

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

Gisela de Martins Souza Pina

**Eficácia da própolis na estomatite protética em idosos: Ensaio clínico
multicêntrico randomizado**

Brasília

2016

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

Gisela de Martins Souza Pina

**Eficácia da própolis na estomatite protética em idosos: Ensaio clínico
multicêntrico randomizado**

Dissertação para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Ciências e
Tecnologias em Saúde da Universidade de
Brasília-UnB

Orientador: Dr. Vicente de Paulo Martins

Área de concentração: Mecanismos básicos e
tecnologias em Saúde.

Linha de pesquisa: Nanobiotecnologia aplicada à
Saúde.

Co-Orientador: Dra. Erica Negrini Lia

Brasília

2016

Ficha catalográfica elaborada automaticamente,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

de Martins Souza Pina, Gisela
dP645 Eficácia da própolis na estomatite protética em
idosos: Ensaio clínico multicêntrico randomizado /
Gisela de Martins Souza Pina; orientador Vicente de
Paulo Martins; co-orientador Erica Negrini Lia. --
Brasília, 2016.
76 p.

Dissertação (Mestrado - Mestrado em Ciências e
Tecnologias em Saúde) -- Universidade de Brasília,
2016.

1. Estomatite protética. 2. Própolis. 3. Candida.
4. Ensaio clínico. I. de Paulo Martins, Vicente,
orient. II. Negrini Lia, Erica, co-orient. III.
Título.

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS EM SAÚDE

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: Gisela de Martins Souza Pina

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins.

Membros Titulares:

Membro interno ao PGCTS: Prof. Dr. Jorge Luis Lopes Zeredo

Membro externo: Prof. Dr. Brunno Santos de Freitas Silva

Membro orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Martins

Membro Suplente:

Prof. Dr. Laudimar Alves de Oliveira

Data 13/12/2016

Dedico esse trabalho à Deus que em Sua maravilhosa bondade me permitiu concluir essa etapa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido Stanley pelo apoio incondicional suporte e paciência, seu comportamento incentivador sempre me fez acreditar que eu podia um pouco mais.

Agradeço também à minha mãe e sogra pela prontidão em ajudar com as crianças sempre que precisei.

Obrigada à diretora do Centro Universitário UniEvangélica Cristiane Martins Bernardes pela compreensão e incentivo.

Aos meus colegas de laboratório Hérick e Luís por toda a ajuda com uma pobre dentista querendo entender de Microbiologia.

À minha amiga Fabiana Tolentino pela atenção em tirar inúmeras dúvidas e pela contribuição na minha formação e aperfeiçoamento.

Agradeço ao prof. Dr. Eduardo Coelho pela gentileza em me ajudar com a parte estatística.

Agradeço de forma especial aos meus orientadores Erica Negrini Lia e Vicente de Paulo Martins por terem atendido às minhas dúvidas com tanto carinho e dedicação. Com vocês aprendi o verdadeiro significado da palavra Mestre! Obrigada por me ajudarem a vencer essa etapa.

SUMÁRIO

Itens Pré-Textuais	i
TABELAS, FIGURAS E ANEXOS	i
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1. Geral	6
2.2. Específicos	6
3. MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1. Desenho do estudo	7
3.2. Participantes	7
3.3. Intervenções	7
3.4. Coleta de dados sócio demográficos, história médica e hábitos	9
3.5. Avaliação clínica da estomatite protética	9
3.6. Avaliação da carga fúngica	10
3.7. Avaliação da adesão ao tratamento	11
3.8. Avaliação da segurança e análise de aceitabilidade ao produto	11
3.9. Análise Estatística	11
4. RESULTADOS	13
5. DISCUSSÃO	20
6. CONCLUSÕES	25
7. REFERÊNCIAS	26
8. APÊNDICES E ANEXOS	32

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

FIGURA 1-	Diferentes tipos de morfologias da espécie <i>Candida albicans</i> mostradas em microscópio	1
FIGURA 2-	Apresentação clínica da estomatite prótica usando a classificação de Newton	3
FIGURA 3-	Esquema da ação dos antifúngicos azóis nos fungos	4
FIGURA 4-	Imagem do desenho do estudo	9
FIGURA 5-	Fluxograma CONSORT	13
TABELA 1-	Distribuição das características dos grupos de estudo, classificação das lesões palatinas e carga fúngica inicial	14
FIGURA 6-	Evolução clínica medida pela classificação de Newton e Evolução microbiológica medida por unidades formadoras de colônias	15
FIGURA 7-	Aparência clínica das lesões iniciais em T0 (A e C) e após tratamento com EPP-AF® em T14 (B e D).	16
FIGURA 8-	Aparência clínica das lesões iniciais em T0 (A e C) e após tratamento com miconazol em T14 (B e D).	17
FIGURA 9-	Desfecho clínico e microbiológico	18
FIGURA 10-	Aceitabilidade do miconazol ou do EPP-AF® de acordo com a escala hedônica de 7 pontos	19
APÊNDICE I-	Ficha clínica (CRF)	33
APÊNDICE II-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido- TCLE	36
ANEXO I-	Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	39
ANEXO II-	Normas para publicação no periódico “Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine”	43
ANEXO III-	Comprovante de submissão do manuscrito	46
ANEXO IV-	Manuscrito submetido	47

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

ANOVA	Analysis of variance
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CONSORT	Consolidated Standards of Reporting Trials
EPP-AF®	Extrato padronizado de própolis produzido pela empresa Apis Flora Ltda.
FINEP	Financiadora de estudo e projetos.
HCFMRP- USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
HIV	Human Immunodeficiency Virus- Vírus da Imunodeficiência Humana.
mg/g	miligrama por grama.
MIC	Grupo controle tratado com gel oral de miconazol 20 mg/g.
pH	Potencial hidrogeniônico.
PROP	Grupo caso tratado com gel de própolis (EPP-AF®).
PTR	Prótese total removível.
T0	Tempo zero (primeiro dia de exame).
T7	Segundo dia de exame, sete dias após início da pesquisa.
T14	Terceiro dia de exame, 14 dias após início da pesquisa.
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro.

RESUMO

Introdução: Estomatite Protética é um quadro associado à infecção fúngica de etiologia multifatorial, comum em usuários de prótese total. O desenvolvimento de produtos à base de própolis para seu tratamento tem atraído interesse especial devido a sua efetividade e segurança, tornando-se uma excelente alternativa para o uso em idosos. O objetivo desse estudo foi avaliar a eficácia de uma formulação muco-adesiva à base de gel contendo extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) para tratamento de estomatite protética por *Candida* spp. **Métodos:** Um total de 40 pacientes idosos foi alocado em dois grupos, aleatoriamente, em um ensaio clínico de não inferioridade (NCT02818803). O grupo controle (MIC) foi tratado com gel de miconazol 20 mg/g e o grupo de estudo (PROP) foi tratado com a formulação contendo extrato padronizado de própolis a 2% (20 mg/g) (EPP-AF®) durante 14 dias. Os pacientes foram examinados por um cirurgião-dentista nos dias T0, T7 e T14. A classificação de Newton foi usada para classificar a estomatite protética. As unidades formadoras de colônia (UFC/mL) foram quantificadas e identificadas (CHROMagar *Candida*®) para comparação antes e depois do tratamento (dias T0 e T14). **Resultados:** Idade, gênero, tempo de uso da prótese, características basais da classificação de Newton e contagem inicial de UFC/mL não diferiram nos dois grupos. Ambos os tratamentos reduziram os valores na escala de Newton ($P < 0.0001$), indicando melhora clínica dos sinais da candidíase com taxa de cura clínica de 70%. A cura microbiológica com redução significativa da carga fúngica no dia T14 foi de 70% no grupo miconazol e de 25% no grupo EPP-AF®. Nenhum efeito adverso foi registrado nos grupos. **Conclusão:** O EPP-AF® parece ser não-inferior ao miconazol considerando a taxa de cura clínica e pode ser recomendado como tratamento adjuvante para estomatite protética em pessoas idosas.

Palavras-chave: Prótese total; estomatite sob prótese; *Candida*; própolis; ensaio clínico.

ABSTRACT

Background: Oral candidiasis is a common infection in complete denture wearers such as in older adults. Oral candidiasis, also known as denture stomatitis has multifactorial etiology. The development of propolis-based products for its treatment has attracted special interest because of their effectiveness and safety, which make them optimal for use in older adults. The aim of this study was to evaluate the efficacy of a standard formulation of Brazilian propolis extract gel (EPP-AF®) for the treatment of denture stomatitis due to *Candida* spp in this population. **Methods:** A total of 40 older patients were randomly allocated in a non-inferiority clinical trial (NCT02818803) into two groups. The control group (MIC) received 20 mg/g miconazole oral gel and the study group (PROP) received mucoadhesive formulation containing standardized extract of 2% (20 mg/g) propolis (EPP-AF®) during 14 days. Patients were examined by a dentist on days 1, 7 and 14. The Newton's score was used to classify the lesion levels of denture stomatitis. The colony forming unities were quantified (CFU/mL) and their species were identified (CHROMagar Candida®) before and after the treatment. Baseline characteristics did not differ between groups. Both treatments reduced Newton's score ($P < 0.0001$), indicating clinical improvement of the symptoms of candidiasis with clinical cure rate of 70%. The microbiological cure with significant reduction in fungal burden on T14 was 70% in the miconazole group and 25% in the EPP-AF® group. The EPP -AF® appears to be non-inferior to miconazole considering the clinical cure rate and could be recommended as an alternative treatment in older patients.

Key words: *Candida*, propolis, stomatitis, denture, clinical trial

1. INTRODUÇÃO

As espécies de *Candida* vivem de maneira comensal na cavidade oral e tem a função de prevenir infecções através da competição com os patógenos e indução do sistema imune (1). Porém quando há um desequilíbrio na microbiota, elas podem causar infecções oportunistas chamadas de candidíase ou candidose, sendo a infecção fúngica mais comum que acontece na mucosa oral (2,3).

Os micro-organismos envolvidos pertencem ao gênero *Candida* sp, sendo *Candida albicans* a espécie mais encontrada nos sítios de infecção. Entretanto, com menos frequência encontra-se outras espécies, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* e *C. dubliniensis* (1,3,4). As espécies de *Candida* exibem formatos diferentes, a forma de blastósporos de *C. albicans* tem a morfogênese oval ou arredondada, enquanto que em *C. krusei* e *C. glabrata* apresentam formas alongadas como filamentos. No entanto as espécies *C. albicans* e *C. dubliniensis* têm a habilidade de formar blastósporos, hifas, pseudo-hifas e clamidósporos (1) (Figura 1). As formas blastósporos e estão relacionadas com a infecção. No estágio inicial da infecção, até 12h, estão presentes blastóporos e hifas, sendo que os primeiros aderem à superfície do epitélio. Com o avançar da infecção, a forma hifa começa a prevalecer (5) Essa transformação de *Candida* comensal para a forma virulenta é possivelmente viabilizada pela adesão, morfogênese, produção de enzimas extracelulares e a mudança de fenótipo (1).

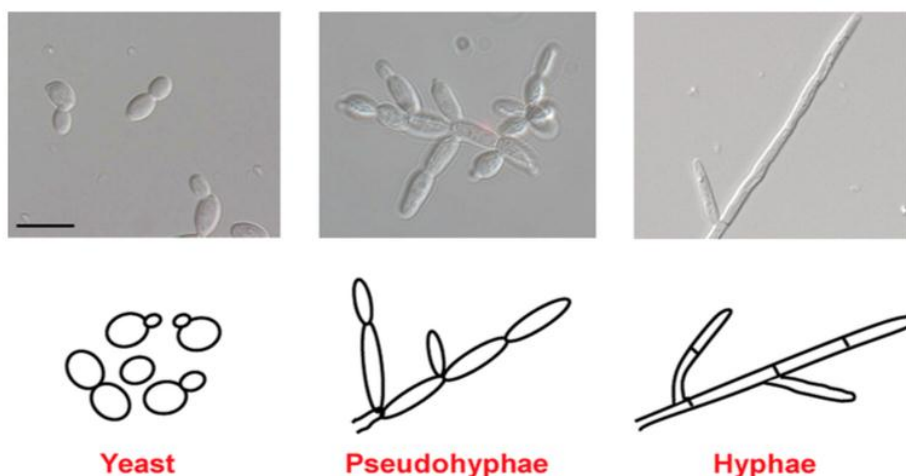


Figura 1: Diferentes tipos de morfologias da espécie *Candida albicans* mostradas em microscópio. Fonte: Thompson, 2011 (6).

A adesão do micro-organismo ao epitélio é considerado o primeiro passo para candidíase, sendo que quanto mais aderente, mais patogênica é a espécie. A habilidade de produzir a patologia está relacionada com a morfogênese da espécie de *Candida*, através da formação de hifas (6–8). As espécies de *Candida* produzem enzimas extracelulares que também são responsáveis pelo processo de virulência, dentre elas, as principais são as enzimas aspartil protease secretada (SAP), lipases e fosfolipases, com papel na invasão do epitélio, adesão às células e ataque ao sistema imune do hospedeiro. Mudança de fenótipo é a capacidade de alteração na morfologia e estrutura do fungo com efeito direto na virulência da espécie (1,2,8).

As defesas imunológicas do hospedeiro e as respostas de defesa locais são ativamente envolvidas na resistência aos mecanismos de patogenicidade do fungo, assim como ao desenvolvimento e avanço da infecção. Dessa forma, estados de imunossupressão (infecção por HIV, corticoterapia, quimioterapia), diabetes, prematuridade ao nascimento, uso prolongado de antibióticos, associados a fatores locais como hipossalivação, uso de corticóides inalatórios, falta de higiene oral e uso contínuo de próteses totais removíveis (PTR) predisõem à candidíase bucal (1,2,4,9–11).

Existem várias formas de apresentação clínica de candidíase oral, incluindo as formas brancas e eritematosas. As formas brancas incluem a pseudomembranosa, caracterizada pela presença de placas brancas que podem ocorrer na superfície da mucosa labial e jugal, palato, língua, tecido periodontal e orofaringe. Um sinal desse tipo de patologia é a capacidade de remoção das pseudomembranas, deixando a mostra um leito hemorrágico. E a forma crônica hiperplásica, ocorre na mucosa jugal e lateral da língua, geralmente há associação com fumo e as placas brancas não podem ser removidas à raspagem. São associadas à diabetes mellitus, pacientes com HIV, leucemia, uso de corticosteroides inalatórios, antibióticos de largo espectro, extremos de idade (pseudomembranosa), fumo (crônica hiperplásica). As formas eritematosas apresentam manchas ou áreas avermelhadas na região do palato duro, dorso da língua e comissura labial e incluem as formas atrófica aguda e crônica, glossite rombóide mediana, queilite angular e crônica multifocal (ocorrência de candidíase atrófica crônica em mais de um sítio). São associadas ao fumo e corticosteroides inalatórios (glossite rombóide mediana), deficiência de vitamina B12, folato e ferritina

(aguda atrófica), deficiência de ferro e vitamina B12, perda da dimensão vertical de oclusão com acúmulo de saliva nas comissuras labiais (queilite angular), má higiene, uso noturno de próteses totais, próteses mal adaptadas atrófica crônica) (2,3,12,13).

Dentre as várias formas de apresentação clínica, destaca-se a candidíase atrófica crônica, conhecida como estomatite protética, caracterizada por lesão eritematosa localizada principalmente no palato duro, região de contato com a base da prótese. Frequentemente assintomática, porém queixas de ardência bucal são comuns entre os pacientes. O diagnóstico é feito pelos sinais e sintomas clínicos. As próteses totais predispõe à infecção pois criam um microambiente propício para o crescimento do fungo, com diminuição do pH, oxigênio e fluxo salivar. A existência de rugosidades, fissuras e porosidades na resina acrílica da qual são confeccionadas as próteses atuam como reservatórios do fungo, fatores como trauma da mucosa em função da falta de adaptação, aumento da idade do paciente, tempo de uso da prótese também estão relacionados à estomatite protética (2,3,14–16). De acordo com Newton (17), a estomatite protética pode ser classificada como (A) tipo I (inflamação localizada ou pontos de petéquias hemorrágicas); (B) tipo II (eritema mais difuso envolvendo uma parte ou totalidade da área recoberta pela prótese); (C) tipo III (eritema associado à hiperplasia papilar na área recoberta pela prótese (Figura 2).

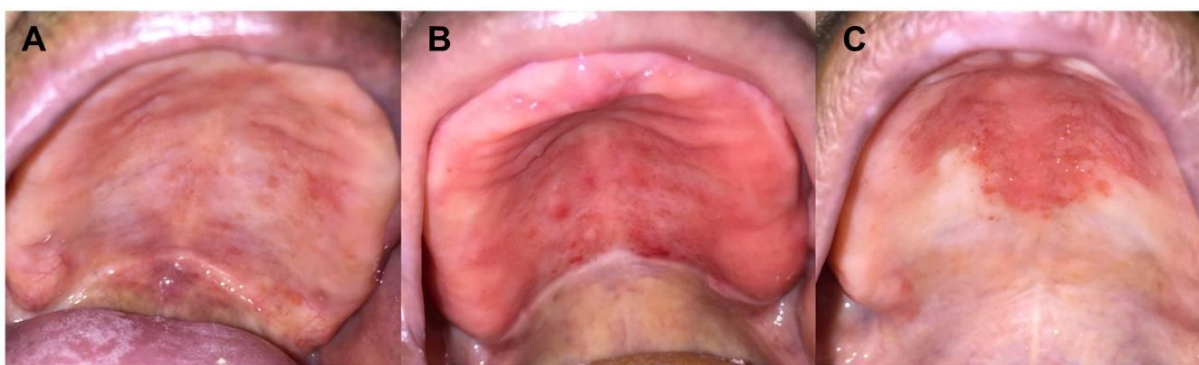


Figura 2: Apresentação clínica da estomatite protética localizada no palato duro, segundo a classificação de Newton (17). (A) tipo I (pontos vermelhos esparsos); (B) tipo II (eritema difuso); (C) tipo III (eritema associado à hiperplasia papilar) Fonte: arquivo pessoal da pesquisadora.

De acordo com o estudo epidemiológico SB Brasil 2010 (18), 63,1% de pessoas idosas com idade entre 65 e 74 anos usam prótese total superior. Considerando que as pessoas idosas apresentam todos os fatores relacionados

acima, pois são os maiores usuários de próteses removíveis com cobertura palatina, podem apresentar dificuldades motoras de higiene bucal e de próteses, dificilmente retiram suas próteses durante o sono, conseqüentemente, apresentam maior probabilidade de ocorrência de estomatite protética.

Por ser uma infecção oportunista, a candidíase muitas vezes é sub diagnosticada, a prevalência de estomatite protética em pessoas idosas apresentada pela literatura é de 58-88% (2,3,19). O tratamento é feito com antifúngicos, especialmente os tópicos, miconazol e nistatina e sistêmicos, fluconazol. O miconazol age desintegrando a parede celular pela inibição da biossíntese do ergosterol (2) sendo considerado o medicamento de escolha para tratamento da estomatite protética. Porém, estudos mostram casos de falha terapêutica e de recorrência rápida após a interrupção do tratamento principalmente se não acompanhado de adequada higienização da prótese (15). Mecanismos de resistência a essas drogas antifúngicas e de toxicidade destas para os pacientes também são observados (14,20–22).

