

# **PROTOCOLLO**

## **TITOLO**

**Studio dell'effetto di un estratto idroalcolico di propoli europea a composizione chimica nota e ad alto contenuto di polifenoli (*SPRAY URTI PROPOLIS*) sulle forme lievi di infezioni delle vie aeree superiori: Studio doppio-cieco verso placebo, randomizzato, a gruppi paralleli, monocentrico**

**Il sottoscritto conferma che condurrà lo studio secondo le condizioni descritte nel protocollo.**

Cognome e nome	Indirizzo	Telefono
Dott. Giuseppe Buonomo	Via Martorano 82019 Sant'Agata de' Goti (BN)	+39 3331116150

## Sommario

<b>PREMESSA</b> .....	3
<b>RAZIONALE</b> .....	3
<b>OBIETTIVO DELLO STUDIO</b> .....	6
<b>TIPO DI STUDIO</b> .....	6
<b>POPOLAZIONE E NUMEROSITA' CAMPIONARIA</b> .....	6
<b>DURATA DELLO STUDIO</b> .....	8
<b>TRATTAMENTI IN STUDIO</b> .....	8
<b>CRITERI DI INCLUSIONE</b> .....	8
<b>CRITERI DI ESCLUSIONE</b> .....	8
<b>METODI</b> .....	9
<b>RISCHI E BENEFICI</b> .....	9
<b>EVENTI AVVERSI</b> .....	10
<b>OUTCOME PRIMARI E SECONDARI</b> .....	10
<b>INFORMAZIONE AL PAZIENTE E CONSENSO INFORMATO</b> .....	11
<b>CONSENSO INFORMATO</b> .....	11
<b>PROTEZIONE DEI PAZIENTI ARRUOLATI</b> .....	11
<b>SPERIMENTATORE PRINCIPALE</b> .....	11
<b>CENTRI PARTECIPANTI</b> .....	11
<b>RISERVATEZZA DEI DATI</b> .....	11

## PREMESSA

Le infezioni delle vie aeree superiori (*Upper Respiratory Tract Infections* - URTIs) comprendono rinosinusite, otite media acuta (OMA), faringotonsillite e laringite. Si tratta di una sintomatologia molto comune, che si attesta essere una delle cause più frequenti della consultazione del medico. Una stima risalente all'anno 2006, effettuata in Inghilterra, ha evidenziato che in un anno, nove pazienti su 100 si rivolgono al medico di base per le URTIs. Di questi nove, in tre pazienti è stata diagnosticata la tonsillite, trattata nel 91% dei casi con terapia antibiotica. Il trattamento farmacologico con antibiotici veniva prescritto anche al 50% dei restanti casi di URTIs registrati (1). La *European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, definisce, all'interno delle "Guideline for the management of acute sore throat", il "mal di gola acuto" come una sintomatologia che si protrae per una durata massima di 14 giorni, causata da un processo infiammatorio che può coinvolgere faringe, tonsille o distretti nasofaringei, per la maggior parte dei casi di origine virale o batterica.

I batteri patogeni che si ritrovano più frequentemente nei pazienti con mal di gola acuto sono gli Streptococchi del gruppo A  $\beta$ -emolitici, le cui infezioni colpiscono in Europa il 2,3% dei soggetti con età compresa tra i 15 e i 44 anni e lo 0,6% degli individui con età superiore a 45 anni (2). Altri studi epidemiologici riportano che l'infezione da *Streptococcus pyogenes* (gruppo A  $\beta$ -emolitico) è diagnosticata nel 5-15% nell'adulto (3). Altrettanto rilevanti, sono le infezioni da *Streptococcus pneumoniae* e *Staphylococcus aureus*.

1. Cook J, Hayward G, Thompson M, et al. Oral corticosteroid use for clinical and cost-effective symptom relief of sore throat: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2014;15: 365
2. Pelucchi C, Grigoryan L, Galeone C, et al. Guideline for the management of acute sore throat. *Clin Microbiol Infect*. 2012. 18(1):1-27
3. Michael R, Wessels MD. Pharyngitis and Scarlet Fever. 2016. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016

## RAZIONALE

La propoli o resina d'api è il nome generico utilizzato per identificare una sostanza naturale, resinosa, raccolta dalle api (*Apis mellifera*) da gemme, essudati e foglie di piante di diverse specie (1-3). Si tratta di una miscela eterogenea molto complessa costituita da resina (50%), cere (30%), oli essenziali (10%), polline (5%), e altri composti inclusi minerali e composti organici come gli acidi fenolici (caffeico e cinnamico) o le loro forme esterificate, i flavonoidi, i terpeni e gli stilbeni (5%) (4). Tuttavia, la composizione chimica può variare a seconda della fonte vegetale, che è correlata alla vegetazione regionale e alla stagione in cui viene raccolta (5). La propoli presenta numerose proprietà biologiche quali attività antimicrobica e antinfiammatoria (6-10). Nonostante la grande variabilità chimica, ci sono centinaia di studi a sostegno delle varie attività biologiche della propoli, che, pur avendo origini diverse e composizione chimica differente, mantiene proprietà simili. La propoli infatti ha mostrato attività antibatterica nei confronti di *Staphylococcus aureus* (11), *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* (12), *Helicobacter pylori*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus alvei*, *Bacillus larve*,

*Proteus vulgaris*, *Salmonella typhimurium* (13), *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Proteus mirabilis*, *Listeria innocua* (14-15).

La propoli ha anche effetto sull'apparato respiratorio in quanto è in grado di ridurre significativamente il numero e la gravità degli attacchi di asma notturni, migliora la funzione polmonare e riduce i meccanismi dell'infiammazione (16). In soggetti con bronchite cronica e sottoposti a trattamento con propoli, dopo alcuni giorni, la quantità e la viscosità dell'espettorato diminuiscono in modo significativo e la condizione generale dei pazienti migliora nel 70% dei casi.

