

Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos

Raúl C. Peña

Pontificia Universidad Católica de Chile, Facultad Agronomía e Ingeniería Forestal,
Casilla 306-22, Santiago, Chile

Abstract

R.C. Peña. 2008. Propolis standardization: a chemical and biological review. Cien. Inv. Agr. 35(1):17-26. Propolis is a natural product dispensed in pharmacies and natural product warehouses. Its properties have long been acknowledged in traditional medicine, yet presently there is no monographic standard. The propolis properties most cited in the literature are its anti-inflammatory, antioxidant, and antiseptic properties, as well as its ability to act as an anti-neoplastic agent. In this paper, the pharmacologic and analytical data for propolis are reviewed, with the aim of providing a standardization technique that allows the production of effective and safe propolis products.

Key words: Analytic standards, *Apis mellifera*, honeybees, palynological method, pharmacology, propolis.

Introducción

El propóleos (número de registro Chemical Abstracts Service (CAS) 9009-62-5) es un producto apícola resinoso y complejo, con una variable apariencia física, recogido y transformado por las abejas melíferas, *Apis mellifera*, desde la vegetación que visitan. Puede ser ocre, rojo, pardo, marrón claro o verde, algunos son friables y firmes, mientras que otros son gomosos y elásticos (Krell, 1996; Salatino *et al.*, 2005). Etimológicamente el término proviene del griego y significa en “defensa de la ciudad (o colmena)”. Geopropolis es el equivalente del propóleos de abeja melífera, producido por himenópteros (Hymenoptera: Meliponinae) nativos de Brasil, el cual contiene materiales arcillosos del suelo (Pereira *et al.*, 2003; Barth 2003, 2004, 2006). Se postula que diferentes propóleos pueden presentar diferentes propiedades químicas y farmacológicas (Bankova, 2005). Por lo tanto, la estandarización de los propóleos es una necesidad. Cabe destacar que en Chile

y posiblemente en otros países la autoridad sanitaria los considera como alimento o suplemento alimentario.

Esta revisión tiene por objetivo presentar una actualización de los métodos de caracterización palinológica y química de los propóleos.

Origen floral y perfil palinológico

El propóleos producido por *A. mellifera* se caracteriza por presentar gran variedad de colores y subsidiariamente por su perfil palinológico. Así tenemos propóleos ricos en polen de especies de *Eucalyptus* (Montenegro *et al.*, 2000, 2001a), *Populus* (*P. alba*, *P. nigra* y *P. tremula*) (Adelmann *et al.*, 2007; Bankova *et al.*, 2002; Montenegro *et al.*, 2001b; D’Albore, 1979) y *Baccharis* (Park *et al.*, 2004; Barth, 1998).

El origen floral y composición palinológica de los propóleos depende en gran medida de las especies vegetales presentes en una zona. Por ejemplo, existen propóleos verde de Brasil y de Chile central en los que predominan polen de *Baccharis dracunculifolia* y *B. linearis*, respectivamente (Bankova, 2005; Montenegro

et al., 2001a). En Cuba, existen propóleos donde predominan especies de *Clusia* (Cuesta Rubio *et al.*, 1999).

En una red de apiarios de Chile central, las especies más frecuentes fueron *Salix humboldtiana* y *E. globulus* entre las plantas endémicas e introducidas, respectivamente (Montenegro *et al.*, 2001b; Koenig, 1995). En otras partes del mundo, los propóleos provienen de especies de los géneros *Acacia*, *Betula*, *Cistus*, *Pinus*, *Quercus*, *Salix*, *Ulmus* y *Xantorrhea* (Bankova *et al.*, 2000b; Martos *et al.*, 1997).

El origen botánico de los propóleos de la zona central de Chile se ha determinado por análisis micro-morfológicos de polen y anexos epidérmicos (Montenegro *et al.*, 2001a). Sin embargo, los métodos espectrofotométricos, incluyendo el de Folin Cicalteu (Hernández *et al.*, 2005), se cuentan entre los más empleados y se incluyen en diversas farmacopeas (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006; Tosi *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2004).

Composición

Más de 300 compuestos químicos se han descrito en los propóleos de diversos orígenes (Castaldo y Capasso, 2002; Pereira *et al.*, 2002). Así por ejemplo, se identificaron lignanos en muestras de propóleos obtenidas de Santa Cruz (VI Región, Chile) (Valcic *et al.*, 1998, 1999). En forma similar se ha encontrado presencia de flavonoides en muestras comerciales (Astudillo *et al.*, 2000). En muestras de propóleos tipificadas palinológicamente se demostró la presencia de terpenos y flavonoides. Entre estos últimos se ha reportado la presencia de acetina, ácido cinámico, cumarina, galangina, izalpina, kaempferido pinocembrina, preniletina, viscidona y vanillina (Muñoz *et al.*, 2001a, b). La preniletina se ha identificado en extractos epicuticulares obtenidos de *Haplopappus foliosus* (Vogel *et al.*, 2006; Urzua, 2004).

Por otro lado, en muestras obtenidas en Valdivia se identificó galangina, crisina, 3-metilgalangina 7-metilgalangina (Alarcón Bartolotti, 1989). La 5, 7-dihidroxi flavona, 3, 5, 7-trihidroxi flavona y 5, 7-dihidroxi flavanona

exhibieron un fuerte efecto como atrapadores de radicales libres (Astudillo *et al.*, 2000).

Métodos para la caracterización química

Químicamente, los propóleos más estudiados son los que siguen la composición de los *Populus* europeos (Havsteen, 2002). Estos estudios se han realizado por cromatografía de gas acoplada a espectrometría de masas. Sin embargo, debido a la baja reproducibilidad de estos métodos, actualmente se recomienda el uso de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) (Figura 1).