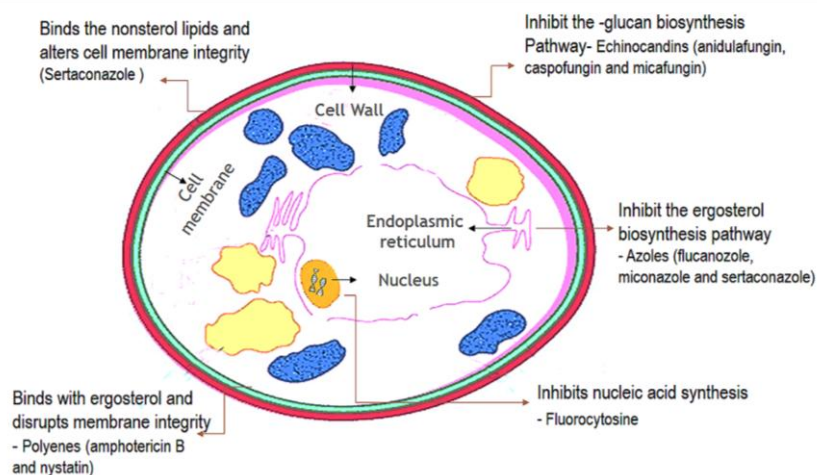


Figura 3: Esquema da ação dos antifúngicos azólicos nos fungos. Fonte: Patil, 2015 (10).

Dessa forma, produtos naturais como a própolis, vem ganhando destaque por apresentarem uma alternativa aos medicamentos sintéticos (20). Esse produto é uma substância resinosa derivada de exsudados da biodiversidade brasileira, misturado com seiva floral, secreções salivares de abelha, cera e pólen. Estudos sugerem que os componentes fenólicos e flavonóides são responsáveis pelas atividades antimicrobiana e antifúngica da própolis (23). Em estudos anteriores, o

extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) teve sua segurança demonstrada pela ausência de citotoxicidade e tampouco apresenta potencial mutagênico por via oral ou tópica (24,25). Além de possuir atividade anti-inflamatória (25,26), anti-úlceras (27), antimicrobiana e cicatrizante (19,23,28) e anti-fúngica (22,29–33). Suas propriedades justificam a hipótese de ser utilizada como tratamento tópico da estomatite protética. O efeito terapêutico do extrato alcoólico da própolis 20% em pacientes com estomatite protética foi avaliado em outro estudo, no qual observou-se regressão da lesão em todos os pacientes tratados, sendo a nistatina utilizada como controle positivo. Entretanto, o etanol utilizado como solvente no referido trabalho pode ocasionar ardência na mucosa bucal, além de não possuir característica mucoadesiva (34). Outros estudos com EPP-AF® em modelos *in vitro* para atividade anti-*Candida* verificaram que o extrato alcoólico na concentração de 1% foi suficiente para eliminação de até 10^6 células/mL (30). A eficácia do gel da própolis foi demonstrada e comparada ao uso do gel oral de miconazol em estudos clínicos. Capistrano e cols (31) compararam 3 grupos (própolis gel 2,5%; miconazol gel, enxaguatório bucal a base de própolis 24%) no tratamento de estomatite protética, e verificaram que os 3 grupos responderam de maneira semelhante, com redução na estomatite clínica e quantidade de unidades formadoras de colônias. Santos e cols (32) verificaram total remissão das lesões de estomatite protética nos pacientes tratados com gel oral de própolis.

Com o intuito de reduzir o risco de desenvolvimento de resistência microbiana e interações medicamentosas em pessoas idosas, a própolis com suas atividades antimicrobiana, cicatrizante e anti-fúngica, se torna uma alternativa atraente para controle e tratamento das lesões de estomatite protética.

2- OBJETIVOS

2.1 Geral

Testar a eficácia da formulação muco-adesiva de EPP-AF[®] comparada ao gel oral de miconazol (20 mg/g).

2.2 Específicos

- Avaliar a atividade anti-candida da formulação muco-adesiva de EPP-AF[®].
- Quantificar e comparar o número de unidades formadoras de colônias (UFC) de *Candida sp* antes e depois de ambos os tratamentos, com extrato padronizado de própolis (EPP-AF[®]) e gel oral de miconazol (20 mg/g).
- Identificar as espécies de *Candida sp* por meio de CHROmagar Candida[®].
- Avaliar a segurança por meio da taxa de eventos adversos por grupo e por teste de aceitabilidade dos produtos.

3- MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Desenho do estudo

Trata-se de um ensaio clínico multicêntrico randomizado aberto e de braços paralelos. A aleatorização dos participantes da pesquisa nos grupos de estudo foi feita pela geração eletrônica no site (<http://www.graphpad.com/quickcalcs>, GraphPad Software, Inc).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (parecer 1.057.529) e registrado no Clinical Trials (NCT02818803).

3.2- Participantes

Foram recrutados pacientes usuários de prótese total removível (PTR) com cobertura palatina, no Centro Universitário de Anápolis (UniEvangélica), e no Núcleo de Saúde da Família do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) entre os meses de janeiro a junho de 2016. Os critérios de inclusão foram idade superior a 60 anos, ser usuário de PTR superior e apresentar estomatite protética. Os critérios de exclusão foram presença de demência e uso de antibióticos e/ou antifúngicos nos últimos 2 meses. Os voluntários concordantes em participar da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. A Figura 5 mostra o desenho amostral em fluxograma.

3.3- Intervenções

Os voluntários foram distribuídos aleatoriamente em 2 grupos, sendo o Grupo controle (MIC) tratado com gel oral contendo 20 mg/g de miconazol e o Grupo própolis (PROP) tratado com uma formulação mucoadesiva contendo extrato

padronizado de própolis EPP-AF[®] a 2%, ou seja, um gel com 20mg/g de própolis. Os ingredientes da formulação foram o extrato padronizado de própolis (EPP-AF[®]), sorbitol (umectante), pectina (polímero), sorbato de potássio (conservante), ácido ascórbico (acidulante), edulcorantes (xilitol e sucralose), aromas (mentol e baunilha) e água purificada. O EPP-AF[®] foi produzido e cedido pela empresa Apis Flora Industrial e Comercial Ltda (Ribeirão Preto, SP), assim como a formulação mucoadesiva. O extrato foi padronizado usando uma composição de própolis bruta obtida de várias regiões do Brasil, com predominância da própolis verde originária da *Baccharis dracunculifolia* (número de patente 0405483-0).

Os voluntários foram orientados a realizar higiene bucal e da prótese, borrifar a base da prótese com solução de digluconato de clorexidina 0,12%, remover o excesso e aplicar fina camada do gel oral de miconazol 20 mg/g, ou de gel com EPP-AF[®] sobre a superfície interna da prótese, 3 vezes ao dia durante 14 dias. Todos os pacientes receberam instrução de higiene oral, manutenção das próteses e aplicação do medicamento, e foram orientados a retirar a prótese durante o período do sono e acomodar em recipiente com água. Os pacientes receberam uma bisnaga do gel previamente pesada, um frasco de clorexidina 0,12% spray e as instruções de uso por escrito. A Figura 4 mostra o desenho do estudo em fluxograma.

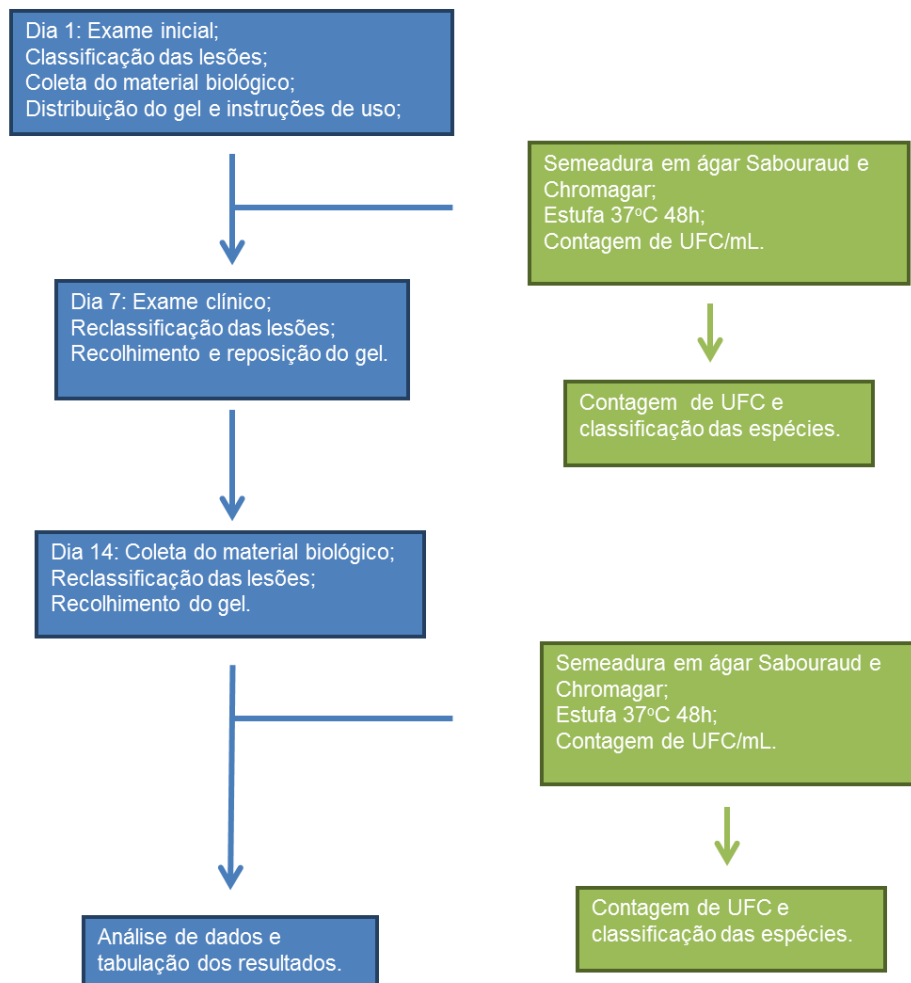


Figura 4. Imagem do desenho do estudo.

3.4- Coleta de dados sócio demográficos, história médica e hábitos

Os dados demográficos e história médica foram coletados por meio de anamnese no primeiro dia (T0). Os voluntários foram inquiridos acerca do tempo de utilização da prótese, hábitos, frequência e produtos utilizados para higiene oral e da prótese, também sobre o hábito de dormir com a prótese e a história médica.

3.5- Avaliação clínica da estomatite protética

Os pacientes passaram por exame físico intrabucal no primeiro dia de avaliação (T0), sendo a classificação proposta por NEWTON (17) utilizada para

avaliação da estomatite protética, dividida em tipo I (inflamação localizada ou pontos de petéquias hemorrágicas); tipo II (eritema mais difuso envolvendo uma parte ou totalidade da área recoberta pela prótese); tipo III (eritema associado à hiperplasia papilar na área recoberta pela prótese). Os participantes foram examinados por um cirurgião-dentista em cada centro participante, as lesões foram fotografadas e discutidas em caso de dúvida na classificação. Os pacientes foram reexaminados após 7 (T7) e 14(T14) dias de tratamento.

3.6- Avaliação da carga fúngica

Coletou-se o bochecho de acordo com protocolo descrito por estudos anteriores (35–37), porém com ajuste para volume e tempo de bochecho. Esses ajustes foram realizados como descritos a seguir: Um grupo de pacientes fez o bochecho com 10 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% por 20 segundos e dispensaram em um tubo estéril de 50 mL. Logo após realizou-se o procedimento com 20 mL por 30 segundos. Essa análise foi realizada em estudo piloto antes da coleta oficial dos dados, verificou-se que a quantidade de UFC obtida com 20 mL de solução salina em 30 segundos, foi superior ao bochecho realizado pelos mesmos pacientes com 10 mL de solução salina por 20 segundos. Como o objetivo era quantificar as colônias para comparação, a amostra com maior volume permitiu melhor resultado. Diante de outras técnicas de isolamento e identificação de espécies de *Candida*, o bochecho com 20 mL de solução salina foi escolhido por apresentar a vantagem de melhor quantificação e isolamento de espécies (35,38). As amostras com o bochecho foram coletadas no 1^o e 14^o dias e acondicionadas refrigeradas até o processamento em laboratório.

No laboratório as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 25^oC a 3.000 x g, descartado o sobrenadante e ressuspendidas em 1 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%. Foi feita a primeira diluição de cada amostra em 0,9 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%, e 0,1 mL da amostra inicial, sendo essa 10⁻¹ (1:10). Foi feita a segunda diluição coletando 0,1 mL da diluição anterior (10⁻¹) em 0,9 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%, sendo essa 10⁻² (1:100). Cem microlitros das amostras foram semeados por espalhamento em placas estéreis contendo o meio de cultura Sabouraud dextrose agar (SDA) (Difco, Detroit, MI, USA) que foi preparado conforme instruções dos fabricantes e acrescido de 5 mL de

cloranfenicol 0,1 g/mL para 1.000 mL do meio. Uma quarta placa foi semeada por esgotamento em meio CHROMagar Candida® (CHROMagar Company, Paris, France) para identificação das espécies, e armazenadas em estufa 37°C por 48h. Depois foi feita a contagem de UFC/mL e identificação das espécies de *Candida* para comparação no início e fim do tratamento e comparação entre os grupos. As amostras foram processadas e analisadas por um profissional em cada centro, com controle de fotos e descrição das colônias para contagem das unidades formadoras de colônias e espécies identificadas pelo CHROMagar Candida®.

3.7- Avaliação da adesão ao tratamento

As bisnagas de miconazol e EPP-AF® foram pesadas antes, no dia 7 e ao término do protocolo do estudo (T 14).

Foram considerados aderentes os pacientes que tiveram o consumo de mais de 5g do produto durante o tratamento.

3.8- Avaliação de segurança e análise de aceitabilidade ao produto

Foram anotados os eventos adversos reportados pelos voluntários. A escala Hedônica de 7 pontos, adaptada de DUTCOSKY (39) foi utilizada para análise de aceitabilidade aos produtos utilizados, o gel contendo EPP-AF® e o produto comercial miconazol.

3.9- Análise Estatística

O tamanho amostral foi determinado de acordo com a fórmula descrita por CHOW e cols (40) para estudos de delineamento paralelo de 2 braços com desfecho dicotômico. O cálculo foi feito considerando a taxa de resposta clínica com margem de inferioridade de 10%, alfa 0,05 e poder de 0,80 e taxa de abandono de 15%, resultando em 20 pacientes por grupo. A análise dos dados foi feita por intenção de tratamento.

O desfecho primário foi a equidade na taxa de cura clínica, e para os desfechos secundários foram considerados a taxa de redução da carga fúngica para >50% do valor pré-tratamento, a taxa combinada de cura clínica e microbiológica e a

aceitabilidade dos produtos em teste. O nível de significância considerado foi $p < 0,05$. Os dados quantitativos (idade, consumo do produto, tempo de uso de PT e carga fúngica) foram comparados pelo teste t de Student com correção de Welch. Para o gênero e presença de diabetes foram realizados teste exato de Fisher e para a frequência de higiene, o teste Mann-Whitney. A evolução clínica das lesões foi medida pelo escore de Newton e comparada pelo teste de Friedman com pos-test de Dunn, e a redução de UFC/mL, após transformação logarítmica, foi analisada por ANOVA para medidas repetidas. Os desfechos clínicos e microbiológicos foram analisados pelo teste exato de Fischer. A aceitabilidade do produto foi comparada pelo teste de Mann-Whitney. Foi usada estatística descritiva para a distribuição das espécies de *Candida*.

4- RESULTADOS

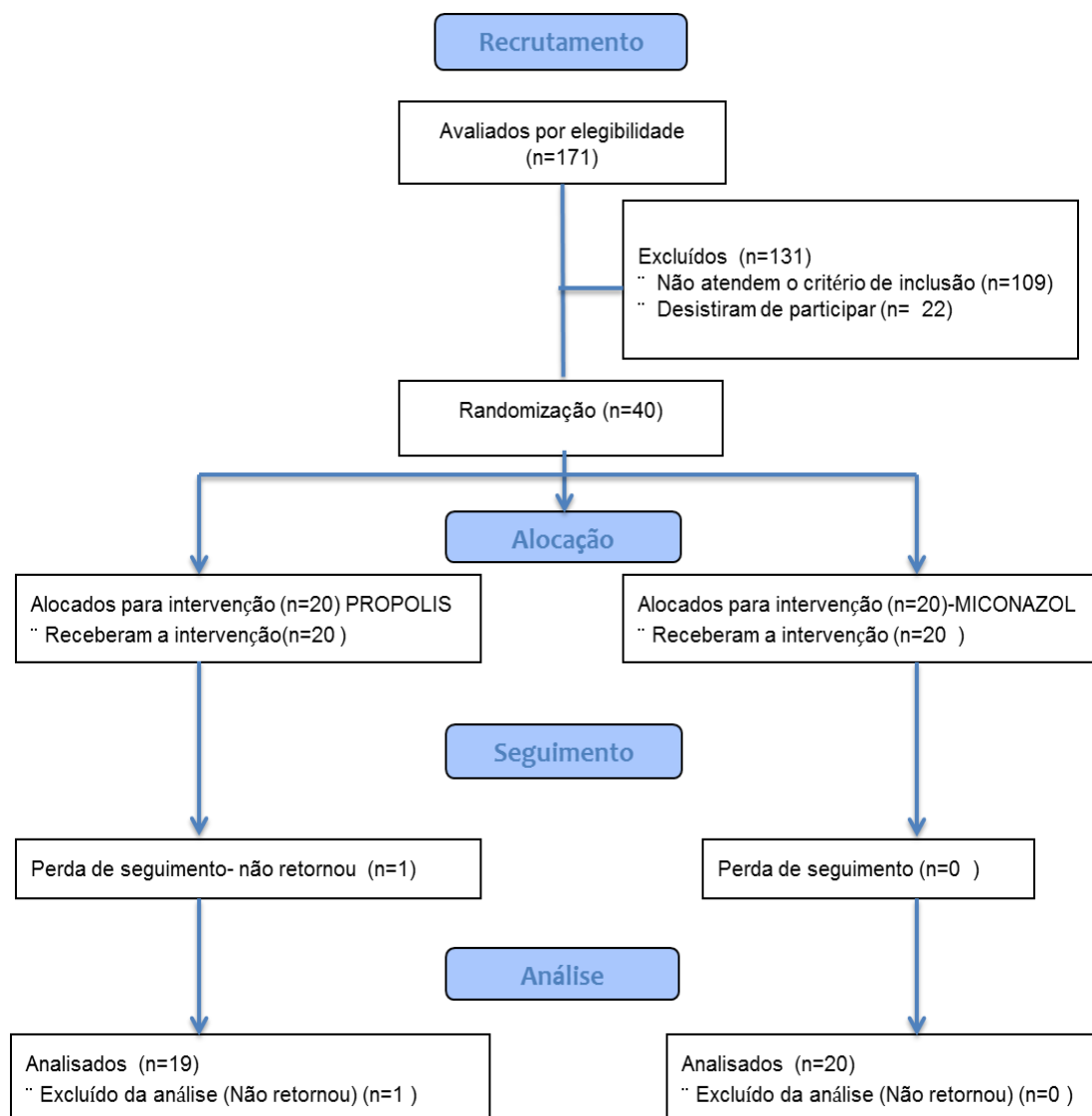


Figura 5. Fluxograma CONSORT

Os pacientes foram recrutados e examinados de janeiro a junho de 2016. O fluxograma CONSORT é mostrado na Figura 5. A Tabela 1 sumariza as características dos grupos, classificação das lesões e carga fúngica. Os grupos foram formados com predomínio feminino, não havendo diferenças relevantes entre as demais características.