La propoli, inoltre, presenta attività antinfiammatoria e immunomodulante: è stato dimostrato che la propoli è in grado di inibire la sintesi di prostaglandine, di attivare il timo, di modulare positivamente il sistema immunitario promuovendo attività fagocitaria, di stimolare l'immunità cellulare, e di integrare effetti curativi in tessuti epiteliali (17);

L'estratto idroalcolico di propoli europea ad alto contenuto di polifenoli che verrà impiegato nel presente studio clinico è già stato studiato per determinare la sua composizione chimica e le proprietà antiossidanti e antiinfiammatorie *in vitro*. In particolare sono stati indagati i cambiamenti dei livelli di espressione di quattro miRNA connessi con l'infiammazione e lo stress-ossidativo in seguito al trattamento con propoli europea (brown) e propoli brasiliana (green). Sono stati studiati i livelli di espressione di miR-17-3p e di miR-27a-3p, in quanto correlati con l'azione antiossidante, avendo come target validati rispettivamente gli mRNA codificanti per tre enzimi mitocondriali (MnSOD, GPX2 e TRXR2) e il fattore di trascrizione NFE2L2. Inoltre, sono state studiate le variazioni dei livelli di espressione due miRNA connessi con l'infiammazione, miR-19a-3p e miR-203a-3p, che presentano come target validato la citochina pro-infiammatoria TNF- $\alpha$ . Per quanto riguarda miR-27a-3p è stato registrato un aumento dei livelli di espressione in seguito al trattamento con entrambi i tipi di propoli e, in accordo con questi risultati i livelli di espressione dell'mRNA target, codificante per NFE2L2, sono risultati sottoespressi. I livelli di espressione di miR-17-3p sono significativamente diminuiti solo in seguito al trattamento con propoli europea. Questo risultato è in accordo con quanto registrato per i livelli di espressione dell'mRNA codificante per GPX2, i quali sono risultati sovraespressi. Infine i risultati hanno dimostrato che il miR-19a-3p e il miR-203a-3p sono significativamente sovraespressi nella propoli europea, mentre solo il miR-19a-3p risulta sovraespresso significativamente nella propoli brasiliana. I livelli di espressione dell'mRNA target di miR-19a-3p e di miR-203a-3p, codificante per la citochina proinfiammatoria TNF- $\alpha$ , tuttavia risultano sottoespressi solo in seguito al trattamento con propoli europea. Questi risultati dimostrano che la propoli europea possiede una superiore capacità modulatoria nei confronti dei meccanismi epigenetici rispetto alla propoli brasiliana (18).

1. Park YK, Paredes-Guzman JF, Alencar SM, Aguiar CL, Fujiwara FY. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. *J. Agric. Food Chem.* 2004;52:1100–1103.
2. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008;5(4):435-41.
3. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine.

Fitoterapia. 2002;73(1):S1-6.

4. Juliano CC, Pala CL, Massimo C. Preparation and characterisation of polymeric films containing propolis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2007; 17:177- 180.

5. de Sousa JP, Bueno PC, Gregório LE, da Silva Filho AA, Furtado NA, et al. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. *J Sep Sci*. 2007;30(16):2656 - 65.

6. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol*. 1998;36(4):347-63.

7. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*. 2001;15(7):561-71.

8. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Ishii E, Midorikawa K, et al. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*. 2001;8(1):16-23.

9. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*. 2007;113(1):1-14.

10. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*. 2008;73(9): R117-24.

11. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006;3(2):249-54.

12. Kim MJ, Kim CS, Kim BH, Ro SB, Lim YK, et al. Antimicrobial effect of Korean propolis against the mutans streptococci isolated from Korean. *J Microbiol*. 2011;49(1):161-4.

13. Orsi RO, Sforcin JM, Funari SR, Bankova V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against Salmonella Typhimurium. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(2):359-68.

14. Erkmén O, Özcan MM. Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *J Med Food*. 2008 Sep;11(3):587-92.

15. Pavilonis A, Baranauskas A, Puidokaite L, Mazeliene Z, Savickas A, et al. [Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts]. *Medicina (Kaunas)*. 2008;44(12):977-83.

16. Khayyal MT, el-Ghazaly MA, el-Khatib AS, Hatem AM, de Vries PJ, et al. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003 Feb;17(1):93-102.

17. Casaroto AR, Lara VS. Phytomedicines for Candida-associated denture stomatitis. *Fitoterapia*. 2010;81(5):323-8.

18. Zaccaria V, Curti V, Di Lorenzo A, Baldi A, Maccario C, Sommati S, Mocchi R, Daglia M. Effect of Green and Brown Propolis Extracts on the Expression Levels of microRNAs, mRNAs and Proteins, Related to Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients*. 2017; 9(10). pii: E1090.

## OBIETTIVO DELLO STUDIO

Lo studio ha lo scopo di valutare se l'applicazione di un estratto idroalcolico di propoli europea a composizione chimica nota e ad alto contenuto di polifenoli mediante spray nebulizzatore orale per la durata di 5 giorni possa consentire la guarigione da forme lievi di infezioni delle vie aeree superiori.

In particolare, sarà testata la capacità dell'estratto di propoli:

- 1) di ridurre l'incidenza del trattamento farmacologico (antibiotico o anti-infiammatorio) che verrà eseguito dopo tre giorni in caso di insorgenza di febbre o dopo 5 giorni nel caso in cui permangano i sintomi sopra indicati, e,
- 2) di ridurre l'incidenza di comparsa di ceppi patogeni resistenti agli antibiotici in tutti i soggetti con infezione di origine batterica al termine del follow-up.

## TIPO DI STUDIO

Verrà condotto uno studio controllato, randomizzato, in doppio cieco verso placebo, a gruppi paralleli, monocentrico secondo lo schema riportato in figura 1.

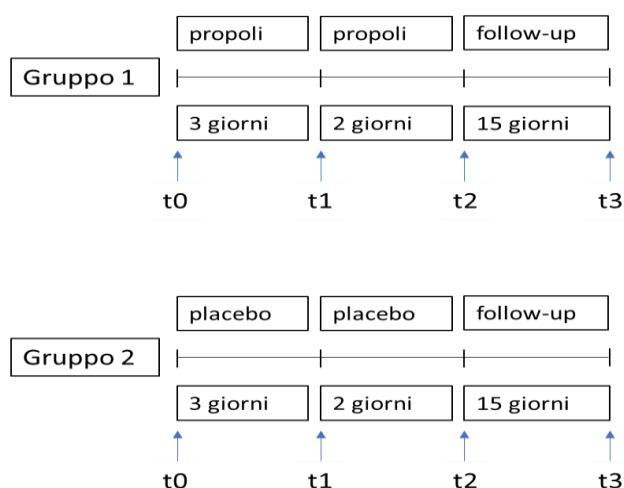


Figura 1. Tipo di studio adottato

## POPOLAZIONE E NUMEROSITA' CAMPIONARIA

Lo studio prevede di reclutare 122 soggetti di entrambi i sessi:

- 1) di età compresa tra 18 e 65 anni
- 2) con lievi forme di infezioni delle vie aeree superiori

I soggetti reclutati verranno divisi in due gruppi di studio, e destinati a ricevere uno dei due differenti trattamenti a confronto:

**2-4 spruzzi 3-4 volte al dì dell'estratto idroalcolico di propoli europea a composizione chimica nota e ad alto contenuto di polifenoli mediante spray nebulizzatore orale,**

vs

**2-4 spruzzi 3-4 volte al dì di placebo** (soluzione idroalcolica colorata con colorante caramello E150 a bassa concentrazione in modo che DGA globale del colorante apportata con la dieta risulti inferiore ai limiti indicati da EFSA).

