

Comparing antifungal effects of *Zataria multiflora* and *Punicagranatum* extract with Nystatin on *Candida Albicans*

F. Nouri¹, J. Beitolahi², A. Mansorian²

¹Department of Restorations, School of Dentistry, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

²Department of Oral Medicine, School of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Address: Fahimeh Nouri, Qazvin University of Medical Sciences, School of Dentistry, Qazvin, Iran.

Tel: +98-912-4799376, Email: nouri.fahimeh@yahoo.com

Received: 24 Jun 2015; Accepted: 1 Aug 2016

*Abstract

Background: Despite all the progress that has been made in the manufacture of synthetic drugs, herbal drugs are increasingly taken into account. This is due to the growing belief that they have fewer side effects compared to synthetic ones.

Objective: To compare the antifungal effects of extracts of *Zataria multiflora* and *Punicagranatum* with Nystatin on *Candida Albicans*.

Methods: This in vitro trial accomplished in the school of dentistry of Tehran University in 2012. From the mouths of 25 patients with denture stomatitis were sampled using sterile swabs. *Candida Albicans* strains were isolated from samples and standard *Candida Albicans* PTCC 5027 were cultured too. Then extract of *Zataria multiflora* and *Punicagranatum* to be obtained and antifungal of extract studied with disk diffusion method. Antifungal power of each of the extracts on the inhibition zone diameter was created in the medium. Data were analyzed by ANOVA and Friedman statistical tests.

Findings: Results showed extracts of *Zataria* and pomegranate flowers have antifungal significant effects ($P < 0.001$). Diameter of inhibition zone was $17.66 \pm .75$ mm in Nystatin group and in the *Zataria* and pomegranate flowers extracts groups was lower ($P < 0.001$). None of the negative control disc did inhibition zone in the medium.

Conclusion: With due attention of *Zataria* and pomegranate flowers extracts exhibited antifungal effects on *Candida Albicans*.

Keywords: Nystatin, *Candida Albicans*, *Zataria Multiflora*, *Punica Granatum*

Citation: Nouri F, Beitolahi J, Mansorian A. Comparing antifungal effects of *Zataria multiflora* and *Punicagranatum* extract with Nystatin on *Candida Albicans*. J Qazvin Univ Med Sci. 2016; 20 (5): 19-25.

مقایسه اثرات ضدقارچی عصاره گیاهان آویشن شیرازی و گل انار با نیستاتین بر کاندیدا آلبیکانس

دکتر فهیمه نوری^۱، دکتر جلیل بیت‌الهی^۲، دکتر آرش منصوریان^۲

^۱ گروه ترمیمی دانشکده دندان‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران

^۲ گروه بیماری‌های دهان دانشکده دندان‌پزشکی دانشگاه تهران، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسؤؤل: قزوین، بلوار شهید باهنر، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، دانشکده دندان‌پزشکی، تلفن ۰۹۱۲۴۴۷۹۹۳۷۶
تاریخ دریافت: ۹۴/۴/۳؛ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۱۱

*چکیده

زمینه: با وجود پیشرفت‌های روزافزون در ساخت داروهای صنعتی، داروهای گیاهی به علت اعتقاد به عوارض جانبی کمتر روز به روز بیش‌تر مورد توجه قرار می‌گیرند.

هدف: مطالعه به منظور مقایسه اثرات ضدقارچی عصاره گیاهان آویشن شیرازی و گل انار با نیستاتین بر کاندیدا آلبیکانس انجام شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۱ در آزمایشگاه دانشکده دندان‌پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. از دهان ۲۵ بیمار مبتلا به التهاب دهانی ایجاد شده توسط دست دندان با استفاده از سواب استریل، نمونه تهیه شد. نمونه‌های کاندیدا آلبیکانس در آزمایشگاه جدا و سویه استاندارد کاندیدا آلبیکانس PTCC ۵۰۲۷ تهیه شد. پس از عصاره‌گیری از گیاهان آویشن شیرازی و گل انار، اثر ضدقارچی آن‌ها با روش دیسک بررسی و قدرت ضدقارچی آن‌ها براساس قطر هاله عدم رشد ایجاد شده در محیط کشت تعیین شد. داده‌ها با آزمون‌های آماری اندازه‌گیری پی‌درپی آنوا و فریدمن تحلیل شدند.

