

# In vitro ispitivanje utjecaja oralnih sredstava za ispiranje usne šupljine na sojevima Candida albicans

---

**Aleksić, Anamarija**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2021**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Dental Medicine and Health Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:243:066061>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-06**

*Repository / Repozitorij:*

[Faculty of Dental Medicine and Health Osijek  
Repository](#)



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**FAKULTET ZA DENTALNU MEDICINU I ZDRAVSTVO**

**OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij Dentalna higijena**

**Anamarija Aleksić**

***IN VITRO* ISPITIVANJE UTJECAJA  
ORALNIH SREDSTAVA ZA ISPIRANJE  
USNE ŠUPLJINE NA SOJEVIMA  
*CANDIDA ALBICANS***

**Završni rad**

**Osijek, 2021.**

**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU**

**FAKULTET ZA DENTALNU MEDICINU I ZDRAVSTVO**

**OSIJEK**

**Preddiplomski sveučilišni studij Dentalna higijena**

**Anamarija Aleksić**

***IN VITRO* ISPITIVANJE UTJECAJA  
ORALNIH SREDSTAVA ZA ISPIRANJE  
USNE ŠUPLJINE NA SOJEVIMA  
*CANDIDA ALBICANS***

**Završni rad**

**Osijek, 2021.**

Rad je ostvaren u: Fakultet za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek, Laboratorij za mikrobiologiju

Mentor rada: doc. dr. sc. Jasminka Talapko, dipl. ing.

Rad ima 26 listova, 5 tablica i 2 slike

**Znanstveno područje:** Biomedicina i zdravstvo

**Znanstveno polje:** Kliničke medicinske znanosti

**Znanstvena grana:** Medicinska mikrobiologija

## ZAHVALA

*Zahvaljujem svojoj mentorici doc. dr. sc. Jasminka Talapko, dipl. ing. na neizmjerljivoj pomoći tijekom pisanja ovog znanstveno-istraživačkoga rada te na prenesenom znanju i uloženom vremenu i trudu.*

*Najveću zaslugu pripisujem svojim roditeljima koji su mi ovo omogućili, usmjeravali me na pravi put tijekom cijelog mog školovanja i pružili mi bezuvjetnu podršku.*

*Velika HVALA svima!*

*Anamarija Aleksić*

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Flora usne šupljine .....	1
1.2. <i>Candida albicans</i> .....	2
1.3. Vodice za ispiranje usne šupljine .....	4
1.3.1. Belosept .....	5
1.3.2. Listerine .....	5
1.3.3. Curasept .....	5
1.3.4. Oral B .....	5
1.3.5. Dontodent .....	6
1.3.6. Perio Aid .....	6
2. HIPOTEZA .....	7
3. CILJEVI .....	8
4. MATERIJAL I METODE .....	9
4.1. Ustroj studije .....	9
4.2. Materijal .....	9
4.3. Metode .....	9
4.4. Statističke metode .....	11
5. REZULTATI .....	12
6. RASPRAVA .....	18
7. ZAKLJUČCI .....	20
8. SAŽETAK .....	21
9. SUMMARY .....	22
10. LITERATURA .....	23
11. ŽIVOTOPIS .....	26

## **KRATICE**

*C. albicans* - *Candida albicans*

CHX - klorheksidin

HEX - heksetidin

CPC - cetilpiridinijev klorid

SNG - sanguinarin

TRN - triklozan

A.D.S. - *Anti Discoloration System*

MIF (*minimum fungicidal concentration*) – minimalna fungicidna koncentracija

## 1. UVOD

### 1.1. Flora usne šupljine

Usna šupljina (lat. *cavum oris*) je početni dio probavnog sustava te uz pomoć pripadajućih organa i enzima sudjeluje u razgradnji hrane. Možemo ju podijeliti na predvorje usne šupljine ili *vestibulum oris* i na pravu usnu šupljinu ili *cavum oris*. Predvorje usne šupljine čine usna, obrazi i zubni lukovi, a pravu usnu šupljinu čini prostor između zubi i početka dijela probavnog sustava (ždrijela). Zubi su žvačni organi i imaju vrlo bitnu ulogu u procesu obrade hrane, otkidaju hranu (očnjaci), drobe hranu (prekutnjaci) i usitnjavaju hranu (kutnjaci). Osim što sudjeluje u probavnom sustavu, usna šupljina također sudjeluje i u dišnom sustavu (disanje) te u fonaciji. Jezik nam pomaže u prevrtanju hrane koju su zubi usitnili, a slina dodatno omekšala. Na jeziku nalazimo okusne pupoljke (gorko, slatko, slano i kiselo) i pomoću jezika možemo mehanički očistiti usnu šupljinu (1).