Una variante metodológica por electro-aspersión se ha ensayado recientemente, tanto para determinar los patrones como las cantidades de compuestos polifenólicos de propóleos (Volpi y Bengonzini, 2006). Uno de los mejores métodos de detección se obtiene por resonancia magnética nuclear, ya que detecta compuestos sensibles o insensibles a la luz ultravioleta (Gómez-Caravaca *et al.*, 2006, Watson *et al.*, 2006). Además, los métodos quimiométricos son cada vez más comunes en la literatura y se prevé la posibilidad de detectar adulteraciones (Watson *et al.*, 2006).

Por otra parte, los métodos empleados para la extracción de compuestos de propolis requieren una adecuada estandarización. D'Albore (1979) usó una mezcla de etanol, cloroformo y acetona, seguido de hidróxido de potasio etanol y acetólisis. La acetólisis permite separar gran cantidad de material orgánico post-extracción (Barth, 1998). Otros autores simplifican la extracción con etanol seguido de hidróxido de potasio, ultrasonido y tratamiento de acetólisis, con lo cual mejoran la concentración de polen (Barth, 1998).

Un método de extracción innovador, mediante altas presiones hidrostáticas (HHP), logra extraer eficientemente los flavonoides, disminuyendo considerablemente el tiempo de extracción (Shouqin *et al.*, 2005).

Propiedades medicinales, tolerancia y efectos indeseables

La farmacodinamia ha sido revisada reciente-

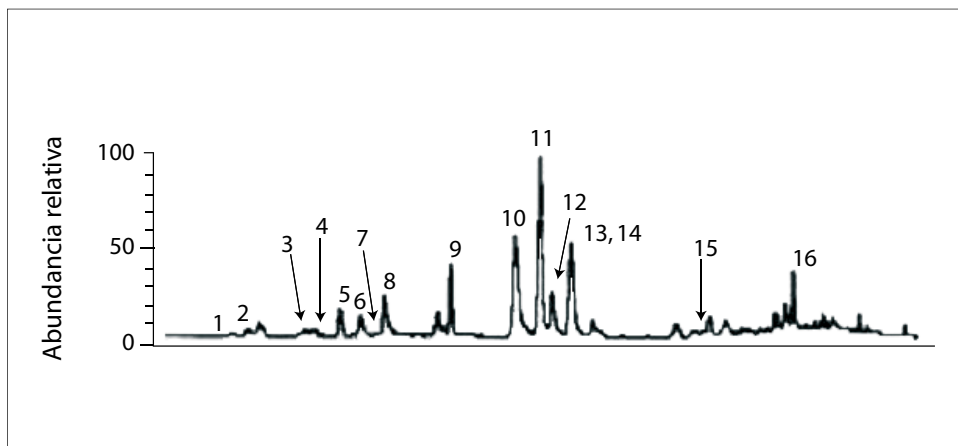


Figura 1. Espectro de propóleos chilenos obtenidos por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Crisina (10), pinocembrina (11) y 3 acetato de pinobanksina (13). (Kumazawa *et al.*, 2004).

Figure 1. Spectrum of Chilean propolis obtained by high resolution liquid chromatography (HPLC). Chrisin (10), pinocembrin (11) and pinobanksin 3 acetate (13) (Kumazawa *et al.*, 2004).

mente por Menezes (2005), destacando propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas, antioxidantes y antineoplásicas. No obstante, muchas de estas cualidades aun requieren de una verificación adicional (Nakajima *et al.* 2007., Paulino *et al.* 2003, Nagai *et al.* 2001, Natarajan *et al.* 1996).

En general, el propóleos es un producto bien tolerado. Faltan estudios sobre los efectos alergénicos debidos a las ceras presentes en estos productos. No obstante, se han reportado casos de dermatitis asociados a ciertos propóleos (Hasan *et al.*, 2005; Gambichler *et al.*, 2004; Kuegler *et al.*, 2005; Callejo, 2001).

Los antecedentes de productos cosméticos permiten afirmar que la cera alba (cera de abeja) (CAS 8012-89-3), un producto extraído de propóleos, produce dermatitis de contacto. Esto fue comprobado por pruebas cruzadas contra propóleos. Además, la cera alba se emplea como aditivo alimentario por lo que se debe tener especial cuidado con los individuos sensibles (Jensen y Andersen, 2006).

Existen informes que confunden la presencia de cera de abejas con propóleos. En estos informes se considera que los productos farmacéuticos serían sensibilizantes por la

presencia de compuestos tales como ácidos y esteres fenólicos: 3, 3-dimetilalilcafeato, cafeato de isoprenilo y el derivado feniletil éster del ácido cafeico (CAPE) (Lübbe y Sánchez-Politta, 2005; Burdock, 1998; Hansson *et al.*, 1995) (Figura 2). Recientemente, compuestos prenilados como el ácido 3-[4-hidroxi-3,5-bis (3-metil-2-butenil)fenil]-2(E)-propenoico se han estudiado por su eficiente actividad antioxidante (Nakanishi *et al.*, 2003) (Figura 2). De igual modo sesquiterpenlactonas, muy comunes en plantas de la familia Asteraceae, presentan fuerte actividad antiinflamatoria. Una molécula muy frecuente de este grupo es dehidrocostus lactona (Figura 2).

Por otra parte, se debe considerar que algunos tipos de propóleos muy oscuros contienen flavonoides altamente tóxicos (Greenaway, 1987). Finalmente existe un informe de un caso de daño renal reversible por exposición a un producto con propóleos brasileños ocurrido en una mujer de 57 años con colangiocarcinoma (Li *et al.*, 2005).

