

ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE EXTRACTOS ETANÓLICOS DE POLEN CHILENO DE *APIS MELLIFERA* FRENTE A *E. COLI*, *S. AUREUS* Y *B. SUBTILIS*

Mireya Ahumada Molina^a

Matías Barra Niedbalski^{a*}

Alexander Eger Domenichini^a

Amany Chaaban Díaz^a

Antonio Leporati Verdugo^a

^aEstudiante de Medicina, Facultad de Medicina Clínica Alemana de Santiago - Universidad del Desarrollo.

Artículo recibido el 20 de septiembre, 2021. Aceptado en versión corregida el 06 de diciembre, 2021.

RESUMEN

Introducción: La resistencia antibiótica constituye uno de los mayores problemas en la medicina actual, por lo que surge la necesidad de buscar nuevas alternativas. El polen corbicular, generado por las abejas melíferas al mezclar polen de flores con secreciones bucales propias, posee gran cantidad de polifenoles. Se ha descrito que los polifenoles presentan actividad antibacteriana. Estos son capaces de interactuar con la pared bacteriana y destruir su integridad. Chile presenta una rica actividad apícola, y además posee una gran variedad de pólenes distintos debido a su flora variada y sus diversos biotopos. **Hipótesis:** Los extractos etanólicos de polen corbicular chileno de la V y VI región presentan actividad antibacteriana, la cual está relacionada con la concentración total de fenoles. **Diseño:** Se realizaron extracciones de fenoles totales con dos solventes (agua destilada y etanol 70%) a 8 muestras de pólenes obtenidos de la V y VI región de Chile. Se caracterizaron en función de su contenido fenólico total mediante el método de Folin Ciocalteu y su actividad antibacteriana frente a *E. Coli*, *S. Aureus* y *B. Subtilis* mediante el porcentaje de inhibición. **Resultado:** Las extracciones etanólicas presentaron contenido fenólico mayor que las acuosas. Los extractos etanólicos presentaron actividad antibacteriana frente a las tres bacterias. No se obtuvo una relación entre el contenido fenólico y la actividad antibacteriana. **Conclusión:** El polen corbicular utilizado presenta actividad antibacteriana independientemente de las concentraciones fenólicas, por lo que es necesario mayores estudios para identificar la variable responsable.

Palabras clave: Polen, Fenoles, *Staphylococcus Aureus*, *Bacillus Subtilis*, *Escherichia Coli*.

INTRODUCCIÓN

Hoy en día, una de las problemáticas más importantes en medicina es la resistencia a antibióticos^{1,2}. Esta crisis se debe principalmente al uso excesivo y prescripción incorrecta de estos fármacos. Por otro lado, en los últimos años las empresas farmacéuticas han disminuido la producción de antibióticos nuevos ya que no son el negocio más rentable dentro de la industria, puesto que se utilizan por períodos relativamente cortos, a diferencia de medicamentos para enfermedades crónicas^{3,4}. Esto limita farmacológicamente el poder tratar enfermedades bacterianas, por lo que surge la necesidad de encontrar nuevas alternativas de tratamiento.

El polen es el gameto masculino de la flor. Las abejas (*Apis mellifera*) recolectan el polen, lo combinan con néctar y secreciones bucales⁵, a este tipo de polen se le denomina corbicular. Mediante ensayos in vitro, se le han atribuido diferentes propiedades al polen recolectado por abejas, como antioxidantes, antibacterianas, antifúngicas y antiinflamatorias, entre otras^{6,7}. Las propiedades del polen van a depender de la flora de la cual es extraída, la estación del año, la geografía que lo rodea, y de la subespecie que lo recolecta, entre otros⁸. Chile es uno de los países con mayor actividad apícola a nivel latinoamericano, teniendo más de 400.000 colmenas explotadas⁹.

Junto a esto, se suma el hecho de que Chile posee diversos biotopos y consecuentemente presenta una flora muy variada, lo que se traduce en una gran variedad de pólenes¹⁰.

