

بررسی آزمایشگاهی تاثیر عصاره الکلی کل انار بر قارچ کاندیدا آلبیکنس

دکتر آزاده زینب تی تی دژ^۱، دکتر صفرعلی علیزاده کوشکوهی^۲، دکتر عادلہ 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

پذیرش مقاله: ۹۹/۵/۲۰

اصلاح نهایی: ۹۹/۵/۱۰

وصول مقاله: ۹۹/۴/۱۰

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

Azadehzeinab Titidej¹, Safarali Alizadeh Koshkahi², Adeleh Ashoori³, Faezeh Azmoodeh^{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 punica granatum contain phytochemicals capable of suppressing oral pathogens associated with fungal diseases. The aim of this study is the assessment of punica granatum extract antifungal activity on Candida albicans.

Material and methods: This study was performed in Qazvin University of Medical Sciences in 2019. The 70% ethanol extract of punica granatum 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 extract was 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 aureole's diameter. Data were analyzed using ANOVA, post-hoc tests (p<0.05).

Results: Results showed that the ethanol extract of punica granatum had 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 granatum but not the ethanol. 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 punica granatum is not due to Ethanol and the punica granatum and Ethanol extracts of punica granatum has antifungal effect on Candida albicans.

Key words: Punica granatum, Candida Albicans, antifungal activity

Corresponding Author: fa.azmoodeh@gmail.com

J Res Dent Sci. 2020; 17 (3): 201-207

خلاصه:

سابقه و هدف: بیماری‌های قارچی دهان جمعیت بسیار زیادی را تحت تاثیر قرار می‌دهند و می‌توانند 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 کاندیدا آلبیکنس است.

مواد و روش‌ها: 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 لیتر تهیه گردید. فعالیت ضد قارچی عصاره با تعیین MIC (حداقل غلظت مهاری) با استفاده از روش Macrobroth dilution، چشمی، و MFC (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 Kolmogorov-Smirnov test مورد آنالیز آماری قرار گرفتند ($P < 0.05$)

یافته‌ها: یافته‌ها نشان دادند که، 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 ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر تعیین شد.

نتیجه‌گیری: مقایسه یافته‌های حاصل از عصاره‌ی گل انار و گروه شاهد اتانولی نشان داد که، اثر مهاری و کشندگی عصاره‌ی هیدرو الکلی گل انار مربوط به اتانول ۷۰ درصد نمی‌باشد و عصاره 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:

بنابراین استفاده از راهکارهای مناسب برای جایگزینی داروهای سنتتیک همشکل همواره مورد توجه بوده است. یکی از این راهکارهای بهره‌گیری از داروهای گیاهی است^(۵).

اخیراً انجام مطالعاتی راجع به استفاده از گیاهان دارویی بعنوان منبع یاز عوامل ضد میکروبی و ضد قارچی به طور چشمگیری افزایش پیدا کرده است. گزارش شده است که طیف گسترده‌ای از عصاره‌ی گیاهان مختلف، دارای فعالیت ضد میکروبی و ضد قارچی هستند^(۶-۹).

انار گیاهی است که سابقه کشت بسیار طولانی دارد. خاستگاه انار ایران و کشورهای همجوار است^(۸).

انار به دلیل دارا بودن مقادیر زیاد پلی فنل‌ها و آنتی اکسیدان‌ها دارای خاصیت ضد میکروبی می‌باشد و همچنین ثابت شده است که ژل‌های درمانی حاوی عصاره انار توانسته‌اند باعث کاهش میزان اتصال و در نتیجه کاهش میزان تشکیل بیوفیلم میکروبی

کاندیدایزیس دهانی شایع‌ترین عفونت فرصت طلب مخاط دهان است که به دنبال رشد بیش از حد قارچ کاندیدا در حفره‌ی دهان ایجاد می‌شود. شایع‌ترین گونه‌ی کاندیدا در ایجاد کاندیدایزیس دهانی، کاندیدا آلبیکنس می‌باشد^(۱). انواع مختلفی از کاندیدایزیس دهانی وجود دارند که شامل نوع حاد با غشای کاذب، آتروفیک حاد، هایپرپلاستیک مزمن، آتروفیک مزمن، angular cheilitis, median rhomboid glossitis است^(۲).

داروی انتخابی در موارد استعمال موضعی در حفره دهان نیستاتین و در موارد سیستمیک فلوکونازول است^(۳).

درمانهای ضد قارچی با استفاده از داروهای ضد قارچ معمول می‌توانند موجب مقاومت‌های دارویی و عود مکرر عفونت‌های کاندیدیایی شوند^(۴).