یافته‌ها: عصاره‌های آویشن و گل انار اثرات ضدقارچی قابل توجهی داشتند. هاله عدم رشد در گروه نیستاتین $17/66 \pm 0/75$ میلی‌متر و در گروه عصاره‌های آویشن و گل انار کمتر بود ($P < 0/001$). هاله عدم رشد در دیسک‌های شاهد منفی مشاهده نشدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به یافته‌ها، عصاره‌های آویشن و گل انار بر روی کاندیدا آلبیکانس تأثیر ضدقارچی داشتند.

کلیدواژه‌ها: نیستاتین، کاندیدا آلبیکانس، آویشن شیرازی، گل انار

*مقدمه

کاندیدیازیس دهانی (Oral candidiasis) شایع‌ترین عفونت فرصت‌طلبی است که مخاط دهان را تحت تأثیر قرار می‌دهد و در اکثر موارد توسط کاندیدا آلبیکانس ایجاد می‌شود. کاندیدا آلبیکانس، یک مخمر دوگانه قوی گرم‌مثبت است که می‌تواند به عنوان میکروارگانسیم‌های طبیعی ساکن در حفره دهان افراد سالم زندگی کند.^(۱)

درمان کاندیدیاژیس به دلیل ظهور سویه‌های کاندیدایی مقاوم به عوامل ضدقارچی رایج، یک مسأله پیچیده است. عوامل ضدقارچی رایج مورد استفاده نه تنها تعداد محدودی دارند، بلکه توجه به اثر دارودرمانی، مشکلات سمی بودن، حلالیت، ثبات و جذب آن‌ها سبب

شده است که فقط تعداد کمی از این ترکیب‌ها برای درمان مناسب باشند.^(۳،۲) نیستاتین یک داروی موضعی مؤثر در درمان کاندیدیاژیس دهانی است که دستگاه گوارش آن را خیلی ضعیف جذب می‌کند و عمده اثر آن در اثر تماس مستقیم با میکروارگانسیم است.^(۴) از آن‌جا که این دارو جذب نمی‌شود، تغییر مزه تلخ آن با قند و دیگر مواد مزه‌دار می‌تواند زمینه انتشار پوسیدگی ناشی از خشکی دهان را در بیماران ایجاد کند.^(۵،۴)

عوارض جانبی داروهای شیمیایی، تمایل بشر به استفاده هرچه بیش‌تر از محصولات طبیعی، هزینه‌های بالای سیستم دارویی جدید، استفاده از منابع

دارای خواص ضدالتهابی و ضدسرطانی است.^(۱۳) در مطالعه‌ای استفاده از ژل حاوی عصاره انار به عنوان یک عامل ضدقارچی علیه کاندیدیازیس بررسی شد و نشان داد عصاره انار می‌تواند به عنوان یک عامل ضدقارچی موضعی برای درمان کاندیدیازیس مرتبط با التهاب دهانی ایجاد شده توسط دست دندان مؤثر باشد.^(۱۴) تحقیق‌ها نشان داده‌اند که عصاره‌های متانولی و اتانولی آویشن شیرازی فعالیت ضدکاندیدیایی بیش‌تری نسبت به عصاره آبی آن دارند.^(۱۵) در مطالعه‌ای فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های متانولی ۱۱ گیاه مختلف بر ۹ گونه میکروارگانیسم بررسی شد و برخی گونه‌های گیاهی فعالیت خوبی را علیه کاندیدا آلبیکانس نشان دادند.^(۱۶) این مطالعه با هدف مقایسه اثرات ضدقارچی عصاره گیاهان آویشن شیرازی و گل انار با نیستاتین بر کاندیدا آلبیکانس انجام شد.