Noventa e cinco por cento dos voluntários relataram dormir com a prótese

durante o sono noturno.

Tabela 1. Distribuição das características dos grupos de estudo, classificação das lesões palatinas e carga fúngica inicial

Variáveis	GRUPO MIC	GRUPO PROP	P Valor
Idade (anos)	73±9	73±7	0,98
Gênero (F %)	80	90	0,66
Tempo de uso de prótese (anos)	30±13	35±11	0,20
Tempo de uso prótese atual (anos)	11±9	15±15	0,23
Frequência diária de higiene da prótese	3 (2-3)	3 (3-3)	0,31
Escore Newton (T0)	2 (1-2)	2 (1-2)	0,98
Quantidade medicamento utilizada (g)	17±13	20±17	0,55
Carga fúngica (Log UFC/mL) T0	3,7±1,6	3,3±1,6	0,44
Presença de diabetes	4	2	0,66

Dados expressos como média (mediana) e DP (intervalo de variação 25 a 75%).

A Figura 6 mostra a evolução clínica representada pela classificação de Newton, e a evolução microbiológica, medida pela contagem de unidades formadoras de colônias. A maioria dos pacientes apresentou remissão das lesões durante os 14 dias de tratamento, sendo a taxa de cura clínica de 70% para ambos os grupos. O grupo MIC, mas não o grupo PROP, apresentou redução significativa da contagem de UFC/mL ($p=0,01$) em T14.

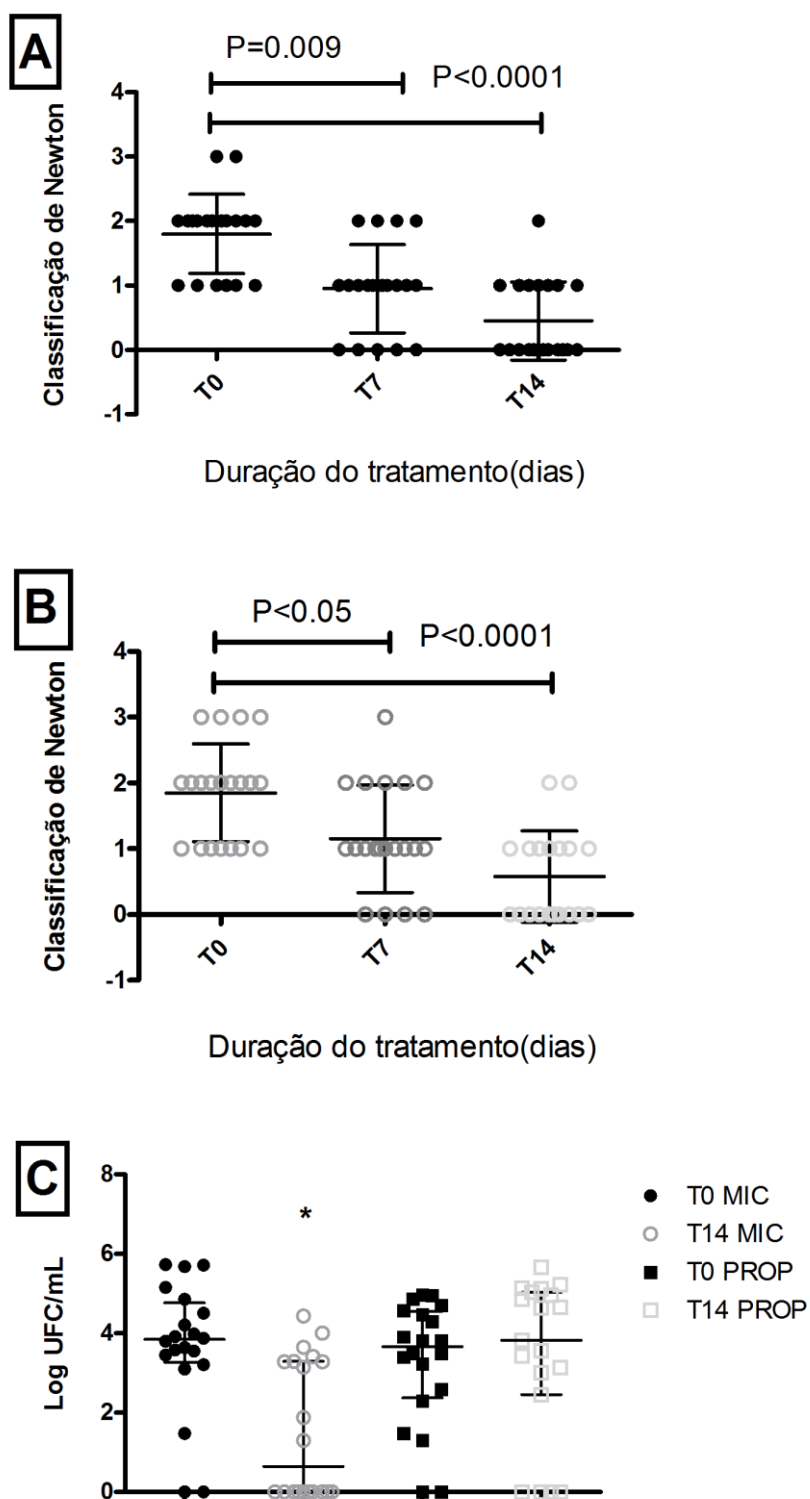


FIGURA 6- A e B. Evolução clínica medida pela classificação de Newton (A, miconazol e B, EPP-AF®). C. Evolução microbiológica medida por unidades formadoras de colônias UFC/mL (C). A e B: Teste Friedman com post-test de Dunn (C) Teste ANOVA. As barras representam a mediana. IC=95% *P<0,05.

A figura 7 mostra a aparência clínica do palato duro antes (T0) e depois do tratamento (T14) dos pacientes do grupo PROP, apresentando melhora dos sinais clínicos.

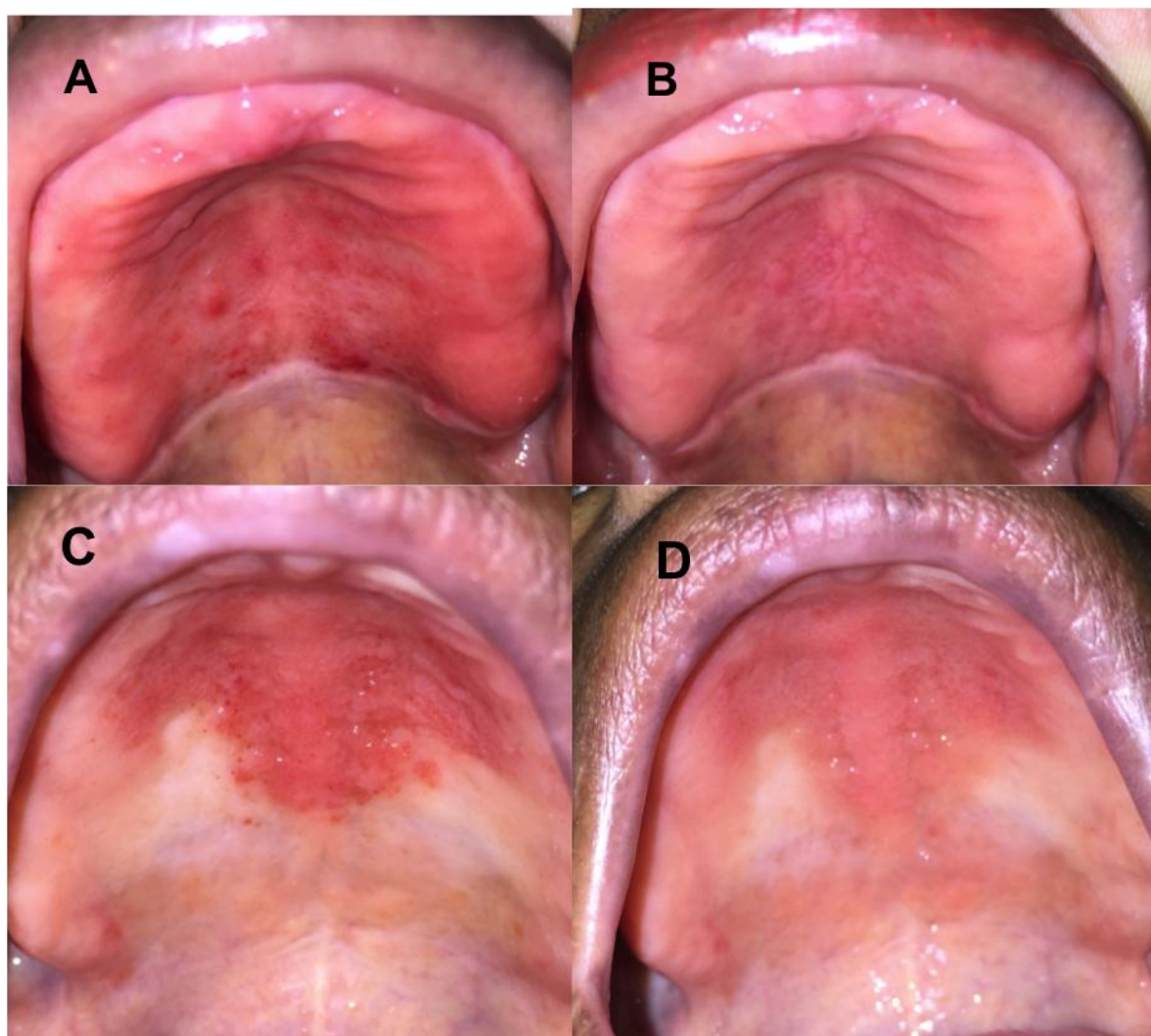


Figura 7. Aparência clínica das lesões iniciais em T0 (A e C) e após tratamento com EPP-AF® em T14 (B e D).

A figura 8 mostra resultados antes (T0) e depois (T14) dos pacientes em do grupo MIC, apresentando melhora dos sinais clínicos.

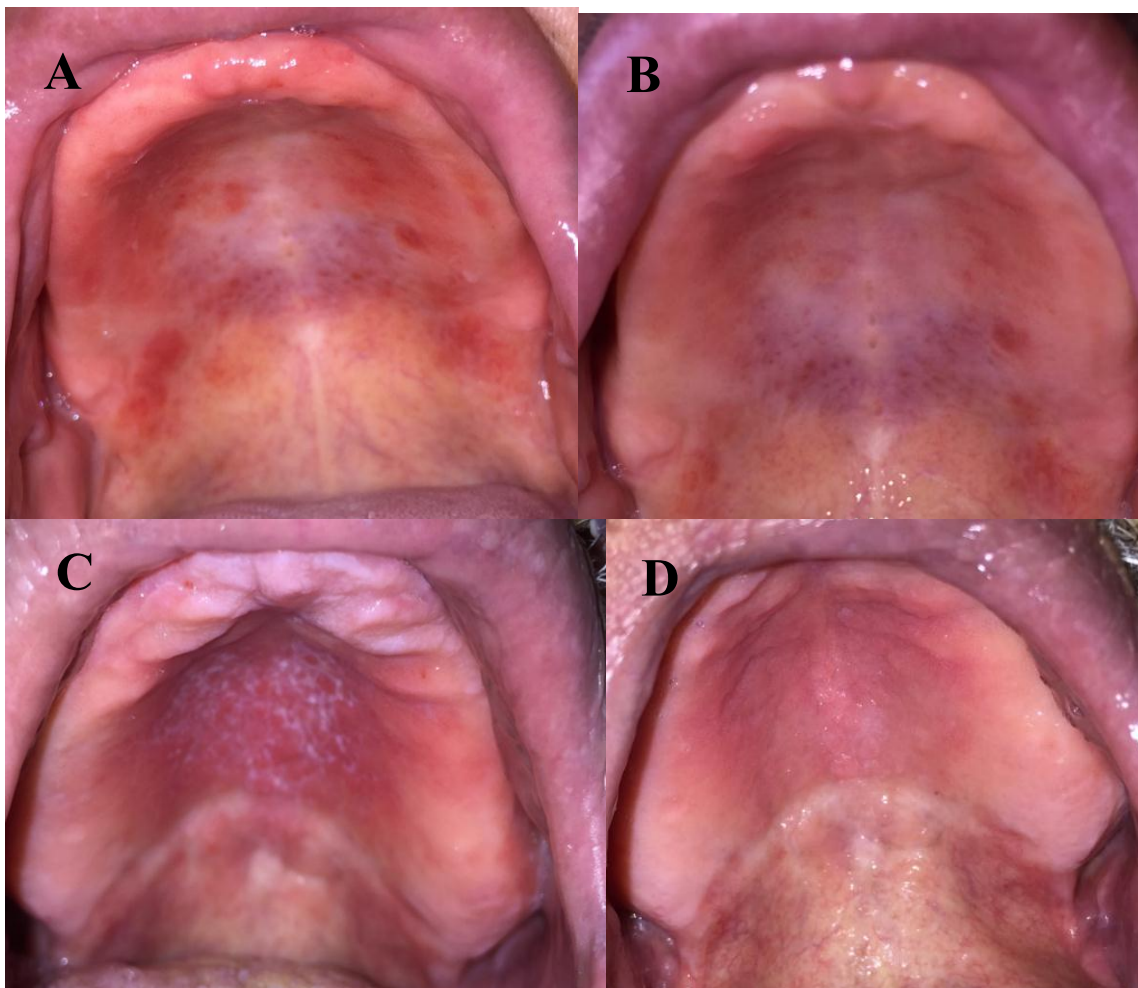


Figura 8. Aparência clínica das lesões iniciais em T0 (A e C) e após tratamento com miconazol em T14 (B e D).

Os desfechos clínico e microbiológico constam na Figura 9. Os dois grupos apresentaram cura clínica das lesões em 14 pacientes no T14. Cerca de 14 pacientes do grupo MIC apresentaram redução da carga fúngica, com cura microbiológica, contra 5 pacientes do grupo PROP no T14.

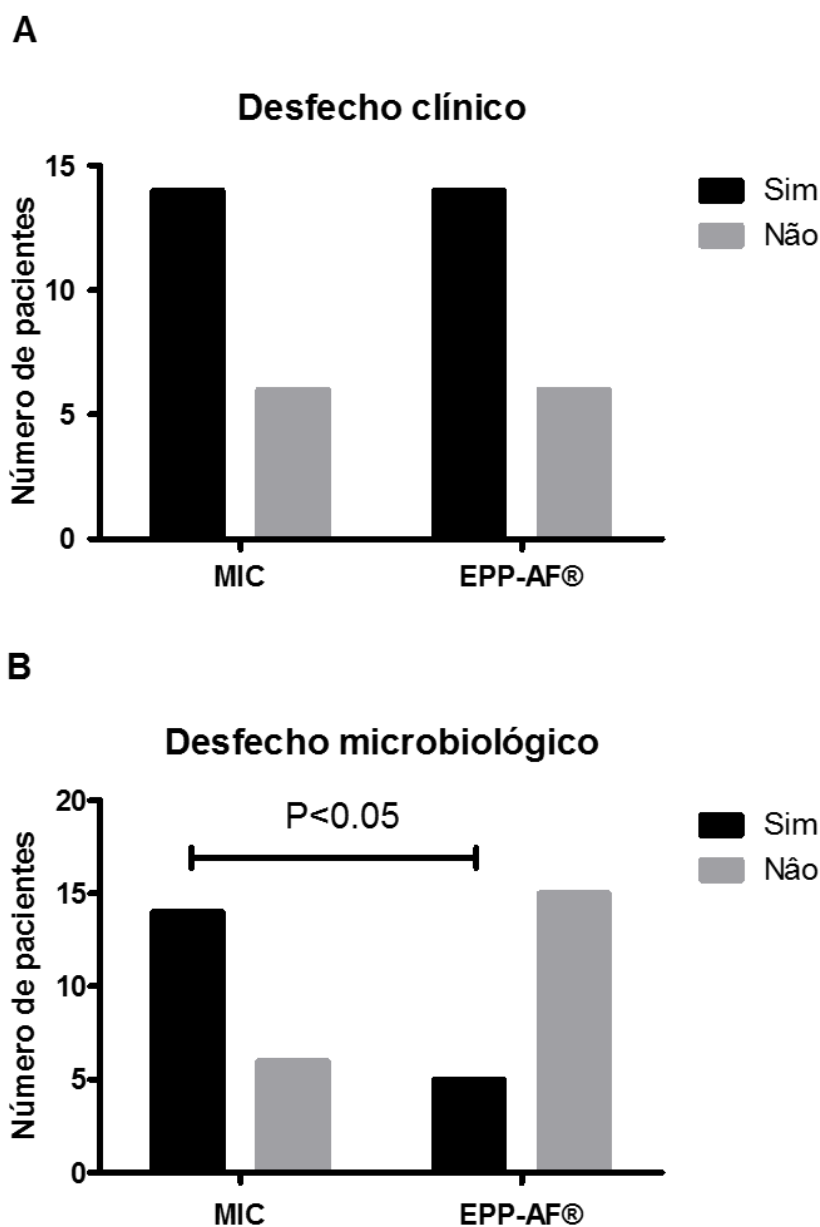


Figura 9. (A) Desfecho clínico e (B) microbiológico. O gráfico de barras compara o desfecho clínico (A) dos dois grupos pela melhora clínica observada pela classificação de Newton e desfecho microbiológico (B) pela redução de UFC/mL. (A) (B) Teste exato de Fischer..* $P < 0,05$. $p = 0,02$.

A Figura 10 mostra os resultados da aceitabilidade aos produtos utilizados (gel de miconazol e EPP-AF®) pelos voluntários do estudo. Em ambos os grupos, houve alta aceitabilidade aos produtos utilizados. Noventa e cinco por cento (95%) dos pacientes do grupo PROP relataram gostar muito ou muitíssimo do sabor, contra 70% do grupo MIC. Apenas 5% do grupo MIC classificaram o medicamento entre os

escores 1-3 da escala hedônica, e nenhum paciente do grupo PROP o classificou nesse intervalo de escore.

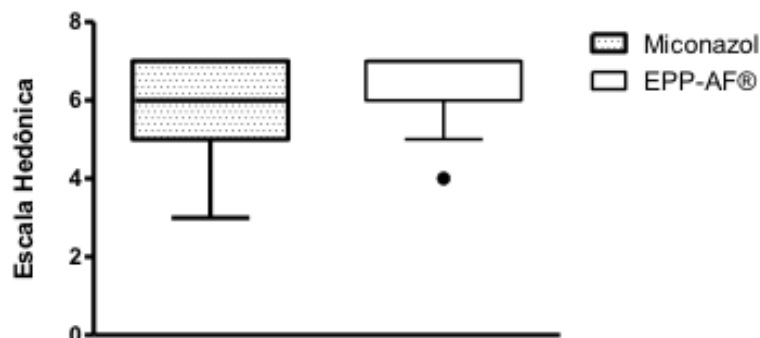


Figura 10 Aceitabilidade do miconazol ou do EPP-AF® de acordo com a escala hedônica de 7 pontos. Box-Plot de Tukey. Teste deMann-Whitney.