### Dimensione del campione

Sia per l'obiettivo primario (incidenza del trattamento farmacologico), sia per l'obiettivo secondario (incidenza di patogeni antibiotico-resistenti) l'approccio statistico più adatto è l'analisi delle proporzioni tramite **test del  $\chi^2$** . Per l'analisi delle proporzioni l'*effect size* è stimato dalle frequenze di rischio relativo RR tra i due gruppi sperimentali (es. nello studio primario RR corrisponde alla probabilità di ricevere un trattamento farmacologico /probabilità di non riceverlo). Non essendo disponibili studi precedenti simili a questo, le stime di *effect size* sono state condotte ipotizzando i seguenti scenari:

- Rischio nel gruppo placebo: 99%, 90%, 80%
- Rischio nel gruppo propoli: 70%, 50%, 30%

I valori di RR utilizzati per la stima della dimensione campionaria che ne derivano:

	99%	90%	80%
70%	1.41	1.28	1.14
50%	1.98	1.80	1.60
30%	3.30	3.00	2.67

I calcoli di dimensione campionaria sono stati effettuati con tre valori di potenza  $1-\beta$  pari a 0.80, 0.95 e 0.99 e livello di significatività  $\alpha=0.05$ .

Nella seguente tabella si riportano le dimensioni campionarie complessive per le diverse ipotesi formulate.

Rischio nel gruppo placebo	Rischio nel gruppo propoli	RR (placebo/propoli)	(1- $\beta$ )= 0.99 $\alpha=0.05$	(1- $\beta$ )= 0.95 $\alpha=0.05$	(1- $\beta$ )= 0.80 $\alpha=0.05$
<b>99%</b>	<b>30%</b>	3.30	30	24	18
	<b>50%</b>	1.98	56	44	30
	<b>70%</b>	1.41	118	88	60
<b>90%</b>	<b>30%</b>	3.00	46	36	26
	<b>50%</b>	1.80	96	72	48
	<b>70%</b>	1.28	304	222	144
<b>80%</b>	<b>30%</b>	2.67	70	54	36
	<b>50%</b>	1.60	190	<b>138</b>	90
	<b>70%</b>	1.14	1408	1008	626

## **DURATA DELLO STUDIO**

Lo studio inizierà dopo parere positivo del Comitato Etico, e terminerà dopo che sarà stato arruolato l'ultimo soggetto e che saranno state eseguite le ultime analisi.

I soggetti potranno, in qualsiasi momento, ritirarsi dallo studio senza dare alcuna motivazione.

I soggetti dovranno essere esclusi dallo studio nel caso si verifichino i seguenti casi:

- ritiro del consenso da parte del soggetto;
- quando si verifica un criterio di esclusione clinicamente rilevante che può influenzare la salute del soggetto;
- non-compliance del soggetto con il protocollo;
- decisione dello sperimentatore principale;
- se il soggetto non si attiene alle indicazioni dello studio, lo sperimentatore dovrà determinarne le ragioni e le circostanze in modo accurato e completo.

## **TRATTAMENTI IN STUDIO**

Per questo studio non è previsto nessun trattamento farmacologico o assunzione di integratori alimentari e alimenti funzionali ad azione antinfiammatoria o antisettica del cavo orale oltre a SPRAY URTI PROPOLIS o placebo.

Inoltre i soggetti arruolati non devono aver assunto, nel mese precedente al reclutamento, farmaci e/o integratori alimentari e alimenti funzionali ad azione antinfiammatoria o antisettica del cavo orale.

## **CRITERI DI INCLUSIONE**

I soggetti da reclutare, che dovranno essere autosufficienti e avere propensione alla collaborazione, dovranno possedere le seguenti caratteristiche:

- soggetti di entrambi i sessi, di età compresa tra i 18 e i 65 anni affetti da forme lievi di infezioni delle vie aeree superiori diagnosticate attraverso visita di controllo del medico di medicina generale e tampone orofaringeo, seguito da antibiogramma, qualora positivo.

## **CRITERI DI ESCLUSIONE**

Saranno esclusi dallo studio i soggetti che presentano le seguenti caratteristiche:

- individui che presentano allergie, che potrebbero essere confusi con i soggetti con infezioni delle vie aeree superiori, oggetto di studio,
- soggetti immunodepressi,
- soggetti sotto terapia immunologica,
- soggetti che hanno ricevuto terapia antibiotica nelle 72 ore precedenti all'arruolamento,
- donne in gravidanza,
- donne in allattamento,

- tutti i pazienti con neoplasia maligna conclamata, malattie cardio-cerebro-vascolari recenti (entro i 90 giorni precedenti l'arruolamento), con insufficienza renale medio\severa (accertata con clearance della creatinina), e i non autonomi;
- tutti i soggetti che secondo i medici non siano idonei a partecipare allo studio in oggetto.

## METODI

I soggetti reclutati dal Dott. Giuseppe Buonomo, operante sul territorio dell'ASL di BENEVENTO, verranno divisi in due gruppi di studio in base a una tabella di randomizzazione, e assumeranno per la durata di cinque giorni, uno dei due differenti trattamenti a confronto (2-4 spruzzi 3-4 volte al dì dell'estratto idroalcolico di propoli europea a composizione chimica nota e ad alto contenuto di polifenoli mediante spray nebulizzatore orale, vs 2-4 spruzzi 3-4 volte al dì di placebo (soluzione idroalcolica colorata con colorante caramello E150 a bassa concentrazione in modo che DGA globale del colorante apportata con la dieta risulti inferiore ai limiti indicati da EFSA).

