación por parejas (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) entre los datos de la a_w de las muestras de polen, registrados durante el primer, segundo y tercer día de recolección de polen en las trampas cazapolen.

	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada ^a
a_w 24 horas-a_w 48 horas	-0,580	0,283	-2,051	0,040	0,121
a_w 24 horas-a_w 72 horas	-1,460	0,283	-5,162	0,000	0,000
a_w 48 horas-a_w 72 horas	-0,80	0,283	-3,111	0,002	0,006

En el caso de la de la calidad microbiológica de las muestras de polen, tanto para enterobacterias, microorganismos aerobios mesófilos, y mohos y levaduras, se detectó la misma tendencia ascendente anteriormente descrita para la a_w de las muestras, con un incremento de las UFC/g a medida que aumentaba el tiempo de permanencia del polen en el cajón (Figuras 62 a 64). Se detectaron diferencias significativas entre los tres periodos de permanencia del polen en el cajón (prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) (información más detallada se puede consultar en la Tabla 23). En todos los casos hubo diferencias significativas en la carga microbiológica entre los tres periodos de permanencia: 24, 48 y 72 horas, excepto para microorganismos aerobios mesófilos y para mohos y levaduras, para los que no se detectaron diferencias significativas entre permanecer 48 o 72 horas en los cajones (prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) (Tablas 26 a 28)

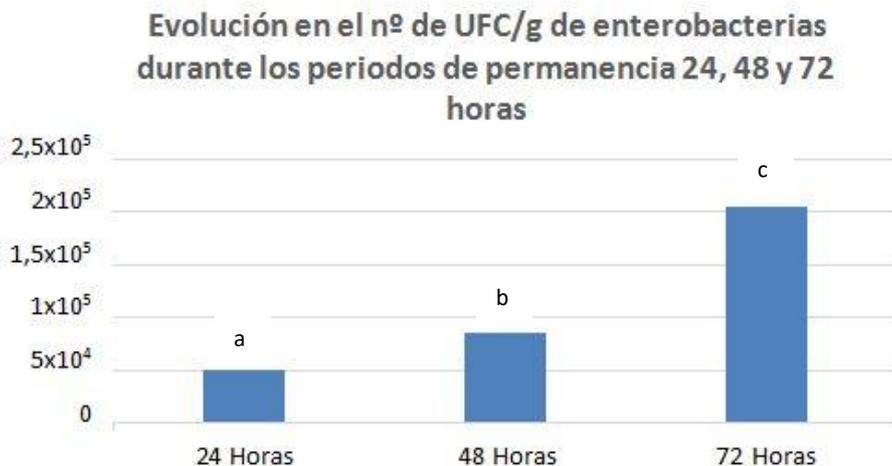


Figura 62. Evolución del nº de UFC/g de enterobacterias de las muestras de polen con un periodo de permanencia en el cajón de 24, 48 y 72 horas. Letras diferentes entre columnas evidencian diferencias significativas entre los distintos periodos de permanencia. Información más detallada puede consultarse en la Tabla 23.

Tabla 26. Resultados de la comparación por parejas (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) entre los datos del número de UFC/g de enterobacterias de las muestras de polen, registrados durante las 24, 48 y 72 horas de permanencia en el cajón de las trampas cazapolen.

	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada ^a
Enterobacterias 24 horas-	-0,826	0,295	-2,801	0,005	0,015
Enterobacterias 48 horas					
Enterobacterias 24 horas-	-1,587	0,295	-5,382	0,000	0,000
Enterobacterias 72 horas					
Enterobacterias 48 horas-	-0,761	0,295	-2,580	0,010	0,030
Enterobacterias 72 horas					

En la evolución de la carga microbiana en el número de UFC/g de microorganismos aerobios mesófilos, también se demuestra un aumento

desde el periodo de 24 horas hasta el periodo de 72 horas de permanencia en el cajón, a lo largo de las seis semanas que duró el ensayo (Figura 63).

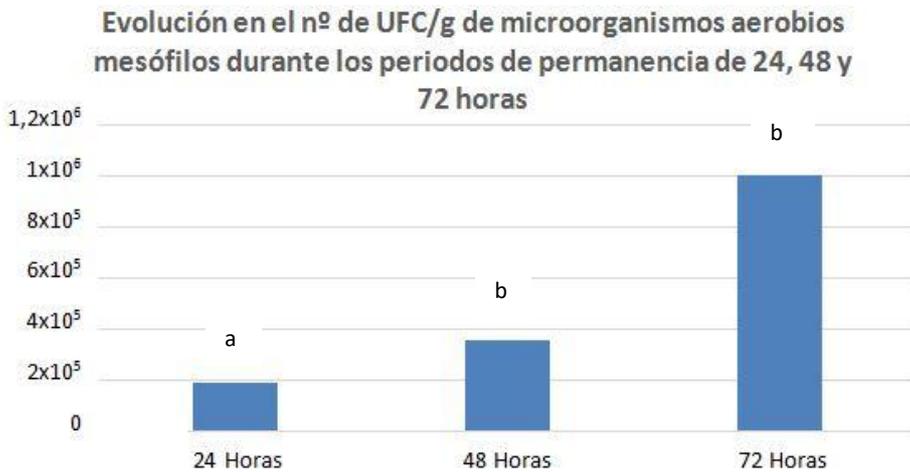


Figura 63. Evolución del nº de UFC/g de microorganismos aerobios mesófilos de las muestras de polen con un periodo de permanencia en el cajón de 24, 48 y 72 horas. Letras diferentes entre columnas evidencian diferencias significativas entre los distintos periodos de permanencia. Información más detallada puede consultarse en la Tabla 23.

Tabla 27. Resultados de la comparación por parejas (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) entre los datos del número de UFC/g de microorganismos aerobios mesófilos de las muestras de polen, registrados durante las 24, 48 y 72 horas de permanencia en el cajón de las trampas cazapolen.

	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada ^a
Aerobios mesófilos 24 horas-Aerobios mesófilos 48 horas	-0,783	0,295	-2,654	0,008	0,024
Aerobios mesófilos 24 horas-Aerobios mesófilos 72 horas	-1,304	0,295	-4,423	0,000	0,000
Aerobios mesófilos 48 horas-Aerobios mesófilos 72 horas	-0,522	0,295	-1,769	0,077	0,231

En la evolución de la carga microbiológica en el número de UFC/g de mohos y levaduras también se demuestra un aumento desde el periodo de 24 horas hasta el periodo de 72 horas de permanencia en el cajón, durante las seis semanas que duró el ensayo. (Figura 64).

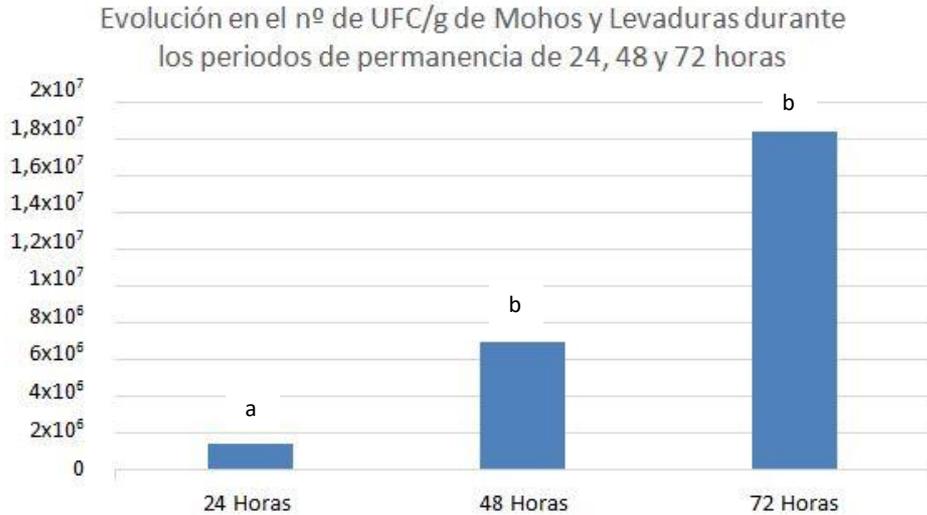


Figura 64. Evolución del nº de UFC/g de mohos y levaduras de las muestras de polen con un periodo de permanencia en el cajón de 24, 48 y 72 horas. Letras diferentes entre columnas evidencian diferencias significativas entre los distintos periodos de permanencia. Información más detallada puede consultarse en la Tabla 23.

Tabla 28. Resultados de la comparación por parejas (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) entre los datos del número de UFC/g de mohos y levaduras de las muestras de polen, registrados durante las 24, 48 y 72 horas de permanencia en el cajón de las trampas cazapolen.

	Estadístico de prueba	Desv. Error	Desv. Estadístico de prueba	Sig.	Sig. ajustada ^a
Mohos y levaduras 24 horas-Mohos y levaduras 48 horas	-0,783	0,295	-2,654	0,008	0,024
Mohos y levaduras 24 horas-Mohos y levaduras 72 horas	-1,304	0,295	-4,423	0,000	0,000
Mohos y levaduras 48 horas-Mohos y levaduras 72 horas	-0,522	0,295	-1,769	0,077	0,231

A tenor de los resultados obtenidos, coincidimos con *González et al. (2005)* que estudiando muestras de polen de abejas de España y Argentina concluyeron que la recogida de polen de las trampas cazapolen era una etapa crítica, ya que cuanto más largo era el período de recogida de polen, mayor era la contaminación microbiológica que se obtenía, ya que podía estar expuesto a una alta humedad relativa. En este sentido, *Serra-Bonvehí & López-Alegret (1986)* advierten que la producción de micotoxinas podría ocurrir si el polen de abeja es secado naturalmente por el sol. También recomendaron recoger el polen antes de que transcurran 48 horas desde la instalación de las trampas de polen. *Serra-Bonvehí & Scolá-Jordá (1997)* informaron de que una elevada actividad hídrica aumenta el número de microorganismos propios pero también sus metabolitos, especialmente las aflatoxinas, afirmando dichos autores aseguran que una recogida más temprana del polen puede disminuir el número de microorganismos. Además, aunque *Campos et al. (2021)* afirman que no existe un consenso claro en la comunidad científica en cuanto al periodo de recogida del polen de la trampa cazapolen, nuestra aportación es que el polen no debe de ser recogido en un periodo superior a las 24 o 48 horas de permanencia en el cajón.

5.2. Segundo Ensayo. Influencia de la Esterilización del Cajón de la Trampa Cazapolen en la Calidad Higiénica del Polen Apícola

Una vez confirmada la alta carga microbiológica del polen de abeja recolectado, era importante establecer el origen de esa contaminación y proponer medidas correctoras. En este segundo ensayo comenzamos a estudiar la trampa cazapolen como posible origen de la contaminación. Concretamente, planteamos como posible factor el estado higiénico del material, por lo que comparamos la carga microbiológica del polen según usáramos el cajón de la trampa cazapolen repetidamente, sin esterilizaciones intermedias, hasta el final del ensayo, como es habitual en el proceso de producción comercial del polen, frente a un proceso de higienización y esterilización periódica, justo antes de cada nuevo uso semanal.

De la misma forma que en el ensayo primero, en este propusimos un estudio con seis semanas de recolección. No obstante, las condiciones climáticas de las semanas 1 y 4, con elevadas precipitaciones, no permitieron la recolección de polen por parte de las abejas, por lo que no fue posible la obtención de polen en los muestreos correspondientes a esas dos semanas, hecho frecuente en este tipo de trabajo, con importantes condicionantes meteorológicos que influyen en la actividad pecoreadora de la abeja, tal como señalan *Percival (1947)* y *Louveaux (1958)*. De igual forma *Mauriello et al.*

(2017) apuntan a que en los días de lluvia, la abeja disminuye drásticamente su actividad forrajera, que fue lo que ocurrió esas dos semanas (consultar Tabla-Resumen de las condiciones meteorológicas del ensayo en Anexo D, primera y cuarta semana).

Siguiendo la pauta del primer estudio, en las muestras de polen de este ensayo, se evaluaron cinco variables: peso del polen recogido, a_w , enterobacterias, microorganismos aerobios-mesófilos y mohos y levaduras (el estudio de estas variables viene reflejado en el Anexo G). No se detectó presencia de coliformes ni de *S. aureus*, coincidiendo estas ausencias con los resultados del primer ensayo, y con lo aportado por Adjlane *et al.* (2017) en su estudio sobre la carga microbiológica del polen fresco argelino. Una vez más, los datos no se ajustaron a una distribución normal (Shapiro-Wilk, $p \leq 0,05$) (ver tabla 29), por lo que fueron analizados con estadística no paramétrica.

Tabla 29. Estudio de la distribución de los datos obtenidos de las distintas variables estudiadas en las muestras de polen que se obtuvieron en el segundo ensayo (abril-mayo del 2016) (Prueba de Shapiro-Wilk, $p \leq 0,05$).

	Shapiro-Wilk		
	Estadístico	gl	Sig
Peso	0,903	23	0,029
a_w	0,587	23	0,000
Enterobacteris	0,281	23	0,000
Aerobios mesófilos	0,506	23	0,000
Levaduras y Mohos	0,413	23	0,000

Cada semana se compararon los resultados obtenidos de cada variable entre el grupo de colmenas en las que se usó el cajón de la trampa cazapolen de forma continua, sin aplicar tratamiento de esterilización y el grupo de colmenas en la que sí se esterilizó el cajón, durante las seis semanas que duró el ensayo. El tamaño de la muestra de polen recogida cada semana, expresada como peso en gramos, siguió la misma tendencia para ambos grupos de colmenas (con tratamiento de esterilización del cajón de la trampa cazapolen y sin tratamiento de esterilización del cajón de la trampa cazapolen) (Fig. 65 y Anexo G). No fueron detectadas diferencias significativas entre ambos grupos en ninguna de las semanas en las que se alargó el estudio (se utiliza el Test U de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$). Tampoco fueron detectadas diferencias significativas entre ambos grupos para la variable a_w en las muestras de polen recogido, excepto en la tercera semana, en la que las muestras procedentes de trampas cazapolen con cajones no esterilizados, tuvieron una a_w

significativamente superior a las muestras procedentes de trampas cazapolen con cajones de esterilizados (Test U de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$) (Fig. 66 y Anexo G), lo cual es francamente difícil de atribuir a haber esterilizado o no el cajón del cazapolen.

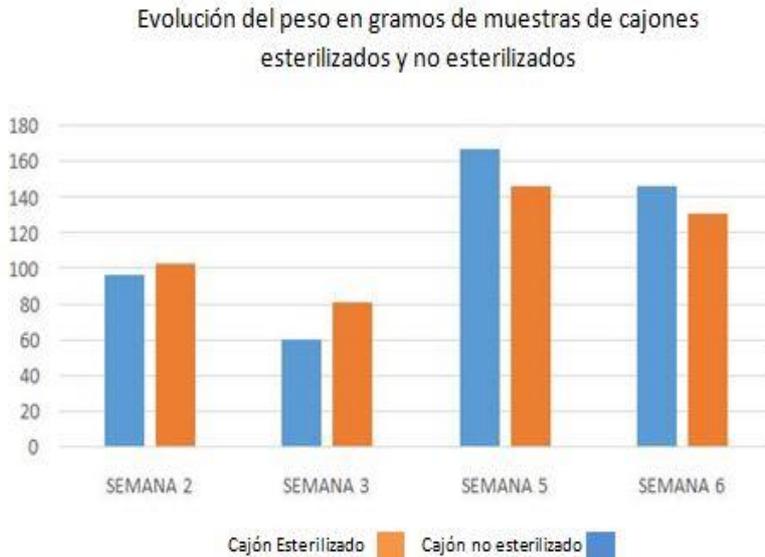


Figura 65. Evolución del peso en gramos de las muestras procedentes de cajones esterilizados y no esterilizados a lo largo de las distintas semanas. En las semanas 1 y 4 no pudimos obtener muestras debido a las condiciones meteorológicas. En ninguna de las semanas fueron detectadas diferencias significativas entre los tratamientos (Test U de Mann-whitney, $p \geq 0,05$). Información más detallada está disponible en el Anexo G.

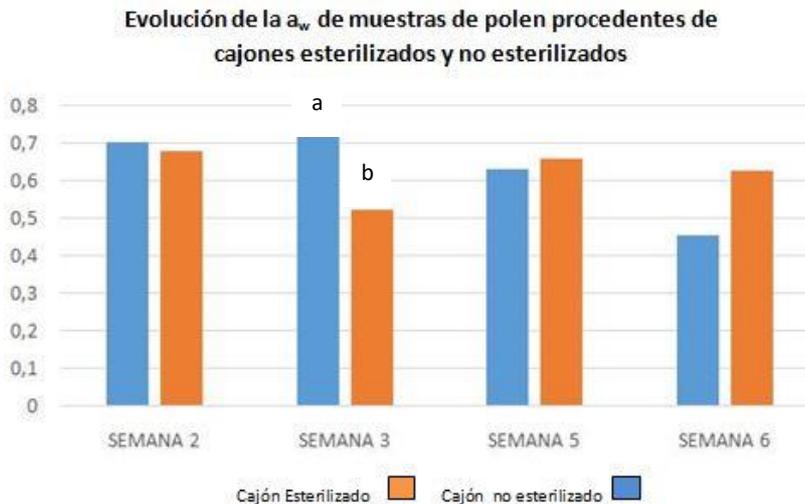


Figura 66. Evolución de la a_w de las muestras de polen procedentes de cajones esterilizados y no esterilizados a lo largo de las distintas semanas. En las semanas 1 y 4 no pudimos obtener muestras debido a las condiciones meteorológicas. Letras diferentes sobre las columnas de cada semana, muestra diferencias significativas entre los tratamientos (Test U de Mann-whitney, $p \leq 0,05$). Información más detallada está disponible en el Anexo G.

Respecto al recuento de microorganismos en las muestras de polen, los resultados fueron desiguales. Solo se detectó un nivel alto de contaminación por enterobacterias en las muestras de la segunda semana procedentes de las trampas cazapolen con los cajones no esterilizados. Los microorganismos aerobios mesófilos solo mostraron un alto recuento en ambos grupos en la semana 5, y los mohos y levaduras en la semana tres, especialmente en las muestras procedentes de trampas cazapolen con cajones no esterilizados. En ninguno de los casos fueron detectadas diferencias significativas entre ambos grupos (Test U de Mann-whitney, $p \leq 0,05$) (Figuras 67 a 69 y Anexo G).

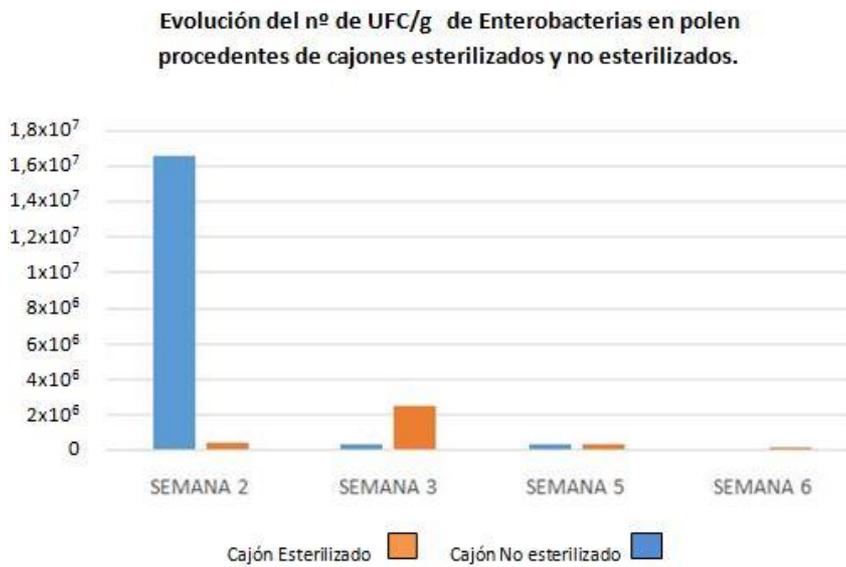


Figura 67. Evolución del número de unidades formadoras de colonias (nº de UFC/g) de enterobacterias en las muestras de polen procedentes de cajones con esterilización semanal y los no esterilizados. Los datos se muestran como repeticiones semanales. En las semanas 1 y 4 no pudimos obtener muestras debido a las condiciones meteorológicas. No fueron detectadas diferencias significativas entre los dos grupo de polenes (procedentes de cajones esterilizados semanalmente y no esterilizados) en ninguna de las semanas (Test U de Mann-whitney, $p \leq 0,05$). Información más detallada está disponible en el Anexo G.

Evolución del nº de UFC/g de Aerobios mesófilos en polen procedentes de cajones esterilizados y no esterilizados

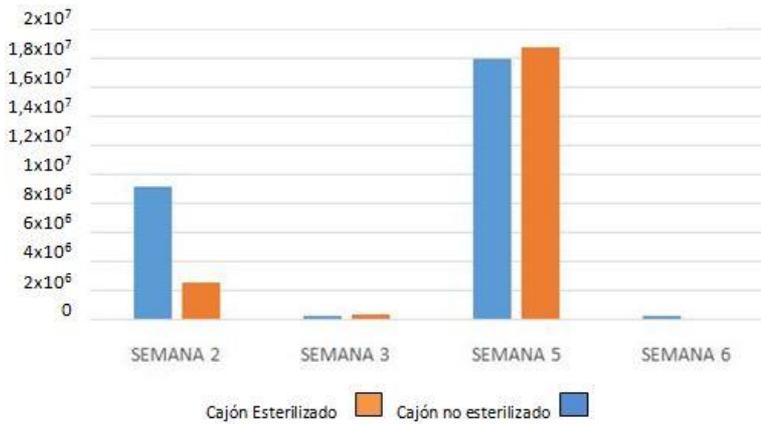


Figura 68. Evolución del número de unidades formadoras de colonias (nº de UFC/g) de microorganismos aerobios mesófilos en las muestras de polen procedentes de cajones con esterilización semanal y no esterilizados. Los datos se muestran como repeticiones semanales. (Test U de Mann-whitney, $p \leq 0,05$). En las semanas 1 y 4 no pudimos obtener muestras debido a las condiciones meteorológicas. No fueron detectadas diferencias significativas entre los dos grupos de polenes (procedentes de cajones esterilizados semanalmente y no esterilizados) en ninguna de las semanas (Test U de Mann-whitney, $p \leq 0,05$). Información más detallada está disponible en el Anexo G.

Evolución del nº de UFC/g de Mohos y Levaduras en polen procedentes de cajones esterilizados y no esterilizados



Figura 69. Evolución del número de unidades formadoras de colonias (nº de UFC/g) de mohos y levaduras en las muestras de polen procedentes de cajones con esterilización semanal y no esterilizados. Los datos se muestran como repeticiones semanales. (Test U de Mann-whitney, $p \leq 0,05$). En las semanas 1 y 4 no pudimos obtener muestras debido a las condiciones meteorológicas. No fueron detectadas diferencias significativas entre los dos grupos de polenes (procedentes de cajones esterilizados semanalmente y no esterilizados) en ninguna de las semanas (Test U de Mann-Whitney, $p \leq 0,05$). Información más detallada está disponible en el Anexo G.

Como ya fue apuntado en apartados anteriores, las condiciones ambientales podrían tener influencia sobre las condiciones propias del polen, y sobre el crecimiento de los microorganismos, por lo que también hemos estudiado posibles relaciones entre la temperatura media ambiental y la humedad media ambiental durante el tiempo que permaneció el polen en los cajones de los cazapólenes y el nivel de contaminación microbiológica de las diferentes familias de microorganismos incluidas en el ensayo. En el estudio se encontraron relaciones significativas (Tabla 30) entre estas variables y las variables estudiadas en el polen, y entre estas últimas (Prueba de correlación Rho de Spearman, $p \leq 0,05$). Cabe destacar que las correlaciones significativas detectadas entre la temperatura media a la que permaneció el polen en el cajón del cazapolen con la a_w registrada en este polen y con el grado de contaminación por enterobacterias, y de la humedad relativa media con los niveles de contaminación por enterobacterias y por mohos y levaduras, tuvieron signo negativo. Sí fue detectada correlación significativa positiva entre los niveles de contaminación por enterobacterias y por mohos y levaduras. La menor a_w debida a la mayor temperatura de mantenimiento del polen podría explicar el menor crecimiento de enterobacterias. Sin embargo, es más difícil explicar que una mayor humedad relativa ambiental genere menor contaminación de hongos y levaduras.

No nos ha sido posible establecer una discusión con resultados de otros autores, ya que hemos sido pioneros en este tipo de ensayos, al no disponer de literatura científica con la que poder entablar una discusión. Como consecuencia de los resultados obtenidos, no creemos necesario el tratamiento higienizante del cajón del cazapolen, ya que supone un gasto energético y de tiempo para el apicultor, ya que el estado higiénico del cajón no influyó en la carga microbiológica del polen fresco.

En definitiva, los resultados de este ensayo no detectaron que la práctica higiénica esterilizante del cajón de la trampa cazapolen de forma periódica a lo largo de las semanas que duró la recogida de muestras influyera de forma decisiva sobre el nivel de contaminación. En cambio, una vez más, sí se detectó una influencia en la carga microbiológica de las condiciones ambientales durante el periodo de recolección. Este último aspecto será tenido en cuenta en el siguiente ensayo.

Tabla 30. Correlación entre dos variables ambientales: temperatura media ambiental y humedad ambiental media acumulada durante el tiempo que permaneció el polen en el cajón de la trampa cazapolen, antes de ser recolectado (Prueba de correlación Rho de Spearman, $p \leq 0,05$). *Nota:* En sombreado aparecen todas aquellas correlaciones que fueron significativas.

Prueba Rho de Spearman $p \leq 0,05$		HR. Acumulada	Peso	a_w	Enterobacterias	Aerobios Mesofilos	Mohos y Levaduras
Temperatura media de permanencia	Coeficiente de correlación	-0,909	-0,065	-0,723	-0,434	-0,529	-0,469
	Sig. (bilateral)	0	0,405	0	0	0	0
	N	171	167	162	148	148	148
HR. media acumulada	Coeficiente de correlación		0,122	0,852	0,609	0,604	0,624
	Sig. (bilateral)		0,115	0	0	0	0
	N		167	162	148	148	148
Peso	Coeficiente de correlación			0,374	0,426	0,450	0,523
	Sig. (bilateral)			0	0	0	0
	N			164	148	148	148
a_w	Coeficiente de correlación				0,719	0,649	0,765
	Sig. (bilateral)				0	0	0
	N				148	148	148
Enterobacterias	Coeficiente de correlación					0,641	0,677
	Sig. (bilateral)					0	0
	N					148	148
Aerobios-mesófilos	Coeficiente de correlación						0,711
	Sig. (bilateral)						0
	N						148

5.3. Tercer ensayo. Influencia de los Factores Ambientales-Climatológicos, y Diseño de Trampas Cazapólenes en la Calidad Higiénica del Polen Apícola.

Las muestras de polen se obtuvieron del apiario instalado en la finca “Porrilla”, propiedad de la Diputación Provincial de Córdoba, en el término municipal de Alcolea. Los resultados de los análisis descriptivos se agruparon en apartados, todos ellos destinados a dar posibles explicaciones al nivel de contaminación registrado en el polen de abejas. En el Apartado A (punto 5.3.1. del presente capítulo) consideramos el efecto de las condiciones del entorno, sobre la carga microbiológica del polen de abeja. En el Apartado B (punto 5.3.2. del presente capítulo) estudiaremos la influencia de los factores climáticos y su relación con el medio. Y en el Apartado C (punto 5.3.3. del presente capítulo) analizaremos la influencia de los distintos diseños de trampas cazapólen en la calidad higiénica del polen apícola.

Se realizaron tres repeticiones correspondientes a la primera, segunda y tercera semana de mayo del 2017. En las repeticiones primera y tercera se obtuvieron 15 muestras. Para la segunda repetición solo fueron 12 muestras, debido a la escasa cantidad de polen extraído de algunas colmenas. El análisis descriptivo de producción de polen, a_w y del crecimiento de microorganismos correspondiente a este tercer ensayo se puede consultar en la Tabla 31. La Tabla-Resumen de los datos meteorológicos correspondientes a las tres semanas que duró el ensayo se pueden consultar en el Anexo E.

5.3.1. Apartado A. Efecto de las Condiciones del Entorno sobre la Carga Microbiológica del Polen de Abejas

Tanto las enterobacterias como los coliformes totales se utilizan de forma habitual para proporcionar pruebas de una higiene deficiente, un procesamiento inadecuado o incluso una posible contaminación fecal en determinados alimentos (Baylis *et al.*, 2011). Belhadj *et al.* (2012) obtienen resultados en coliformes comprendidos entre 1×10^3 y 3×10^5 UFC/g en su estudio microbiológico sobre polen fresco procedente de distintas regiones de Argelia. En nuestro estudio, las medias de los resultados (independientemente del tipo de trampa cazapólen) correspondientes a enterobacterias fueron $2,9 \times 10^4 \pm 4,1 \times 10^4$, $3,9 \times 10^5 \pm 4,9 \times 10^5$ y $5,4 \times 10^5 \pm 5,6 \times 10^6$ UFC/g, para las tres repeticiones respectivamente. Las medias para coliformes fueron 22 ± 13 , 37 ± 76 y $2,4 \times 10^3 \pm 3,6 \times 10^2$ microorganismos/g, respectivamente para las tres repeticiones (Tabla 31).

Ambos parámetros son indicadores de posible contaminación fecal. Belhadj *et al.* (2012) también advierten de la presencia de *S. aureus*; sin embargo, sus resultados fueron más elevados ($2,73 \times 10^4$ UFC/g) que los obtenidos en nuestras repeticiones (Tabla 31) lo que establece un riesgo sanitario para el consumo de polen fresco.