La cera que se separa de los propóleos entre otros compuestos contiene alcanos, alquenos, alcadienos y ácidos grasos. Sin embargo, las ceras de los propóleos brasileños se basan en monoésteres de ácidos carboxílicos o alcoholes

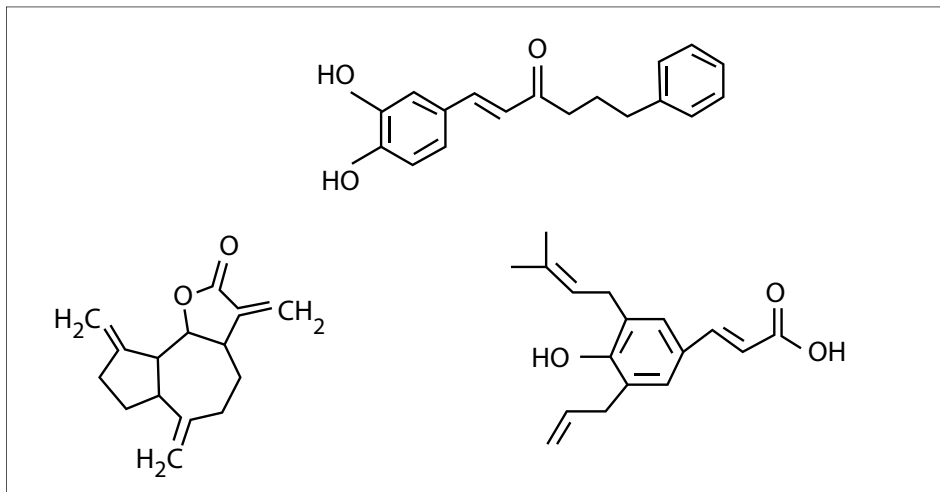


Figura 2. Estructuras de algunos compuestos químicos representativos de propóleos: feniletil éster del ácido cafeico, dihidrocústus-lactona, un sesquiterpeno y el ácido 3-[4-hidroxi-3,5-bis(3-metil-2-butenil)fenil]-2(E)-propenoico, que actúa como un eficiente antioxidante (Nakanishi *et al.*, 2003).

Figure 2. Structures from representative chemical compounds isolated from propolis:

*phenyl ethyl ester of caffeic acid (CAPE), dihydrocumyl alcohol, a sesquiterpene and 3-[4-hydroxy-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)phenyl]-2(E)-propenoic acid, that acts as an efficient antioxidant agent (Nakanishi *et al.*, 2003).*

triterpénicos (Custodio *et al.*, 2003; Pereira y Aquino Neto, 2002).

Las propiedades antimicóticas de propóleos, incluyendo la actividad sobre varias especies de *Candida* y de *Trichosporon*, se han estudiado previamente (Oliveira *et al.*, 2006). La recomendación general es realizar un estudio de costo beneficio, considerando que la aplicación de terbinafina y fluconazol, tienen baja confiabilidad y efectividad antimicótica, ya que sólo un cuarto de los pacientes reacciona bien a la terapia vía oral con estos compuestos antimicóticos (Roberts *et al.*, 2003). Además de determinar el costo se hace necesaria la búsqueda de nuevas alternativas (Bristow, 2005). Según Silici *et al.* (2005) los flavonoides tienen propiedades antimicóticas, principalmente los provenientes de *A. mellifera* subsp. *caucasica*.

Tanto los flavonoides (Havsteen, 2002) como el etil fenil cafeato (CAPE) han sido objeto de intensas evaluaciones farmacológicas (Mafia *et al.*, 2002a, b; Rossi *et al.*, 2002). CAPE inhibe la síntesis de eicosanoides (Márquez *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2002, Michaluart *et al.*, 1999) y del ácido nítrico (Nagaoka *et al.*, 2003),

lo que se podría tratar de un efecto indirecto debido a la inhibición de radicales libres o de algún promotor de la óxido nítrico sintetasa (E.C.1.14.13.39). Galangina es un flavonoide relevante y posiblemente junto al compuesto anterior dan cuenta de la mayor actividad inhibitoria de radicales libres (Farré *et al.*, 2004; Rossi *et al.*, 2002).

El tratamiento dental con resinas adhesivas es una técnica para sellar la dentadura, evitando la entrada de microbios a la pulpa dentaria. Tagakashi *et al.* (2002) ensayaron la fase flavonoide y no flavonoide del propóleos, considerando que contenidos superiores a 2 mg de propóleos son tóxicos para la dentina. Estos autores encontraron que la fase flavonoide es antiinflamatoria, confirmando los estudios previos (Almeida y Menezes, 2004; Scheller *et al.*, 1978).