I soggetti saranno arruolati nello studio impiegando i criteri di inclusione ed esclusione sopra riportati. Prima di essere inseriti nello studio, ai soggetti consenzienti, sarà consegnato:

- 1) il foglio informativo, allegato alla presente documentazione, con chiare informazioni riguardanti lo studio clinico, gli obiettivi e le modalità di realizzazione;
- 2) il consenso informato, allegato alla presente documentazione, che verrà compilato con i dati dei soggetti, da essi firmato e controfirmato dallo sperimentatore.

Il paziente dovrà recarsi dal medico curante dopo 3 giorni dal trattamento nel caso di febbre, per la prescrizione di un opportuno trattamento farmacologico, oppure dopo 5 giorni dal trattamento. I soggetti nei quali dopo 5 giorni di trattamento con propoli o con placebo permarranno i sintomi saranno sottoposti a opportuno trattamento farmacologico.

Dopo i 5 giorni di trattamento con propoli o con placebo, seguirà il periodo di il follow-up della durata di 15 giorni.

Al termine del follow-up tutti i soggetti reclutati in cui l'infezione delle vie aeree superiori era risultata di origine batterica verranno sottoposti nuovamente a tampone orofaringeo, seguito da antibiogramma per la verifica della presenza di patogeni resistenti agli antibiotici.

## RANDOMIZZAZIONE

**La sequenza di randomizzazione sarà generata da uno statistico** utilizzando il *software* STATA 16 (*Stata Statistical Software: Release 16*. College Station, TX: StataCorp LLC), e i soggetti saranno assegnati a ciascuno dei due gruppi di trattamento (propoli e placebo) in maniera casuale ed imprevedibile mediante una randomizzazione semplice (rapporto di allocazione 1:1). Tale procedura consentirà di minimizzare il "selection bias", ossia differenze sistematiche tra le caratteristiche di base dei gruppi a confronto (sbilanciamento prognostico e di risposta al trattamento).

L'occultamento della lista di randomizzazione proteggerà la sequenza di allocazione sino all'assegnazione, e sarà conservata in un luogo inviolabile del Dipartimento di Farmacia dell'Università Federico II di Napoli. Sia la generazione della sequenza di allocazione, sia la lista di randomizzazione, saranno separate dall'implementazione della lista ai gruppi di intervento attraverso l'utilizzo di **buste chiuse**. Tali buste saranno **preparate da un ricercatore del Dipartimento di Farmacia non coinvolto nel trial da un punto di vista clinico**, dovranno essere opache, sigillate, pinzate e numerate in ordine conforme a quello della lista di randomizzazione, e successivamente

conservate in un armadio sigillato. Lo sperimentatore che arruolerà i soggetti, e che consegnerà loro uno dei due trattamenti a confronto aprendo di volta in volta la busta successiva, resterà all'oscuro della lista di randomizzazione.

## **MASCHERAMENTO**

Lo studio sarà in *double-blind* in quanto né il medico sperimentatore, né il soggetto arruolato sarà a conoscenza di quale sia l'integratore alimentare a base di propoli e quale sia il placebo.

I due trattamenti saranno resi irriconoscibili in quanto il packaging sarà identico, e i trattamenti saranno uguali per colore, e sapore.

## **RISCHI E BENEFICI**

Non è previsto nessun rischio né effetto collaterale per i soggetti che aderiscono al progetto.

I soggetti saranno comunque continuamente monitorati e, nel caso si verificano effetti indesiderati durante lo studio, il soggetto sospenderà l'assunzione dell'integratore alimentare e lo stesso dovrà uscire dallo studio. In particolare, il monitoraggio consisterà nella valutazione dei vari sintomi associati ad una probabile infezione delle vie aeree (faringodinia, abbassamento della voce, arrossamento e bruciore della gola, afonia), o dell'avvento di uno stato febbrile.

Si ipotizza, invece, un miglioramento dei sintomi delle lievi infezioni delle vie aeree superiori.

## **EVENTI AVVERSI**

Pur non essendo previsto nessun evento avverso legato all'assunzione dell'integratore alimentare, sarà annotato l'eventuale uso di farmaci durante il periodo di permanenza nello studio del soggetto e gli eventuali effetti avversi manifestati.

## **OUTCOME PRIMARI E SECONDARI**

### **Outcome primario:**

Verrà valutata la capacità dell'estratto idroalcolico di propoli europea a composizione chimica nota e ad alto contenuto di polifenoli di ridurre l'incidenza del trattamento farmacologico nel gruppo trattato con propoli rispetto al gruppo di controllo (placebo) che verrà somministrato solo dopo il terzo giorno nel caso compaia la febbre o dopo il quinto giorno nel caso in cui i sintomi della infezione delle vie aeree superiori non regrediscano.

### **Outcome secondario:**

In tutti i gruppi di pazienti (sia trattati solo con propoli, sia trattati solo con il placebo, sia in cui l'insorgenza della febbre al terzo giorno di malattia o la permanenza dei sintomi della malattia dopo 5 giorni di trattamento ha indotto un trattamento antibiotico), nei quali l'infezione delle vie aeree superiori sia risultata di origine batterica, a seguito di diagnosi tramite coltura da tampone orofaringeo positiva con successiva esecuzione dell'antibiogramma, verrà determinata l'incidenza della presenza di patogeni resistenti agli antibiotici al termine del follow-up.

## INFORMAZIONE AL PAZIENTE E CONSENSO INFORMATO

I soggetti, prima di essere arruolati nello studio clinico, verranno informati circa le finalità del progetto. L'informazione al paziente verrà fornita con apposito modulo in forma comprensibile per poter esprimere un consenso informato scritto e firmato. Lo sperimentatore, controfirmato il modulo stesso, dovrà dare una copia del consenso informato al soggetto e conservare l'originale. Il foglio di informazione per il soggetto e il modulo di consenso verranno valutati e approvati dal Comitato Etico durante l'esame del protocollo di studio.

## CONSENSO INFORMATO

A ogni soggetto arruolato sarà sottoposto un consenso informato scritto preceduto da una chiara descrizione dell'obiettivo dello studio.

Il soggetto compilerà con i propri dati e firmerà il modulo di consenso, che verrà controfirmato dallo sperimentatore, come previsto dal Regolamento (UE) 2016/679.