Normalnu floru ili fiziološku floru čini veliki broj mikroorganizama koji se mogu nalaziti na koži čovjeka i na sluznicama te žive kao komenzali. Mikroorganizmi koji čine normalnu floru nastanjuju zdrave ljude. Komenzali su mikroorganizmi koje možemo pronaći u ili na organizmu domaćina i oni ne moraju imati štetno djelovanje na organizam domaćina. Ipak, u određenim uvjetima mogu postati patogeni za čovjeka. Ukoliko mikroorganizmi koji čine normalnu floru dođu do primarno sterilnih prostora (npr. krv ili tkivo) tada postaju patogeni i izazivaju bolest (2).

U usnoj šupljini može biti prisutno više od 700 bakterijskih vrsta ili filotipova. Određene bakterije mogu uzrokovati karijes, gingivitis i parodontitis. Takva pojava oralne bolesti smatra se učestalom u današnje vrijeme (3).

Normalna flora ima bitnu ulogu u prevenciji bolesti jer potiče imunološki sustav da dolazi brže do reakcije na novi antigen koji ulazi u organizam i sudjeluje u razgradnji hrane i toksina. Ipak, normalna flora nije nužna za život. Postoje dvije vrste flore, a to su rezidentna (trajna) flora i tranzitorna (prolazna) flora. Rezidenta flora sastoji se od određenih vrsta mikroba koji su specifični za određene dijelove tijela. Takve vrste mikroba pronalazimo u određenoj dobi i ovise o spolu. Veći dio normalne flore čine bakterije, dok manji dio čine gljive i protozoi. Na sastav trajne flore utječu čimbenici kao što su: okoliš, prehrana i socioekonomski uvjeti. Ukoliko se poremeti ravnoteža trajne flore zbog vanjskih ili unutrašnjih čimbenika, ona se vrlo brzo vraća u svoje prvobitno stanje. Mikroorganizmi tranzitorne flore mogu se u određeno vrijeme (povremeno ih nalazimo) pronaći na sluznici i koži čovjeka, a inače se ti



mikroorganizmi nalaze u okolini. Tranzitorna flora sastoji se od apatogenih ili uvjetno patogenih bakterija. Po svome štetnom djelovanju tranzitorna je flora štetnija jer može napraviti veća oštećenja nego kada nastane poremećaj u trajnoj flori ili dođe do oštećenja kože ili sluznice. Utvrđeno je da veći broj neuzgojivih vrsta mikroorganizama čini normalnu floru od onih mikroorganizama koji se mogu uzgojiti. U usnoj šupljini mogu se pronaći različite vrste bakterija: *Streptococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Neisseriaceae*, difteroide i dosta rijetko *Lactobacillaceae*. U jednom mililitru sline može se pronaći  $10^8 - 10^9$  bakterija, a u gingivalnim džepovima ima ih  $10^{12}$  (2).

## 1.2. *Candida albicans*

*Candida albicans* je mikroorganizam koji se ubraja u komenzalne gljivice. Kolonije se mogu pronaći u usnoj šupljini, mokraćnom, probavnom i genitalnom traktu te na koži. *Candida albicans* prisutna je u svakome od nas i ne mora nužno imati štetan utjecaj na naš organizam jer zdrav organizam ima mogućnost kontrole *C. albicans* (4).

Može se pronaći u obliku blastospora, pseudohifa i hifa. Patogeni mikrobi koji uzrokuju mikoze danas su jako rasprostranjeni, mogu imati štetan učinak na kožu i sluznicu te mogu prouzročiti sistemsku mikozu. Jedan od čimbenika patogenosti je polimorfizam, što znači da *C. albicans* iz neutralnog, bezopasnog stanja prelazi u mikožno stanje (5).