La actividad antibacteriana del polen se atribuye principalmente a la presencia de polifenoles como flavonoides y polifenoles ácidos. Estos tienen la capacidad de formar complejos con la pared celular interrumpiendo su integridad, bloqueando los canales e inhibiendo el flujo de electrones en la cadena transportadora de electrones. Además, se ha descrito que pueden bloquear la bomba efflux, la cual es un tipo de mecanismo con el cual la bacteria es capaz de generar resistencia^{11,12}. Cabe destacar que se ha descrito en el polen derivado de plantas nativas chilenas posee un contenido fenólico importante¹³ y, paralelamente se ha descrito en otros países que la cantidad fenólica total se relaciona directamente con la actividad antimicrobiana^{14,15}.

Dados los antecedentes expuestos, el polen corbicular chileno es una alternativa interesante para disminuir el uso de antibióticos, además que comprobar dichas atribuciones podría tener efectos económicos sobre la producción apícola del país. De ahí nace la idea de este estudio, donde se evalúa la actividad antibacteriana de extractos etanólicos del polen apícola en las bacterias *Escherichia Coli*, *Staphylococcus Aureus* metilicina resistente, y *Bacillus Subtilis*. Las tres bacterias han sido utilizadas

*Correspondencia: mabarran@udd.cl
2021, Revista Confluencia, 4(2), 30-35



para evaluar la actividad antibacteriana en estudios de distintos países¹⁴⁻¹⁶.

Hipótesis: Los extractos etanólicos de polen corbicular chileno de la V y VI región presentan actividad antibacteriana, la cual está relacionada con la concentración total de fenoles.

Objetivo general: Determinar si extractos etanólicos de polen apícola chileno presentan actividad antibacteriana en relación a su concentración de fenoles totales frente a *E. Coli*, *S. Aureus* y *B. Subtilis*.

Objetivos específicos:

1. Caracterizar los distintos extractos de pólenes apícolas en base a su contenido fenólico total.
2. Caracterizar los distintos extractos de pólenes apícolas en base a su actividad antibacteriana.
3. Determinar la correlación lineal entre contenido fenólico total y la actividad antibacteriana.

METODOLOGÍA

Diseño experimental

La población estudiada estuvo compuesta de muestras de pólenes corbiculares de la V y VI región de Chile. Se realizó la extracción de fenoles totales a una muestra de 8 tipos diferentes de polen con dos solventes: agua destilada y etanol 70%. Posteriormente se calculó la concentración fenólica total de los 16 extractos utilizando el reactivo de Folin Ciocalteu.

Se realizaron diluciones seriadas de las bacterias: *E. Coli*, *S. Aureus* y *B. Subtilis* para la obtención del título celular. Luego se mezclaron cada una de las bacterias con los extractos obtenidos y se determinó la actividad antibacteriana a 1 y 18 horas de incubación. Se cuantificó la actividad antibacteriana de los extractos a través del porcentaje de inhibición de crecimiento y se compararon con un control sin extracto de polen.

Extracción de fenoles totales

Se utilizó 1 gramo de cada muestra de polen, las cuáles se maceraron, homogeneizaron y se extrajeron los fenoles utilizando 7,5 ml de una solución de etanol al 70% o agua destilada, obteniéndose 16 extractos de pólenes (8 etanólicos y 8 acuosos).

Se incubaron en un baño termostático a una temperatura de 70°C por 30 minutos. Se centrifugaron a 2500 rpm por 10 minutos y el sobrenadante se traspasó a otro tubo. Finalmente, los extractos fueron liofilizados y resuspendidos en agua al mismo volumen inicial.

