



Evaluación del potencial fermentativo del polen apícola

Fermentative potential test of bee pollen

Autores: Carlos Alberto del Risco Río¹, Rosalina García Neninger¹, Giselle Rodríguez Castro¹.

1- Centro de Investigaciones Apícolas, Carretera Cano-Wajay, Km 0, El Cano, Arroyo Arenas, La Lisa, La Habana, Teléfono 202 0890.

microbiologia1@ciapi.minag.cu

Recibido: 6-6- 2017

Aprobado: 16-6 -2017

RESUMEN

El polen apícola es un alimento con propiedades nutricionales y terapéuticas demostradas para el hombre y en Cuba pudiera constituir un producto con un impacto económico importante, lo cual no es posible por exceder las normas microbiológicas establecidas para los alimentos. El ensilaje es un método de bioconservación que se fundamenta en la fermentación ácido láctica y que disminuye la microbiota de los sustratos. Con el objetivo de evaluar el potencial fermentativo del polen apícola para ser ensilado, se evaluaron las variables químicas azúcares solubles totales, capacidad tampón y materia seca de 28 muestras de polen apícola y con estos resultados se calculó el coeficiente de fermentación. Este coeficiente si supera el valor de 30, se puede considerar el sustrato con características químicas apropiadas para ser ensilado. Todos los resultados de concentración de azúcares solubles totales y materia seca fueron superiores al 15 y 25 % respectivamente y la capacidad tampón inferior a 35 meq/100 g. Todas las muestras de polen estuvieron acordes con los criterios que predicen si un sustrato vegetal es fermentable, es decir, una concentración de azúcares solubles totales y materia seca superior al 15 y 25 % respectivamente, una capacidad tampón inferior a 35 meq/100 g y un coeficiente de fermentación superior a 30. Por tanto, el polen apícola presenta características químicas que permiten la fermentación ácido láctica de este sustrato ensilado y de este modo, obtener una reducción de la microbiota.

Palabras clave: polen apícola, fermentación, ensilaje.

ABSTRACT

The bee pollen is a food with nutritional and therapeutic properties demonstrated for man and in Cuba could be an important economic product, which is not possible to exceed the microbiological specifications. With the aim of assessing the fermentative potential of 28 samples of bee pollen for ensiling and thereby obtain an acidified product with high microbiological quality, it were evaluated different chemical variables such as soluble sugars, buffer capacity and dry matter and calculated the fermentation coefficient. All pollen samples were consistent with the criteria that predict whether a vegetable substrate is fermentable according to the literature, namely, a total soluble sugar concentration and dry matter higher than 15 and 25 % respectively a buffer capacity of less than 35 meq / 100 g and a fermentation factor greater than 30. Therefore, bee pollen has chemical characteristics that allow the lactic acid fermentation of the substrate through the silage and thus to obtain a reduction of the microbiota to meet the acceptance criteria for human consumption.

Keywords: bee pollen, fermentation, silage

INTRODUCCIÓN

Las pelotas de polen apícola son el resultado de la aglutinación de las células de polen floral por las abejas (*Apis mellifera*), para transportarlo a la colmena.^{1,2} El polen apícola que se cosecha y seca se promueve como un alimento saludable con un amplio rango de propiedades nutricionales y terapéuticas,³⁻⁷ porque contiene una elevada concentración de proteínas, aminoácidos esenciales y compuestos fenólicos con actividad antioxidante.¹ Sin embargo, se ha comprobado en varios países que tiene altos recuentos de los microorganismos indicadores de la calidad sanitaria⁸⁻¹¹.

Cuba no está exenta de esta regularidad y el polen que se obtiene posee una elevada carga microbiana que invalida su comercialización.^{12,13} Dado que el polen se consume crudo y no se utilizan prácticas de intervención que puedan controlar o disminuir eficazmente la microbiota, pudiera constituir una fuente potencial de enfermedades de transmisión alimentaria.

Existen métodos de conservación que reducen y controlan el número de microorganismos en los alimentos.¹⁴ Los métodos biológicos (bioconservación), basados en la fermentación ácido láctica, se consideran una alternativa económica que disminuye la microbiota contaminante y se obtiene un producto final con elevado número de bacterias lácticas, las cuales tienen un efecto beneficioso para la salud humana^{5,16}.

