

# El própolis y la salud

## *Propolis and human health*

FARRÉ R, FRASQUET I, SÁNCHEZ A

Área de Nutrición y Bromatología

Dpto. de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología, Toxicología y Medicina Legal. Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia. Avda. Vicent Andrés Estellés s/n 46100 Burjassot (Valencia).  
rosaura.farre@uv.es

### RESUMEN

El própolis es una resina cérea, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena. Ampliamente utilizado desde la antigüedad con diversas finalidades, actualmente se investigan las acciones, efectos y posibles usos del própolis en biología y medicina, destacando su utilización como suplemento dietético y en la industria farmacéutica.

En este trabajo se revisan las pruebas disponibles sobre las propiedades del própolis en el tratamiento y prevención de distintos tipos de trastornos y para ello, tras un breve repaso a su origen y composición, se realiza una búsqueda exhaustiva de la información bibliográfica disponible sobre sus propiedades, los parámetros utilizados para evaluar su calidad y sus posibles efectos secundarios.

Los resultados obtenidos confirman su eficacia, principalmente, como antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano.

PALABRAS CLAVE: Própolis. Actividad biológica. Indicaciones. Evaluación de la calidad. Efectos secundarios.

### ABSTRACT

*Propolis is a waxy resin, with a complex composition and viscous consistency, elaborated from different resinous vegetable particles by bees and used in the construction, repair and protection of their hives. Since ancient times propolis has been widely used for diverse purposes. Currently, the activity, effects and possible applications of propolis in biology and medicine are being investigated, with an emphasis on their use as a dietary supplement, as well as their possible applications within the pharmaceutical industry.*

*In this work a review on the properties of propolis in the treatment and prevention of different types of diseases has been carried out. After a brief review of the origin and composition of propolis, an exhaustive bibliographical search of its properties, the parameters used to evaluate its quality, and its possible indirect effects has been carried out. According to the studies reviewed, the effectiveness of propolis lays mainly in its antioxidant, anti-inflammatory and anti-microbial activities.*

KEY WORDS: Propolis. Biological activity. Review of studies.

### INTRODUCCIÓN

Se da el nombre de própolis, en griego significa defensor de la ciudad, entendida ésta como sinónimo de colmena, a una resina cérea, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas elaboran y utilizan en la construcción, reparación, aislamiento y protección de la colmena<sup>1-4</sup>.

### INTRODUCTION

The term propolis originates from Greek and means defender of the city. With respect to beehives, it is understood as being synonymous with a wax like resin with a complex composition of viscous consistency, produced by bees for use in the construction, repair, insulation and protection of the hive<sup>1-4</sup>.

Las abejas (*Apis mellifera*), recogen con sus mandíbulas, partículas resinosas de las yemas, brotes y pecíolos de las hojas de diferentes vegetales (olmo, álamo, sauce, abedul, castaño de Indias, pino, abeto, roble y algunas herbáceas) que, una vez en la colmena, mezclan con cera y secreciones salivares para obtener el própolis, cuya producción anual (10-300 g/colmena) difiere en función de la variedad de abejas, el clima, la flora y el dispositivo de recogida<sup>3,5,6</sup>.

Gracias a su contenido en aceites esenciales, el própolis suele ser aromático y en función de su origen botánico y de la época de recolección, difiere en color (de amarillo claro a castaño oscuro), sabor (amargo, ligeramente picante o insípido) y consistencia<sup>1,3,7</sup>. El própolis se recoge de las colmenas por medio de trampas o raspado, siendo el atrapado el método que ofrece mejor calidad y menor contaminación<sup>8</sup>, la recolección se hace antes de la llegada del invierno en las regiones templadas y, en los climas tropicales, al inicio de la estación lluviosa, cuando la propolización parece más activa<sup>3</sup>. Tanto en la recolección como en el procesado deben aplicarse rigurosas normas de higiene para evitar la contaminación y la subsiguiente pérdida del valor comercial del producto<sup>8</sup>.

Al igual que la miel, el própolis se conoce desde la más remota antigüedad y ha sido ampliamente utilizado por diferentes culturas con diversas finalidades, entre ellas en medicina<sup>1,3,4</sup>. Con el posterior desarrollo de la química farmacéutica, y al igual que ocurrió con los tratamientos fitoterápicos, el própolis dejó prácticamente de utilizarse. Recientemente, se observa un resurgir en su uso y actualmente se investigan sus acciones, efectos y posibles usos en biología y medicina, entre los que destacan su aplicación como suplemento dietético y en la industria farmacéutica<sup>3,4,7,9</sup>.

En este trabajo se revisan las pruebas disponibles sobre las propiedades del própolis en el tratamiento y prevención de distintos tipos de trastornos y para ello se hace un breve repaso del origen y la composición del própolis y más exhaustivo de la información bibliográfica disponible sobre sus propiedades.

Bees (*Apis mellifera*), collect resinous particles from leaf buds, shoots and petioles of leaves from different vegetables (elm, poplar, willow, birch, hoarse chestnut, pine, fir, oak trees and some herbaceous plants) with their mandibles, which once introduced into the hive are mixed with wax and salivary secretions, in order to obtain propolis. Annual production (10-300g/hive) varies in accordance with the variety of bee, the climate, the flora and the collection mechanism used<sup>3,5,6</sup>.

Thanks to its content in essential oils, propolis is usually aromatic and, in accordance with its botanical origin and the season in which it is harvested, varies in colour (from light yellow to dark chestnut), taste (bitter, slightly spicy or insipid), or consistency<sup>1,3,7</sup>. Propolis is collected from beehives through the use of traps or through scraping methods. However, it is the use of traps from which the highest quality propolis is obtained, due to a lower degree of contamination<sup>8</sup>. Harvesting is carried out before the arrival of the winter season in the temperate climates, while in tropical zones, harvesting takes place on commencement of the rainy season, which is the period when propolis production appears to be more active<sup>3</sup>. As much in the collection, as well in processing, rigorous standards of hygiene should be applied, in order to avoid contamination of the product and the subsequent loss of its commercial value<sup>8</sup>.

As in the case of honey, propolis has been known to mankind from the remotest of ancient times and has been widely used by different cultures for differing purposes, among which its use in medicine is included<sup>1,3,4</sup>. However, since the subsequent development of pharmaceutical chemistry, as has equally occurred in case of phytotherapeutic treatments, propolis practically fell into disuse. However, more recently there has been a resurgence in its use, and currently, research is being carried out on its activity, effects and possible uses in biology and medicine. The most prominent are its application as a dietary supplement and its use in the pharmaceutical industry<sup>3,4,7,9</sup>.

In the present work, the evidences available on the properties of propolis in the treatment and prevention of varying types of disorders are revised, and in order to do so, a brief revision of the origin and composition of propolis, as well as a more exhaustive appraisal of the literature

## ORIGEN BOTÁNICO Y COMPOSICIÓN

En las zonas templadas la mayor parte del própolis procede del exudado de brotes de chopos o álamos pertenecientes al género *Populus spp*; en la zona septentrional de Rusia, de los brotes de abedul (*Betula verrucosa*) y de *P. tremula*<sup>10-12</sup>; en las regiones mediterráneas, de las choperas y de las hojas de *Cistus spp.*<sup>13</sup>; en Brasil de las hojas de especies de *Baccharis dracunculifolia*<sup>6,11</sup>; en Venezuela y Cuba de la resina floral del género *Clusia*<sup>14</sup> y en zonas más tropicales se obtiene de otros vegetales<sup>10</sup>.

Los própolis pueden clasificarse en función de su origen geográfico y, aunque los datos relativos a los contenidos de flavonoides y ésteres fenólicos de los própolis europeos y de América del Norte son incompletos, se sabe que los própolis del género *Populus spp* contienen una mezcla de agliconas flavónicas, ácidos hidroxicinámicos y sus ésteres; que la variedad rusa contiene básicamente agliconas flavónicas y la brasileña derivados carbono-prenilados del ácido p-cumárico<sup>11</sup>. De hecho la composición del própolis, muy compleja y variada en función de la diversidad fitogeográfica de las zonas de recolección, aporta información útil sobre sus propiedades, origen botánico y localización geográfica<sup>15-17</sup>.

Aunque los principales componentes del própolis son los flavonoides y los ácidos fenólicos y sus ésteres, los métodos de análisis de que se disponen en la actualidad permiten detectar un número cada vez mayor de compuestos en el mismo, comprobándose que la variabilidad en la composición es muy elevada por lo que se considera necesario proseguir con los estudios para un mejor conocimiento de sus componentes<sup>3,18</sup>.

En el própolis europeo, el contenido total en fenoles, principales responsables de la mayoría de sus propiedades farmacológicas, representa más de la mitad de los 160 compuestos diferentes identificados en él<sup>11,19</sup>. Sin embargo, algunas muestras suizas e italianas muestran composiciones inusuales (Tabla 1), con contenidos de bencil p-cumarato y de bencil ferulato bastante altos (>5%), relativa escasez de compuestos fenólicos y ausencia de algunos compuestos típicos (pinobanksina y prenil cafeatos) del própolis procedente del *P.nigra*<sup>12</sup>. Los própolis turcos<sup>20</sup>, egipcios<sup>21-23</sup>, brasileños<sup>14,18,24</sup>, de Chile<sup>25-26</sup> y de Cuba<sup>14</sup> de procedencias botánicas distintas muestran composiciones variadas, y en algunos casos

information available on its properties, has been carried out.

## BOTANICAL ORIGIN AND COMPOSITION

In temperate zones, propolis mainly comes from the exudate from the black poplar buds or from poplars belonging to the genus *Populus spp*; in the northern area of Russia from birch buds (*Betula verrucosa*) and *P.tremula*<sup>10-12</sup>; in Mediterranean regions from black poplars and from the leaves of *Cistus spp.*<sup>13</sup>; in Brazil from the leaves of some species of *Baccharis dracunculifolia*<sup>6,11</sup>; in Venezuela and Cuba from the floral resin of the genus *Clusia*<sup>14</sup>, and in more tropical areas it is obtained from other plants<sup>10</sup>.

Propolis may be classified on the basis of its geographical origin, and although data on the flavonoids and phenolic esters of European and North American propolis are incomplete, it is known that the propolis from the genus *Populus spp* contains a mixture of flavonic aglycones, hydroxycinnamic acids and its esters; and that the Russian variety basically contains flavonoid aglycones, while the Brazilian variety prenylated carbon derivatives of p-coumaric acid<sup>11</sup>. In fact, the composition of propolis, which is complex and varies in accordance with the phyto-geographical diversity of the areas from which it is collected, gives useful information on its properties, botanical origins and geographical situation<sup>15-17</sup>.

Although the main components of propolis are the flavonoids and the phenolic acids and their esters, the methods of analysis which are currently available, allow an increasingly greater number of compounds to be detected. However, the variability in composition is very high, and for this reason further studies are required, in order to obtain a greater knowledge of its components<sup>3,18</sup>.

In European propolis, the total content of phenols, which are mainly responsible for most of its pharmacological properties, represent over half of the 160 different compounds that have been identified<sup>11,19</sup>. However, some Swiss and Italian samples show unusual compositions (Table 1), with a high bencil p-coumarate and bencil ferulate content (5%), a relative scarcity of phenolic compounds and an absence of some

compuestos característicos que podrían ser de utilidad para la identificación de su origen.

typical compounds (pinobankosin and prenyl caffeate) in propolis from *P.nigra*<sup>12</sup>. Turkish<sup>20</sup>, Egyptian<sup>21-23</sup>, Brazilian<sup>14,18,24</sup>, Chilean<sup>25-26</sup> and Cuban<sup>14</sup> propolis from different botanical origins, show varied compositions, and in some cases characteristic compounds which could be useful in the identification of origin.

