View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Qazvin University of Medical Sciences Repository

بررسی آزمایشگاهی تاثیر عصاره الکلی گل انار برقارچ کاندیدا آلبیکنس

دکتر آزاده زینب تی تی دژ[۱]، دکتر صفرعلی علیزاده کوشکوهی[۲]، دکتر عادله آشوری[۳]، دکتر فائزه آزموده[#۱]

۱-استادیار گروه آسیب شناسی دهان، فک و صورت ،مرکز تحقیقات پیشگیری از پوسیدگی دندان،دانشکده دندان پزشکی،دانشگاه علوم پزشکی قزوین،ایران
۲- دانشیار گروه باکتری شناسی، دانشگاه علوم پزشکی قزوین،ایران
۳ – دندانپزشک

وصول مقاله: ۹۹/۴/۱۰ اصلاح نهایی: ۹۹/۵/۱۰ پذیرش مقاله: ۹۹/۵/۲۰

Antifungal activity of the alcholic extracts of Punicagranatum against Candida Albicans (an in vitro study)

Azadehzeinab Titidej [1], Safarali Alizadeh Koshkohi [2], Adeleh Ashoori[3], Faezeh Azmoudeh [1#]

[1] Assistant Prof, Oral & Maxillofacial Dept., Faculty of Dentistry, Qazvin Medical Sciences, Qazvin, Iran
[2] Associate Prof, Bacteriology Dept, Qazvin University of Medical Sciences, ,Qazvin, Iran
[3] Dentist, Private Practice, Qazvin, Iran

Received: June 2020 ; Accepted: August 2020

Abstract

Background & Aim: Oral diseases affect the majority of the population and can affect a person's overall health. It is reported that punicagranutum contain phytomedicinecapabale of suppressing oral pathogens associated with fungal diseases. The aim of this study is the assessement of punicagranutm extract antifungal activity on Candida albicans.

Material and methods: This study was performed in Qazvin University of Medical Sciences in 2019 The70% ethanol extract of punicagranutum was purchased from the Research Institute of Chemical Industry Development and then made in 1- 1/2048 mg/ml concentrations.The antifungal activity of the extractwas examined by determining the MIC (minimum inhibitory concentration) using the Macrobroth dilution method, means macroscopic examination of the test tubes containing serial dilutions of extract and candida albicans to determine the growth or lack of growth of microorganisms through the ¬eye, and MFC (Minimum Fungicidal Concentration) was determined by preparing the subculture of the contents of all of the undeveloped tubes in a MIC experiment in a solid culture. Also, the non-growth aureole diameter with Agar well diffusion method was obtained by preparing wells in a solid culture medium And pouring different dilutions of the extract into it and measuring the non-growth aura's diameter.Data were analyzed using ANOVA, post-hoc tests ($p<0.05$).

Results: Results showed that the ethanol extract of punicagranutumhad inhibitory effect in concentration of $\frac{1}{32}$ mg/ml and fungicidal effect in concentration of $\frac{1}{4}$ mg/ml in which the most of this effect is due to punica granutumbut not theethanol.Also, the mean of maximum non-growth aureole diameter was 21 mm at a concentration of 1 mg / ml.

Conclusions: Comparison of the results of ethanol control group and test group showed that inhibitory and fungicidal effect of hydroalcoholic extract of punicagranutum is not due to Ethanol and the punicagranutum and Ethanol extracts of punicagranutum has antifungal effect on Candida albicans.

Key words: Punicagranutum, Candida Albicans,antifungal activity
 # Corresponding Author: **fa.azmoodeh@gmail.com**
J Res Dent Sci. 2020; 17 (3): 201-207

#، نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر فائزه آزموده تلفن: ۳۳۳۵۳۰۶۲ پست الکترونیک: **fa.azmoodeh@gmail.com**

خلاصه:

سابقه و هدف: بیماری‌های قارچی دهان جمعیت بسیار زیادی را تحت تاثیر قرارمی‌دهند ومی‌توانند بر سلامت عمومی شخص هم تاثیر بگذارند. گزارش شده است که گل انار حاوی ترکیباتی است که توانایی مقابله با بیماری‌های قارچی را دارا می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر عصاره‌ی گل انار بر روی قارچ کاندیداآلبیکنس است.