La fermentación ácido láctica que ocurre en los productos de origen vegetal ensilados se ha aprovechado como método de bioconservación, pero antes de emplear este proceso es necesario investigar el potencial fermentativo del sustrato que se desea ensilar.¹⁷ Las variables químicas principales que determinan el potencial fermentativo de sustratos de origen vegetal ensilados son: el contenido de azúcares solubles, la materia seca y la capacidad tampón.¹⁸ Es más fácil ensilar matrices que tienen alto nivel de azúcares fermentables, con baja capacidad tampón y un contenido de materia seca que permita el desarrollo de las bacterias ácido lácticas y la compactación de los silos.^{17,19}

El presente estudio tiene como objetivo la caracterización preliminar del polen apícola con el propósito de ser utilizado en la preparación de silos, como una manera de reducir la carga microbiana del sustrato.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Centro de Investigaciones Apícolas (CIAPI). El universo de trabajo estuvo compuesto por las colmenas experimentales del CIAPI. Una muestra de 10 colmenas fue seleccionada para la recolección del polen apícola, según los criterios técnicos de Aranda *et al.*²⁰ que son: población abundante de abejas, buen estado sanitario, presencia de

abejas reinas jóvenes y prolíferas y ausencia de entradas adicionales a la entrada principal a las colmenas.

Recolección de las muestras de polen apícola

El polen se recolectó durante el período de Diciembre 2006 a Mayo 2007, por ser el período de mayor floración de plantas poliníferas en Cuba,²¹ de acuerdo a lo establecido por Aranda *et al.*²⁰ y Valdés *et al.*^{12,13} sobre la higiene general en el proceso, acopio cada 24 h y la correcta desinfección y colocación de las trampas. Las colectas de cada día se beneficiaron mediante limpieza mecánica y se conservaron a 4 °C hasta completar una muestra de 400 g y de esta forma fueron reunidas 28 muestras.

Evaluación del potencial fermentativo del polen apícola

La determinación de azúcares solubles totales se realizó según lo establecido en los métodos de ensayo para el polen apícola en Cuba.²² Una porción de ensayo de 5 g de polen se añadió a 30 mL de agua destilada a 65 °C. La mezcla se agitó y centrifugó a 3500 rpm durante 10 min. El sobrenadante se decantó y la operación se repitió cuatro veces. Al extracto acuoso reunido se le añadió 5 mL de acetato de cinc al 7,5 % y 10 mL de ferrocianuro de potasio al 3,5 %, se agitó y enrasó a 250 mL con agua destilada. Al cabo de los 20 min la solución se filtró y se tomaron cuatro alícuotas de 50 mL y se les determinaron los azúcares reductores y la sacarosa aparente por duplicado por el método de Lane y Eynon.²³ Los azúcares solubles totales se consideraron como la sumatoria de los reductores y la sacarosa aparente.

La capacidad tampón se determinó según el método propuesto por Playne y McDonald.²⁴ Un macerado de 10 g de polen se tituló primeramente a pH 3,0 con ácido clorhídrico 0,1 mol · L⁻¹ y luego a pH 6 con hidróxido de sodio 0,1 mol · L⁻¹. La capacidad tampón se expresó en miliequivalentes de álcali requeridos para cambiar el pH desde 4 hasta 6 de 100 g de polen (meq/100 g).

La materia seca se determinó según lo establecido en los métodos de ensayo para el control de la calidad del polen apícola seco en Cuba²² y de Oliveira (2006),²⁵ basados en la determinación de la pérdida de peso por desecación de la porción de ensayo hasta valores constantes a una temperatura de 100 °C.

El coeficiente de ensilaje (CE) se calculó a través de la ecuación propuesta por Schmidt *et al* (1971).²⁶ y citado por De la Roza (2005),²⁷ la cual relaciona las variables químicas primarias materia seca (MS), azúcares solubles totales (AST) y capacidad tampón (CT).

$$CE = MS(\%) + \frac{8 \cdot AST(\%)}{CT(meq/100g)}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Según se observa en la Tabla 1, todas las muestras analizadas excedieron la concentración del 15 % de azúcares solubles totales, que es el valor mínimo para predecir si un sustrato vegetal es fermentable.^{27,28}

Los azúcares reductores constituyeron el 98 % de los azucars totales y según la literatura consultada, los reductores mayoritarios presentes en el polen apícola son la glucosa y la fructosa,^{6,29} los cuales son asimilables por la gran mayoría de las bacterias ácido lácticas.³⁰ Por tanto, el polen contiene una elevada concentración de azúcares totales, que en su mayor parte son azúcares reductores fermentables por las bacterias ácido lácticas, lo cual permitirá la acidificación de los silos elaborados a partir de este sustrato.