La causa probable es que en la zona donde se encontraba el apiario, se constató la existencia de fuentes de contaminación fecal, que eran excrementos de animales (principalmente de ovino y caprino) ya que el lugar de ubicación del apiario era utilizado como zona de pastoreo y tránsito de estos animales. También se constató la presencia de aguas estancadas a escasos metros del apiario, donde el ganado también acudía a beber. En este sentido, los altos valores de recuento microbiológico podrían explicarse por el comportamiento de las abejas melíferas, que tienden a preferir una fuente de agua sucia a otra más limpia, lo que puede deberse a su olor y contenido en sal (Johansson & Johansson, 1978). En este mismo sentido, Bonoan *et al.* (2017) y Filipiak *et al.* (2017) manifiestan que las fuentes de "agua sucia" ricas en nutrientes son un aspecto clave de las dietas de las abejas melíferas para complementar el pobre equilibrio estequiométrico de elementos que a veces carecen en sus dietas a base de polen. Más recientemente Cairns *et al.* (2021) afirman que las abejas melíferas, para completar su dieta necesitan minerales, ya que el contenido mineral de las flores puede ser inadecuado en concentración y composición. Por lo tanto, es habitual que las abejas melíferas beban "agua sucia" de fuentes naturales como los charcos y remansos, que por otra parte, es donde les es más fácil beber, ya que un cauce con corriente las puede arrastrar. Belhadj *et al.* (2012) analizaron el polen apícola argelino e informaron que dentro de la antera el polen es estéril, apuntando a la posible actuación de las abejas melíferas como portadoras de la contaminación del polen. En nuestro estudio, durante las tareas de campo, pudimos constatar esta situación, y la tendencia de las abejas a beber de estas aguas, así como la inclinación de posarse de forma continua sobre los excrementos de los animales. Es probable que las posibles fuentes de contaminación para las abejas melíferas sea el agua contaminada con heces de animales, así como los lugares contaminados por los que los animales han pasado previamente. Así mismo Sattler *et al.* (2015) señalan que la contaminación del polen se puede producir durante el proceso de producción, y también en la recolección y transformación del polen. Las enterobacterias y los coliformes totales pueden encontrarse en el tracto intestinal de los seres humanos y los animales, así como en el suelo y los entornos vegetales. La presencia de enterobacterias y coliformes totales en las muestras indica una posible contaminación fecal.

Belhadj *et al.* (2012) obtuvieron recuentos elevados de coliformes totales y en enterobacterias que superan los valores recomendados en polen crudo.



Figura 70. Abejas bebiendo de materia fecal encharcada. Fuente: <https://mudsongs.org/honey-bees-drinking-dirty-water/>

Por otra parte, tenemos los hábitos sociales de las abejas. Las abejas melíferas, al igual que otros insectos sociales, albergan una amplia variedad de bacterias, debido a la alta densidad de individuos dentro de la colonia, el intercambio de alimentos, y la coexistencia de miembros de la colonia de varias generaciones (Evans & Armstrong 2006; Loncaric *et al.*, 2009; Kačániová *et al.*, 2009).

En las colonias de *A. mellifera*, la abeja tiene contacto boca a boca con las larvas y entre sí (esto último por alimentación recíproca o trofolaxis). Por lo tanto, no es posible rastrear las bacterias exactamente hasta llegar a su origen, es decir, las cargas de polen, el saco de miel, el néctar recién almacenado o la miel. Las bacterias que se aíslan del tracto digestivo de la abeja, no se obtienen de una única fuente de procedencia (Loncaric *et al.*, 2011).

Sobre el tipo de microorganismos del tracto digestivo de las abejas melíferas, Rada *et al.* (1997) informaron en su estudio sobre la presencia de microorganismos anaeróbicos y aeróbicos, en concreto *Lactobacillus sp.*, coliformes, *Stafilococos*, *Bacillus sp.* y levaduras, publicando Kačániová *et al.* (2004) resultados comparables. En el estudio sobre de la microflora intestinal de abeja realizado por Chahbar & Mahamed (2014), la investigación se realizó sobre el tracto digestivo, el polen almacenado (pan de abeja) y pellets de polen. Las bacterias aisladas pertenecen a los géneros *Enterobacter*, *Pantoea*,

Pseudomonas y *Lactococcus* y a los géneros vecinos *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Todas las cepas de levaduras pertenecen probablemente a los géneros *Saccharomyces* y para mohos se identifican géneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria* y *Mucor*. Gilliam & Prest (1989) coinciden en estos últimos géneros que aislaron en polen de almendra en sus estudios para determinar los microorganismos asociados al polen. Así mismo, estos autores identificaron más de seis géneros de levaduras (*Cryptococcus*, *Kloeckera*, *Candida*, *Rhodotorula*, *Torulopsis*, *Hansenela*). Gonzalez *et al.* (2005) identificaron algunas especies de flora fúngica como *Penicillium verrucosum*, *Aspergillus Niger*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* y *Alternaria* spp.

Según los caracteres bioquímicos y fisiológicos que se encuentran, ciertas bacterias pueden estar implicadas en la degradación de los componentes de las dos capas externas del polen, ser ingeridas por las abejas con el alimento y compartidas con otros individuos de la colmena por el fenómeno de la trofalaxis. La presencia de levaduras y mohos se explica por la estrecha relación que la abeja tiene con su entorno, el suelo y las flores.

Todo lo anterior nos permite extraer una primera conclusión, y es que un entorno contaminado, unido a los hábitos de las abejas, pueden ser un importante origen de la contaminación microbiológica que detectamos en el polen, y coincidimos con lo apuntado por Mauriello *et al.* (2017), que afirman que los apicultores deben tener en cuenta los niveles de contaminación biológica de las áreas en las que se colocan las colmenas.

5.3.2. Apartado B. Influencia de los Factores Climáticos y su Relación con el Medio.

Dadas las relaciones que encontramos en ensayos anteriores entre las condiciones ambientales y la carga microbiológica del polen de abeja recolectado, en este apartado intentamos encontrar posibles efectos debidos a la dinámica de las condiciones ambientales. En este ensayo debimos tener en consideración la progresión habitual de las condiciones bioclimáticas, en la transición desde la primavera, más húmeda, hacia el verano, más seco. Esto se tradujo, entre otros aspectos, en la reducción del agua disponible para las abejas. Concretamente, durante las repetidas visitas al colmenar, pudimos comprobar como el agua del arroyo cercano, habitualmente usado por las abejas, reducía su cauce. Así, en la primera repetición el agua fluía, mientras que en la segunda y la tercera repetición (última semana muy calurosa con máximas superiores a 30 °C y con nula precipitación) se había convertido en

aguas estancadas (Ver Tabla-resumen con datos climatológicos correspondientes a los periodos de las tres repeticiones en Anexo E).

Los resultados presentados en la Tabla 31 muestran una reducción progresiva (a lo largo de las tres repeticiones) del peso de la muestra de polen recolectado. A medida que avanzó el ensayo se redujo la oferta polinífera y la consecuente producción de polen. Por el contrario, la a_w en las muestras se incrementó a lo largo de las tres repeticiones del ensayo. Esto es importante, desde que un incremento de la a_w puede ser una causa del incremento de la actividad microbiológica. El incremento progresivo también ocurrió en el recuento de microorganismos aerobios mesófilos, coliformes y enterobacterias. En el grupo de los mohos y levaduras se produjo una reducción en el periodo central del ensayo, seguido de un fuerte incremento en la tercera repetición, y en el caso de *S. aureus* hubo un incremento en la segunda repetición, seguido de un descenso final.

Tabla 31. Análisis descriptivo del crecimiento de microorganismos, a_w y producción de polen correspondiente al Tercer Ensayo.

	Produc Polen (peso) Media±S.D.	a_w Media±S.D.	Aerobios mesófilos Media±S.D.	Total de coliformes Media±S.D.	Enterobacterias totales Media±S.D.	Levadura y mohos Media±S.D.	<i>S. aureus</i> Media±S.D.
Primera repetición n=15	70,9±43,3	0,603±0,036	$1,4 \times 10^5 \pm 2,7 \times 10^5$	22±13	$2,9 \times 10^4 \pm 4,1 \times 10^4$	$2,1 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^5$	$1,1 \times 10^2 \pm 1,9 \times 10^2$
Segunda repetición n=12	55±23	0,631±0,031	$2,2 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$	37±76	$3,9 \times 10^5 \pm 4,9 \times 10^5$	$5,2 \times 10^2 \pm 3,9 \times 10^2$	$2,5 \times 10^3 \pm 6,3 \times 10^3$
Tercera repetición n=15	13±8,6	0,720±0,024	$3,6 \times 10^5 \pm 6 \times 10^5$	$2,4 \times 10^3 \pm 3,6 \times 10^2$	$5,4 \times 10^5 \pm 5,6 \times 10^6$	$3 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^7$	$0,7 \times 10^1 \pm 0,25 \times 10^1$

Nota: Los resultados se expresan en UFC/g para los recuentos microbiológicos, excepto para los coliformes totales que son microorganismos/g. Los resultados corresponden a tres repeticiones realizadas en las tres semanas primeras de mayo del 2017. El peso viene determinado en gramos.

El incremento de la contaminación microbiológica a lo largo del ensayo podría deberse a la contaminación ambiental. A medida que avanzaba la primavera, y coincidiendo además con una nula precipitación y elevadas temperaturas en la última semana del ensayo (ver Anexo E) las abejas encontraron una menor disponibilidad de agua, por lo que se vieron obligadas a recurrir a acúmulos de agua estancada. Estos resultados estarían de acuerdo con los encontrados por Belhadj *et al.* (2012) que encuentran diferencias significativas en recuentos microbianos de polen debidas a la humedad relativa, temperatura y precipitación. Concretamente estos autores encontraron algunas correlaciones entre coliformes, mohos-levaduras, aerobios mesófilos, estafilococos y humedad relativa.

Los datos registrados con este ensayo no se ajustaron a una distribución normal (Kolmogorov-Smirnov, $p \leq 0,05$) para ninguna de las variables salvo para la a_w^* (ver Tabla 32), por lo que fueron analizadas con estadística no paramétrica.

Tabla 32. Prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, $p \leq 0,05$) para el estudio de la distribución de los datos obtenidos de las variables incluidas en el ensayo por las cuales se demuestra que los datos no se distribuyen en una distribución normal.

	Kolmogorov-Smirnov		
	Estadístico	gl	Sig.
Peso	0,15	54	0,004
a_w^*	0,08	54	0,200*
Enterobacterias	0,255	54	0
<i>S. aureus</i>	0,459	54	0
Mohos y levaduras	0,326	54	0
Aerobios mesófilos	0,292	54	0
<i>E. coli</i>	0,377	54	0

Nota: *A excepción de la a_w , los datos registrados no se ajustaron a una distribución normal.

Cuando consideramos la variable tamaño de la muestra recogida (peso en gramos), solo fueron detectadas diferencias significativas entre la primera y la segunda repetición. Para la variable a_w fueron detectadas diferencias significativas entre las tres repeticiones. Probablemente esto se deba a los cambios en las temperaturas y en la variabilidad de la humedad relativa ambiental. Sin embargo, para los cinco grupos de microorganismos estudiados

en el presente ensayo (enterobacterias, microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras, *E. coli* y *S. aureus*, no fueron detectadas diferencias significativas entre ningunas de las tres repeticiones (Estadística no paramétrica. Test de Friedman, $p \leq 0,05$; prueba de los rangos de Wilkosen, $p \leq 0,05$). Las diferencias significativas en la a_w en las tres repeticiones se debería de haber traducido en detectar diferencias significativas en los grupo de microorganismos estudiados, coincidiendo así con lo aportado por [González et al. \(2005\)](#), los cuales apuntan a que una mayor a_w en el polen provocaría un aumento en la carga microbiológica. Así mismo, [Serra-Bonvehí & Scolá-Jordá \(1997\)](#) informan de que una elevada actividad hídrica aumenta el número de microorganismos propios. En principio, nuestros resultados estarían en clara contradicción con lo anteriormente expuesto. Probablemente, la explicación que pudiera darse a esta discordancia era que el entorno del apiario estaba tan altamente contaminado desde el punto de vista microbiológico (como ya se ha comentado anteriormente), que este grado de contaminación pudiera enmascarar otros posibles efectos, como la influencia de la a_w en la carga microbiológica. Como se puede apreciar en el Anexo E (Tabla-resumen de los datos climatológicos correspondientes a las tres semanas en las que se realizaron las tres repeticiones en mayo 2017), a medida que avanzaba el mes, coincidiendo con una nula precipitación (sobre todo en la última semana) y con elevadas temperaturas (en ocasiones muy superiores a los 30 °C), las abejas encontraron una menor disponibilidad de agua, por lo que se vieron obligadas a recurrir a acúmulos de agua estancada, que en este caso estaban situados a escasos metros de la ubicación del apiario.

5.3.3. Influencia del Diseño de Trampas Cazapólenes en la Calidad Higiénica del Polen Apícola

El análisis descriptivo correspondiente a este ensayo, en el cual se estudió la influencia del diseño de tres tipos diferentes de trampas cazapólenes (normal de piquera, normal de piquera modificado y de fondo) en relación con las variables peso, a_w , y distintos grupos de microorganismos estudiados, se pueden encontrar en la Tabla 33.

Tabla 33. Análisis descriptivo del crecimiento de microorganismos, a_w y producción de polen en relación con la trampa cazapolen.

	Producción Polen (peso) Media±S.D.	a_w Media±S.D.	Aerobios mesófilos Media±S.D.	Total de coliformes Media±S.D.	Enterobacterias totales Media±S.D.	Levadura y mohos Media±S.D.	<i>S. aureus</i> Media±S.D.
Cazapolen de fondo n=18	62,54±42,22	0,630±0,059	$6,8 \times 10^5 \pm 8,1 \times 10^5$	786±11122	$2,8 \times 10^5 \pm 4,4 \times 10^5$	$4,6 \times 10^4 \pm 7,4 \times 10^4$	61±177
Cazapolen frontal de piquera modificado n=18	33,61±26,59	0,641±0,062	$1,3 \times 10^6 \pm 1,3 \times 10^6$	762±1137	$2,9 \times 10^5 \pm 3,4 \times 10^5$	$5,5 \times 10^4 \pm 1 \times 10^5$	$2 \times 10^3 \pm 5,3 \times 10^3$
Cazapolen frontal de piquera n=18	40,76±34,58	0,658±0,063	$7 \times 10^5 \pm 9 \times 10^5$	844±1204	$5,1 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$	$1 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^5$	72±234

Los datos obtenidos para determinar la influencia de los tres diseños distintos de trampas utilizadas en las tres repeticiones, no se ajustaron a una distribución normal, salvo la a_w^* (Tabla 34)

Tabla 34. Prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, $p \leq 0,05$) para el estudio de la distribución de los datos obtenidos de las variables incluidas en el ensayo.

Kolmogorov-Smirnov			
	Estadístico	gl	Sig.
PESO	0,15	54	0,004
a_w^*	0,080	54	0,200*
Enterobacterias	0,255	54	0,000
<i>S. aureus</i>	0,459	54	0,000
Mohos y Levaduras	0,326	54	0,000
Aerobios mesófilos	0,292	54	0,000
<i>E. coli</i>	0,377	54	0,000

Nota: *A excepción de la a_w , los datos registrados no se ajustaron a una distribución normal.

De la misma manera que los resultados obtenidos por [Mauriello et al. \(2017\)](#) en su estudio sobre la caracterización microbiana del polen de abeja de la zona del Vesubio recogido mediante tres trampas diferentes, en nuestro trabajo tampoco fueron detectadas diferencias significativas entre los tipos de trampa cazapolen para ninguna de las variables estudiadas en las muestras de polen: peso, a_w , enterobacterias, microorganismos aerobios mesófilos, mohos y levaduras, *E. coli* y *S. aureus* (estadística no paramétrica. Test de Kruskal-Wallis para muestras no relacionadas, $p > 0,05$).

Lo habitual en la apicultura española es la utilización de la trampa cazapolen frontal de piquera, por su comodidad y fácil manejo. A tenor de los resultados obtenidos, y coincidiendo con [Mauriello et al. \(2017\)](#), la utilización de una trampa cazapolen distinta no influye en la carga microbiológica del polen, por tanto no es necesario la utilización de otro tipo de trampa cazapolen que la comúnmente usada por los apicultores españoles.

El polen fresco en este estudio presenta altos recuentos de microorganismos y supera los valores recomendados según [Campos et al. \(2008\)](#), que se exponen en la Tabla 12. De tal manera que es necesario un tratamiento descontaminante del polen fresco para su destino a consumo humano.

Por último, estamos de acuerdo con Campos *et al.* (2008) y Bogdanov (2006) en que la contaminación bacteriana del polen apícola es un gran problema y que, desde el punto de vista higiénico y de seguridad, deberían establecerse normas de calidad microbiológica.

5.4. Cuarto Ensayo. Tratamientos Descontaminantes del Polen Apícola por Desección con Aire Caliente, Ozonización y Combinación de ambos Métodos. Ensayo de Vida Útil. Efecto de los Tratamientos sobre el Contenido en Polifenoles y Características Sensoriales.

El polen fresco está sujeto a la degradación por mohos, levaduras y bacterias, por lo que su control de calidad es esencial para el consumo humano. Existen diferentes formas para la conservación e higienización del polen de abejas: (I) La desecación, en torno a 40 °C, es la más frecuente, genera seguridad alimentaria, pero produce efectos desfavorables, con pérdida de calidad, confiriendo al producto atributos sensoriales poco palatables, que llegan a ser desagradables para el consumo directo por el consumidor. (II) Descontaminación mediante procesos de irradiación de alimentos, o pasteurización fría, que es segura, pero también es cara, poco asequible y hay que tener en cuenta que aún existela percepción negativa del consumidor sobre los alimentos tratados con irradiación. (III) La liofilización, que es también poco accesible en la actualidad y, con el inconveniente, deque disminuye notablemente el contenido de vitamina C y provitamina. (IV) La congelación, que no provoca cambios sustanciales en la composición química del polen apícola, por lo que esta técnica debería recomendarse cuando se desee su conservación con fines nutricionales o terapéuticos, pero hay que controlar la seguridad microbiológica (Bogdanov, 2015). En cualquiera de ellas debe procesarse pronto, ya sea congelado o desecado, después de la recolección, para evitar su deterioro (Somerville, 2012). En este trabajo, con la finalidad de conseguir un producto con las máximas propiedades y altamente agradable para el consumidor, hemos optamos por la congelación, y el trabajo ha ido dirigido a salvar el reto microbiológico al que nos enfrentamos con el polen fresco congelado, que no es otro que garantizar la seguridad alimentaria.

Por lo tanto, dado que las posibilidades de actuar en este sentido durante el proceso de recolección han resultado poco eficaces, tendríamos que hacerlo sobre el polen de abeja ya recolectado. La opción propuestaha sido la ozonización. Se trata de aplicar un tratamiento de choque que reduzca la carga microbiológica y con ello garantizar la seguridad del alimento. En este ensayo consideramos tres subensayos: en el primero aplicamos la desecación

como proceso único, en el segundo aplicamos la ozonización como proceso único, y en el tercero aplicamos un sistema mixto de ambos métodos, además de estudiar la vida útil del polen de abejas tratado de esta última manera.

Los resultados del ensayo no se ajustaron a una distribución normal (Shapiro-Wilk, $p \leq 0,05$) (Tabla 35), por lo que fueron analizados con estadística no paramétrica. Los test usados se indican en cada cada subensayo.

Tabla 35. Prueba de Shapiro-Wilk para el estudio y distribución de los datos, $p \leq 0,05$

	Secado por aire caliente			Ozono			Combinación		
	Sta.	gl	Sig.	Sta.	gl	Sig.	Sta.	gl	Sig.
Enterobacterias	0,473	40	0,000	0,164	80	0,00	0,290	30	0,000
Porcentaje de reducción de Enterobacterias	0,616	40	0,000	0,691	80	0,00	0,642	30	0,000
Aerobios mesófilos	0,549	40	0,000	0,153	80	0,00	0,362	30	0,000
Porcentaje de reducción de aerobios mesófilos	0,873	40	0,000	0,761	80	0,00	0,898	30	0,008
Porcentaje de reducción de mohos y levaduras	0,785	40	0,000	0,688	80	0,00	0,831	30	0,000

5.4.1. Tratamiento Térmico: Polen de Abeja Secado con Corriente de Aire Caliente.

En este subensayo se realizó un proceso de desecación, con una temperatura de secado de $42 \pm 1^\circ\text{C}$, como tratamiento único, siguiendo a la mayoría de autores que recomiendan esta temperatura para el secado de polen (Isik *et al.*, 2018). La mayor reducción se observó en las enterobacterias, con porcentajes superiores al 90%, seguidas de los mohos y las levaduras con una reducción del 70-80% y, por último, los aerobios mesófilos con una reducción del 53-67% (ver Tabla 36). La reducción fue significativa en todos los grupos microbiológicos estudiados en comparación con el grupo control no tratado. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas dentro de los tres grupos de tiempo de exposición (prueba de Wilcoxon, $p \leq 0,05$).

Tabla 36. Reducción de la carga microbiana del polen secado al con aire caliente ($42\pm 1^\circ\text{C}$) a tres tiempos diferentes de exposición.

Grupo microbiológico	Tiempo de secado por aire caliente	N	Contar (UFC/g) (media \pm D.E.)	Reducción de la contaminación (media \pm D.E.)*
Enterobacteriaceae	Sin tratamiento	10	$2,4 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^4$	$0,0 \pm 0,0^a$
	15 min	10	$6,7 \times 10^2 \pm 4,6 \times 10^3$	$93,8 \pm 7,4^b$
	30 min	10	$8,4 \times 10^3 \pm 1,2 \times 10^4$	$96,1 \pm 3,8^b$
	45 min	10	$5,9 \times 10^3 \pm 1,05 \times 10^4$	$96,9 \pm 5,0^b$
	Sin tratamiento	10	$6,7 \times 10^4 \pm 6,7 \times 10^4$	$0,0 \pm 0,0^a$
Aerobios Mesófilos	Sin tratamiento	10	$2,0 \times 10^4 \pm 2,1 \times 10^4$	$53,0 \pm 55,7^b$
	15 min	10	$1,2 \times 10^4 \pm 8,1 \times 10^3$	$67,2 \pm 35,3^b$
	30 min	10	$1,4 \times 10^4 \pm 7,2 \times 10^3$	$59,1 \pm 33,2^b$
	45 min	10	$3,5 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$	$0,0 \pm 0,0^a$
	Sin tratamiento	10	$3,5 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$	$0,0 \pm 0,0^a$
Mohos y levaduras	Sin tratamiento	10	$3,5 \times 10^7 \pm 5,6 \times 10^7$	$0,0 \pm 0,0^a$
	15 min	10	$7,7 \times 10^5 \pm 7,4 \times 10^5$	$78,0 \pm 32,5^b$
	30 min	10	$9,4 \times 10^5 \pm 8,7 \times 10^5$	$70,3 \pm 45,8^b$
	45 min	10	$7,7 \times 10^5 \pm 6,8 \times 10^5$	$80,8 \pm 27,2^b$

Nota: * Letras diferentes que aparecen como superíndices indican resultados significativamente diferentes del porcentaje de reducción de la carga microbiana dentro del grupo microbiológico (estadística no paramétrica. Prueba de Wilcoxon, $p < 0,05$).

El tratamiento habitual de secado por aire caliente es eficaz para reducir la carga microbiana (Mauriello *et al.*, 2017), como se observó en nuestro ensayo, en el que la reducción de enterobacterias fue significativa y el porcentaje de reducción para aerobios mesófilos, mohos y levaduras también fue medio o incluso alto (véase la Tabla 36). Por ello, el secado por aire caliente debería ser satisfactorio para conseguir este propósito, pero también conlleva algunos inconvenientes como la pérdida de propiedades nutricionales, la reducción de la palatabilidad y la valoración de los consumidores (Collin *et al.*, 1995; Serra-Bonheví *et al.*, 2001).

5.4.2. Polen de Abeja Expuesto al Tratamiento con Ozono

En este caso el polen de abejas fue sometido a tratamientos únicos con ozono durante tiempos diferentes: 30 min, 60 min y testigo no tratado. En el caso de las enterobacterias, la reducción de la contaminación observada se situó entre el 80,0% y el 90,9%, en el caso de los aerobios mesófilos, entre el

69,1% y el 83,1%, y en el de los mohos y las levaduras, entre el 89,4% y el 89,5%. Todos los resultados, así como el porcentaje de reducción, se muestran en la Tabla 37. Todos los tratamientos mostraron una reducción microbiana significativa en comparación con el grupo de control no tratado (prueba de Wilcoxon, $p \leq 0,05$). Por el contrario, no hubo diferencias significativas entre las tres exposiciones temporales (prueba de Wilcoxon, $p \geq 0,05$).

Tabla 37. Reducción de la carga microbiana obtenida a partir del polen de abeja expuesto al ozono (potencia: 200mg/h).

Grupo microbiológico	Tiempo de exposición al ozono	N	Contar (UFC/g) (media \pm D.S.)	Reducción de la contaminación (media \pm D.E.)*
Enterobacterias	Sin tratamiento	20	$8,1 \times 10^6 \pm 2,3 \times 10^7$	$0,0 \pm 0,0$ a
	30 min	20	$8,8 \times 10^4 \pm 1,05 \times 10^5$	$80,0 \pm 6,6$ b
	60 min	20	$4,1 \times 10^4 \pm 4,7 \times 10^4$	$90,9 \pm 3,0$ b
Aerobios Mesófilos	Sin tratamiento	20	$2,0 \times 10^6 \pm 6,3 \times 10^6$	$0,0 \pm 0,0$ a
	30 min	20	$9,2 \times 10^4 \pm 1,4 \times 10^5$	$69,1 \pm 8,1$ b
	60 min	20	$5,4 \times 10^4 \pm 9,0 \times 10^4$	$83,1 \pm 5,0$ b
Mohos y levaduras	Sin tratamiento	20	$7,5 \times 10^8 \pm 2,0 \times 10^9$	$0,0 \pm 0,0$ a
	30 min	20	$2,1 \times 10^6 \pm 2,0 \times 10^6$	$89,5 \pm 4,4$ b
	60 min	20	$1,9 \times 10^6 \pm 3,5 \times 10^6$	$89,4 \pm 4,2$ b

*Los superíndices indican resultados significativamente diferentes del porcentaje de reducción dentro del grupo microbiológico (estadística no paramétrica. Prueba de Wilcoxon, $p \leq 0,05$).

5.4.3. Evaluación de la Vida Útil del Polen de Abeja con Tratamiento Combinado por Secado con Aire Caliente y Exposición al Ozono durante 15/30 minutos, respectivamente.

No se encontraron diferencias significativas entre los tiempos de exposición al ozono de 30 y 60 minutos para reducir la carga microbiana. Por lo tanto, se eligió el tiempo más bajo de exposición al ozono junto con el secado por aire caliente durante 15 minutos para evaluar la vida útil del polen apícola tratado y su almacenamiento en frío (4°C). Esta temperatura de refrigeración es ligeramente inferior a la propuesta por Isik *et al.* (2018) de 5°C a 10°C para el mantenimiento de su calidad.

Con este tratamiento combinado se estudió la evolución de la carga microbiana en 18 muestras, con el fin de obtener información para establecer la vida útil del polen de abeja tratado según este método. Tras este

tratamiento, los resultados mostraron una importante reducción de todos los grupos de microorganismos incluidos en este estudio, especialmente del grupo de enterobacterias. Tres semanas después de tratar el polen de abeja y mantenerlo en frío, la carga microbiana aumentó lentamente. La última evaluación se llevó a cabo seis semanas después del tratamiento y, aunque la carga microbiana siguió aumentando, se mantuvo en un nivel inferior al observado inicialmente en el polen de abeja fresco. Los resultados se muestran en la Tabla 39.

No sólo la congelación del polen fresco de abeja es suficiente para garantizar su seguridad alimentaria, sino que, si bien detiene el crecimiento de microorganismos, no reduce los presentes. Por esta razón, sería una opción adecuada adoptar un tratamiento de choque seguido de un almacenamiento en frío. Nuestros resultados muestran una importante reducción de la carga microbiana cuando se expone el polen de abeja al ozono (Tabla 38) por lo que podría considerarse un tratamiento de choque conveniente. La conservación por congelación posterior (-20 °C) evitaría el posterior aumento de la carga microbiológica, convirtiéndolo en un producto más seguro. Por el contrario, el tratamiento con ozono permitió una reducción de la carga microbiana tal que se mantuvo baja cuando el polen de abeja se conservó en el frigorífico (4 °C) durante varias semanas (Tabla 38), lo que ofrece nuevas oportunidades comerciales aunque es necesario seguir investigando para garantizar la seguridad alimentaria.

Tabla 38. Evaluación de la carga microbiana, en seis momentos diferentes, en el polen de abeja tratado combinando 30 minutos de exposición al ozono junto con 15 minutos de secado por aire caliente y mantenido en un frigorífico a 4°C.

	Enterobacterias		Aerobios mesófilos		Mohos y levaduras	
	N	(Media ± D.E.) *	N	(Media ± D.E.) *	N	(Media ± D.E.) *
a.t. ¹	18	6,0x10 ⁶ ± 1,4x10 ^{7a}	18	1,1x10 ⁶ ± 3,5x10 ^{6a}	18	2,4x10 ⁸ ± 6,6x10 ^{8a}
d.t. ²	18	1,0x10 ⁴ ± 3,5x10 ^{4b}	18	1,4x10 ⁴ ± 2,7x10 ^{4b}	18	6,5x10 ⁵ ± 1,2x10 ^{6b}
1 semana d.t. ²	18	9,9x10 ³ ± 2,0x10 ^{4c}	18	3,6x10 ⁴ ± 6,8x10 ^{4bc}	18	4,3x10 ⁶ ± 1,2x10 ^{7b,c}
2 semana d.t. ²	18	2,6x10 ⁴ ± 4,4x10 ^{4d}	18	2,5x10 ⁴ ± 5,0x10 ^{4b}	18	7,8x10 ⁶ ± 1,9x10 ^{7c,d}
3 semana d.t. ²	18	3,6x10 ⁴ ± 6,3x10 ^{4e,f}	18	5,9x10 ⁴ ± 1,3x10 ^{5b}	18	8,4x10 ⁶ ± 1,9x10 ^{7c,d}
6 semana d.t. ²	17	2,4x10 ⁵ ± 5,9x10 ^{5e,f}	17	9,6x10 ⁴ ± 1,4x10 ^{5c}	17	1,1x10 ⁷ ± 2,1x10 ^{7d}

Nota: Las iniciales a.t. indican antes del tratamiento, y d.t. después del tratamiento. *Diferentes letras indicadas como superíndices junto a los resultados indican resultados significativamente diferentes del porcentaje de reducción entre evaluaciones dentro del grupo microbiológico (estadística no paramétrica. Prueba de Wilcoxon, p<0.05).