No grupo PROP, um paciente relatou ardência durante a aplicação e nenhum efeito adverso foi relatado pelos participantes do outro grupo.

A identificação das espécies de *Candida* foi realizada pelo meio CHROMagar Candida®. A espécie mais prevalente foi *C. albicans* em 90% do grupo MIC e 85% do grupo própolis. Espécies sugestivas de *C. glabrata* ou *C. parapsilosis* estavam presentes em 45% dos pacientes do grupo MIC e 40% no grupo PROP. *Candida tropicalis* apareceu em 45% do grupo PROP e 20% do grupo MIC. Apenas um paciente em cada grupo apresentou a espécie *C. krusei*. Culturas com isolamento de uma única espécie foram observadas em 55% e 40% dos pacientes dos grupos MIC e PROP respectivamente. Culturas com duas e três espécies apareceram no grupo MIC em 30% e 15%, respectivamente, e no grupo PROP em 40% e 20% no T0, sendo que no grupo MIC T14, apenas 5% dos pacientes apresentava culturas múltiplas. No último exame para o grupo PROP, observou-se redução de 5% dos pacientes que apresentavam duas ou três espécies de *Candida*.

5- DISCUSSÃO

Dos 171 pacientes examinados, 131 foram excluídos por não apresentarem lesões características de candidíase ou não preencherem os critérios de inclusão da idade mínima. Dos 40 pacientes analisados, 85% eram do sexo feminino. Esse dado corrobora com a literatura que mostra maior prevalência de estomatite protética entre as mulheres (15,33,38), possivelmente esse fato se deve à maior procura das mulheres por tratamento. Todos os 5 voluntários do sexo masculino apresentaram tempo de uso de prótese superior a 20 anos e dormiam com prótese. Um fator hormonal pode estar associado à predominância feminina, Golecka-Bakowska e colaboradores, verificaram que mulheres de meia idade que usam suplementos hormonais e próteses totais removíveis, são mais propensas ao desenvolvimento de candidíase oral associada ao uso da prótese (41).

As variáveis analisadas estão diretamente ligadas ao aumento de risco da estomatite protética. O tempo médio de uso da PTRs atuais foi de 11 ± 9 anos para o grupo MIC e 15 ± 15 anos para o grupo PROP. Apesar de não haver consenso na literatura atual em relação ao tempo limite de uso da mesma PTR (42), existe relação significativa entre o tempo de uso de prótese e candidíase oral. Em estudo para avaliação do tempo de uso e qualidade de PTRs (43), concluíram que o tempo de uso influencia na qualidade geral das próteses, sendo, porém, difícil generalizar o tempo de vida útil em um período de 1 a 10 anos.

Sabe-se que além de aderir às estruturas orais, as espécies de *Candida* sp também colonizam as irregularidades presentes na estrutura acrílica da prótese (3,15,38,44). Dos quarenta participantes do estudo em questão, trinta e oito pacientes relataram dormir com a prótese. Esse hábito é nocivo, pois o contato da superfície contaminada da prótese com a mucosa palatina é contínuo, favorecendo a diminuição do fluxo salivar e desenvolvimento de estomatite protética (3,10,15,45,46). Estudos mostram que, apenas o tratamento medicamentoso do paciente não é eficaz, sendo necessária a desinfecção da superfície da prótese. A associação de método mecânico, escovação, e método químico, soluções adstringentes e detergentes é descrito como mais eficaz na limpeza e redução de micro-organismos (15,46–48). O spray de digluconato de clorexidina 0,12% foi

usado com o intuito de desinfecção da prótese, a fim de evitar a recontaminação pelos micro-organismos aderidos. A clorexidina já tem difundido na literatura seu potencial antimicrobiano na remoção de biofilme e prevenção de colonização de *Candida albicans* (33,45,49,50), porém sua atividade depende de um tempo de ação maior que 30 minutos (50). Alguns estudos apontam melhora no aspecto da mucosa do paciente com estomatite protética após uso tópico de clorexidina (51,52). No entanto, mesmo um reduzido tempo de exposição ao antisséptico pode ocasionar interferência na interpretação de melhora clínica das lesões.

As pessoas idosas dessa amostra, de maneira geral, gozavam de boas condições de saúde. Alguns pacientes apresentaram diabetes tipo II e por ser uma condição imunossupressora (53), foi considerado um possível fator de confundimento. Porém, além dessa condição estar mais associada a outros tipos de candidíase como atrófica aguda e crônica hiperplásica (2, 3), o número de pacientes foi pequeno, e a estomatite protética caracteriza-se por lesões superficiais (54) portanto acreditamos que a parte sistêmica não interferiu no resultado apresentado pelos grupos.

Acerca da prevalência das espécies, nosso achado corrobora com vários estudos na literatura que apontam a *Candida albicans* como principal agente etiológico da estomatite protética (3,11,33,38,45,55,56).

A apresentação do produto em forma de gel é preferível em relação ao extrato alcoólico de própolis pois o etanol presente em sua formulação é capaz de provocar irritação à mucosa além de não possuir características mucoadesivas (31, 32). Esta é uma característica importante para manutenção do produto em íntimo contato com as lesões por um período maior de tempo. Estudos anteriores em modelos *in vitro* e *in vivo* demonstraram a ausência de potencial citotóxico e mutagênico do gel de própolis (24,30). Baseando-se nesses estudos prévios, foi determinada a composição utilizada no presente estudo. O produto foi formulado com 2,85x a concentração fungicida obtida em modelo anti-*Candida albicans in vitro*, que foi 0,7% (7,0 mg/g). Estudos histopatológicos foram realizados demonstrando que até 3,6% de própolis não causaram processo inflamatório ou irritante (28).

No presente estudo, a ação anti-inflamatória e cicatrizante da formulação à base do extrato de própolis se sobrepôs à ação antifúngica, considerando que houve cura clínica porém, sem redução da carga fúngica. A ação anti-inflamatória foi atribuída pela melhora clínica das lesões. Esses achados corroboram com a

pesquisa de BERRETTA e cols (28), que avaliaram a ação cicatrizante do gel de própolis em feridas no epitélio de ratos e concluíram que as concentrações de 2,4% e 3,6% foram eficazes para reconstituição dos tecidos. Outros autores demonstraram atividade antifúngica da própolis, mesmo em pequenas concentrações, e concluíram que o efeito antifúngico era diretamente proporcional à concentração de própolis usada. Em nosso estudo, foi utilizada a concentração de própolis de 2%, incapaz de provocar alterações irritantes à mucosa, ainda assim a redução de UFCs não foi satisfatória (57). Portanto, pode ser questionado se o tempo de tratamento ou utilização de concentrações superiores poderia interferir sobre a ação antifúngica. Capistrano e cols (31) obtiveram melhora clínica nas lesões de estomatite protética, mas sem remissão total das lesões em todos os pacientes, em um estudo com metodologia semelhante ao presente trabalho.

Podemos pontuar vantagens interessantes em um produto natural com atividade anti-inflamatória, cicatrizante e capacidade de melhora clínica da estomatite protética, quando comparado a um medicamento anti-fúngico. A *Candida* é um micro-organismo comensal presente na maior parte da população, dessa forma devemos ponderar que sua eliminação possivelmente cause um desequilíbrio da microbiota oral. Não foi observado um padrão entre redução de UFCs e melhora clínica da estomatite protética. Pacientes com alto número de colônias apresentaram regressão clínica da lesão, bem como alguns pacientes que mostraram pequena regressão inflamatória, apresentaram redução na quantidade de UFCs. Uma hipótese poderia envolver a capacidade da própolis de atuar no dimorfismo da *Candida albicans* entre as formas de pseudo-hifas e hifas em leveduras, sendo esta última não-patogênica(29). Sabe-se que esta mudança pode estar relacionada com a virulência e patogenicidade do fungo (1,6,58,59), sendo as pseudo-hifas e hifas os morfotipos patogênicos. A própolis pode provocar uma mudança no fenótipo do fungo sem necessariamente sua redução quantitativa. Em perspectivas para estudos posteriores pode ser analisada a relação entre a melhora clínica da lesão de estomatite protética pelo tratamento com EPP-AF® e a mudança de fenótipo do fungo. Outra coisa que é preciso ter em mente é que a própolis também possui ação antiinflamatória via ação no sistema imunológico (26) e que a candidíase é desencadeada, dentre outros possíveis fatores, por um desequilíbrio dessa resposta (imunossupressão) que favorece a transição dimórfica para a forma patogênica (2). Desse modo, se a própolis está atuando no equilíbrio da resposta imunológica, é

possível que como consequência a *Candida* transite para a morfogênese não-patogênica, ou seja, não é possível sabermos com os dados disponíveis no momento, se a própolis está atuando diretamente sobre o agente causal ou na resposta imunológica do hospedeiro, resposta que será estudada futuramente. De qualquer modo, a remissão dos sinais clínicos sem o desequilíbrio da flora microbiológica, é um fato muito interessante e positivo.

A aceitabilidade do produto é importante para adesão do paciente ao tratamento. O paciente não aderente pode ter dificuldades em manter a posologia, podendo incorrer em exposição inadequada ao antifúngico, efeitos adversos (60), risco de interações medicamentosas (61–63) e resistência dos micro-organismos, observada comumente em antifúngicos azólicos (14,21,22,64). O miconazol age alterando a permeabilidade da membrana celular, e é considerado o antifúngico de escolha para tratamento tópico de estomatite protética em pacientes saudáveis. Porém seu uso recorrente pode causar resistência de espécies de *Candida* ao miconazol, em pacientes idosos com estomatite protética (21,65). Resultados de uma meta-análise mostraram que o miconazol apresentou maior eficácia clínica para o tratamento da estomatite protética comparado a substâncias naturais, incluindo a própolis (60). Porém, em nosso estudo a melhora clínica foi semelhante entre os dois produtos. O miconazol, apesar da ação tópica, pode ser suficientemente absorvido ao ponto de interagir com outras drogas. Isso acontece por meio da inibição da enzima citocromo P-450, diminuindo o "clearance" de alguns fármacos. Existem relatos de interação com o anticoagulante varfarina, além de antidepressivos, anti-histamínicos, imunossupressores, anti-epiléticos, que podem apresentar risco de interação com miconazol gel oral (61,62). Os autores ainda fazem um alerta para a consideração de interações entre fármacos por cirurgiões-dentistas antes das prescrições.

Alguns estudos apontam que pacientes expostos a fatores de risco e com candidíase de repetição devem ser tratados com antifúngicos com menor potencial de desenvolvimento de resistência em micro-organismos (10,14), com relação a esta questão, a própolis demonstrou ação anti-fúngica por pelo menos três mecanismos de ação distintos em modelo de biblioteca de deleção de *S. cerevisiae* (66,67) e em *C. albicans* (29), o que dificultaria o desenvolvimento de resistência microbiológica. Assim, embora, os dados aqui encontrados tenham demonstrado que a ação na presente patologia seja por uma ação anti-inflamatória e cicatrizante, e não

antifúngica, o risco de resistência utilizando o gel contendo EPP-AF®, estaria descartado. Idosos são público alvo para desenvolvimento de estomatite protética de repetição, devido ao alto índice de uso de PTRs, portanto, o ideal de tratamento são alternativas eficazes e com o mínimo de risco, oferecendo maior segurança.

6- CONCLUSÕES

A própolis se mostrou eficiente na redução dos sinais e lesões, apresentando, nessa população analisada, maior eficácia na regressão clínica das lesões do que na redução do número de colônias.

Em nossos resultados *Candida albicans* foi o agente etiológico de maior prevalência na estomatite protética.

O EPP-AF® se mostrou um produto com boa aceitabilidade entre os voluntários, favorecendo a aderência ao tratamento.

Para futuros estudos, sugere-se a avaliação da resposta imunológica dos pacientes, além da resposta microbiológica considerando as características fenotípicas e genotípicas buscando possíveis correlações entre as espécies de *Candida* e o seu morfotipo, e o grau de melhora clínica das lesões.

7- REFERÊNCIAS

1. Jayatilake JAMS. A Review of the Ultrastructural Features of Superficial Candidiasis. *Mycopathologia*. 2011;171(4):235–50.
2. Giannini PJ, Shetty K V. Diagnosis and management of oral candidiasis. *Otolaryngol Clin North Am* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;44(1):231–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.otc.2010.09.010>
3. Akpan A, Morgan R. Oral Candidiasis. *Postgrad Med J*. 2002;78(922):455–9.
4. Ewan V, Staines K. Diagnosis and management of oral mucosal lesions in older people: a review. *Rev Clin Gerontol* [Internet]. 2008;18(2):115–28. Available from: <http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cin20&AN=2010369557&site=ehost-live>
5. Jayatilake JAMS, Samaranayake YH, Cheung LK, Samaranayake LP. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type, hyphal and SAP mutants of *Candida albicans*, and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med*. 2006;35(8):484–91.
6. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. 2011;10(9):1173–82.
7. Jayatilake J, Samaranayake Y, Cheung L, Samaranayake LP. Quantitative evaluation of tissue invasion by wild type hyphal and SAP mutants of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species in reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med*. 2006;484–91.
8. Sudbery P, Gow N, Berman J. The distinct morphogenic states of *Candida albicans*. *Trends Microbiol*. 2004;12(7):317–24.
9. Loster BW, Loster J, Wiczorek A, Ryniewicz W. Mycological analysis of the oral cavity of patients using acrylic removable dentures. *Gastroenterol Res Pract*. 2012;2012.
10. Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies. *Front Microbiol*. 2015;6(DEC):1–10.
11. Budtz-Jørgensen E. The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis. *Scand J Dent Res* [Internet]. 1974;82(2):151–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4598186>

12. Neville B, Damm D, Bouquot J. Patologia Oral e Maxilo- facial. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
13. Regezi J, Sciubba J, Jordan R. Patologia Oral: correlações clinico patológicas. 5ª. Rio de Janeiro: Elsevier Inc.; 2008. 73-106 p.
14. Ramage G, Tomsett K, Wickes BL, López-Ribot JL, Redding SW. Denture stomatitis: A role for Candida biofilms. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology. 2004;98(1):53–9.
15. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis. J Prosthodont. 2011;20(4):251–60.
16. Kulak Y, Arıkan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. J Prosthet Dent. 1994;72(3):283–8.
17. Newton A. Denture sore mouth: a possible aetiology. Br Dent J. 1962;112:357–60.
18. Brasil. SB Brasil 2010. Ministério da Saúde. 2012.
19. Freitas JB, Gomez RS, De Abreu MHNG, Ferreira E Ferreira E. Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians. J Oral Rehabil. 2008;35(5):370–4.
20. Casaroto AR, Lara VS. Phytomedicines for Candida-associated denture stomatitis. Fitoterapia [Internet]. Elsevier B.V.; 2010;81(5):323–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2009.12.003>
21. Lamfon H, Porter SR, McCullough M, Pratten J. Susceptibility of Candida albicans biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: A longitudinal study. J Antimicrob Chemother. 2004;53(2):383–5.
22. Siqueira ABS, Rodriguez LRN de A, Santos RKB, Marinho RRB, Abreu S, Peixoto RF, et al. Antifungal activity of propolis against Candida species isolated from cases of chronic periodontitis. Braz Oral Res [Internet]. 2015;29(1):1–6. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1806-83242015000100278&lng=en&nrm=iso&tlng=en
23. Rocha BA, Rodrigues MR, Bueno PCP, De Mello Costa-Machado AR, De Oliveira Lima Leite Vaz MM, Nascimento AP, et al. Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Increased water solubility of the chemical

- constituents and antioxidant activity. *J Therm Anal Calorim.* 2012;108(1):87–94.
24. Senedese JM, Rodrigues AR, Furtado MA, Faustino VD, Berretta AA, Marchetti JM, et al. Assessment of the mutagenic activity of extracts of Brazilian propolis in topical pharmaceutical formulations on mammalian cells in vitro and in vivo. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2011;2011(Poloxamer 407).
 25. Reis CMF, Carvalho JCT., Caputo, L.R.G.; Patricio KCM., Barbosa MVJ., Chieff, A.L., BaSTOS JK. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis.Pdf [Internet]. 2000. p. 43–52. Available from: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2000000100005>
 26. Machado JL, Assunção AKM, Da Silva MCP, Reis AS Dos, Costa GC, Arruda DDS, et al. Brazilian green propolis: Anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2012;
 27. Barros MP de, Sousa JPB, Bastos JK, Andrade SF de. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J Ethnopharmacol.* 2007;110(3):567–71.
 28. Berretta AA, Nascimento AP, Bueno PCP, Leite Vaz MM de OL, Marchetti JM. Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds. *Int J Biol Sci.* 2012;8(4):512–21.
 29. de Castro PA, Bom VLP, Brown NA, Almeida RSC de, Ramalho LNZ, Savoldi M, et al. Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;60:74–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2013.07.001>
 30. Berretta AA, De Castro PA, Cavalheiro AH, Fortes VS, Bom VP, Nascimento AP, et al. Evaluation of mucoadhesive gels with propolis (EPP-AF) in preclinical treatment of candidiasis vulvovaginal infection. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;
 31. Capistrano HM, De Assis EM, Leal RM, Alvarez-Leite ME, Brener S, Bastos EMAF. Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida* -associated denture stomatitis. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013.
 32. Santos VR, Gomes RT, Mesquita RA, Moura MDG, França EC, Aguiar EG, et

- al. Efficacy of Brazilian Propolis Gel for the Management of Denture Stomatitis: a Pilot Study. *Phytother Res.* 2008;
33. Azevedo RVP, Komesu MC, Candido RC, Salvetti C, Rezende FHC. *Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: Maximal inhibitory dilution of propolis and periogard. *Rev Microbiol [Internet]*. 1999;30(4):335–41. Available from: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-22844438454&partnerID=40&md5=eb0ddd702abac555f92e981a11b0af46>
 34. Santos VR, Pimenta FJGS, Aguiar MCF, Do Carmo MA V, Naves MD, Mesquita RA. Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract. *Phyther Res.* 2005;19(7):652–4.
 35. Raju SB, Rajappa S. Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity. *ISRN Dent [Internet]*. 2011;2011(Table 2):487921. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3205665&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 36. Godoy JSR, de Souza Bonfim-Mendonça P, Nakamura SS, Yamada SS, Shinobu-Mesquita C, Pieralisi N, et al. Colonization of the oral cavity by yeasts in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis. *J Oral Pathol Med [Internet]*. 2013;42(3):229–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22978344>
 37. Samaranayake LP, MacFarlane TW, Lamey PJ, Ferguson MM. A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity. *J Oral Pathol.* 1986;15(7):386–8.
 38. Bianchi CMP de C, Bianchi HA, Tadano T, Depaula CR, Hoffmann-Santos HD, Leite DP, et al. Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2016;58(3):6–10.
 39. Dutcoscky S. *Análise sensorial de alimentos*. 2nd ed. Champagnat, editor. Curitiba; 2007.
 40. CHOW S, SHAO J, WANG H. *Sample size calculations in clinical research*. 1st ed. Inc MD, editor. New York; 2003.
 41. Golecka-Bychawska M, Mierzwinska-Nastalska E, Bychawska M. Influence of Hormone supplementation therapy on the incidence of denture stomatitis and on chemiluminescent activity of polymorphonuclear granulocytes in blood of