Medición del contenido de Fenoles totales

Los extractos acuosos y etanólicos de polen se diluyeron 1:10 y posteriormente a 100 µL de cada uno, por triplicado, se les agregó 500 µL del reactivo de Folin-Ciocalteu (diluido 1:10 en agua destilada), se

agitaron por 30 segundos y se dejaron reposar por 2 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se les agregó 400 µL de Na₂CO₃ (75 mg/L), se incubaron por 15 minutos a 50°C en el termobloque y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Luego se midió la absorbancia de cada una de las muestras a una longitud de onda de 760 nm. Se realizó una curva estándar de ácido gálico, la cual se utilizó para el cálculo de contenido de fenoles de la muestra.

Porcentaje de inhibición

Las bacterias se cultivaron previamente en medio LB semisólido a 37°C durante 24 horas. Se prepararon diluciones de 0,5 McF de cada una de las bacterias y se calculó sus respectivos títulos. Posteriormente se incubaron 100 µL de una suspensión de 10⁶ UFC/mL en medio LB líquido junto con 20 µL de extractos etanólicos de polen y 80 µL de LB por 1 o 18 horas. Después se realizaron diluciones seriadas de 1:10 de las soluciones previamente incubadas y se sembraron gotas de 10 µL por triplicado en placas con medio LB semisólido. Las placas se incubaron a 37°C por 18 horas y se realizó el conteo de colonias aisladas. Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de inhibición de crecimiento} = \left(1 - \frac{\left(\frac{\text{UFC / mL suspensión bacteriana con extracto de polen}}{\text{UFC/mL Control}} \right) \right) \times 100.$$

Análisis estadístico

Se utilizó el programa GraphPad Prism 8®. Para todas las pruebas de diferencias de medias se utilizó ANOVA de un factor con pruebas posteriores post-hoc Tukey. Además, se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido fenólico total y la actividad antibacteriana.

Requerimientos bioéticos

Este trabajo está libre de implicaciones bioéticas y se apega a las normas de ética en investigación.

RESULTADO

Caracterización de los distintos extractos de pólenes apícolas en base a contenido fenólico total

En primer lugar, se comparó el contenido fenólico total obtenido mediante extracciones etanólicas y acuosas y se obtuvo que la extracción etanólica obtiene una concentración de fenoles estadísticamente significativamente mayor a la extracción acuosa ($p < 0.0001$).

Las distintas extracciones presentaron diferentes concentraciones de fenoles, siendo el mayor promedio de concentración de 126,194 µgEAG/ml ($p < 0,05$) (Tabla 1).



Caracterización de los distintos extractos de pólenes apícolas en base a su actividad antibacteriana

En cuanto a la actividad antibacteriana frente a E. Coli, luego de una hora de incubación, solamente dos muestras de polen presentaron actividad antibacteriana significativa respecto al control ($p < 0,05$). El resto de muestras no presentaron actividad antibacteriana significativa ($p > 0,05$) (Figura 1A).

En la actividad antibacteriana frente a S. Aureus, luego de una hora de incubación, se obtuvo que solamente una muestra presentó actividad antibacteriana significativa en comparación al control ($p < 0,05$) y los otros no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$) (Figura 1B).

Frente a B. Subtilis, luego de una hora de incubación, todos los pólenes presentaron actividad antibacteriana significativa, superior al 90% de inhibición ($p < 0,0001$) (Figura 1C).

Al incubar S. Aureus junto a los extractos de polen por un periodo de 18 horas, todos los pólenes presentaron un porcentaje de inhibición mayor que el control ($p < 0,0001$) (Figura 1D).

Por último, los resultados de E. Coli a 18 horas no pudieron ser cuantificados, ya que en el control no se pudieron contar colonias aisladas dada la densidad de bacterias en la microgota (Figura 1E). Sin embargo, cualitativamente se observó actividad ya que en las placas con extractos sí se pudieron contar colonias aisladas (Figura 1F).

Relación entre contenido fenólico total y la actividad antibacteriana.