مواد و روش ها: این مطالعه آزمایشگاهی در سال ۹۸ در دانشگاه علوم پزشکی قزوین انجام گردید.عصاره‌ی اتانولی ۷۰٪ گل انار به صورت آماده از پژوهشکده توسعه صنایع شیمیایی جهاد دانشگاهی خریداری شد و سپس در رقت‌های ۱ تا $\frac{1}{2048}$میلی گرم بر میلی لیترتهیه گردید. فعالیت ضد قارچی عصاره با تعیینMIC (حداقل غلظت مهاری) با استفاده از روش Macrobroth dilution، چشمی، وMFC (حداقل غلظت کشندگی) با استفاده از تهیه کشت از محتویات تمام لوله‌های رشد نیافته در آزمایش MIC در محیط کشت جامد انجام شد. همچنین قطر هاله‌ی عدم رشد با روش Agar well diffusion با تهیه چاهک‌هایی در محیط کشت جامد و ریختن رقت‌های مختلف عصاره در آن و اندازه‌گیری قطر هاله‌ی عدم رشد انجام شد.داده‌ها با استفاده از آزمونهای ANOVA، انجام تست‌های تعقیبی(post-hoc)و Kolmogrov-Smirnov test مورد آنالیز آماری قرار گرفتند ($P<۰/۰۵$)

یافته ها: یافته‌ها نشان دادندکه، عصاره اتانولی گل انار در غلظت یک سی و دوم میلیگرم بر میلی لیتر دارای حداقل غلظت مهاری، و در غلظت یک چهارم میلی گرم بر میلی لیتر دارای حداقل غلظت کشندگی می‌باشد، همچنین میانگین ماکزیمم قطر هاله‌ی عدم رشد معادل ۲۱ میلی‌متر در غلظت 1میلی‌گرم بر میلی لیتر تعیین شد.

نتیجه گیری: مقایسه یافته‌های حاصل از عصاره‌ی گل انار و گروه شاهد اتانولی نشان داد که، اثر مهاری وکشندگی عصاره‌ی هیدرو الکلی گل انار مربوط به اتانول ۷۰ درصد نمی‌باشد وعصاره گل انار به تنهایی دارای اثر کشندگی و مهارکنندگی بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس است.

کلید واژه‌ها: عصاره انار ،قارچ کاندیدا آلبیکنس ، خاصیت ضد قارچی

مقدمه:

کاندیدیازیس دهانی شایعترین عفونت فرصت طلب مخاط دهان است که به دنبال رشد بیش از حد قارچکاندیدا در حفره‌ی دهان ایجاد می‌شود. شایع‌ترین گونه‌ی کاندیدا در ایجاد کاندیدیازیس دهانی، کاندیدا آلبیکنس می‌باشد[۱]. انواع مختلفی ازکاندیدیازیس دهانی وجود دارندکه شامل نوع حاد با غشای کاذب،آتروفیک حاد ،هایپرپلاستیک مزمن،آتروفیک مزمن،median rhomboid glossitisوangular cheilitis است[۲].

داروی انتخابی در موارد استعمال موضعی در حفره دهان نیستاتین و در موارد سیستمیک فلوکونازول است[۳].

درمانهای ضدقارچی با استفاده از داروهای ضدقارچ معمول می‌توانند موجب مقاومت‌های دارویی و عود مکرر عفونت‌های کاندیدیایی شوند[۴].

بنابراین استفاده از راهکارهای مناسب برای جایگزینی داروهای سنتتیکک همشکل همواره مورد توجه بوده است. یکی از این راهکارهای بهره‌گیری از داروهای گیاهی است[۵].

اخیراً انجام مطالعاتی راجع به استفاده ازگیاهان دارویی بعنوان منبع یازعوامل ضد میکروبی و ضدقارچی به طورچشمگیری افزایش پیدا کرده است. گزارش شده است که طیف گستردهای ازعصاره‌ی گیاهان مختلف، دارای فعالیت ضدمیکروبی و ضدقارچی هستند[۶-۹].