- menopausal -aged women. *Eur J Med Res*. 2010;15:46–9.
42. Ribeiro PM, Kogaito CY, Junqueira JC, Jorge AOC. Isolamento de *Candida* spp. com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMagar *Candida*. *Braz Dent Sci*. 2009;12(4):40–5.
43. Cabrini J, Fais L, Compagnoni M, Mollo Júnior F, Pinelli L. Tempo de uso e a qualidade das próteses totais – uma análise crítica Wear time and the quality of the complete dentures – a critical analysis Laiza Maria Grassi FAIS Marco Antonio COMPAGNONI Lígia Antunes Pereira PINELLI. *Cienc Odontol Bras*. 2008;11(2):78–85.
44. Gharechahi M, Moosavi H, Forghani M. Effect of Surface Roughness and Materials Composition. *J Biomater Nanobiotechnol* [Internet]. 2012;3(4):541–6. Available from:
<http://www.scirp.org/journal/PaperInformation.aspx?PaperID=24029&#abstract>
45. Nalbant AD, Kalkanci A, Filiz B, Kustimur S. Effectiveness of different cleaning agents against the colonization of *Candida* spp and the in Vitro detection of the adherence of these yeast cells to denture acrylic surfaces. *Yonsei Med J*. 2008;49(4):647–54.
46. Felton D, Cooper L, Duqum I, Minsley G, Guckes A, Haug S, et al. Evidence-Based Guidelines for the Care and Maintenance of Complete Dentures: A Publication of the American College of Prosthodontists. *J Prosthodont*. 2011;20(SUPPL. 1).
47. Catão CD de S, Ramos INC, Silva Neto JM da S, Duarte SMO, Batista AUD, Dias AH de M. Eficiência de substâncias químicas na remoção do biofilme em próteses totais. *Rev Odontol UNESP*. 2007;36(1):53–60.
48. Gonçalves LFF, Neto DR da S, Bonan RF, Carlo HL, Ulisses A, Batista D, et al. Higienização de Próteses Totais e Parciais Removíveis. *Rev Bras Ciências da Saúde*. 2011;15(1):87–94.
49. Rocha CGBBR, Reis C, Pimenta FC. Contagem E Identificação De Microrganismos Na Saliva De Portadores Do Vírus Da Imunodeficiência Humana Antes E Após Higienização E Bochecho Com Anti-Sépticos. *Rev Patol Trop*. 2006;35(2):125–33.
50. Gouveia CL, Freire ICM, Leite ML de A e S, Figueiredo RDA, Almeida L de FD, Cavalcanti YW, et al. Antifungal activity of components used for decontamination of dental prostheses on the growth of *Candida albicans*.

- 2014;43(2):137–43.
51. Kazuo SD, Camila U, Ferreira S, Justo KD, Rye OE, Shigeyuki UE. Higienização Em Prótese Parcial Removível. Rev Odontol da Univ Cid São Paulo. 2008;20(2):168–4.
 52. Budtz-Jorgensen E. Materials and methods for cleaning dentures. J Prosthet Dent. 1979;619–23.
 53. Jurevic RJ, Bai M, Chadwick RB, White TC, Dale BA. Single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in human β -defensin 1: High-throughput SNP assays and association with *Candida* carriage in type I diabetics and nondiabetic controls. J Clin Microbiol. 2003;41(1):90–6.
 54. Bissell V, Felix DH, Wray D. Comparative trial of fluconazole and amphotericin in the treatment of denture stomatitis. Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol. 1993;76(1):35–9.
 55. Baddam VR, Bakki S, Kantheti LP, Kuruba K, Mulakaluri R, Poosarla C. Candidal carriage, isolation and species variation in patients undergoing radiotherapy and chemotherapy for head and neck tumours. J Dr NTR Univ Heal Sci. 2014;3(1):28.
 56. Leite DP, Piva MR, Martins-Filho PRS. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e à terapia fotodinâmica. 2015;44(1):12–7.
 57. Longhini R, Raksa SM, Oliveira ACP, Svidzinski TIE, Franco SL. Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. Brazilian J Pharmacogn. 2007;17(3):388–95.
 58. Novák A, Vágvolgyi C, Pesti M. Characterization of *Candida albicans* colony-morphology mutants and their hybrids. Folia Microbiol (Praha). 2003;48(2):203–9.
 59. Webb BC, Thomas CJ, Willcox MDP, Harty D, Knox KW. *Candida* - associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of candida species in the oral cavity. Aust Dent J. 1998;43(1):45–50.
 60. Zhang L-W, Fu J-Y, Hua H, Yan Z-M. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. Oral Dis [Internet]. 2015;(October 2015):185–95. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/odi.12380>

61. Lempers VJC, Martial LC, Schreuder MF, Blijlevens NM, Burger DM, Aarnoutse RE, et al. Drug-interactions of azole antifungals with selected immunosuppressants in transplant patients: strategies for optimal management in clinical practice. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;24:38–44.
62. Pemberton MN, Oliver RJ, Theaker ED. Miconazole oral gel and drug interactions. *Br Dent J [Internet]*. 2004;196(9):529–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131616>
63. Dodds-ashley E, Pharm D. Management of Drug and Food Interactions with Azole Antifungal Agents in Transplant Recipients. *Pharmacotherapy*. 2010;30(8).
64. Pfaller MA. Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. *Am J Med [Internet]*. Elsevier Inc.; 2012;125(1 SUPPL.):S3–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.amjmed.2011.11.001>
65. Dalazen D, Zanrosso D, Wanderley L, Silva NL Da, Fuentefria AM. Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de *Candida* spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil. *J Bras Patol e Med Lab*. 2011;47(1):33–8.
66. de Castro PA, Savoldi M, Bonatto D, Barros MH, Goldman MHS, Berretta AA, et al. Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 2011;10(3):398–411.
67. de Castro PA, Savoldi M, Bonatto D, Malavazi I, Goldman MHS, Berretta A a, et al. Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* exposed to propolis. *BMC Complement Altern Med [Internet]*. 2012;12:194. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3598864&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
68. Samaranayake L. Commensal oral *Candida* in Asian cohorts. *Int J Oral Sci*. 2009;1(1):2–5.
69. Kulak Y, Arikan A, Delibalta N. Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis. *Tha\le J Prosthet Dent*. 1994;72:283–8.

8- APÊNDICES E ANEXOS

APÊNDICE I

Ficha clínica (CRF)

CÓDIGO DE RANDOMIZAÇÃO: _____

CRF

PROJETO PROPOLIS X CANDIDose BUCAL

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE

Nome: _____ Idade _____

Endereço: _____

Telefone de contato: _____ Raça/cor _____ Gênero F / M

CÓDIGO DE RANDOMIZAÇÃO: _____

COLETOU TCLE? () S () N DATA DA COLETA ___/___/___

CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Idade \geq 60 anos () S () N

Prótese removível com cobertura palatina? () S () N

Estomatite protética () S () N

CRITÉRIO DE EXCLUSÃO

Possui demência ou déficit cognitivo? () S () N

Usou antibióticos ou antifúngicos nos últimos 2 meses? () S () N

Obs: excluir o paciente do estudo caso a(s) resposta(s) acima seja(m) afirmativa(s)

DADOS DE SAÚDE

Lista de problemas

Medicamentos em uso _____

V0- Triagem e Avaliação Inicial Data ___/___/___Informações sobre a prótese

Há quanto tempo usa prótese dentária? _____

Há quanto tempo a prótese atual foi confeccionada? _____

Dorme com a prótese? () S () N

Frequência de higiene da prótese _____x/dia

Produtos utilizados p/ higiene da prótese

() pasta dental () escova dental ()

outros _____

Classificação de Newton

() I () II () III

O material foi coletado(bochecho NaCl 0,9% estéril)? () S () N

Fornecido o frasco de medicamento? () S () N

Quantidade _____Peso _____

Fornecido orientação de uso (receita)? () S () N

Marcar retorno em 7 dias

Carga fúngica: _____UFC/mL Data ___/___/___

Identificação do fungo

Espécie _____

Resistência a antifúngicos _____

Responsável pelo preenchimento _____

V1 – Avaliação Data ___/___/___

Retornou medicamento? () S () N

Quantidade _____Peso _____

Classificação de Newton

() I () II () III

Eventos adversos

() descamação da mucosa () aftas () reação alérgica(vermelhidão, edema, pápulas) () outros _____

Escala Hedônica

7 - gostei muitíssimo

6 - gostei muito

5 - gostei moderadamente

4 - nem gostei/nem desgostei

3 - desgostei moderadamente

2 - desgostei muito

1 - desgostei muitíssimo

Fornecido o frasco de medicamento? () S () N

Quantidade _____Peso _____

Fornecido orientação de uso (receita)? () S () N

Marcar retorno em 7 dias

Responsável _____
preenchimento_____

pelelo

V2 – Avaliação Data ____/____/____

Retornou medicamento? () S () N

Quantidade _____ Peso _____

Classificação de Newton

() I () II () III

O material foi coletado(bochecho NaF 0,9% estéril)? () S () N

Carga fúngica: _____ UFC/mL

Eventos adversos

() descamação da mucosa () aftas () reação alérgica(vermelhidão, edema, pápulas) () outros _____

Responsável pelo preenchimento _____

Observações _____

APÊNDICE II- Termo de consentimento livre e esclarecido**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE****versão 3 de 30 de abril de 2015***(Pesquisa Científica em Seres Humanos, Resolução CNS 466/12)*

O(A) Senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa “AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA FORMULAÇÃO MUCO-ADESIVA A BASE DE EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS (EPP-AF[®]) COMO ANTI-SÉPTICO BUCAL”

Informações sobre a pesquisa

Título: "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA FORMULAÇÃO MUCO-ADESIVA A BASE DE EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS (EPP-AF[®]) COMO ANTI-SÉPTICO BUCAL".

Pesquisadores envolvidos: Erica Negrini Lia(pesquisadora principal, aluna de pós-doutorado FMRP-USP) cel (61)9116-7148; Eduardo Barbosa Coelho (docente FMRP-USP) cel 98136-7075; Andresa Aparecida Berreta e Silva, fone(16) 3514-4444; Gisela de Martins Souza Pina, fone (62)8103-0307. **O telefone do Comitê de Ética em Pesquisa(CEP) do HC/FMRPUSP é (16) 3602-2228.**

Justificativa e objetivos da pesquisa

A própolis, um produto natural produzido por abelhas, tem sido usado para tratar vários problemas de saúde. Há pesquisadores que usaram a própolis para tratar a candidíase na boca(sapinho). Este estudo pretende avaliar se o uso da própolis produzida pela empresa Apis Flora de Ribeirão Preto-SP pode curar a candidíase bucal (sapinho), que ocorre comumente em pessoas que usam dentadura.

Procedimentos

Para participar do estudo você passará por exame da boca e fará um bochecho com soro fisiológico, o que dura em média 20 minutos e será realizado por um dentista. Este exame e o bochecho não causam dor ou desconforto. Seu prontuário (que contém suas informações de saúde) também será analisado e faremos algumas perguntas relacionadas à hábitos de higiene bucal. Serão necessárias fazer 3 avaliações, sendo uma inicial, e mais duas outras, 1 semana e 15 dias após o primeiro exame. Os exames da boca serão realizados no Ambulatório de Geriatria

do Hospital das Clínicas da FMRP-USP em Ribeirão Preto-SP, no Ambulatório de Geriatria do Centro Multidisciplinar do Idoso do HUB em Brasília-DF ou no Curso de Odontologia do Centro Universitário de Anápolis (Unievangelica) em Anápolis-GO, e você será atendido na cidade onde morar ou for mais próxima da sua casa. No primeiro exame, se for encontrada a candidíase (“sapinho”) em sua boca, você receberá o tratamento para 15 dias, que pode ser a própolis ou o miconazol, de acordo com um sorteio que faremos. Caso você seja sorteado para usar o gel de miconazol, você deverá passar com o dedo uma camada fina desse gel no céu da boca, 3 vezes ao dia, após a higiene bucal, durante 15 dias. No primeiro e no último dia do exame, você deverá fazer um bochecho com soro fisiológico e cuspir em um frasco de plástico, que será coletado pelo pesquisador para análise em laboratório. Durante todo o tratamento, você deverá seguir as orientações de higiene bucal e com a sua dentadura, passadas pelo pesquisador.

Riscos

Pode haver falha da própolis em tratar a candidíase bucal. A própolis poderá causar irritação ou alergias no céu da boca. Caso isso ocorra, você passará a ser tratado com o gel oral de miconazol. Em raríssimas situações, o gel de miconazol também poderá causar irritação ou alergias no céu da boca. Neste caso, o tratamento tópico será suspenso e passaremos a tratar você com um comprimido de fluconazol tomado pela boca, em dose única. Esclarecemos que é pouco provável que esses efeitos colaterais ocorram, entretanto é importante que você esteja consciente dos mesmos, caso aconteçam.

Benefícios

Para você, o benefício em participar da pesquisa será passar por uma avaliação odontológica completa e conhecer seu estado de saúde bucal. Além disso, você receberá o benefício do tratamento e de orientações de higiene de próteses e de saúde bucal.

Forma de acompanhamento e assistência

O estudo será acompanhado por um cirurgião-dentista capacitado. Os pesquisadores estarão à sua disposição para quaisquer esclarecimentos nos telefones: Erica Negrini Lia / Eduardo Barbosa Coelho(16) 98136-7075 / 3602-2543, Gisela de Martins Souza Pina, fone (62)8103-0307. Mesmo após o encerramento da pesquisa, você continuará seu acompanhamento de saúde, médico e odontológico.

Garantia de liberdade em participar da pesquisa

Você tem de plena liberdade de se recusar a participar ou retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa, sem nenhum tipo de prejuízo.

Garantia de sigilo

O pesquisador se compromete a manter segredo da sua participação e você será identificado apenas por um número, e de publicar os resultados da pesquisa para a comunidade médica e científica.

Indenização

Você tem direito à indenização conforme as leis vigentes no país, caso ocorra dano decorrente da sua participação na pesquisa.

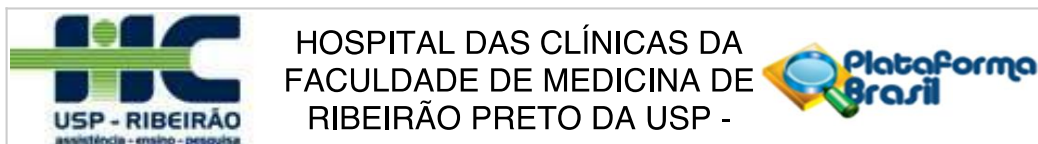
Outros esclarecimentos

Você tem a garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento a que será submetido. O pesquisador tem o compromisso de lhe dar informação atualizada durante o estudo, mesmo que possa afetar sua vontade em continuar participando. **Você receberá uma via deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que será assinado e rubricado em todas as páginas pelo pesquisador e por você.**

Nome do participante _____ assinatura _____ Data _____

Nome do pesquisador _____ assinatura _____ Data _____

ANEXO I- Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DE UMA FORMULAÇÃO MUCO-ADESIVA A BASE DE EXTRATO PADRONIZADO DE PRÓPOLIS (EPP-AF®) COMO ANTI-SÉPTICO

Pesquisador: Erica Negrini Lia

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 39116614.1.1001.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: FINANCIADORA DE ESTUDOS E PROJETOS - FINEP

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.057.529

Data da Relatoria: 01/05/2015

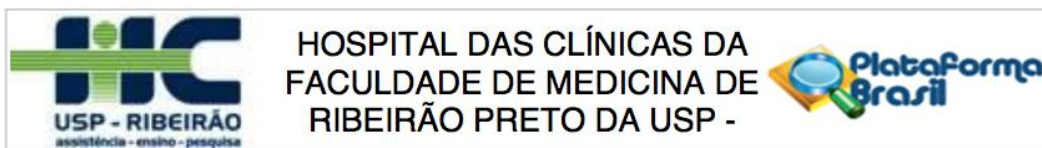
Apresentação do Projeto:

A candidíase é a infecção fúngica muco-cutânea mais comum que ocorre na boca. Em idosos, a forma clínica mais prevalente é a candidose atrófica crônica, também denominada estomatite protética, de etiologia multifatorial. Para seu tratamento preconiza-se a utilização de antifúngicos e cuidados de higiene com a prótese, bem como sua remoção durante o período do sono. Entretanto, há casos de falha terapêutica e de recorrência rápida após a interrupção do tratamento, principalmente se não há implementação conjunta de medidas de higiene com a prótese. Mecanismos de resistência e toxicidade a antifúngicos também são observados. Adicionalmente, o contato do antifúngico com a mucosa é bastante fugaz e há diluição do mesmo pela ação da saliva, o que pode afetar a sua efetividade. Produtos naturais como o própolis tem despertado o interesse como alternativa aos medicamentos sintéticos. Assim, o objetivo deste estudo é testar a eficácia da formulação mucoadesiva contendo o extrato padronizado de própolis (EPP-AF) como antisséptico bucal.

Objetivo da Pesquisa:

Testar a eficácia da formulação muco-adesiva contendo o extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) como antisséptico bucal. OBJETIVOS ESPECÍFICOS: Avaliar a atividade anticândida da formulação mucoadesiva do EPP-AF®; Quantificar e comparar o número de unidades formadoras

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.057.529

de colônias (UFC) de *Candida sp* antes e depois de ambos os tratamentos, com extrato padronizado de própolis (EPP-AF®) e gel oral de miconazol (20mg/g); Avaliar a segurança por meio da taxa de eventos adversos por grupo e por teste de aceitabilidade dos produtos.