El efecto de propóleos Apiherbal® en periodontitis crónica y agresiva fue estudiado por Del Río (2006). La periodontitis es una patología infecciosa provocada por *Porphyromonas gingivalis*, bacteria Gram negativa, la que tradicionalmente se trata con

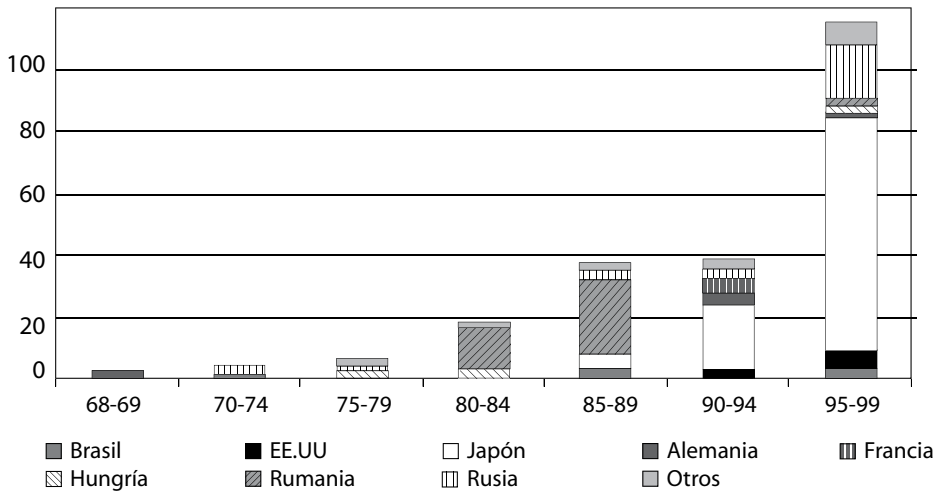


Figura 3. Aumento de las patentes con propóleos por países entre 1965 y 1999 (adaptado de Pereira *et al.*, 2002).
Figure 3. Increment of propolis patenting by countries between 1965 and 1999 (adapted from Pereira *et al.*, 2002).

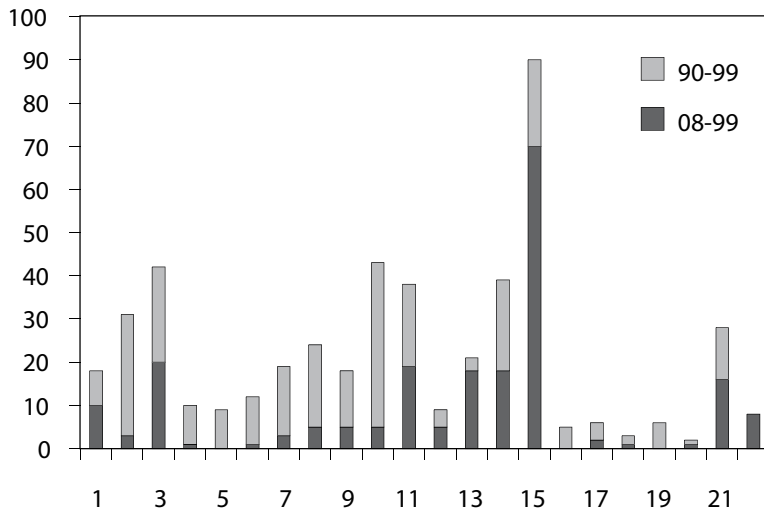


Figura 4. Productividad científica décadas 1910 a 1990 (adaptado de Pereira *et al.*, 2002). 1. Alemania, 2. Brasil, 3. Bulgaria, 4. China, 5. Cuba, 6. España, 7. EE.UU., 8. Francia, 9. Italia, 10. Japón, 11. Polonia, 12. Reino Unido, 13. República Checa, 14. Rumanía, 15. Rusia, 16. Egipto, 17. Holanda, 18. Yugoslavia, 19. Hungría, 20. Ucrania, 21. Otros, 22. Indeterminado.
Figure 4. Propolis-related scientific productivity between 1910 and 1990 (adapted from Pereira *et al.*, 2002). 1. Germany, 2. Brazil, 3. Bulgaria, 4. China, 5. Cuba, 6. Spain, 7. USA, 8. France, 9. Italy, 10. Japan, 11. Poland, 12. United Kingdom, 13. Czech Republic, 14. Romania, 15. Russia, 16. Egypt, 17. Netherlands, 18. Yugoslavia, 19. Hungary, 20. Ukraine, 21. Others, 22. Not determined.

antibióticos penicilámicos y quinólicos. Por su acción contra *Streptococcus mutans* está siendo investigada para el tratamiento de las caries (Koo *et al.*, 2002). Las sustancias del propóleo inhiben la glucosil transferasa, enzima relacionada con la fijación de microbios al tejido dentario. La apigenina y *tt*-farnesol serían en parte responsables de tal inhibición. Obviamente la acción sinérgica de varios compuestos flavonoides y terpenos presentes en el propóleo mejora la acción de este producto natural (Kosalec *et al.*, 2005). Por sus propiedades antibióticas, el propóleo, también ha sido ensayado en otitis de animales (Holz, 1999), o como aditivo alimentario en la cría de pollos (Khojasteh Shalmany y Shivazad, 2006; Biavatti *et al.*, 2003).

Propiedades antioxidantes

Las propiedades antioxidantes del propóleo también son notables. Sólo son superadas por el té verde (Sroka, 2006). Algunos compuestos antioxidantes identificados incluyen ácido ferúlico, quercetina y ácido cafeico (Usami *et al.*, 2004). Propóleos de algunas fuentes serían bioactivos por la presencia de compuestos prenilados (Chen *et al.*, 2004). Apigenina, compuesto presente en mieles y propóleos, presentaría un efecto supresor de tumores p53 (Muñoz *et al.*, 2007; McVean *et al.*, 2000).

Russo *et al.* (2004, 2006) estudió un propóleo (Naturandes Chile) determinando las propiedades antioxidantes, las que se atribuyen a galangina, ácido cafeico, ácido ferúlico, *p*-cumárico y CAPE. En general, según Nagai *et al.* (2001) el propóleo es más activo que el resto de los productos de la colmena en su propiedades antioxidantes. Kumazawa *et al.* (2004) describen crisina, pinoembrina y 3 acetato de pinobanksina entre los compuestos mayoritarios de propóleos chilenos, pero estos compuestos no son antioxidantes muy potentes.