Tabla 1. Variables químicas primarias y coeficiente de ensilaje de 28 muestras de polen apícola húmedo, recolectadas en el período Diciembre 2006 – Mayo 2007.

Muestras de polen apícola	Azúcares solubles totales (% en MS)	Azúcares reductores (% en MS)	Capacidad tampón (meq/100g en MS)	Materia seca (%)	Coeficiente de ensilaje
1	30,7	30,31	21,6	67,75	79,1
2	33,0	32,45	20,7	71,5	84,2
3	31,4	31,11	19,6	71,91	84,7
4	32,7	32,01	20,2	71,31	84,3
5	34,0	33,30	20,4	73,80	87,1
6	30,4	29,95	20,7	69,55	81,3
7	30,2	29,80	19,4	71,54	84,0
8	32,0	31,61	19,1	72,21	85,6
9	37,3	36,75	17,7	74,58	91,5
10	38,2	37,29	16,9	75,34	93,4
11	36,0	35,46	13,0	78,77	100,9
13	37,4	36,25	11,2	81,13	107,8
14	37,6	36,71	12,5	80,57	104,6
15	39,0	38,11	19,6	82,27	98,2
16	42,3	41,94	22,6	80,82	95,8
17	43,0	42,17	13,3	80,39	106,2
18	42,0	41,02	13,7	84,05	108,6
19	41,2	40,41	13,2	82,49	107,5

20	45,9	45,46	14,8	75,59	100,4
21	43,1	42,25	11,4	78,37	108,6
22	40,4	39,56	12,4	77,30	103,4
23	35,0	34,41	15,8	65,45	83,2
24	35,7	35,30	12,6	80,49	103,1
25	34,1	33,74	14,3	75,02	94,1
26	36,1	35,62	12,8	74,28	96,8
27	36,5	36,06	17,3	73,07	89,9
28	35,8	35,17	14,9	77,05	96,3
Min.-					
Max.	30,2 – 45,9	30,3 – 45,5	11,2 – 22,6	67,8 – 84,1	79,1 – 108,6
Media	36,8	36,2	16,2	75,9	95,3
Desviació					
n	4,3	4,2	3,6	4,8	9,5
estándar					

Leyenda: Min.-Max, valores mínimo y máximo entre los cuales oscilaron los resultados de todas las muestras; MS, materia seca.

La elevada concentración de azúcares reductores en el polen apícola, es consecuencia del néctar y los fluidos glandulares ricos en invertasa que incorporan las abejas para aglomerar las células de polen floral. La invertasa es la enzima que desdobra la sacarosa (no reductor) presente en el néctar, a fructosa y glucosa, aumentando así la cantidad de los azúcares reductores al total^{1,6,31,32}.

Por otra parte, la capacidad tampón es la variable que se opone al incremento de la acidez en los silos y mientras más bajo sea el valor con mayor facilidad se acidifican. Los resultados para todas las muestras de polen apícola son inferiores a 23 meq/100 g, incluso, el 50 % alcanzaron valores entre el 11 y 14,9 meq/100 g (Tabla 1). Según De La Roza²⁷ y Westra²⁸ para considerar un sustrato vegetal como fermentable, la capacidad tampón debe ser inferior a 35,0 meq/100 g, como el maíz (15 - 30 meq/100 g) y los desechos de piña (20,49 meq/100 g).³³ Por tanto, los resultados hasta ahora observados indican, que el polen apícola contiene una elevada concentración de azúcares fermentables para la acidificación de los silos y una capacidad tampón baja que no dificulta este proceso.