**TABLA 1:** Composición de diversos própolis europeos<sup>12</sup>.

**TABLE 1:** Composition of numerous European propolis samples<sup>12</sup>.

COMPONENTE COMPOUND	Própolis <i>P. Nigra</i> (media) (%) Própolis <i>P. Nigra</i> (average) (%)	Própolis Suizo Italian propolis (%)	Própolis Italiano Italian propolis (%)
Pinocembrina	7.2	0.3	0.2
Pinocembrin			
Pinobanksina	3.7	-	-
Pinobanksin			
O-acetato de pinobanksina	8.0	0.5	0.4
Pinobanksin O-acetate			
Chrysin	8.4	-	0.5
Chrysin			
Galangina	7.8	0.3	0.2
Galangin			
Pentenil cafeatos	3.3	0.2	-
Pentenyl caffeates			
Bencil cafeato	3.0	-	0.9
Bencyl caffeate			
Prenetil cafeato	2.8	-	0.2
Prenethyl caffeate			
Glicéridos fenólicos	1.1	23.1	-
Phenolic glycerides			
Ácidos diterpénicos	-	-	53.2
Diterpenic acids			

En el própolis (Tabla 2) se han aislado más de 180 compuestos. Sus principales componentes son resinas y bálsamos que contienen flavonoides y ácidos fenólicos o sus ésteres (50%); contenidos muy variables de ceras (7.5-35%) que afectarán a los correspondientes restantes componentes; aceites volátiles (10%); polen (5%) e impurezas (4.4-19.5%). Además contienen pequeñas cantidades de terpenos, taninos, restos de la secreción de las glándulas salivares de las abejas y posibles contaminantes. Los compuestos activos son los flavonoides que incluyen flavonas, flavonoles, flavononas y flavononoles. Debe señalarse que la mayoría de los estudios no pretenden determinar la composición química completa, sino tan sólo algunos componentes de interés, en especial los flavonoides<sup>3,27</sup>.

In propolis (Table 2) over 180 compounds have been isolated. Its main components are resins and balsams, which contain flavonoids and phenolic acids or their esters (50%); highly variable wax contents (7.5-35%), which affect the corresponding remaining components; volatile oils (10%); pollen (5%) and impurities (4.4-19.5%). Additionally, they contain small quantities of terpens, tannins, traces of secretions from the salivary glands of bees and possible contaminants. The active compounds are the flavanoids which include flavons, flavanols, flavonons and flavononols. It should be pointed out that most of the studies carried out have not been aimed at determining a complete chemical composition, but have merely determined some of the components of interest, particularly the flavonoids<sup>3,27</sup>.

**TABLA 2:** Composición promedio del própolis<sup>3,27</sup>

COMPOSICIÓN	(%)	COMPUESTOS, CARACTERÍSTICAS Y OBSERVACIONES
Resinas	45-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres.
Ceras	7.55 a 35	Mayoría cera de abeja, también de origen vegetal
Aceites esenciales	5-10	Volátiles
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y el resto dependen del origen botánico
Polen	5	Proteínas del polen y aminoácidos libres. Predominan arginina y prolina.
Otros compuestos orgánicos y minerales	5	14 oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes, otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb.. Cetonas Lactonas Quinonas Esteroides Ácido benzoico y ésteres Vitaminas: B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> . Pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen. Azúcares.

**TABLE 2:** Average composition of propolis<sup>3,27</sup>

COMPOSITION	(%)	COMPOUNDS, CHARACTERISTICS AND COMMENTS
Resins	45-55	Flavonoids, phenolic acids and esters.
Waxes	7.55 to 35	Mostly beeswax, but also of vegetable origin
Essential oils	5-10	Volatile
Fatty acids	5	Mostly from wax and rest depending on botanical origin
Pollen	5	Pollen proteins and free aminoacids. Arginine and proline predominate.
Other organic compounds and minerals	5	14 trace elements of which Fe & Zn are the most abundant, others: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb.. Cetons Lactones Quinones Steroids Benzoic acid and esters Vitamins: B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> . Small quantities mainly from pollen. Sugars.

## PROPIEDADES Y ACTIVIDAD BIOLÓGICA

El própolis es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se atribuyen efectos antiinflamatorios, inmunoestimulantes, hepatoprotectores, carcinostáticos, antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos y de regeneración tisular<sup>3,11,27,28,29</sup>. Los flavonoides (quercetina, apigenina, galangina, etc.) y los ácidos fenólicos (cafeico, isoferúlico, cinámico y benzoico)<sup>30</sup>, además de ser tóxicos para las levaduras<sup>31</sup>, inhiben la actividad enzimática de la hialuronidasa<sup>32</sup> y el

## PROPERTIES AND BIOLOGICAL ACTIVITY

Propolis, is a product of extraordinary interest, as much in the field of medicine as the pharmaceutical industry. It is attributed with numerous properties: it is an anti-inflammatory agent, an immunostimulant, a hepatoprotector, a carcinostatic, it has anti-microbial, anti-viral, anti-fungal, anti-protozoan properties, it is an anesthetic and a tissue regenerator<sup>3,11,27,28,29</sup>. The flavonoids (quercetin, apigenin, galangina, etc.) and the phenolic acids (caffeic, isoferulic, cynammic and benzoic)<sup>30</sup>, in addition to being toxic to yeasts<sup>31</sup>, inhibit the

ácido cafeico y la actividad de la dihidrofolato reductasa, podrían explicar la similitud entre algunos de sus efectos y los de algunos antiinflamatorios no esteroideos<sup>33</sup>.

Al estudiar la actividad antibacteriana (*Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*), antifúngica (*Candida albicans*) y antiviral (*Avia influenza*) de própolis de diferente origen geográfico, se comprueba que todos son activos frente a hongos y cepas bacterianas Gram (+) y, muchas de ellas, también frente al virus de la influenza. En las muestras procedentes de zonas templadas esta actividad se atribuye a sus contenidos en ésteres y ácidos fenólicos, componentes de los que carecen los própolis de origen tropical que, sin embargo, muestran una actividad similar por su contenido en derivados carbono prenilados del ácido p-cumárico<sup>11,34</sup>.

A continuación se mencionan las distintas actividades del própolis para las que se dispone de estudios que las apoyan.

#### *Actividad antioxidante*

El própolis es una fuente natural de antioxidantes, que protegen a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación<sup>3,35</sup>. Sus propiedades antioxidantes se deben a su actividad antiradicalaria (radicales alcoxi y, en menor grado, superóxido) y al efecto inhibitorio sobre el ión cuproso, iniciador de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad<sup>36,37</sup>. En los própolis brasileño y chino, los extractos acuosos muestran mayor actividad antiradicalaria que los metanólicos y lo contrario ocurre con los de origen holandés o peruano<sup>38</sup>.

El própolis ejerce efectos antioxidantes en el colon, disminuyendo la concentración de hidroperoxidasas lipídicas y, como algunos de sus componentes se absorben y pasan a la circulación, actúan como antioxidantes hidrofílicos y aumentan la concentración tisular de vitamina C<sup>39</sup>.

En pacientes con episodios isquémicos el própolis parece reducir el riesgo de accidentes cerebro-vasculares<sup>40</sup>.

#### *Actividad antimicrobiana*

El própolis es activo frente a numerosos microorganismos *Bacillus larvae*, *B. subtilis*, *B. de*

enzymatic activity of the hyaluronidase<sup>32</sup>. Additionally, caffeic acid and the activity of dihydrofolate reductase could explain the similarity between some of its effects and those of some non-steroid anti-inflammatory properties<sup>33</sup>.

In studies concerning the anti-bacterial (*Staphylococcus aureus* & *Escherichia coli*), antifungal (*Candida albicans*) and antiviral (*Avia influenza*) activity of propolis from different geographical regions, it was found that all were active against fungi and Gram (+) bacterial strains and additionally, many were also active against the influenza virus. In the samples from temperate zones, this activity is attributed to its ester and phenolic acid content, compounds which are not encountered in propolis from tropical zones. However, tropical zone propolis also shows a similar activity, due to its content in carbon-prenylated derivatives from p-coumaric acid<sup>11,34</sup>.

Different examples of propolis activity, on which studies are available to support such claims, are given below.

#### *Anti-oxidant activity*

Propolis is a natural source of anti-oxidants, that protect oils and serum lipoproteins from oxidation<sup>3,35</sup>. Its anti-oxidant properties are due to its anti-radical activity (alcoxi radicals and to a lesser extent, superoxide) and an inhibiting effect on the cuprous ion, an initiator of the oxidation of low density lipoproteins<sup>36,37</sup>. In Brazilian and chinese propolis, the aqueous extracts have shown greater anti-radical activity than the methanolic extracts. The contrary was found to be true of extracts from Dutch or Peruvian origin<sup>38</sup>.

Propolis exerts anti-oxidant effects on the colon, reducing the concentration of lipid hydroperoxide concentration, and as some of its compounds are absorbed and enter into circulation, they act as hydrophilic anti-oxidants and increase tissue concentration of vitamin C<sup>39</sup>.

In patients with ischemic episodes, propolis seems to reduce the risk of cerebral-vascular accidents<sup>40</sup>.

#### *Anti-microbial activity*

Propolis is active against numerous microorganisms; *Bacillus larvae*, *B. subtilis*, *B. de Koch*,

*Koch, Staphylococcus aureus, Streptomyces sobrinus, S. mutans, S. cricetus, Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Giardia lamblia, Bacteroides nodosus, Klebsiella pneumoniae*<sup>3,16,41</sup>, incluso alguno (*Streptococcus piogenes*) resistente a los antibióticos<sup>16,41</sup>. Los componentes cinámicos y flavónicos del própolis, que alteran las membranas e inhiben la motilidad bacteriana, probablemente contribuyan a esta acción y al sinergismo observado con algunos antibióticos<sup>41,42</sup>.

La actividad antibacteriana de los própolis europeos se deben a sus contenidos en agliconas flavónicas (galangina y pinocembrina) y compuestos fenólicos (pinobanksina, acetato de 3-O-pinobanksina, bencil-p-cumarato, ésteres del ácido cafeico y ácidos ferúlico y cafeico) y, en el de las Islas Canarias, de lignanos furofuranos<sup>11</sup>. El alemán, rico en feniletíl-trans-cafeato, bencil ferulato y galangina, es más activo, frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, que el francés, rico en bencil cafeato y pinocembrina<sup>43</sup> y el mediterráneo (Bulgaria, Turquía, Grecia y Argelia), compuesto por flavonoides, ésteres de ácido cafeico y ácidos ferúlicos, diterpénicos e hidroxiditerpénicos, también muestra propiedades bacteriostáticas y bactericidas significativas<sup>44</sup>.

En el própolis egipcio, la actividad antimicrobiana difiere según la zona de procedencia siendo, en el sur del país, frente a *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*, alta en el de Banisweif, moderada en el Fayoum y baja en Assiut y Souhag. En el delta, los de Dakahlia y El-Saff son activos frente a *Escherichia coli* y los de Sharkia e Ismailia frente a *Staphylococcus aureus* y, en este último caso, también frente a *Candida albicans*<sup>21,22,23</sup>.

En el própolis brasileño se han identificado compuestos fenólicos, entre los que destaca el ácido 3,5-diprenil-p-cumárico, que poseen actividad antibacteriana significativa y sin diferencias estacionales frente a *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* y *Streptococcus faecalis*<sup>11,45,46</sup>.