Otros compuestos antioxidantes como CAPE son minoritarios en la muestra analizada. Un estudio sobre la composición de los propóleos del Perú también demostró tener actividad antioxidante poco potente, correlacionando con la baja concentración de CAPE. Es posible

que la similitud de los climas bajo la corriente de Humboldt podría explicar esta situación (Banskota *et al.*, 2001).

Mercado

Internacionalmente, la primera patente se inscribió en Rumania (1965), totalizando 239 en el mundo para el período analizado. En los años 80 predominaron en la ex URSS y los países satélites. En la actualidad, el 43% de las patentes son de origen japonés (Figura 3).

El 6,2% de las patentes corresponden a productos para tratamientos odontológicos. Japón tuvo un crecimiento de 660% en la década de los años 80 a 90 en la productividad científica (Figura 4). De igual modo el precio ascendió de 5 a 200 dólares por kilogramo, para productos de Brasil, los que además de una mejor calidad tendrían menor contenido de metales pesados que el propóleo de otros proveedores.

En Chile, el mercado del propóleo es cautivo y su manejo es artesanal. Por tanto, requiere de una amplia difusión de las diferentes propiedades de este producto, para interesar a los productores y empresarios a incursionar en un rubro no tradicional dentro de la actividad apícola. Se considera necesario poner especial énfasis en el manejo y explotación de la colmena, optimizando la producción, para lograr insertar el propóleo chileno en el mercado nacional e internacional (Hernández *et al.*, 2005).

Una posibilidad es dar énfasis en trazabilidad como se ha hecho con otros productos de la colmena, particularmente con la miel. Lo que se busca son productos con denominación de origen especialmente como el propuesto por el Sistema de Inspección y Certificación para la exportación del Servicio Agrícola y Ganadero (SAG).

Comentarios finales

El propóleo es un producto de la colmena de composición compleja, abandonado temporalmente por la industria farmacéutica (Farré *et al.*, 2004). Sólo se tienen preparados galénicos consistentes en extractos hidroalcohólicos carentes de protocolos de

producción. Sin embargo, existe un renovado interés por parte de la industria farmacéutica y dermocosmética. En la actualidad existen métodos analíticos y biológicos, incluyendo los métodos de determinación palinológica, que permiten asegurar la calidad. El dogma que el propóleo de zona templada se basaría en *Populus* ha sido superado. Por ejemplo en Chile, *Salix* reemplaza al álamo como fuente de resinas (Montenegro *et al.* 2001b, 2004; Ruoff y Bogdanov, 2004). Montenegro *et al.* (2000) han sugerido que la flora nativa contribuye en forma importante como recurso propolífero, incluyendo *Baccharis linearis*, *Escallonia pulverulenta* y *Salix humboldtiana*. La detección de viscidona en muestra de propóleo de Colliguay confirmaría al menos la presencia de romerillo (*Baccharis*) (Muñoz *et al.*, 2001b).

Los métodos por cromatografía de alto rendimiento serían onerosos para control de rutina (Cunha *et al.*, 2004). Niveles máximos de ceras, metales pesados y acaricidas son los principales componentes que se deben normar (Ruoff y Bogdanov, 2004; Bankova *et al.*, 2000). Es importante considerar que los mercados internacionales son muy exigentes en términos de compuestos trazas, metales pesados y contaminantes ambientales (Pereira *et al.*, 2002).

Conclusión

Los resultados de esta investigación bibliográfica permiten destacar la importancia de los propóleos para la salud y al mismo tiempo el interés creciente manifestado por el considerable aumento de la patentes de productos a base de propóleos, a nivel mundial. Aun cuando el desarrollo de métodos que permitan establecer la calidad se encuentran en desarrollo, los protocolos actuales no necesariamente consideran la gran diversidad de propóleos existentes y sus propiedades farmacológicas. Es evidente la necesidad de pruebas adicionales y de investigar en profundidad los efectos biológicos del propóleo, especialmente considerando la variabilidad de su composición. Al mismo tiempo parece necesario desarrollar protocolos de producción debidamente estandarizados.

Resumen

El propóleo es un producto apícola resinoso y complejo, con una variable apariencia física, recogido y transformado por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) desde la vegetación que visitan. Se distribuye en farmacias y almacenes naturistas, y en la actualidad carece de un estándar de calidad. Las propiedades biológicas y farmacológicas más estudiadas son aquellas que lo describen como agente antiinflamatorio, antioxidante, antiséptico y antineoplásico. En este trabajo se revisa la información farmacológica y analítica tendiente a una estandarización que permita producir medicamentos de eficacia y seguridad terapéutica comprobable.

Palabras clave: Abejas, *Apis mellifera*, estándares analíticos, farmacología, método palinológico, propóleos.

Agradecimientos

El autor agradece el financiamiento recibido a través del proyecto Fondecyt 1060535.

Literatura citada

- Adelmann, J., M. Passos, D. H. Breyer, M. H. Rocha dos Santos, C. Lenz, N. F. Leite, F. M. Lanças, and J. D. Fontana. 2007. Exotic flora dependence of an unusual Brazilian propolis: The pinocembrin biomarker by capillary techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 43:174-178.
- Alarcón Bartolotti, R. 1989. Estudio Químico de propóleos. Tesis de Grado Pedagogía en Biología Universidad Austral de Chile.
- Almeida, E. C. de, and H. Menezes. 2002. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. *J. Venom. Anim. Toxins*. 8:191-212.
- Astudillo, S., L., R. Avila, F.R. Morrison., M. Gutierrez, J. Bastida J., C. Codina, and G. Schmeda-Hirschmann. 2000. Biologically active compounds from Chilean propolis. *Bol. Soc. Chil. Quím.* 45:577-581.
- Bankova, B. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. *eCAM* 2:29-32.
- Bankova, V., and M.C. Marcucci. 2000. Standardization of propolis: present status and perspectives. *Bee World* 81:182-188
- Bankova, V., L. De Castro, and M.C. Marcucci.