شوند^(۹) همچنین خاصیت ضد آفت آن در برخی مطالعات نشان داده شده است^(۱۰).

هدف از این تحقیق بررسی تاثیر عصاره الکلی گل انار بر روی این پاتوژن مهم حفره دهان (کاندیدا آلبیکنس) است تا شاید نتایج حاصل از آن بتواند راهی در جهت شناخت بهتر گیاهانی با خاصیت ضدقارچی و استفاده گسترده تر از آن‌ها را پیش رو قرار دهد.

مواد و روش ها:

سوش استاندارد قارچ کاندیدا آلبیکنس (ATCC 10231) از آزمایشگاه مرجع دانشگاه علوم پزشکی قزوین و عصاره خشک گل انار تهیه شده با اتانول ۷۰٪ به صورت آماده از پژوهشکده توسعه 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 لوله استریل که حاوی ۵ میلیتر محیط کشت مایع بود، یک لوپ از کلنی های ۲۴ ساعته میکروارگانیسم موردنظر سوسپانسیون و مخلوط شد تا یکنواخت گردد. به منظور استاندارد نمودن کدورت، سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با لوله شماره ۰/۵ مک فارلند تنظیم شد. این مقایسه هم به صورت چشمی و متوسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتر انجام شد.

تعیین فعالیت ضد میکروبی با استفاده از روش تعیین حداقل غلظت مهاری (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MFC) براساس روش پیشنهادی CLSI با استفاده از روش Macro Agar well diffusion و Broth Dilution صورت گرفت.

ابتدا ۲۰۴۸ میلی گرم از عصاره خشک با ترازوی آزمایشگاهی SARTORIUS (آلمان) با دقت ۰/۰۰۱ وزن شدودر 1 ml اتانول ۷۰ درصد حلش دو با دستگاه shaker هم زده شد تا محلول یکنواختی بدست آید. سپس این محلول از کاغذ صافی

واتمن رد شد تا ذرات درشت آن گرفته شود، در مرحله بعد محلول با فیلترهای ۰/۲۲ میکرومتر (Millipore filter) استریلشد و در لوله ای که از قبل استریل شده بود ریخته شد. بهاینترتیب Stock عصاره با غلظت ۲۰۴۸ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. از این عصاره رقت های 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 از سوسپانسون قارچی با رقت ۱/۸ به غلظتهای مختلف عصاره انار، فنل و اتانول اضافه شد.

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

به منظور حذف اثر اتانول که بعنوان حلال عصاره مورد استفاده قرار گرفت رقت های سریالی از الکل ۷۰ درصد مانند عصاره در ۱۲ غلظت تهیه و همانند مرحله قبل سوسپانسیون رقیق شده ی قارچ کاندیدا آلبیکنس به تمامی لوله ها اضافه گردید.

برای ماده ی فنلی به همان ترتیب ذکر شده رقت های سریالی تهیه شد و سوسپانسیون میکروبی کاندیدا آلبیکنس به تمامی لوله ها اضافه گردید.

لوله های حاوی رقت های سریالی عصاره، فنل و الکل به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه انکوبه شدند و پس از ۲۴ ساعت لوله ها از نظر رشد قارچ بطور ماکروسکوپی مورد بررسی قرار گرفتند (Macrobroth dilution). رقت ماقبل لوله ای که قارچ در آن رشد یافته بود، بعنوان MIC در نظر گرفته شد.

محتویات لوله های رشد نیافته، در محیط کشت جامد Saborad Dextrose Agar کشت داده شد (subculture). رقت ماقبل لوله ای که قارچ های موجود در آن رشد کردند بعنوان غلظت MFC در نظر گرفته شد.

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

باتوجه به بررسیهای آماری، تعداد ۳۶

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

و تعداد ۳۶ نمونه در گروه فنل و ۳۶ نمونه در گروه الکل و ۸ نمونه در گروه شاهد) کنترل منفی و کنترل مثبت در کل ۱۱۶ نمونه در نظر گرفته شد. تمامی مراحل ذکر شده زیر نظر استاد متخصص میکروب شناسی و زیر هود و در شرایط 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 داده‌ها بررسی و توسط آزمون ANOVA و انجام تست‌های تعقیبی (post-hoc) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. ($P < 0.05$)

یافته‌ها:

با استفاده از آزمون کولموگروف اسمیرنوف جهت نرمالیتی متغیرهای کمی، توزیع قطر هاله‌ی عدم رشد در دو گروه عصاره‌ی گل انار و فنل از توزیع نرمال تبعیت می‌کرد. ($P > 0.05$)

باتوجه به نتایج جدول ۱ بزرگترین قطر هاله‌ی عدم رشد برای عصاره‌ی گل انار مربوط به غلظت 1 mg/ml و کمترین قطر هاله‌ی 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. ($P < 0.001$) همچنین رقت های سریالیزاتانول ۷۰٪ تهیه شد و توانایی آندرجلوگیری از رشد قارچ کاندیدا آلبیکنس مورد آزمایش قرار گرفت. نتیجه به اینصورت بود که فقط در غلظت ۷۰٪، اتانول میتواند باعث ایجاد هاله بعد مرشد به قطر ۱ mm شود، ولی در سایر غلظتها اثر مهاری ندارد.