En conjunto, el própolis muestra una buena actividad antimicrobiana dosis-dependiente frente a *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* y *Moraxella catarrhalis*, pero no frente a *Enterobacteriaceae*<sup>47</sup>.

Ensayos in vitro han demostrado que los extractos de própolis son más eficaces frente a los cocos gram (+) (*Staphylococcus aureus, Strepto-*

*Staphylococcus aureus, Streptomyces sobrinus, S. mutans, S. cricetus, Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli, Salmonella, Shigella, Giardia lamblia, Bacteroides nodosus, Klebsiella pneumoniae*<sup>3,16,41</sup>, even against one (*Streptococcus piogenes*), which is resistant to antibiotics<sup>16,41</sup>. The cynammic and flavonic compounds of propolis, which alter the membranes and inhibit bacterial motility, probably contribute to this action and to the synergism observed with some antibiotics<sup>41,42</sup>.

The anti-bacterial activity of European propolis is due to its flavonoid aglycones (galangin & pinocembrin) and phenolic compounds (pinobanksin, pinobanksin 3-O-acetate, bencil-p-cumarate, caffeic acid esters, and ferulic and caffeic acids), and in propolis from the Canary Islands, lignan furofurans<sup>11</sup>. The German variety, rich in phenylethyl-trans-cafeate, bencil ferulate and galangin, is more effective against *Staphylococcus aureus* & *Escherichia coli*, than the French variety, rich in bencil cafeate and pinocembrin<sup>43</sup>. The Mediterranean type (Bulgarian, Turkish, Greek and Algerian), composed of flavonoids, esters of caffeic and ferulic acids, diterpenes and hydroxyditerpenes, also show significant bacteriostatic and bactericidal properties<sup>44</sup>.

In the case of Egyptian propolis, anti-microbial activity differs in accordance with its region of origin. In the South of the country, against *Staphylococcus aureus* & *Escherichia coli*, the Banisweif variety shows high activity, the Fayoum variety, moderate activity, and the Assiut and Souhag variety, low activity. In the Delta region, the Dakahlia and El-Saff variety are active against *Escherichia coli*, and the Sharkia and Ismailia variety against *Staphylococcus aureus*. The last variety is also effective against *Candida albicans*<sup>21,22,23</sup>.

In Brazilian propolis, phenolic compounds have been identified, most notably 3,5-diprenyl-p-cumaric acid, which possesses significant anti-bacterial activity and without seasonal differences against *Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus* and *Streptococcus faecalis*<sup>11,45,46</sup>.

On the whole, propolis presents a good dose dependent anti-microbial activity against *Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae* & *Moraxella catarrhalis*, but not against *Enterobacteriaceae*<sup>47</sup>.

*coccus β-haemolyticus*) y que sólo actúan frente a algunas bacterias gram (-) como *Escherichia coli* o *Pseudomonas aeruginosa*<sup>48</sup>. En cambio, otros estudios<sup>41,42</sup>, indican que los efectos bacteriostáticos o bactericidas del própolis dependen de la dosis y que las bacterias aeróbicas gram (-) también se inhiben a concentraciones superiores a 2.8 mg/ml. Así pues, los extractos de própolis inhiben significativamente a todos los microorganismos, en especial a las especies de *Actinomyces*<sup>49</sup> y durante su almacenamiento disminuyen los contenidos de flavonoides y por tanto también su capacidad inhibidora<sup>50</sup>.

Los disolventes y el método de extracción utilizado pueden modificar la actividad antimicrobiana del própolis<sup>3,51</sup>. Los extractos etanólicos al 60-80% inhiben el crecimiento microbiano, al 70-80% tienen una mayor actividad antioxidante y al 80% inactivan mayoritariamente a la hialuronidasa<sup>52</sup>. Los extractos acuosos inducen una protección no específica frente a bacterias gram (-) como *Klebsiella neumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*<sup>3</sup> y tanto los extractos etanólicos como los acuosos son activos en la periodontitis bacteriana, probablemente gracias al efecto sinérgico de varios compuestos<sup>53</sup>.

### Actividad antifúngica

Los própolis centroeuropeos (Alemania, Francia y Austria), con composiciones cualitativas similares y predominio del ácido trans-p-cumárico, muestran actividad frente a *Candida albicans*<sup>43</sup> mientras que los mediterráneos (Bulgaria, Turquía, Grecia y Argelia), que contienen flavonoides, ésteres del ácido cafeico y ácidos ferúlicos, presenta menor actividad antifúngica<sup>44</sup>. Por su parte, el própolis egipcio de Dakahlia, con dos ésteres de cafeato y dos triterpenoides, es más activo frente a *Candida albicans* que el de Ismailia que no contiene ácidos aromáticos, ni ésteres, ni flavonoides<sup>22</sup> y, estudios sobre la incidencia de la paracoccidiomicosis en América latina, sugieren que, independientemente de su origen geográfico, los macrófagos estimulados con própolis aumentan su actividad fungicida<sup>54</sup>.

El própolis muestra, en distintos grados, efectos fungicidas frente a numerosas especies como *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Ascosphaera apis* y *Plasmopara vitico-*

In vitro tests have demonstrated that propolis extracts are more effective against gram (+) cocci (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus β-haemolyticus*), but are only active against some gram (-) bacteria, such as *Escherichia coli* or *Pseudomonas aeruginosa*<sup>48</sup>. On the other hand, other studies<sup>41,42</sup>, have indicated that the bacteriostatic or bactericidal effects of propolis depend on the dose and that gram (-) aerobic bacteria may also be inhibited at concentrations higher than 2.8mg/ml. In summary, propolis extracts significantly inhibit all micro-organisms, especially the *Actinomyces* species<sup>49</sup>. However, during its storage flavonoid content reduces and consequently, its inhibiting capacity<sup>50</sup>.

The solvent and the method of extraction used may modify the anti-microbial activity of propolis<sup>3,51</sup>. Ethanolic extracts at 60-80% inhibit microbial growth, at 70-80% they have higher antioxidant activity and at 80% render hyaluronidase mainly inactive<sup>52</sup>. Aqueous extracts induce a non-specific protection against gram (-) bacteria, such as *Klebsiella neumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*<sup>3</sup>. Both the ethanolic and the aqueous extracts are active in bacterial periodontitis, probably due to the synergic effect of various compounds<sup>53</sup>.

### Anti-fungal activity

Central European propolis (Germany, France and Austria), with similar qualitative compositions and a predominance of trans-p-coumaric acid, show activity against *Candida albicans*<sup>43</sup>, while Mediterranean varieties (Bulgaria, Turkey, Greece and Algeria), that contain flavonoids, esters of caffeic acid and ferulic acids, present anti-fungal activity to a lesser extent<sup>44</sup>. Egyptian propolis from Dakahlia, with two caffeate esters and two triterpenoids, is more active against *Candida albicans* than the variety from Ismailia, which does not contain aromatic acids, esters, or flavonoids<sup>22</sup>. Studies on the incidence of paracoccidiomycosis in Latin America suggest that, independently of geographical origin, macrophages stimulated with propolis increase fungicidal activity<sup>54</sup>.

Propolis shows, in varying degrees, fungicidal effects against numerous species such as *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea*, *Ascosphaera apis* and *Plasmopara vi-*

*Ja*<sup>3</sup>. La mayor inhibición observada, 50% en todas las especies estudiadas, corresponde a una concentración de própolis del 4% y los microorganismos más afectados son la *Alternaria alternata* y el *Penicillium digitatum*<sup>55</sup>.

La mayor inhibición sobre hongos patógenos se observa en *Trichophyton metagrophytes*, *Candida albicans* y *Malassezia pachydermatis*<sup>42</sup> y, en el género *Candida*, el efecto del própolis depende de las especies, siendo de mayor a menor en *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* y *C. guilliermondii*<sup>56</sup>.

El diluyente del própolis, aceite, etanol, propilenglicol o glicerina también influye en su actividad antifúngica<sup>51</sup>.

Al comparar la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de própolis con la de la griseofulvina, frente a dos variedades de *Aspergillus flavus*, se comprueba que, ambas sustancias, reducen la masa micelar seca, la germinación de conidios, el crecimiento y la producción de aflatoxina B1, tanto más cuanto mayor sea su concentración y que, a igualdad de ésta, la griseofulvina es cuatro veces más eficaz que el própolis<sup>57</sup>. En cambio, frente a *Candida albicans* en mucosa oral, el extracto etanólico de própolis al 20% se muestra tan efectivo como la nistatina y supera a otros antifúngicos (clotrimazol, econazol y fluconazol) que presentan resistencias<sup>58</sup>.

### Actividad antiviral

El própolis ejerce efectos inhibidores frente a los virus de la viruela vacuna, la influenza, la enfermedad de Newcastle, el herpesvirus, la fiebre del Valle de Rift, la influenza aviaria, la infección vírica bursal, el reovirus<sup>23</sup> y el virus de la gripe *Hong Kong*, por lo que podría ser útil en su prevención<sup>59,60,61</sup>. Esta actividad se atribuye al contenido en compuestos fenólicos, principalmente ácido cafeico, ésteres de los ácidos cafeico y ferúlico (3-metilbut-2-enil cafeato, 3-metilbutil ferulato) y agliconas flavónicas (luteolina y quercetina), muy activas frente al virus del herpes<sup>2,11</sup>. El uso de una pomada de própolis canadiense, rica en flavonoides, redujo los síntomas locales y fue más efectiva que el aciclovir en el tratamiento del herpes genital<sup>62</sup> y el extracto acuoso de própolis inhibe la integración del provirus del sarcoma murino (MuSV-124) en el genoma huésped, evitando la malignización de las células NIH/3T3<sup>63</sup>.

*ticola*<sup>3</sup>. The highest degree of inhibition observed, 50% in all of the species studied, corresponded to a propolis concentration of 4% and the most affected microorganisms are *Alternaria alternata* and *Penicillium digitatum*<sup>55</sup>.

The highest degree of inhibition on pathogenic fungi was observed in *Trichophyton metagrophytes*, *Candida albicans* and *Malassezia pachydermatis*<sup>42</sup>, and on the *Candida* genus. The effect of propolis depends on the species concerned, and in order of greatest to least effect is *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. guilliermondii*<sup>56</sup>.

Diluents of propolis; oil, ethanol, propilenglycol or glycerin, also influence its anti-fungal activity<sup>51</sup>.

On comparison of anti-fungal activity of ethanolic extracts of propolis with those of griseofulvin, against two varieties of *Aspergillus flavus*, it can be seen that both substances reduce dry micellar mass, the germination of conidia, the growth and production of aflatoxin B1, the greater the concentration the greater the effect. However, to the same measure, griseofulvin is four times more effective than propolis<sup>57</sup>. On the other hand, against *Candida albicans* in oral mucosa, the ethanolic extract of propolis at 20% has been shown to be as effective as nistatin. In comparison with other fungicides (clotrimazole, econazole & fluconazole), to which fungi present resistance, propolis has been shown to be more effective<sup>58</sup>.