## PROTEZIONE DEI PAZIENTI ARRUOLATI

Lo sperimentatore principale si assicurerà che la ricerca sia condotta secondo il protocollo seguendo le procedure e le istruzioni fin qui descritte.

Lo sperimentatore principale coordinerà gli aspetti clinici e verificherà che lo studio clinico sia condotto secondo le Norme di Buona Pratica Clinica della Unione Europea (Direttiva 2001/20/EEC) in conformità con la corrente Dichiarazione di Helsinki concernente la ricerca medica sugli umani (Helsinki 1964, modificata da: Tokyo 1975, Venezia 1983, Hong Kong 1989, Somerset West 1996 ed Edinburgo).

## SPERIMENTATORE PRINCIPALE

<b>Dott. Giuseppe Buonomo</b>
<b>Indirizzo:</b> Via Martorano 82019 Sant'Agata de' Goti (BN)
<b>Tel:</b> +39 3331116150
<b>Mail:</b> giuseppebuonomo@tin.it

## CENTRI PARTECIPANTI

UCCP (Unità Complessa di Cure Primarie), studio medico del Dott. Giuseppe Buonomo, operante sul territorio dell'ASL di BENEVENTO.

## RISERVATEZZA DEI DATI

I dati clinici saranno trattati secondo le disposizioni vigenti in materia di *privacy* e i dati clinici dei singoli pazienti saranno trattati anonimamente. I dati dello studio immessi in computer saranno conservati osservando le leggi vigenti sulla *privacy* come previsto dal Regolamento (UE) 2016/679.

Gli sperimentatori conserveranno una lista dei pazienti in modo che sia possibile la loro identificazione (D.L. 52/2008). I dati clinici saranno oggetto di pubblicazioni scientifiche e relazioni congressuali.

La elaborazione dei dati avverrà presso il Dipartimento di Farmacia dell'Università di Napoli Federico II e, in particolare, il database sarà affidato a un biometrista che provvederà alla produzione di un report statistico con i dati ottenuti dallo studio clinico.

# **PROTOCOL**

## **TITLE**

**Study of the effect of European propolis hydro-alcoholic extract chemically characterized with high polyphenols content (SPRAY PROPOLIS URTI) on the first symptoms of mild uncomplicated upper respiratory tract infections: a double-blinded, randomized placebo-controlled, parallel-group, single-center study.**

**The undersigned, as shown below, confirms that this study will be carry out in according to following protocol.**

Surname and name	Address	Phone
Dr. Giuseppe Buonomo	Via Manzoni, 19 San Giorgio del Sannio 82100 Benevento, Italy	+39 3331116150

## Summary

<b>INTRODUCTION</b>	15
<b>BACKGROUND</b>	15
<b>STUDY OBJECTIVE</b>	16
<b>PRIMARY AND SECONDARY OUTCOMES</b>	16
<b>STUDY DESIGN</b>	17
<b>POPULATION AND NUMBER OF SAMPLES</b>	17
<b>BLINDING</b>	19
<b>DURATION OF STUDY</b>	19
<b>INCLUSION CRITERIA</b>	20
<b>EXCLUSION CRITERIA</b>	20
<b>METHODS</b>	20
<b>RISKS AND BENEFIT</b>	22
<b>PRINCIPAL INVESTIGATOR</b>	23
<b>PARTICIPATING CENTERS</b>	23

## INTRODUCTION

Upper Respiratory Tract Infections (URTIs) include rhinosinusitis, acute otitis media (OMA), pharyngotonsillitis and laryngitis. It has a very common symptomatology and it is one of the most frequent causes of doctor's consultation. An estimate from the year 2006, carried out in England, showed that in one year, nine out of every 100 patients turn to the general practitioner for URTIs. Of these nine, three subjects were diagnosed with tonsillitis, which in 91% of cases was treated with antibiotic therapy. Pharmacological treatment with antibiotics was also prescribed in 50% of the remaining registered URTIs cases.

Within the "Guidelines for the management of acute sore throat", the European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases defines "acute sore throat" as a symptom that lasts for a maximum of 14 days, caused by an inflammatory process that can involve pharynx, tonsils or nasopharyngeal districts, of viral or bacterial origin.

The pathogenic bacteria most frequently found in patients with acute sore throat are *Streptococcus* of group A  $\beta$ -haemolytic, whose infections affect 2.3% of individuals between 15 and 44 years of age and 0.6% of individuals over 45 years of age in Europe. Other epidemiological studies report that *Streptococcus pyogenes* infection (group A  $\beta$ -hemolytic) is diagnosed in 5-15% of adults. Equally relevant are *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* infections.

## BACKGROUND

Propolis (also known as bee resin) is the generic name used to identify a natural, resinous substance collected by bees (*Apis mellifera*) from buds and exudates of different plant species consisting of resin (50%), waxes (30%), essential oils (10%), pollen (5%), and other compounds including minerals and organic compounds. Propolis has an effect on the respiratory system, as such, it can significantly reduce the number and nocturnal asthma attacks severity. It is able to improve lung function and reduce inflammation defence mechanisms. In subjects with chronic bronchitis and propolis treatment, after a few days, the quantity and viscosity of sputum decreases significantly and the general condition of patients improves in 70% of cases.

Many studies suggest that propolis exerts anti-inflammatory and immunomodulating activity: propolis has been shown to inhibit prostaglandin synthesis, activate thymus, positively modulate the immune system by promoting phagocytic activity, stimulate cellular immunity, and integrate curative effects into epithelial tissues.

The hydroalcoholic extract of European propolis with high polyphenol content that will be used in the present clinical study has already been studied to determine its chemical composition and antioxidant and anti-inflammatory properties in vitro. In particular, the changes in expression levels of four miRNAs related to inflammation and stress-oxidative stress following treatment with European propolis (brown) and Brazilian propolis (green) were investigated. The expression levels of miR-17-3p and miR-27a-3p were studied, as they are related to the antioxidant action, having as targets validated respectively the mRNA encoding for three mitochondrial enzymes (MnSOD, GPX2 and TRXR2) and the transcription factor NFE2L2. In addition, variations in the expression levels of two miRNAs related to inflammation, miR-19a-3p and miR-203a-3p, presenting the pro-

inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  as a validated target. For miR-27a-3p, an increase in expression levels was reported following treatment with both types of propolis and, according to these results, the expression levels of the target mRNA, coding for NFE2L2, were under-expressed. Expression levels of miR-17-3p decreased significantly only after treatment with European propolis. This result is in agreement with the GPX2 encoding mRNA expression levels, which were overexpressed. Finally, the results showed that miR-19a-3p and miR-203a-3p were significantly overexpressed in European propolis, whereas only miR-19a-3p was significantly overexpressed in Brazilian propolis. The target mRNA expression levels of miR-19a-3p and miR-203a-3p, coding for the proinflammatory cytokine TNF- $\alpha$ , were, however, only under-expressed after treatment with European propolis. These results show that European propolis has a higher modulatory capacity towards epigenetic mechanisms than Brazilian propolis.