Tanto en E. Coli a 1 hora ($r = -0,4782$), S. Aureus 1 hora ($r = 0,3361$) y 18 horas ($r = 0,3981$), y B. Subtilis a 1 hora ($r = 0,4810$), no se obtuvo una relación significativa entre el contenido fenólico total y el porcentaje de inhibición ($p > 0,05$) (Figuras 2A, 2B, 2C, 2D).

Tabla 1: Caracterización del polen corbicular*.

Muestras	Concentración fenólica total promedio Extracción con etanol ($\mu\text{gEAG/mL}$) (n=24)	Concentración fenólica total promedio Extracción con agua destilada ($\mu\text{gEAG/mL}$) (n=24)
Polen 1	54,88	15,71
Polen 2	72,58	13,21
Polen 3	52,72	23,49
Polen 4	126,19	18,97
Polen 5	48,90	11,47
Polen 6	40,57	17,03
Polen 7	35,78	20,15
Polen 8	42,44	9,88
Promedio	57,99****	16,24****

*Las muestras de polen fueron extraídas con agua y etanol. El contenido fenólico de los extractos etanólicos y acuosos (n=24) fueron determinados mediante el método Folin-Ciocalteu, se interpoló la absorbancia en la curva de ácido gálico para obtener concentración, **** $p < 0,0001$.

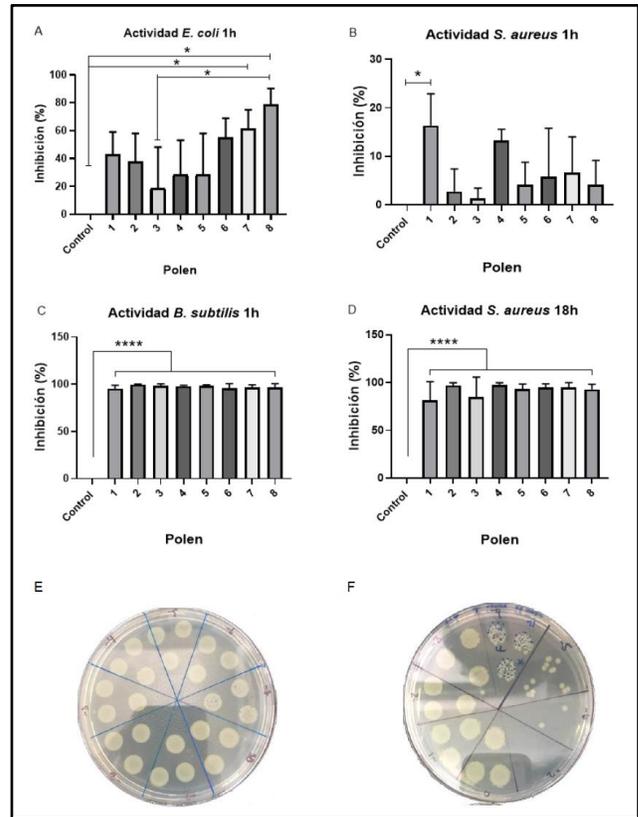


Figura 1. Actividad antibacteriana. (A-D) Se determinó la actividad antibacteriana de los extractos fenólicos etanólicos de polen corbicular (n = 8) contra las bacterias E. coli a 1 hora (A), S. aureus a 1 y 18 horas (B, D) y B. subtilis a 1 hora (C). Los datos fueron analizados mediante ANOVA. (E, F) Fotografías de placas de Petri con E. coli, actividad a 1 (E) y 18 horas (F). * $p < 0,05$ y **** $p < 0,0001$.