### Anti-viral activity

Propolis exerts inhibitory effects against bovine smallpox, influenza, Newcastle's disease, the herpes virus the rift valley fever, aviary influenza, the bursal viral infection, the reovirus<sup>23</sup>, the Hong Kong flu virus and consequently, could be of use in the prevention of such diseases<sup>59,60,61</sup>. Such an activity is attributed to its content in phenolic compounds, mainly caffeic acid, esters of caffeic and ferulic acid (3-methylbut-2-enyl caffeate, 3-methylbutyl ferulate), and finally, flavonic aglycones, (luteoline and quercetin) which are highly active against herpes<sup>2,11</sup>. The use of a Canadian propolis ointment, rich in flavonoids, reduced local symptoms and was more effective than acyclovir in the treatment of genital herpes<sup>62</sup>. The aqueous extract of propolis inhibits the integration of provirus from the murine sar-

### *Actividad antiprotozoaria*

Cuatro compuestos aislados del própolis brasileño, los ácidos 3-prenil-4-hidroxicinámico, 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano, 3,5-diprenil-4-hidroxicinámico y el 2,2-dimetil-6-carboxietenil-8-prenil-2H-1-benzopirano, demostraron ser activos frente al *Trypanosoma cruzi*<sup>66</sup>. Al estudiar la actividad de un extracto etanólico de própolis (100 µg/ml) frente a este mismo agente se observa, que si bien es activo contra las tres formas parasitarias, el máximo efecto se obtiene contra los tripomastigotas que desaparecen en 24 horas de la sangre. También se inhibe la infección protozoaria de los macrófagos peritoneales y de las células miocárdicas, por lo que se estudia su posible uso como agente antitripanosomal<sup>64</sup>.

### *Actividad inmunoestimulante*

Se comprueba la eficacia inmunoestimulante del própolis determinando los niveles de citoquinas, antes y después de administrar, a diez adultos sanos, 500 mg diarios de própolis por vía oral durante trece días. En dicho periodo, aunque no se modificaron sus valores plasmáticos, la capacidad de secreción de citoquinas aumentó significativamente<sup>65,66</sup>.

### *Actividades antiinflamatoria y analgésica*

Algunos de los componentes fenólicos del própolis, como el ácido cafeico y el éster del ácido fenil-etil cafeico, la quercetina y la naringenina, ejercen efectos antiinflamatorios y actúan sobre la producción de eicosanoides, tanto in vitro, suprimiendo la generación de prostaglandinas y de leucotrienos en macrófagos peritoneales, como in vivo, en la inflamación peritoneal aguda inducida por la zimosina<sup>67</sup>.

El própolis por vía oral suprime de forma significativa la vía de la lipooxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico y, el éster del ácido fenil-etil cafeico es, de entre los componentes conocidos del própolis, el modulador más potente de la cascada del ácido araquidónico<sup>67,68</sup>. Ambos productos disminuyen la actividad de la ciclooxigenasa en macrófagos, medida en función de la producción de prostaglandina

coma virus (MuSV-124) in the host genome, preventing the malignisation of NIH/3T3 cells<sup>63</sup>.

### *Anti-protozoan activity*

Four isolated compounds from Brazilian propolis, 3-prenyl-4-hydroxycinnamic, 2,2-dimethyl-6-carboxiethenyl-2H-1-benzopiran, 3,5-diprenyl-4-hydroxycinnamic and 2,2-dimethyl-6-carboxiethenyl-8-prenyl-2H-1-benzopiran, have been observed as being active against *Trypanosoma cruzi*<sup>66</sup>. From the study of an ethanolic propolis extract (100 µg/ml) against this same agent, it was observed that even though it is effective against the three parasitic forms, its maximum effect was obtained against trypomastigotes, which disappear from blood in 24 hours. It also inhibits protozoa infection of peritoneal macrophages and of myocardial cells, and for this reason, its possible use as an anti-trypanosomal agent is being studied<sup>64</sup>.

### *Imunostimulant activity*

The effectiveness of propolis as an immunostimulant has been checked by determining cytokine levels, before and after administration to ten healthy adults, who were given 500mg daily oral doses of propolis for thirteen days. Although their plasmatic values did not change throughout this period of time, their cytokine secretion capacity increased significantly<sup>65,66</sup>.

### *Analgesic and anti-inflammatory activity*

Some of the phenolic compounds of propolis, such as caffeic acid and the caffeic acid phenylethyl ester, quercetin and naringenin, possess anti-inflammatory effects and act upon the production of eicosanoids, as much in vitro, suppressing the generation of prostaglandins and leukotriens in peritoneal macrophages, as in vivo, in acute peritoneal inflammation induced by zimosin<sup>67</sup>.

Orally administered propolis significantly suppresses the lipoxigenase pathway in the arachidonic acid metabolism, and the caffeic acid phenylethyl ester is, as one of the known propolis compounds, the most potent modulator of the arachidonic acid cascade<sup>67,68</sup>. Both products

$E_2$ , y protegen, al tejido cartilaginoso y a los condrocitos humanos, de los daños producidos por la interleuquina-1 $\beta$ <sup>69,70</sup>.

La actividad antiinflamatoria por barrido de radicales libres se atribuye principalmente al ácido cafeico, a su prenil éster y a los flavonoides como galangina, kaempferol y kaempferida<sup>11</sup> y, aunque no se conoce el mecanismo de acción, los efectos antiinflamatorios del própolis y la inhibición que ejerce sobre la actividad de la mieloperoxidasa, de la lipooxigenasa y de la oxidasa-NADPH leucocitarias pueden deberse, en parte, a su excelente capacidad para eliminar radicales libres<sup>71</sup>.

El própolis parece poseer una potente actividad antiinflamatoria y analgésica ya que, su administración oral, inhibe significativamente el edema de la zarpa inducido en ratas y ratones por diversos agentes (carragenina, formalina, radiación gamma), al igual que la formación de granulomas y exudados, la angiogénesis y la respuesta neurógena al dolor<sup>72-75</sup>.

### *Actividad antitóxica*

Se ha comprobado que el extracto acuoso de própolis inhibe la síntesis de interleuquina-1 $\beta$  y de ácido nítrico en leucocitos humanos<sup>76</sup> y el poder mutágeno de la daunomicina, el benzopireno y la aflatoxina-B1 sobre la *Salmonella*<sup>77</sup>. En ratas protege, al igual que la nicotinamida y probablemente debido a su actividad antiradicalaria, a las células- $\beta$  pancreáticas de la destrucción causada por la estreptozotocina<sup>76</sup> y, a los hepatocitos, de los efectos lesivos del tetracloruro de carbono ya que, tras el tratamiento con própolis por vía oral, se conserva la integridad de las biomembranas y disminuyen la reducción del glutatión celular, las pérdidas citosólicas de lactato deshidrogenasa y la formación de lipoperoxidos<sup>78</sup>.

Por otra parte, la galangina, flavonoide que abunda en el própolis, con propiedades antioxidantes y capaz de modular la actividad enzimática y de suprimir la genotoxicidad de muchos productos químicos, se ha propuesto para la quimioprevención del cáncer<sup>79</sup>.

reduce cyclooxygenase activity in macrophages, measured on the basis of prostaglandin  $E_2$  production, and protect cartilaginous tissue and human chondrocytes from the damage produced by interleukin-1 $\beta$ <sup>69,70</sup>.

Anti-inflammatory activity through free radical scavenging is mainly attributed to caffeic acid, to its prenyl ester and to flavonoids such as, galangin, kaempferol and kaempferide<sup>11</sup>. Additionally, although the action mechanism remains unknown, the anti-inflammatory effects of propolis and the inhibition that it exerts upon myeloperoxidase activity of the lipooxygenase, and of the leukocyte NADPH-oxidase, could in part, be due to its excellent capacity to eliminate free radicals<sup>71</sup>.

Propolis seems to possess potent analgesic and anti-inflammatory activity, given that its oral administration significantly inhibits paw oedema, induced in rats and mice by various agents (carrageenin, formalin, gamma radiation), just as it does in the case of the formation of granuloma and exudates, angiogenesis and the neurogenic response to pain<sup>72-75</sup>.

### *Antitoxin activity*

It has been proven that the aqueous extract of propolis inhibits the synthesis of interleukin-1 $\beta$  and nitric acid in human leukocytes<sup>76</sup>, as well as the mutagenic power of daunomycin, benzopyrene, and aflatoxin-B1 on *Salmonella*<sup>77</sup>. Propolis in rats, just as in the case of nicotinamide, probably due to its anti-radical activity, protects pancreatic  $\beta$ -cells from the destruction caused by streptozotocin<sup>76</sup>, and the hepatocytes from the harmful effects of carbon tetrachloride. This may be due to the fact that subsequent to treatment with orally administered propolis, the integrity of the biomembranes is conserved, and cellular glutathione reduction, cytosolic loss of lactate dehydrogenase and the formation of lipoperoxide<sup>78</sup> decreases.

On the other hand, galangin, an abundant flavonoid in propolis, with antioxidant properties, and capable of modulating enzymatic activity and suppressing the genotoxicity of many chemical products, has been proposed as an agent to be used in the chemoprevention of cancer<sup>79</sup>.

### *Otras actividades*

Remineralizante del esmalte dentario: "in vitro", las soluciones de própolis incrementan significativamente el valor del test de dureza de Vickers<sup>80</sup>.

Estrogénica: estudios "in vitro", con células MCF-7 procedentes de cáncer de mama humano, tratadas con extractos etanólicos y etéreos de própolis demuestran que ambos compiten por los receptores estrogénicos y disminuyen la proliferación celular. "In vivo, incrementan de forma significativa y de manera dosis-dependiente el peso del útero de rata, por lo que se concluye que el própolis es capaz de activar a los receptores estrogénicos<sup>81</sup>.

Fitoinhibidora: los extractos de própolis inhiben la germinación de plantas y semillas<sup>3</sup>.

## INDICACIONES

Tradicionalmente y desde muy antiguo el própolis se ha utilizado en Europa y norte de África para la curación de las heridas y el tratamiento de las infecciones de boca y garganta, así como de la caries. En el África sub-sahariana se utiliza todavía con fines medicinales y en otras variadas aplicaciones.

En tecnología alimentaria las propiedades antioxidantes, antimicrobianas y antifúngicas del própolis pueden ofrecer una gran variedad de aplicaciones, con la ventaja de que sus residuos pueden ser beneficiosos para la salud humana. Se ha propuesto su uso como conservante del pescado congelado y en el tratamiento post-cosecha y de conservación de frutas y su aplicación como pesticida y fungicida están en fase de estudio. No obstante faltan estudios sobre los posibles efectos a largo plazo derivados de su consumo<sup>3</sup>.

En medicina veterinaria se utiliza para cicatrizar heridas y en el tratamiento de muchas patologías, tales como diarreas, abscesos, quemaduras, dermatosis, mastitis, coccidiosis y eimeriasis de los conejos, etc. y también para mejorar la ganancia de peso de los terneros lactantes y de las gallinas ponedoras<sup>3</sup>.

### *Other activities*

Re-mineralisation of the enamel of teeth: in "in vitro" tests, propolis solutions significantly increase values obtained in the Vickers hardness test<sup>80</sup>.

Estrogens: "in vitro" studies with MCF-7 cells from human breast cancers, treated with ethanolic and ether extracts of propolis, show that both compete for estrogenic receptors and therefore, decrease cell proliferation. "In vivo" studies have shown that on a dose dependant basis, propolis significantly increases the weight of the uterus in rats. It has therefore been concluded that it is capable of activating estrogenic receptors<sup>81</sup>.

Phytoinhibitor: propolis extracts inhibit the germination of plants and seeds<sup>3</sup>.

## INDICATIONS

Traditionally, and since very ancient times, propolis has been used in Europe and North Africa in the treatment of wounds, mouth and throat infections, as well as in tooth cavities. In sub-Saharan Africa, it is still used for medicinal purposes and for other varying applications.