5.4.4. Estudio del Contenido en Polifenoles presentes en el Polen de Abeja tras el Tratamiento (Desecación y Ozono) durante 30 Minutos.

Se evaluaron los posibles cambios en la composición de los polifenoles. Comparación entre el polen de abeja fresco, el polen de abeja desecado con aire caliente (30 minutos) y el polen de abeja expuesto al ozono (30 minutos). Para analizar los resultados se aplicó la estadística no paramétrica, ya que los datos no se distribuían normalmente (Shapiro-Wilk, $p \leq 0,05$), no había homogeneidad de varianza (heteroscedasticidad) y el número de muestras era escaso. No se detectaron diferencias significativas entre los tres tipos de polen de abeja: fresco, desecado y ozonizado para los polifenoles estudiados (prueba de Friedman, $p \leq 0,05$). Los resultados se muestran en la Tabla 39. Es necesario señalar que los flavonoides están presentes en el polen en mayor cantidad que los ácidos fenólicos, de acuerdo con nuestros resultados, y se encuentran principalmente en forma de glucósidos, moléculas unidas a un grupo de azúcar. En este trabajo, no se empleó la hidrólisis en el procedimiento de preparación de la muestra para cuantificar las agliconas, sino que se determinaron las agliconas naturales libres en cada tipo de polen. Las secreciones de la glándula hipofaríngea de la abeja melífera provocan una hidrólisis enzimática parcial de los glucósidos a agliconas libres durante la recolección del polen. La presencia de agliconas libres es un buen indicador de la calidad del polen, ya que el enlace glicósido reduce las propiedades antioxidantes (Cook & Samman, 1996). Nuestros resultados para crisina, kaempferol, ácido cafeico, ácido p-cumárico y quercetina son aproximados a los obtenidos por Habrika *et al.* (2021) en miel adicionada de polen.

La preservación de las cualidades nutricionales es crucial para este tipo de producto. Se utilizaron como modelo los componentes del polen de abeja más valorados por los consumidores por sus propiedades antioxidantes, como los polifenoles (Campos *et al.*, 2001; Kroyer & Hegedus, 2001; Almaraz-Abarca *et al.*, 2004). El polen de abeja se trató con ozono durante 30 minutos debido a la significativa reducción de la carga microbiana en comparación con el grupo de control de polen de abeja fresco no tratado. También se eligió este tratamiento con ozono porque no se encontraron diferencias entre la exposición al ozono durante 30 o 60 minutos. Los resultados obtenidos indican que el tratamiento con ozono no tuvo un impacto negativo sobre los polifenoles evaluados en el presente trabajo (Tabla 39), lo que hace a este tratamiento más interesante aún para usarlo como método de choque para reducir la carga microbiológica del polen de abejas.

Tabla 39. Polifenoles en el polen de abeja. Se cuantificó la presencia de polifenoles en muestras de polen de abeja: 10 muestras iniciales de polen de abeja fresco y congelado, 10 muestras de polen de abeja secado al aire caliente y 10 muestras de polen de abeja expuesto al ozono. Los resultados se presentan como número de muestras que contienen los polifenoles específicos (N) y la media (Media \pm D.E.) ($\mu\text{g/g}$ seco) para cada uno de los polifenoles estudiados. El ácido gálico, la genisteína y el resveratrol se encontraron por debajo del LOQ en todas las muestras analizadas.

Polifenoles	Cafeico		Crisina		Kaempferol		Luteolina		Naringerina		P-Cumárico		Quercetina		Rutina	
	N	media \pm D.E.	N	media \pm D.E.	N	media \pm D.E.	N	media \pm D.E.	N	media \pm D.E.	N	media \pm D.E.	N	media \pm D.E.	N	media \pm D.E.
Polen fresco	5	3,3 \pm 2,3	5	4,5 \pm 4,5	5	1,9 \pm 0,5	5	63,1 \pm 41,9	5	2,1 \pm 1,1	5	7,1 \pm 4,8	5	7,5 \pm 1,9	5	6,7 \pm 2,7
Polen desecado	5	3,7 \pm 1,8	5	4,4 \pm 3,7	5	1,6 \pm 0,8	5	70,6 \pm 47,7	5	2,7 \pm 0,9	5	7,1 \pm 4,4	5	7,7 \pm 1,4	5	6,3 \pm 2,9
Polen ozonizado	5	3,5 \pm 2,1	5	6,0 \pm 4,7	5	1,7 \pm 0,4	5	86,3 \pm 70,7	5	2,6 \pm 1,9	5	7,8 \pm 5,4	5	7,9 \pm 2,6	5	6,6 \pm 2,7

5.4.5. Evaluación Sensorial del Polen Apícola Procesado.

Para todos los parámetros evaluados, el polen de abeja expuesto al ozono durante 30 y 60 minutos no mostró diferencias sensoriales en comparación con el polen de abeja fresco no tratado, a diferencia de *Yook et al. (1997)* que establecen que concentraciones altas de ozono (18 ppm) y un largo tiempo de contacto (8 horas) provocan cambios notables en los pigmentos naturales en el polen de abeja. Sin embargo, los resultados obtenidos revelaron diferencias sensoriales entre el polen de abeja fresco y el polen de abeja secado con aire caliente (durante 15, 30 y 45 minutos), excepto el atributo del color, que no mostró ningún cambio apreciable, contrariamente a los resultados obtenidos por *Isik et al. (2018)* que encuentran pérdida de color amarillo y luminosidad en el polen desecado. También *Yook et al. (1997)* obtienen cambios significativos en el color del aloe vera y del polen apícola a gran concentración de ozono (18 ppm) durante tiempo prolongado (8 horas). Probablemente, en nuestro ensayo estos problemas fueron obviados por el reducido tiempo de exposición al ozono en comparación con los autores anteriores.

En la Tabla 40 se presenta el perfil sensorial de cada tratamiento. Los resultados parciales pueden consultarse en el Anexo H.

Tabla 40. Perfiles sensoriales del polen fresco y secado al aire caliente.

Tipo de polen de abeja	Perfil sensorial
Fresco (sin tratar)	Olor intenso (5) (vegetación/verde); los granos cambian de forma al presionar con los dedos y se combinan en una masa, se observa polvo de polen, muy húmedo en boca, dulce, amargo, ligeramente salado y ligeramente ácido. Aroma medio (3) (vegetación/verde/humedad, floral) y persistencia media (3).
Polen desecado durante 15 minutos	Olor intenso (5) (vegetal/verde); los granos cambian de forma al presionar con los dedos pero no se combinan en una masa, no se observa polvo de polen; húmedo en boca, dulce y ligeramente salado. Aroma medio (3) (vegetal/verde/tostado) y persistencia corta (2).
Polen desecado durante 30 minutos	Olor medio (3) (vegetal/verde); los granos cambian de forma al presionar con los dedos pero no se combinan en una masa, no se observa polvo de polen; húmedo en boca, dulce y ligeramente salado. Aroma suave (2) (vegetación/verde/tostado) y persistencia corta (2).
Polen desecado durante 45 minutos	Olor medio (3) (vegetal/verde); los granos cambian de forma al presionar con los dedos, no se observa polvo de polen; seco en boca, ligeramente salado. Aroma muy suave (1) (vegetación/verde/tostado) y persistencia corta (2).

Así, la intensidad del olor a vegetación/verde para el polen de abeja secado al aire caliente durante 15 minutos es similar a la del polen de abeja fresco y se mantienen la mayoría de los atributos de textura. Sin embargo, tras el tratamiento de secado por aire caliente aparece el aroma a tostado y se pierden otros descriptores de aroma (humedad y floral) caracterizantes del polen apícola fresco. Además, la persistencia es más corta después del tratamiento.

Entre las escasas referencias encontradas sobre análisis sensorial de polen, *Siuda et al. (2012)* observaron que las condiciones de almacenamiento del polen de abeja influyen en el color y el flavor de manera significativa, sin encontrar cambios en otros atributos estudiados como textura, identidad, intensidad del flavor y palatabilidad. *Campos et al. (2021)* apuntan que el polen recolectado se puede almacenar en el congelador por un período de algunas semanas. Después de un mes comienza a mostrar cambios de sabor, textura y color.

En otro tipo de producto, *Akbas & Ozdemir (2008)* en su estudio sobre ozonización de higos desecados, tampoco encontraron diferencias significativas en el sabor dulce, rancidez, flavor, apariencia y palatabilidad debidas al tratamiento, aconsejando el ozono como prometedor método de descontaminación microbiológica para este producto.

En resumen, con este último ensayo, hemos podido comprobar el escaso o nulo efecto negativo, sobre las cualidades organolépticas, que puede tener el tratamiento de choque que proponemos para reducir la carga microbiológica del polen fresco.

Capítulo 6. Conclusiones

CAPÍTULO 6. CONCLUSIONES

Primera. El polen fresco extraído directamente de la colmena posee una elevada carga microbiológica que conlleva un alto riesgo para el consumo humano. Los recuentos microbiológicos para bacterias aerobias mesófilas, enterobacterias, coliformes y mohos y levaduras están por encima de los criterios recomendados propuestos por *Campos et al. (2008)*.

Segunda. El diferente manejo sobre el material usado en el proceso productivo en el apiario no obtuvo diferencias significativas en la calidad microbiológica del polen obtenido, bien utilizando para ello distintos diseños de trampas cazapolen, o introduciendo cajones esterilizados previamente. Estas acciones no han reducido la carga microbiológica del polen fresco.

Tercera. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre la recogida del polen a las 24, 48 y 72 horas. La contaminación microbiológica aumentó a lo largo de las sesiones del ensayo, debiéndose a factores climatológicos y ambientales. El polen debe de ser recogido en un periodo comprendido entre las 24 y 48 horas de permanencia en el cajón.

Cuarta. El ozono ha demostrado ser un método descontaminante eficaz para reducir la carga de microorganismos en el polen fresco.

Quinta. El tratamiento combinado de ozono con desecación por aire caliente a 42°C obtuvo la máxima reducción microbiana. Se redujo de forma sustancial la carga microbiológica inicial de enterobacterias, aerobios mesófilos y mohos y levaduras.

Sexta. En el ensayo de vida útil del polen de abeja, tras el tratamiento combinado de desecación y ozonización, y mantenido en condiciones de refrigeración a 4°C, los resultados mostraron el mantenimiento durante tres semanas de los recuentos de enterobacterias y mesófilos aerobios.

Séptima. Utilizando el contenido de polifenoles presentes en el polen como indicador de posibles efectos adversos debidos a la oxidación producida por el ozono, se obtienen resultados que apuntan a que el tratamiento con ozono no tiene un impacto negativo sobre los polifenoles evaluados, lo que convierte al ozono en un tratamiento descontaminante prometedor para el polen de abeja.

Octava. El análisis sensorial realizado no muestra diferencias en el perfil descriptivo entre el polen tratado con ozono y el polen fresco. Por el contrario, tras el tratamiento de secado por aire caliente aparece el aroma tostado y se pierden otros descriptores de aroma (humedad y floral) caracterizantes del polen apícola fresco.

Finalmente, concluimos que el proceso mixto de desecación (15 minutos) y ozonización (30 minutos) es un tratamiento de choque adecuado para reducir la carga microbiológica del polen fresco, aumentando la seguridad alimentaria y permitiendo su posterior conservación con frío (4° C).

Chapter 7. Conclusions

CHAPTER 7. CONCLUSIONS

First. The fresh pollen extracted directly from the hive has a high microbiological load that carries a high risk for human consumption. Microbiological counts for mesophilic aerobic bacteria, enterobacteria, coliforms, and molds and yeasts are above the recommended criteria proposed by Campos *et al.* (2008).

Second. The different management of the material used in the production process in the apiary did not result in significant differences in the microbiological quality of the pollen obtained, either by using different designs of pollen traps or by introducing previously sterilised boxes. These actions have not reduced the microbiological load of the fresh pollen.

Third. Statistically significant differences were found between pollen collection at 24, 48 and 72 hours. Microbiological contamination increased throughout the trial sessions, due to climatological and environmental factors. The pollen must be collected in a period between 24 and 48 hours of permanence in the box.

Fourth. Ozone proved to be an effective decontamination method that reduced the load of micro-organisms in fresh pollen.

Fifth. The combined treatment of ozone with hot air drying at 42 °C obtained the maximum microbial reduction. The initial microbiological load of enterobacteria, mesophilic aerobes and moulds and yeasts was substantially reduced.

Sixth. In the shelf life test of bee pollen, after the combined desiccation and ozonation treatment, and maintained under refrigeration conditions at 4°C, the results showed a maintenance of counting levels produced by the treatment in the group of Enterobacteriaceae and mesophilic aerobes for three weeks.

Seventh. Using the content of polyphenols present in pollen as an indicator of possible adverse effects due to oxidation produced by ozone, results indicate that ozone treatment does not have a negative impact on the polyphenols evaluated, making ozone a promising decontaminant treatment for bee pollen.

Eighth. The sensory analysis carried out shows no difference in the descriptive profile between ozone-treated pollen and fresh pollen. On the contrary, after the hot air drying treatment, the toasted flavour appears and other flavour descriptors (moisture and floral) characterizing fresh bee pollen are lost.

Finally, we conclude that the mixed process of desiccation (15 minutes) and ozonization (30 minutes) is an adequate shock treatment to reduce the microbiological load of fresh pollen, increasing food safety and allowing its subsequent cold storage (4° C).

Capítulo 8. Índice de Tablas y Figuras

CAPÍTULO 8. ÍNDICE DE TABLAS Y DE FIGURAS

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales bacterias presentes en el polen.	19-20
Tabla 2. Países con reglamentación respecto al polen.	21
Tabla 3. Descripción taxonómica de la abeja.	32
Tabla 4. Composición del polen apícola y del pan de abeja.	58-59
Tabla 5. Valor sugerido en macronutrientes.	61
Tabla 6. Composición de aminoácidos (g/100g) del polen de abeja de diferentes orígenes botánicos en distintos países.	65
Tabla 7. Contenido promedio en ácidos grasos en polen en mg/100 mg de lípidos. Polen procedente de Colombia, Estados Unidos y China.	68
Tabla 8. Relación entre el color del gránulo de polen y el género de la planta.	76
Tabla 9. Criterios microbiológicos de preparados alimenticios para regímenes dietéticos y/o especiales.	79
Tabla 10. Límites de distintos tipos de microorganismos según el R.D. 2685/1976 (derogado).	80
Tabla 11. Criterios microbiológicos de <i>Pharmacopoea Europaea</i> III. 5.1.4.	80
Tabla 12. Valores microbiológicos sugeridos por Campos <i>et al.</i> (2008).	81

Tabla 13. Rango de países exportadores de polen apícola en 2020.	85
Tabla 14. Rango de países importadores de polen apícola en 2020.	86
Tabla 15. Evolución de precios del polen en la temporada 2020-2021.	89
Tabla 16. Composición del polen y necesidades nutricionales del ser humano.	92
Tabla 17. Modelo de nomenclatura para la conservación de las muestras.	112
Tabla 18. Gradiente de fase móvil.	122
Tabla 19. Caracterización de compuestos fenólicos por LC-MS/MS	122
Tabla 20. Recuperaciones (%), precisión (RSD%) y límite de cuantificación (LOQ).	123
Tabla 21. Resultados de la prueba de Shapiro-Wilk para el estudio de la distribución de los datos obtenidos de las variables incluidas en el ensayo.	135
Tabla 22. Correlación entre dos variables ambientales: temperatura media ambiental y humedad ambiental media acumulada durante el tiempo que pasó el polen en el cajón del cazapolen, antes de ser recolectado. Prueba de correlación Rho de Spearman, $p < 0,05$.	140
Tabla 23. Análisis descriptivo del crecimiento de los microorganismos y de la producción de polen en gramos, en el periodo de 24, 48 y 72 horas de permanencia en el cajón.	142
Tabla 24. Resultados de la comparación por parejas (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) entre el tamaño de las muestras de polen (peso), registrados durante el primer, segundo y tercer día de recolección	

de polen en las trampas cazapolen. 144

Tabla 25.Resultados de la comparación por parejas (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) entre los datos de la a_w de las muestras de polen, registrados durante el primer, segundo y tercer día de recolección de polen en las trampas cazapolen. 145

Tabla 26.Resultados de la comparación por parejas (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) entre los datos del número de UFC/g de enterobacterias de las muestras de polen, registrados durante las 24, 48 y 72 horas de permanencia en el cajón de las trampas cazapolen. 146

Tabla 27.Resultados de la comparación por parejas (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) entre los datos del número de UFC/g de microorganismos aerobios mesófilos de las muestras de polen, registrados durante las 24, 48 y 72 horas de permanencia en el cajón de las trampas cazapolen. 147

Tabla 28.Resultados de la comparación por parejas (Prueba de rangos con signo de Wilcoxon, $p \leq 0,05$) entre los datos del número de UFC/g de mohos y levaduras de las muestras de polen, registrados durante las 24, 48 y 72 horas de permanencia en el cajón de las trampas cazapolen. 148

Tabla 29.Estudio de la distribución de los datos obtenidos de las distintas variables estudiadas en las muestras de polen que se obtuvieron en el presente ensayo (Prueba de Shapiro-Wilk, $p \leq 0,05$). 150

Tabla 30.Correlación entre dos variables ambientales: temperatura media ambiental y humedad ambiental media acumulada durante el tiempo que pasó el polen en el cajón del cazapolen, antes de ser recolectado (Prueba de correlación Rho de Spearman, $p < 0,05$). 155

Tabla 31. Análisis descriptivo del crecimiento de microorganismos, a_w y producción de polen correspondiente al Tercer Ensayo.	161
Tabla 32. Prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, $p \leq 0,05$) para el estudio de la distribución de los datos obtenidos de las variables incluidas en el ensayo por las cuales se demuestra que los datos no se distribuyen en una distribución normal.	162
Tabla 33. Análisis descriptivo del crecimiento de microorganismos, a_w y producción de polen en relación con la trampa cazapolen.	164
Tabla 34. Prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov, $p \leq 0,05$) para el estudio de la distribución de los datos obtenidos de las variables incluidas en el ensayo.	165
Tabla 35. Prueba de Shapiro-Wilk para el estudio y distribución de los datos, $p < 0.05$	167
Tabla 36. Reducción de la carga microbiana del polen secado al con aire caliente ($42 \pm 1^\circ\text{C}$) a tres tiempos diferentes de exposición.	168
Tabla 37. Reducción de la carga microbiana obtenida a partir del polen de abeja expuesto al ozono (potencia: 200mg/h).	169
Tabla 38. Evaluación de la carga microbiana, en seis momentos diferentes, en el polen de abeja tratado combinando 30 minutos de exposición al ozono junto con 15 minutos de secado por aire caliente y mantenido en un frigorífico a 4°C	171
Tabla 39. Polifenoles en el polen de abeja.	173

Tabla 40. Perfiles sensoriales del polen fresco y secado al aire caliente.	174
--	-------	-----

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Abeja pecoreando flor de <i>Cistus albidus</i> .	15
Figura 2. Humano recolectando miel. Castellote. Teruel.	27
Figura 3. Figura humana recolectando miel. Cueva de la Araña.	28
Figuras 4 y 5. Abejas en relieve talladas en las columnas del Templo de Karnak. Tebas. Egipto.	29
Figura 6. Abeja masticando polen de jara blanca.	31
Figura 7. Clasificación jerárquica y distinción morfológica de la abeja según la casta.	34
Figura 8. Morfología general de la cabeza.	34
Figura 9. Imagen de la corbícula de la abeja.	35
Figura 10. Morfología del tercer par de patas.	35
Figura 11. Esquema del estambre y del polen.	36
Figura 12. Distintas representaciones de un grano de polen.	37
Figura 13. Abeja con polen adherido a su cuerpo.	38
Figura 14. Distintos planos del pellet de polen en las corbículas.	38
Figura 15. Abeja obrera transportando polen en sus patas.	39
Figura 16. Alimentación de larvas por abejas nodrizas.	39

Figura 17. Detalle de la rejilla de plástico y del orificio de paso de la abeja hacia la colmena con el pellet de polen en sus patas.	41
Figuras 18. Cajón de acumulación.	42
Figura 19. Imagen-resumen de las partes de una trampa cazapolen.	42
Figura 20. Trampa cazapolen frontal de entrada o piquera.	43
Figura 21. Trampa cazapolen de fondo.	44
Figura 22. Trampa cazapolen superior.	45
Figura 23. Disposición de trampas cazapolen frontales en colmenas del apiario experimental de Alcolea.	45
Figura 24. Disposición de un colmenar en la Sierra de Córdoba.	46
Figura 25. Abejas intentando pasar a través de la rejilla.	46
Figura 26. Recolección de polen en apiario.	47
Figura 27. Envases apilables de transporte del polen. Caja perforada alimentaria especial para polen.	47
Figura 28. Polen compactado por la humedad.	48
Figura 29. (a) Humidímetro. (b) Colocando polen en humidímetro. (c) Resultado de la medición.	50
Figura 30. Equipo de desecación de polen.	51
Figura 31. Pesada de polen.	51
Figura 32. Procesamiento del polen desecado. Primer cribado del polen.	52

Figura 33. Aventadora-limpiadora de polen	53
Figura 34. Limpieza de preenvasado. Cinta transportadora de limpieza manual por aspirado.	53
Figura 35. Bidones metálicos de 150 Kg de polen.	54
Figura 36. Envase de vidrio con polen desecado.	54
Figura 37. Envase de plástico para polen envasado al vacío.	55
Figura 38. Imagen de polen fresco congelado en envases herméticos de polietileno estéril.	56
Figura 39. Cadena del pan de abeja: desde la recolección del polen por las abejas hasta la formación del pan de abeja.	57
Figura 40. Pantone Color Formula Guide.	76
Figura 41. Variedad de colores de las cargas de polen de diferentes especies de plantas.	77
Figura 42. Gráfico de porcentaje de distribución del número de colmenas por CC.AA. en España.	83
Figura 43. Incremento por países del valor de las exportaciones a nivel mundial en en M\$ del 2015 al 2020.	84
Figura 44. Distribución de la producción de polen por Comunidades Autónomas (CC.AA.).	87
Figura 45. Evolución de precios del polen en Euros/kg (€/kg) en el periodo de Abril del 2017 a Marzo del 2018.	88
Figura 46. Evolución de precios del polen (Abril 2019-Marzo 2020) en €/kg.	88

Figura 47. Evolución precios en €/kg del polen (Abril 2020-Marzo 2021).	89
Figura 48. Evolución de precios del polen (Abril 2013-Marzo 2021).	90
Figura 49. Polen fresco en el que se han desarrollado mohos.	96
Figura 50. Acción del ozono sobre la pared bacteriana.	100
Figura 51. Aparato Novasina® IC-500 AW-LAB.	117
Figura 52. Equipo de desecación.	118
Figura 53. Equipo de ozonizado con muestra tratada con ozono.	118
Figura 54. (a) Representación del perfil de una trampa cazapolen frontal de piquera. (b). Representación del perfil de trampa cazapolen frontal de piquera modificada, donde se aprecia el suplemento posterior y el hueco del cajón trasero.	127
Figura 55. Evolución del peso en gramos del polen recogido semanalmente a lo largo del ensayo destinado a valorar el nivel de contaminación microbiológica del polen de abeja.	135
Figura 56. Evolución de la actividad de agua de las muestras de polen recogido a lo largo de las seis semanas del ensayo.	137
Figura 57. Evolución del nº de UFC/g de enterobacterias en las muestras de polen recogidas a lo largo de las seis semanas del ensayo.	138
Figura 58. Evolución del número de UFC/g de aerobios mesófilos en las muestras de polen recogidas a lo largo de las seis semanas del ensayo.	138

Figura 59. Evolución del número de UFC/g de mohos y levaduras en las muestras de polen recogidas a lo largo de las seis semanas del ensayo.	139
Figura 60. Evolución del peso del polen en gramos recogido según los periodos de 24, 48 y 72 horas de permanencia en el cajón, destinado a valorar el nivel de contaminación microbiológica del polen de abejas.	143
Figura 61. Evolución de la actividad de agua de las muestras de polen con un periodo de permanencia en el cajón de 24, 48 y 72 horas.	144
Figura 62. Evolución del nº de UFC/g de enterobacterias de las muestras de polen con un periodo de permanencia en el cajón de 24, 48 y 72 horas.	146
Figura 63. Evolución del nº de UFC/g de microorganismos aerobios mesófilos de las muestras de polen con un periodo de permanencia en el cajón de 24, 48 y 72 horas.	147
Figura 64. Evolución del nº de UFC/g de mohos y levaduras de las muestras de polen con un periodo de permanencia en el cajón de 24, 48 y 72 horas.	148
Figura 65. Evolución del peso en gramos de las muestras procedentes de cajones esterilizados y no esterilizados a lo largo de las distintas semanas.	151
Figura 66. Evolución de la a_w de las muestras de polen procedentes de cajones esterilizados y no esterilizados a lo largo de las distintas semanas.	151
Figura 67. Evolución del número de unidades formadoras de colonias (nº de UFC/g) de Enterobacterias en las muestras de polen procedentes de cajones con esterilización semanal y no esterilizados. Los datos se	

muestran como repeticiones semanales. 152

Figura 68. Evolución del número de unidades formadoras de colonias (nº de UFC/g) de microorganismos aerobios mesófilos en las muestras de polen procedentes de cajones con esterilización semanal y no esterilizados. 153

Figura 69. Evolución del número de unidades formadoras de colonias (nº de UFC/g) de mohos y levaduras en las muestras de polen procedentes de cajones con esterilización semanal y no esterilizados. 153

Figura 70. Abejas bebiendo de materia fecal encharcada. 158

Capítulo 9. Referencias bibliográficas

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- Abad, F.X., Pintó, R.M., Gajardo, R. & Bosch, A. (1997). Viruses in mussels: public health implications and depuration. *Journal of Food Protection*, 60(6), 677-681. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-60.6.677>.
- Achen, M.& Yousef, A.E. (2001). Efficacy of ozone against *Escherichia coli* O157:H7 on apples. *Journal of Food Science*, 66 (9), 1380–1384. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb15218.x>
- Adaškevičiūtė, V., Kaskoniene, V., Kaskonas, P., Barcauskaite, K. & Maruska, A. (2019). Comparison of physicochemical properties of bee pollen with other bee products. *Biomolecules*, 9(12), 819. <https://doi.org/10.3390/biom9120819>
- Adjlane, N., Hadjali, L.M., Benamara, M., Bounadi, O. & Haddad, N. (2017). Qualite microbiologique du pollen produit par les apiculteurs et commercialise en Algerie. *Revue de microbiologie industrielle, sanitaire, et environnemental*, 11(1), 31-39. https://www.researchgate.net/publication/315666110_QUALITE_MICROBIOLOGIQUE_DU_POLLEN_PRODUIIT_PAR_LES_APICULTEURS_ET_COMMERCIALISE_EN_ALGERIE
- Akbas, M.Y. & Ozdemir, M. (2006). Effectiveness of ozone for inactivation of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* in pistachios. *International Journal of Food Science and Technology*, 41, 513–519. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2005.01099.x>
- Akbas, M.Y. & Ozdemir, M. (2008). Application of gaseous ozone to control populations of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Bacillus cereus* spores in dried figs. *Food Microbiology*, 25, 386–391. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2007.09.007>.
- Almagro-Berenguer, J. (s.f.). *El polen apícola. Guía de Buenas Prácticas*. [Diapositiva Power Point]. Centro de Investigación Apícola y Agroambiental. Marchalano. <https://docplayer.es/108365541-El-polen-apicola-guia-de-buenas-practicas.html>
- Almeida-Muradian, L., Pamplona, L., Coimbra, S. & Barth, O. (2005). Chemical composition and botanical evaluation of dried bee pollen pellets.

Journal of Food Composition and Analysis, 18(1), 105–111. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.10.008>

Almaraz-Abarca, N., Campos, M.D.G., Ávila-Reyes, J.A., Naranjo-Jiménez, N., Herrera-Corral, J. & González-Valdez, L.S. (2004). Variability of antioxidant activity among honeybee-collected pollen of different botanical origin. *Interciencia*, 29(10), 574–578. http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442004001000006

Altunatmaz, S.S., Tarhan, D., Aksu, F., Barutçu, U.B. & Or, M.E. (2017). Mineral element and heavy metal (cadmium, lead and arsenic) levels of bee pollen in Turkey. *Food Science and Technology*, 37, 136–141. <https://doi.org/10.1590/1678-457x.36016>.

Álvarez, E. & Campos, J. (2017). Diversidad y Criterios Microbiológicos en Polen usado como Suplemento Alimenticio para Humanos [Archivo PDF]. *Digital@uaqro*, 10(2), 218-229. https://www.uaq.mx/investigacion/revista_ciencia@uaq/ArchivosPDF/v10-n2/art16_numpagina.pdf

Anjos, O., Fernandes, R., Cardoso, S.M., Delgado, T., Farinha, N., Paula, V., Estevinho, L.M. & Carpes, S.T. (2019a). Bee pollen as a natural antioxidant source to prevent lipidoxidation in black pudding. *LWT- Food Science and Technology*, 111, 869-875. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.105>

Anjos, O., Paula, V., Delgado, T. & Estevinho, L. (2019b). Influence of the storage conditions on the quality of bee pollen. *Zemdirbyste-Agriculture*, 106(1), 87–94. <https://doi.org/10.13080/z-a.2019.106.012>

Aristóteles (384 a.C- 322 a.C). Investigación sobre los animales [Archivo PDF]. <http://www.scielo.org.co/pdf/difil/v10n15/v10n15a04.pdf>.