* مواد و روش‌ها:

این مطالعه آزمایشگاهی در سال ۱۳۹۱ در دانشکده دندان پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران انجام شد. برای تهیه کاندیدا آلبیکانس، از دهان ۲۵ بیمار مراجعه‌کننده به بخش پروتز، با استفاده از کشیدن سواب استریل بر روی ضایعه تشخیص بالینی کاندیدیازیس (استوماتیت دنچر) نمونه‌برداری شد. سپس سواب حاوی کاندیدا در داخل لوله آزمایشگاه حاوی مایع انتقال‌دهنده (Reduce Transport Fluid) قبل از ۲۴ ساعت به آزمایشگاه ارسال شد. نمونه‌های کاندیدا در آزمایشگاه با کشیدن سواب در جهت‌های مختلف روی محیط حاوی کلرامفنیکل (yeast extract glucose chloramphenicol) کشت داده شدند. برای شناسایی اولیه کلونی‌ها، یک کلونی مخمر در محیط حاوی کلرامفنیکل کشت داده و طی ۲۴ ساعت نتیجه خوانده شد. گونه‌های کاندیدا آلبیکانس در این محیط به رنگ سبز دیده می‌شوند. کاندیدا تروپیکالیس رنگ آبی و سایر گونه‌ها، رنگ‌های صورتی تا بنفش و حتی سفید دارند.^(۱۶) بعد از انجام مراحل

غیرتجدیدشونده مانند منابع فسیلی و آلودگی محیط توسط صنایع دارویی و ناتوانی بشر برای ساخت برخی از مواد دارویی که به‌طور طبیعی در گیاهان وجود دارند، باعث توجه هرچه بیش‌تر به گیاهان دارویی شده است.^(۶) میکروشناس‌های بالینی به استفاده از داروهای گیاهی جهت درمان عفونت‌ها تمایل زیادی دارند؛ زیرا عوارض این داروها در مقایسه با داروهای شیمیایی به‌طور قابل توجهی پایین است.^(۷) از جمله گیاهان دارویی مورد توجه، آویشن شیرازی و گل انار است. آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) یکی از شناخته شده‌ترین گیاهان دارویی از تیره نعناع است.^(۸) این گیاه بوته‌هایی به ارتفاع ۴۰ تا ۸۰ سانتی‌متر، سبز متمایل به سفید و معطر، ساقه‌های متعدد، محکم و مقاوم و پوست خاکستری متمایل به سفید یا کمی متمایل به قهوه‌ای دارد، برگ آویشن شیرازی کوچک و دارای دم‌برگ کوتاه است.^(۹) آویشن در طب سنتی ایران و اروپا مصرف دارویی دارد. به‌طور عمده ترکیب‌های فنولی مسئول خواص ضدباکتریایی عصاره‌ها و اسانس‌ها هستند.^(۱۰،۱۱) بنابراین هرچه مقادیر مواد فنولیک بالاتر باشد، خواص ضد میکروبی آن بالاتر خواهد بود.^(۱۲) این مواد در اسانس آویشن شیرازی می‌توان به کارواکرول، تیمول و اوژنول اشاره کرد. تیمول بوی معطر و طعم تند دارد و یک ماده ضدقارچ و ضدباکتری محسوب می‌شود. آویشن خواص ضد درد و تشنج دارد. هوش و قوه ادراک را زیاد می‌کند و در درمان نارسایی کبد مؤثر است. خون را به جریان می‌اندازد و اعضای جنسی و تناسلی را در بدن تحریک و تقویت می‌کند.^(۱۲)

گل انار (*Punica granatum*) از درختچه انار به‌دست می‌آید و به‌طور وسیعی در خاورمیانه، حاشیه دریای مدیترانه، چین، هند و آمریکای جنوبی استفاده می‌شود. این درختچه در سرتاسر شمال و غرب ایران رویش طبیعی دارد. دارای تانن فراوان است و به‌عنوان منقبض‌کننده و ضدخونریزی مصرف سنتی دارد. همچنین

سطح پلیت محتوی محیط حاوی کلرامفنیکل گسترش داده شد. داخل هر پلیت، یک دیسک عصاره گیاهی و یک دیسک نیستاتین به عنوان شاهد مثبت، یک دیسک متانول و یک دیسک خالی به عنوان شاهد منفی استفاده شد. دیسک‌ها به فاصله ۱۵ میلی‌متر از لبه پلیت و ۲۴ میلی‌متر از مرکز دیسک بعدی گذاشته شدند. تمام پلیت‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند. برای هر نمونه بیمار ۳ مرتبه آزمایش تکرار شد. همچنین کاندیدا آلبیکانس استاندارد بر روی محیط حاوی کلرامفنیکل کشت داده شد و تأثیر عصاره گیاهان و نیستاتین بر روی آن، مطابق روش ذکر شده در فوق بررسی شد (برای هر عصاره ۳ بار تکرار). قطر هاله عدم رشد هر دیسک به وسیله کولیس اندازه‌گیری شد. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS ۲۰ و آزمون‌های آماری اندازه‌گیری پی‌درپی آنوا و فریدمن تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ درصد در نظر گرفته شد.