انارگیاهی است که سابقه کشت بسیارطولانی دارد. خاستگاه انار ایران وکشورهای همجوار است[۸].

انار به دلیل دارابودن مقادیر زیاد پلی فنل‌ها وآنتی اکسیدان ها دارای خاصیت ضدمیکروبی میباشد و همچنین ثابت شده است که ژل های درمانی حاوی عصاره انار توانسته اند باعث کاهش میزان اتصال و در نتیجه کاهش میزان تشکیل بیوفیلم میکروبی

شوند [۹] همچنین خاصیت ضد آفت آن در برخی مطالعات نشان داده شده است[۱۰].

هدف از این تحقیق بررسی تاثیر عصاره‌ی الکلی گل انار بر روی این پاتوژن مهم حفره‌ی دهان (کاندیداآلبیکنس) است تا شاید نتایج حاصل از آن بتواند راهی در جهت شناخت بهتر گیاهانی با خاصیت ضدقارچی و استفاده‌ی گسترده‌تر از آن‌هارا پیش رو قرار دهد .

مواد و روش ها:

سوش استاندارد قارچ کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) از آزمایشگاه مرجع دانشگاه علوم پزشکی قزوین و عصاره‌ی خشک گل انار تهیه شده با اتانول ۷۰٪ به صورت آماده از پژوهشکده توسعه‌ی صنایع شیمیایی جهاد دانشگاهی خریداری شد.

جهت تهیه کشت مقداری از سوسپانسیون میکروبی فعال شده روی محیط آگار منتقل گردید سپس محیط های کشت به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور قرار داده شد.

جهت تهیه سوسپانسیون میکروبی در یک لوله‌ی استریل که حاوی ۵ میلیلیتر محیط کشت مایع بود،یک لوپ ازکلنی‌های ۲۴ ساعته‌ی میکروارگانیسم موردنظر سوسپانسیون و مخلوط شد تا یکنواخت گردد. به منظور استاندارد نمودن کدورت،سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با لوله شماره‌ی ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد. این مقایسه هم به صورت چشمیوه متوسط دستگاها سپکتروفوتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر انجام شد.

تعیین فعالیت ضدمیکروبی با استفاده ازروش تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) وحداقل غلظت کشندگی (MFC) براساس روش پیشنهادی CLSI با استفاده ازروش Macro Broth Dilution و Agar well diffusionصورت گرفت.

ابتدا ۲۰۴۸ میلی گرم ازعصاره خشک با ترازوی آزمایشگاهی SARTORIUS(آلمان) با دقت ۰/۰۰۰۱وزن شدودر 1 ml اتانول ۷۰درصد حلش دو با دستگاه shaker هم زده شد تا محلول یکنواختی بدست آید. سپساین محلول از کاغذ صافی واتمن رد شد تا ذرات درشت آن گرفته شود، در مرحله‌ی بعد محلول با فیلترهای۰/۲۲ میکرومتر (Millipore filter) استریلشد و در لوله‌ای که از قبل استریل شده بود ریخته شد. بهاینترتیب Stockعصاره با غلظت ۲۰۴۸ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. از این عصاره رقت‌های سریالی عصاره از یک میلی گرم بر میلی لیتر تا ۱/۸/۲۰۴ میلی گرم بر میلی لیتر در محیط Neotriant Broth تهیه شد[۷]

۰/۵ میلیلیتر ازسوسپانسون قارچی با رقت۱٪به غلظتهای مختلف عصاره انار،فنل واتانول اضافه شد.

یک لوله نیز بعنوان کنترل مثبت بدون عصاره و یک لوله بعنوان کنترل منفی بدون میکروارگانیسم قرارداده شد.

به منظور حذف اثر اتانول که بعنوان حلال عصاره مورد استفاده قرار گرفت رقت‌های سریالی از الکل ۷۰ درصد مانند عصاره در ۱۲ غلظت تهیه و همانند مرحله‌ی قبل سوسپانسیون رقیق شده‌ی قارچ کاندیدا آلبیکنس به تمامی لوله‌ها اضافه گردید.

برای ماده ی فنلی به همان ترتیب ذکرشده رقتهای سریالی تهیه شد و سوسپانسیون میکروبی کاندیدا آلبیکنس به تمامی لوله‌ها اضافه گردید.