La materia seca también es importante para predecir la correcta acidificación de los silos. Valores entre 25 y 35 %, permite una eficaz compactación de los silos para dar lugar a la atmósfera microaerófila favorable a las bacterias ácido láctica. De este modo, disminuyen las

pérdidas de nutrientes asociadas al exceso de actividad biológica de la microbiota acompañante. Además, de la concentración de materia seca dependen las variables antes analizadas, así como la concentración de proteínas y el número de bacterias acompañantes³⁴⁻³⁶. Todos los resultados obtenidos de materia seca en las 28 muestras estuvieron por encima de 67,8 % (Tabla 1), muy superiores al rango de valores entre 25 y 35 %, por consiguiente, es posible ajustar esta variable en el polen apícola.

Con el empleo de las variables azúcares solubles totales, capacidad tampón y materia seca fue calculado el coeficiente de ensilaje de las muestras de polen apícola, recomendado por De la Roza²⁷ para predecir el potencial fermentativo de sustratos vegetales. Según este autor, si el coeficiente calculado supera el valor de 30, se puede considerar el sustrato con características químicas apropiadas para ser ensilado. El 36 % de las muestras duplicaron este valor, el 64 % lo triplicaron y la media obtenida fue de 95,3 (Tabla 1). Esto confirma las adecuadas características químicas del polen apícola para ser fermentado a través del ensilaje como método de bioconservación.

Respecto a las variables químicas del polen apícola investigadas en Cuba, Martín³⁷ refiere en provincia Habana un promedio de azúcares solubles totales de 37,2 % (entre 35,5 – 39,3 %) y Tabío *et al.*³⁸ de azúcares reductores de 35,6 % (entre 34,8 – 36,4 %). Estos resultados medios son muy cercanos a los obtenidos en este trabajo, aunque los rangos son más estrechos. Sin embargo, los métodos empleados fueron los mismos. Esto puede estar dado a que las muestras utilizadas por estos investigadores fueron recogidas en un período de dos meses (Martín: de Enero a Febrero y Tabío en Enero y Diciembre), que abarcan una menor diversidad de plantas melíferas y poliníferas en floración que las incluidas durante el período Diciembre – Mayo evaluado en este trabajo y consecuentemente, menor variabilidad en los resultados. Rangos más amplios de azúcares totales se informaron por Vit *et al.*³⁹ (15 – 50 %) y en la normativa de calidad del polen apícola seco de Brasil se acepta del 14,5 - 55 %.⁴⁰

En relación con la materia seca, la gran mayoría de los resultados informados en la literatura para el polen apícola varían entre el 70 – 85 %, ^{6,31,38} donde están incluidos el 89 % de los resultados de las muestras de polen apícola analizadas en esta investigación. Sin embargo, en los Andes venezolanos Vit *et al.*³⁹ informan valores de materia seca muy elevados para el polen apícola fresco, entre 90,1 y 91,3 %. La diferencia puede estar dada, a que la materia seca del polen apícola depende de la humedad medio ambiental de cada región,⁴¹ puesto que los sustratos que provienen de fuentes naturales son muy higroscópicos.⁴²

Por otra parte, no se han encontrado referencias sobre la capacidad tampón y el coeficiente de ensilaje del polen apícola, por lo que los resultados obtenidos en este trabajo constituyen primeros registros para estas variables.

CONCLUSIONES

El polen apícola presenta características químicas primarias que permiten la fermentación ácido láctica de este sustrato a través del ensilaje, con el fin de obtener una reducción de la microbiota según los criterios de aceptación para el consumo humano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carpes ST. Chemical composition and free radical scavenging activity of *Apis mellifera* bee pollen from Southern Brazil. *Journal of Food Technology*. 2009; 12(3): 222-229.
2. Pérez P. A. Manual de apicultura. Ed. Agrinfor Cuba; 2007. p. 82-102.
3. Cocan O, Marguitas LA, Dezmiorean D, Laslo L. Composition and biological activities of bee pollen: review. *Bulletin of the University of Agricultural Science and Veterinary Medicine*. 2005; 61: 221–226.
4. Hamamoto R, Ishiyama K, Yamaguchi M. Inhibitory effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone resorption in femoral tissues and osteoclast-like cell formation in bone marrow cells in vitro. *Journal of Health Science*. 2006; 52(3): 268–275.
5. Yamaguchi M, Hamamoto R, Uchiyama S, Ishiyama K, Hashimoto K. Anabolic effects of bee pollen *Cistus ladaniferus* extract on bone components in the femoral diaphyseal and metaphyseal tissues of rats in vitro and in vivo. *Journal of Health Science*. 2006; 52(1): 43–49.
6. Campos MGR, Bogdanov S, Almeida LB, Szczesna T, Mancebo Y, Frigerio C, *et al.* Pollen composition and standardisation of analytical methods. *Journal of Apicultural Research and Bee World*. 2008; 47(2): 156–163.
7. Silva TMS, Camara CA, Lins ACS, Agra MF, Silva EMS, Reis IT, *et al.* Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2009; 81(2): 173-178.
8. Guerra PE, Salamanca GG, Henao RC. Estudio microbiológico de cargas de polen colectado y almacenado por *Apis mellifera* [Internet]. Colombia: Departamento de Química, Facultad de Ciencias Básicas, Grupo de Investigaciones Mellitopalinológicas.