In the technology of foodstuffs, its antioxidant, anti-microbial and anti-fungal properties may offer a great variety of applications, with the advantage that its residues may be beneficial to human health. Its use; as a preservative in frozen fish, in the treatment of post-harvested foodstuffs, in the preserving of fruit, as well as its application as a pesticide and fungicide is at a study phase. However, insufficient studies have been carried out on the possible long term effects derived from its consumption<sup>3</sup>.

In veterinary medicine, it is used to heal wounds and in the treatment of many pathologies, such as diarrhoeas, abscesses, burns, dermatosis, mastitis, coccidiosis and eimeria in rabbits, etc. Additionally, it is used in weight gain programs for unweaned calves and egg-laying hens<sup>3</sup>.

### *The healing of wounds*

Together with its bactericidal and anti-inflammatory properties, propolis presents topical anaesthetic effects and favours healing, given that

### *Curación de heridas*

Junto a sus propiedades bactericidas y antiinflamatorias el própolis presenta efectos anestésicos tópicos y favorece la cicatrización, ya que estimula la regeneración epitelial y la microcirculación<sup>3</sup>, por ello, desde antiguo se utiliza, muchas veces junto con la miel y en forma de apósitos o vendajes oclusivos, en el tratamiento de heridas y lesiones ulcerosas de diferente etiología, incluso para la lepra<sup>3,82</sup>.

### *Dermatología*

El própolis se utiliza en cosmética principalmente como desodorante y conservante. Además, regenera el tejido epitelial por estimulación de distintos sistemas enzimáticos, del metabolismo celular, de la circulación y de la formación de colágeno y, debido a la presencia de arginina, es útil en casos de acné y de quemaduras<sup>3</sup>. Al comparar los efectos de una crema de própolis y de la sulfodiacina argéntica en el tratamiento de las quemaduras, se observa que si bien ambas inhiben la colonización microbiana, las zonas tratadas con própolis muestran menos inflamación y cicatrizan más rápidamente<sup>83</sup>.

El extracto etanólico del própolis rojo cubano muestra actividad antipsoriásica, antiinflamatoria y analgésica<sup>84</sup>.

### *Neoplasias*

Se ha demostrado que el própolis coreano, al igual que el comercial (Sigma # p-1010), induce apoptosis en líneas celulares de hepatoma humano<sup>29</sup>, que el extracto etanólico de própolis es un buen inhibidor de la mutagenicidad<sup>85</sup> y que el metanólico presenta citotoxicidad frente al carcinoma colónico murino 26-L5 y al fibrosarcoma humano HT-1080<sup>36</sup>. Además, varios de sus componentes aislados han mostrado actividad anticancerígena, asociada a la inhibición del ciclo celular y la inducción de la apoptosis, como en el caso del ácido 3-(2-dimetil 8,3-metil 2 butenil) benzopirano-6-propenoico<sup>86</sup> o induciendo la apoptosis sin afectar al ciclo celular de las células cancerosas, como la prenilflavanona propolina A, que también muestra actividad antioxidante<sup>87</sup>.

it stimulates epithelial regeneration and microcirculation<sup>3</sup>. For this reason since ancient times, it has been frequently used with honey as a poultice or in occlusive bandaging, in the treatment of wounds and ulcer wounds of differing aetiologies, even for lepra<sup>3,82</sup>.

### *Dermatology*

Propolis is used in cosmetics mainly as a deodorant and preservative. Furthermore, it regenerates epithelial tissue through the stimulation of enzymatic systems, cellular metabolism, circulation and the formation of collagen, and due to the presence of arginine, it is useful in cases of acne and burns<sup>3</sup>. On the comparison of the effects of propolis cream and silver sulfadiazine in the treatment of burns, both have been observed to inhibit microbial colonisation. However, areas treated with propolis show less inflammation and heal more rapidly<sup>83</sup>.

Ethanol extract of red Cuban propolis shows anti-psoriasis, anti-inflammatory and analgesic activity<sup>84</sup>.

### *Neoplasia*

It has been demonstrated that Korean propolis, like the commercial type (Sigma # p-1010), induces apoptosis of human hepatoma cell lines<sup>29</sup>. The ethanol extract of propolis is a good inhibitor of mutagenicity<sup>85</sup> and the methanolic extract presents cytotoxicity against murine colon 26-L5 carcinoma and human HT-1080 fibrosarcoma. Additionally, several of its isolated compounds have shown anti-cancerogenic activity, associated with the inhibition of the cellular cycle and the induction of apoptosis, as in the case of 3-(2 acid (2-dimethyl 8.3 methyl 2-butenyl) benzopyran-6-propenoic<sup>86</sup> or induced apoptosis without affecting the cellular cycle of cancerous cells, such as prenyl flavanone propolin A, which also shows antioxidant activity<sup>87</sup>.

It has been shown that the carbon prenylates of p-cumaric acid in Brazilian propolis act against hepatocarcinoma, that the prenyl ester of caffeic acid and of methyl caffeate inhibit breast cancer and melanoma<sup>11</sup>, and that in "in vitro" tests, artepilina C shows antibacterial activity and causes significant damage to solid

En própolis brasileño se ha comprobado que los derivados carbono prenilados de ácidos p-cumáricos actúan contra el hepatocarcinoma, que los prenil éster del ácido cafeico y del metil cafeato inhiben el cáncer de mama y el melanoma<sup>11</sup> y que, en ensayos in vitro, la artepilina C muestra actividad antibacteriana y, causa daños significativos sobre tumores sólidos y células leucémicas<sup>88</sup> y, su inyección intratumoral (500 µg tres veces por semana), provoca apoptosis, mitosis abortiva y necrosis masiva en células humanas tumorales malignas. Además, junto con la supresión del crecimiento tumoral se produjo un incremento del cociente de células T CD4/CD8 y del número total de células T-helper que indican que la artepilina C actúa sobre el sistema inmunológico y que posee una actividad antitumoral directa, con efectos citotóxicos e inhibidores del crecimiento de las células tumorales<sup>88</sup>.

Tanto el própolis como la artepilina C inhiben la peroxidación lipídica y el desarrollo de cánceres pulmonares, evitan la progresión de los adenomas a carcinomas<sup>89</sup> y previenen frente a la oxidación y carcinogénesis inducida por triacetato férrico de nitrilo en ratones<sup>90</sup>.

Tras haber establecido, en diversos estudios previos, que los ésteres del ácido cafeico del própolis inhiben el crecimiento tumoral, tanto en células de adenocarcinoma colónico humano como en lesiones precancerosas inducidas en colon de rata, se ensaya el posible efecto de una dieta a la que se ha adicionado própolis (750 ppm de feniletíl-3-metilcafeato) sobre la carcinogénesis inducida por azoximetano subcutáneo en la mucosa colónica de ratas macho, observándose que el metilcafeato inhibe de forma significativa la incidencia y la multiplicidad, invasiva y no invasiva, de los adenocarcinomas de colon, disminuyendo, casi a la mitad respecto a los controles, la actividad de la mucosa colónica, la producción de ácido araquidónico y el volumen del tumor<sup>91</sup>.

Se sugiere que el própolis ejerce un efecto protector en la carcinogénesis colónica, evitando el desarrollo de las lesiones preneoplásicas, ya que una dosis de 30 mg/kg de extracto etanólico, administrada tras la exposición a un agente cancerígeno (1,2 dimetilhidrazina) se asocia de forma significativa a una disminución del número de criptas aberrantes en el colon distal<sup>92</sup>.

tumours and leukemic cells<sup>88</sup>. Its intratumoral injection (500 µg, three times per week) causes apoptosis, abortive mytosis and massive necrosis in human malignant tumorous cells. Furthermore, together with the suppression of tumoral growth, an increase in the quotient of T CD4/CD8 cells and the total number of T-helper cells was seen to occur. This indicates that artepilina C acts upon the immunological system and possesses direct anti-tumoral activity with cytotoxic effects and inhibits tumoral cell growth<sup>88</sup>.

Both propolis and artepilina C inhibit lipid peroxidation and the development of pulmonary cancers, prevent the progression of adenomas and carcinomas<sup>89</sup> and prevent oxidation and carcinogenesis induced by nitrile ferric triacetate in mice<sup>90</sup>.

After having established, in several previous studies, that the caffeic acid esters in propolis inhibit tumoral growth, both in human colonic adenocarcinoma, as in pre-cancerous wounds induced in rat colons, the possible effect of a diet with added propolis (750 ppm of phenylethyl-3-methylcafeate) on the carcinogenesis induced by subcutaneous azoxymethane in colonic mucose in male rats was studied. It was found that methylcafeate significantly inhibits invasive and non-invasive multiplicity of colonic adenocarcinomas by reducing by half, with respect to control groups, colonic mucose activity, arachidonic acid production and the volume of the tumor<sup>91</sup>.

It is suggested that propolis exerts a protective effect in colonic carcinogenesis, preventing the development of preneoplastic lesions, given that a dose of 30 mg/kg of ethanolic extract, administered after exposure to a cancerous agent (1,2 dimethylhydrazine), is strongly associated with a reduction in the number of aberrant crypts in the distal colon<sup>92</sup>.

### *Ophthalmology*

Propolis, rich in antioxidants, prevents 70% of cases of cataract formation induced by exposure to selenites<sup>93</sup>.

After inducing corneal lesions with sodium hydroxide or silver nitrate in a group of rabbits, topical treatments with propolis extracts or dexamethasone were applied. Similar results were obtained for both substances<sup>94,95</sup>.

### Oftalmología

El própolis, rico en antioxidantes, previene en un 70% de los casos la formación de cataratas inducidas por exposición a selenitos<sup>93</sup>.

Tras inducir con hidróxido sódico o nitrato de plata lesiones corneales a un grupo de conejos se les trata tópicamente con extractos de própolis o con dexametasona, obteniéndose con ambas sustancias efectos similares<sup>94,95</sup>.

En la queratitis postherpética, la aplicación local de unos finos apósitos de própolis durante 10-15 días acelera significativamente la epitelización de la córnea, reduce a la mitad el tiempo de recuperación y duplica la agudeza visual de los pacientes control<sup>96</sup>.

### Odontología

Los extractos alcohólicos de própolis poseen una acción anestésica local, atribuible a sus contenidos en pinocembrina y ésteres de cafeato<sup>11</sup> y efectos cariostáticos que dependen de su composición. Se ha observado que el extracto etanólico de própolis brasileño, rico en pinocembrina y galangina, inhibe la actividad glucosiltransferasa y el crecimiento del *Streptococcus mutans*<sup>97,98</sup>. Las flavanonas, algunos dihidroflavonoles y el sesquiterpeno tt-farnesol, que es el agente antibacteriano más activo, inhiben el crecimiento del *St mutans* y del *St sobrinus* en la cavidad oral y las flavonas y flavonoles, en particular la apigenina (4',5,7-trihidroxi-flavona), inhiben la actividad glucosiltransferasa del *St mutans* y del *St sanguinis*<sup>99</sup>.

La histología dental demuestra que tanto la pasta dental a base de própolis como la de hidróxido cálcico inhiben el crecimiento bacteriano y estimulan la reparación de la dentina<sup>100</sup>, en cambio, los colutorios a base de própolis no impiden la formación de placa dental<sup>101</sup>.

### Otorrinolaringología

Un estudio de casos y controles realizado en niños pone de manifiesto los efectos del própolis sobre los procesos inflamatorios agudos y crónicos de las vías respiratorias altas. Se administra, a los "casos" y durante toda la estación fría, un extracto acuoso comercial de própolis con un

In postherpetic keratitis, the local application of thin propolis dressings for 10-15 days significantly accelerates corneal epithelisation, reduces by half recuperation, and doubles visual sharpness in control patients<sup>96</sup>.