* یافته‌ها:

بین قطر هاله عدم رشد و فعالیت ضدقارچی عصاره گیاهی رابطه مستقیمی وجود داشت. هیچ هاله عدم رشدی اطراف دیسک متانول به عنوان شاهد منفی دیده نشد. تفاوت آماری معنی‌داری بین دو نمونه کاندیدا آلبیکانس استاندارد و نمونه تهیه شده از بیماران مشاهده نشد. میزان هاله عدم رشد برحسب گروه‌های مورد مطالعه نشان داد که بیش‌ترین تأثیر فعالیت ضدقارچی را نیستاتین به میزان $18/66 \pm 0/36$ میلی‌متر و سپس آویشن شیرازی و گل انار داشتند (در کاندیدای استاندارد). در مقایسه دو به دو بین گروه‌ها، بین میانگین قطر هاله عدم رشد در گروه عصاره آویشن شیرازی و گل انار با نیستاتین تفاوت آماری معنی‌داری دیده شد ($P < 0/001$). همچنین بین میانگین قطر هاله عدم رشد (در نمونه‌های بیماران و استاندارد) در گروه عصاره آویشن شیرازی و گل انار تفاوت آماری معنی‌داری دیده نشد (جدول شماره ۱).

کشت، ۲۱ نمونه دارای قارچ کاندیدا آلبیکانس وارد مطالعه شدند.

سوش کاندیدا آلبیکانس استاندارد با شماره PTCC5027 پس از تهیه از مرکز پژوهش‌های علمی-صنعتی به عنوان نمونه شاهد در محیط حاوی کلرامفنیکل کشت داده شد. نیستاتین (۱۰۰۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) از شرکت داروسازی جابرن حیان تهیه شد. سپس گیاهان آویشن شیرازی و گل انار که بیش‌ترین خاصیت درمانی را روی میکروارگانیسم‌های آسیب‌زای دهان نشان داده بودند، انتخاب شدند. ۳۰ گرم از پودر هر گیاه در ۱۰۰ میلی‌لیتر متانول خالص حل و محلول به مدت ۴۸ ساعت روی هم‌زن گذاشته شد. سپس هر عصاره از کاغذ فیلتراسیون واتمن شماره یک (ساخت انگلستان) گذرانده شد که وزن آن‌ها در بازه $29/98 \pm 0/01$ گرم بود. در مرحله بعد محلول فیلتراسیون در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت برای تهیه غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گذاشته شد.^(۱۷) جهت بررسی آلودگی محیط از روش دیسک پلیت استفاده شد. سپس ۴۰ دیسک خالی را داخل بشر ریخته و درب آن را بسته و به‌وسیله اتوکلاو استریل شدند. در شرایط استریل، هر ۱۰ دیسک در محفظه شیشه‌ای حاوی یکی از انواع عصاره متانول گیاهی قرار گرفت و روی آن‌ها پوشیده شد. در ضمن ۱۰ دیسک داخل متانول و ۱۰ دیسک داخل نیستاتین گذاشته شد. بعد از یک ساعت، دیسک‌های اشباع شده در شرایط استریل به‌وسیله انبر برداشته و در انکوباتور ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه خشک شدند.

در این مطالعه از روش انتشار دیسک کاغذی استاندارد ارایه شده توسط عبدالله‌زاده و همکاران برای ارزیابی فعالیت ضدقارچی استفاده شد.^(۱۷) ابتدا سوسپانسیونی از کاندیدای تهیه شده از دهان بیمار در سرم فیزیولوژی استریل آماده شد؛ به نحوی که کدورت حاصله معادل ۰/۵ واحد مک فارلند به دست آمد. سپس سوسپانسیون با یک سوپ استریل برداشته و در تمامی

جدول ۱ - مقایسه میانگین قطر هاله عدم رشد (میلی متر) عصاره‌های گیاهی و نیستاتین در روش دیسک