Takvo mikožno stanje naziva se kandidijaza. Kandidijaza je gljivična infekcija koju uzrokuje *Candida albicans*, najčešće zbog oslabljenog organizma (imunološki sustav, upotrebe antibiotika, dijabetes itd.) (6). Pokazatelji oralne kandidijaze mogu se pronaći na sluznici obraza, dorzumu jezika i nepcu. *Candida albicans* u usnoj se šupljini može manifestirati na nekoliko načina:

1. Akutna pseudomembranozna kandidijaza
2. Akutna atrofična kandidijaza
3. Kronična atrofična kandidijaza
4. Kronična hiperplastična kandidijaza
5. Kutni heilitis
6. Cirkularni dermatitis / Perioralni dermatitis
7. Medijanski romboidni glositis
8. Kronična mukokutana kandidijaza (CMC) (7).

Akutna pseudomembranozna kandidijaza jedna je od najčešćih oralnih infekcija, a smanjeno lučenje sline i suhoća usta mogu potaknuti pojavu bolesti. Često se pojavljuje kod dojenčadi, ali i kod odraslih s hormonalnim i imunološkim disbalansima. Akutna pseudomembranozna kandidijaza očituje se pojavom bijelih naslaga na jeziku, obrazu i nepcu. Bijele naslage lako se uklanjaju, ostavljajući to područje crvenim. Vrlo je bitno uočiti razliku između ovih bijelih naslaga i naslaga koje pronalazimo po sluznici koje su uvjetovane lošom oralnom higijenom (5, 8, 9). Liječenje se započinje topikalnim pripravcima, a ukoliko dođe do pogoršanja stanja, započinje se sekundarno liječenje. Primjenjuje se klotrimazol; lijek iz skupine antimikotika. Za profilaksu od 14 dana, moraju se uzimati lijekovi 5 puta dnevno. Ne smije se jesti ništa pola sata poslije uzimanja terapije jer hrana usporava apsorpciju tvari (8, 10).

Akutna atrofična kandidijaza može se naći i pod nazivom antibiotska bolna usta (9). Uzrok pojave dugotrajno je korištenje antibiotika širokog spektra, imunosupresiva i kortikosteroida (5, 9). Cijela usna šupljina otečena je, crvena i jako senzitivna, a na gornjoj strani jezika (dorzum) mogu se vidjeti eritematozne promjene s oštećenjima okusnih pupoljaka. Liječenje se provodi na isti način kao i kod akutne pseudomembranozne kandidijaze (5, 8, 9).

Kronična atrofična kandidijaza može se nazvati još i stomatitis proteza jer je tipična za pacijente koji nose mobilne nadomjestke ili zubne proteze (5). Promjene se događaju na sluznici bez simptoma, odnosno u većini slučajeva crvenilo otkriva prvo stomatolog. Loše održavanje čistoće proteze i loša oralna higijena pridonose pojavi infekcije (5, 8). U liječenju se koriste antigljivične kreme i masti nanošenjem tankog sloja izravno na protezu 2 – 4 puta u danu (8).

Kronična hiperplastična kandidijaza može se naći i pod imenom kandidijazna leukoplakija (5, 7). Ona nastaje uslijed razmnožavanja gljivica *Candida albicans* u dubljim slojevima epitela usne šupljine (5, 11). Glavna razlika između kronične hiperplastične kandidijaze i akutne pseudomembranozne kandidijaze je ta što se kod ove bolesti struganjem ne mogu odstraniti bijele naslage. Bijele naslage možemo pronaći na bočnim stranama jezika i na bukalnoj sluznici. Postoji homogena i heterogena (nodularna) leukoplakija (5, 9). Homogenu leukoplakiju tvore glatke i bijele površine, a heterogenu tvore crvene površine pomiješane s bijelim površinama (11). Heterogene promjene mogu imati potencijal za zloćudne tumore (5, 9).

Kutni heilitis lokalizira se na kutnim dijelovima usana. Može nastati zbog suhoće usta, pada imuniteta ili nošenja protetskih nadomjestaka. Generalizira se pucanjem kuta usana s eritematoznim oštećenjima, u nekim slučajevima dolazi do stvaranja bijelih mjehurića/plaka (5, 8).

Cirkularni dermatitis pojavljuje se s manjim crvenim kožnim promjenama oko usta, moguće je zahvaćenje pigmentiranog dijela usne. Kožne promjene često su istoga oblika (8).

Perioralni dermatitis obuhvaća veće područje od pigmentiranog dijela usana i nejednolikog je oblika (8).

Medijanski romboidni glositis više je estetski problem. Generalizira se kao upala jezika s crvenim ili crveno-bijelim lezijama romboidnog oblika na sredini jezika (5, 8).