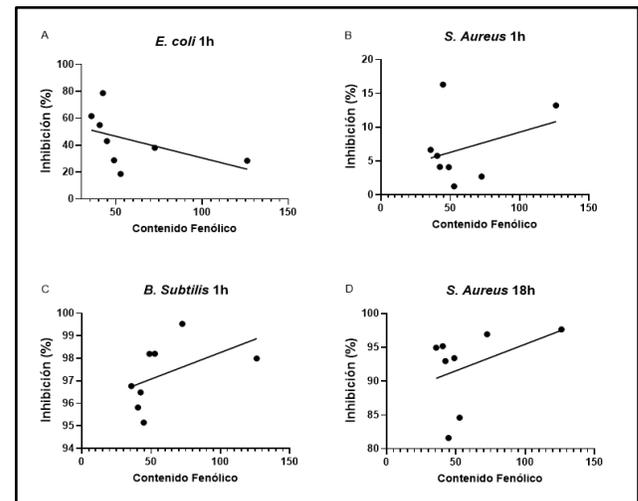


Figura 2. Correlación entre contenido fenólico y porcentaje de inhibición de los extractos etanólicos de polen. Se calculó el coeficiente de correlación de Pearson entre el contenido fenólico total y la inhibición (%) contra (A) E. Coli a 1 hora de incubación ($r = -0,4782$; $R^2 = 0,2287$). (B) S. Aureus a 1 hora de incubación ($r = 0,3361$; $R^2 = 0,1130$). (C) B. Subtilis a 1 hora de incubación ($r = 0,4810$; $R^2 = 0,2314$). (D) S. Aureus a 1 hora de incubación ($r = 0,3981$; $R^2 = 0,1585$). Se consideraron coeficientes significativos p -valor $< 0,05$.



DISCUSIÓN

La industria apícola se ha caracterizado por la generación de la miel como principal producto de la colmena. Ésta ha sido ampliamente caracterizada con propiedades antivirales, antioxidantes, y antibacterianas, entre otras¹⁷. Sin embargo, en los últimos años también existe un aumento de estudios sobre otros productos derivados de la colmena, entre ellos, propóleo, cera y polen¹⁷⁻¹⁹. El polen corbicular es una mezcla de las secreciones salivales y gástricas de las abejas melíferas y el polen que la planta genera. Estudios internacionales le han atribuido diferentes propiedades al polen corbicular, como antiinflamatorias, antioxidantes y antibacterianas, entre otras^{6,11}. El principal mecanismo de acción de los fenoles es la interrupción de la integridad de la pared, pero también se ha descrito el bloqueo de la bomba efflux¹².

En este estudio se comprobó que la extracción de fenoles, utilizando etanol 70% como solvente, permite obtener un mayor contenido fenólico que utilizando agua destilada como solvente, lo que se condice con la literatura¹⁵. Debido a los bajos contenidos fenólicos que se obtuvieron en la extracción acuosa, se decidió no utilizarlos para caracterizar la actividad antibacteriana del polen (Tabla 1).

Además, se estudió la actividad antibacteriana frente a distintas especies. En base a los antecedentes del mecanismo antibacteriano que poseen los fenoles^{11,12} y estudios anteriores²⁰, se esperaba que las bacterias Gram (+) fueran más susceptibles que las Gram (-). Sin embargo, luego de 1 hora de incubación, tan solo un extracto presentó un porcentaje de inhibición significativamente mayor al control para *S. Aureus* (Figura 1B), mientras que para *E. Coli* dos pólenes presentaron actividad significativa (Figura 1A). Esto podría deberse a que la cepa de *S. Aureus* utilizada era de origen clínico metilino resistente, afectando la actividad de los fenoles.

Por lo anterior, se incluyó otra bacteria Gram (+) en el estudio, *B. Subtilis*. Investigaciones previas que utilizaron esta bacteria, a 24 horas de incubación, presentaron actividad antibacteriana²¹. En este estudio, al incubar *B. Subtilis* junto con los extractos por 1 hora, se obtuvo que los 8 extractos presentaron un porcentaje de inhibición significativamente mayor al control, siendo todos superior al 90% (Figura 1C).