2000. Propolis recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31:3-15.
- Bankova, V., M. Popova, S. Bogdanov, y A.G. Sabatini. 2002. Chemical composition of European propolis: expected and unexpected results. *Z. Naturforsch.* 57c: 530-533.
- Banskota, A.H., Y. Tezuka, y S. Kadota. 2001. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research* 15:561-571.
- Barth, O. 1998. Pollen analysis of Brazilian propolis. *Grana* 37:97-101.
- Barth, O. 2003. Palynological analysis of Brazilian geopropolis sediments. *Grana* 42:121-127.
- Barth, O. 2004. Melissopalynology in Brazil: A review of pollen analysis of honeys, propolis, and pollen load of bees. *Sci Agric. (Piracicaba, Brazil)* 6:342-350.
- Barth, O. 2006. Palynological analysis of geopropolis samples obtained from six species of Meliponinae in the Campus of Universidade Riverao Preto, Brasil, USP, Brasil. *Apiacta (Argentina)* 41:71-85.
- Biavatti, M.W., Bellaver, M.H., L. Volpato, y C. Bellaver C. 2003. Preliminary studies of alternative feed additives for broilers: *Alternanthera brasiliana* extract, propolis extract and linseed oil. *Rev. Bras. Cienc. Avic.* 5:147-151.
- Bristow, I. 2005. Fungal infections of nails. *New Perspectives Bristow. The International Journal of Lower Extremities Wounds (on line)* 4:72-73.
- Burdock, G. A. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology* 36:347-363.
- Callejo, A., A. Armentia, M. Lombardero., C. Martínez, S. Rebollo, E. Sedano E., R. de la Fuente, y A. Fernández. 2001. Hypersensitivity to propolis. Case report. *Alergol. Immunol. Clin.* 16:113-117.
- Castaldo, S, y F.Capasso. 2002. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia* 73:S1-S6.
- Chen, C.N., Weng M.S, Wu C.L., y J.K.Lin.2004. Comparison of radical scavenging activity, cytotoxic effects and apoptosis induction in Human melanoma cells by Taiwanese propolis from different sources. *eCAM* 1:175-185.
- Cuesta Rubio, O., A. Cuellar Cuellar, N. Rojas, H. Velez Castro, L. Rastrelli, y R. Aquino. 1999. A polyisoprenylated benzophenone from Cuban Propolis. *J. Nat. Prod.* 62:1013-1015.
- Cunha, I.B.S., A.C.H.F. Sawayaa, F.M. Caetano, M.T. Shimizua, M.C. Marcucci, F.T. Drezza, G.S. Poviaa, y P.de O. Carvalhoa. 2004. Factors that influence the yield and composition of Brazilian propolis extracts. *J.Braz.Chem. Soc.*15:964-970.
- Custodio, A.R., M.M.C. Ferreira, G. Negri, y A. Salatino. 2003. Clustering of comb and propolis waxes based on the distribution of aliphatic constituents. *J. Braz. Chem. Soc.* 14:354-357.
- D'Albore, G.R. 1979. L'origine géographique de la propolis. *Apidologie* 10:241-267.
- Del Río, P.I. 2006. Actividad biocida de un propolis chileno frente a *Porphyromonas gingivalis*: estudio *in vitro*. Tesis Médico Odontólogo, Universidad de Chile. Santiago, Chile 130 pp. www.cybertesis.cl/tesis/uchile/2006/delrio_p/html/index.html.
- Farré, R., F.R. Frasquet y A. Sánchez. 2004. El propolis y la salud. *Ars Pharmaceutica* 45:21-43.
- Gambichler, T., S. Boms, y M. Freitag. 2004. Contact dermatitis and other skin conditions in instrumental musicians. *BMC Dermatology* 4:3.
- Gómez-Caravaca A.M., G.M. Gómez-Romero, D. Arráez-Román, A. Segura-Carretero, y A. Fernández-Gutiérrez. 2006. Advances of phenolic compounds in product derived from bees. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41:1220-1234.
- Hansson, C., M.Ezzeralab, y O.Steiner 1995. Oxidative activation of the propolis hapten isoprenyl caffeate. *Acta Dermato-Venereologica* 75:34-36.
- Hasan, T., K. Rantanen, K. Alanko, J. Harvima, R. Jolanki, K. Kalimo, A. Latí, K. Lammintausta, I. Lauerma, A. Laukkanen, T. Luukkaala, R. Riekkí, K.Turjanmaa, E. Varjonen, y A.-M. Vuorela. 2005. Patch test reactions to cosmetic allergens in 1995-1997 and 2000-2002 in Finland- A multicentre study. *Contact Dermatitis* 53:40-45.
- Havsteen, B.H. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol. Ther.* 96:67-202.
- Hernández, S.M, S.C. Lazo, M.J. Junod, M.J. Arancibia, S.R. Flores, A.E. Valencia, y V.E. Valenzuela. 2005. Características organolépticas y físico-químicas de propóleos de la provincia de Ñuble, VIII Región-Chile. *Archivo Latinoamericano de Nutrición* 55:374-380.
- Holz, J. 1999. Zum Wirksamkeit von Propoliszubereitung bei Otitis externa des Hundes sowie Untersuchungen der antibakteriellen, antiviralen Aktivitäten von etanolischen Propolisextraktes und deren Wirkung auf Zellkulturen. Inaugural Diss. Freie Universitaet Berlin, Doktors der Vererinärmedizin. www.diss.fuberlin.de/1999/93/holz.pdf/ (Consultado: diciembre de 2006).