Atkin, S., Barrier, S., Cui, Z., Fletcher, P., Mackenzie, G., Panel, V., Sol, V. & Zhang, X. (2011). UV and visible light screening by individual sporopollenin exines derived from *Lycopodium clavatum* (club moss) and *Ambrosia trifida* (giant ragweed). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 102, 209–217. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2010.12.005>.

- Allevato, M. (2005). Picaduras de abejas. *Actualizaciones terapéuticas dermatológicas*, 40, 40-43. http://www.atdermae.com/pdfs/atd_28_01_04.pdf
- Aylanc, V., Falcao, S., Ertosum, S. & Vilas-Boas, M. (2021). From the hive to the table: Nutrition value, digestibility and bioavailability of the dietary phytochemicals present in the bee pollen and bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 109,464–481. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.042>
- Bacha, A.B., Norah, A.O., Al-Osaimi, M., Harrath, A.H., Mansour, L. & El-Ansary, A. (2020). The therapeutic and protective effects of bee pollen against prenatal methylmercury induced neurotoxicity in rat pups. *MetabolicBrainDisease*, 35(1), 215–224. <https://link.springer.com/article/10.1007/s11011-019-00496-z>
- Bakour, M., Al-Waili, N.S., El Menyiy, N., Imtara, H., Figuira, A.C., Al-Waili, T., et al.(2017). Antioxidant activity and protective effect of bee bread (honey and pollen) in aluminum-induced anemia, elevation of inflammatory makers and hepato-renal toxicity. *Journal of Food Science & Technology*, 54(13),4205–4212. <https://link.springer.com/article/10.1007/s13197-017-2889-9>
- Baldi-Coronel, B., Grasso, D., Chaves-Pereira, S. & Fernández, G. (2004). Caracterización bromatológica del polen apícola argentino [Archivo PDF]. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 15,145–181. <https://www.redalyc.org/pdf/145/14502906.pdf>
- Ballesteros, H.H. & Vásquez, R.E.(2007). Determinación de la producción de jalea real en colmenas de cría de diferentes dimensiones. *Revista Corpoica-Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 8(1), 75-81. <http://revistacta.agrosavia.co/index.php/revista/article/view/87/86>
- Barajas-Ortiz, J.P., Martínez, T. & Rodríguez-Sandoval, E. (2001). Evaluación del efecto de la temperatura en el secado de polen apícola procedente de dos zonas de Cundinamarca. *Dyna*, 165, 48-57. ISSN 0012-7353
- Barene, I., Daberte, I. & Siksna, S. (2015). Investigation of bee bread and development of its dosage forms. *Medicinosteorija ir praktika – T*, 21, 16–22. <https://doi.org/10.15591/mtp.2015.003>

- Barreto, L.M.R.C., Funari, S.R.C. & de Oliveira Orsi, R. (2005). Composição e qualidade do pólen apícola proveniente de sete estados brasileiros e do Distrito Federal. *Boletim de Indústria animal*, 62(2),167–175. <http://iz.agricultura.sp.gov.br/bia/index.php/bia/article/view/1309/1304>
- Barth, M.M., Zhou, C., Mercier, J. & Payne, F.A. (1995). Ozone storage effects on anthocyanin content and fungal growth in blackberries. *Journal Food Science*,60(6), 1286–1288. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1995.tb04575.x>
- Basarkar, U. G. (2017). Light microscopic studies of pollen grains by acetolysis method. *International Journal of Researches in Biosciences, Agriculture and Technology*,5, 1–10. https://ijrbat.in/upload_papers/031020170256131%20Bhaskar.pdf
- Baylis, C., Uyttendaele, M., Joosten, H. & Davies, A. (2011). The *Enterobacteriaceae* and their significance to the food industry. *International Life Sciences Institute (ILSI) Europe Report Series*. Brussels, Belgium. <http://www.ilsilife.org/Europe/Documents/EP%20Enterobacteriaceae.pdf>.
- Bedascarrasbure, M.B., Moja, J. & Rodríguez, G. (2020). *Módulo 2. Nutrición y Alimentación artificial de abejas. Buenas prácticas apícolas para la alimentación artificial*. [Archivo PDF]. www.produccionnotradicional.jimdofree.com
- Belhadj, H., Bouamra, D., Dahamna, S., Harzallah, D., Ghadbane M. & Khennouf, S. (2012). Microbiological sanitary aspects of pollen. *Advances in Environmental Biology*. 6(4), 1415–1420. https://www.researchgate.net/profile/Ghadbane-Mouloud/publication/286758280_Microbiological_sanitary_aspects_of_pollen/links/56dd2fd608aebabdb415abc7/Microbiological-sanitary-aspects-of-pollen.pdf
- Belhadj, H., Harzallah, D., Dahamna, S. & Khennouf, S. (2014). Microbiological quality control of marketed pollen. *Der PharmaciaLettre*,6(2),37–42. https://www.researchgate.net/profile/Daoud-Harzallah/publication/286768200_Microbiological_quality_control_of_marketed_pollen/links/5e886f85299bf1307978e25e/Microbiological-quality-control-of-marketed-pollen.pdf

- Beltrán D., Selma, M.V., Tudela, J.A.& Gil, M.I. (2005). Effect of different sanitizers on microbial and sensory quality of fresh-cut potato strips stored under modified atmosphere or vacuum packaging. *Postharvest Biology and Technology*, 37, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2005.02.010>
- Benavides-Guevara, R.M., Quicazan, M.C. & Ramírez-Toro, C. (2017). Digestibility and availability of nutrients in bee pollen applying different pretreatments. *Ingeniería y Competitividad*, 19(1), 119–128. http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0123-30332017000100119&script=sci_arttext&lng=en
- Besora, J. (s.f.). *Secador solar y trampa de polen. Informe técnico par la construcción de una trampa cazapolen y un secador solar de polen.* [Archivo PDF]. <https://esf-cat.org/wp-content/uploads/2017/04/Informe-t%C3%A9cnico-trampa-y-secador-de-polen.pdf>
- Bialka, K.L. & Demirci, A. (2007). Decontamination of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* on blueberries using ozone and pulsed UV-light. *Journal of Food Science*, 72, 391–396. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00517.x>
- Blackmore, S., Wortley, A., Skvarla, J. & Rowley, J. (2007). Pollen wall development in flowering plants. *New Phytologist*. 174(3), 483–498. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02060.x>
- Block, G., Sinh, R. & Gridley, G. (1994). Collection of dietary-supplement data and implication for analysis. *The American Journal of Clinical Nutrition* Vol. 59(1), 234–239. <https://doi.org/10.1093/ajcn/59.1.232S>
- Bogdanov, S. (2006). Contaminants of bee products. *Apidologie* 37(1), 1-18. <https://doi.org/10.1051/apido:2005043>
- Bogdanov, S. (2011). Pollen: Nutrition, functional properties, health: A review. *Bee Product Science*, 1-34.
- Bogdanov S, (2014). Pollen: Production, Nutrition: A Review. *Bee Product Science*. Available: <http://www.bee-hexagon.net/>
- Bogdanov, S. (2015). Pollen: Production, Nutrition and Health: A Review. *Bee Product Science*. <http://www.bee-hexagon.net>

- Bogdanov, S. (2016). Pollen: Collection, Harvest, Compostion, Quality. *Bee Product Science*. Available: <http://www.bee-hexagon.net/>
- Bobis, O., Marghitas, L. A., Dezmirean, D., Morar, O., Bonta, V. & Chirila, F. (2010). Quality parameters and nutritional value of different commercial bee products. Bulletin of University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine Cluj–Napoca. *Animal Science and Biotechnologies*, 67(1–2), 5254. <http://dx.doi.org/10.15835/buasvmcn-asb:67:1-2:5254>
- Bonoan, R.E., Tai, T.M., Rodriguez, M.T., Feller, L., Daddario, S.R., Czaja, R.A., et al. (2017). Seasonality of salt foraging in honey bees (*Apis mellifera*). *Ecological Entomology*, 42, 195–201. <https://doi.org/10.1111/een.12375>
- Brasil (1997). Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Portaria nº 368, de 4 de setembro de 1997. Regulamento Técnico sobre as Condições Higiénico-Sanitárias e de Boas Práticas de Elaboração para Estabelecimentos Elaboradores/Industrializadores de Alimentos. Diário Oficial da União da Republica Federativa do Brasil, Brasília
- Brasil (2001). Instrução Normativa n. 3 de 2001. Regulamentos Técnicos de Identidade e Qualidade, de Apitoxina, de Cera de Abelha, de Geléia Real, de Geléia Real Liofilizada, de Pólen Apícola, de Própolis, de Extrato de Própolis. Ministerio da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.
- Brindza, J., Gróf, J., Bacigálová, K., Ferianc, P. & Tóth, D. (2010). Pollen microbial colonization and food safety. *Acta Chimica Slovaca*, 3, 95–102. http://www.acs.chtf.stuba.sk/papers/acs_0061.pdf
- Brodowska, A.J., Śmigielski, K., Nowak, A., Brodowska, K., Catthoor, R. & Czyżowska, A. (2014). The impact of ozone treatment on changes in biologically active substances of cardamom seeds. *Journal Food Science*, 79 (9), 1649-1655. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12591>
- Brodowska, A.J., Nowak, A. & Śmigielski, K. (2018): Ozone in the Food Industry: Principles of Ozone Treatment, Mechanisms of Action, and Applications. An Overview, Critical Reviews in *Food Science and*

- Nutrition*,58(13), 2176-2201<http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2017.1308313>.
- Bueno, M. (s.f.). *El polen, ese gran desconocido*. Biosalud- instituto de medicina biológica y antienvjecimiento. [Documento de Word]. Docplayer. <https://docplayer.es/11863714-El-polen-ese-desconocido.html>
- Burgos, A.R. (2012). *Comparación de la producción de polen con tres fuentes alternativas de proteína en la dieta de Apis mellifera* [Tesis de Médico Veterinario Zootecnista. Quito, Ecuador. Universidad Central del Ecuador]. <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/336/1/T-UCE-0014-3.pdf>
- Cairns, S.,Wratten, S.D., Filipiak, M., Veronesi, E.R., Saville, D.J. & Shields M.W. (2021). Ratios rather than concentrations of nutritionally important elements may shape honey bee preferences for “dirty water”. *EcologicalEntomology*,46, 1236–1240. <https://doi.org/10.1111/een.13067>
- Caldo, T., Venancio, A.&Abrunhosa, L. (2014). Irradiation for mold and mycotoxin control: AReview. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*,13, 1049-1061. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12095>
- Canale, A., Benelli, G., Castagna, A., Sgherri, C., Poli, P., Serra, A.&Nicolella, C. (2016). Microwave-assisted drying for the conservation of honeybee pollen. *Materials*, 9, 363. <https://doi.org/10.3390/ma9050363>.
- Campos, M., Webby, R., Markham, K., Mitchall, K. &Da Cunha, A. (2003). Age-induced diminution of free radical scavenging capacity in bee pollens and the contribution of constituent flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,51, 742–745.<https://doi.org/10.1021/jf0206466>
- Campos, M., Bogdanov, S., Almeida-Muradian, L., Szczesna,T., Mancebo, Y.,Frigerio, C. & Ferreira, F. (2008). Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research*,47(2), 156–163.<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.47.2.12>
- Campos, M., Frigerio, C., Lopes, J. & Bogdanov, S. (2010). What is the future of Bee–Pollen?.*Journal of ApiProduct and ApiMedical Science*, 2(4), 131–<https://doi.org/10.3896/IBRA.4.02.4.01>

- Campos, M., Anjos, O. (21-23 October 2015). *Nutritional and functional properties of bee pollen*. 11th Coloss Conference (21-23 October 2015). [Diapositiva de power point]. Apiteraphy Symposium
- Campos, M., Barreto, L., Anjós, O. (7-9 September 2016). *Bee pollen Standard Methods .State of the art*. [Archivo PDF]. The 7th European Conference of Apidology. Cluj-Napoca, Romania. https://www.apiservices.biz/documents/articles-en/7th_european_conference_apidology.pdf
- Campos M., Anjos, O., Chica, M., Campoy, P., Nozkova, J., Almaraz-Abarca, N., Barreto, L.M.R.C., Nordi, J.C., Estevinho, L.M., Pascoal, A., Branco, V., Chopina, A., Dias, L.G., Tešić, Ž. L. J., Mosić, M.D., Kostić, A.Ž., Pešić, M.B., Milojković-Opsenica, D.M., Sickel, W., Ankenbrand, M.J., Grimmer, G., Dewenter, I.S., Keller, A., Förster, F., Tananaki, C.H., Liolios, V., Kanelis, D., Rodopoulou, M.A., Thrasylvoulou, A., Paulo, L., Kast, C., Lucchetti, M.A., Glauser, G., Lokutova, O., Almeida-Muradian, L.B., Szcześna, T. & Carreck, N.L. (2021). Standard methods for pollen research. *Journal of Apicultural Research*, 60(4), 1-109. <https://doi.org/10.1080/00218839.2021.1948240>
- Carpes, S.T. (2008). Estudo das Características Físico-Químicas e Biológicas do Polén Apícola de *Apis mellifera* da região Sul do Brasil [Study of chemical and biological characteristics of *Apis mellifera* of the Southern Region of Brazil]. Dissertation. Tese apresentada Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Rio de Janeiro: Sector de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná.
- Carpes, S.T., Mourão, G.B., De Alencar, S.M. & Masson, M.L. (2009). Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Brazilian Journal of Food Technology*, 12, 220–229. <https://doi.org/10.4260/BJFT2009800900016>.
- Cepero, A. (2016). *Monitorización de los principales patógenos de las abejas para la detección de alertas y riesgos sanitarios*. [Tesis de doctorado. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Sanidad Animal. Madrid, España]. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/38839/1/T37640.pdf>
- Chantarudee, A., Phuwapraisirisan, P., Kimura, K., Okuyama, M., Mori, H., Kimura, A. & Chanchao, C. (2012). 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*,12,1–12. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-45>.
- Chahbar, N. & Mahamed, A.L. (2014). Contribution to identification of the microflora of the digestive tract and pollen of Algerian honeybees: *Apis mellifera intermissa* and *Apis mellifera sahariensis*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*,3(6), 601-607. https://www.researchgate.net/profile/Chahbar-Nora-2/publication/283044127_Contribution_to_identification_of_the_microflora_of_the_digestive_tract_and_pollen_of_Algerian_honeybees_Apis_mellifera_intermissa_and_Apis_mellifera_sahariensis/links/5627281008aed3d3f138aa9f/Contribution-to-identification-of-the-microflora-of-the-digestive-tract-and-pollen-of-Algerian-honeybees-Apis-mellifera-intermissa-and-Apis-mellifera-sahariensis.pdf
- Ching, T. & Ching, K. (1962). Fatty Acids in Pollen of Some Coniferous Species. *Science*,138(3543),890–891. <https://doi.org/10.1126/science.138.3543.890>.
- Choi, J.H., Jang, Y.S., Oh, J.W., Kim, C.H. & Hyun, I.G. (2015). Bee Pollen-Induced Anaphylaxis: A Case Report and Literature Review. *Allergy, Asthma and Immunology Research*,7,513–517. <https://doi.org/10.4168/aair.2015.7.5.513>
- Clarke, D., Morley, E. & Robert, D. (2017). The bee, the flower, and the electric field: Electriecology and aerial electroreception. *Journal of Comparative Physiology A*, 203,737–748. <https://doi.org/10.1007/s00359-017-1176-6>.
- Cobo, A. (1980). *El polen: Recogida, manejo y aplicaciones*. Hojas divulgadoras del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid. [Archivo PDF]. https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1980_08.pdf
- Cook, N.C. & Samman, S. (1996). Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *The Journal of Nutritional Biochemistry*,7(2), 66–76. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(95\)00168-9](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(95)00168-9)

- Collin, S., Vanhavre, T., Bodart, E.&Bouseta, A. (1995). Heat treatment of pollens: impact on their volatile flavor constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*,43:444–448.https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jf00050a035?casa_token=GQywhB8oAV0AAAAA:DIImOfU6Fa9sgdTtPTCbwwl2aFQ6mP8vN24XSJXc-yqXxnP3KqCp5YFoN_Vslnbh1_GiF7alykC-IAOe
- Conte, G., Benelli, G., Serra, A., Signorini, F., Bientinesi, M., Nicoella, C., ...&Canale, A. (2017). Lipid characterization of chestnut and willow honeybee-collected pollen: Impact of freeze-drying and microwave-assisted drying. *Journal of Food Composition and Analysis*, 55, 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2016.11.001>.
- Conte, P., Del Caro, A., Balestra, F., Piga, A.&Fadda, C. (2018). Bee pollen as a functional ingredient in gluten-free bread: A physical-chemical, technological and sensory approach. *LWT- Food Science and Technology*,90, 1–7.<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.002>
- Corona, M. (14 de Agosto de 2014). Corona Apicultores. Obtenido de corona-apicultura [Blogspot].<http://coronaapicultores.blogspot.com/>
- Costell, E.& Duran, L. (1982). El análisis sensorial en el control de calidad de los alimentos. *Revista de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*.21(1), 1-21. ISSN 0034-7698
- Da Silva, G.R., da Natividade, T.B., da Silva,Camara, C.A., Sarmento da Silva, E.M., Ribeiro dos Santos, F.D.A. &Sarmento-Silva, T.M S. (2014). Identification of sugar, amino acids and minerals from he pollen of Jandaíra stingless bees (*Melipona subnitida*). *Food and Nutrition Sciences*,5,10–15.<https://doi.org/10.4236/fns.2014.511112>.
- De Arruda, V.A.S., Pereira, A.A.S., de Freitas, A.S., Barth, O.M. & de Almeida-Muradian, L.B.(2013). Dried bee pollen: B complex vitamins, physicochemical and botánica composition. *Journal of Food Composition and Analysis*,29,100–105.<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2012.11.004>.
- De Arruda, V.A.S., Dos Santos, A.V., Sampaio, D.F., Araújo, E.S., Peixoto, A.L.C., Estevinho, M.L.F.& Almeida-Muradian, L.B.(2017). Microbiological quality and physicochemical characterization of Brazilian bee pollen. *Journal of Apicultural Research*, 56(3), 231–238.<http://dx.doi.org/10.1080/00218839.2017.1307715>

- De Florio Almeida, J., dos Reis, A.S., Heldt, L.F.S., Pereira, D., Bianchin, M., de Moura, C., ...&Carpes, S.T. (2017). Lyophilized bee pollen extract: A natural antioxidant source to prevent lipid oxidation in refrigerated sausages. *LWT-Food Science and Technology*, 76, 299–305. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.017>.
- De Melo Pereira, I.& Almeida-Muradian, L. (2010). Stability of antioxidant vitamins in bee pollen samples. *Química Nova*, 33, 3, 514-518. <https://www.scielo.br/j/qn/a/xyrzZ7ygz6ByKPKSzLsdSWd/?format=pdf&lang=en>
- De Melo, A.A.M., Estevinho, M.L.M.F. & Almeida-Muradian, L.B. (2015). A diagnosis of the microbiological quality of dehydrated bee pollen produced in Brazil. *Letters in Applied Microbiology*, 61(5), 477–483. <https://doi.org/10.1111/lam.12480>
- De Melo, A.A.M., Estevinho, M.L.M.F., Sattler, J.A.G., Souza, B.R., da Silva Freitas, A., Barth, O.M. & Almeida-Muradian, L.B. (2016). Effect of processing conditions on characteristics of dehydrated bee-pollen and correlation between quality parameters. *LWT-Food Science and Technology*, 65, 808–815. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.09.014>.
- De Melo, A.A.M., Estevinho, L.M., Moreira, M.M., Delerue-Matos, C., de Freitas, A.D.S., Barth, O.M. & Almeida-Muradian, L.B. (2018a). A multivariate approach based on physicochemical parameters and biological potential for the botanical and geographical discrimination of Brazilian bee pollen. *Food Bioscience*, 25, 91–110. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.08.001>.
- De Melo, A.A.M., Estevinho, L.M., Moreira, M.M., Delerue-Matos, C., Freitas, A.D.S.D., Barth, O.M. & Almeida-Muradian, L.B.D. (2018b). Phenolic profile by HPLC-MS, biological potential, and nutritional value of a promising food: Mono-floral bee pollen. *Journal of Food Biochemistry*, 42(5), E12536. <https://doi.org/10.1111/jfbc.12536>.
- De Oliveira, K.C., Moriya, M., Azedo, R.A., Almeida-Muradian, L.B.D., Teixeira, E.W., Alves, M.L., *et al.* (2009). Relationship between botanical origin and antioxidants vitamins of bee-collected pollen. *Química Nova*, 32, (5), 1099–1102. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500003>
- De Oliveira, R.C., do Nascimento Queiroz, S.C., da Luz, C.F.P., Porto, R.S. & Rath, S. (2016). Bee pollen as a bioindicator of environmental pesticide

- contamination. *Chemosphere*,163, 525-534.<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.022>.
- Del Risco, C., Pérez, A., Álvarez, V., Rodríguez, G., Leiva, V., Puig, Y. &García,R. (2012). Bacterias ácido-lácticas para ensilar polen apícola.[Archivo PDF].*RevistaCENIC Ciencias Biológicas*, 43, (1),17–21.<https://www.redalyc.org/pdf/1812/181223772003.pdf>
- Delaplane, K. S., Dag, A., Danka, R.G., Freitas, B.M., Garibaldi, L.A., Goodwin R.M.,*et al.*(2013). Standard methods for pollination research with *Apis mellifera*. *Journal of Apiculture Reseach*,52(4),1–28.<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.4.12>
- Delmarva’s news leader. June 21st 2021. Bee Pollen Sales Market 2021 Covid 19 Impact on Top countries data Industry Growth Analysis, Segmentation, Size, Share, Trend, Future Demand and Leading Players Updates by Forecast. <https://www.wboc.com/story/44140311/Bee-Pollen-Sales-Market-2021-Covid-19-Impact-on-Top-countries-data-Industry-Growth-Analysis-Segmentation-Size-Share-Trend-Future-Demand-and-Leading-Players-Updates-by-Forecast>
- Detry, R., Simon-Delso, N., Bruneau, E. & Daniel, H.M. (2020). Specialisation of yeast genera in different phases of bee bread maturation. *Microorganisms*,8,(11),1789.<https://doi.org/10.3390/microorganismos8111789>
- Deveza, M.V., Keller, K.M., Lorenzon, M.C.A., Nunes, L.M.T., Sales, É.O. & Barth, O.M. (2015). Mycotoxicological and palynological profiles of commercial brands of dried bee pollen. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4),1171–1176.<https://doi.org/10.1590/S1517-838246420140316>
- Diario de Teruel. (7 de Julio del 2021). Descubren en Castellote una pintura rupestre de una recolección de miel de hace 7.500 años. <https://www.diariodeteruel.es/bajoaragon/descubren-en-castellote-una-pintura-de-una-recoleccion-de-miel-de-hace-7500-anos>
- Diaz-Moreno, A. C., Zuluaga-Dominguez, C. M., Fuenmayor, C. A. & Martinez, T. (2009). Special features of pollen production in Colombia. Paper presented at the Apimondia, Montpellier (France).

- Di Cagno, R., Filannino, P., Cantatore, V. & Gobbetti, M. (2019). Novel solid-state fermentation of bee-collected pollen emulating the natural fermentation process of bee bread. *Food Microbiology*, 82, 218–230. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.02.007>
- Dinkov, D. & Stratev, D. (2016). The content of two toxic heavy metals in Bulgarian bee pollen [Archivo PDF]. *International Food Research Journal*, 23, 1343–1345. [http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20\(03\)%202016/\(61\).pdf](http://www.ifrj.upm.edu.my/23%20(03)%202016/(61).pdf)
- Di Pasquale, G., Salignon, M., Le Conte, Y., Belzunces, L. P., Decourtye, A., Kretzschmar, A.,... & Alaux, C. (2013). Influence of pollen nutrition on honey bee health: pollen quality and diversity matter?. *Plos One*, 8(8), 72016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072016>.
- Domínguez-Valhondo, D., Bohoyo, D., Hernández, M.T. & Guindaleza, D. (2011). Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutrition properties of honeybee-collected pollen. *International Journal of Food Science and Technology*, 46, 2204–2211. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02738.x>.
- Dong, J., Yang, Y., Wang, X. & Zhang, H. (2015). Fatty acid profiles of 20 species of monofloral bee pollen from China. *Journal of Apicultural Research*, 54, 503–511. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1173427>
- Dong, X., Zhou, Z., Wang, L., Saremi, B., Helmbrecht, A., Wang, Z., & Loo, J.J. (2018). Increasing the availability of threonine, isoleucine, valine, and leucine relative to lysine while maintaining an ideal ratio of lysine: methionine alters mammary cellular metabolites, mammalian target of rapamycin signaling, and gene transcription. *Journal of Dairy Science*, 101(6), 5502-5514. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13707>.
- Durán, A., Zuluaga, C., & Quicazán, M. (2014). Rectificación de las prácticas de cosecha y deshidratación en el beneficio del polen apícola en Colombia. Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia. ISSN: 2390–0148.
- Duttmann, C., Castillo, G., Demedio, J. & Verde, M. (2013). La apicultura y factores que influyen en producción, calidad, inocuidad y comercio de la miel. León, Nicaragua: UNAN-León.

<http://www.inta.gob.ni/biblioteca/images/pdf/guias/guia%20de%20apicultura.pdf>

Działo, M., Mierziak, J., Korzun, U., Preisner, M., Szopa, J. & Kulma, A. (2016). The potential of plant phenolics in prevention and therapy of skin disorders. *International Journal of Molecular Sciences*, 17, 160. <https://doi.org/10.3390/ijms17020160>.

Ecocolmena. Polen: Producción y criterios de calidad(30 de Julio del 2021). <https://www.ecocolmena.org/polen-produccion-y-criterios-de-calidad/>

Eleazu, C., Suleiman, J.B., Othman, Z.A., Zakaria, Z., Nna, V.U., Hussain, N.H.N., *et al.*(2020). Bee bread attenuates high fat diet induced renal pathology in obese rats via modulation of oxidative stress, downregulation of NF- κ B mediated inflammation and Bax signalling. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 22, 1–17. <https://doi.org/10.1080/13813455.2020.1752258>.

Erdman J.W.J. (1997). Nutrient impact (of ozone contact with foods). In: EPRI expert panel report: Evaluation of the history and safety of ozone in processing food for human consumption. Vol. 1: Executive summary. Palo Alto, CA, USA: Electric Power Research Institute, Final report, TR-108026-VI-4827, Chapter 5.

Estevinho, M.L., Afonso, S.E. & Feás, X. (2011). Antifungal effect of lavender honey against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Cryptococcus neoformans*. *Journal of Food Science and Technology*, 48(5), 640–643. <https://doi.org/10.1007/s13197-011-0243-1>

Estevinho, L.M., Rodrigues, S., Pereira, A.P. & Feás, X. (2012). Portuguese bee pollen: palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(2), 429–435. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02859.x>

Etimologías de Chile. Etimología de apicultura. (Consultado el 14 de Julio del 2021).