Luego, se incubaron las bacterias con los extractos durante un tiempo más prolongado con el fin de determinar si esta variable influye en la actividad antibacteriana frente a *S. Aureus* y *E. Coli*. En relación a *S. Aureus*, existen estudios que han demostrado actividad antibacteriana de pólenes de Eslovaquia¹⁵, Grecia²² y Egipto²³ con tiempos de incubación de 24 horas. En este estudio se incubó *S. Aureus* junto con los extractos fenólicos durante 18 horas. Todos los extractos presentaron porcentajes de inhibición significativamente superiores al control;

en promedio se obtuvo un 92.17% de inhibición (Figura 1D). Posiblemente esto se explica porque, si bien la bacteria puede presentar algún mecanismo de resistencia, los fenoles poseen variados mecanismos de acción específicos, los cuales la bacteria no puede contrarrestar en exposiciones prolongadas. Por lo tanto, la multiresistencia de esta bacteria sólo dificulta temporalmente la actividad antibacteriana.

En la literatura, pólenes de Marruecos¹⁶, Grecia²² y Portugal²⁴ no presentaron actividades frente a *E. Coli* a 24 y 48 horas de incubación, lo que se contrasta con pólenes de Eslovaquia¹⁴ y Egipto²³. En esta investigación se incubó *E. Coli* por 18 horas y se observó una inhibición del crecimiento, pero no pudo ser cuantificada dado que no se pudo contabilizar colonias aisladas en el control (Figuras 1E y 1F). Posiblemente, para calcular un porcentaje de inhibición a 18 horas para esta bacteria es necesario trabajar con una dilución de densidad bacteriana menor en el ensayo. Para futuros estudios se sugiere determinar el porcentaje de inhibición a distintas horas de incubación frente a estas dos bacterias, con el fin de determinar a qué tiempo se obtienen porcentajes de inhibición significativos.

La resistencia a antibióticos es una problemática actual¹⁻². En base a los resultados obtenidos de la actividad antibacteriana, el polen chileno parece ser una alternativa para disminuir el uso de antibióticos. En este estudio se observó que tiene un efecto antibacteriano significativo frente a bacterias de importancia clínica como *E. Coli* y *S. Aureus*, ambas responsables de diversas patologías como enteritis, infecciones en el tracto urinario, infecciones cutáneas, y neumonía, entre otras^{25,26}.

Finalmente, se determinó la relación entre el contenido fenólico total y la actividad antibacteriana. En ninguna de las series se obtuvo una relación entre estas dos variables (Figura 2). Dado que la actividad no se relaciona con la concentración fenólica total, se plantea que la actividad antibacteriana se podría relacionar con el tipo de fenol que contiene. Se ha descrito que los flavonoides poseen mayor actividad antioxidante que polifenoles ácidos, esto gracias a la presencia de mayor cantidad de grupos hidroxilos y la posición de estos¹¹. Asimismo, se ha descrito que la actividad antibacteriana se relaciona con la actividad antioxidante²⁷. En consecuencia, los flavonoides corresponden a un buen candidato de estudio para explicar la actividad antibacteriana del polen chileno.

CONCLUSIÓN

En este estudio se caracterizaron pólenes chilenos en base a su contenido fenólico y actividad antibacteriana y, además, se determinó si existe una asociación entre estas variables. Los extractos etanólicos de polen corbicular de la V y VI región presentan actividad antibacteriana frente a *B. Subtilis*, *E. Coli* y *S. Aureus*, por lo tanto, podrían constituir una



novedosa alternativa para enfrentar el problema de la resistencia a antibióticos. Sin embargo, se determinó que la actividad antibacteriana no se relaciona con la concentración fenólica total de los pólenes por lo que se requieren estudios adicionales para determinar la variable a la cual se le atribuye la propiedad antibacteriana.

Limitaciones

Se utilizó una muestra pequeña de pólenes de dichas regiones, lo que limita que se puedan extrapolar los datos.