- Universidad del Tolima. 2007 [Consultada junio 2007]. Disponible en: <http://www.ut.edu.co/investigacion/grupos/m/mpolen.pdf>.
9. Khismatullin R, Kuzyaev R, Lyapunov Y, Elovikova E. Sanitary microbiology of honey bee collected pollen. Document for Small Business and Professionals. 2002. [Consultada octubre 2010]. Disponible en: <http://www.docstoc.com/search/honeybee.pollen>.
 10. Lyapunov YE, Khismatullin RG, Kuziaev RZ. Enterobacteria of honey bee pollen. Scientific Programme Apimondia. Ireland 2005; (336): 130.
 11. Kacániová M, Pavlicová S, HaPčík P, Kociubinski G, Kmazovická V, Sudzina M, *et al.* Microbial communities in bees, pollen and honey from Slovakia. Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 2009; 56(3): 285–295.
 12. Valdés G, García O, Ruiz M, Martín M, Giral T. Evaluación de las condiciones higiénicas del polen. Zootécnica. 1992; 2(1): 87-93.
 13. Valdés G, Martín M, García O, Ruíz M, Giral T. Evaluación de la calidad sanitaria de diferentes modelos de trampas de polen. Zootécnica. 1992; 2(1) 79-86.
 14. Fernández EE. Microbiología e inocuidad de los alimentos. 1ª ed. Universidad Autónoma de Querétaro. México; 2001. p. 13 – 53.
 15. Abd F, Hegazi AG, Mateescu Ch. La apiterapia y sus componentes. El polen. Apiterapia [CD ROM]. XXXVII Congreso Internacional de Apimondia, celebrado en Durban, Sudáfrica; 2001.
 16. Olivares M, Paz DRM, Gómez N, Lara VF, Sierra S, Maldonado JA, *et al.* The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. International Microbiology. 2006; 9: 47-52.
 17. Lara VF. Efectos beneficiosos en niños sanos del consumo de un producto lácteo que contiene dos cepas probióticas: *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 y *Lactobacillus gasseri* CECT5714. [Nutrición Hospitalaria: Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral](#). 2007; 22(4): 496-502.
 18. Wattiaux M. Introducción al proceso de ensilaje. Novedades lácteas [Internet]. 2002 [Consultada diciembre 2005]; 502. Disponible en: http://WWW.babcock.cals.wisc.edu/downloads/du/du_502.es.pdf.
 19. Villa FA, Menéndez PA, Carulla EJ, Pabón LM, Cárdenas AE. Estudio microbiológico y calidad nutricional del ensilaje de maíz en dos ecorregiones de Colombia. Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias. 2010; 23(1): 23-31.
 20. Thomas J M, Karl RM. Microbiología de los alimentos. Ed. Acribia, España; 2009.