<http://etimologias.dechile.net/?apicultura#:~:text=La%20palabra%20%22apicultura%22%20es%20un,%2C%20cultismo%2C%20terr%C3%A9cola%20y%20agr%C3%ADcola.>

- European Food Safety Authority. (2014). Towards an integrated environmental risk assessment of multiple stressors on bees: review of research projects in Europe, knowledge gaps and recommendations. *EFSA Journal*, 12 (3), 3594. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3594>
- Evans, J.D. & Armstrong, T.N. (2006). Antagonistic interactions between honey bee bacterial symbionts and implications for disease. *BMC Ecology* 6, 4. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-6-4>
- Farag, S.A. & El-Rayes, T.K. (2016). Effect of bee-pollen supplementation on performance, carcass traits and blood parameters of broiler chickens. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 11, 168–177. <https://doi.org/10.3923/ajava.2016.168.177>
- FDA, (2001). Hazard analysis and critical point (HACCP): procedures for the safe and sanitary processing and importing of juice, final rule. Federal register. 66: 6137–6202. <https://www.federalregister.gov/documents/2001/01/19/01-1291/hazard-analysis-and-critical-control-point-hacp-procedures-for-the-safe-and-sanitary-processing-and>
- Feás, X., Vazquez-Tato, M.P., Estevinho, L., Seijas, J.A. & Iglesias, A. (2012). Organic bee pollen: Botanical origin, nutritional value, bioactive compounds, antioxidant activity and microbiological quality. *Molecules*, 17(7), 8359–8377. <https://doi.org/10.3390/molecules17078359>.
- Fernández-Escartín E. (2008). Microbiología e Inocuidad de los alimentos. *México: Universidad Autónoma de Querétaro. Segunda edición, septiembre 2008.*
- Filipiak, M., Kuszewska, K., Asselman, M., Denisow, B., Stawiarz, E. & Woyciechowski, M. (2017). Ecological stoichiometry of the honeybee: pollen diversity and adequate species composition are needed to mitigate limitations imposed on the growth and development of bees by pollen quality. *Plos One*, 12, 1-31. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183236>
- Fonseca J.M. & Rushing J.W. (2006). Effect of ultraviolet-C light on quality and microbial population of fresh-cut watermelon. *Postharvest Biology and Technology*, 40(3), 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.02.003>

- Foote, H.L. (1957). Possible use of microorganisms in synthetic bee bread production. *American Bee Journal*, 97, 476–478.
- Formicki, G., Greń, A., Stawarz, R., Zyśk, B. & Gał, A. (2013). Metal content in honey, propolis, wax, and bee pollen and implications for metal pollution monitoring. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22, 99–106. <http://www.pjoes.com/Metal-Content-in-Honey-Propolis-Wax-r-nand-Bee-Pollen-and-Implications-for-Metal,88957,0,2.html>
- Friedman, J. & Barrett, S.C. (2009). Wind of change: new insights on the ecology and evolution of pollination and mating in wind-pollinated plants. *Annals of botany*, 103, 1515–1527. <https://doi.org/10.1093/aob/mcp035>.
- Fuenmayor, C. A. (2009). *Aplicación de bioprocesos en polen de abejas para el desarrollo de un suplemento nutricional proteico*. Universidad Nacional de Colombia [Tesis para optar al título de M. Sc. en Ingeniería Química. Área de Bioprocesos]. Universidad Nacional de Colombia. Sede Bogotá. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Química y Ambiental. Maestría en Ingeniería Química. Bogotá, D.C.
- Fuenmayor, C.A., Zuluaga, D., Díaz, M., Quicazán de C., Cosio, M. & Mannino, S. (2014). Evaluation of the physicochemical and functional properties of Colombian bee pollen. *Revista MVZ Córdoba*, 19(1), 4003–4014. <https://doi.org/10.21897/rmvz.120>
- Galán-Soldevilla, H., Ruiz, M.P., Serrano, S. & Jodral, M. (2005). Development of a Preliminary Sensory Lexicon of Floral Honey by Multivariate Statistical Procedures. *Food Quality and Preference*, 16(19), 71–77. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2004.02.001>
- García A., Mount J.R. & Davidson P.M. (2003). Ozone and chlorine treatment of minimally processed lettuce. *Journal of Food Science*, 68(9): 2747–2751. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb05799.x>
- García-García, D., Rojas-Mogoyón, M. & Sanchete-Nieves, J. (2006). Contenido microbiológico cultivable del tracto intestinal y polen almacenado de *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae). *Acta Biológica Colombiana*, 11, 123–129. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/27150/27423>

- García, P. (2016). *Control Microbiológico y sensorial de alimentos*. Editorial Síntesis.
- Gardana, C., Del Bo, C., Quicazán, M.C., Correa, A.R. & Simonetti, P. (2018). Nutrients, phytochemicals and botanical origin of commercial bee pollen from different geographical areas. *Journal of Food Composition and Analysis*, 73, 29-38. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2018.07.009>.
- Génesis, 1:29, Antiguo Testamento. <https://biblia.com/bible/rvr60/g%C3%A9nesis/1/29>. Consultado el 23.10.2016
- Gey, K.F. (1998). Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. *BioFactors*, 7(1, 2), 113–174. <https://doi.org/10.1002/biof.5520070115>
- Ghosh, S. & Jung, C. (2017). Nutritional value of beecollected pollens of hardy kiwi, *Actinidia arguta* (Actinidiaceae) and oak, *Quercus sp.* (Fagaceae). *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 20, 245 – 251. <https://doi.org/10.1016/j.aspen.2017.01.009>
- Gil M.I., Selmaa M.V., Beltrán D., Allendea A. & Verab E.C. (2006). Elimination by ozone of *Shigella sonnei* in shredded lettuce and water. *Food Microbiology*, 35, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.09.005>
- Gilliam, D. B. & Prest, B. J. (1989) Lorenz. Microbiology of pollen and bee bread: taxonomy and enzymology of molds. *Apidologie*, 20 (1), 53-68.
- Glick, N.R. & Fischer, M.H. (2013). The role of essential fatty acids in human health. *Journal of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 18, 268–289. <https://doi.org/10.1177/2156587213488788>
- Gliński, Z. & Jarosz, J. (1988). Mikroflorapszczoły miodnej *Apis mellifera*. *Postępy Mikrobiologii*, 27, 95-107. ISSN: 0079-4252
- Glowacz, M., Colgan, R. & Rees, D. (2014). The use of ozone to extend the shelf-life and maintain quality of fresh produce. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95, 662–671. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6776>
- Glušac, J. R., Stijepić, M. J., Milanović, S. D. & Đurđević-Milošević, D.M. (2015). Physico-chemical properties of honeybee pollen enriched acidophilus

milk and probiotic yoghurt. *Acta Periodica Technologica*, 46, 45–54.
<https://doi.org/10.2298/APT1546045G>

- González, G., Hinojo, M.J., Mateo, R., Medina, A. & Jiménez, M. (2005). Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *International Journal of Food Microbiology*, 105(1), 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.001>
- Gomes, S., Dias, L., Moreira, L., Rodrigues, P. & Estevinho, L.M. (2010). Physicochemical, microbiological and antimicrobial properties of commercial honeys from Portugal. *Food and Chemical Toxicology* 48: 544–548. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.11.029>
- Gómez, C. 1984. "Origen botánico del polen comercializado en España". II Congreso Nacional de Apicultura. Gijón. Fundación Principado de Asturias. Instituto de Investigación y Desarrollo de la Apicultura.
- Gómez, A. (1 de febrero del 2020). *Manejo del polen. Comercialización*. [Discurso principal]. XXII Jornada Malagueña de Apicultura. Antequera. Málaga. <https://www.mieldemalaga.com/asociacion/jornadas/ponencias/texto22-1.pdf>
- Goulson D. & Hughes W.O.H. (2015). Mitigating the anthropogenic spread of bee parasites to protect wild pollinators. *Biological Conservation*, 191, <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2015.06.023>
- Graystock P., Yates K., Darvill B., Goulson D. & Huchea W.O.H. (2013). Emerging dangers: deadly effects of an emergent parasite in a new pollinator host. *Journal Invertebrate Pathology*, 114(2), 114–119. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2013.06.005>
- Graystock P., Jones J. C., Pamminger T., Parkinson J. F., Norman V., Blane E. J., Rothstein L., Wäckers F., Goulson D. & Hughes W.O.H. (2016). Hygienic food to reduce pathogen risk to bumblebees. *Journal of Invertebrate Pathology*, 136, 68-73. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.03.007>
- Greene A.K., Güzel-Seydim Z.B. & Seydim A.C. (2012). Chemical and physical properties of ozone. Ozone in food processing. Chichester: Blackwell Publishing Ltd. 19-32. <https://doi.org/10.1002/9781118307472.ch3>
- Grosso, G., Bei, R., Mistretta, A., Marventano, S., Calabrese, G., Masuelli, L., et al. (2013). Effects of vitamin C on health: A review of evidence. *Frontiers in Bioscience*, 18, 1017–1029. <https://doi.org/10.2741/4160>

- Gurini, L., Dovico, A., Álvarez, A. & Maldonado, L. (2020). Producción y procesamiento de polen: buenas prácticas de manejo y manufactura. Buenos Aires: Ediciones INTA; Estación Experimental Agropecuaria Delta del Paraná.
- Guzel-Seydim, Z.B., Greene, A.K. & Seydim, A.C. (2004). Use of ozone in the food industry. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie*, 37, 453–460. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2003.10.014>
- Guzmán, E., Espinosa, L., Correa, A. & Guzmán, G. (2011). Colonización, impacto y control de las abejas melíferas africanizadas en México. *Revista veterinaria de México*, 42(2), 149-178. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=42319744005>
- Hani, S., Hajilou, J. & Rezanejad, F. (2018). Evaluation of phenolic and flavonoid compounds in pollen grains of three *Citrus* species in response to low temperature. *Grana*, 57(3), 214-222. <https://doi.org/10.1080/00173134.2017.1358763>
- Haydak, M.H. (1958). Pollen - pollen substitutes -beebread. *American Bee Journal*, 98, 145–146.
- Herrero, F. (2004). Las abejas y la miel. León, España: Caja España. Obtenido de <http://www.saber.es/web/biblioteca/libros/las-abejas-y-la-miel/las-abejas-y-la-miel.pdf>
- Hildebrand, P.D., Forney, C.F., Song, J., Fan, L. & McRae, K.B. (2008). Effect of a continuous lowozone exposure (50 nL L⁻¹) on decay and quality of stored carrots. *Postharvest Biol Technol* 49(3): 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.03.012>
- Hodges, D., (1952). The Pollen Loads of the Honeybee. *Bee Research Association*.
- Hölldobler, B. & Wilson, E.O. (1990). The ants. Cambridge, Mass.: *Harvard University Press*, 12, 732.
- Hong-Sun, Y., Seong-IL, L. & Myung-Woo, B. (1998). Changes in Microbiological and Physicochemical Properties of Bee Pollen by Application of Gamma Irradiation and Ozone Treatment. *Journal of Food Protection*, 61, 217-220. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.2.217>

- Hunt, N.K. & Marinas, B.J. (1997). Kinetics of *Escherichia coli* inactivation with ozone water. *Water Research* 31(6), 1355-1362. [https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(96\)00394-6](https://doi.org/10.1016/S0043-1354(96)00394-6)
- Ibrahim, A. & Spivak, M. (2006). The relationship between hygienic behavior and suppression of mite reproduction as honey bee (*Apis mellifera*) mechanisms of resistance to *Varroa destructor*. *Apidologie*, 37(1), 31-40. <https://doi.org/10.1051/apido:2005052>
- Isik, A., Ozdemir, M. & Doymaz, I. (2018). Effect of hot air drying on quality characteristics and physicochemical properties of bee pollen. *Food Science and Technology*, 39, 224-231. <https://doi.org/10.1590/fst.02818>.
- International Organization for Standardization (s.f.). ISO/WD 24382. Beepollen-Specifications. <https://www.iso.org/standard/78544.html?browse=tc>
- Jagdis, A. & Sussman, G. (2012). Anaphylaxis from bee pollen supplement. *Canadian Medical Association Journal*, 184, 1167-1169. <https://doi.org/10.1503/cmaj.112181>.
- Jaksch, D., Margesin, R., Mikoviny, T., Skalny, J.D., Hartungen, E., Schinner, F., Mason, N.J. & Mark, T.D. (2004). The effect of ozone treatment on the microbial contamination of pork meat measured by detecting the emissions using PTR-MS and by enumeration of microorganisms. *International Journal of Mass Spectrometry*, 239, 209-214. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2004.07.018>
- Jáuregui, D.J. & Vallejo, C. 2012. Estudio de la productividad de polen y miel de abeja (*Apis mellifera*) utilizando trampas cazapolen con diferentes períodos de estadía en las colmenas, en San Cristóbal de Caranqui provincia de Imbabura. [Tesis Ing. Agropecuario, Pontificia Universidad Católica del Ecuador sede Ibarra], 92. Consultado 22 de julio de 2021. <http://dspace.pucesi.edu.ec/handle/11010/138>
- Johansson, T.S.K. & Johansson, M.P. (1978). Providing honeybees with water. *Bee World*, 59, 11-17. <https://doi.org/10.1080/0005772X.1978.11097693>
- Juźwiak, S., Samochowiec, L. & Wójcicki, J. (1989). The influence of pollen extracts on serum triglyceride lipase activity in rabbits fed with a high-fat diet. *Herba Polonica*, 35, 43.

<https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.agro-42d5206a-c5e7-46a7-bff1-ebcf93135412>

- Kačániová, M., Chlebo, R., Kopernický, M. & Trakovická, A. (2004). Microflora of the honeybee gastrointestinal tract. *Folia Microbiologica*, 49, 169–171. <https://doi.org/10.1007/BF02931394>
- Karabagias, I., Karabagias, V., Gatzias, I. & Riganakos, K. (2018). Biofunctional Properties of Bee Pollen: The case of “Bee Pollen Yoghurt”. *Coatings*, 8, 423. <https://doi.org/10.3390/coatings812042>
- Kassyanenko, V., Komisarenko, I. & Dubtsova, E. (2010). Influence of honey, pollen and bee bread on serum cholesterol of patients with pathological lipid metabolism. *Beekeeping, Apitherapy and Life Quality*, 81–82, International Industrial Academy, Moscow, Russia.
- Kaur, N., Chugh, V. & Gupta, A.K. (2014). Essential fatty acids as functional components of foods - A review. *Journal of Food Science and Technology*, 51, 2289–2303. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0677-0>.
- Kempf, M., Heil, S., Haßlauer, I., Schmidt, L., von der Ohe, K., Theuring, C., ... & Beuerle, T. (2010). Pyrrolizidine alkaloids in pollen and pollen products. *Molecular Nutrition and Food Research*, 54, 292–300. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900289>.
- Khalifa, S.A., Elashal, M., Kieliszek, M., Ghazala, N.E., Farag, M.A., Saeed, A., et al. (2020). Recent insights into chemical and pharmacological studies of bee bread. *Trends in Food Science & Technology*, 97, 300–316. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.08.021>
- Khalifa, S.A.M., Elashal, M.H., Yosri, N., Du, M., Musharraf, S.G., Nahar, L., Sarker, S.D., Guo, Z., Cao, W., Zou, X., et al. (2021). Bee Pollen: Current Status and Therapeutic Potential. *Nutrients*, 13, 1876. <https://doi.org/10.3390/nu13061876>
- Kieliszek, M., Piwowarek, K., Kot, A. M., Blazeiak, S., Chlebowska-Smigiel, A. & Wolska, I. (2017). Pollen and bee bread as new health-oriented products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 71, 170-180. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.10.021>.
- Komosinska-Vassev, K., Olczyk, P., Kaźmierczak, J., Mencner, L. & Olczyk, K. (2015). Bee pollen: Chemical composition and therapeutic

application.Evidence-Based.*Complementary and Alternative Medicine*, 1-6.<https://doi.org/10.1155/2015/297425>.

Kostić, A.Ž., Pešić, M.B., Mosić, M.D., Dojčinović, B.P., Natić, M.M., &Trifković, J.Đ. (2015). Mineral content of bee pollen from Serbia. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*, 66, 251–258. <https://doi.org/10.1515/aiht-2015-66-2630>.

Kovacik, L., Plitzko, J., Grote, M. &Reichelt, R. (2009). Electron tomography of structures in the wall of hazel pollen grains. *Journal of Structural Biology*166(3), 263–271.<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2009.03.008>.

Krell, R. (1996). Valuated products from beekeeping. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. *FAO Agricultural Services Bulletin*, 124, 87-113.

Kroyer, L.& Hegedus, N. (2001). Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innovative. Food Science & Emerging Technologies*, 2(3), 171–174. [https://doi.org/10.1016/S1466-8564\(01\)00039-X](https://doi.org/10.1016/S1466-8564(01)00039-X)

Krystijan, M., Gumul, D., Ziobro, R. & Korus, A. (2015). The fortification of 1171 biscuits with bee pollen and its effect on physicochemical and antioxidant properties in biscuits. *LWT –Food Science and Technology*, 63, 640–646. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.075>.

Kunicka–Styczyńska, A., & Śmigielski, K. (2011). Bezpieczeństwomikrobiologicznesurowcówziołowych. *Przemysł Spożywczy*6, 50-53.ISSN :0033-250X

Kurek-Gorecka, A., Górecki, M., Rzepecka-Stojko, A., Balwierz, R. & Stojko, J. (2020). Bee products in dermatology and skin care. *Molecules*, 25(3), 556.<https://doi.org/10.3390/molecules25030556>

Lara, J. M. (2019). Biología, Toxinología y Terapéutica de Especies Venenosas y de Interés Veterinaria en Nicaragua. Universidad Nacional Agraria. Facultad de Ciencia Animal. Departamento de Medicina Veterinaria. 41.

La tienda del apicultor (s.f.). POLEN DE ABEJA: Producción, manejo y comercialización. <https://www.latiendadelapicultor.com/blog/polen-produccion-manejo-y-comercializacion/#:~:text=Almacenamiento%20y%20envasado,->

El polen normalmente se utilizan bolsas de Ode, polen de sus posibles atacantes.

- Laverde, J., Egea, L., Rodríguez, D. & Peña, J. (2010). Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de las abejas y apicultura en Colombia con énfasis en miel de abejas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. <http://hdl.handle.net/20.500.12324/12612>
- Lesur, L. (2012). Anatomía, alimentación y manejo de las abejas [Archivo pdf]. México: TRILLAS. Obtenido de http://siplandi.seducoahuila.gob.mx/SIPLANDI_NIVELES_2015/SECUNDARIA2015/LIBROS/TECNOLOGIA/TECNOLOGIA_APICULTURA_TS_UNO/API_TRES.pdf
- Li, Q.Q., Wang, K., Marcucci, M.C., Sawaya, A.C.H.F., Hu, L., Xue, X. F., ... & Hu, F.L. (2018). Nutrient-rich bee pollen: A treasure trove of active natural metabolites. *Journal of Functional Foods*, 49, 472–484. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.09.008>.
- Liolios, V., Tananaki, C., Dimou, M., Kanelis, D., Goras, G., Karazafiris, E. & Thrasyvoulou, A. (2016). Ranking pollen from bee plants according to their protein contribution to honey bees. *Journal of Apicultural Research*, 54, 582-592. <https://doi.org/10.1080/00218839.2016.1173353>
- Liolios, V., Tananaki, C., Dimou, M., Kanelis, D., Rodopoulou, M.A. & Thrasyvoulou, A. (2018). Exploring the sugar profile of unifloral bee pollen using high performance liquid chromatography. *Journal of Food and Nutrition Research*, 57(4), 341-350. ISSN 1336-8672
- Liolios, V., Tananaki, C., Kanelis, D., Rodopoulou, M. A., Dimou, M. & Argenta, N. (2019). The determination of fat content and fatty acid composition of bee pollen based on its botanical origin. 5th International Symposium on Bee Products, Silema, Malta.
- Llorente, J. (10 de octubre de 2008). Anatomía externa de la abeja. Obtenido de Fundación Amigos de las Abejas: <https://abejas.org/anatomia-externa-de-las-abejas/>
- Lončarić, I., Heigl, H., Licek, E., Moosbeckhofer, R., Busse, H.J. & Rosengarten, R. (2009) Typing of Pantoea agglomerans isolated from colonies of

- honey bees (*Apis mellifera*) and culturability of selected strains from honey. *Apidologie* 40 (1), 40–54. <https://doi.org/10.1051/apido/2008062>
- Loncaric I., Ruppitsch, W., Licek, E., Moosbeckhofer, R., Busse, H-J.& Rosengarten, R. (2011). Characterization of selected Gram-negative non-fermenting bacteria isolated from honey bees (*Apis mellifera carnica*). *Apidologie* 42, 312–325. <https://doi.org/10.1007/s13592-011-0019-7>
- Loper, G., Standifer, L., Thompson, M. & Gilliam, M. (1980). Biochemistry and microbiology of bee-collected almond (*Prunus dulcis*) pollen and bee bread. I- Fatty Acids, Sterols, Vitamins and Minerals. *Apidologie* 11(1), 63–73. <https://doi.org/10.1051/apido:19800108>
- Louveaux. J. 1958. Recherches sur la récolte du pollen par les abeilles (*Apis mellifica* L.). *Annales de l'abeille* 1, 13-111. <https://doi.org/10.1051/apido:19590102>
- McNamara, K.B. & Pien, L. (2019). Exercise-induced anaphylaxis associated with the use of bee pollen. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 122, 118–119. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.09.461>.
- Machoy-Mokrzyńska, A., Łoniewski, I. & Wojcicki, J. (1992). Influence of pollen extracts on the central nervous system. *Herba Polonica*, 38(4), 189-194.
- Makris, M., Koulouris, S., Koti, I., Aggelides, X., Sideri, K., Chliva, C., & Kalogeromitros, D. (2010). Temporal relationship of allergic rhinitis with asthma and other co-morbidities in a Mediterranean country: A retrospective study in a tertiary reference allergyclinic. *Allergologia et Immunopathologia*, 38, 246–253. <https://doi.org/10.1016/j.aller.2009.11.007>.
- Manning, R. (2001). Fatty acids in pollen: a review of their importance for honey bees. *Bee World*, 82(2), 60–75. <https://doi.org/10.1080/0005772X.2001.11099504>
- Manousaridis G., Nerantzaki A., Paleologos E.K., Tsiotsias A., Savvaidis, I.N. & Kontominas, M.G. (2005). Effect of ozone on microbial, chemical and

- sensory attributes of shucked mussels. *Food Microbiology*, 22(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2004.06.003>
- Mărgăoan, R., Marghitas, L.A., Dezmirean, D., Mihai, C.M. & Bobis, O. (2010). Bee collected pollen - General aspects and chemical composition. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 67, 1-2. Electronic ISSN 1843-536X
- Mărgăoan, R., Mărghitaș, L.A., Dezmirean, D.S., Dulf, F.V., Bunea, A., Socaci, S.A. & Bobiș, O. (2014). Predominant and secondary pollen botanical origins influence the carotenoid and fatty acid profile in fresh honeybee-collected pollen. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62, 6306–6316. <https://doi.org/10.1021/jf5020318>.
- Mărgăoan, R., Cornea-Cipcigan, M., Topal, E. & Kosoglu, M. (2020). Impact of fermentation processes on the bioactive profile and health-promoting properties of bee bread, mead and honey vinegar. *Processes*, 8(9), 1081. <https://doi.org/10.3390/pr8091081>
- MARNYS®. (25 de Enero del 2021). Polen de Abeja. Propiedades y cómo tomar polen. <https://www.marnys.es/magazine/propiedades-y-beneficios-del-polen/>
- Martínez, F. & Cobo, A. (1988). Apuntes de Apicultura. Publicación de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. Edita: Dirección General de Investigación y Extensión Agrarias. Centro de Información y Documentación Agraria. Sevilla. I.S.B.N. 84-87141-05-06. Depósito legal: SE-1678-1988.
- Martins, M. C., Morgano, M. A., Vicente, E., Baggio, S. R. & Rodriguez-Amaya, D. B. (2011). Physicochemical composition of bee pollen from eleven Brazilian States. *Journal of Apicultural Science*, 55, 107–116. ISSN (Print) 1643-4439
- Mateescu, C. (2011). Bee products—legal status health claims to be evaluated by EFSA (European Food Safety Authority). *Economics, Management, and Financial Markets*, 6(1), 1133-1140. <http://www.addletonacademicpublishers.com/economics-management-and-financial-markets/journals/emfm/about-the-journal.html>

- Mauriello, G., De Prisco, A., Di Prisco, G., La Stora, A. & Caprio, E. (2017). Microbial characterization of bee pollen from the Vesuvius area collected by using three different traps. *PLoS one*, 12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183208>.
- Mayda, N., Özkök, A., Bayram, N. E., Gerçek, Y. C. & Sorkun, K. (2020). Bee bread and bee pollen of different plant sources: Determination of phenolic content, antioxidant activity, fatty acid and element profiles. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(4), 1795–1809. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00427-y>
- Mellidou, I., Georgiadou, E. C., Kaloudas, D., Kalaitzis, P., Fotopoulos, V., & Kanellis, A. K. (2019). Chapter 17 – Vitamins. In E. M. Yahia (Ed.), *Postharvest Physiology and Biochemistry of Fruits and Vegetables*. United Kingdom: Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/C2016-0-04653-3>.
- Mesa, A. 2015. Caracterización fisicoquímica y funcional del polen de abejas (*Apis mellifera*) como estrategia para generar valor agregado y parámetros de calidad al producto apícola [Tesis de maestría]. Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín.
- Mesnage, R. & Seralini, G-E. (2018). Toxicity of Pesticides on Health and Environment. *Frontiers in Public Health and Frontiers in Environmental Science*. <https://doi.org/10.3389/978-2-88945-644-4>.
- Miller F.A., Silva C.L.M. & Brandão T.R.S. (2013). A Review on ozone-based treatments for fruit and vegetables preservation. *Food Engineering Reviews* 5(2), 77-106. <https://doi.org/10.1007/s12393-013-9064-5>
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA) (2021). Indicadores Económicos del Sector Apícola (2021). *El sector apícola español en 2020: Principales magnitudes e indicadores económicos*. [Archivo PDF]. SG de producciones ganaderas y cinegéticas. https://www.mapa.gob.es/es/ganaderia/temas/produccion-y-mercados-ganaderos/indicadoreseconomicossectorapicola2020_paraweb_tcm30-576747.pdf
- Mizarahi, A. & Lensky, Y. (2013). Bee products: Properties, applications, and apitherapy. *Springer Science & Business Media*.

- Modro A. F., Silva, I. C. & Luz, C. F. (2009). Analysis of pollen load based on color, physicochemical composition and botanical source. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 81, 281–285. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652009000200014>.
- Monroy, A. (2013). Efecto del tipo de trampa y los días a cosechar en la producción de polen. [Archivo pdf]. Proyecto especial presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo en el Grado Académico de Licenciatura. Universidad El Zamorano. Honduras. Disponible en <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/1771/1/CPA-2013-061.pdf>
- Montes, M. (2014). Las abejas y las escenas de apicultura en el antiguo Egipto: concepción, desarrollo y evolución. *BAEDE, Boletín de la Asociación Española de Egiptología*, 23, 157-220. ISSN: 1331-6780.
- Mullin, C. A., Frazier, M., Frazier, J. L., Ashcraft, S., Simonds, R., van Engelsdorp, D. & Pettis, J. S. (2010). High levels of miticides and agrochemicals in North American apiaries: implications for honey bee health. *PloS ONE*, 5(3), e9754, 1-19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009754>
- Naitoh, S., Okada, Y. & Sakai, T. (1988). Studies on utilization of ozone in food preservation: V.Changes in microflora of ozone treated cereals, grains, peas, beans, and spices during storage. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 35(2), 69–77. https://doi.org/10.3136/nskkk1962.35.2_69
- Nardoni, S., D'Ascenzi, C., Rocchigiani, G., Moretti, V. & Mancianti, F. (2016) Occurrence of moulds from bee pollen in Central Italy—A preliminary study. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*. 23(1), 103–5. <https://doi.org/10.5604/12321966.1196862>
- Nayik, G. A., Shah, T. R., Muzaffar, K., Wani, S. A., Gull, A., Majid, I. & Bhat, F. A. (2014). Honey: its history and religious significance: a review. *Universal Journal of Pharmacy*, 3(1) 5–8. https://www.academia.edu/62088707/Honey_Its_History_and_Religious_Significance_A_Review
- Nogueira, C., Iglesias, A., Feás, X. & Estevinho, L. M. (2012). Commercial bee pollen with different geographical origins: A comprehensive approach.

International Journal of Molecular Sciences, 13(9), 11173-11187.
<https://doi.org/10.3390/ijms130911173>.

Novaković, S., Djekic, I., Pešić, M., Kostić, A., Milinčić, D., Stanisavljević, N., Radojević, A. & Tomasevic, I. (2021). Bee pollen powder as a functional ingredient in frankfurters. *Meat Science*, 182. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108621>

Odoux, J. F., Feuillet, D., Aupinel, P., Loublier, Y., Tasei, J. N. & Mateescu, C. (2012). Territorial biodiversity and consequences on physico-chemical characteristics of pollen collected by honey bee colonies. *Apidologie*, 43, 561–575. <https://doi.org/10.1007/s13592-012-0125-1>.

Omar, W. A. W., Azhar, N. A., Fadzilah, N. H., & Kamal, N. N. S. N. M. (2016). Bee pollen extract of Malaysian stingless bee enhances the effect of cisplatin on breast cancer cell lines. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(3), 265-269. <https://doi.org/10.1016/j.apjtb.2015.12.011>.

Onisei, T., Mateescu, C., & Răscol, M. (2018, October). Bee products – Between physiological and pharmacological effects. APIMONDIA 7th APIMEDICA and 6th APIQUALITY Symposium, Sibiu, Romania.

Othman, Z. A., Noordin, L., Ghazali, W. S. W., Omar, N., & Mohamed, M. (2019). Nutritional, phytochemical and antioxidant analysis of bee bread from different regions of Malaysia. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 81(5), 955–960. <https://doi.org/10.36468/pharmaceutical-sciences.590>

Özler, H., S. Pehlivan, A. Kahraman, M. Doğan, F. Celep, B. Başer, A. Yavru, and S. Bagherpour. (2011). Pollen morphology of the genus *Salvia L. (Lamiaceae)* in Turkey. *Flora–Morphology, Distribution, Functional, Ecology of Plants*, 206(4), 316–327. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2010.07.005>

Padilla, F., Flores, J., & Pérez, A. (septiembre de 2007). Los órganos de los sentidos de las abejas: ojos y antenas. *El Colmenar* 87, 13-26. Obtenido de http://www.uco.es/dptos/zoologia/Apicultura/trabajos_libros/2007_Sentidos_1_El_Colmenar.pdf

- Pajuelo Consultores Apícolas (s.f.). Programa de Bienes Públicos sectoriales para la Competitividad. <http://uruguaymiel.com/wp-content/uploads/2021/07/Informe-final-de-nuevos-productos.pdf>
- Parlamento Europeo (2018). INFORME sobre las perspectivas y desafíos para el sector apícola de la Unión (2017/2115(INI)). Comisión de Agricultura Desarrollo. <https://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?type=REPORT&reference=A8-2018-0014&language=ES>
- Patil, S. & Bourke, P. (2012). Ozone processing of fluid foods. In: Cullen P.J., Tiwari B.K., Valdamidis V.P., editors. Novel thermal and non-thermal technologies for fluid foods. First edition. Waltham: *Academic Press*. pp. 225-251.
- Peachey, B. L., Scott, E. M. & Gatlin III, D. M. (2018). Dietary histidine requirement and physiological effects of dietary histidine deficiency in juvenile red drum *Sciaenops ocellatus*. *Aquaculture*, 483, 244–251. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2017.10.032>.
- Peleg M. (1976). Review paper: The chemistry of ozone in the treatment of water. *Water Research*, 10, 361–365. [https://doi.org/10.1016/0043-1354\(76\)90052-X](https://doi.org/10.1016/0043-1354(76)90052-X)
- Pérez, F., Gómez, A. & Molins, J.L. (1987). Origen floral y coloración de las pelotas de polen. *Vida apícola* 25. Pag. 33-45.
- Pérez A.G., Sanz C., Rios J.J., Olias R. & Olias J.M. (1999). Effects of ozone treatment on postharvest strawberry quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 1652–1656. <https://doi.org/10.1021/jf980829I>
- Pérez, M. (8 de abril del 2019). La abeja en el Antiguo Egipto. *Etiptología 2.0*. <http://egiptologia20.es/la-abeja-en-el-antiguo-egipto>
- Percival, M. (1947). Pollen collection by *Apis mellifera*. *New Phytologist*, 46, 142-165. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1947.tb05076.x>
- Peris, J. (1984). Producción y comercio de los productos apícolas en España. *El Campo del Banco de Bilbao. Apicultura. Enero-Marzo, nº 93*. Bilbao.
- Pidek, I.A. (2004). Preliminary results of pollen trapping in the region of the Roztocze National Park (SE Poland). *Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska Lublin Polonia*, 59, 143–159. <http://dlibra.umcs.lublin.pl/publication/5003>

- Pirani, S. (2010). Application of ozone in food industry. [PhD Thesis]. Doctoral Program in Animal Nutrition and Food Safety. Università degli Studi di Milano, Milan, Italy.
- Plan Nacional de Medidas de Ayuda a la Apicultura. España 2020-2022 (Marzo 2021). Subdirección General de Productos Ganaderos. Dirección General de Producciones y Mercados Agrarios. Catálogo de Publicaciones de la Administración General del Estado: <http://publicacionesoficiales.boe.es/>. NIPO: 003-19-178-9.
- Plinio, G. (2002). *Naturalis Historia*. (Edición de Josefa Cantó, Isabel Gómez Santamaría, Susana González Martín y Eusebia Tarrío). Cátedra. Letras Universales. Madrid.
- Polański, M. Okoń, K. Przybyło, R. & Frasiak, W. (1988). Cardioprotective properties of hydrophilic pollen extract (HPE). *Polish Journal of Pathology*, 49(2), 109–112.
- Polański, M. (1998). The usefulness of the hydrophilic fraction of bee pollen loads standardized in order to achieve a therapeutic effect cardioprotection. In *Proceedings of the 35th Scientific Beekeeping Conference in Pulawy*, vol. 56.
- Prashanth, L., Kattapagari, K. K., Chitturi, R. T., Baddam, V. R. R. & Prasad, L. K. (2015). A review on role of essential trace elements in health and disease. *Journal of Dr. NTR University of Health Sciences*, 4, 75-85. <https://doi.org/10.4103/2277-8632.158577>.
- Profshare market research (s.f.). Bee Pollen Market by Product Type (Wild Flower Bee Pollen, Camellia Bee Pollen, and Rape Bee Pollen) by Application (Food Additives, Pharmaceuticals, Feed Additives, and Cosmetics) by Industry Analysis, Volume, Share, Growth, Challenges, Trends and Forecast 2019-2027. Recuperado el 21 de septiembre del 2021 de <https://www.profsharemarketresearch.com/bee-pollen-market/>
- Proyecto Europeo FH7 APIFRESH. (2012) Developing European Standards for Bee Pollen and Royal Jelly: Quality, Safety and Authenticity. (2012). *CTC Alimentación. Revista sobre Agroalimentación e Industrias Afines*. 51, 20-21.