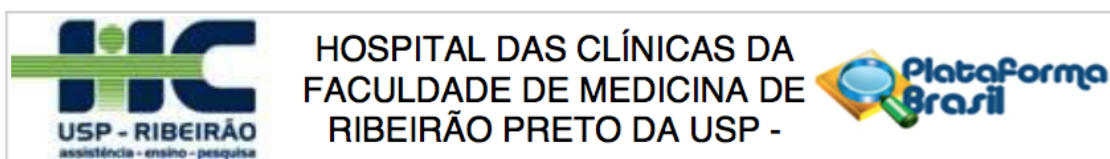
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O principal risco refere-se a potencial ausência de eficácia da própolis, ou a desencadeamento de reações irritativas ou alérgicas no local da aplicação do produto em investigação. Os autores referem que esses riscos são pequenos e haverá uma avaliação odontológica seriada dos voluntários incluídos no estudo. Caso haja eventos adversos, o paciente será excluído do protocolo e tratado com medicamento padrão (miconazol 2%). Os benefícios apontados pelos autores se referem ao conhecimento acerca do estado de saúde bucal, receber o benefício do tratamento e recebimento de orientações de higiene de próteses e de saúde bucal. Ainda, em caso de resistência à resposta ao tratamento tópico, a despeito da boa adesão do paciente ao tratamento e às medidas de higiene, o paciente receberá tratamento com dose única de fluconazol 150mg por via oral.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo multicêntrico nacional, em que o centro coordenador será o HCFMRP-USP. O estudo será randomizado, aberto, de braços paralelos utilizando o gel de miconazol a 2% como tratamento comparador. O Grupo controle será tratado com uso tópico de gel de miconazol a 2% e o Grupo própolis será tratado com o uso tópico com a formulação mucoadesiva contendo extrato padronizado de própolis a 3%. Os pacientes receberão a medicação de acordo com a sua alocação no grupo de estudo, obtido por tabela de aleatorização gerada eletronicamente e serão orientados a aplicar fina camada do gel de miconazol ou borrifar a formulação da própolis sobre mucosa palatina, 3 vezes ao dia, após a realização da higiene bucal, durante 15 dias. Todos os pacientes receberão instrução de higiene de suas próteses e serão orientados a retirar a prótese durante o período do sono. Coleta das amostras biológicas: As amostras serão coletadas como descrito em trabalhos prévios da literatura. As coletas ocorrerão com um período mínimo de uma hora após a última refeição e higiene oral, em 10 mL de solução fisiológica estéril, através de bochecho por 30 segundos. O líquido do bochecho será transferido para tubos estéreis de fundo cônico de 50 mL e armazenados refrigerados entre o momento da coleta, transporte e semeadura nos meios de cultura apropriados. Avaliação da carga fúngica (contagem de Unidades Formadoras de Colônia – UFC). Antes da semeadura as amostras serão concentradas por centrifugação, o sobrenadante será descartado e o precipitado ressuscitado em 1 mL de solução fisiológica, seguido por 6 diluições

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 1.057.529

seriadas na proporção 1:10. Cem microlitros de cada diluição serão semeados em placas contendo os meios de cultura suplementados com cloranfenicol, as quais serão incubadas a 37°C por 48–72 h. As placas que não apresentarem colônias serão incubadas até 120h. As colônias identificadas no meio CHROMagar Candida® serão contadas e a carga fúngica será expressa em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mililitro de lavado oral (UFC/mL). A determinação da carga fúngica será realizada no primeiro dia de avaliação do paciente e no 15º dia após a instituição do tratamento. Para a identificação das principais leveduras e avaliação da sua resistência a medicamentos antifúngicos será utilizado o teste bioquímico CANDIFAST® (International Microbio-France). Por meio da fermentação de açúcares e suscetibilidade a actona, mudanças de cores nos poços do kit permitirão identificar a espécie de levedura. A ausência ou presença de crescimento das leveduras na presença de diferentes antifúngicos como a anfotericina B (4g/mL); nistatina (200 unidades/mL); flucitosina (35g/mL); econazol (16 g/mL); cetoconazol (16 g/mL); miconazol (16 g/mL); fluconazol (16 g/mL) determinar-se-a o padrão de resistência. Para avaliação dos resultados, serão utilizados testes estatísticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Recomendações acatadas.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa v2 14/04/2015, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 3 de 30 de abril de 2015, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

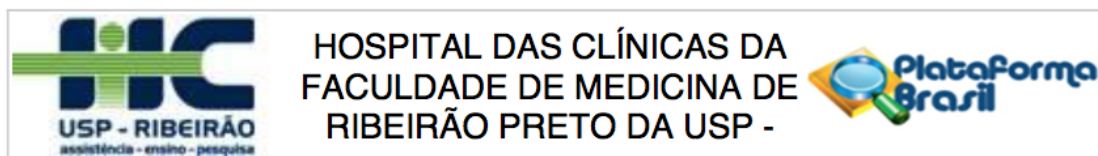
UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DE
RIBEIRÃO PRETO DA USP -

Continuação do Parecer: 1.057.529

RIBEIRAO PRETO, 11 de Maio de 2015

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO II- Normas para Publicação em referido periódico.

Hindawi Publishing Corporation

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine

Normal title part end impact factor part bgn
Impact Factor 1.931

Author Guidelines

Language editing

Hindawi has partnered with Editage to provide an English-language editing service to authors prior to submission. Authors that wish to use this service will receive a 10% discount on all editing services provided by Editage. To find out more information or get a quote, please [click here](#).

Submission

Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online [Manuscript Tracking System](#). Regardless of the source of the word-processing tool, only electronic PDF (.pdf) or Word (.doc, .docx, .rtf) files can be submitted through the MTS. There is no page limit. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication and minimize administrative costs. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. If for some technical reason submission through the MTS is not possible, the author can contact ecam@hindawi.com for support.

Terms of Submission

Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal published by Hindawi or any other publisher. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. It is also the authors' responsibility to ensure that the articles emanating from a particular institution are submitted with the approval of the necessary institution. Only an acknowledgment from the editorial office officially establishes the date of receipt. Further correspondence and proofs will be sent to the author(s) before publication unless otherwise indicated. It is a condition of submission of a paper that the authors permit editing of the paper for readability. All inquiries concerning the publication of accepted papers should be addressed to ecam@hindawi.com.

Peer Review

All manuscripts are subject to peer review and are expected to meet standards of academic excellence. If approved by the editor, submissions will be considered by peer-reviewers, whose identities will remain anonymous to the authors.

Concurrent Submissions

In order to ensure sufficient diversity within the authorship of the journal, authors will be limited to having two manuscripts under review at any point in time. If an author already has two manuscripts under review in the journal, he or she will need to wait until the review process of at least one of these manuscripts is complete before

submitting another manuscript for consideration. This policy does not apply to Editorials or other non-peer reviewed manuscript types.

Article Processing Charges

Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine is an open access journal. Open access charges allow publishers to make the published material available for free to all interested online visitors. For more details about the article processing charges of Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, please visit the [Article Processing Charges](#) information page.

Units of Measurement

Units of measurement should be presented simply and concisely using System International (SI) units.

Title and Authorship Information

The following information should be included

- Paper title
- Full author names
- Full institutional mailing addresses
- Email addresses

Abstract

The manuscript should contain an abstract. The abstract should be self-contained and citation-free and should not exceed 200 words.

Introduction

This section should be succinct, with no subheadings.

Materials and Methods

This part should contain sufficient detail so that all procedures can be repeated. It can be divided into subsections if several methods are described.

Results and Discussion

This section may each be divided by subheadings or may be combined.

Conclusions

This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance.

Acknowledgments

All acknowledgments (if any) should be included at the very end of the paper before the references and may include supporting grants, presentations, and so forth.

References

Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., “as discussed by Smith [9]”; “as discussed elsewhere [9, 10]”). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed.

Preparation of Figures

Upon submission of an article, authors are supposed to include all figures and tables in the PDF file of the manuscript. Figures and tables should not be submitted in separate files. If the article is accepted, authors will be asked to provide the source files of the figures. Each figure should be supplied in a separate electronic file. All figures should be cited in the paper in a consecutive order. Figures should be supplied in either vector art formats (Illustrator, EPS, WMF, FreeHand, CorelDraw, PowerPoint, Excel, etc.) or bitmap formats (Photoshop, TIFF, GIF, JPEG, etc.). Bitmap images should be of 300 dpi resolution at least unless the resolution is intentionally set to a lower level for scientific reasons. If a bitmap image has labels, the image and labels should be embedded in separate layers.

Preparation of Tables

Tables should be cited consecutively in the text. Every table must have a descriptive title and if numerical measurements are given, the units should be included in the column heading. Vertical rules should not be used.

Proofs

Corrected proofs must be returned to the publisher within 2-3 days of receipt. The publisher will do everything possible to ensure prompt publication. It will therefore be appreciated if the manuscripts and figures conform from the outset to the style of the journal.

Copyright

Open Access authors retain the copyrights of their papers, and all open access articles are distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided that the original work is properly cited.

The use of general descriptive names, trade names, trademarks, and so forth in this publication, even if not specifically identified, does not imply that these names are not protected by the relevant laws and regulations.

While the advice and information in this journal are believed to be true and accurate on the date of its going to press, neither the authors, the editors, nor the publisher can accept any legal responsibility for any errors or omissions that may be made. The publisher makes no warranty, express or implied, with respect to the material contained herein.

Disclosure Policy

A competing interest exists when professional judgment concerning the validity of research is influenced by a secondary interest, such as financial gain. We require that our authors reveal any possible conflict of interest in their submitted manuscripts. If there is no conflict of interest, authors should state that "The author(s) declare(s) that there is no conflict of interest regarding the publication of this paper."

ANEXO III- Comprovante de submissão do manuscrito.

Dear Dr. de Paulo Martins,

The Research Article titled "Efficacy of Propolis on the Denture Stomatitis Treatment in Older Adults: A Multicentric Randomized Trial," by Gisela Pina, Erica Lia, Andressa Berreta, Andresa Piacezzi Nascimento, Elina Torres, Andrei Buszinski, Tatiana Amabile de Campos, Eduardo Barbosa Coelho and Vicente de Paulo Martins has been received and assigned the number 8971746.

All authors will receive a copy of all the correspondences regarding this manuscript.

Thank you for submitting your work to Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.

Best regards,

Engy Shaker
Editorial Office
Hindawi Publishing Corporation
<http://www.hindawi.com>

ANEXO IV- Manuscrito submetido ao referido periódico.

Journal: Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Qualis Capes: A2 Interdisciplinar; B1 Odontologia.
Fator de Impacto: 1,931

Efficacy of Propolis on the Denture Stomatitis Treatment in Older Adults: A Multicentric Randomized Trial

Gisela de M.S. Pina^{1,2}, Erica N. Lia², Andresa A. Berreta³, Andresa P. Nascimento³, Elina C. Torres³, Andrei F.M. Buszinski³, Eduardo B. Coelho^{4*}, Vicente de P. Martins²

¹Unievangélica University Center, Anápolis, Brazil.

²University of Brasilia-UnB, Brasília, Brazil.

³Laboratory of Research, Development and Innovation, Apis Flora Indl. Coml. Ltda.

⁴University of São Paulo-USP, Ribeirão Preto, Brazil.

*corresponding author (ebcoelho@fmrp.usp.br)

Abstract

Our hypothesis tested the efficacy and safety of a formulation of Brazilian propolis extract gel compared to miconazole oral gel for the treatment of denture stomatitis due *Candida* spp infection in older adults. Forty patients were randomly allocated in a non-inferiority clinical trial into two groups. The control group (MIC) received 20 mg/g miconazole oral gel and the study group (PROP) received mucoadhesive formulation containing standardized extract of 2%(20 mg/g) propolis (EPP-AF®) during 14 days. Patients were examined on days 1, 7 and 14. The Newton's score was used to assess the denture stomatitis. The colony forming unity count (CFU/mL) was quantified and identified (CHROMagar *Candida*®) before and after the treatment. Baseline characteristics did not differ between groups. Both treatments reduced Newton's score (P <0.0001), indicating clinical improvement of the symptoms of candidiasis with clinical cure rate of 70%. The microbiological cure with significant reduction in fungal burden on T14 was 70% in the miconazole group and 25% in the EPP-AF® group. The EPP-AF® appears to be non-inferior to miconazole considering the clinical cure rate and could be recommended as an alternative treatment in older patients.

Key words: *Candida*; propolis; stomatitis,denture; clinical trial.

Introduction

Candidiasis is the most common fungal infection that occurs in the mouth [1, 2]. The microorganisms involved belongs to the genus *Candida sp*, and the species most commonly found at sites of infection is *Candida albicans*. However, less frequently it is found other species, such as *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. guilliermondii* and *C. dubliniensis* [2, 3]. *Candida sp* is a commensal organism and its transformation into opportunistic pathogen occurs due to fungal pathogenicity mechanisms such as epithelial adherence, morphogenesis, production of hydrolytic enzymes and phenotypic changes. The immune defense of the host and local defense response are actively involved in the resistance to the fungus pathogenic mechanisms and the development and progress of infection [3, 4]. Thus, immunosuppression, (HIV infection, corticosteroid therapy, chemotherapy), diabetes, premature birth, prolonged use of antibiotics, associated with local factors such as hyposalivation, use of inhaled corticosteroids, poor oral hygiene and continuous use of removable dentures (RD), predispose to the occurrence of oral candidiasis [1].

Among the various clinical forms, there is chronic atrophic candidiasis, known as denture stomatitis, which is characterized by erythematous lesions located mainly in the upper palate, which contact the denture base. The prevalence of the disease among top RD users presented by the literature is 58-88% [1, 2, 5]. The presence of cracks or porosities in the acrylic resin of which are made the prosthesis serve as fungus reservoirs [1, 2, 6, 7].

Denture stomatitis is treated with antifungals (miconazole, nystatin, fluconazole), but studies show cases of treatment failure and rapid recurrence after discontinuation of treatment especially if not accompanied by proper hygiene of the prosthesis [8]. Resistance mechanisms to these drugs and antifungal toxicity for these patients are also observed [6, 9–11]. Thus, natural products such as propolis, is gaining prominence. This product is a resinous substance derived from exudates of Brazilian biodiversity, mixed with floral sap, salivary secretions of bees, wax and pollen.

In previous studies, the standardized extract of propolis (EPP-AF®) had demonstrated its safety where it has determined that it is not a cytotoxic product or has mutagenic potential orally or topically [12, 13], as well as having anti -

inflammatory [13, 14], antiulcer [15], wound healing and antimicrobial [16, 17] and fungicidal activities [11, 18–21]. Its properties justify the hypothesis to be used as topical treatment of denture stomatitis. The therapeutic effect of alcoholic extract of propolis 20% in patients with denture stomatitis was evaluated in another study, in which there was regression of the lesion in all treated patients, Nystatin used as positive control [20]. However, the ethanol used as solvent may irritate the oral mucosa, and does not have mucoadhesive characteristic. Other studies with EPP - AF[®] in vitro models for anti-*Candida* activity found that the alcoholic extract at a concentration of 1% was enough to eliminate 10⁶ cells/ml [22]. The efficacy of propolis gel were demonstrated and compared to the use of miconazole oral gel in clinical studies [19, 23].

Thus, the objective of the study was to test the efficacy and evaluate the safety, acceptability and anti-*Candida* activity of the EPP-AF[®] mucoadhesive formulation compared to miconazole oral gel (20mg/g) through the quantification and identification of isolated *Candida* species of mucosa of the population studied before and after treatments.

Materials and Methods

1- Trial design

This is a multicenter, randomized open-label, parallel arm trial. The randomization of the study participants in the study groups was done by the electronic generation by the site (<http://www.graphpad.com/quickcalcs>, GraphPad Software, Inc).

This study was approved by the Human Research Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of the Medical School of Ribeirão Preto of the University of São Paulo (protocol 1,057,529) and registered in the Clinical Trials (NCT02818803).

2- Participants

Patients were enrolled in the University of Anápolis (UniEvangelica) and the Family Health Center of the Hospital das Clínicas of the Medical School of Ribeirão Preto, University of São Paulo (HCFMRP- USP) between the months of January and

June 2016. The inclusion criteria were age over 60 years, being a user of RD superior and presenting prosthetic stomatitis. Exclusion criteria were presence of dementia and use of antibiotics and/or antifungals in the last 2 months. The volunteers agreeing to participate in the study signed the informed consent form.

3- Interventions

The volunteers were randomly assigned to 2 groups, the control group (MIC) treated with oral gel containing 20 mg / g miconazole and the propolis group (PROP) treated with a mucoadhesive formulation containing gel with EPP-AF® propolis standard extract 2 %. The ingredients of the formulation were standardized extract of propolis (EPP-AF®) sorbitol, pectin (polymer) potassium sorbate (preservative), ascorbic acid (acidulant), sweeteners (xylitol and sucralose), aromas (menthol and vanilla) And purified water. EPP-AF® was produced and supplied by Apis Flora Industrial e Comercial Ltda (Ribeirão Preto, SP). The extract was standardized using a crude propolis composition obtained from several regions of Brazil, with a predominance of green propolis originating from *Baccharis dracunculifolia* (patent number 0405483-0).

The volunteers were instructed to perform oral and prosthesis hygiene, sprinkle the prosthesis base with 0.12% chlorhexidine digluconate solution, remove the excess and apply thin layer of miconazole oral gel 20 mg/g, or gel with EPP-AF ® on the inner surface of the prosthesis 3 times a day for 14 days. All patients were instructed in oral hygiene, prosthetic maintenance and medication application, and were instructed to remove the prosthesis during the sleep period and to accommodate in a container with water. Patients received a pre-weighed gel tube, a 0.12% chlorhexidine vial, and written instructions for use

4- Collection of socio-demographic data, medical history and habits

Demographic data and medical history were collected by means of anamnesis on the first day (T0). The volunteers were asked about the prosthesis time of use, habits, frequency and products used for oral hygiene and prosthesis, also about the habit of sleeping with the prosthesis.

5- Clinical evaluation of denture stomatitis

Patients underwent intraoral examination on the first day of evaluation (T0), and the classification proposed by NEWTON [24] was used to evaluate denture stomatitis, divided into type I (localized inflammation or points of hemorrhagic petechiae); Type II (more diffuse erythema involving part or all of the area covered by the prosthesis); Type III (erythema associated with papillary hyperplasia in the area covered by the prosthesis). The patients were reexamined after 7 (T7) and 14 (T14) days of treatment.

6- Evaluation of the fungal burden

The mouthwash samples were collected with 20 mL of 0.9% sodium chloride solution for 20 seconds at days 1 and 14, dispensed in sterile tube and refrigerated conditioned until laboratory processing. The collections followed protocol from previous studies [25–28].

In the laboratory the samples were centrifuged for 15 minutes at 25°C at 3000 x g, discarded the supernatant and resuspended in 1 mL of 0.9% sodium chloride solution. The first dilution of each sample was made in 0.9 mL of 0.9% sodium chloride solution and 0.1 mL of the initial sample, which was 10^{-1} (1:10). The second dilution was made by collecting 0.1 mL of the previous dilution (10^{-1}) in 0.9 mL of 0.9% sodium chloride solution, 10^{-2} (1: 100). One hundred μ l of the samples were seeded by spreading on sterile plates containing the Sabouraud dextrose agar (SDA) culture medium (Difco, Detroit, MI, USA) which was prepared according to the manufacturers instructions and added with 5 mL chloramphenicol 0.1 g / ML to 1,000 mL of the medium. A fourth plaque was seeded by exhaustion in CHROMagar *Candida*® medium (CHROMagar Company, Paris, France) for identification of the species, and stored in a 37°C stove for 48h. Then the CFU/mL count and identification of the *Candida* species were made for comparison at the beginning and end of the treatment and comparison between the groups.

7- Evaluation of adherence to treatment

The miconazole and EPP-AFA® tubes were weighed before, on day 7 (T7) and at the end of the study protocol (T 14).

Patients who consumed more than 5 g of the product during treatment were considered as adherents.

8- Safety evaluation and product acceptability analysis

Adverse events reported by volunteers were noted. The 7-point Hedonic scale, adapted from DUTCOSKY [29], was used to analyze the acceptability of the products used, the gel containing EPP-AF and the commercial product miconazole.