قطر هاله بعد مرشد بین گروه فنل و گل انار از لحاظ آماری تفاوت معناداری ندارد. ($P = 0.1$)

طبق آزمایشات انجام شده MIC در گروه فنل برابر غلظت ۱۲۸/۱ mg/ml و در گروه عصاره‌ی گل انار برابر غلظت ۳۲/۱

غلظت (mg/ml)	میانگین قطر	انحراف از معیار	p value
۱	۳۱	۱/۰۰	<0.001
$\frac{1}{2}$	۱۹	۰/۰۰	
$\frac{1}{4}$	۱۷	۱/۰۰	
$\frac{1}{8}$	۱۴	۱/۰۰	
$\frac{1}{16}$	۱۳	۱/۰۰	
$\frac{1}{32}$	۱۱	۱/۰۰	
$\frac{1}{64}$	۸	۰/۰۰	
$\frac{1}{128}$	۵	۱/۰۰	
$\frac{1}{256}$	۰	۰/۰۰	
$\frac{1}{512}$	۰	۰/۰۰	
$\frac{1}{1024}$	۰	۰/۰۰	
$\frac{1}{2048}$	۰	۰/۰۰	

بحث

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

باتوجه به افزایش مقاومت میکروبی نسبت به داروهای سنتزی شیمیایی و همچنین اثرات مفید گیاهان 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 در مقابله با عوارض جانبی ناشی از مصرف داروهای شیمیایی رو به افزایش است.^(۱۱)

انار یک منبع طبیعی از ترکیبات فنلی است که حاوی آنتی اکسیدان‌هایی همچون تانن، پلیفنل، فلاونوئید و ویتامین C می‌باشد سایر آنتی اکسیدان های انار شامل توکوفرولها و آنتوسیانینها هستند که خواص پیشگیرنده و درمانی آن ها به اثبات رسیده است^(۱۲).

از مقایسه‌ی هاله‌ی عدم رشد اطراف چاهک حاوی عصاره ۱ mg/ml و اتانول ۷۰ درصد این نکته دریافت شد که میانگین ماکزیمم قطر هاله‌ی عدم رشد در اطراف چاهک حاوی عصاره با غلظت ۱ mg/ml 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 میکروارگانسیم 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 کاندیدا آلبیکنس 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.

روش Agar well diffusion و Macrobroth dilution باعث سهولت، هزینه‌ی کم، توانایی تست تعداد زیادی میکروارگانسیم و یا عوامل آنتی میکروبیال 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 میلی‌متر گزارش نمودند^(۱۳) ماکزیمم ناحیه مهاری در مطالعه حاضر ۲۱ میلی متر در غلظت 1 mg/ml می‌باشد. همچنین Anibal PC و همکاران، به بررسی فعالیت ضدقارچی عصاره خام اتانولی تهیه شده از دانه، پوست، پریکارپ و گل گیاه انار بر روی قارچ کاندیدا آلبیکنس پرداختند. عصاره پریکارپ و پوست فعالیت ضد قارچی بر علیه کاندیدا با 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 در آب 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 و درصد 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 ATCC ۱۰۲۳۱ استفاده شده ولی در این مطالعه از پاتوژن های دهانی استفاده شده است، و مسلماً 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

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 *Syzygium aromaticum*, *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, MoradiHaghighi 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.

نحوه انبارداری آن متفاوت است. انار حاوی ترکیبات پلی فنلی، قندها، اسیدهای چرب، ترکیبات معطر، اسیدهای آمینه، توکوفرولها، استرولها، ترپنوئیدها، آلکالوئیدها و غیره است^(۷). در نهایت باید این نکته را عنوان کرد که علیرغم اهمیت مطالعات آزمایشگاهی در ارزیابی عملکرد مواد ضد میکروبی، تعمیم نتایج این مطالعات به محیطهای بالینی و دهان بیماران 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 می باشند. برای اینکه بتوان کاربرد این مواد در شرایط بالینی را توصیه نمود، ضرورت انجام تحقیقات بالینی احساس میشود.

نتیجه گیری:

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

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.