گروه	نمونه بیماران	نمونه استاندارد	سطح معنی‌داری
آویشن شیرازی	۱۳/۲۵±۰/۴۳	۱۲/۳۴±۰/۴۶	۰/۲۴۲
گل انار	۱۲/۱۷±۰/۶۲	۱۱/۲۷±۰/۵۲	۰/۱۸۸
نیستاتین	۱۷/۶۶±۰/۷۵	۱۸/۶۶±۰/۳۶	۰/۲۲۸

*بحث و نتیجه گیری:

مطالعه حاضر نشان داد عصاره آویشن شیرازی و گل انار اثرات ضدقارچی مؤثری بر روی کاندیدا آلبیکانس داشتند که به دلیل ترکیب‌های شیمیایی پیچیده در این گیاهان است. نائینی و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مطالعه‌ای نشان دادند اسانس گیاهان آویشن شیرازی و اسطوخودوس اثرات ضدکاندیدایی بسیار قوی دارد که با نتایج مطالعه حاضر همخوانی داشت.^(۱۸) در مطالعه مسیو، اثر ضدقارچی آویشن در مقابل قارچ میکوزیس (تهیه شده از واژن زنان آلوده) بررسی شد که نتایج نشان‌گر اثرات ضدقارچی وسیع آویشن بود.^(۱۹) در مطالعه آزمایشگاهی اُمران و همکاران که به روش رقیق‌سازی بر روی گیاهان آویشن، پونه و لیمو انجام شد مشابه مطالعه حاضر، آویشن اثر ضدقارچی خوبی در مقایسه با آمفوتریپسین B نشان داد.^(۲۰) در یک مطالعه اثر ضدقارچی آویشن در کنار گیاه رزماری بر روی کاندیدا آلبیکانس بررسی شد و نتیجه به‌دست آمده مشابه مطالعه حاضر بود.^(۲۱) در مطالعه ضیاء و همکاران اسانس آویشن اثر ضدقارچی بسیار خوبی علیه کاندیدا آلبیکانس داشت و در مقادیر نسبتاً کم توانست از رشد کاندیدا آلبیکانس در محیط کشت جلوگیری کند.^(۲۲) عبدالله‌زاده و همکاران در سال ۲۰۱۱، اثرات ضدباکتریایی و ضد میکروبی گل انار را بر روی میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای دهانی بررسی و نشان دادند عصاره گل انار خاصیت ضدباکتریایی علیه عفونت‌های دهانی داشت که با نتایج تحقیق حاضر همسو بود.^(۱۷) منصوریان و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ اثرات ضدقارچی عصاره پوست انار علیه کاندیدا آلبیکانس را بررسی کردند و نشان داد عصاره پوست انار همانند مطالعه حاضر، اثرات

ضدقارچی مؤثری علیه کاندیدا آلبیکانس داشت.^(۲۳) از جمله برتری‌های این مطالعه بررسی اثرات ضدقارچی گیاهان آویشن شیرازی و گل انار بر روی کاندیدا آلبیکانس‌های جدا شده از دهان بیماران دارای التهاب دهانی ناشی از دست دندان علاوه بر کاندیدای استاندارد بود. به نظر می‌رسد آویشن شیرازی و گل انار نسبت به نیستاتین اثر ضدقارچی مناسبی روی کاندیدا آلبیکانس دارند.

*سپاس‌گزاری:

مقاله حاضر حاصل طرح تحقیقاتی مصوب کمیته تحقیقات دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تهران به شماره ثبت ۴۹۳۵ است که بدین‌وسیله از کمیته مذکور تشکر می‌شود.

*مراجع:

- Greenberg M, Glick M. Burket's oral medicine: diagnosis and treatment. 10th ed. New York: Pmph USA Ltd; 2008. 77-80.
- Runyoro DK, Ngassapa OD, Matee MI, Joseph CC, Moshi MJ. Medicinal plants used by Tanzanian traditional healers in the management of Candida Infections. J Ethnopharmacol 2006 Jun 30; 106 (2): 158-65.
- Zarrin M, Zarei Mahmoudabadi A. Central nervous system fungal infections; a review article. Jundishapur J Microbiol 2010; 3 (2): 41-7.
- Frootani AA. Essential knowledge and clinical application of 170 drugs for 370 dental problems. 3rd ed. Tehran: Shayan-Nemudar; 2003. 171-9.
- Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis MA. In vitro susceptibility of oral Candida to seven antifungal agents. Oral Microbiol Immunol 2005 Dec; 20 (6): 349-53.