## STUDY OBJECTIVE

The clinical study purpose is to test the propolis extract capacity:

1. To reduce the first common symptoms occurring during mild uncomplicated URTIs and therefore the pharmacological treatment incidence (use of anti-inflammatory and/or antibiotic and/or antitussive drugs).
2. To reduce antibiotic-resistant pathogenic strains incidence at the end of the follow-up, in the subjects in which URTIs is caused by bacteria.

## PRIMARY AND SECONDARY OUTCOMES

### Primary Outcome:

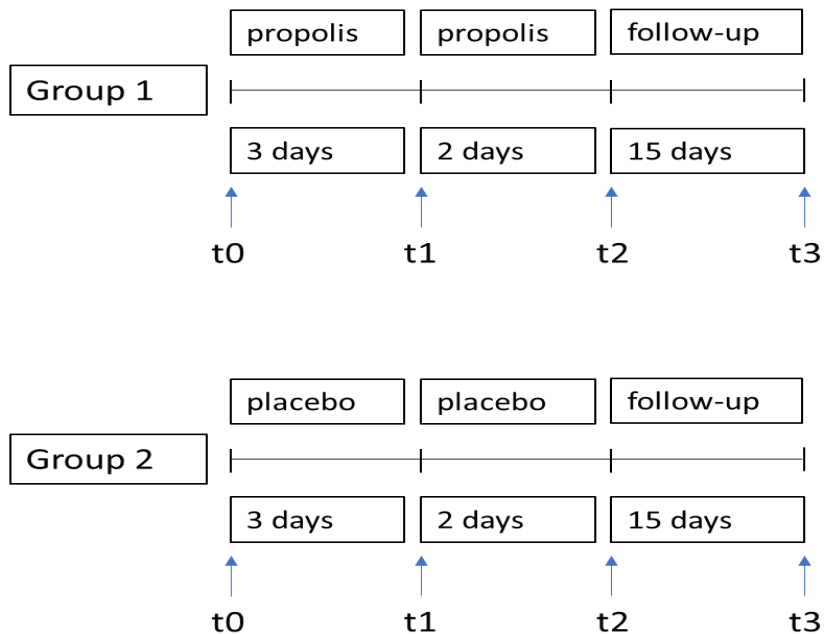
Remission of the following symptoms (pharyngodynia, lowering of the voice, redness and burning of the throat, aphonia) and therefore reduction of drug treatment incidence (antibiotic or anti-inflammatory drugs) that will be administered at the onset of a feverish state after 3 days or if the symptoms will be present after 5 days.

### Secondary Outcome:

Antibiotic-resistant pathogenic strain incidence reduction in all subjects with infections caused by bacteria, assessed by the susceptibility test.

## STUDY DESIGN

Monocentric, randomized, double blind, parallel group, placebo controlled studies will be performed as reported in figure 1.



**Figura 1.** Study design

## POPULATION AND NUMBER OF SAMPLES

In the study 122 subjects of both sex will be enrolled:

- 1) aged 18 to 65 years,
- 2) affected by the first symptoms of mild uncomplicated upper respiratory tract infections.

Participants are randomly allocated into two experimental groups: placebo and propolis.

t0 (ie before the treatment start). Patients with symptoms reflecting a mild uncomplicated upper respiratory tract infection which meet the inclusion criteria are examined for the symptom assessment by the physician. The patient is expected to perform the oropharyngeal swab (followed by antibiogram if positive).

Treatment: administration (2-4 times/day) of propolis oral spray or placebo spray three time a day for 5 days.

If after 3 days of treatment with propolis or placebo at t1 (3 days after the first visit) fever appears the patient has to be submitted to a visit to evaluate the type of therapeutic treatment to be administered and is excluded by the study.

If after 5 days of treatment with propolis or placebo at t2 (after 5 days from the start of treatment ie at the end of the treatment) the symptoms are stil present and/or fever appears the patient has to be submitted to a visit to evaluate the type of therapeutic treatment administered (the subject is excluded from the clinical trial).

Follow up: t3 monitoring (15 days after the end of propolis or placebo treatment).

## Sample sizes

Both for the primary objective (remission of symptoms) and the secondary objective (incidence of antibiotic-resistant pathogens) the most suitable statistical approach is the analysis of proportions by  $\chi^2$  tests. The effect size is estimated from the relative RR risk frequencies between the two experimental groups (e.g. in the primary study RR corresponds to the probability of receiving a drug treatment /probability of not receiving it). Since no previous studies similar to this one are available, effect size estimates were conducted assuming the following scenarios:

- Risk in the placebo group: 99%, 90%, 80%.
- Risk in the propolis group: 70%, 50%, 30%.

The RR values used to estimate the resulting sample size:

	99%	90%	80%
70%	1.41	1.28	1.14
50%	1.98	1.80	1.60
30%	3.30	3.00	2.67

The sample size calculations were made with three  $1-\beta$  power values equal to 0.80, 0.95 and 0.99 and significance level  $\alpha = 0.05$ .

The following table shows the overall sample sizes for the different assumptions.