### Dentistry

Alcoholic extracts of propolis possess local anesthetic action, which is attributable to its content in pinocembrin and caffeate esters<sup>11</sup> and composition dependent cariostatic effects. Ethanolic extracts of Brazilian propolis, rich in pinocembrin and galangin, have been found to inhibit glucosyltransferase activity and the growth of *Streptococcus mutans*<sup>97,98</sup>. Flavanones, some dihydroflavanols and tt-farnesol sesquiterpene, which is the most antibacterial agent, inhibit the growth of *St. mutans* and *St sobrinus* in the oral cavity. Flavons and flavanols, in particular apigenin (4',5,7-trihydroxyflavon), inhibit glucosyltransferase of *St. mutans* and *St. sanguinis*<sup>99</sup>.

Dental histology shows that both propolis and calcium hydroxide based toothpaste inhibit bacterial growth and stimulate dentine repair<sup>100</sup>. On the other hand, propolis based mouthwashes do not prevent the formation of dental plaque<sup>101</sup>.

### Otorhinolaryngology

A study of cases and controls carried out on children has revealed the effects of propolis on acute and chronic inflammatory processes in the upper respiratory tracts. An aqueous extract of commercial propolis (NIVCRISOL®), with a high flavonoid content, was administered to both cases and control group and the effects were monitored through clinical observation and periodic analysis of viral, bacterial and fungal loads. The results indicated that this treatment reduces the number of symptomatic cases and the viral and microbial loads in the upper tract. Due to its effectiveness, good tolerance and low cost, its administration as a contributory remedy in the treatment of acute or chronic rhino-pharyngitis<sup>102</sup> has been proposed.

elevado contenido de flavonoides (NIVCRISOL®) y, al igual que los controles, se monitorizan por observación clínica y análisis periódicos de la carga de virus, bacterias y hongos. Los resultados indican que el tratamiento reduce el número de casos sintomáticos y disminuye la carga viral y microbiana de las vías altas. Por su eficacia, buena tolerancia y bajo coste se propone su administración como coadyuvante en el tratamiento de las rinofaringitis agudas o crónicas<sup>102</sup>.

### *Metabolismo mineral*

Se estudia, en ratas sanas y con anemia ferropénica de origen nutricional, los efectos de la adición de própolis a la dieta sobre la utilización digestiva de hierro, calcio, fósforo y magnesio. El própolis produce, en ambos grupos, una ganancia de peso, que justifica su utilización como fortificante, además de mejorar la utilización digestiva del hierro, favorecer el metabolismo fosfocálcico y mantener en niveles adecuados el del magnesio. En las ratas anémicas mejora la eficiencia en la regeneración de la hemoglobina y la utilización digestiva del calcio y del magnesio, lo que atenúa los efectos adversos de la deficiencia férrica sobre el metabolismo de estos minerales<sup>103</sup>.

### *Alcoholismo*

En ratas con hepatopatía alcohólica experimental, por administración oral de etanol (3 g/día) durante un mes, se observa que la administración, tres veces al día durante tres días, de extractos etanólicos de própolis, a una concentración de 10 mg/kg, disminuye significativamente las concentraciones de transaminasas (GOT y GPT) y de triacilglicéridos séricos y hepáticos; con 30 mg/kg se evita que aumenten significativamente las concentraciones de los citocromos P-450 y NADPH-dependiente-C-reductasa y la peroxidación lipídica, disminuyendo notablemente la degeneración grasa hepatocelular y la vacuolización y con 100 mg/kg disminuye la concentración hepática de glutatión reducido y se incrementa la actividad de la glutatión-S-transferasa y de la  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasa<sup>5,104</sup>. Así pues, los antioxidantes del própolis ejercen un efecto hepatoprotector que, en el de origen europeo, se

### *Mineral metabolism*

The effect of the addition of propolis in the diet of healthy rats and rats with ferropenic anemia to the digestive use of iron, calcium, phosphorus and magnesium has been studied. Propolis was found to produce, in both groups, weight gain. This would justify its use as a strengthening additive, where in addition to improving the digestive use of iron, it serves to aid the phosphorus and calcium metabolism and to maintain suitable levels of magnesium. In anaemic rats it improves the efficiency of haemoglobin regeneration and the digestive use of calcium and magnesium, which moderates the adverse effects of iron deficiency on the metabolism of these minerals<sup>103</sup>.

### *Alcoholism*

In rats with experimental alcoholic hepatopathy through the oral administration of ethanol (3g/day) for one month, the administration of ethanolic extracts of propolis at a concentration of 10mg/kg administered three times per day for three days, was found to significantly reduce concentrations of transaminase (GOT & GPT), and serum and hepatic triacylglyceride. At 30mg/kg significant increases in P-450 cytochrome and NADPH dependent-C-reductase concentrations, and lipid peridoxation are avoided, resulting in a notable reduction in hepatocellular fat degeneration and vacuolisation. At 100mg/kg the hepatic concentration of reduced glutathione diminishes and glutathione-S-transferase and  $\gamma$ -glutamylcystein synthetase activity increases<sup>5,104</sup>. Consequently, the antioxidants of propolis have a hepatoprotective effect that in propolis of European origin is attributed to the caffeic and ferulic acids and their esters, and to a lesser extent to the flavonic aglycones, while in the Brazilian variety, it is associated with two derivatives of dicaffeoylquinic acid (3,4-dicaffeoylquinic-acid and its methyl ester)<sup>11</sup>.

## QUALITY EVALUATION

The multiple and varied beneficial properties of propolis to health, which are dependent on its compounds, justify the necessity of an adequate

atribuye a los ácidos cafeico y ferúlico y a sus ésteres y, en menor cuantía, a las agliconas flavónicas y en el brasileño se relaciona con dos derivados del ácido dicafeoilquinoico (ácido 3,4-dicafeoilquinoico y su metil éster)<sup>11</sup>.

## EVALUACIÓN DE LA CALIDAD

Las múltiples y variadas propiedades beneficiosas para la salud del própolis, que dependen de sus componentes, justifican la necesidad de una correcta evaluación de su calidad, y si bien distintos países disponen de parámetros oficiales para dicha evaluación, son escasos los ensayos de que se disponen para medir su actividad biológica<sup>3,36</sup>. Para que la calidad de un própolis se considere buena debe cumplir los siguientes requisitos<sup>11</sup>:

1. Estar libre de contaminantes tóxicos.
2. Contener bajos porcentajes de cera, materia insoluble y cenizas.
3. Definir su procedencia botánica para determinar el tipo de compuestos activos.
4. Tener contenidos elevados de principios activos.

Por ello, para evaluar la calidad del própolis además de la inspección visual de sus características físicas y organolépticas (aspecto, consistencia, sabor, origen, color u olor), véase la Tabla 3, que proporcionan una apreciación subjetiva del producto y cierta relación con su calidad real, se deben determinar los contenidos de principios activos que permiten una evaluación real y objetiva<sup>11,105</sup>.

evaluation of its quality. Although different countries have official parameters available to determine such an evaluation, tests to measure its biological activity are scarce<sup>3,36</sup>. In order for the quality of propolis to be considered as high, the following requisites should be fulfilled<sup>11</sup>:

1. It should be free from toxic contaminants.
2. It should contain low percentages of wax, insoluble materials and ash.
3. Its botanical origin should be defined, in order to determine its active compounds.
4. It should have a high content in active principles.

In the evaluation of the quality of propolis, in addition to a visual inspection of its physical and organoleptical characteristics (appearance, consistency, origin, colour or smell (see Table 3), which provide a subjective appreciation of the product and an indication of quality to a certain degree, the contents of its active principles should be determined, in order to provide a real and objective evaluation<sup>11,105</sup>.

**TABLA 3:** Características organolépticas que permiten evaluar la calidad del própolis<sup>105</sup>

<b>PARÁMETRO</b>	<b>CALIDAD BUENA</b>	<b>CALIDAD MEDIA</b>	<b>CALIDAD INFERIOR</b>
<b>PRESENTACIÓN</b>	Escamas y gránulos	Bloques o pelotas	Polvo
<b>ASPECTO</b>	Al corte, difieren color externo e interno	Leve diferencia de color al corte	Sin diferencia de color al corte
<b>COLOR</b>	Verdoso, amarillo, naranja o con tintes del mismo color	Marrón	Oscuro
<b>OLOR</b>	Resinoso aromático	Resinoso	Inodoro
<b>SABOR</b>	Picante o resinoso	Resinoso leve	Insípido

**TABLE 3:** Organoleptic characteristics that permit the quality evaluation of propolis<sup>105</sup>

PARAMETER	QUALITY GOOD	QUALITY AVERAGE	QUALITY POOR
<b>PRESENTATION</b>	Flaky and granulated	In blocks or balls	Powder
<b>APPEARANCE</b>	On cutting differences in external and internal colouring	Slight differences in external and internal colouring	No differences in external and internal colouring
<b>COLOUR</b>	Green, yellow, orange or shades of the same colour	Brown	Dark
<b>SMELL</b>	Aromatic resin	Resinous	No smell
<b>TASTE</b>	Spicy or resinous	Slightly resinous	Insipid

Para caracterizar muestras brutas de própolis se propone determinar los contenidos de: fenoles totales, flavonoides, ceras, cenizas, compuestos volátiles y residuo seco. En el caso de las tinturas se determinan los fenoles totales, los flavonoides, las ceras, la densidad y el etanol<sup>106</sup>. En el Tabla 4 se muestran los parámetros analíticos que definen la calidad del própolis.

In the characterisation of raw samples of propolis, it is proposed that content of the following compounds should be determined: Total phenols, flavonoids, wax, ash, volatile compounds and dry residue. In the case of tinctures, total phenols, flavonoids, waxes, density and ethanol should be determined<sup>106</sup>. In table 4, the analytical parameters that define the quality of propolis are shown.

**TABLA 4.** Parámetros analíticos que definen la calidad del própolis<sup>105</sup>**TABLE 4.** Analytical parameters that define the quality of propolis<sup>105</sup>

PARÁMETRO PARAMETER	• CALIDAD BUENA (A) GOOD QUALITY	(B) CALIDAD MEDIA (B) MEDIUM AVERAGE	(C) CALIDAD INFERIOR (C) LOW POOR
Test de identidad Identity test	+	+	+
Reacción de Shinoda Shinoda reaction	+	+	+
Índice de oxidación Oxidation index	>0-1.5 s	1.6-5 s	5.1-12 s
Resinas solubles en etanol 96° Soluble resins in ethanol 96°	70-85%	55-69%	40-54%
Cera + impurezas Wax + impurities	15-30%	31-45%	46-60%

El test de identidad consiste en tres reacciones químicas simultáneas que comprueban la presencia de principios activos (fenoles totales) en las resinas y, por tanto, permiten establecer el porcentaje de resinas solubles en etanol y, establecer el rendimiento del própolis y su residuo tras la extracción con disolventes. El porcentaje de cera e impurezas mecánicas indica la fracción sin utilidad práctica y, a mayor porcentaje, menor calidad del producto.

La reacción de Shinoda, sirve para detectar flavonoides y el índice de oxidación, determinación que se incluye en las normas de calidad de varios países (Rusia, Cuba y Rumania), evalúa su poder antioxidante frente al permanganato potásico y, a mayor velocidad, mejor calidad del própolis<sup>105</sup>.