Proyecciones

Se sugiere comparar la actividad de los extractos de polen con un *gold standard* para evaluar la potencia de su actividad antibacteriana. También determinar si existe relación entre la concentración de flavonoides y la actividad antibacteriana de los extractos de polen chileno. Finalmente, evaluar la utilidad clínica de los extractos de polen.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance [Internet]. Ginebra: WHO; 2014 [citado el 22 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/112642>
2. World Health Organization. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance [Internet]. Ginebra: WHO; 2014 [citado el 22 de agosto de 2021]. Disponible en: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/163468/9789241564946_eng.pdf;sequence=1
3. Frieden T. Antibiotic resistance threats in the United States [Internet]. USA: Centers for Disease Control and Prevention; 2013 [citado el 22 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/drugresistance/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>
4. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. Pharmacy and Therapeutics [Internet]. 2015 [citado el 22 de agosto de 2021];40(4):277-83. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/pmc4378521/>
5. Salamanca Grosso G, Hernández López J, Osorio Tangarife M. Componentes fenólicos del polen coribicular Colombiano y su capacidad antioxidante y antirradicalaria. ACCB [Internet]. 2017 [citado 22 de agosto de 2021];1(29):86-97. Disponible en: <https://revistaaccb.org/r/index.php/accb/article/view/146>
6. Denisow B, Denisow-Pietrzyk M. Biological and therapeutic properties of bee pollen: a review. J Sci Food Agric [Internet]. 2016 [citado 22 de agosto de 2021];96(13):4303-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1002/jsfa.7729>
7. Komosinska-Vassef K, Olczyk P, Kaźmierczak J, Mencner L, Olczyk K. Bee pollen: chemical composition and therapeutic application. Evid Based Complement Alternat Med [Internet]. 2015 [citado 22 de agosto de 2021];2015:297425. Disponible en: <https://doi.org/10.1155/2015/297425>
8. Cullen N, Xia J, Wei N, Kaczorowski R, Arceo-Gómez G, O'Neill E, Hayes R, Ashman TL. Diversity and composition of pollen loads carried by pollinators are

primarily driven by insect traits, not floral community characteristics. Oecologia [Internet]. 2021 [citado el 22 de agosto de 2021];196(1):131-43. Disponible en: <https://doi.org/10.1007/s00442-021-04911-0>

9. Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Apicultura [Internet]. Santiago: ODEPA; 2021 [citado el 26 de agosto, 2018]. Disponible en: <https://www.odepa.gob.cl/rubros/apicultura>
10. Biblioteca del Congreso Nacional. Chile Nuestro País [Internet]. Santiago: BCN; 2021 [citado el 23 de agosto de 2021]. Disponible en: <https://www.bcn.cl/siit/nuestropais/index.html>
11. Rzepecka-Stojko A, Stojko J, Kurek-Górecka A, Górecki M, Kabała-Dzik A, Kubina R, Moździerz A, Buszman E. Polyphenols from Bee Pollen: Structure, Absorption, Metabolism and Biological Activity. Molecules [Internet]. 2015 [citado el 23 de agosto de 2021];20(12):21732-49. Disponible en: <https://doi.org/10.3390/molecules201219800>
12. Rempe CS, Burris KP, Lenaghan SC, Stewart CN Jr. The potential of systems biology to discover antibacterial mechanisms of plant phenolics. Front. Microbiol [Internet]. 2017 [citado el 23 de agosto de 2021];8:422. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00422>
13. Montenegro G, Pizarro R, Mejías E, Rodríguez S., Evaluación biológica de polen apícola de plantas nativas de Chile. Phytol [Internet]. 2013 [citado el 23 de agosto de 2021];82(1). Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?pid=S1851-56572013000100002&script=sci_arttext&lng=en
14. Fatrcová-Šramková K, Nůžková J, Kačániová M, Máriássyová M, Rovná K, Stričík M. Antioxidant and antimicrobial properties of monofloral bee pollen. J Environ Sci Health B [Internet]. 2013 [citado el 23 de agosto de 2021];48(2):133-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1080/03601234.2013.727664>
15. Kacániová M, Vuković N, Chlebo R, Haščík P, Rovna K, Cubon J, Pasternakiewicz A. The Antimicrobial Activity of Honey, Bee Pollen Loads and Beeswax from Slovakia. Arch. Biol. Sci. [Internet]. 2012 [citado el 23 de agosto de 2021];64(3):927-34. Disponible en: <https://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=RS2012001892>
16. Abouda Z, Zerdani I, Kalalou I, Faid M, Ahami MT. The Antibacterial Activity of Moroccan Bee Bread and Bee-pollen (fresh and dried) against Pathogenic Bacteria. J. Microbiol [Internet]. 2011 [citado el 23 de agosto de 2021];6(4):376-84. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.3923/jm.2011.376.384>
17. Hernández J, Fernández V, Sulbarán B. Caracterización fisicoquímica, actividad antioxidante y contenido de polifenoles totales en pulpa de lechosa (Carica papaya). Observador del Conocimiento [Internet]. 2014 [citado el 23 de agosto de 2021];2(1):195-201. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/284712402>
18. Chen YW, Ye SR, Ting C, Yu YH. Antibacterial activity of propolins from Taiwanese green propolis. J Food Drug Anal [Internet]. 2018 [citado el 23 de agosto de 2021];26(2):761-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.10.002>
19. Fratini F, Cilia G, Turchi B, Felicioli A. Beeswax: A minireview of its antimicrobial activity and its application in medicine. Asian Pac J Trop Med [Internet]. 2016