Kronična mukokutana kandidijaza može se opisati kao raspon poremećaja gdje dolazi do repetitivne kandidijaze kože, noktiju i sluznice (12). Kod pojave ove bolesti mogući je uzrok genetska nasljednost, imunološki disbalans i često se očituje u ranijoj dobi (5, 12).

### **1.3. Vodice za ispiranje usne šupljine**

Vodice za ispiranje usne šupljine mogu imati antiseptičko djelovanje, ali i ne moraju. One čine važan element oralne higijene uz pastu za zube, četkicu za zube te zubni konac. Njihova upotreba najčešće slijedi nakon pranja zubi. Osim što mogu poslužiti i kao osvježivači daha, imaju vrlo bitnu ulogu u prevenciji bolesti usne šupljine(13).

Najčešće bolesti usne šupljine na koje vodice za ispiranje mogu djelovati preventivno su: gingivitis, parodontitis, halitoza (loš zadah) te također pomažu i kod kserostomije (suhoća usta) (14). Vodice se koriste tako da se odgovarajuća količina tekućine naspe u čep (pročitati na proizvodu točne upute o korištenju) i mućka se u ustima oko minute te se ispljune. Poslije mućkanja ne preporučuje se ispirati usta vodom zbog boljeg učinka sredstva. Ne preporučuje se gutanje vodica za usta zbog svoga sastava, jer nakon učestalog gutanja može doći do neželjenih nuspojava (15).

U sastavu vodica za usta mogu se pronaći: alkohol, klorheksidin (CHX), esencijalna ulja(EO), heksetidin, cetilpiridinijev klorid(CPC) itd. (16). Klorheksidin traje najdulje u ustima i najčešće se koristi. Moguće nuspojave kod CHX, CPC, EO najčešće su uzrokovanje mrlja na zubima. Mrlje se kao takve mogu spriječiti adekvatnim četkanjem zubi ili se po potrebi može konzultirati sa stomatologom. Osim mrlja može doći i do disfunkcije papila, odnosno poremećaja okusa u ustima. Alkohol u vodicama za ispiranje usne šupljine ima slabo ili gotovo nikakvo antimikrobno djelovanje. Dugoročnije korištenje vodica na bazi alkohola može dovesti do raka usne šupljine ili ždrijela. Posebno su rizična skupina (osim djece) za korištenje vodica za ispiranje usne šupljine na bazi alkohola ovisnici o alkoholu (17).

U ovom znanstveno – istraživačkom radu koristili smo:

### **1.3.1. Belosept**

Belosept je otopina koja sadrži heksetidin i svojim djelovanjem sprječava stvaranje bakterija i gljivica u usnoj šupljini. Crvenkasto je obojena i specifičnog mirisa. Osim heksetidina sadrži i alkohol, što je štetno za ovisnike o alkoholu. Primjenjuje se u skladu s uputama te se ne smije koristiti s drugim lijekovima. Otopina se ne smije gutati i, osim mućkanja otopine u ustima, moguća je primjena i izravno na inficirano područje pomoću vaticice. Koristi se nekoliko puta dnevno, moguće su nuspojave iritacija jezika i disfunkcija okusnih pupoljaka (18).

### **1.3.2. Listerine**

Listerine je jedan od najpoznatijih proizvoda za ispiranje usne šupljine. Načinjen je davne 1879. godine od kombinacija esencijalnih ulja, a prvotno se koristio kao kirurško oralno sredstvo za ispiranje usne šupljine. Iako je bio poznat po tome da inhibitorno djeluje na rast mikroorganizama u usnoj šupljini, nije dobio veću pozornost. Najčešće se koristio kao sredstvo protiv neugodnog zadaha iz usta (halitoza). Ipak, unazad nekoliko godina dopijeva na tržište kao oralno sredstvo za suzbijanje oralnih bolesti uzrokovanih plakom (mekane naslage na zubima) (19).