El índice de oxidación depende de los compuestos fenólicos y, en menor medida, de los ácidos grasos insaturados de cadena larga. Muestras de própolis con un contenido de compuestos fenólicos superior al 7% tienen índices de oxidación inferiores a los 22 segundos<sup>107</sup>.

La dificultad para establecer normas comunes de control de calidad es un gran impedimento para la comercialización del própolis.

## EFFECTOS SECUNDARIOS

El própolis es relativamente atóxico, dosis diarias de 1400 mg/kg no causan ningún efecto negativo en ratones, aunque masticar grandes cantidades de própolis en bruto puede producir náuseas y trastornos digestivos<sup>3</sup>, a los apicultores a menudo les produce dolor de cabeza al inspeccionar las colmenas<sup>63</sup> y no son infrecuentes las reacciones alérgicas<sup>4</sup>, en particular al cafeato de isoprenilo<sup>108</sup>.

Antes de iniciar un tratamiento con própolis conviene realizar una prueba de alergia, bien por aplicación tópica del producto en el antebrazo o por vía oral adoptando las debidas precauciones.

## CONCLUSIONES

Desde muy antiguo el própolis se ha utilizado, de forma empírica, en el tratamiento de múltiples patologías. En la actualidad el avance de las técnicas analíticas ha permitido conocer mejor su composición y estudiar la actividad de

The identity test consists of three simultaneous chemical reactions which check for the presence of active principles (total phenols) in resins and therefore, check the percentage of soluble resins in ethanol and establish the yield of propolis and its residue after extraction with solvents. The percentage of wax and mechanical impurities indicate the fraction of substances which are of no practical utility. The higher the percentage, the lower the quality of the product will be.

The Shinoda reaction, serves in the detection of flavonoids and the index of oxidation. Such a determination is included in the quality standards in numerous countries (Russia, Cuba and Rumania). The test evaluates antioxidant power against potassium permanganate, where the greater the velocity of the reaction, the higher the quality of the propolis will be<sup>105</sup>.

The index of oxidation is dependant on the phenolic compounds and to a lesser extent, the unsaturated long chain fatty acids. Samples of propolis with a content of phenolic compounds over 7%, present oxidation indices of less than 22 seconds<sup>107</sup>.

The difficulty in establishing common quality control standards is a great impediment in the commercialisation of propolis.

## SIDE EFFECTS

Propolis is relatively atoxic. Daily doses of 1400mg/kg have no negative effect in mice. However, chewing large quantities of raw propolis can produce nausea and digestive disorders<sup>3</sup>. Apiarists often suffer from headaches while inspecting beehives<sup>63</sup>, and allergic reactions are not uncommon<sup>4</sup>, particularly to isoprenyl caffeate<sup>108</sup>.

Before initiating propolis treatment, an allergy test should be carried out, either through a topical application of the product on the forearm, or orally, after the appropriate precautions have been taken.

## CONCLUSIONS

Propolis has been used empirically in the treatment of multiple pathologies since ancient times. In the present day, subsequent to the advancement of analytical techniques, greater

sus componentes. Los resultados obtenidos confirman su eficacia, principalmente, como antioxidante, antiinflamatorio y antimicrobiano.

knowledge concerning its composition is available, permitting the study of the activity of its compounds to be carried out. The results obtained confirm its effectiveness, mainly, as an antioxidant, anti-inflammatory and anti-microbial agent.

## BIBLIOGRAFÍA/BIBLIOGRAPHY

1. Cañas S. Els Productes del Rusc. *Mètode* 2002 (33):51-55.
2. Ifas/University of Florida. Focus on propolis. *Apis* 1997;15(11):2-3.
3. Krell R. Value-added products from beekeeping. *FAO Agricultural Services Bulletin* N°. 124. Rome 1996.
4. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998;36(4):347-363.
5. Lin SC, Chung CY, Chiang CL, Hsu SH. The influence of propolis ethanol extract on liver microsomal enzymes and glutathione after chronic alcohol administration. *Am J Chin Med* 1999;27(1):83-94.
6. Kumazawa S, Yoneda M, Shibata I, Kanaeda J, Hamasaka T, Nakayama T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. *Chem Pharm Bull* 2003;51(6):740-742.
7. Bracho J.C. Calidad de propóleos de origen argentino. I Propiedades organolépticas. *Vida Apícola* 2003. Ed 20.
8. Stangaciu S. Cuidados para la producción y extracción de propóleos. *Espacio Apícola* N° 33 1998: 24-29.
9. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res* 2001;15(7):561-571.
10. Wollenweber E, Buchmann SL. Feral honey bees in the Sonoran Desert: Propolis sources other than poplars (*Populus* spp.). *Z Naturforsch C A J Biosci* 1997;52(7-8):530-535.
11. Bankova V. Determining quality in propolis samples. *J Am Apither Soc* 2000; Vol 7, N° 2.
12. Bankova V, Popova M, Bogdanov S, Sabatini A. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z Naturforsch* 2002; 57c:530-533.
13. Martos I, Cossentini M, Ferreres F, TomasBarberan FA. Flavonoid composition of Tunisian honeys and propolis. *J Agric Food Chem* 1997;45(8):2824-2829.
14. Cuesta-Rubio O, Frontana-Urbe B, Ramírez-Apan T, Cárdenas J. Polyisoprenylated Benzophenones in Cuban Propolis; Biological Activity of Nemorosone. *Z Naturforsch* 2002; 57c:372-378.
15. Marcucci MC, Ferreres F, Custodio AR, Ferreira MMC, Bankova VS, García-Viguera C. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Z Naturforsch C A J Biosci* 2000;55(1-2):76-81.
16. Moreno MIN, Isla MI, Cudmani NG, Vattuone MA, Sampietro AR. Screening of antibacterial activity of Amaicha del Valle (Tucuman, Argentina) propolis. *J Etnopharmacol* 1999;68(1-3):97-102.
17. Wu P, Ye L. Determination of effective components in propolis. *Wei Sheng Yan Jiu* 2000;29(2):123-124.
18. Murat K, Serdar K, Semra K. GC-MS Analysis of propolis samples from two different regions of Turkey. *Z Naturforsch* 2002; 57c: 905-909.
19. Menghinello P, Cucchiari L, Palma F, Agostini D, Dacha M, Stocchi V. Simultaneous analysis of flavonoid aglycones in natural products using an RP-HPLC method. *J Liq Chromatogr Relat Technol* 1999;22(19):3007-3018.
20. Sorkun K, Sür B, Salih B. Determination of chemical composition of Turkish propolis. *Z naturforsch* 2001;56(7-8):666-668.
21. Hegazi A, Abd El Hady F. Egyptian propolis: 1 Antimicrobial activity and chemical composition of upper Egypt propolis. *Z Naturforsch* 2001;56(1-2):82-88.
22. Abd El Hady F, Hegazi A. Egyptian propolis: 2. Chemical composition, antiviral and antimicrobial activities of east Nile delta propolis. *Z Naturforsch* 2002;57(3-4):386-394.
23. Hegazi A; Abd El Hady F. Egyptian propolis: 3. Antioxidant, antimicrobial activities and chemical composition of propolis from reclaimed lands. *Z Naturforsch* 2002;57(3-4):395-402.
24. Park Y, Alencar S, Aguiar C. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem* 2002;50(9):2502-2506.
25. Muñoz O, Peña R, Ureta E, Montenegro G, Timmermann B. Propolis from Chilean matorral hives. *Z Naturforsch* 2001;56(3-4):269-272.
26. Muñoz O, Peña R, Ureta E, Montenegro G, Caldwell C, Timmermann B. Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral. *Z Naturforsch* 2001;56c:273-277.
27. Durk E. The Ability of bee products to modulate human immune system. *Eight International Symposium on trends in Biomedicine in Finland: allergy, oxidants and antioxidants, and human health* 1997.
28. Scheller S, Dworniczak S, Waldemar-Klimmek K, Rajca M, Tomczyk A, Shani J. Synergism between ethanolic extract of propolis (EEP) and anti-tuberculosis drugs on growth of mycobacteria. *Z Naturforsch C A J Biosci* 1999;54(7-8):549-553.

29. Choi YH, Lee WY, Nam SY, Choi KC, Park YE. Apoptosis induced by propolis in human hepatocellular carcinoma cell line. *Int J Mol Med* 1999;4(1):29-32.
30. Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *J Pharm Belg* 1994;49(6):462-468.
31. Bariliak IR, Berdyshev GD, Dugan AM. The antimutagenic action of apiculture products. *Tsitol Genet* 1996;30(6):48-55.
32. Miyataka H, Nishiki M, Matsumoto H, Fujimoto T, Matsuka M, Satoh T. Evaluation of propolis. 1. Evaluation of Brazilian and Chinese propolis by enzymatic and physico-chemical methods. *Biol Pharm Bull* 1997;20(5):496-501.
33. Strehl E, Volpert R, Elstner EF. Biochemical activities of propolis extracts. III. Inhibition of dihydrofolate reductase. *Z Naturforsch C* 1994;49(1-2):39-43.
34. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999;64(3):235-240.
35. Isla M, Nieva M, Sampietro A, Vattuone M. Antioxidant activity of Argentine propolis extracts. *J Ethnopharmacol* 2001;76(2):165-170.
36. Claus R, Kinscherf R, Gehrke C, Bonaterra G, Basnet P, Metz J. Antiapoptotic effects of propolis extract and propolis on human macrophages exposed to minimally modified low density lipoprotein. *Arzn Forsch Drug Res* 2000;50(4):E373-E379.
37. Pascual C, Gonzalez R, Torricella RG. Scavenging action of propolis extract against oxygen radicals. *J Ethnopharmacol* 1994;41(1-2):9-13.
38. Banskota A, Tezuka Y, Adnyana I, Midorikawa K, Matsushige K, Message D. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. *J Ethnopharmacol* 2000;72(1-2):239-246.
39. Sun F, Hayami S, Haruna S, Ogiri Y, Tanaka K, Yamada Y. In vivo antioxidative activity of propolis evaluated by the interaction with vitamins C and E and the level of lipid hydroperoxidases in rats. *J Agric Food Chem* 2000;48(5):1462-1465.
40. Samoliuk VA. The indices of the antioxidant system and the status of the cerebral blood supply in patients with an ischemic episode on apitherapy. *Lik Sprava* 1995;(1-2):68-70.
41. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. *Microbiol Res* 1997;152(3):239-246.
42. Heinze W, Holz J, Nattermann H, Blankenstein P. Effects of ethanol extracts of propolis against common bacteria, fungi and viruses of veterinary importance. *Tierarztl Umsch* 1998;53(6):321-326.
43. Hegazi A, Abd El Hady F, Abd Allah F. Chemical composition and antimicrobial activity of European propolis. *Z Naturforsch* 2000;55(1-2):70-75.
44. Velikova M, Bankova V, Sorkun K, Houcine S, Tsvetkova I, Kujumgiev A. Propolis from the Mediterranean region: chemical composition and antimicrobial activity. *Z Naturforsch* 2000;55(9-10):790-793.
45. Sforcin JM, Fernandes A, Lopes CA, Bankova V, Funari SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *Ethnopharmacol* 2000;73(1-2):243-249.
46. Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol* 2001;74(2):105-112.
47. Drago L, Mombelli B, De Vecchi E, Fassina M, Tocalli L, Gismondo M. In vitro antimicrobial activity of propolis dry extract. *J Chemother* 2000;12(5):390-395.
48. Keskin N, Hazir S, Baser KH, Kurkcuoglu M. Antibacterial activity and chemical composition of Turkish propolis. *Z Naturforsch* 2001;56(11-12):1112-1115.
49. Koo H, Gomes B, Rosalen P, Ambrosano G, Park Y. In vitro antimicrobial activity of propolis and *Arnica montana* against oral pathogens. *Arch Oral Biol* 2000;45(2):141-148.
50. Serra Bonvehi J, Ventura Coll F. Study on propolis quality from China and Uruguay. *Z Naturforsch* 2000;55(9-10):778-84.
51. Tosi B, Donini A, Romagnoli C, Bruni A. Antimicrobial activity of some commercial extracts of propolis prepared with different solvents. *Phytother Res* 1996;10(4):335-336.
52. Park Y, Ikegaki M. Preparation of water and ethanolic extracts of propolis and evaluation of the preparations. *Biosci Biotechnol Biochem* 1998;62(11):2230-2232.
53. Santos FA, Bastos EM, Uzeda M, Carvalho MA, Farias LM, Moreira ES. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria. *J Ethnopharmacol* 2002;80(1):1-7.
54. Murad JM, Calvi SA, Soares AM, Bankova V, Sforcin JM. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on fungicidal activity of macrophages against *Paracoccidioides brasiliensis*. *J Ethnopharmacol* 2002;79(3):331-4.
55. Ozcan M. Antifungal properties of propolis. *Grasas y Aceites* 1999;50(5):395-398.
56. Ota C, Unterkircher C, Fantinato V, Shimizu MT. Antifungal activity of propolis on different species of *Candida*. *Mycoses* 2001;44(9-10):375-8.
57. Ghaly MF, Ezzat SM, Sarhan MM. Use of propolis and ultragriseofulvin to inhibit aflatoxigenic fungi. *Folia Microbiol* 1998;43(2):156-160.
58. Martins RS, Pereira ES, Lima SM, Senna MI, Mesquita RA. Effect of commercial ethanol propolis extract on the in vivo growth of *Candida albicans* collected from HIV-seropositive and HIV-seronegative Brazilian patients with oral candidiasis. *J Oral Sci* 2002;44(1):41-8.