لوله‌های حاوی رقت‌های سریالی عصاره، فنل و الکل به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شدند وپس از ۲۴ ساعت لوله‌ها از نظر رشد قارچ بطور ماکروسکوپی مورد بررسی قرارگرفتند(Macrobroth dilution). رقت ماقبل لوله‌یی که قارچ در آن رشد یافته بود، بعنوان MIC در نظر گرفته شد.

محتویات لوله های رشد نیافته، درمحیط کشت جامد Saborad Dextrose Agar کشت داده شد (subculture). رقت ماقبل لوله‌ای که قارچ‌های موجود درآن رشدکردند بعنوان غلظتMFCدرنظرگرفته شد.

همچنین قطر هاله عدم رشد با استفاده از روشAgar well diffusion تعیین شد.

باتوجه به بررسیهای آماری،تعداد ۳۶

نمونه درگروه عصاره گل انار به ۱۲ گروه (غلظتهای مختلف عصاره) ۳ تایی)جهت تأیید کنترل کیفیت و صحت مراحل

و تعداد ۳۶ نمونه درگروه فنل و ۳۶ نمونه درگروه الکل و ۸ نمونه درگروه شاهد)کنترل منفی وکنترل مثبت درکل ۱۱۶ نمونه درنظر گرفته شد.

تمامی مراحل ذکرشده زیر نظر استاد متخصص میکروب شناسی و زیر هود و درشرایط آسپتیک انجام شد.

داده‌ها جمع آوری شده، با استفاده از نرم افزار آماری Spss21 تحت windows 7 وارد کامپیوتر شدند و با استفاده از آزمون Kolmogrov-Smirnov test نرمال بودن توزیع داده ها بررسی و توسط آزمون ANOVA و انجام تست‌های تعقیبی(post-hoc)مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. (P<۰/۰۵)

یافته ها:

با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف جهت چک نرمالیتی متغیرهای کمی، توزیع قطر هاله‌ی عدم رشد در دو گروه عصاره‌ی گل انار و فنل از توزیع نرمال تبعیت می‌کرد. (P>۰/۰۵)

باتوجه به نتایج جدول ۱ بزرگترین قطر هاله‌ی عدم رشد برای عصاره‌ی گل انار مربوط به غلظت 1 mg/ml و کمترین قطرهاله‌ی عدم رشد مربوط به غلظت $\frac{1}{128}$ mg/ml می‌باشد. و تفاوت مشاهده شده بین میزان قطر هاله‌ی عدم رشد در غلظت های مختلف معنی دار است. (P <۰/۰۰۱) همچنین رقت های سریالیازاتانول ۷۰٪ تهیه شدوتوانایی آندرجلوگیری از رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس موردآزمایش قرارگرفت. نتیجه به اینصورت بود که فقط درغلظت ۷۰٪اتانول میتواند باعث ایجاد هاله یعد مرشد به قطر ۱ mmشود،ولی درسایر غلظتها اثرمهاری ندارد.

قطر هاله یعد مرشد بینگروهفنل وگل انار از لحاظ آماری تفاوت معناداری ندارد. (P=۰/۱)

طبقآزمایشات انجام شدهMICدرگروه فنل برابر غلظت ۱۲۸/۱ mg/mlودرگروه عصاره‌ی گل انار برابر غلظت ۳۲/۱ mg/mlمیباشد. وmfc در گروه فنل برابر غلظت ۶۴/۱ mg/ml و در گروه گل انار برابرغلظت ۴/۱ mg/ml می باشد.