Risk in the placebo group	Risk in the propolis group	RR (placebo/propolsi)	(1- $\beta$ )= 0.99 $\alpha$ =0.05	(1- $\beta$ )= 0.95 $\alpha$ =0.05	(1- $\beta$ )= 0.80 $\alpha$ =0.05
<b>99%</b>	<b>30%</b>	3.30	30	24	18
	<b>50%</b>	1.98	56	44	30
	<b>70%</b>	1.41	118	88	60
<b>90%</b>	<b>30%</b>	3.00	46	36	26
	<b>50%</b>	1.80	96	72	48
	<b>70%</b>	1.28	304	222	144
<b>80%</b>	<b>30%</b>	2.67	70	54	36
	<b>50%</b>	1.60	190	<b>138</b>	90
	<b>70%</b>	1.14	1408	1008	626

## Statistical analysis

First, descriptive statistics will be used to characterize all survey items, using mean and standard deviation for the continuous variables, and numbers and frequency distributions for the categorical variables. Second, a univariate analysis will be conducted by using  $\chi^2$  tests on 2×2 contingency tables to compare respiratory symptoms between treated and untreated subjects. We will use the Yates's correction when at least one cell of the table has an expected count smaller than 5. Third, a multivariate logistic regression analysis will then be conducted to determine the extent to which independent variables predicted the outcome of interest. We will perform four logistic models; the outcomes variables were the following: remission or relief of all symptoms (Model 1), sore throat (Model 2), swelling and redness of throat (Model 3) and muffled dysphonia (Model 4) at three days. Independent variables included into the models will be the following: age, gender, propolis oral application (all Models), positive medical history for sore throat (Models 1, 3), positive medical history for muffled dysphonia (Models 1, 2, 3), positive medical history for swelling and redness of throat (1, 2), pharyngeal swab positivity (Models 1, 2, 3). The results of the logistic regression models will be presented as Odds Ratios (ORs) with 95% confidence intervals (95% CIs). All reported values will be based on two-tailed tests, and will be considered statistically significant at  $p=0.05$  or less. All data will be encoded and analysed using the Stata software version 15 (Stata Corp. Stata 2017. Stata Statistical Software. Release 15. College Station, TX: StataCorp LLC.).

## BLINDING

The study will be double-blind as neither the investigating physician nor the enlisted subject will know which propolis supplement and which placebo.

The two treatments will be made unrecognizable, in fact the packaging will be identical, and the treatments will be the same in color and taste.

## DURATION OF STUDY

The clinical trial will be submitted to the local Ethics Committee for approval. The beginning of study is possible after approvation of Ethics Committe and it will be closed after the enrollment of all patient and the conclusion of all analysis.

The subjects involved, at any time, can withdraw from the study without providing a motivation.

The subjects enrolled in study will be excluded if the following cases occur:

- subjects withdrawal their consent

- when a clinically relevant exclusion criterion occurs, which may influence the health of the subject;
- non-compliance of the subject with the protocol;
- decision of the principal investigator;

If the subject is not relevant to the indications of the study, the investigator will determine the reasons and circumstances accurately and completely.

## **INCLUSION CRITERIA**

The inclusion criteria will be:

- Aged 18-65 years of age
- Individuals affected by the first symptoms of mild uncomplicated upper respiratory tract infections.

## **EXCLUSION CRITERIA**

- Individuals with allergies, which could be confused with those with irritation upper airway, object of study.
- Immunocompromised subjects.
- Subjects under immunological therapy.
- Subjects who received antibiotic therapy within 72 hours prior to enrollment.
- Pregnant women.
- Breastfeeding women.
- All patients with overt malignant neoplasia, recent cardio-cerebro-vascular diseases (within 90 days prior to enrollment), with severe middle renal insufficiency (ascertained with creatinine clearance), and non-autonomous.
- All subjects who according to the doctors are not eligible to participate in the study in question.

## **METHODS**

Subjects enrolled by Dott. Giuseppe Buonomo, operating in BENEVENTO ASL area, will take 2-4 times/day) of propolis or placebo spray for five days.

Participants will be assessed at day three and day five and referred to further treatment if their condition requires it. After 15 days there will be a final assessment.

Subjects will be enrolled for the study following inclusion and exclusion criteria, previously described.

Before being included in the study, the consenting subjects will be delivered:

- 1) information sheet, with clear information regarding the clinical study, objectives and methods of implementation;
- 2) informed consent, which will be filled in with the subjects' data, signed by them and countersigned by the investigator.

Patients underwent four visits (baseline =t0, after 3 days =t1, after 5 days=t2, and after the follow-up of 15 days=t3) in an outpatient setting. At baseline visit (t0) information on the sociodemographic, clinical and symptomatologic characteristics of patients will be collected in the Case Report Form (CRF). In particular, the following URTI symptoms (presence/absence) were registered: sore throat, muffled dysphonia and swelling and redness of throat. Moreover, throat swabs will be collected from physicians and transported to Unisannio Lab (San Giorgio del Sannio, BN, Italy) for microbiological analysis. At the end of the baseline visit, the patients will be randomly divided into two groups, placebo group (untreated group) and propolis group (treated group). To the placebo group, 2-4 sprays of a hydro-alcoholic solution of dye E150 will be administered during the baseline visit. Then, this treatment will be repeated three times/day for 5 days in the subject's home. Propolis group will be submitted to the same treatment with propolis oral spray. Clinical visits at t1 (after 3 days of treatment) and t2 (after 5 days of treatment) will be carried out to evaluate the persistence of the symptoms (sore throat, muffled dysphonia and swelling and redness of throat) and health status. After the visits, the relief of the symptoms was registered by the physicians on the case report form (CRF). After 5 days of treatment, patients will be followed up for 15 days (t3). At the end of this follow-up, a final throat swab will be performed for the patients that resulted to be positive to bacterial infections. All data will be compiled in CRF by physicians.

## **RANDOMISATION**

The randomization sequence will be generated by a statistician using STATA 16 software (Stata Statistical Software: Release 16. College Station, TX: StataCorp LLC), and subjects (compliant to the inclusion and exclusion criteria) will be assigned to each of the two treatment groups (propolis and placebo) randomly and unpredictably by simple randomization (1:1 allocation ratio). The randomization code will consist of a three-digit number as indicated in the respective Case Report Form (CRF).

## **DATA COLLECTION**

The data collection will be carried out through the appropriate forms (Case Reporting Form - CRF) divided into two main sections. A first section will be related to personal data, the patient's medical history, the intake of any concomitant drugs, and the treatment group (propolis or placebo) and must be completed at the enrolment. Instead, the second section should be completed at the control visit.

## **RISKS AND BENEFIT**

Participants taking part in this study should have a benefit on the first symptoms of mild uncomplicated upper respiratory tract infections, including a reduction in the incidence of drug treatment and a reduction in the incidence of the emergence of antibiotic-resistant pathogenic strains. There are no known risks to participants taking part in this study, considering the traditional use of propolis for the maintenance of the oral cavity and upper respiratory tract health.

## **ADVERSE EVENTS**

Any possible use of the subject's medication and any adverse effects manifested will be noted. The doctor will note on the CRF remote and near pathologies, and the result of the oral throat swab carried out.