59. Serkedjjeva J, Manolova N, Bankova V. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *J Nat Prod* 1992;55(3):294-302.
60. Amoros M, Lurton E, Boustie J, Girre L, Sauvager F, Cormier M. Comparison of the anti-herpes simplex virus activities of propolis and 3-methyl-but-2-enyl caffeate. *J Nat Prod* 1994;57(5):644-647.
61. Dumitrescu M, Sanu E, Crisan I. The mechanisms of the antiherpetic action of aqueous propolis extracts. I. The antioxidant action on human fibroblast cultures. *Rev Roum Virol* 1992;3-4:165-173.
62. Vynograd N, Vynograd I, Sosnowski Z. A comparative multi-centre study of the efficacy of propolis, acyclovir and placebo in the treatment of genital herpes (HSV). *Phytomedicine* 2000;7(1):1-6.
63. Huleihel M, Ishano V. Effect of propolis extract on malignant cell transformation by moloney murine sarcoma virus. *Arch Virol* 2001;46(8):1517-26.
64. Higashi K, de Castro S. Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. *J Ethnopharmacol* 1994;43(2):149-155.
65. Bratter C, Tregel M, Liebenthal C, Volk HD. Prophylactic effectiveness of propolis for immunostimulation: A clinical pilot investigation. *Forsch Komplementarmed* 1999;6(5):256-260.
66. Harish Z, Rubinstein A, Golodner M, Elmaliyah M, Mizrahi Y. Suppression of HIV-1 replication by propolis and its immunoregulatory effect. *Drugs Exp Clin Res* 1997;23(2):89-96.
67. Mirzoeva O, Calder P. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1996;55(6):441-449.
68. Krol W, Scheller S, Czuba Z, Matsuno T, Zydowicz G, Shani J. Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. *J Ethnopharmacol* 1996;55(1):19-25.
69. Rossi A, Ligresti A, Longo R, Russo A, Borelli F, Sautebin L. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. *Phytomed* 2002;9(6):530-535.
70. Cardile V, Panico A, Gentile B, Borrelli F, Russo A. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. *Life Sci* 2003;73(8):1027-1035.
71. Volpert R, Elstner EF. Interactions of different extracts of propolis with leukocytes and leukocytic enzymes. *Arzn Forsch Drug Res* 1996;46(1):47-51.
72. Park EH, Kim SH, Park SS. Anti-inflammatory activity of propolis. *Arch Pharmacol Res* 1996;19(5):337-341.
73. El Ghazaly MA, Khayyal MT. The use of aqueous propolis extract against radiation-induced damage. *Drugs Exp Clin Res* 1995;21(6):229-236.
74. Song Y, Park E, Jung K, Jin C. Inhibition of angiogenesis by propolis. *Arch Pharm Res* 2002;25(4):500-4.
75. De Campos R, Paulino N, Da Silva C, Scremin A, Calixto J. Anti-hyperalgesic effect of an ethanolic extract of propolis in mice and rats. *J Pharm Pharmacol* 1998;50(10):1187-1193.
76. Matusushige K, Basnet P, Hase K, Kadota S, Tanaka K, Namba T. Propolis protects pancreatic beta-cells against the toxicity of streptozotocin (STZ). *Phytomed* 1996;3(2):203-209.
77. Varanda E, Monti R, Tavares D. Inhibitory effect of propolis and bee venom on the mutagenicity of some direct and indirect acting mutagens. *Teratog Carcinog Mutagen* 1999;19(6):403-413.
78. El-Khatib A, Agha A, Mahran L, Khayyal M. Prophylactic effect of aqueous propolis extract against acute experimental hepatotoxicity. *Z Naturforsch* 2002;57(3-4):379-85.
79. Heo M, Sohn S, Au W. Anti-genotoxicity of galangin as a cancer chemopreventive agent candidate. *Mutat Res* 2001;488(2):135-50.
80. Giamalia I, Steinberg D, Grobler S, Gedalia I. The effect of propolis exposure on microhardness of human enamel in vitro. *J Oral Rehabil* 1999;26(12):941-943.
81. Song Y, Jin C, Jung K, Park E. Estrogenic effects of ethanol and ether extracts of propolis. *J Ethnopharmacol* 2002;82(2-3):89-95.
82. Benedum J. From the history of the wound care. *Zentralbl Chir* 2000;125 Suppl.1:84-86.
83. Gregory SR, Piccolo N, Piccolo MT, Piccolo MS, Heggors JP. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *J Altern Complement Med* 2002;8(1):77-83.
84. Ledon N, Casaco A, Gonzalez R, Merino N, Gonzalez A, Tolon Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Acta Pharmacol Sin* 1997;18(3):274-276.
85. Jeng S, Shih M, Kao C, Chen S. Antimutagenicity of ethanol extracts of bee glue against environmental mutagens. *Food Chem Toxicol* 2000;38(10):893-897.
86. Luo J, Soh J, Xing W, Mao Y, Matsuno T. PM-3, a benzo-gamma-pyran derivative isolated from propolis, inhibits growth of MCF-7 human breast cancer cells. *Anticancer Res* 2001;21(3B):1665-1671.
87. Chen C, Wu C, Shy H, Lin J. Cytotoxic prenylflavanones from Taiwanese propolis. *J Nat Prod* 2003;66(4):503-506.
88. Kimoto T, Arai S, Kohguchi M, Aga M, Nomura Y, Micallef MJ. Apoptosis and suppression of tumor growth by artemillin C extracted from Brazilian propolis. *Cancer Detect Prev* 1998;22(6):506-515.
89. Kimoto T, Koya-Miyata S, Hino K, Micallef MJ, Hanaya T. Pulmonary carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. *Virchows Arch* 2001;438(3):259-270.
90. Kimoto T, Hino K, Yamamoto Y, Nomura Y, Micallef MJ, Hanaya T. Renal carcinogenesis induced by ferric nitrilotriacetate in mice, and protection from it by Brazilian propolis and artemillin C. *Pathol Int* 2000;50(9):679-689.
91. Rao C, Desai D, Rivenson A, Simi B, Amin S, Reddy B. Chemoprevention of colon carcinogenesis by phenylethyl-3-methylcaffeate. *Cancer Res* 1995;55(11):2310-2315.
92. Bazo A, Rodrigues M, Sforzin J, de Camargo J, Ribeiro L. Protective action of propolis on the rat colon carcinogenesis. *Teratog Carcinog Mutagen* 2002;22(3):183-94.

93. Orhan H, Marol S, Hepsen I, Sahin G. Effects of some probable antioxidants on selenite-induced cataract formation and oxidative stress-related parameters in rats. *Toxicol* 1999;139(3):219-232.
94. Ozturk F, Kurt E, Cerci M, Emiroglu L, Inan U, Turker M. The effect of propolis extract in experimental chemical corneal injury. *Ophthalmic Res* 2000;32(1):13-18.
95. Hepsen I, Er H, Cekic O. Topically applied water extract of propolis to suppress corneal neovascularization in rabbits. *Ophthalmic Res* 1999;31(6):426-431.
96. Maichuk I, Orlovskaja K, Andreev V. The use of ocular drug films of propolis in the sequelae of ophthalmic herpes. *Voen Med Zh* 1995;(12):36-39,80.
97. Koo H, Rosalen P, Cury J, Park Y, Ikegaki M, Sattler A. Effect of *Apis mellifera* propolis from Brazilian regions on caries development in desalivated rats. *Caries Res* 1999;33(5):393-400.
98. Park Y, Koo M, Abreu J, Ikegaki M, Cury J, Rosalen PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr Microbiol* 1998;36(1):24-28.
99. Koo H, Rosalen P, Cury J, Park Y, Bowen W. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46(5):1302-9.
100. Bretz W, Chiego D, Marcucci M, Cunha I, Custodio A, Schneider L. Preliminary report on the effects of propolis on wound healing in the dental pulp. *Z Naturforsch C A J Biosci* 1998;53(11-12):1045-1048.
101. Murray M, Worthington H, Blinkhorn A. A study to investigate the effect of a propolis-containing mouthrinse on the inhibition of de novo plaque formation. *J Clin Periodontol* 1997;24(11):796-798.
102. Crisan I, Zaharia C, Popovici F, Jucu V, Belu O, Dascalu C. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. *Rom J Virol* 1995;46(3-4):115-133.
103. Haro A, López-Aliaga I, Lisbona F, Barrionuevo M, Alferez M, Campos M. Beneficial effect of pollen and/or propolis on the metabolism of iron, calcium, phosphorus, and magnesium in rats with nutritional ferropenic anemia. *J Agric Food Chem* 2000;48(11):5715-5722.
104. Lin S, Lin Y, Chen C, Chung C, Hsu S. The hepatoprotective and therapeutic effects of propolis ethanol extract on chronic alcohol-induced liver injuries. *Am J Chin Med* 1997;25(3-4):325-332.
105. Maidana F, Chaillou L. Tipificación de calidad para propóleos en bruto. CEDIA.
106. Woisky R, Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. *J Apicultur Res* 1998;37(2):99-105.
107. Maidana F. Influencia de los compuestos fenólicos del propoleos sobre el índice de oxidación. Centro de Investigaciones Apícolas-CEDIA. Congreso Internacional de Propóleos. Buenos Aires (Argentina), 1 y 2 de Septiembre de 2000.
108. Hansson C, Ezzelarab M, Sterner O. Oxidative activation of the propolis hapten isoprenyl caffeate. *Acta Derm Venereol* 1995;75(1):34-36.