جدول ۱ - مقایسه قطر هاله ی عدم رشد در گروه عصاره ی گل انار‌در غلظت های مختلف

غلظت(mg/ml)	میانگین قطر	انحراف از معیار	P value
۱	۲۱	۱/۰۰	<۰/۰۰۱
$\frac{1}{2}$	۱۹	/۰۰	
$\frac{1}{4}$	۱۷	۱/۰۰	
$\frac{1}{8}$	۱۴	۱/۰۰	
$\frac{1}{16}$	۱۲	۱/۰۰	
$\frac{1}{32}$	۱۱	۱/۰۰	
$\frac{1}{64}$	۸	/۰۰	
$\frac{1}{128}$	۵	۱/۰۰	
$\frac{1}{256}$	۰	/۰۰	
$\frac{1}{512}$	۰	/۰۰	
$\frac{1}{1024}$	۰	/۰۰	
$\frac{1}{2048}$	۰	/۰۰	

بحث

مطالعه حاضر نشان داد که عصاره‌ی الکلی گل انار در غلظت-های ۱mg/ml تا $\frac{1}{128}$ mg/ml دارای اثر ضدقارچی علیهکاندیداآلبیکنس می‌باشد. طبق آزمایشات انجام شده MIC عصاره‌ی گل انار برابرغلظت$\frac{1}{32}$ mg/ml وMFC برابر غلظت$\frac{1}{4}$ mg/ml می‌باشد.

باتوجه به افزایش مقاومت میکروبی نسبت به داروهای سنتزی شیمیایی و همچنین اثرات مفیدگیاهان دارویی در درمان بیماری‌ها و با توجه به در دسترس بودن، سازگاری بیشتر با سیستم ایمنی انسان و ارجحیت استفاده از منابع طبیعی نسبت به ترکیبات شیمیایی توسط مردم، استفاده از گیاهان و مواد

مؤثر هی آن‌ها درمقابله با عوارض جانبی ناشی ازمصرف داروهای شیمیایی رو به افزایش است [۱۱].

انار یک منبع طبیعی از ترکیبات فنلی است که حاوی آنتی اکسیدان‌هایی همچون تانن،پلیفنل،فلاونوئیدو ویتامین C می‌باشد سایر آنتی اکسیدان های انار شامل توکوفرولها و آنتوسیانینها هستندکه خواص پیشگیرنده ودرمانی آن ها به اثبات رسیده‌است [۱۲].

از مقایسه‌ی هاله‌ی عدم رشد اطراف چاهک حاوی عصاره ۱mg/ml واتانول ۷۰ درصد این نکته دریافت شد که میانگین ماکزیمم قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف چاهک حاوی عصاره با غلظت mg/ml ۱ معادل ۲۱ میلی متر می‌باشد، در حالیکه ماکزیمم قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف چاهک حاوی اتانول ۷۰٪ معادل ۱ میلی متر بود .

در این مطالعه اثر گروه شاهد اتانولی بر روی میکروارگانیسم بطور مجزا مورد بررسی قرار گرفت. این مسئله از این جهت حائز اهمیت می‌باشد که ممکن است اثر عصاره‌ی الکلی مربوط به اتانول باشد و نه خود گیاه گل انار. ولی طبق نتایج حاصل ، بیشترین خاصیت مهارکنندگی رشد مربوط به خود عصاره گل انار است و اتانول نقش قابل توجهی ندارد.

بر طبق مطالعه حاضر فنل در مقایسه با گل انار دارای خاصیت مهارکنندگی و کشندگی بیشتری بر روی قارچ کاندیداآلبیکنس می‌باشد، ولی با توجه به اثرات نامطلوبی که این ماده بر روی بدن انسان دارد، اهمیت این مطالعه برای بررسی میزان خاصیت ضدقارچی عصاره الکلی گل انار که یک ماده بی ضرر برای انسان می‌باشد در مقایسه با فنل به خوبی قابل درک است.

روشwell diffusion Agar و Macrobroth dilutionبعلت سهولت، هزینه‌ی کم، توانایی تست تعداد زیادی میکروارگانیسم و یا عوامل آنتی‌میکروبیال و سهولت تفسیر نتایج بعنوان تست روتین حساسیت به عوامل آنتی میکروبیال استفاده می‌شود.

در مطالعه حاضر عصاره الکلی گل انار دارای خاصیت مهارکنندگی و کشندگی روی قارچ کاندیدا آلبیکنس می‌باشد.