9- Statistical Analysis

The sample size was determined according to the formula described by CHOW et al. [30] for studies of parallel 2-arm design with dichotomous outcome. The calculation was made considering the clinical response rate with inferiority margin of 10%, alpha 0.05 and power of 0.80 and abandonment rate of 15%, resulting in 20 patients per group. Data analysis was done by intention to treat.

The primary outcome was fairness in the clinical cure rate, and for the secondary outcomes the fungal burden reduction rate was considered to be > 50% of the pre-treatment value, the combined clinical and microbiological cure rate, and the acceptability of the products in test. The significance level considered was $p < 0.05$. The quantitative data (age, product intake, time of RD use and fungal burden) were compared by the Student t test with Welch correction. For the gender, Fisher's exact test was performed and for hygiene frequency, the Mann-Whitney test. The clinical evolution of the lesions was measured by the Newton score and compared by the Friedman test with Dunn post-test, and the reduction of CFU/mL after logarithmic transformation was analyzed by ANOVA for repeated measurements. Clinical and microbiological outcomes were analyzed by Fisher's exact test. The acceptability of the product was compared by the Mann-Whitney test. Descriptive statistics were used for the distribution of *Candida* species.

Results

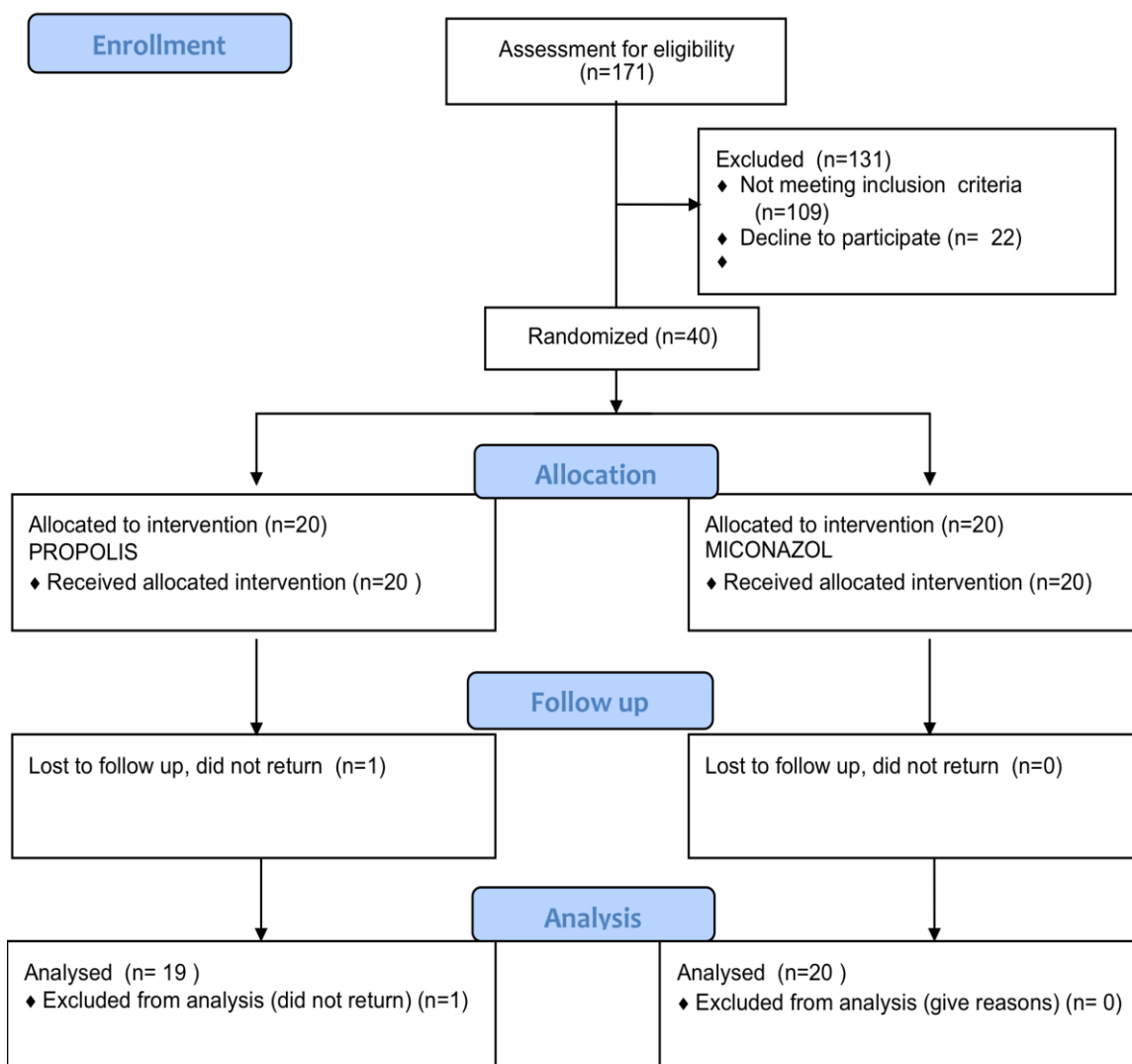


Figure 1. CONSORT flowchart

Patients were recruited and examined from January to June 2016. The CONSORT flowchart is shown in Figure 1. Table 1 summarizes group

characteristics, lesion classification, and fungal load. The groups were formed with female predominance, with no significant differences between the other characteristics.

Ninety-five percent of the volunteers reported sleeping with the dentures during nocturnal sleep.

Table 1. Baseline characteristics of the study groups, classification of palatine lesions and initial fungal burden

Variable	MIC (n=20)	PROP (n=20)	P Value
Age (years)	73±9	73±7	0,98
Gender (F %)	80	90	0,66
RD : time of use (years)	30±13	35±11	0,20
Current: RD time of use (years)	11±9	15±15	0,23
Frequency of RD hygiene (times/day)	3 (2-3)	3 (3-3)	0,31
Newton's score (T0)	2 (1-2)	2 (1-2)	0,98
Amount of gel (g)	17±13	20±17	0,55
Unity count (Log CFU/mL) T0	3,7±1,6	3,3±1,6	0,44

Data expressed as mean (median) and SD (range 25 to 75% range).

Figure 2 shows the clinical evolution represented by the Newton's classification, and the microbiological evolution, as measured by the count of colony forming units. The majority of patients presented remission of the lesions during the 14 days of treatment, with a clinical cure rate of 70% for both groups. The MIC group, but not the PROP group, presented a significant reduction of the CFU/mL count ($p = 0.01$) in T14.

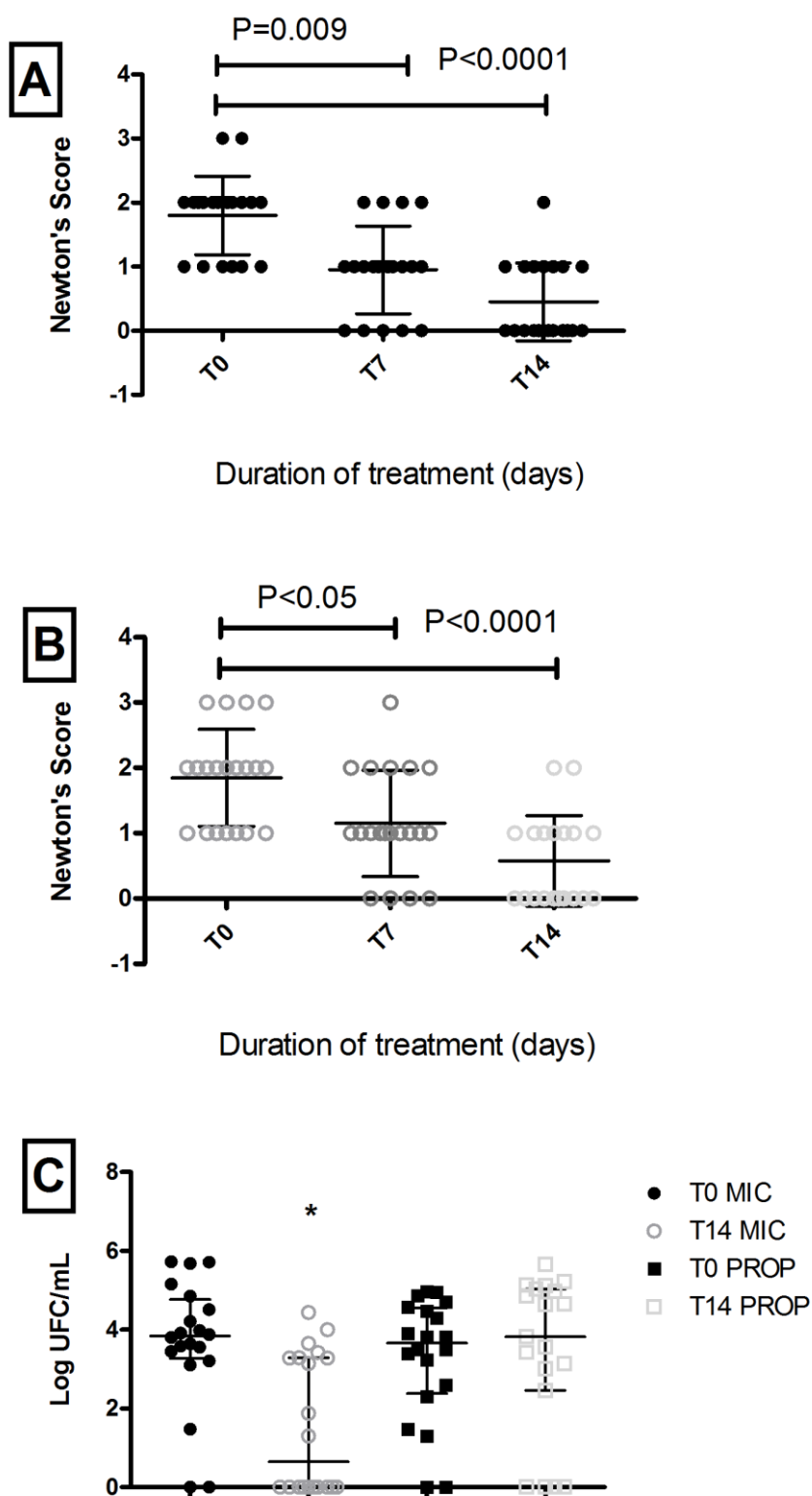


FIGURE 2- A and B. Clinical evolution measured by Newton's classification (A, miconazole and B, EPP-AF®). C. Microbiological evolution measured by colony forming units CFU/mL (C). A and B: Friedman test with Dunn post-test (C) ANOVA test. The bars represent the median. CI = 95% * $P < 0.05$

The clinical and microbiological outcomes are shown in Figure 3. Both groups showed clinical cure of the lesions in 14 patients in T14. About 14 patients in the MIC group presented reduction of the fungal burden, with microbiological cure, against 5 patients of the PROP group at T14.

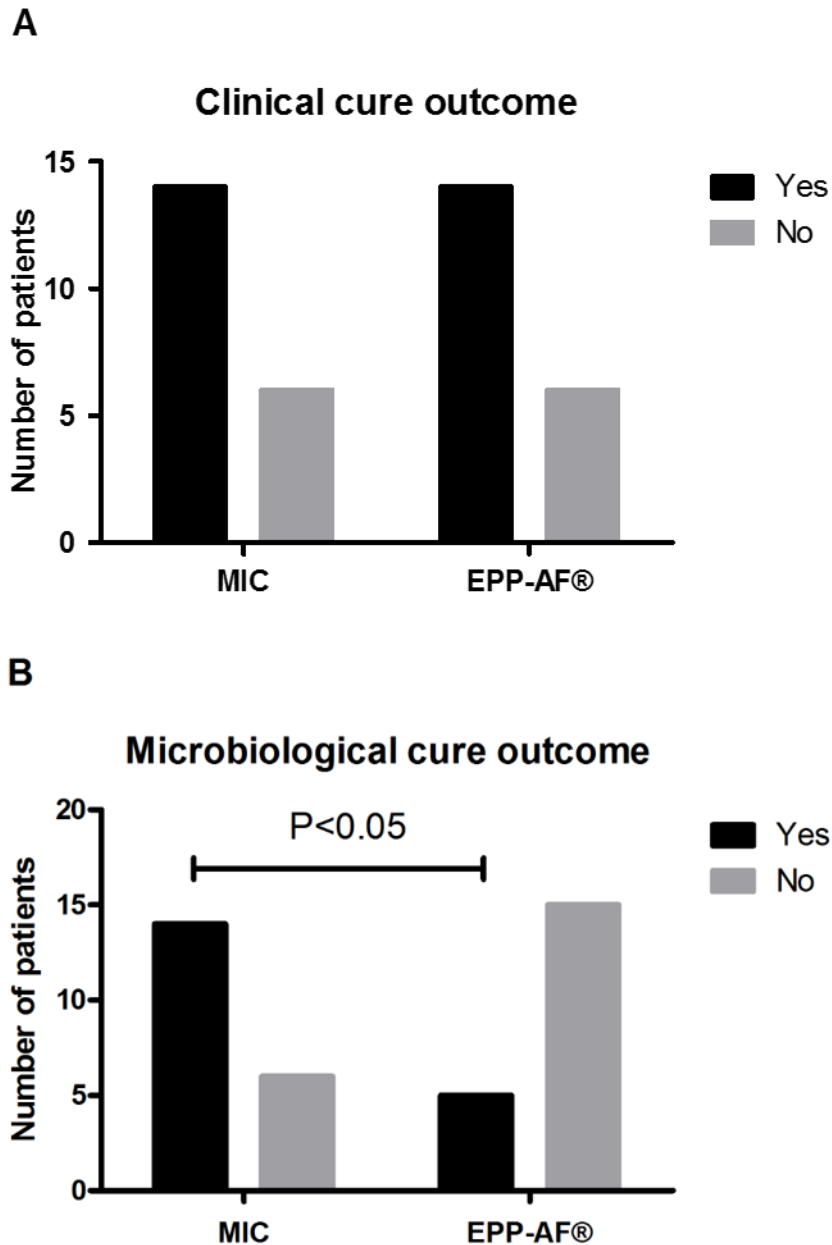


Figure 3. (A) Clinical and (B) microbiological outcomes. The bar chart compares the clinical outcome (A) of the two groups by the clinical improvement observed by Newton's classification and microbiological outcome (B) by the reduction of CFU / mL. (A) (B) Fischer's exact test. * $P < 0.05$. $P = 0.02$.

In both groups, there was high acceptability to the products used. Ninety-five percent of patients in the PROP group reported having great or very high taste, compared to 70% in the MIC group. Only 5% of the MIC group classified the drug among the scores 1-3 of the hedonic scale, and no patient in the PROP group rated it within this score range.

In PROP group, one patient reported burning sensation during application and no adverse effects were reported by the participants in the other group.

Identification of the *Candida* species was performed by the CHROMagar *Candida*®. The most prevalent species were *C. albicans* in 90% of the MIC group and 85% of the propolis group. Species suggestive of *C. glabrata* or *C. parapsilosis* were present in 45% of patients in the MIC group and 40% in the PROP group. *Candida tropicalis* appeared in 45% of the PROP group and 20% of the MIC group. Only one patient in each group presented the species *C. krusei*. Isolation cultures of a single species were observed in 55% and 40% of patients in the MIC and PROP groups respectively. And cultures with two and three species appear in the MIC group in 30% and 15% and in the PROP group in 40% and 20% in the T0, and in the MIC T14 group, only 5% of the patients had multiple cultures. In the last examination for the PROP group, a reduction of 5% of patients with two or three *Candida* species was observed.

Discussion

Of the 171 patients examined, 131 were excluded because they did not present lesions characteristic of candidiasis or did not meet the inclusion criteria of the minimum age. Of the 40 patients analyzed, 85% were female. This data corroborates the literature showing a higher prevalence of prosthetic stomatitis among women [8, 21, 28], possibly due to women's increased demand for treatment. All 5 male volunteers had time to use a prosthesis over 20 years old and slept with a prosthesis. A hormonal factor may be associated with female predominance, Golecka-Bakowska and colleagues found that middle-aged women using hormonal supplements and removable total dentures are more prone to the development of oral candidiasis associated with prosthesis use [31].

The analyzed variables are directly related to the increased risk of prosthetic stomatitis. The mean time of use of the current PTRs was 11 ± 9 years for the MIC group and 15 ± 15 years for the PROP group. Although there is no consensus in the current literature regarding the time limit for the use of the same RD [32], there is a significant relationship between the time of use of prosthesis and oral candidiasis. In a study to evaluate the time of use and quality of PTRs [33], they concluded that the time of use influences the overall quality of the prostheses, but it is difficult to generalize the useful life in a period of 1 to 10 years.

It is known that in addition to adhering to oral structures, *Candida* sp species also colonize the irregularities present in the acrylic structure of the prosthesis [2, 8, 28, 34]. Of the forty participants in the study in question, thirty-eight patients reported sleeping with the dentures. This habit is harmful because the contact of the contaminated surface of the denture with the palatal mucosa is continuous, favoring the reduction of salivary flow and the development of denture stomatitis [2, 8, 35–37]. Studies show that only the drug treatment of the patient is not effective, and disinfection of the denture surface is necessary. The association of mechanical method, brushing, and chemical method, astringent solutions and detergents is described as more effective in cleaning and reducing microorganisms [8, 36, 38, 39]. The 0.12% chlorhexidine digluconate spray was used in order to disinfect the prosthesis in order to avoid recontamination by the adhered microorganisms. Chlorhexidine has already published in the literature its antimicrobial potential in biofilm removal and prevention of colonization of *Candida albicans* [21, 35, 40, 41] but its activity depends on a time of action greater than 30 minutes [41]. Some studies point to an improvement in the appearance of the patient's mucosa with prosthetic stomatitis after topical use of chlorhexidine [42, 43]. However, even a short time of exposure to the antiseptic may cause interference in the interpretation of clinical improvement of the lesions.

Regarding the prevalence of species, our finding corroborates several studies in the literature that point to *Candida albicans* as the main etiological agent of prosthetic stomatitis [2, 21, 28, 35, 44–46].

Previous studies in in vitro and in vivo models have demonstrated the absence of cytotoxic and mutagenic potential of propolis gel [12, 22]. Based on these previous studies, the composition used in the present study was determined. The product was formulated with 2.85x the fungicidal concentration obtained in the anti-*Candida*

albicans model in vitro, which was 0.7% (7.0 mg/g). Histopathological studies were performed demonstrating that up to 3.6% of propolis did not cause an inflammatory or irritant process [17].

In the present study, the anti-inflammatory and healing action of the formulation based on the propolis extract overlapped the antifungal action, considering that there was a clinical cure, but without reducing the fungal load. The anti-inflammatory action was attributed to the clinical improvement of the lesions. These findings corroborate the research by BERRETTA et al. [17], who evaluated the healing action of propolis gel on wounds in the epithelium of rats and concluded that concentrations of 2.4% and 3.6% were effective for tissue reconstitution. Other authors demonstrated antifungal activity of propolis, even in small concentrations, and concluded that the antifungal effect was directly proportional to the concentration of propolis used. In our study, the concentration of propolis of 2% was used, incapable of provoking irritant changes to the mucosa; Yet the reduction of CFUs was not satisfactory [47]. Therefore, it may be questioned whether the time of treatment or use of higher concentrations could interfere with the antifungal action. Capistrano et al [19] obtained clinical improvement in prosthetic stomatitis lesions, but without total remission of the lesions in all patients, in a study with methodology similar to the present study.