- Pridal, A., Sedlázek, I. & Marvanová, L. (1997). Microbiología of *Bombus terrestris* L. larvae (Himenoptera: Apoidea) from laboratory rearing. *Acta Universitarias Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Bruñieseis* S.M.Z. a Lesnické Univerzity V Brne, 59-66.
- Puig-Peña, Y., del Risco-Ríos, C.A., Álvarez-Rivera, V., Leiva-Castillo, V.P., García-Neninger, V. & R. (2012). Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de un proceso de secado. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 43 (1), 23-27.[fecha de Consulta 1 de Febrero de 2021]. ISSN: 0253-5688. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181223772004>
- Quero, A. (2004). Las abejas y la apicultura. Universidad de Oviedo, Departamento de Biología de Organismos y Sistemas. Oviedo, España: UDO. Obtenido de http://www.mieldemalaga.com/data/Las_abejas_y_la_apicultura.pdf
- Quintaes, K. D. & Diez-Garcia, R. W. (2015). The importance of minerals in the human diet. In M. de la Guardia and S. Garrigues (Ed.), *Hand book of Mineral Elements in Food*, Chichester: John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118654316.ch1>.
- Rada, V., Machoa, M., Huk, J., Marounek, M. & Duskova, D. (1997). Microflora in the honeybee digestive tract: counts, characteristics and sensitivity with veterinary drugs. *Apidologie* 28, 357–365. <https://doi.org/10.1051/apido:19970603>.
- Real Academia Española. (s.f.). Apicultura. En Diccionario de la Lengua Española. Recuperado en 22 de julio del 2021, de <https://dle.rae.es/apicultura>.
- Restaino, L., Frampton, E.W., Hemphill, J.B. & Palnikar, P. (1995). Efficacy of ozonated water against various food-related microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology* 61(9), 3471–3475. <https://doi.org/10.1128/aem.61.9.3471%2D3475.1995>.
- Rezanejad, F. (2012). Air pollution effects on flavonoids in pollen grains of some ornamental plants. *Turkish Journal of Botany*, 36(1), 49-54. <https://doi.org/10.3906/bot-1008-15>.
- Rizvi, S., Raza, S. T., Faizal-Ahmed, A. A., Abbas, S. & Mahdi, F. (2014). The role of vitamin E in human health and some diseases. *Sultan Qaboos*

University Medical Journal, 14(2), 157-165.
<https://doi.org/10.1080/10408360802118625>.

Roblero, O. (2013). Detección de abeja africana (*Apis mellifera* *scutellata*) en la región lagunera del estado de Durango. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, División de Ciencia Animal. Coahuila, México: universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Obtenido de <http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/3396/OBED%20ADONAI%20ROBLERO%20MORALES.pdf?sequence=1>.

Rodríguez, I. (2010). *Parámetros descriptores y requisitos para la Denominación de Origen Protegida Miel de Sierra Morena*. [Tesis doctoral]. Universidad de Córdoba.

Rodríguez, G. (2012). Implementación, mejoramiento y desarrollo en la producción y comercialización de miel de abeja en la parroquia de Puellaró, provincia de Pichincha. Universidad central del Ecuador, Facultad de ciencias administrativas. Quito, Ecuador: UCE. Obtenido de <http://www.dspace.uce.edu.ec/bitstream/25000/1557/1/T-UCE-0003-254.pdf>

Roman, A. (2009). Concentration of chosen trace elements of toxic properties in bee pollen loads. *Polish Journal of Environmental Studies*, 18, 265–272.

Root, A.I. (1976). *ABC y XYZ de la Apicultura*. 10ª edición. Ed. Librería Hachette. S.A. Buenos Aires. Argentina.

Rowley, J., Claugher, D. & Skvarla, J. (1999). Structure of the exine in *Artemisia vulgaris* (Asteraceae): A review. *Taiwania*, 44, 1–21.
[https://doi.org/10.6165/TAI.1999.44\(1\).1](https://doi.org/10.6165/TAI.1999.44(1).1)

Rowley, J. & Skvarla, J. (2000). The elasticity of the exine. *Grana*, 39: 1–7.
<https://doi.org/10.1080/00173130150503759>

Rubiano, M. (2016). Análisis virológico y epidemiológico del síndrome de despoblamiento de las colmenas en España: estudio de causas y consecuencias. [Tesis doctoral]. Universidad Complutense de Madrid, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria. Madrid, España: Universidad Complutense de Madrid. Obtenido de <https://eprints.ucm.es/38831/1/T37638.pdf>

- Ruiz, B. (2003). Módulo de apicultura. Instituto Nacional de Agricultura (INA). Tegucigalpa, Honduras: Guaymuras. Obtenido de <https://bdigital.zamorano.edu/bitstream/11036/2939/1/01.pdf>
- Ruppert, E. & Barnes, R. (2000). *Insectos*. En E. Ruppert, & R. Barnes, Zoología de los invertebrados (sexta ed., págs. 831-854). México D.F., México: McGraw-Hill, Interamericana.
- Ryan, K., & Ryan, C. (2004). Sherris Medical Microbiology. 4th Editio. Mc. Graw Hill.
- Saavedra, K. I., Rojas, C. & Delgado, G. E. (2013). Características polínicas y composición química del polen apícola colectado en Cayaltí (Lambayeque – Perú). *Revista Chilena de Nutrición*, 40, 71–78. <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182013000100011>
- Sáenz, C. (1978). *Polen y esporas (Introducción a la Palinología y Vocabulario Palinológico)*. 1ª ed. H. Blume Ediciones. Madrid.
- Sáenz, C. (11 de Noviembre del 2015). La cera y la miel de las abejas se usan desde hace 9.000 años. *La Vanguardia*. <https://www.lavanguardia.com/ciencia/planetatierra/20151112/54438798738/neolitico-cera-abeja.html>.
- Sagona, S., Pozzo, L., Peiretti, P. G., Biondi, C., Giusti, M., Gabriele, M. & Felicioli, A. (2017). Palynological origin, chemical composition, lipid peroxidation and fatty acid profile of organic Tuscanian bee-pollen. *Journal of Apicultural Research*, 56, 136–143. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1287995>.
- Samochowicz, L. & Wójcicki, J. (1981). Effect of pollen on serum and liver lipids in rats fed on a high-lipid diet. *Herba Polonica*, 27, 333.
- Sánchez, M. (2016). Permapicultura. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica: IICA. Obtenido de http://www.iica.int/sites/default/files/bids/11/02/2016/permapicultu_raguatemala.pdf
- Saric, A., Balog, T., Sobocanec, S., Kusic, B., Sverko, V., Rusak, G., Likic, S., Bubalo, D., Pinto, B., Reali, D. & Marotti, T. (2009). Antioxidant effects of flavonoid from Croatian *Cystusincanus* L. rich bee pollen. *Food and Chemical Toxicology*, 47(3), 547–554. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.12.007>.

- Sattler, J.A.G., de Melo, I.L.P., Granato, D., Araújo, E., de Freitas, A.D.S., Barth, O.M. & de Almeida-Muradian, L.B. (2015). Impact of origin on bioactive compounds and nutritional composition of bee pollen from southern Brazil. *Food Research International*, 71, 82–91. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.09.013>.
- Sattler, J.A.G., de Melo, A.A.M., Nascimento, K.S.D., Mancini-Filho, J., Sattler, A.&Almeida-Muradian, L.B.D. (2016). Essential minerals and inorganic contaminants (barium, cadmium, lithium, lead and vanadium) in dried bee pollen produced in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Food Science and Technology*, 36, 505–509. <https://doi.org/10.1590/1678-457X.0029>.
- Schmidt, J.O.& Buchmann, S.L. (1992). Other products of hive. In: Graham, J.M., Amgrose, J.T.& Langstroth, L.L., eds. *The Hive and the honeybee: a new book on beekeeping which continues the tradition of "Angustiarte on the hive and the honeybee"*. Hamilton: Dadant,. 928-977.
- Scott, R.&Stead, A. (Eds.). (1994). *Molecular and Cellular Aspects of Plant Reproduction* (Society for Experimental Biology Seminar Series).Cambridge: Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511752339>
- Seeley, T. (2006). *Ecología da abelha: Umestudo de adaptação na vida social*. Porto Alegre Paixão.
- Selamoglu, Z. (2018). Honeybee pollen with health beneficial: An update. *Journal of Traditional Medicine &ClinicalNaturopathy*, 7(1), 141.<https://doi.org/10.4172/2573-4555.1000e141>
- Serra, J., Gómez, A. & Gonell, J. (1985). Caracterización del polen de abejas. Estudio de sus factores de composición (humedad, aminoácidos, proteínas, espectro de azúcares, grasas, fibra bruta, elementos minerales, origen botánico, test organoléptico y de su conservación. Departamentd'Agricultura Ganadería i Pesca. Generalitat de Catalunya.
- Serra-Bonheví, J. & López Alegret, P. (1986). Étudesmicrobiologiques du pollend'abeilles. *Revue Française d'apiculture* 79, 259-266.
- Serra-Bonheví, J. &Jordà-Escolá R. (1997). Nutrient composition and microbiological quality of honeybee-collected pollen in Spain. *Journal*

of Agricultural and Food Chemistry, 45, 725-732. <https://doi.org/10.1021/jf960265q>

Serra-Bonheví, J., Soliva, M., Centelles, E. (2001). Evaluation of Polyphenolic and Flavonoid Compounds in Honey bee-Collected Pollen Produced in Spain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49, 1848–1853. <https://doi.org/10.1021/jf0012300>

Shahali, Y. (2015). Allergy after ingestion of bee-gathered pollen: Influence of botanical origins. *Annals of Allergy, Asthma, & Immunology*, 114, 250-251. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2014.11.009>.

Skog L. & Chu, C.L. (2001). Effect of ozone on qualities of fruits and vegetables in cold storage. *Canadian Journal of Plant Science*, 81, 773–778. <https://doi.org/10.4141/P00-110>.

Sobral, F., Calhella, R. C., Barros, L., Dueñas, M., Tomás, A., Santos-Buelga, C., *et al.* (2017). Flavonoid composition and antitumor activity of bee bread collected in northeast Portugal. *Molecules*, 22(2), 248. <https://doi.org/10.3390/molecules22020248>.

Somerville, D. (2012). Pollen trapping and storage. *NAW Agriculture: Dept. Of Primary Industries. Factsheet Number (Primefact): 1126. 2nd Edition. Orange (New South Wales). Australia.*

Sousa, D.C. (2007). *Apicultura: Manual do agente de desenvolvimento rural. 2. Ed. Brasília: Sebrae. (REDE APIS- Apicultura Integrada e Sustentável).*

Standifer, L., McCaughey, W., Dixon S., Gilliam, M. & Loper, G. (1980). Biochemistry and microbiology of pollen collected by honey bees (*Apis mellifera* L.) from almond, *Prunus dulcis*. *Apidologie* 11(2), 163–171. <https://doi.org/10.1051/apido:19800206>

Stefanov, B. (4 octubre 2017). *Apimondia Istanbul - China's Apiculture Situation and Development Strategy - Jie Wu - 30.09.2017* [Archivo de video]. Youtube. <https://www.youtube.com/watch?v=qOK20mIOHSE&t=166s>

Steven, A. (2014). Pollen. A microscopic wonder of plant kingdom. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*, 1, 45–62. <https://www.researchgate.net/publication/281967060>

- Stone H., Sidel J.L., Oliver S., Woolsey A. & Singleton R.C. (1974). Sensory evaluation by Quantitative Descriptive Analysis. *Food Technology*, 28, 24-33. <https://doi.org/10.1002/9780470385036.ch1c>
- Stone H. & Sidel J.L. (1993). *Sensory Evaluation Practices*. 2ª ed., Academic Press.
- Strittmatter, R.J. & Johnson, D.A. (1996). Ozone application for cooling tower water. *ASHRAE Journal*, 38, 27–34.
- Suzuki, T., Masaoka, K., Nishi, M., Nakamura, K. & Ishiguro, S. (2008). Identification of kaonashi Mutants Showing Abnormal Pollen Exine Structure in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 49(10), 1465–1477. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn131>
- Talavera, S. (1987). *Flora vascular de Andalucía Occidental*. Ketres Editora. S.A. Barcelona. ISBN. 84-85256-63-8.
- Tapp C. & Rice R.G. (2012). Generation and control of ozone. In: O'Donnell C., Tiwari B.K., Cullen P.J., Rice R.G., editors. Ozone in food processing. First edition. Chichester: Blackwell Publishing, 33-46.
- Thakur, M. & Nanda, V. (2018). Assessment of physico-chemical properties, fatty acid, amino acid and mineral profile of bee pollen from India with a multivariate perspective. *Journal of Food & Nutrition Research*, 57(4), 328-340.
- Thakur, M. & Nanda, V. (2020). Composition and functionality of bee pollen: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 98, 82-106. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.02.001>
- Tiwari B.K. & Muthukumarappan K. (2012). Ozone in fruit and vegetable processing. In: O'Donnell C., Tiwari B.K., Cullen P.J., Rice R.G., editors. Ozone in food processing. First edition. Chichester: Blackwell Publishing Ltd., 55-74.
- Tolić, M. T., Krbavčić, I. P., Vujević, P., Milinović, B., Jurčević, I. L. & Vahčić, N. (2017). Effects of weather conditions on phenolic content and antioxidant capacity in juice of chokeberries (*Aronia melanocarpa* L.). *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, 67(1), 67-74. <https://doi.org/10.1515/pjfn-2016-0009>.

- Tomás, A., Falcao, S.I., Russo-Almeida, P. & Vilas-Boas, M. (2017). Potentialities of beebread as a food supplement and source of nutraceuticals: Botanical origin, nutritional composition and antioxidant activity. *Journal of Apicultural Research*, 56(3), 219–230. <https://doi.org/10.1080/00218839.2017.1294526>
- Transparency Market Research. (s.f). *Bee Pollen Market: Global Industry Analysis, Size, Share, Growth, Trends and Forecast 2019-2027*. <https://www.transparencymarketresearch.com/bee-pollen-market.html>
- Tridge, (s.f.). *Global market overview Bee pollen*. <https://www.tridge.com/intelligences/bee-pollen>
- Trujillo, A.(s.f.).Evaluación de la producción de polen en colmenas de abejas (*Apis mellifera*) en el centro experimental Cota Cota. [Archivo pdf].<https://dipgis.umsa.bo/investigaumsa/wp-content/uploads/2021/08/AC-EVALUACION-DE-LA-PRODUCCION-DE-POLEN-EN-COLMENAS-DE-ABEJAS-Adacely-Norka-Trujillo-Rodriguez.pdf>
- Tzortzakis, N., Singleton, I.& Barnes, J. (2007). Deployment of low-level ozone-enrichment forthe preservation of chilled fresh produce. *PostharvestBiology and Technology*43(2), 261–270. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2006.09.005>
- Unión de Uniones de Agricultores y Ganaderos. (13 de mayo del 2021). Unión de Uniones analiza la evolución de los precios de la miel y polen: campaña 2020/21. <http://uniondeuniones.org/profiles/blogs/union-de-uniones-analiza-la-evolucion-de-los-precios-de-la-miel-y-polen>
- Vásquez, R., Ortega, N., Martínez, R. & Maldonado, W. (2012). *La apicultura. Manual técnico de apicultura: abeja (Apis mellifera)*,8-16. Colombia: Produmedios. Obtenido de https://repository.agrosavia.co/bitstream/handle/20.500.12324/32817/62052_1.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Visscher, K. & Seeley, T. (1982). Foraging Strategy of Honeybee Colonies in a Temperate Deciduous Forest. *Ecology*, 63(6), 1790-1801. <https://doi.org/10.2307/1940121>

- Végh, R., Csóka, M., Sörös, C. & Sipos, L. (2021). Food safety hazards of bee pollen- A review. *Trends in Food Science & Technology*, 114, 490-509. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.06.016>.
- Verslues, P.E., & Sharma, S. (2010). Proline metabolism and its implications for plant environment interaction. *The Arabidopsis Book*, 8,e0140. <https://doi.org/10.1199/tab.0140>.
- Victorin, K. (1992). Review of the genotoxicity of ozone. *Mutation Research*, 277, 221–238. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(92\)90045-b](https://doi.org/10.1016/0165-1110(92)90045-b).
- Virgilio, (70a.C.-19a.C). *Georgicas*. <http://www.cervantesvirtual.com/obra/las-georgicas-de-virgilio/>
- Wakil, A., Mackenzie, G., Diego-Taboada, A., Gordon, J. & Atkin, S. (2010). Enhanced Bioavailability of Eicosapentaenoic Acid from Fish Oil After Encapsulation Within Plant Spore Exines as Microcapsules. *Lipids* 45(7), 645–649. <https://doi.org/10.1007/s11745-010-3427-y>.
- Wang, R. & Dobritsa, A.A. (2018). Exine and aperture patterns on the pollen surface: Their formation and roles in plant reproduction. *Annual Plant Reviews Online*, 1. <https://doi.org/10.1002/9781119312994.apr0625>
- Wang, W., Hu, J. & Cheng J. (1987). “Biological effect of pollen from beehives radioprotective effect on hematopoietic tissues of irradiated mice,” in Proceedings of the 31st International Apicultural Congress Apimondia, p. 176, Warsaw, Poland.
- Witherell, P.C. (1975). Otros productos de la colmena. In: DADANT, E. La colmena y la abeja melífera. Montevideo: Hemisferio Sur. p.684.
- Xu, X., Sun, L., Dong, J. & Zhang, H. (2009). Breaking the cells of rape bee pollen and consecutive extraction of functional oil with supercritical carbon dioxide. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(1), 42-46. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2008.08.004>.
- Yang, K., Wu, D., Ye, X., Liu, D., Chen, J. & Sun, P. (2013). Characterization of chagal composition of bee pollen in China. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(3), 708-718. <https://doi.org/10.1021/jf304056b>.

- Yerlikaya, O. (2014). Effect of bee pollen supplement on antimicrobial, chemical, rheological, sensorial properties and probiotic viability of fermented milk beverages. *Mljekarstvo*, 64, 268-279. <https://doi.org/10.15567/mljekarstvo.2014.0406>
- Yook, H.S., Chung, Y.J., Kim, J.O., Kwon, O.J., Sung, K. & Byun, M.W. (1997). Effects of ionizing energy and ozone treatments on the microbial decontamination and physicochemical properties of aloe powders and bee pollen. *Journal of Food Science and Nutrition*. 2, 89–95. ISSN: 1226-332X
- Yook, H.S., Lim, S.I. & Byun, M.W. (1998) Changes in microbiological and physicochemical properties of bee pollen by application of gamma irradiation and ozone treatment. *J Food Prot*, 61, 217–220.
- Zarco, J. (2014). De abejas reinas y obreras: Más allá de la identidad genética. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F.: UNAM. Obtenido de http://www.cienciorama.unam.mx/a/pdf/307_cienciorama.pdf
- Zagon, J., Dehne, L.I., Wirz, J., Linke, B. & Boegl, K.W. (1992). Ozone treatment for removal of microorganisms from spices. An alternative to ethylene oxide fumigation or irradiation? Results of a practical study. *Bundesgesundheitsblatt*. 35, 20–23.
- Zhang, L.K., Lu, Z.X., Yu, Z.F. & Gao, X. (2005). Preservation of fresh-cut celery by treatment of ozonated water. *Food Control*, 16(3), 279–283. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.03.007>
- Zhao, J. & Cranston, P.M. (1995). Microbial decontamination of black pepper by ozone and the effect of the treatment on volatile oil constituents of the spice. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 68, 11–18. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740680103>
- Zuluaga, C., A. Durán, C. Díaz, and M. Quicazán. (2012). Estrategias para la implementación de Buenas Prácticas en la cadena productiva de polen apícola en Colombia. ISBN 978–958–761–308–7. Encuentro Nacional de Investigación y Desarrollo - ENID. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Zuluaga, C. M. (2015a). *Valorización del polen apícola como alimento mediante el desarrollo de un proceso físico o biotecnológico*. [Tesis de

doctorado, Universidad Nacional de Colombia]. Repositorio Institucional- Universidad Nacional de Colombia.

Zuluaga, C. M., Serrato, J. C. & Quicazan, M. C. (2015b). Bee-pollen structure modification by physical and biotechnological processing: Influence on the availability of nutrients and bioactive compounds. *Journal of the Italian Chemical Engineering Transactions*, 43, 79–84. <https://doi.org/10.3303/CET1543014>

Zuluaga, C. M., Serrato-Bermúdez, J. & Quicazán, M. (2018). Influence of drying-related operations on microbiological, structural and physicochemical aspects for processing of bee-pollen. *Engineering in Agriculture, Environment and Food*, 11(2), 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.eaef.2018.01.00>

CAPÍTULO 10. ANEXOS

Anexo A

Protocolo de Producción y Manipulación del Polen Apícola desde su obtención hasta el traslado al laboratorio.

- En cada una de las recogidas de muestra, el equipo en contacto con el polen (herramientas de colmena y cepillo) debe desinfectarse previamente aplicándole una solución de agua con hipoclorito sódico (1/10).
- Diariamente se utilizan guantes desinfectados y ropa de apicultor limpia.
- Se utilizan bolsas estériles de material plástico para el transporte de los cajones con polen de muestra.
- Toda la ropa utilizada se limpia después de cada sesión de recogida de polen.
- Los guantes de goma siempre se desinfectan previamente a la manipulación de los cajones.
- El vehículo de transporte desde el apiario al colmenar se mantiene siempre limpio y desodorizado.

Anexo B

Formulario entregado para el análisis y evaluación sensorial del polen apícola

Nombre:	Fecha:
Código de la muestra	
<hr/>	
EVALUACION VISUAL (APARIENCIA)	
Color: <input type="checkbox"/> blanco <input type="checkbox"/> amarillo <input type="checkbox"/> rojizo <input type="checkbox"/> violeta <input type="checkbox"/> anaranjado <input type="checkbox"/> parduzco.	
Defectos visuales: <input type="checkbox"/> muy limpio <input type="checkbox"/> limpio <input type="checkbox"/> sucio <input type="checkbox"/> insectos.	
Otros:	
EVALUACION DEL OLOR	
Intensidad global: <input type="checkbox"/> agradable y persistente <input type="checkbox"/> agradable y poco persistente <input type="checkbox"/> olor desagradable o rancio.	
Descripción:	
Aromático Floral: <input type="checkbox"/> muy suave <input type="checkbox"/> suave <input type="checkbox"/> medio <input type="checkbox"/> fuerte <input type="checkbox"/> muy fuerte	
Campo: vegetales, hierba, madera.....: <input type="checkbox"/> Muy suave <input type="checkbox"/> suave <input type="checkbox"/> medio <input type="checkbox"/> fuerte <input type="checkbox"/> muy fuerte	
Tostado: <input type="checkbox"/> muy suave <input type="checkbox"/> suave <input type="checkbox"/> medio <input type="checkbox"/> fuerte <input type="checkbox"/> muy fuerte	
Animal: sudor, establo/cuadra, cuero: <input type="checkbox"/> muy suave <input type="checkbox"/> suave <input type="checkbox"/> medio <input type="checkbox"/> fuerte <input type="checkbox"/> muy fuerte	
Humedad: <input type="checkbox"/> muy suave <input type="checkbox"/> suave <input type="checkbox"/> medio <input type="checkbox"/> fuerte <input type="checkbox"/> muy fuerte	
Otros:	

EVALUACIÓN DE LA TEXTURA

- Táctil:** □ Apretando ligeramente el polen entre el dedo índice y el pulgar, la forma de los granos no cambia.
- Apretando de la misma forma, la forma de los granos cambia.
- Apretando los granos cambia de forma pero no se pega con los otros.
- Apretando los granos cambia de forma y se unen con la masa.
- En boca:** □ Al morderlo cede sin fragmentarse.
- Al morderlo se fragmenta sin ceder.

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO ACUOSO

- **Muy seco:** no modifican su forma y muestran una textura crujiente
- **Seco:** no se modifican, pero presentan una textura más maleable
- **Húmedo:** cambia su forma inicial, pero no se agrupan.
- **Muy húmedo:** cambian su forma y se agrupan formando masas polínicas.

EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE POLVO POLÍNICO

Se evalúa según aparezca el dedo índice cubierto de polvo o completamente limpio, después de introducirlo en el interior del envase y rotarlo varias veces.

- No:** cuando el dedo aparece limpio
- Poco:** al cubrirse unas zonas y aparecer limpias otras
- Sí:** al cubrirse el dedo uniformemente del polvo polínico

EVALUACIÓN DE LAS SENSACIONES OLFATO-GUSTATIVAS

EVALUACIÓN DE LOS SABORES BÁSICOS

Sabor Dulce: muy suave suave medio fuerte muy fuerte

Sabor Ácido: muy suave suave medio fuerte muy fuerte

Sabor Amargo: muy suave suave medio fuerte muy fuerte

Sabor Salado: muy suave suave medio fuerte muy fuerte

EVALUACION DEL AROMA

Intensidad global: muy suave suave medio
fuerte muy fuerte

Descripción:

Aromático Floral: muy suave suave medio
fuerte muy fuerte

Campo: vegetales, hierba, madera....: Muy suave
suave medio fuerte muy fuerte

Tostado: muy suave suave medio fuerte muy
fuerte

Animal: sudor, establo/cuadra, cuero: muy suave
suave medio fuerte muy fuerte

Humedad: muy suave suave medio fuerte
muy fuerte

EVALUACION DE LAS SENSACIONES TRIGEMINALES

Astringencia Picor Frescor otras

PERSISTENCIA: muy corto corto medio largo
 muy largo

RETROGUSTO: muy suave suave medio fuerte
 muy fuerte

Anexo C

Tabla-resumen de datos climatológicos correspondientes al periodo de las seis semanas en las que se realizó el primer ensayo. 6 de abril al 17 de mayo del 2015. *Nota:* T=Temperatura media del día en °C. TM=Temperatura máxima del día en °C. Tm=Temperatura mínima del día en °C. H= Humedad relativa en %. PP= Nivel de precipitación en mm. Cada semana corresponde de lunes a domingo.

	Primera semana. Del 6 al 12 de abril							Segunda semana. Del 13 al 19 de abril							Tercera semana. Del 20 al 26 de abril						
	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
T	15,8	15,7	13,3	15,1	17,3	13,7	16,5	17,9	21,9	16,2	16,6	18,4	17,8	16,3	17,8	18,7	18,4	18,8	17,1	16,3	16,6
TM	17,2	23,4	18,2	21,4	24,8	18,1	25,9	26	29,4	23,8	23,6	25,9	24,7	25,1	28,3	27,6	26	29,8	24,3	19,9	21,4
Tm	15	10	9,5	10	12	10	8,4	9	14	13	12,4	13,7	12	7,7	7,9	11	10	8	10	11,5	12,4
H	85	66	66	78	61	88	69	58	40	81	81	70	61	57	52	54	61	53	62	82	84
PP	0	0,7	0	1,27	0,5	0	10,4	0	0	4,6	15,24	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0,2

Anexo C. Continuación

	Cuarta semana. Del 27 de abril al 3 de mayo							Quinta semana. Del 4 abril al 10 de mayo							Sexta semana. Del 11 al 17 de mayo						
	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
T	15,4	17,6	18,5	19,8	21,3	23,5	21,7	21,1	19,9	19,5	21,6	20,2	22,8	24,6	24,9	25,4	27,7	27,4	24	24,3	23,8
TM	22	25,9	27	28,9	31,2	34,9	32,4	30,4	26,7	29,5	33,6	28,7	33,7	35,9	37	38,1	41,2	39,8	33,2	33,6	34,2
Tm	10,8	11,3	10	9,8	11	12,9	13	15	15	8	8	13,4	11,1	13,2	12	12,3	14,9	14,4	12,7	16,7	12
H	78	64	53	54	53	46	52	56	57	44	38	58	39	34	33	36	27	26	28	27	35
PP	8,13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo D

Tabla-resumen de datos climatológicos correspondientes al periodo de las seis semanas en las que se realizó el segundo ensayo. 18 de abril al 29 de mayo del 2016. *Nota:* T=Temperatura media del día en °C. TM=Temperatura máxima del día en °C. Tm=Temperatura mínima del día en °C. H= Humedad relativa en %. PP= Nivel de precipitación en mm. Semana de lunes a domingo.