## **INFORMATION TO THE PATIENT AND INFORMED CONSENT**

The subjects, before being enrolled in the clinical study, will be informed about the aims of the project. The information to the patient will be provided with an appropriate form in a comprehensible form in order to express an informed written and signed consent. The investigator, countersigned the form itself, should give a copy of the informed consent to the subject and keep the original. The subject information sheet and consent form will be evaluated and approved by the Ethics Committee during the examination of the study protocol. Each person enrolled will be given informed written consent preceded by a clear description of the purpose of the study. The subject will fill in their data and sign the consent form, which will be countersigned by the investigator.

Informed consent will be signed in accordance with Regulation (EU) 2016/679.

## **ETHICAL ASPECTS AND PROTECTION OF PATIENTS ENROLLED**

The principal investigator shall ensure that the research is conducted according to the protocol following the procedures and instructions described above. The principal investigator will coordinate the clinical aspects and verify that the clinical trial is conducted in accordance with the European Union's Good Clinical Practice Standards (Directive 2001/20/EEC) in accordance with the current Helsinki Declaration on Human Medical Research (Helsinki 1964, as amended by: Tokyo 1975, Venice 1983, Hong Kong 1989, Somerset West 1996 and Edinburgh), and guidelines for good clinical practice (CPMP/ICH/ 135/95). In order to ensure compliance with the protocol, good clinical practice (GCP) and regulatory requirements, authorized personnel of the Department of Pharmacy will ensure continuous monitoring, both during and after the study.

## PRINCIPAL INVESTIGATOR

<b>Dott. Giuseppe Buonomo</b>
<b>Address:</b> Via Manzoni, 19 San Giorgio del Sannio (BN) Italy 82100
<b>Phone:</b> +39 3331116150
<b>e-mail:</b> giuseppebuonomo@tin.it

## PARTECIPATING CENTERS

UCCP (Center for primary care), medical office of Dott. Giuseppe Buonomo, operanting in BENEVENTO ASL area.

## CONFIDENTIALITY OF DATA

Clinical data will be processed in accordance with current privacy regulations and clinical data of individual patients will be processed anonymously. The study data entered into the computer will be stored in accordance with applicable privacy laws as provided in the Regulation (EU) 2016/679. The investigators will keep a list of patients so that they can be identified (D.L. 52/2008). The clinical data will be report in scientific publications and conference reports. The data processing will take place at the Department of Pharmacy of the University of Naples Federico II and the database will be entrusted to a biometrician who will produce a statistical report with the data obtained from the clinical study.

## BIBLIOGRAFY

1. Cook J, Hayward G, Thompson M, et al. Oral corticosteroid use for clinical and cost-effective symptom relief of sore throat: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials*. 2014.15: 365
2. Pelucchi C, Grigoryan L, Galeone C, et al. Guideline for the menagement of acute sore throat. *Clin Microbiol Infect*. 2012. 18(1):1-27
3. Michael R, Wessels MD. Pharyngitis and Scarlet Fever. 2016. In: Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti VA, editors. *Streptococcus pyogenes : Basic Biology to Clinical Manifestations*. Oklahoma City (OK): University of Oklahoma Health Sciences Center; 2016
- 1.Park YK, Paredes-Guzman JF, Alencar SM, Aguiar CL, Fujiwara FY. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. *J. Agric. Food Chem*. 2004;52:1100–1103.

2. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red propolis—chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008;5(4):435-41.
3. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002;73(1):S1-6.
4. Juliano CC, Pala CL, Massimo C. Preparation and characterisation of polymeric films containing propolis. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2007; 17:177- 180.
5. de Sousa JP, Bueno PC, Gregório LE, da Silva Filho AA, Furtado NA, et al. A reliable quantitative method for the analysis of phenolic compounds in Brazilian propolis by reverse phase high performance liquid chromatography. *J Sep Sci*. 2007;30(16):2656 - 65.
6. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol*. 1998;36(4):347-63.
7. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*. 2001;15(7):561-71.
8. Banskota AH, Tezuka Y, Adnyana IK, Ishii E, Midorikawa K, et al. Hepatoprotective and anti-*Helicobacter pylori* activities of constituents from Brazilian propolis. *Phytomedicine*. 2001;8(1):16-23.
9. Sforcin JM. Propolis and the immune system: a review. *J Ethnopharmacol*. 2007;113(1):1-14.
10. Viuda-Martos M, Ruiz-Navajas Y, Fernández-López J, Pérez-Alvarez JA. Functional properties of honey, propolis, and royal jelly. *J Food Sci*. 2008;73(9): R117-24.
11. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, et al. Bioactive constituents of brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006;3(2):249-54.
12. Kim MJ, Kim CS, Kim BH, Ro SB, Lim YK, et al. Antimicrobial effect of Korean propolis against the mutans streptococci isolated from Korean. *J Microbiol*. 2011;49(1):161-4.
13. Orsi RO, Sforcin JM, Funari SR, Bankova V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella Typhimurium*. *Int Immunopharmacol*. 2005;5(2):359-68.
14. Erkmen O, Ozcan MM. Antimicrobial effects of Turkish propolis, pollen, and laurel on spoilage and pathogenic food-related microorganisms. *J Med Food*. 2008 Sep;11(3):587-92.
15. Pavilonis A, Baranauskas A, Puidokaite L, Mazeliene Z, Savickas A, et al. [Antimicrobial activity of soft and purified propolis extracts]. *Medicina (Kaunas)*. 2008;44(12):977-83.
16. Khayyal MT, el-Ghazaly MA, el-Khatib AS, Hatem AM, de Vries PJ, et al. A clinical pharmacological study of the potential beneficial effects of a propolis food product as an adjuvant in asthmatic patients. *Fundam Clin Pharmacol*. 2003 Feb;17(1):93-102.
17. Casaroto AR, Lara VS. Phytomedicines for *Candida*-associated denture stomatitis. *Fitoterapia*. 2010;81(5):323-8.
18. Zaccaria V, Curti V, Di Lorenzo A, Baldi A, Maccario C, Sommati S, Mocchi R, Daglia M. Effect of Green and Brown Propolis Extracts on the Expression Levels of microRNAs, mRNAs and Proteins, Related to Oxidative Stress and Inflammation. *Nutrients*. 2017; 9(10). pii: E1090.