21. Aranda ML, Cardenal JA, Álvarez JA y Pozo J. El polen. Control sanitario. Normas legales. Actualidad Apícola. 2001; 77: 14-15.
22. Acuña J. Plantas melíferas de Cuba. Serie Agrícola. 1970; 14: 29 – 48.
23. NRAG 931: 1994. Apicultura. Polen apícola. Métodos de ensayo.
24. Lane JH, Eynon L. Determination of reducing sugars by means of Fehling's solution with methylene blue as internal indicator. Food and Agriculture. 1923; 3: 19 – 25.
25. Playne M.J, McDonald P. The buffering constituents of Herbage and of Silage. Journal of Science of Food and Agriculture. 1966; 17: 264-268.
26. Oliveira KCL. Caracterização do pólen apícola e utilização de vitaminas antioxidantes como indicadores do processo de desidratação [Dissertação per optar al grau de Mestre de Ciências Farmacêutico]. Brazil: University of São Paulo; 2006.
27. Schmidt L, Weissbach F, Wernecke KD, Hein E. Erarbeitung von parametern für die Worhersage und Stuerung des Gärungsverlaufes bei der Grünfütter-silierung. Forschungsbericht, Oskar-Kernell-Institut für Tierernährung Rostok; 1971.
28. De la Roza DB. El ensilado en zonas húmedas y sus indicadores de calidad. IV Jornadas de Alimentación Animal. 2005 [Consultada diciembre 2009]. Disponible en: http://www.mouriscade.com/doc_ponencias/oct-2005/ensilado_zonas_humedas_e_indicadores_calidad.pdf.
29. Westra R. El arte de ensilar [Internet]. Argentina: Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto, Provincia de Córdoba; 2000. [Consultada junio 2006]. Disponible en: http://www.produccionbovina.com.ar/produccion_y_manejo_reservas/reservas_silos/40-arte_de_ensilar.htm.
30. Serra BJ, Gonell J, Gómez A. Estudio de la composición y características físico-química del polen de abejas. Alimentaria. 1986; 176(23): 63-67.
31. Brock TD, Madigan MT. Biology of microorganisms. 8th. ed. Prentice Hall. Madrid; 2000.
32. Human H, Nicolson SW. Nutritional content of fresh, bee-collected and stored pollen of *Aloe greatheadii* var. *davyana* (Asphodelaceae). Phytochemistry. 2006; 67: 1486–1492.
33. De Jong D, Manfrini MV, Turcatto PA, Aloar CF. Nutrición de las abejas [Internet]. 2009 [Consultada Marzo 2011] Disponible en: http://www.xibla.com.br/PDF/David_de_Jong1.pdf.
34. López HM, Wingching R, Augusto RBA. Características fermentativas y nutricionales del ensilaje de rastrojo de *Ananas comosus*. Agronomía Costarricense. 2009; 33(1): 1-15.

35. Betancourt M, González I, Martínez AM. Evaluación de la calidad de los ensilajes. Revista Digital CENIAP HOY [Internet]. 2005 [Consultada junio 2006]; 8. Disponible en: <http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n8/arti/betancourtm/betancourtm.htm>.
36. García A. El daño térmico en el ensilaje de alfalfa [Internet]. College of Agriculture & Biological Sciences / South Dakota State University / USDA. 2006 [Consultada en diciembre 2009]. Disponible en <http://WWW.agbiopubs.sdstate.edu/articles/ExEx4032S.pdf>.
37. Castillo M, Rojas A, Wing CR. Valor nutricional del ensilaje de maíz cultivado en asocio con vigna (*Vigna radiata*). Agronomía Costarricense. 2009; 33(1): 133-146.
38. Martín AM. Cambios bioquímicos durante el proceso de elaboración del pan de abejas a escala de laboratorio [Tesis presentada en opción del título de Licenciado en Ciencias Bioquímicas]. Ciudad Habana, Universidad de La Habana; 1992.
39. Tabío C, Alvarez JD, Berisiartu M. Caracterización preliminar del polen en la zona de El Cano en la provincia de La Habana. Ciencia y Técnica en la Agricultura. 1988; 4: 73-80.
40. Vit P, Herrera P, Rodríguez D, Carmona J. Caracterización de polen apícola fresco recolectado en Cacute, en los Andes Venezolanos. Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel. 2008; 32(2): 7-11.
41. Instrução Normativa nº 3, 2001. Anexos V-VI. Regulamento Técnico para Fixação e Qualidade de Pólen Apícola, Própolis. Brasil: Ministerio de Agricultura, Cría y Abastecimiento en Brasil, Secretário de Defesa Agropecuária.
42. González AV, León V, Quintana AR, Quiñones F. Determinación de la actividad de agua en el polen apícola y su correlación con la humedad. Vida Apícola. 2009; 156: 9-12.
43. Gibson M. (editor). Pharmaceutical preformulation and formulation. A practical guide from candidate drug selection to commercial dosage form. Interpharm CRC. Washinton DC. USA. 2004.