	Primera semana. Del 18 al 24 de abril							Segunda semana. Del 25 abril al 1 de mayo							Tercera semana. Del 2 al 8 de mayo						
	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8
T	18,1	15,2	14,1	15,7	17,8	17,4	18,3	18,8	18,7	18,7	18,8	18,1	20,6	18,2	18,1	19,6	19,4	18,4	16,2	16,2	15,3
TM	28,5	17,3	20,6	23,1	24,4	24,2	27,5	27,8	27,9	26,1	26,7	24,3	28	25,7	28,4	32,9	28,8	22,5	19,6	20,4	21,2
Tm	9,3	14	10	9	13	13,1	10	10,7	9	12	11,3	11	13	10,9	8,9	6,3	9,5	15	13,8	14	12
H	65	92	88	69	68	76	58	49	60	62	64	68	55	35	30	33	37	59	89	80	87
PP	0	0	23,8	9,14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3,81	0	2,79

Anexo D. Continuación

	Cuarta semana. Del 9 al 15 de mayo							Quinta semana. Del 16 al 22 de mayo							Sexta semana. Del 23 al 29 de mayo						
	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
T	14,2	13,6	13,4	14,3	14,7	16,2	18,1	20,6	21,5	22,2	22,3	24,1	23,4	21,8	22	22,3	21,5	20,3	20,6	18,2	18,9
TM	18	18,3	18,8	19,5	20,7	23,1	27,2	30,3	31,1	30,6	31,3	33,7	33,1	28,5	32,2	29,8	28	27,8	28,2	22,9	26
Tm	11,3	10,7	8	12	11	9,7	11,9	10,5	12,9	13,2	12,7	12,9	13,9	16,4	10,5	15,2	16	14,3	13	14,2	12
H	88	89	86	87	82	74	71	54	51	50	52	45	47	53	41	55	51	56	52	72	6
PP	30,9	13,9	10,67	11,2	12,2	4,8	0	0	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5

Anexo E

Tabla-resumen de los datos climatológicos correspondientes a las tres semanas en las que se realizaron las tres repeticiones en mayo 2017. Tercer ensayo. *Nota:* T=Temperatura media en °C. TM= Temperatura máxima en °C. Tm= Temperatura mínima en °C. H= Humedad relativa en %. PP= Precipitación en mm. Semana de lunes a domingo.

	Primera repetición. Del 1 al 7 de mayo							Segunda repetición. Del 8 al 14 de mayo							Tercera repetición. Del 15 al 21 de mayo						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
T	15,4	17,4	19,6	19,9	18,4	17,7	20,7	20,9	19,5	17,4	17,3	17,1	18,6	19,5	22,2	23,2	21,8	21,3	19,8	21,1	22,1
TM	23,7	27,7	30,2	31	23,7	25,6	31,5	32,2	27,2	21,2	21,5	22	24,1	28,2	32,1	33,2	31,5	27,2	29,5	34,1	28,7
Tm	6,9	8	9,9	10,8	13,7	11	11,7	10,8	11,9	15	14,7	13,9	14	11,8	13,6	16,6	13,7	15	8,8	9	15
H	58	58	52	57	69	65	47	49	60	87	78	83	72	64	52	45	51	43	41	45	43
PP	2,79	0	0	0	0	0,25	0	0	0	0,25	20,3	5,84	12,2	0	0	0	0	0	0	0	0

Anexo F

Tabla explicativa de la determinación del peso y de la a_w en el polen fresco y de los recuentos obtenidos en el primer ensayo (abril-mayo 2015) para enterobacterias, aerobios-mesófilos y mohos y levaduras.

	Semana 1		Semana 2		Semana 3		Semana 4		Semana 5		Semana 6	
	N	Media± Desviación estándar	N	Media± Desviación estándar	N	Media± Desviación estándar	N	Media± Desviación estándar	N	Media± Desviación estándar	N	Media± Desviación estándar
Peso	12	2,4x10 ^{±3} ,3x10	15	1,5x10 ² ±7,5x10 ²	12	2,3x10 ² ±1,2x10 ²	15	1,2x10 ² ±1,0x10 ²	15	8,1x10 ^{±6} ,6x10	12	4,2x10 ^{±2} ,8x10
a_w	10	0,7±0,0	15	0,8 ^b ±0,0	12	0,7±0,1	15	0,6±0,0	15	0,6±0,0	12	0,4±0,1
Enterobacterias	5	3,1x10 ⁵ ±4,4x10 ⁵	15	2,4x10 ⁵ ±1,9x10 ⁵	12	1,3x10 ⁵ ±1,7x10 ⁵	15	6,8x10 ⁴ ±3,3x10 ⁴	15	4,0x10 ⁴ ±5,9x10 ⁴	12	1,2x10 ⁴ ±1,9x10 ⁴
Aerobios mesófilos	5	2,0x10 ⁶ ±2,1x10 ⁶	15	1,1x10 ⁶ ±1,5x10 ⁶	12	1,7x10 ⁵ ±2,0x10 ⁵	15	5,6x10 ⁵ ±9,4x10 ⁵	15	1,5x10 ⁵ ±2,0x10 ⁵	12	4,2x10 ⁴ ±5,8x10 ⁴
Mohos y levaduras	5	3,0x10 ⁷ ±3,7x10 ⁷	15	2,3x10 ⁷ ±2,8x10 ⁷	12	8,3x10 ⁶ ±1,3x10 ⁷	15	2,2x10 ⁶ ±2,6x10 ⁶	15	2,8x10 ⁶ ±3,7x10 ⁶	12	2,4x10 ⁵ ±3,0x10 ⁵

Anexo G

Tabla explicativa de la determinación del peso de la producción y la a_w en el polen fresco además de los recuentos obtenidos en el segundo ensayo (abril-mayo 2016) para enterobacterias, aerobios-mesófilos y mohos y levaduras.

		Semana 2		Semana 3		Semana 5		Semana 6	
		N	Media± Desviación estándar	N	Media± Desviación estándar	N	Media± Desviación estándar	N	Media± Desviación estándar
Peso	No esterilizado	4	$9,7 \times 10^2 \pm 1,2 \times 10^2$	5	$60,3 \pm 59,52$		$167,1 \pm 182,55$	3	$146,27 \pm 143,24$
	Esterilizado	4	$1,0 \times 10^2 \pm 1,0 \times 10^2$	4	$81,1 \pm 92,29$		$152,5 \pm 129,78$	4	$131,18 \pm 124,23$
	Total	8	$1,0 \times 10^2 \pm 1,1 \times 10^2$	9	$69,5 \pm 71,31$		$156,9 \pm 147,03$	7	$137,58 \pm 120,92$
a_w	No esterilizado	4	$0,70 \pm 0,01$	5	$0,72 \pm 0,01$		$0,63 \pm 0,02$	3	$0,45 \pm 0,34$
	Esterilizado	4	$0,68 \pm 0,02$	4	$0,52 \pm 0,03$		$0,66 \pm 0,06$	4	$0,63 \pm 0,01$
	Total	8	$0,69 \pm 0,02$	9	$0,63 \pm 0,11$		$0,65 \pm 0,04$	7	$0,55 \pm 0,22$
Enterobacterias	No esterilizado	3	$1,7 \times 10^7 \pm 2,4 \times 10^7$	3	$2,9 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^5$		$2,6 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$	3	$3,2 \times 10^4 \pm 6,8 \times 10^3$
	Esterilizado	4	$3,4 \times 10^5 \pm 9,0 \times 10^4$	2	$2,4 \times 10^6 \pm 7,1 \times 10^4$		$2,4 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$	3	$6,3 \times 10^4 \pm 9,2 \times 10^4$
	Total	7	$7,3 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^7$	5	$1,2 \times 10^6 \pm 1,2 \times 10^6$		$2,5 \times 10^5 \pm 1,2 \times 10^5$	6	$4,8 \times 10^4 \pm 6,1 \times 10^4$
Aerobios mesófilos	No Esterilizado	3	$9,2 \times 10^6 \pm 1,5 \times 10^7$	3	$2,6 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$		$1,8 \times 10^7 \pm 2,5 \times 10^7$	3	$3,0 \times 10^5 \pm 2,2 \times 10^5$
	Esterilizado	4	$2,6 \times 10^6 \pm 5,0 \times 10^6$	3	$3,0 \times 10^5 \pm 2,4 \times 10^5$		$1,9 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^7$	3	$2,8 \times 10^4 \pm 1,5 \times 10^4$
	Total	7	$5,4 \times 10^6 \pm 1,0 \times 10^7$	6	$2,8 \times 10^5 \pm 1,8 \times 10^5$		$1,8 \times 10^7 \pm 2,0 \times 10^7$	6	$1,6 \times 10^5 \pm 2,0 \times 10^5$
Mohos y levaduras	No Esterilizado	3	$1,1 \times 10^8 \pm 1,7 \times 10^8$	3	$9,4 \times 10^8 \pm 1,3 \times 10^9$		$3,7 \times 10^7 \pm 2,9 \times 10^7$	3	$6,0 \times 10^6 \pm 3,5 \times 10^6$
	Esterilizado	4	$2,4 \times 10^7 \pm 2,4 \times 10^7$	3	$4,3 \times 10^8 \pm 2,8 \times 10^8$		$3,4 \times 10^7 \pm 3,8 \times 10^7$	3	$2,1 \times 10^6 \pm 2,6 \times 10^6$
	Total	7	$5,9 \times 10^7 \pm 1,1 \times 10^8$	6	$6,8 \times 10^8 \pm 8,7 \times 10^8$		$3,6 \times 10^7 \pm 2,8 \times 10^7$	6	$4,0 \times 10^6 \pm 3,5 \times 10^6$

Panelistas	Evaluación del olor							Evaluación de la textura	Evaluación del contenido acuoso				Evaluación del contenido de polvo polínico			Evaluación de sensaciones olfato gustativas				Evaluación del aroma						Evaluación sensaciones trigeminales						
	Intensidad del olor	Olор aromático floral	Olор campo	Olор tostado	Olор animal	Olор humedad	Otros olores		Táctil	Muy seco	Seco	Húmedo	Muy húmedo	No	Poco	Sí	Sabor dulce	Sabor ácido	Sabor amargo	Sabor salado	Intensidad del aroma	Aroma aromático floral	Aroma campo	Aroma tostado	Aroma animal	Aroma humedad	Otros aromas	Astringencia	Pícor	Frescor	Otras	Persistencia
1	5	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma y se unen con la masa	0	0	x	0	0	0	x	3,5	1	3	1	3	3	3	0	0	2,5	0	0	0	0	0	2,5	0
2	4,5	0	4,5	0	0	0	0	granos cambian forma y se unen con la masa	0	0	x	0	0	0	x	3,5	1,5	3	1	3	2,5	3	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0
3	5	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma y se unen con la masa	0	0	x	0	0	0	x	3	1	3	1	2,5	3	2,5	0	0	3,5	0	0	0	0	0	3	0
4	5	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma y se unen con la masa	0	0	x	0	0	0	x	3	1	2,5	1	3,5	2,5	3,5	0	0	3,5	0	0	0	0	0	3,5	0
5	4,5	0	4,5	0	0	0	0	granos cambian forma y se unen con la masa	0	0	x	0	0	0	x	3	1	3,5	1	3	3	3	0	0	2,5	0	0	0	0	0	3	0
6	4	0	4	0	0	0	0	granos cambian forma y se unen con la masa	0	0	x	0	0	0	x	2,5	1,5	3	1,5	2,5	3,5	2,5	0	0	3	0	0	0	0	0	2,5	0
7	5	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma y se unen con la masa	0	0	x	0	0	0	x	2,5	1	3	1,5	3,5	3	3,5	0	0	3	0	0	0	0	0	3,5	0
8	5	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma y se unen con la masa	0	0	x	0	0	0	x	3	1	3	1	3	3,5	3	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0
Media	4,7	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma y se unen con la masa	0	0	x	0	0	0	x	3	1	3	1	3	3	3	0	0	3	0	0	0	0	0	3	0
Max	5	0	5	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		3,5	1,5	3,5	1,5	3,5	3,5	3,5	0	0	3,5	0	0	0	0	0	3,5	0
Min	4	0	4,5	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		2,5	1	3	1	2,5	2,5	2,5	0	0	2,5	0	0	0	0	2,5	0	
SD	0,4	0	0,4	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0		0,38	0,2	0,267	0,2	0,378	0,378	0,4	0	0	0,4	0	0	0	0	0,4	0	

Anexo H. Evaluación sensorial del polen apícola fresco

Panelistas	Evaluación del olor							Evaluación de la textura Táctil	Evaluación del contenido acuoso				Evaluación del contenido			Evaluación de sensaciones olfato gustativas				Evaluación del aroma						Evaluación sensaciones trigeminales						
	Intensidad del olor	Olor aromático floral	Olor campo	Olor tostado	Olor animal	Olor humedad	Otros olores		Muy seco	Seco	Húmedo	Muy húmedo	No	Poco	Sí	Sabor dulce	Sabor ácido	Sabor amargo	Sabor salado	Intensidad del aroma	Aroma aromático floral	Aroma campo	Aroma tostado	Aroma animal	Aroma humedad	Otros aromas	Astringencia	Pícor	Frescor	Otras	Persistencia	Retrogusto
1	5	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3,5	0	0	1	3	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0
2	4	0	4,5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3,5	0	0	1,5	3	0	3	1,5	0	0	0	0	0	0	0	2	0
3	5	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3	0	0	1	3	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0
4	5	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3	0	0	1	2,5	0	2,5	1	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0
5	4	0	4,5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3	0	0	1	2,5	0	2,5	1	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0
6	4	0	4	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	2,5	0	0	1,5	3,5	0	3,5	1,5	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0
7	4,5	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	2,5	0	0	1	3,5	0	3,5	1	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0
8	5	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3	0	0	1	3	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Media	5	0	5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3	0	0	1	3	0	3	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0
Max	5	0	5	0	0	0	0		0	0		0	0	0	3,5	0	0	1,5	3,5	0	3,5	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0
Min	4	0	4,5	0	0	0	0		0	0		0	0	2,5	0	0	1	2,5	2,5	0	2,5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0
SD	0,496	0	0,4	0	0	0	0		0	0		0	0	0,4	0	0	0,2	0,38	0	0,4	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0	

Anexo H. Evaluación sensorial del polen apícola tratado a 15 minutos de desecación.

Panelistas	Evaluación del olor							Evaluación de la textura	Evaluación del contenido acuoso				Evaluación del contenido de polvo polínico			Evaluación de sensaciones olfato gustativas				Evaluación del aroma							Evaluación sensaciones trigeminales							
	Intensidad del olor	Olor aromático floral	Olor campo	Olor tostado	Olor animal	Olor humedad	Otros olores		Táctil	Muy seco	Seco	Húmedo	Muy húmedo	No	Poco	Sí	Sabor dulce	Sabor ácido	Sabor amargo	Sabor salado	Intensidad del aroma	Aroma aromático floral	Aroma campo	Aroma tostado	Aroma animal	Aroma humedad	Otros aromas	Astringencia	Picor	Frescor	Otras	Persistencia	Retrogusto	
1	3,5	0	3,5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3,5	0	0	1	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
2	3,5	0	3,5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3,5	0	0	1,5	2	0	2	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	
3	3	0	3	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3	0	0	1	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
4	3	0	3	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3	0	0	1	1,5	0	2,5	1	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0		
5	3	0	3	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3	0	0	1	1,5	0	2	1	0	0	0	0	0	0	1,5	0			
6	2,5	0	2,5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	2,5	0	0	1,5	2,5	0	2	1,5	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0		
7	2,5	0	2,5	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	2,5	0	0	1	2,5	0	1,5	1	0	0	0	0	0	0	1,5	0			
8	3	0	3	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3	0	0	1	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	2	0			
Media	3	0	3	0	0	0	0	granos cambian forma pero no se unen con la masa	0	0	x	0	x	0	0	3	0	0	1	2	0	2	1	0	0	0	0	0	0	2	0			
Max	3,5	0	3,5	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	3,5	0	0	1,5	2,5	0	2,5	1,5	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0			
Min	2,5	0	2,5	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	2,5	0	0	1	1,5	0	1,5	1	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0			
SD	0,378	0	0,4	0	0	0	0		0	0	0	0	0	0	0,4	0	0	0,23	0,378	0	0,3	0,2	0	0	0	0	0	0	0,4	0				

Anexo H. Evaluación sensorial del polen apícola tratado a 30 minutos de desecación.

Panelistas	Evaluación del olor							Evaluación de la textura Táctil	Evaluación del contenido acuoso				Evaluación del contenido de polvo polínico			Evaluación de sensaciones olfato gustativas				Evaluación del aroma						Evaluación sensaciones trigeminales								
	Intensidad del olor	Olor aromático floral	Olor campo	Olor tostado	Olor animal	Olor humedad	Otros olores		Muy seco	Seco	Húmedo	Muy húmedo	No	Poco	Sí	Sabor dulce	Sabor ácido	Sabor amargo	Sabor salado	Intensidad del aroma	Aroma aromático floral	Aroma campo	Aroma tostado	Aroma animal	Aroma humedad	Otros aromas	Astringencia	Picor	Frescor	Otras	Persistencia	Retrogusto		
1	3,5	0	3,5	0	0	0	0	granos cambian forma al presionar con los dedos	0	x	0	0	x	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
2	3,5	0	3,5	0	0	0	0	granos cambian forma al presionar con los dedos	0	x	0	0	x	0	0	0	0	0	1,5	1,5	0	1,5	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
3	3	0	3	0	0	0	0	granos cambian forma al presionar con los dedos	0	x	0	0	x	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	
4	3	0	3	0	0	0	0	granos cambian forma al presionar con los dedos	0	x	0	0	x	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	
5	3	0	3	0	0	0	0	granos cambian forma al presionar con los dedos	0	x	0	0	x	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	
6	2,5	0	2,5	0	0	0	0	granos cambian forma al presionar con los dedos	0	x	0	0	x	0	0	0	0	0	1,5	1,5	0	1,5	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0	
7	2,5	0	2,5	0	0	0	0	granos cambian forma al presionar con los dedos	0	x	0	0	x	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0	
8	3	0	3	0	0	0	0	granos cambian forma al presionar con los dedos	0	x	0	0	x	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	
Media	3	0	3	0	0	0	0	granos cambian forma al presionar con los dedos	0	x	0	0	x	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	2	0		
Max	3,5	0	3,5	0	0	0	0		0		0	0		0	0	0	0	1,5	1,5	0	1,5	1,5	0	0	0	0	0	0	0	0	2,5	0		
Min	2,5	0	2,5	0	0	0	0		0		0	0		0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1,5	0		
SD	0,378	0	0,4	0	0	0	0		0		0	0		0	0	0	0	0,2	0,231	0	0,2	0,2	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4	0		

Anexo H. Evaluación sensorial del polen apícola tratado a 45 minutos de desecación



UNIVERSIDAD ESTATAL DE BOLÍVAR DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN

**DRA. MIRTHA MANZANO DIAZ, PhD. DIRECTORA
DEPARTAMENTO DE INVESTIGACIÓN DE LA UNIVERSIDAD
ESTATAL DE BOLÍVAR.**

CERTIFICO

Que el Doctorando JUAN RAMÓN CABELLO CÍVICO, participó en el COMITÉ ORGANIZADOR y COMITÉ CIENTÍFICO nombrado por el Departamento de Investigación, en la organización del **III CONGRESO INTERNACIONAL DE CIENCIA, TECNOLOGÍA, INNOVACIÓN Y EMPRENDIMIENTO** que se desarrollo los días 11,12 y 13 de noviembre del presente año.

Es todo cuanto puedo certificar en honor a la verdad, facultando al interesado hacer uso de la presente certificación en la forma que estime conveniente.

Guaranda, 23 de noviembre del 2015

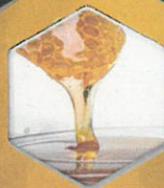

DRA. MIRTHA MANZANO DIAZ
DIRECTORA



VIII
Congreso
Nacional de
Apicultura



3, 4 y 5 de
Noviembre
2016



Palacio de
Exposiciones
y Congresos

GRANADA

CERTIFICADO DE COMUNICACIÓN

El Comité Científico certifica que la comunicación con el título

186/71 - Descontaminación microbiana del polen apícola por exposición directa al ozono

del/de los autor/es

(1) Salud Serrano Jiménez, (2) Juan Ramón Cabello Cívico, (3) M^a Inmaculada Rodríguez Delgado, (4) Jose Manuel Flores Serrano

ha sido presentada en el
VIII Congreso Nacional de Apicultura,
celebrado en el Palacio de Exposiciones y Congresos de Granada,
del 3 al 5 de noviembre de 2016.

En Granada, a 5 de noviembre de 2016

D. José Luis Quiles Morales
Coordinador del Comité Científico



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA



La Vicerrectora de Estudios de Postgrado y Formación Continua de la Universidad de Córdoba

ACREDITA que:

CABELLO CÍVICO, JUAN RAMÓN

ha presentado en la modalidad de **COMUNICACIÓN ORAL** el trabajo que lleva por título :

DESCONTAMINACIÓN MICROBIANA DEL POLEN APÍCOLA POR EXPOSICIÓN DIRECTA AL OZONO

en el **V Congreso Científico de Investigadores en Formación de la Universidad de Córdoba**, organizado por la Escuela de Doctorado de la Universidad de Córdoba, celebrado en Córdoba los días 30 de Noviembre y 1 de Diciembre de 2016.

Y para que así conste, se expide y firma este certificado en

Córdoba, a 1 de diciembre de 2016



Fdo: JULIETA MÉRIDA GARCÍA

**Vicerrectora de Estudios de Postgrado y Formación Continua
de la Universidad de Córdoba**

Article

Microbial Decontamination of Bee Pollen by Direct Ozone Exposure

Juan Ramón Cabello ¹, Salud Serrano ^{1,*}, Inmaculada Rodríguez ¹, Ana Isabel García-Valcárcel ²,
María Dolores Hernando ² and José Manuel Flores ³

¹ Department of Food Science and Technology, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; juanramon.cabellocivico@gmail.com (J.R.C.); v62rodem@uco.es (I.R.)

² National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA), 28040 Madrid, Spain; aigarcia@inia.es (A.I.G.-V.); hernando.dolores@inia.es (M.D.H.)

³ Department of Zoology, University of Córdoba, 14071 Córdoba, Spain; ba1flsej@uco.es

* Correspondence: sserrano@uco.es; Tel.: +34-957-212-654

Abstract: The bee pollen is a complete and healthy food with important nutritional properties. Usually, bee pollen is consumed dehydrated, but it is possible to market it as fresh frozen pollen, favoring the maintenance of its properties and greatly increasing its palatability, compared to dried pollen. However, fresh frozen pollen maintains a high microbiological load that can include some pathogenic genus to human health. In this work, ozonation combined with drying is applied to reduce the microbiological load. The lowest timing exposure to ozone (30 min) was chosen together with hot-air drying during 15 min to evaluate the shelf-life of treated bee-pollen under cold storage (4 °C), and initial reductions of 3, 1.5, and 1.7 log cycles were obtained for *Enterobacteriaceae*, mesophilic aerobes, and molds and yeasts counting, respectively. Six weeks after treatment the microbial load was held at a lower level than initially observed in fresh bee-pollen. In addition, ozone treatment did not have a negative impact on the polyphenols evaluated. Likewise, the sensory profile of the bee pollen under different treatments was studied. For all these assays the results have been favorable, so we can say that ozonation of fresh pollen is safe for human consumption, which maintains its polyphenols composition and organoleptically is better valued than dried pollen.

Keywords: bee pollen; ozone; microbial decontamination; polyphenols; sensory analysis



Citation: Cabello, J.R.; Serrano, S.; Rodríguez, I.; García-Valcárcel, A.I.; Hernando, M.D.; Flores, J.M. Microbial Decontamination of Bee Pollen by Direct Ozone Exposure. *Foods* **2021**, *10*, 2593. <https://doi.org/10.3390/foods10112593>

Academic Editor: María Carmen Seijo

Received: 28 September 2021

Accepted: 25 October 2021

Published: 27 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The honey bee (*Apis mellifera* L.) is a social insect that belongs to order Hymenoptera. In every honey bee colony, there are three castes: queen, workers, and drones. Honey bees' colonies are permanent, survive the winter and, in favorable environment, they are reported to live up to several years. While floral nectar and other plant secretions provide the colony with the main source of sugars, pollen supplies proteins, fats, and other nutrients. As permanent colonies, honey bees need to stock up on food to cope with adverse conditions. Because of this, they collect plenty of nectar and pollen, which later on are stored in empty comb cells, as honey and beebread, respectively.

Indeed, that is the basis of honey and pollen production in beekeeping. Honey bees work hard and often produce more honey than they need, which allows beekeepers to harvest the excess. The production of bee-pollen is carried out when beekeepers assemble pollen-traps at the entrance of the beehive to collect the pollen pellets that honey bees carry in the pollen basket of their hind legs (also known as corbicular pollen). When foraging, honey bees become covered with pollen. To groom themselves, they use stiff structures on their legs and brush the pollen off their bodies. The pollen grains are mixed with some regurgitated nectar and bee salivary secretions before packing all of them together into small pellets to be transported on their rear legs. By returning, bees enter the hive through

that ozone is effective in removing bad odors and allergens from the air [22]. This makes ozone a possible candidate for microbial control in bee-pollen including mycotoxins [23,24]. However, there is little research devoted to its use on its product. Yook et al. (1998) [8] observed lower microbial load reduction in bee-pollen due to ozone exposure when compared to gamma-radiation, considering ozone unsatisfactory. These research were carried out under extremely specific and restricted conditions and hence, insufficient to discard ozone treatment in bee-pollen. Consequently, the main aim of this work is the evaluation of the methods for microbial decontamination of bee-pollen based on ozone exposure.

Not just reducing the microbial load of fresh or frozen bee-pollen is required for safe consumption, but also keeping it the lowest for the maximum period is essential. Microbial load is a limiting factor to set the shelf-life of this product. Cold chain maintenance is crucial to avoiding the microbial growth in non-dried bee-pollen. Although usually the fresh bee-pollen is kept in a frozen state, in this study monitoring of the microbial load exposed to ozone and keeping at refrigeration temperatures are carried out.

Moreover, ozone acts as a potential oxidizing agent. Yook et al. (1998) [8] noted certain effect of ozone on fatty acid composition such as a remarkable decrease of unsaturated fatty acid, and visual changes in pigments. Bearing in mind that polyphenols are biologically active bee-pollen components, and they are of a great biological interest because of their antioxidant activity [25], the effect of ozone treatment on them was also studied in our current work.

Finally, drying process of bee-pollen modifies its sensory characteristics making it more stringy and less palatable. These changes were another reason to carry out the present study. Together with the reduction of microbial load in this product to make it safe for human consumption, an evaluation of its sensory attributes was carried out comparing dried bee-pollen to fresh bee-pollen exposed to ozone and frozen afterwards.

2. Materials and Methods

2.1. Sampling of Bee Pollen

During spring 2016, samples of bee-pollen were gathered from an experimental apiary of the University of Córdoba (Córdoba, Spain) (37°55'33.5'' N, 4°43'26.1'' W). The bee colonies (*Apis mellifera iberiensis*) were housed in Langstroth hives placed on platforms raised 50 cm above ground level and were fitted with pollen-traps. Samples were collected every two days and kept frozen (−20 °C) up to their analysis.

2.2. Microbiological Quality

Ten grams of each bee-pollen sample were homogenized into 90 mL of peptone water solvent and decimal dilutions were prepared using the same solvent. For microbiological determination the methodology proposed by Estevinho et al. (2012) [26] was followed. Aerobic mesophilic bacteria were counted onto standard plate count agar (PCA) and incubated at 30 °C for 72 h. For molds and yeasts counts potato dextrose agar (PDA) was used and incubated at 25 °C for 5 days. *Staphylococcus aureus* was determined using Baird Parker agar and incubated at 37 °C for 48 h. Total *Enterobacteriaceae* was counted onto violet, red bile glucose agar (VRBG) incubated at 37 °C for 24 h. Finally, total coliforms were determined on brilliant green bile lactose incubated at 31 °C for 24 and 48 h. Determinations for all microbiological analysis were carried out in duplicate.

2.3. Bee-Pollen Treatments

In this study five different issues were raised: (i) Hot-air dried bee-pollen treatment, (ii) bee-pollen exposed to ozone treatment, (iii) evaluation of the shelf-life of bee-pollen exposed to ozone, (iv) study of changes on polyphenols present in bee-pollen exposed to ozone, (v) sensory evaluation of processed bee-pollen. For each of these trials, 10 g of sample were needed.

2.3.1. Hot-Air Dried Bee-Pollen Treatment

For this trial a bee-pollen dryer was used (Mauro Valla dryer, Borgo Val di Taro, Italy). First, four groups were set up. Each group consisted of six samples of 10 g. Bee-pollen samples from three of the groups were dried at a temperature of 42 °C during 15, 30 and 45 min, respectively. The fourth group was kept as control and was not treated. Microbiological count was carried out before and after the drying process, as indicated above.

2.3.2. Bee-Pollen Exposed to Ozone Treatment

For this assay an ozone generator, with ozone output of 200 mg/h, was used (Ozonoplus-10. Vida-10. China). The evaluations were performed on three groups consisting of 20 samples each (10 g/sample). Two groups were exposed to an ozone density of 200 mg/h for 30 and 60 min, respectively, within a polyethylene container. These timings of treatment were selected according to available literacy and previous non published assays. The third group was taken as control and was not exposed. The microbial counting was carried out before and after ozone exposition as described above.