Pai MB و همکاران نتیجه مشابهی را در مورد پوست انار بدست آوردند. آن‌ها اثر مهاری بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس با میانگین ناحیه مهاری ۲۲ میلیمترگزارش نمودند[۱۳] ماکزیمم ناحیه مهاری در مطالعه حاضر ۲۱ میلی متر در غلظت 1 mg/ml می‌باشد. همچنین Anibal PCو همکاران ، به بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره خام اتانولی تهیه شده از دانه، پوست، پرریکارپ و گل گیاه انار بر روی قارچ کاندیداآلبیکنس پرداختند.عصاره پرریکارپ و پوست فعالیت ضد قارچی بر علیه کاندیدابا MIC (حداقل غلظت مهاری)، ۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر نشان داد [۱۴] Kumar و همکاران نیز تاثیر ضد قارچی پوست انار را در تمام غلظت ها نشان دادند[۱۵]

همچنین در مطالعه Da silva و همکاران ، به بررسی خاصیت ضد قارچی لکتین (pgTel) موجود درآب میوه پونیکا گرانوتوم پرداختند. بنابراین آن‌ها به این نتیجه رسیدند که pgTel از طریق استرس اکسیداتیو، کاهش سطح انرژی و آسیب به دیواره ی سلولی دارای خاصیت ضد قارچی می‌باشد[۱۳].

قابل ذکر است Rathish nair و همکاران در مطالعه ای که انجام شد، نشان دادند عصاره اتانولی برگ گیاه انار در غلظت-های متفاوت بر روی کاندیدا آلبیکنس موثر نمی‌باشد همچنین عبدالله زاده و همکاران **در** بررسی اثر ضد باکتریایی و ضدقارچی عصاره متانولی (MEPGP)پوست پونیکا گرانوتوم بر روی پاتوژن های دهانی به این نتیجه رسیدند که هیچ غلظتی از MEPGP بر روی کاندیدا آلبیکنس موثر نیست [۱۴].

بدیهی است که ممکن است مواد موثره موجود در برگ و پوست انار با گل آن متفاوت باشد.

واضح است که هر نوع حلالی قادر به استخراج انواع ودرصد مختلفی از ترکیبات موجود در گیاه می‌باشد و به همین دلیل خواص عصاره ها با حلال‌های مختلف با یکدیگر متفاوت می باشد، همچنین در مطالعه حاضر از سوش های استاندارد ATCC۱۰۲۳۱ استفاده شده ولی در این مطالعه از پاتوژن های دهانی استفاده شده است ، ومسلما نتایج حاصله تنها قابل تعمیم به همان گونه از قارچ می‌باشد.

این نکته نیز قابل ذکر است که، ترکیبات شیمیایی میوه انار بسته به محل رویش، اقلیم، رسیدگی میوه و عملیات پرورش و نحوه انبارداری آن متفاوت است. انار حاوی ترکیبات پلی‌فنلی، قندها، اسیدهای چرب، ترکیبات معطر، اسیدهای امینه، توکوفرول‌ها، استرول‌ها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و غیره است [۷].

درنهایت باید این نکته را عنوان کردکه علیرغم اهمیت مطالعات آزمایشگاهی د رارزیابی عملکرد موادضدمیکروبی، تعمیم نتایج این مطالعات به محیط‌های بالینی و دهان بیما ران با مشکلات متعددی روبرو میباشد، زیرا شرایط موجود در دهان، گونه‌های موجود و بسیاری عوامل دیگر ، که بالقوه توانایی تغییر در نتایج را دارند، متفاوت می‌باشند. برای اینکه بتوان کاربرد این مواد در شرایط بالینی را توصیه نمود، ضرورت انجام تحقیقات بالینی احساس میشود.

نتیجه گیری:

مقایسه یافته‌های حاصل از عصاره‌ی گل انار و گروه شاهد اتانولی نشان داد که، اثر مهاری وکشندگی عصاره‌ی هیدرو الکلی گل انار مربوط به اتانول ۷۰ درصد نمی‌باشد وعصاره گل انار به تنهایی دارای اثر کشندگی و مهارکنندگی بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس است.

References:

1.Fatahi MA, Shokohi T, Sooteh H, Hedavati MT, Okhovatian A, Tamadoni A, et al. Molecular identification of Candida albicans isolated from the oncology patients at four University Hospitals in Mazandaran Province. J Mazandaran Univ Med Sci 2007; 17(61):1-11.