- [citado el 23 de agosto de 2021];9(9):839-43. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.07.003>
20. Bridi R, Atala E, Pizarro PN, Montenegro G. Honeybee Pollen Load: Phenolic Composition and Antimicrobial Activity and Antioxidant Capacity. *J Nat Prod* [Internet]. 2019 [citado el 23 de agosto de 2021];82(3):559-65. Disponible en: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.8b00945>
 21. Vit P, Pedro SR, Roubik DW. *Pot-Pollen in Stingless Bee Melittology*. Springer; 2018 [citado el 23 de agosto de 2021];380-9.
 22. Graikou K, Kapeta S, Aligiannis N, Sotiroudis G, Chondrogianni N, Gonos E, Chinou I. Chemical analysis of Greek pollen - Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. *Chem Cent J* [Internet]. 2011 [citado el 23 de agosto de 2021];5(1): 33. Disponible en: <https://dx.doi.org/10.1186%2F1752-153X-5-33>
 23. Khider M, Elbanna M, Mahmoud A, Owayss AA. Egyptian Bee Pollen as Antimicrobial, Antioxidant Agents, and Dietary Food Supplements. *Food Sci Biotechnol* [Internet]. 2013 [citado el 23 de agosto de 2021];22:1-9. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10068-013-0238-y>
 24. Pascoal A, Rodrigues S, Teixeira A, Feás X, Estevinho LM. Biological activities of commercial bee pollens: antimicrobial, antimutagenic, antioxidant and anti-inflammatory. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2014 [citado el 23 de agosto de 2021];63:233-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.11.010>
 25. Kolenda R, Burdukiewicz M, Schierack P. A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2015 [citado el 23 de agosto de 2021];5:23. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2015.00023>
 26. Lee AS, de Lencastre H, Garau J, Kluytmans J, Malhotra-Kumar S, Peschel A, Harbarth S. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* [Internet]. 2018 [citado el 23 de agosto de 2021];4(1): 18033. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
 27. Mohdaly AA, Mahmoud AA, Roby MH, Smetanska I, Ramadan MF. Phenolic Extract from Propolis and Bee Pollen: Composition, Antioxidant and Antibacterial Activities. *J Food Biochem* [Internet] 2015 [citado el 23 de agosto de 2021];39(5):538-47. Disponible en: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12160>