6. Mirhoseini SM, Ghandali R. The Evaluation of medicinal plants and by-products, utilization process (pharmaceutical, hygienic, cosmetic, nutrient) in Iran. *J Med Plants*. 2011; 5 (1): 30-8.
7. Cowan MM. Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 1999 Oct; 12 (4): 564-82.
8. Sajed H, Sahebkar A, Iranshahi M. *Zataria multiflora* Boiss. (Shirazi thyme)-an ancient condiment with modern pharmaceutical uses. *J Ethnopharmacol* 2013 Feb 13; 145 (3): 686-98. doi: 10.1016/j.jep.2012.12.018.
9. Lahooji A, Mirabolfathy M, Karami-Osboo R. Effect of *Zataria multiflora* and *Satureja hortensis* essential oils, Thymol and carvacrol on growth of *Fusarium graminearum* isolates and deoxynivalenol production. *Iran J Plant Path* 2010; 46 (1): 11-3. [In Persian]
10. Zhang Z, Liao L, Moored J, Wu T, Wang Z. Antioxidant phenolic compounds from walnut kernels (*Juglans regia* L.). *Food Chem* 2009; 113 (1): 160-5.
11. Ayoughi F, Barzegar M, Sahari MA, Naghdibadi H. Chemical compositions of essential oils of *Artemisia dracunculoides* L. and endemic *Matricaria chamomilla* L. and an evaluation of their antioxidative effects. *J Agr Sci Tech* 2011; 13: 79-88.
12. Nakhai LA, Mohammadirad A, Yasa N, Minaie B, Nikfar S, Ghazanfari G, et al. Benefits of *Zataria multiflora* Boiss in experimental model of mouse inflammatory bowel disease. *Evid Based Complement Alternat Med* 2007 Mar; 4 (1): 43-50.
13. Golnar Z. Antifungal effects of plants in Semnan. *J Med Plants* 1988; 14: 4-6.
14. Vasconcelos LC, Sampaio MC, Sampaio FC, Higino JS. Use of *Punica granatum* as an antifungal agent against candidosis associated with denture stomatitis. *Mycoses* 2003 Jun; 46 (5-6): 192-6.
15. Mahmoudabadi AZ, Dabbagh MA, Fouladi Z. In vitro anti-candida activity of *Zataria multiflora* Boiss. *Evid Based Complement Alternat Med* 2007 Sep; 4 (3): 351-3.
16. Javidnia K, Miri R, Assadollahi M, Gholami M, Ghaderi M. Screening of selected plants growing in Iran for antimicrobial activity. *Iranian J of Science and Technology Transaction A* 2009; 33 (A4): 329-33.
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 Winter; 8 (1): 1-6.
18. Naini A, Naseri M, Kamal-Nejad M, Khosh-Zaban F, Rajabian T, et al. Effects of essential oils and extracts of medicinal plants on 50 standard strains of *Candida Albicans* in vitro. *J Med Plants*. 2011; 10 (38): 163-72.
19. Mathew BP, Nath M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *ChemMedChem* 2009 Mar; 4 (3): 310-23. doi: 10.1002/cmdc.200800353.
20. Mahdavi Omran S, Esmaeilzadeh S, Rahmani Z. Laboratory study of anticandidal activity of thyme, pennyroyal and lemon essential oils by micro dilution method. *Jundishapur J Microbiol* 2010; 3 (4): 161-7.
21. Hanafi EM, Abdel-Khader MM, Kassem SS, Daninal EN. Aroma-therapy for endometritis induced by *Candida albicans*. *International Journal of Academic Research* 2010 Sep; 2 (5): 111-6.
22. Zia MA, Bayat M, Khalkhali H. In vitro antifungal effect of *Thymus vulgaris* essence on *Candida albicans* isolated from patients with oral candidiasis. *J Shahrekord Univ Med*

Sci 2011; 13 (3): 44-52. [In Persian]

23. Mansourian A, Boojarpour N, Ashnagar S, Momen Beitollahi J, Shamshiri AR. The comparative study of antifungal activity of

Syzygium aromaticum, *Punica granatum* and nystatin on *Candida albicans*; an in vitro study. *J Mycol Med* 2014 Dec; 24 (4): e163-8. doi: 10.1016/j.mycmed.2014.07.001.