2 . Garcia-Cuesta C, Sarrion-Pérez M-G, Bagán JV. Current treatment of oral candidiasis: A literature review. Journal of Clinical and Experimental dentistry. 2014;6(5):576.

3. Rodrigues Cardoso, AM, Wanderley Cavalcanti, Y, Dantas de Almeida, LdF, Alves de Lima Pérez, AL, Nascimento Padilha, WW. Antifungal activity of plant-based tinctures on Candida. RSBO Revista Sul-Brasileira de Odontologia. 2012;9(1):25-30.

4. Horn DL, Neofytos D, Anaissie EJ, Fishman JA, Steinbach WJ, Olyaei AJ, et al. Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the orospective antifungal therapy alliance registry. J Clin Infect Dis 2009; 48(12): 1695-703.

5. Namdar Ahmadabad H, Roudbary M, RoudbarMohammadiSh, Mohammad Hassan Z, NezafatFirizi M. Anti-fungal effect of Fresh, aged and pickled garlic aqueous extract on Candida albicans; In vitro. Horizon MediSci 2013; 18(4):179-83.

6.Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Beitollahi JM, Shamshiri A. The comparative study of antifungal activity of Syzygiumaromaticum, Punicagranatum and nystatin on Candida albicans; an in vitro study.Journal de mycologiemedicale. 2014; 24(4):163-8.

7-Azmudeh F, Hajikhani S, Alizadeh S. Evaluation of the hydroalcoholic chamomile extract antifungal activity on Candida albicans-Invitro Study. J Res Dent Sci. 2017;13(4):210-15.

8. Mirjalili S. A Review on Biochemical Constituents and Medicinal Properties of Pomegranate (Punica granatum L.). JMP. 2015;4(56):1-22

9. Habibipour R, MoradiHaghgou L. Study on Hydro-Alcoholic Extract Effect of Pomegranate Peel on Pseudomonas aeruginosa Biofilm Formation. Avicenna J Clin Med. 2015; 22 (3) :195-202

10-Ghalayani P, Zolfaghary B, Farhad AR, Tavangar A, Soleymani B. The efficacy of Punicagranatum extract in the management of recurrent aphthous stomatitis. J Res Pharm Pract. 2013;2(2):88-92.

11. Chen F, Wang D. Novel technologies for the prevention and treatment of dental caries: a patent survey. Expert opinion on therapeutic patents. 2010 May 1;20(5):681-94.

12. Abid M, Yaich H, Cheikhrouhou S, et al. Antioxidant properties and phenolic profile characterization by LC-MS/MS of selected Tunisian pomegranate peels. J Food Sci Technol. 2017;54(9):2890-2901.

13. Pai MB, Prashant G, Murlikrishna K, Shivakumar K, Chandu G. Antifungal efficacy of Punica granatum, Acacia nilotica, Cuminum cyminum and Foeniculum vulgare on Candida albicans: an in vitro study. Indian Journal of Dental Research. 2010;21(3):334.

14. Anibal PC, Peixoto ITA, Foglio MA, Höfling JF. Antifungal activity of the ethanolic extracts of Punica granatum L .and evaluation of the morphological and structural modifications of its compounds upon the cells of Candida spp. Brazilian Journal of Microbiology. 2013;44(3):839-48.

15. Kumar KSP, Samlin SS, Siva B, Sudharshan R, Vignesswary A, Divya K. Punica granatum as a salutiferous superfruit in the treatment of oral candidiasis - An in-vitro study. J Oral Maxillofac Pathol. 2020;24(1):188-89.

16. Marc G, Araniciu C, Oniga S, Vlase L, Pîrnău A, Duma M, et al. New N-(oxazolylmethyl)-thiazolidinedione Active against Candida albicans Biofilm: Potential Als Proteins Inhibitors. Molecules. 2018;23(10):2522.

17-.Abdollahzadeh Sh, Mashouf R, Mortazavi H, Moghaddam M, Roozbahani N, Vahedi M. Antibacterial and antifungal activities of punica granatum peel extracts against oral pathogens. *J Dent (Tehran)*. 2011;8(1):1-6.