2.4. Evaluation of the Shelf-Life of Bee-Pollen Exposed to Ozone

In this trial 18 samples of 10 g of bee-pollen were treated with ozone for 30 min as described above and kept in a refrigerator at 4 °C. These samples were put under microbiological analyses consisting of six evaluations: Fresh bee-pollen, just treated bee-pollen, and 1, 2, 3, and 6 weeks after exposition. Microbial counting was executed as described above.

2.5. Evaluation of Polyphenols Present in Bee-Pollen

Ten samples of bee-pollen were used in this trial. From each sample three subsamples were obtained. First subsamples were dried for 30 min as described above. The second one was exposed to ozone for 30 min and the third group was set as control, was not exposed. All samples were frozen afterwards up to their analyses. In every group the presence and concentration of 11 polyphenols belonging to different structural groups was evaluated; three phenolic acids: gallic acid (hydroxybenzoic acid), caffeic acid, and p-coumaric acid (hydroxycinnamic acids) and seven aglycon flavonoids: two flavones (Luteolin and Chrysin), three flavanones (Quercetin, Rutin (quercetin 0–3-rutoid) and kaempferol), one flavonol (Naringenin), one isoflavone (Genistein), and one trihydroxystilbene (resveratrol) using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS/MS). The pollen samples were homogenized by grinding to a fine powder, using a common mortar. Next, 1 g of pollen was mixed with 10 mL of ethanolic solution (Ethanol: water in proportion of 80:20 *v/v*) in a polypropylene tube and sonicated in an ultrasonic water bath for 20 min at room temperature. Afterwards, centrifugation was carried out at 4000 rpm during 10 min and the supernatant was transferred to a 50 mL flask. This procedure was repeated two times more and the supernatants were combined and brought to 50 mL final volume with ethanol/water (80/20 *v/v*). To 0.8 mL of extract filtrated through a 22 µm nylon filter, 0.2 mL of a water solution with 0.1% of acid formic was added before quantitation in High Performance Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (HPLC-MS/MS), whose working conditions are described in Supplementary information.

The identity of compounds was assessed by comparing their ions transition in MS/MS, retention time, and ratio SRM1/SMR2 (Selected Reaction Monitoring) with that of standards. Quantitation was carried out by a standard addition method in the range of 20 to 800 ng/mL with good linearity ($r^2 > 0.995$) for each compound in each pollen sample. Recoveries ranged from 71.2 to 111.6% for all polyphenols at 30 and 500 ng/mL fortification levels and the quantification limits (LOQs) calculated on the basis of ten times the signal-to-noise ratios were lower than 0.8 µg/g.

2.6. Sensory Evaluation of Processed Bee-Pollen

Sensory analysis was conducted on untreated fresh bee-pollen; 30 min ozone exposed bee-pollen; 15, 30, and 45 min hot-air dried bee-pollen, following Serra Bonvehí and Gómez Pajuelo (1988) [27] and Baldi et al. (2004) [28] analysis. Visual, texture, olfactive and taste attributes were evaluated.

Panel of trained and experienced assessors described color, odor intensity and its descriptors, basic flavors, aftertaste, persistence, aroma intensity and its descriptors, tactile and mouth textures.

2.7. Data Analysis

Data were statistically processed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Statistics software for Windows, IBM Corp, 2016. Version 24.0. IBM Corp, Armonk, NY, USA. All the variables available were tested to check whether data violated the assumptions for regular parametric tests to report valid results. Parametric statistics were applied when possible. When data resulted non normally distributed, or there was no variance homogeneity (heteroscedasticity), non-parametric statistics were used. The tests are specified in the results.

3. Results

None of the variables of the study of trials 1, 2, and 3 were normally distributed (Shapiro–Wilk, $p < 0.05$) (Table 1). For this reason, non-parametric statistical analysis was applied.

Table 1. Shapiro–Wilk test for the study and distribution of the data, $p < 0.05$.

	Hot-Air Drying			Ozone			Combination		
	Statistic	df	Sig	Statistic	df	Sig	Statistic	df	Sig
<i>Enterobacteriaceae</i>	0.473	40	0.000	0.164	80	0.000	0.290	30	0.000
<i>Enterobacteriaceae</i> reduction percentage	0.616	40	0.000	0.691	80	0.000	0.642	30	0.000
Mesophilic aerobes	0.549	40	0.000	0.153	80	0.000	0.362	30	0.000
Mesophilic aerobes reduction percentage	0.873	40	0.000	0.761	80	0.000	0.898	30	0.008
Moulds & yeasts reduction percentage	0.785	40	0.000	0.688	80	0.000	0.831	30	0.000

df: degree of freedom; Sig: Significance.

3.1. Trial 1. Heat Treatment: Hot-Air Dried Bee-Pollen

In every treatment a significant microbial reduction was observed in comparison to the untreated control group (Wilcoxon test, $p < 0.05$). However, no significant differences were found within the three exposures timing groups. The greatest reduction was noticed on *Enterobacteriaceae*, showing percentages above 90%, followed by molds and yeasts 70–80% reduction and finally mesophilic aerobes 53–67% reduction. All results, as well as reduction percentage are shown in Table 2.

Table 2. Microbial load reduction of hot-air dried pollen (42 ± 1 °C) exposed to three different timing exposure. The results are expressed as number of samples (N), average of CFU counted, and percentage of microbial load reduction (mean \pm S.D.).

Microbiological Group	Hot-Air Dried Timing	N	Counting (log CFU/g) (Mean \pm S.D.)	% Reduction of Contamination (Mean \pm S.D.) *
<i>Enterobacteriaceae</i>	Without treatment	10	5.39 \pm 5.34	0.0 \pm 0.0 ^a
	15 min	10	3.83 \pm 3.66	93.8 \pm 7.4 ^b
	30 min	10	3.93 \pm 4.07	96.1 \pm 3.8 ^b
	45 min	10	3.77 \pm 4.02	96.9 \pm 5.0 ^b
Mesophilic aerobes	Without treatment	10	4.83 \pm 4.82	0.0 \pm 0.0 ^a
	15 min	10	4.31 \pm 4.33	53.0 \pm 55.7 ^b
	30 min	10	4.09 \pm 3.91	67.2 \pm 35.3 ^b
	45 min	10	4.16 \pm 3.86	59.1 \pm 33.2 ^b
Moulds & yeasts	Without treatment	10	7.54 \pm 7.75	0.0 \pm 0.0 ^a
	15 min	10	5.89 \pm 5.87	78.0 \pm 32.5 ^b
	30 min	10	5.97 \pm 5.94	70.3 \pm 45.8 ^b
	45 min	10	5.89 \pm 5.83	80.8 \pm 27.2 ^b

* a, b Superscripts indicate significantly different results of the reduction percentage within the microbiological group (non-parametric statistic. Wilcoxon test, $p < 0.05$). S.D. means Standard Deviation.

3.2. Trial 2. Bee-Pollen Exposed to Ozone Treatment

All treatments showed a significant microbial reduction in comparison to the untreated control group. Otherwise, there was no significant difference between the two different timing exposures (Wilcoxon test, $p > 0.05$). For *Enterobacteriaceae* the contamination reduction observed was between 80.0% and 90.9%, for mesophilic aerobes was 69.1% and 83.1%, and for molds and yeasts between 89.4% and 89.5%. All results, as well as reduction percentage are shown in Table 3.

Table 3. Microbial load reduction obtained from bee-pollen directly exposed to ozone (output: 200 mg/h). The results are expressed as number of samples (N), average of CFU counted, and percentage of microbial load reduction (mean \pm S.D.).

Microbiological Group	Ozone Exposure Timing	N	Counting (log CFU/g) (Mean \pm S.D.)	% Reduction of Contamination (Mean \pm S.D.) *
<i>Enterobacteriaceae</i>	Without treatment	20	6.91 \pm 7.36	0.0 \pm 0.0 ^a
	30 min	20	4.94 \pm 5.02	80.0 \pm 6.6 ^b
	60 min	20	4.61 \pm 4.67	90.9 \pm 3.0 ^b
Mesophilic aerobes	Without treatment	20	6.31 \pm 6.80	0.0 \pm 0.0 ^a
	30 min	20	4.97 \pm 5.16	69.1 \pm 8.1 ^b
	60 min	20	4.73 \pm 4.95	83.1 \pm 5.0 ^b
Moulds & yeasts	Without treatment	20	8.88 \pm 9.30	0.0 \pm 0.0 ^a
	30 min	20	6.32 \pm 6.31	89.5 \pm 4.4 ^b
	60 min	20	6.29 \pm 6.54	89.4 \pm 4.2 ^b

* a, b Superscripts indicate significantly different results of the reduction percentage within the microbiological group (non-parametric statistic. Wilcoxon test, $p < 0.05$).

3.3. Evaluation of the Shelf-Life of Bee-Pollen Treated Combining Hot-Air Drying (15 min) and Ozone Exposure (30 min)

No significant differences were found between ozone exposure treatment timing 30 and 60 min to reduce microbial load. Thus, the lowest timing exposure to ozone together with hot-air drying during 15 min was chosen to evaluate the shelf-life of treated bee-pollen and cold storage (4 °C).

Using this treatment, evolution of microbial load was studied in 18 samples in order to obtain helpful information, which could be used in the future, to set shelf-life of bee-pollen treated according to this method. After this treatment, results showed an important and remarkable reduction in all microbiological groups included in this study, especially in *Enterobacteriaceae* group. Three weeks after bee-pollen has been treated and kept cool,

microbial load increased slowly. Last evaluation was carried out six weeks after treatment and although the microbial load continued increasing, it was held at a lower level than initially observed in fresh bee-pollen. Results are shown in Table 4.

Table 4. Evaluation of the microbial load, at six different times, in bee-pollen treated mixing 30 min ozone exposure together with 15 min hot-air drying and kept in a refrigerator at 4 °C. The results are expressed as number of samples (N) and average of CFU counted (mean ± S.D.).

	<i>Enterobacteriaceae</i>		Mesophilic Aerobes		Moulds & Yeasts	
	N	(mean ± S.D.) *	N	(mean ± S.D.) *	N	(mean ± S.D.) *
b.t. ¹	18	6.78 ± 7.15 ^a	18	6.02 ± 6.54 ^a	18	8.39 ± 8.82 ^a
Just a.t. ²	18	4.03 ± 4.54 ^b	18	4.16 ± 4.44 ^b	18	5.81 ± 6.06 ^b
1 week a.t. ²	18	3.99 ± 4.30 ^c	18	4.56 ± 4.83 ^{b,c}	18	6.63 ± 7.07 ^{b,c}
2 weeks a.t. ²	18	4.42 ± 4.64 ^d	18	4.39 ± 4.70 ^b	18	6.90 ± 7.29 ^{c,d}
3 weeks a.t. ²	18	4.55 ± 4.80 ^{e,f}	18	4.77 ± 5.11 ^b	18	6.92 ± 7.28 ^{c,d}
6 weeks a.t. ²	17	5.37 ± 5.77 ^{e,f}	17	4.98 ± 5.15 ^c	17	7.05 ± 7.33 ^d

* a,b,c,d,e,f, Superscripts indicate significantly different results of the reduction percentage within the microbiological group (non-parametric statistic. Wilcoxon test, $p < 0.05$). ¹ b.t.: before treatment. ² a.t.: after treatment.

3.4. Study of Changes on Polyphenols Present in Bee-Pollen after Treatment (Heat and Ozone) during 30 min

Potential changes in polyphenols composition were evaluated. Comparison between fresh bee-pollen, hot-air dried bee-pollen (30 min) and ozone exposed bee-pollen (30 min). To analyze the results, non-parametric statistics was applied as data resulted non normally distributed, there was no variance homogeneity (heteroscedasticity), and number of samples was scarce. Results were not normally distributed (Shapiro–Wilk, $p < 0.05$). No significant differences were detected within the three types of bee-pollen: fresh, hot-air dried, or ozonized for polyphenols studied (Friedman test, $p < 0.05$). Results are shown in Table 5. It is necessary to point out, that flavonoids are present in pollen in greater amount than phenolic acid, in accordance with our results, and are mainly in the form of glycosides, molecules bond to a sugar group. In this work, hydrolysis was not employed in the sample preparation procedure to quantified aglycons but the natural free aglycons in each pollen were determined. The hypopharyngeal gland secretions of the honeybee, cause partial enzymatic hydrolysis of glycosides to free aglycons during pollen collection. The presence of free aglycones is a good indicator of the quality of pollen because the glycoside bond reduces antioxidative properties [29].

Table 5. Polyphenols in bee-pollen. The presence of polyphenols was quantified in bee-pollen samples: 10 initial samples of fresh-frozen bee-pollen, 10 hot-air dried bee-pollen samples, and 10 ozone exposed bee-pollen samples. The results are presented as number of samples that contain the specific polyphenols (N) and the average (Mean ± S.D.) (µg/g dry) for each of polyphenols studied. Gallic Acid, Genistein, and Resveratrol were found below the Limit of Quotation (LOQ) in all the analyzed samples.

Polyphenols	Caffeic		Chrysin		Kaempfer		Luteolin		Naringerin		P-Coumaric		Quercetin		Rutin	
	N	Mean ± S.D.	N	Mean ± S.D.	N	Mean ± S.D.	N	Mean ± S.D.	N	Mean ± S.D.	N	Mean ± S.D.	N	Mean ± S.D.	N	Mean ± S.D.
Fresh Pollen	5	3.3 ± 2.3	3	4.5 ± 4.5	5	1.9 ± 0.5	5	63.1 ± 41.9	4	2.1 ± 1.1	5	7.1 ± 4.8	5	7.5 ± 1.9	5	6.7 ± 2.7
Dried Pollen	5	3.7 ± 1.8	3	4.4 ± 3.7	5	1.6 ± 0.8	5	70.6 ± 47.7	4	2.7 ± 0.9	5	7.1 ± 4.4	5	7.7 ± 1.4	5	6.3 ± 2.9
Ozonize Pollen	5	3.5 ± 2.1	3	6.0 ± 4.7	5	1.7 ± 0.4	5	86.3 ± 70.7	4	2.6 ± 1.9	5	7.8 ± 5.4	5	7.9 ± 2.6	5	6.6 ± 2.7

3.5. Sensory Evaluation of Processed Bee-Pollen

For all evaluated parameters, bee-pollen exposed to ozone during 30 and 60 min showed no sensory differences in comparison to untreated fresh bee-pollen. However, the results obtained revealed sensory differences between fresh bee-pollen and hot-air dried bee-pollen (during 15, 30, and 45 min), except for the color attribute which showed no appreciable change. In Table 6 sensory profile for each treatment is presented.

Table 6. Sensory profiles of fresh and hot-air dried pollen.

Bee-Pollen Type	Sensory Profile
Fresh (untreated)	Intense (5) odour (vegetation/green); grains change their shape when pressing with the fingers and combine together in one mass, pollen dust is observed, very wet in mouth, sweet, bitter, slightly salted, and lightly acid. Medium (3) flavor (vegetation/green/humidity, floral) and medium (3) persistence.
15' Dried pollen	Intense (5) odor (vegetation/green); grains change their shape when pressing with the fingers but not combine together in one mass, no pollen dust is observed; wet in mouth, sweet, and slightly salted. Medium (3) flavor (vegetal/green/roasted) and short (2) persistence.
30' Dried pollen	Medium (3) odor (vegetation/green); grains change their shape when pressing with the fingers but not combine together in one mass, no pollen dust is observed; wet in mouth, sweet and slightly salted. Soft (2) flavor (vegetation/green/roasted) and short (2) persistence.
45' Dried pollen	Medium (3) odor (vegetation/green); grains change their shape when pressing with the fingers, no pollen dust is observed; dry in mouth, slightly salted. Very soft (1) flavor (vegetation/green/roasted) and short (2) persistence.

4. Discussion

Microbiological contamination of commercial bee-pollen arises from different sources. One of them is the plant from which it comes from. Later, the honey bee handles the pellets of pollen to set them on their legs. Next hazardous step is the collection of bee-pollen using pollen-traps and eventually, final handling of bee-pollen to market it [9,30]. When the bee-pollen reaches the market, its microbiological quality must be guaranteed to be considered a safe product intended for human consumption, but also its nutritional properties must be preserved, as well as its value as a dietary supplement and palatability for consumers.

Regarding food safety, our work studied the three more frequent microbiological groups considered in this kind of research [2,31]. Taking note with special interest to *Enterobacteriaceae*, some agents responsible for health issues in human beings are included within this group. *Enterobacteriaceae* load in bee-pollen has a double origin. On the one hand, they can contaminate the bee-pollen through the environment, the activity of the honey bee that moves all over the surroundings, for example when they visit a source of polluted water used by other animals. On the other hand, *Enterobacteriaceae* are the main part of the microbiota presented in the intestine of healthy honey bees and they are also used as a hygiene indicator of the handling procedure of the product.

By contrast, the presence of mesophilic aerobes has a remarkable relation with initial contamination of raw materials, as well as the tools and materials used all along the production, handling, and storage of bee-pollen. Finally, molds and yeasts load is linked to environmental conditions [31,32].

Initially, untreated bee-pollen samples present in every trial a high load of *Enterobacteriaceae* potentially dangerous for consumption. Moreover, this microbiological group presented the best response when treating the product.

Usual hot-air drying treatment is efficient to reduce the microbial load [13], as it was observed in our trial, in which the reduction of *Enterobacteriaceae* was significant and the percentage of reduction for mesophilic aerobes, molds, and yeasts also was medium or even high (see Table 2). For this reason, hot-air drying should be satisfactory to achieve this purpose, but it also entails some inconveniences such as the loss of nutritional properties,

reduction of palatability and consumers' rating [14,15]. In this sense our objective was to study different efficient methods that let avoiding the inconveniences of hot-air drying.

Not only freezing the fresh bee-pollen is sufficient to guarantee its food safety, while it stops the growth of microorganisms, it does not reduce the present ones. For this reason, it would be a suitable option to adopt a shock treatment followed by cold storage. In the present work, the studied treatment was ozone exposure. Our results show an important reduction of microbial load when bee-pollen is exposed to ozone (see Table 3) so it could be considered a convenient shock treatment. Posterior freezing preservation ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) would avoid the subsequent increase of bacterial load, making it a safer product. Furthermore, ozone treatment allowed maintaining a high microbial load reduction when bee-pollen was kept in the refrigerator ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$) for several weeks (see Table 4), which offers new trade opportunities although further research is needed to ensure food safety.

In this work the effect of ozone on bee-pollen components was also raised, due to its oxidative capacity reported by other studies [8]. Preservation of nutritional qualities is crucial for this kind of product. Bee-pollen components, more frequently valued by consumers because of their antioxidant properties, such as polyphenols, were used as model [3,25,33]. Bee-pollen was treated with ozone for 30 min due to the significant reduction of microbial load in comparison to untreated control group of fresh bee-pollen. This ozone treatment was also chosen because no differences between 30 and 60 min ozone exposure were found. The obtained results indicate that ozone treatment did not have a negative impact on polyphenols evaluated in the present work (see Table 5) which makes ozone exposure a potential treatment for bee-pollen.

Finally, improving consumers acceptance of bee-pollen is another objective of this study. Sensory analysis carried out showed no differences between fresh and ozone exposed bee-pollen. However, hot-air dried bee-pollen presented a different sensory profile, except for the color, and the more the exposure to hot air, the more its sensory profile changes. Thus, the vegetation/green odor intensity for 15 min hot-air dried bee-pollen is similar to that of the fresh bee-pollen and most of the textural attributes are kept. However, the roasted flavor arises after the hot-air drying treatment and other flavor descriptors (humidity and floral) for fresh bee-pollen are lost. The persistence is shorter after the treatment.

Despite these promising results and the low cost of ozonation equipment, new research is required on the possible appearance of harmful compounds from oxidation caused by ozone, although we found authors who already point to these limitations [34].

5. Conclusions

The ozonation treatment achieved a contamination reduction of 80.0–90.9%, 69.1–83.1%, and 89.4–89.5% for *Enterobacteriaceae*, mesophilic aerobes, and molds and yeasts, respectively. Since no significant differences were found between ozone exposure treatment timing 30 and 60 min to reduce microbial load, the lowest timing exposure to ozone together with hot-air drying during 15 min was chosen to evaluate the shelf-life of treated bee-pollen and cold storage ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Last evaluation was carried out six weeks after treatment and although the microbial load continued to increasing, it was held at a lower level than initially observed in fresh bee-pollen.

The obtained results indicate that ozone treatment did not have a negative impact on polyphenols evaluated in the present work which makes ozone exposure a potential treatment for bee-pollen. Sensory analysis carried out showed no differences between fresh and ozone exposed bee-pollen. However, hot-air dried bee-pollen presented a different sensory profile, except for the color, and the more the exposure to hot air, the more its sensory profile changes. Thus, the vegetation/green odor intensity for 15 min hot-air dried bee-pollen is similar to that of the fresh bee-pollen and most of the textural attributes are kept. However, the roasted flavor arises after the hot-air drying treatment and other flavor descriptors (humidity and floral) for fresh bee-pollen are lost. Moreover, the persistence is shorter after the treatment.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/foods10112593/s1>, Table S1: Gradient of mobile phase. Table S2: Characterization of the phenolic compounds by LC-MS/MS. Table S3: Recoveries (%), precision (RSD%) and quantitation limit (LOQ).

Author Contributions: Conceptualization, S.S. and J.M.F.; methodology, S.S., A.I.G.-V. and J.M.F.; validation, A.I.G.-V.; formal analysis, S.S. and J.M.F.; investigation, J.R.C., I.R. and A.I.G.-V.; data curation, S.S., I.R.; writing—original draft preparation, J.R.C., S.S. and J.M.F.; writing—review and editing, S.S., I.R., A.I.G.-V. and J.M.F.; supervision, S.S. and J.M.F.; project administration, J.M.F.; funding acquisition, M.D.H. and J.M.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the European Union’s European Regional Development Fund (ERDF) 2014–2020, through the National Institute for Agricultural and Food Research and Technology (INIA) of Spain, and the projects RTA2017-00058-C04-04.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Jean-Prost, P.; Médori, P.; Le Conte, Y. *Apiculture: Connaître L’abeille, Conduire le Rucher.7 Édition Revue et Complétée*; Éditions Tec & Doc: Paris, France, 2005; p. 698.
- Campos, M.G.R.; Bogdanov, S.; de Almeida-Muradian, L.B.; Szczesna, T.; Mancebo, Y.; Frigerio, C.; Ferreira, F. Pollen composition and standardisation of analytical methods. *J. Apic. Res.* **2008**, *47*, 154–161. [[CrossRef](#)]
- Campos, M.G.R.; Frigerio, C.; Lopes, J.; Bogdanov, S. What is the future of Bee-Pollen? *J. ApiProduct ApiMedical Sci.* **2010**, *2*, 131–144. [[CrossRef](#)]
- Brodtschneider, R.; Crailsheim, K. Nutrition and health in honey bees. *Apidologie* **2010**, *41*, 278–294. [[CrossRef](#)]
- Wright, G.A.; Nicolson, S.W.; Shafir, S. Nutritional Physiology and Ecology of Honey Bees. *Annu. Rev. Entomol.* **2018**, *63*, 327–344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Muniategui, S.; Sancho, T.; Terradillos, L.; Huidobro, J.; Simal-Lozano, J. Composición del polen apícola. *Vida Apícola* **1993**, *59*, 44–48.
- Bonvehí, J.S.; Jordà, R.E. Nutrient Composition and Microbiological Quality of Honeybee-Collected Pollen in Spain. *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 725–732. [[CrossRef](#)]
- Yook, H.-S.; Lim, S.-I.; Byun, M.-W. Changes in Microbiological and Physicochemical Properties of Bee Pollen by Application of Gamma Irradiation and Ozone Treatment. *J. Food Prot.* **1998**, *61*, 217–220. [[CrossRef](#)]
- Hani, B.; Dalila, B.; Saliha, D.; Daoud, H.; Mouloud, G.; Seddik, K. Microbiological Sanitary Aspects of Pollen. *Adv. Environ. Biol.* **2012**, *6*, 1415–1420.
- Puig-Peña, Y.; del-Risco-Ríos, C.A.; Álvarez-Rivera, V.; Leiva-Castillo, V.; García-Neninger, R. Comparación de la calidad microbiológica del polen apícola fresco y después de un proceso de secado. *CENIC Cienc. Biológicas* **2012**, *43*, 23–27.
- Nardoni, S.; D’Ascenzi, C.; Rocchigiani, G.; Moretti, V.; Mancianti, F. Occurrence of moulds from bee pollen in Central Italy—A preliminary study. *Ann. Agric. Environ. Med.* **2015**, *23*, 103–105. [[CrossRef](#)]
- Hosny, A.S.; Sabbah, F.M.; EL-Bazza, Z.E. Studies on the microbial decontamination of Egyptian beepollen by γ radiation. *Egypt. Pharm. J.* **2018**, *17*, 190–200. [[CrossRef](#)]
- Mauriello, G.; De Prisco, A.; Di Prisco, G.; La Storia, A.; Caprio, E. Microbial characterization of bee pollen from the Vesuvius area collected by using three different traps. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0183208. [[CrossRef](#)]
- Collin, S.; Vanhavre, T.; Bodart, E.; Bouseata, A. Heat Treatment of Pollens: Impact on Their Volatile Flavor Constituents. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 444–448. [[CrossRef](#)]
- Bonvehí, J.S.; Torrentó, M.S.; Lorente, E.C. Evaluation of Polyphenolic and Flavonoid Compounds in Honeybee-Collected Pollen Produced in Spain. *J. Agric. Food Chem.* **2001**, *49*, 1848–1853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Domínguez-Valhondo, D.; Gil, D.B.; Hernández, M.T.; González-Gómez, D. Influence of the commercial processing and floral origin on bioactive and nutritional properties of honeybee-collected pollen. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *46*, 2204–2211. [[CrossRef](#)]
- Canale, A.; Benelli, G.; Castagna, A.; Sgherri, C.; Poli, P.; Serra, A.; Mele, M.; Ranieri, A.; Signorini, F.; Bientinesi, M.; et al. Microwave-Assisted Drying for the Conservation of Honeybee Pollen. *Materials* **2016**, *9*, 363. [[CrossRef](#)]
- Kačániová, M.; Fikselová, M.; Haščík, P.; Kôazovická, V.; Nôzková, J.; Fatrcová-Šrámková, K. Changes in microflora of bee pollen treated with uv light and freezing during storage. *Ecol. Chem. Eng. A* **2010**, *17*, 89–94.
- Kędzia, B.; Hołderna-Kędzia, E. The microbiological decontamination of pollen by using of ionizing radiation. *Postępy Fitoter.* **2010**, *3*, 152–156.
- Priehn, M.; Denis, B.; Aumeier, P.; Kirchner, W.H.; Awakowicz, P.; Leichert, L.I. Sterilization of beehive material with a double inductively coupled low pressure plasma. *J. Phys. D Appl. Phys.* **2016**, *49*, 374002. [[CrossRef](#)]
- Rice, R.G.; Graham, D.M. US FDA regulatory approval of ozone as an antimicrobial agent—what is allowed and what needs to be understood. *Ozone News* **2001**, *29*, 22–31.

22. Rice, R.G.; Graham, D.M.; Lowe, M.T. Recent Ozone Applications in Food Processing and Sanitation. *Food Saf. Mag.* **2002**, *8*, 10–17.
23. Beuchat, L.R.; Chmielewski, R.; Keswani, J.; Law, S.E.; Frank, J.F. Inactivation of aflatoxigenic *Aspergilli* by treatment with ozone. *Lett. Appl. Microbiol.* **1999**, *29*, 202–205. [[CrossRef](#)]
24. Zhu, F. Effect of ozone treatment on the quality of grain products. *Food Chem.* **2018**, *264*, 358–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Kroyer, G.; Hegedus, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **2001**, *2*, 171–174. [[CrossRef](#)]
26. Estevinho, L.M.; Rodrigues, S.; Pereira, A.P.; Feás, X. Portuguese bee pollen: Palynological study, nutritional and microbiological evaluation. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2011**, *47*, 429–435. [[CrossRef](#)]
27. Serra Bonvehí, J.; Gómez Pajuelo, A. La calificación de mieles mediante el análisis organoléptico. *Apiacta* **1988**, *23*, 103–108.
28. Baldi Coronel, B.; Grasso, D.; Chaves Pereira, S.; Fernández, G. Caracterización bromatológica del polen apícola argentino. *Cienc. Docencia Technol.* **2004**, *15*, 145–181.
29. Cook, N.C.; Samman, S. Flavonoids—Chemistry, metabolism, cardioprotective effects and dietary sources. *J. Nutr. Biochem.* **1996**, *7*, 66–76. [[CrossRef](#)]
30. González, G.; Hinojo, M.J.; Mateo, R.; Medina, A.; Jiménez, M. Occurrence of mycotoxin producing fungi in bee pollen. *Int. J. Food Microbiol.* **2005**, *105*, 1–9. [[CrossRef](#)]
31. De Arruda, V.A.S.; Dos Santos, A.V.; Sampaio, D.F.; Araújo, E.D.S.; Peixoto, A.L.D.C.; Estevinho, M.L.M.F.; de Almeida-Muradian, L.B. Microbiological quality and physicochemical characterization of Brazilian bee pollen. *J. Apic. Res.* **2017**, *56*, 231–238. [[CrossRef](#)]
32. Gliński, Z.; Jarosz, J. Mikroflora pszczoły miodnej. *Post Mikrobiol.* **1988**, *27*, 95–107.
33. Almaraz-Abarca, N.; Campos, M.G.; Ávila-Reyes, J.A.; Naranjo Jiménez, N.; Herrera-Corral, J.; González-Valdez, L.S. Variability of antioxidant activity among honey bee-collected pollen of different botanical origin. *J. Sci. Technol. Am.* **2004**, *29*, 574–578.
34. Kim, J.-G.; Yousef, A.E.; Dave, S. Application of Ozone for Enhancing the Microbiological Safety and Quality of Foods: A Review. *J. Food Prot.* **1999**, *62*, 1071–1087. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]