- Jensen, C.D., y K.E. Andersen. 2006. Allergic contact dermatitis from cera alba (purified propolis) in a lip balm and candy. *Contact Dermatitis* 55:312-313.
- Khojasteh Shalmany, S., y M. Shivazad. 2006. The effect of diet propolis supplementation on Ross broiler Chick performance. www.pjbs.org/ijps/fin529.pdf. (Consultado: enero de 2007).
- Koenig, B. 1995. Plant sources of propolis. *Bee World* 66:136-139.
- Koo, H., P.L. Rosalen, J.A. Cury, K. Yong. Park, y W.H. Bowen. 2002. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46:1302-1309.
- Kosalec, I., S. Pepelnjak, M. Bakmaz, y V. Wladimir-Knezevic. 2005. Flavonoid analysis and antimicrobial activity of commercially available propolis products. *Acta Pharm.* 55:423-430.
- Krell, R. 1996. Value added products from beekeeping FAO Agricultural Services Bulletin No. 124. Chapter V. <http://www.fao.org/docrep/w0076e/w0076e00.htm> (Consultado: abril de 2007).
- Kuegler, K., T. Brinkmeier, P.J. Frosch, y W. Uter. 2005. Anogenitaldermatosen - allergische und irritative Ausloesefaktoren Analyse von Daten des IVDK und Literaturübersicht. *Journal der deutschen dermatologischen Gesellschaft* 3:979-986.
- Kumazawa, S., T. Hamazaka, y T. Nakayama. 2004. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chemistry* 84:329-339.
- Li, Y., J. L. Lin, Ch.-W. Yang, y Ch.-Ch. Yu . 2007. Case report acute renal failure induced by a Brazilian variety of propolis. *American J. Kidney Dis.* 46:125-129.
- Lübbe, J, y S. Sanchez-Politta. 2005. Propolis, beeswax, and sensitization potential of topical calcineurin inhibitors. *Clinical and Experimental Dermatology* 31:129-156.
- Mafia, P., A. Ianaro, B. Pisano, F. Borrelli, F. Capasso, A. Pinto, y A. Iatenti. 2002a. The role of the phenethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia* 73:S30-S37.
- Mafia, P., A. Ianaro, B. Pisano, F. Borrelli, F. Capasso, A. Pinto, y A. Iatenti. 2002b. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester in a rat model of vascular injury *British Journal of Pharmacology* 136:353-360.
- Martos, I., M. Cossentini, F. Ferreres, y F.A. Tomas-Barberan. 1997. Flavonoid Composition of Tunisian Honeys and Propolis. *J. Agric. Food Chem.* 45:2824-2829.
- McVean, M., H. Xiao, K.-I. Isobe, y J. Pelling. 2000. Increased in wild type p53 stability and transactivational activity by the chemopreventive agent apigenin in keratinocytes. *Carcinogenesis* 21:633-639.
- Menezes, H. 2005. Propolis uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. *Arq. Inst. Biol.* 72:405-411.
- Michaluart, P., J.L. Masferrer, A.M. Carothers, K. Subaramaiah, B.S. Zweifel, C. Koboldt, J.R. Mestre, D. Grunberger, P.G. Sacks , T. Tanabe, y A.J. Danneberg. 1999. Inhibitory effect of caffeic acid phenylethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase 2 in human oral epithelial cells and in rat model of inflammation. *Cancer Research* 59:2347-2352.
- Montenegro, G., B.N. Timmermann, R.C. Peña, A. Mujica, y G. Avila. 2000. Pollen grains and vegetative structures in propolis as indicators of potential drugs in Chilean plants. *Phyton* 66:15-23.
- Montenegro, G., G. Avila, y R.C. Peña. 2001a. Botanical origin and seasonal production of propolis in hives of Central Chile. *Bol. Bot. Univ. Sao Paulo* 19:1-6.
- Montenegro, G., R.C. Peña, A. Mujica, y R. Pizarro. 2001b. Botanical resources for propolis in an apiary network in central Chile. *Phyton*:191-201.
- Muñoz, O., E. Ureta, R.C. Peña, y G. Montenegro. 2001a. Propolis of matorral of Central Chile hives. *Z. Naturforsch.* 56c:269-272.
- Muñoz, O., R.C. Peña, E. Ureta, G. Montenegro, C. Caldwell, y B.N. Timmermann. 2001b. Phenolic compounds of propolis from central Chilean matorral. *Z. Naturforsch.* 56:273-274.
- Muñoz, O., S. Copaja, H. Speisky, R. C. Peña, y G. Montenegro. 2007. Contenido de flavonoides y compuestos fenólicos de mieles chilenas e índice antioxidante. *Química Nova* 30:848-851.
- Nagai, T., M. Sakai, R. Inoue, H. Inoue, y N. Suzuki. 2001. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. *Food Chemistry* 75:237-240.
- Nagaoka, T., A.H. Bankota, Y. Tesuka, N. Midorikawa, K. Matsushige, y S. Kadota. 2003. Caffeic acid phenyl ester CAPE analogues: potent nitric oxides inhibitors from Netherlands propolis. *Biol. Pharm. Bull.* 26:487-491.
- Nakajima, Y., M. Shimazawa, S. Mishima, y H. Hara. 2007. Water extract of propolis and its main constituents, caffeoylquinic acid derivatives, exert neuroprotective effects *via* antioxidants actions. *Life Sciences* 80:370-377.
- Nakanishi, I., Y. Uto, K. Ohkubo, K. Miyazaki, H. Yakumaru, S. Urano, H. Okuda, J.-I. Ueda,