We can score interesting advantages in a natural product with anti-inflammatory, healing and clinical improvement capacity of denture stomatitis when compared to an anti-fungal drug. *Candida* is a commensal microorganism present in most of the population, so we should consider that its elimination possibly causes an imbalance of the oral microbiota. No pattern was observed between CFU reduction and clinical improvement of prosthetic stomatitis. Patients with high number of colonies presented clinical regression of the lesion, as well as some patients who showed small inflammatory regression, presented a reduction in the number of CFUs. One hypothesis could involve the propolis' ability to act on the dimorphism of *Candida albicans* between the pseudohyphas and hyphae forms in yeasts, the latter being non-pathogenic. It is known that this change may be related to the virulence and pathogenicity of the fungus [3, 48–50] with the pseudohyphas and hyphae being the pathogenic morphotypes. Propolis may cause a change in the phenotype of the fungus without necessarily reducing it quantitatively. In prospects for further studies, the relationship between the clinical improvement of prosthetic stomatitis lesion by

EPP-AF® treatment and the change in fungus phenotype. Another thing to keep in mind is that propolis also has anti-inflammatory action via the immune system [14] and that candidiasis is triggered, among other possible factors, by an imbalance of this response (immunosuppression) that favors the dimorphic transition to The pathogenic form [1]. Thus, if propolis is acting in the balance of the immune response, it is possible that as a consequence *Candida* transits to the non-pathogenic morphotype, that is, it is not possible to know from the data available at the time, if the propolis is acting directly on The causative agent or the host's immune response, a response that will be studied in the future. In any case, the remission of clinical symptomatology without the imbalance of the microbiological flora is a very interesting and positive fact.

Acceptability of the product is important for patient adherence to treatment. The non-adherent patient may have difficulties in maintaining dosage and may suffer from inadequate exposure to antifungal, adverse effects [51], risk of drug interactions [52–54] and microorganism resistance, commonly observed in azole antifungals [10, 11, 55]. Miconazole acts by altering the permeability of the cell membrane, and is considered the antifungal of choice for topical treatment of denture stomatitis in healthy patients. However, its recurrent use may cause resistance of *Candida* species to miconazole in elderly patients with denture stomatitis [10, 56]. Results of a meta-analysis showed that miconazole showed greater clinical efficacy for the treatment of denture stomatitis compared to natural substances, including propolis [51]. However, in our study, clinical improvement was similar between the two products. Miconazole, in spite of its topical action, may be sufficiently absorbed to the point of interacting with other drugs. There are reports of interaction with the anticoagulant warfarin, in addition to antidepressants, antihistamines, immunosuppressants, antiepileptics, which may present a risk of interaction with Miconazole oral gel [52, 53]. The authors still caution against the consideration of interactions between drugs by dental surgeons prior to prescriptions.

Some studies indicate that patients exposed to risk factors and with recurrent candidiasis should be treated with antifungals with lower potential for developing resistance in microorganisms [6, 37], regarding this issue, propolis demonstrated antifungal action by at least three mechanisms of action in the model of deletion strains of *S. cerevisiae* [18, 57] and in *C. albicans* [58], making it difficult to develop microbiological resistance. Thus, the data herein have shown that an action in the

present pathology by an anti-inflammatory and cicatrizing action, and not antifungal, the risk of resistance using EPP-AF®, would be discarded. Elderly are a target audience for the development of repetitive denture stomatitis, due to the high rate of use of removable dentures, therefore, the ideal treatment are effective alternatives and with minimal risk, offering greater safety.

Conclusion

The present study is a clinical trial performed in elderly patients with prosthetic stomatitis to evaluate the efficacy of a new mucoadhesive formulation based on propolis extract. Propolis has proven effective in reducing symptoms and lesions, presenting, in this study population, greater anti-inflammatory efficacy and healing than antifungal. For future studies, it is suggested the microbiological evaluation of phenotypic and genotypic characteristics as possible correlations between *Candida* species and the degree of clinical improvement of the lesions.

Conflict of interests

The project was funded by the Financier of Studies and Projects-FINEP CNPJ 33,749,086 / 0002-90 and authors declare no conflict of interest.

Supporting

The project was financed by the Financier of studies and projects (FINEP), process n. 01.12.0040.01 and n. 03.12.0056.01, CNPJ 33.749.086 / 0002-90 and by the Foundation for Research Support of the State of São Paulo, PIPE Program (FAPESP), through process no. 2013 / 50492-2.

Acknowledgments

We thank the company Apis Flora for the production of the mucoadhesive gel containing Standardized Extract of Propolis (EPP-AF®), the Foundation for Support, Research and Assistance (FAEPA) of HCMRP-USP.

References

- [1] P. J. Giannini and K. V. Shetty, "Diagnosis and management of oral candidiasis," *Otolaryngol. Clin. North Am.*, vol. 44, no. 1, pp. 231–240, 2011.
- [2] A. Akpan and R. Morgan, "Oral Candidiasis," *Postgrad. Med. J.*, vol. 78, no. 922, pp. 455–459, 2002.
- [3] J. A. M. S. Jayatilake, "A Review of the Ultrastructural Features of Superficial Candidiasis," *Mycopathologia*, vol. 171, no. 4, pp. 235–250, 2011.
- [4] L. Samaranayake, "Commensal oral Candida in Asian cohorts.," *Int. J. Oral Sci.*, vol. 1, no. 1, pp. 2–5, 2009.
- [5] J. B. Freitas, R. S. Gomez, M. H. N. G. De Abreu, and E. Ferreira E Ferreira, "Relationship between the use of full dentures and mucosal alterations among elderly Brazilians," *J. Oral Rehabil.*, vol. 35, no. 5, pp. 370–374, 2008.
- [6] G. Ramage, K. Tomsett, B. L. Wickes, J. L. López-Ribot, and S. W. Redding, "Denture stomatitis: A role for Candida biofilms," *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 98, no. 1, pp. 53–59, 2004.
- [7] Y. Kulak, A. Arian, and N. Delibalta, "Comparison of three different treatment methods for generalized denture stomatitis," *Thale J. Prosthet. Dent.*, vol. 72, pp. 283–288, 1994.
- [8] L. Gendreau and Z. G. Loewy, "Epidemiology and Etiology of Denture Stomatitis," *J. Prosthodont.*, vol. 20, no. 4, pp. 251–260, 2011.
- [9] A. R. Casaroto and V. S. Lara, "Phytomedicines for Candida-associated denture stomatitis," *Fitoterapia*, vol. 81, no. 5, pp. 323–328, 2010.
- [10] H. Lamfon, S. R. Porter, M. McCullough, and J. Pratten, "Susceptibility of Candida albicans biofilms grown in a constant depth film fermentor to chlorhexidine, fluconazole and miconazole: A longitudinal study," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 53, no. 2, pp. 383–385, 2004.
- [11] A. B. S. Siqueira, L. R. N. de A. Rodriguez, R. K. B. Santos, et al., "Antifungal activity of propolis against Candida species isolated from cases of chronic periodontitis.," *Braz. Oral Res.*, vol. 29, no. 1, pp. 1–6, 2015.
- [12] J. M. Senedese, A. R. Rodrigues, M. A. Furtado, et al., "Assessment of the mutagenic activity of extracts of Brazilian propolis in topical pharmaceutical formulations on mammalian cells in vitro and in vivo," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2011, no. Poloxamer 407, 2011.
- [13] C. M. F. Reis, J. C. T. . Carvalho, K. C. M. . Caputo, L.R.G.; Patricio, M. V. J. . Barbosa, and J. K. Chieff, A.L., BaSTOS, "Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis.Pdf." pp. 43–52, 2000.
- [14] J. L. Machado, A. K. M. Assunção, M. C. P. Da Silva, et al., "Brazilian green propolis: Anti-inflammatory property by an immunomodulatory activity," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, 2012.
- [15] M. P. de Barros, J. P. B. Sousa, J. K. Bastos, and S. F. de Andrade, "Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats," *J. Ethnopharmacol.*, vol. 110, no. 3, pp. 567–571, 2007.
- [16] B. A. Rocha, M. R. Rodrigues, P. C. P. Bueno, et al., "Preparation and thermal characterization of inclusion complex of Brazilian green propolis and hydroxypropyl- β -cyclodextrin: Increased water solubility of the chemical constituents and antioxidant activity," *J. Therm. Anal. Calorim.*, vol. 108, no. 1, pp. 87–94, 2012.

- [17] A. A. Berretta, A. P. Nascimento, P. C. P. Bueno, M. M. de O. L. Leite Vaz, and J. M. Marchetti, "Propolis standardized extract (EPP-AF®), an innovative chemically and biologically reproducible pharmaceutical compound for treating wounds," *Int. J. Biol. Sci.*, vol. 8, no. 4, pp. 512–521, 2012.
- [18] P. A. de Castro, M. Savoldi, D. Bonatto, et al., "Molecular characterization of propolis-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*," *Eukaryot. Cell*, vol. 10, no. 3, pp. 398–411, 2011.
- [19] H. M. Capistrano, E. M. De Assis, R. M. Leal, et al., "Brazilian green propolis compared to miconazole gel in the treatment of *Candida* -associated denture stomatitis," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, vol. 2013, 2013.
- [20] V. R. Santos, F. J. G. S. Pimenta, M. C. F. Aguiar, et al., "Oral candidiasis treatment with Brazilian ethanol propolis extract," *Phyther. Res.*, vol. 19, no. 7, pp. 652–654, 2005.
- [21] R. V. P. Azevedo, M. C. Komesu, R. C. Candido, C. Salvetti, and F. H. C. Rezende, "*Candida* sp in the oral cavity with and without lesions: Maximal inhibitory dilution of propolis and periogard," *Rev. Microbiol.*, vol. 30, no. 4, pp. 335–341, 1999.
- [22] A. A. Berretta, P. A. De Castro, A. H. Cavalheiro, et al., "Evaluation of mucoadhesive gels with propolis (EPP-AF) in preclinical treatment of candidiasis vulvovaginal infection," *Evidence-based Complement. Altern. Med.*, 2013.
- [23] V. R. Santos, R. T. Gomes, R. A. Mesquita, et al., "Efficacy of Brazilian Propolis Gel for the Management of Denture Stomatitis: a Pilot Study," *Phytother. Res.*, 2008.
- [24] A. Newton, "Denture sore mouth: a possible aetiology.," *Br Dent J*, vol. 112, pp. 357–360, 1962.
- [25] S. B. Raju and S. Rajappa, "Isolation and identification of *Candida* from the oral cavity.," *ISRN Dent.*, vol. 2011, no. Table 2, p. 487921, 2011.
- [26] J. S. R. Godoy, P. de Souza Bonfim-Mendonça, S. S. Nakamura, et al., "Colonization of the oral cavity by yeasts in patients with chronic renal failure undergoing hemodialysis.," *J. Oral Pathol. Med.*, vol. 42, no. 3, pp. 229–34, 2013.
- [27] L. P. Samaranayake, T. W. MacFarlane, P. J. Lamey, and M. M. Ferguson, "A comparison of oral rinse and imprint sampling techniques for the detection of yeast, coliform and *Staphylococcus aureus* carriage in the oral cavity.," *J. Oral Pathol.*, vol. 15, no. 7, pp. 386–388, 1986.
- [28] C. M. P. de C. Bianchi, H. A. Bianchi, T. Tadano, et al., "Factors related to oral candidiasis in elderly users and non-users of removable dental prostheses," *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, vol. 58, no. 3, pp. 6–10, 2016.
- [29] S. Dutcoscky, *Análise sensorial de alimentos*, 2nd ed. Curitiba, 2007.
- [30] S. CHOW, J. SHAO, and H. WANG, *Sample size calculations in clinical research*, 1st ed. New York, 2003.
- [31] M. Golecka-Bychawska, E. Mierzwinska-Nastalska, and M. Bychawska, "Influence of Hormone supplementation therapy on the incidence of denture stomatitis and on chemiluminescent activity of polymorphonuclear granulocytes in blood of menopausal -aged women.," *Eur. J. Med. Res.*, vol. 15, pp. 46–49, 2010.
- [32] P. M. Ribeiro, C. Y. Kogaito, J. C. Junqueira, and A. O. C. Jorge, "Isolamento de *Candida* spp. com utilização de meio de cultura cromogênico CHROMagar *Candida*," *Braz Dent Sci*, vol. 12, no. 4, pp. 40–45, 2009.

- [33] J. Cabrini, L. Fais, M. Compagnoni, F. Mollo Júnior, and L. Pinelli, “Tempo de uso e a qualidade das próteses totais – uma análise crítica Wear time and the quality of the complete dentures – a critical analysis Laiza Maria Grassi FAIS Marco Antonio COMPAGNONI Lígia Antunes Pereira PINELLI,” *Cienc Odontol Bras.*, vol. 11, no. 2, pp. 78–85, 2008.
- [34] M. Gharechahi, H. Moosavi, and M. Forghani, “Effect of Surface Roughness and Materials Composition,” *J. Biomater. Nanobiotechnol.*, vol. 3, no. 4, pp. 541–546, 2012.
- [35] A. D. Nalbant, A. Kalkanci, B. Filiz, and S. Kustimur, “Effectiveness of different cleaning agents against the colonization of *Candida* spp and the in Vitro detection of the adherence of these yeast cells to denture acrylic surfaces,” *Yonsei Med. J.*, vol. 49, no. 4, pp. 647–654, 2008.
- [36] D. Felton, L. Cooper, I. Duqum, et al., “Evidence-Based Guidelines for the Care and Maintenance of Complete Dentures: A Publication of the American College of Prosthodontists,” *J. Prosthodont.*, vol. 20, no. SUPPL. 1, 2011.
- [37] S. Patil, R. S. Rao, B. Majumdar, and S. Anil, “Clinical appearance of oral *Candida* infection and therapeutic strategies,” *Front. Microbiol.*, vol. 6, no. DEC, pp. 1–10, 2015.
- [38] C. D. de S. Catão, I. N. C. Ramos, J. M. da S. Silva Neto, et al., “Eficiência de substâncias químicas na remoção do biofilme em próteses totais,” *Rev Odontol UNESP*, vol. 36, no. 1, pp. 53–60, 2007.
- [39] L. F. F. Gonçalves, D. R. da S. Neto, R. F. Bonan, et al., “Higienização de Próteses Totais e Parciais Removíveis,” *Rev. Bras. Ciências da Saúde*, vol. 15, no. 1, pp. 87–94, 2011.
- [40] C. G. B. B. R. Rocha, C. Reis, and F. C. Pimenta, “Contagem E Identificação De Microrganismos Na Saliva De Portadores Do Vírus Da Imunodeficiência Humana Antes E Após Higienização E Bochecho Com Anti-Sépticos,” *Rev. Patol. Trop.*, vol. 35, no. 2, pp. 125–133, 2006.
- [41] C. L. Gouveia, I. C. M. Freire, M. L. de A. e S. Leite, et al., “Antifungal activity of components used for decontamination of dental prostheses on the growth of *Candida albicans*,” vol. 43, no. 2, pp. 137–143, 2014.
- [42] S. D. Kazuo, U. Camila, S. Ferreira, et al., “Higienização Em Prótese Parcial Removível,” *Rev. Odontol. da Univ. Cid. São Paulo*, vol. 20, no. 2, pp. 168–4, 2008.
- [43] E. Budtz-Jorgensesn, “Materials and methods for cleaning dentures,” *J. Prosthet. Dent.*, pp. 619–623, 1979.
- [44] V. R. Baddam, S. Bakki, L. P. Kantheti, et al., “Candidal carriage, isolation and species variation in patients undergoing radiotherapy and chemotherapy for head and neck tumours,” *J. Dr. NTR Univ. Heal. Sci.*, vol. 3, no. 1, p. 28, 2014.
- [45] E. Budtz-Jørgensen, “The significance of *Candida albicans* in denture stomatitis,” *Scand. J. Dent. Res.*, vol. 82, no. 2, pp. 151–90, 1974.
- [46] D. P. Leite, M. R. Piva, and P. R. S. Martins-Filho, “Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e à terapia fotodinâmica,” vol. 44, no. 1, pp. 12–17, 2015.
- [47] R. Longhini, S. M. Raksa, A. C. P. Oliveira, T. I. E. Svidzinski, and S. L. Franco, “Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica,” *Brazilian J. Pharmacogn.*, vol. 17, no. 3, pp. 388–395, 2007.
- [48] A. Novák, C. Vágvölgyi, and M. Pesti, “Characterization of *Candida albicans*

- colony-morphology mutants and their hybrids," *Folia Microbiol. (Praha)*., vol. 48, no. 2, pp. 203–209, 2003.
- [49] B. C. Webb, C. J. Thomas, M. D. P. Willcox, D. Harty, and K. W. Knox, "Candida - associated denture stomatitis. Aetiology and management: A review. Part 1. Factors influencing distribution of candida species in the oral cavity," *Aust. Dent. J.*, vol. 43, no. 1, pp. 45–50, 1998.
- [50] D. S. Thompson, P. L. Carlisle, and D. Kadosh, "Coevolution of morphology and virulence in Candida species," *Eukaryot. Cell*, vol. 10, no. 9, pp. 1173–1182, 2011.
- [51] L.-W. Zhang, J.-Y. Fu, H. Hua, and Z.-M. Yan, "Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis," *Oral Dis.*, no. October 2015, pp. 185–95, 2015.
- [52] V. J. C. Lempers, L. C. Martial, M. F. Schreuder, et al., "Drug-interactions of azole antifungals with selected immunosuppressants in transplant patients: strategies for optimal management in clinical practice," *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 24, pp. 38–44, 2015.
- [53] M. N. Pemberton, R. J. Oliver, and E. D. Theaker, "Miconazole oral gel and drug interactions.," *Br. Dent. J.*, vol. 196, no. 9, pp. 529–31, 2004.
- [54] E. Dodds-ashley and D. Pharm, "Management of Drug and Food Interactions with Azole Antifungal Agents in Transplant Recipients," *Pharmacotherapy*, vol. 30, no. 8, 2010.
- [55] M. A. Pfaller, "Antifungal drug resistance: Mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment," *Am. J. Med.*, vol. 125, no. 1 SUPPL., pp. S3–S13, 2012.
- [56] D. Dalazen, D. Zanrosso, L. Wanderley, N. L. Da Silva, and A. M. Fuentefria, "Comparação do perfil de suscetibilidade entre isolados clínicos de Candida spp. orais e vulvovaginais no Sul do Brasil," *J. Bras. Patol. e Med. Lab.*, vol. 47, no. 1, pp. 33–38, 2011.
- [57] P. A. de Castro, M. Savoldi, D. Bonatto, et al., "Transcriptional profiling of *Saccharomyces cerevisiae* exposed to propolis.," *BMC Complement. Altern. Med.*, vol. 12, p. 194, 2012.
- [58] P. A. de Castro, V. L. P. Bom, N. A. Brown, et al., "Identification of the cell targets important for propolis-induced cell death in *Candida albicans*," *Fungal Genet. Biol.*, vol. 60, pp. 74–86, 2013.