- T. Ozawa, K. Fukuhara, S. Fukuzumi, H. Nagasawa, H. Hori, y N. Ikota. 2003. Efficient radical scavenging ability of artemisinin, a major component of Brazilian propolis, and the mechanism. *Org. Biomol. Chem.* 1:1452-1454.
- Natarajan, K., T.R. Singh, S. Burke, D. Grunberger, y B.B. Aggarwal. 1996. Caffeic acid phenylethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 93:9090-9095.
- Oliveira, A.C., C.S. Shinobu, R. Longhini, S.L. Franco, y T.I.E. Svidzinski. 2006. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz (Brazil)* 101:493-497.
- Park, Y.K., J.F. Paredes-Guzman, C.L. Aguiar, S.M. Alencar, y F.Y. Fujiwara. 2004. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. *J. Agric. Food Chem.* 52:1100-1103.
- Paulino, N., A.P. Dantas, V. Bankova, V.D. Tagliari Longhi, A. Scremin, S.L. De Castro, y J.B. Calixto. 2003. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. *J. Pharmacol. Sci.* 93:307-313.
- Pereira, A.S., S.F. Seixas, F. Mathias Silva e F. Aquino Neto. 2002. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova* 25:321-326.
- Pereira, A.S., B. Bicalho, y F.R. de Aquino Neto. 2003. Comparison of propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula*. *Apidologie* 34:291-298.
- Roberts, D.T., W.D. Taylor, y J. Boyle. 2003. Guidelines for treatment of onychomycosis. *British Journal of Dermatology* 148:402-410.
- Rossi, A., R. Longo, A. Russo, F. Borrelli, y L. Sautebin. 2002. The role of phenyl ethyl ester of caffeic acid (CAPE) in the inhibition of rat lung cyclooxygenase activity by propolis. *Fitoterapia* 73:S30-S37.
- Ruoff, K., y S. Bogdanov. 2004. Authenticity of honey and other bee products. *Apiacta* 38:317-327.
- Russo, A., V. Cardile, F. Sanchez, N. Troncoso, A. Vanella, y J. Garbarino. 2004. Chilean propolis: antioxidant activity and antiproliferative action in human tumor cell lines. *Life sciences* 76:545-558.
- Russo, A., N. Troncoso, F. Sanchez, J. Garbarino, y A. Vanella. 2006. Propolis protect human spermatozoa from DNA damage caused by benzo[a]pyrene and exogenous reactive oxygen species. *Life sciences* 78:1401-1406.
- Salatino A., É. Weinstein Teixeira, G. Negri y D. Message. 2005. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *eCAM* 2:33-38. <http://ecam.oxfordjournals.org/cgi/content/abstract/2/1/33> (Consultado: enero de 2008).
- Scheller S., L. Ilewicz, M. Luciak, D. Skrobidska, A. Stojko, y W. Matuga. 1978. Biological properties and clinical application of propolis. IX. Experimental observation on the influence of ethanol extract of propolis (EEP) on dental pulp regeneration. *Arzneimittelforschung* 28:289-291.
- Shouqin Z., X. Jun, y W. Changzheng. 2005. High hydrostatic pressure extraction of flavonoids from propolis. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80:50-54.
- Sroka, Z. 2006. The screening analysis of antiradical activity of some plant extracts. *Postepy Hyg. Med. Dosw. (on line)* 60:563-570.
- Tosi, E., M.C. Ciappini, A.F. Cazzoli, y L.M. Tapiz. 2006. Physico-chemical characteristics of propolis produced in Santa Fe (Argentina). *Apiacta* 41:110-120.
- Urzua, A. 2004. Secondary metabolites in the epicuticle of *Haploppappus foliosus* DC. (Asteraceae). *J. Chil. Chem. Soc.* 49:137-141.
- Usami, E., G. Kusano, T. Takayose, H. Wachi, y Y. Seyama. 2004. Assessment of antioxidant activity of natural compounds by water and lipid-soluble antioxidant factor. *Yakugaku Zasshi*. 124:847-850.
- Valcic S., G. Montenegro, y B.N. Timmermann. 1998. Lignans from Chilean Propolis. *J. Nat. Prod.* 61:771-775.
- Valcic S., G. Montenegro, A.M. Mujica, G. Avila, S. Franzblau, M.P. Singh, W.M. Maiese, y B. N. Timmermann. 1999. Phytochemical, morphological, and biological investigations of propolis from central Chile. *Z. Naturforsch. C* 54:406-416.
- Vogel, H., M. González, F. Faini, I. Razmilic, J. Rodríguez, J. San Martín, y F. Urbina. 2005. Antioxidant properties and TLC characterization of four Chilean *Haploppappus*-species known as bailahuén. *J. Ethnopharmacology* 97: 97-100.
- Volpi, N., y G. Bergonzini. 2006. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. *J. Pharm. and Biomedical analysis* 42:354-3671.
- Watson, D.G., E. Peyfoon, L. Zheng, D. Lu, V. Seidel, B. Johnston, J.A. Parkinson, J. Fearnley. 2006. Application of principal components analysis to ¹H NMR data obtained from propolis samples of different geographical origin. *Phytochemical Analysis*. 17:323-331.