### **1.3.3. Curasept**

Curasept su vodice za ispiranje usne šupljine kod kojih je pojava mrlja na zubima kao posljedica klorheksidina smanjena na minimum zbog *A.D.S.(Anti Discoloration System)*. Osim što smanjuje stvaranje mrlja na zubima, također smanjuje upale desni i iritacije. Između ostalih proizvoda, Curasept ima proizvod na prirodnoj bazi koji sadrži aktivne sastojke iz biljaka kao što su npr. kamilica i kadulja. Nijedan Curasept proizvod ne oštećuje caklinu ili dentin te ne izaziva iritacije okolnih tkiva. Vodica za ispiranje usne šupljine Daycare sadrži čak četiri vrste esencijalnih ulja, bez alkohola su i ne dovode do dehidracije tkiva u usnoj šupljini (20).

### **1.3.4. Oral B**

Oral B vodice za ispiranje usne šupljine na bazi su cetilpiridinijeva klorida ili klorheksidina. Mogu biti s fluoridom i bez fluorida. Fluorid ne sprječava ponovno stvaranje plaka na zubima, nego stvara zaštitu za zube od kiselina koje proizvode mikroorganizmi iz plaka. Bez fluorida vodice nemaju protektivan faktor, samo čine dah svježim. Vodica na bazi klorheksidina pomaže kod bolesnog zubnog mesa ili se primjenjuje kod stomatološkog zahvata. Vodice bez alkohola

ne iritiraju zubno meso i zube te su zbog toga pogodne za osobe koji imaju problema s osjetljivošću zubi/zubnog mesa i nakon stomatološkog zahvata (21).

### **1.3.5. Dontodent**

Dontodent vodice za ispiranje usne šupljine na bazi su natrijeva fluorida ili u kombinaciji natrijeva fluorida i cetilpiridinijeva klorida. Imaju baktericidno i antifungalno djelovanje te mogu biti bez/s alkoholom. Primjenjuju se za zaštitu zubne cakline, kod preosjetljivosti na toplo/hladno, zbog upale zubnog mesa, za sprječavanje stvaranja karijesa i plaka i održavanje zdrave flore usne šupljine. Proizvodi su veganski, neki su bez glutena i bez laktoze (22).

### **1.3.6. Perio Aid**

Perio Aid je otopina na bazi klorheksidina (CHX) i cetilpiridinijev klorida (CPC) koji djeluju zajedno protiv stvaranja zubnog plaka i održavaju parodont zdravim. Iako sadrži klorheksidin, Perio Aid ima proizvod 'Active Control' koji se može koristiti po nekoliko mjeseci kontinuirano uz minimalno stvaranje mrlja na zubima (23).

## **2. HIPOTEZA**

Oralne vodice za ispiranje usne šupljine imaju izniman značaj u održavanju oralne higijene. Na temelju dosadašnjih spoznaja o učincima vodica za ispiranje usne šupljine, postavljena je radna hipoteza:

1. Vodice za ispiranje usne šupljine imaju antifungalno djelovanje
2. Vodice za ispiranje usne šupljine imaju različite antifungalne učinke, ovisno o njihovu sastavu

### 3. CILJEVI

1. Prikazati značaj vodica za ispiranje usne šupljine u prevenciji i liječenju infekcija usne šupljine nastalih djelovanjem sojeva *Candida albicans*
2. Pojasniti mehanizme djelovanja istih oralnih antiseptika

## 4. MATERIJAL I METODE

**4.1. Ustroj studije:** znanstveno-istraživački, eksperimentalni rad

**4.2. Materijal** Za ovo *in vitro* istraživanje korišteni su sojevi kvasaca *Candida albicans* koji su dio zbirke sojeva Laboratorija za mikrobiologiju, Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Osijek, Sveučilište J. J. Strossmayer Osijek.

Oralni antiseptici kupljeni su u ljekarni u Osijeku, a to su Belosept ( proizvod Belupa), Listerine, Curasept, Oral B, Dontodent (proizvod DM-a) i Perio Aid (proizvod Dentaída) (Tablica 1.).

Tablica 1. Testirana komercijalna sredstva za ispiranje usne šupljine

Komercijalno ime	Aktivni sastojci	Proizvođač
Belosept	Hexetidin	Belupo, RH
Curasept	0,12 % Chlorhexidine-digluconate	Saronno. Italija
Dontodent	Cetylpyridinium chloride	EU, Njemačka
Listerin	Sodium fluoride, alkohol (21,6 %)	Johnson & Johnson, Njemačka
Oral B	Cetylpyridinium chloride	Procter & Gamble, Njemačka
PerioAid	0.12 % Cholrhexidine Digluconate 0.05 % Cetylpyridinium Chloride	Dentaída, Španjolska

### 4.3. Metode

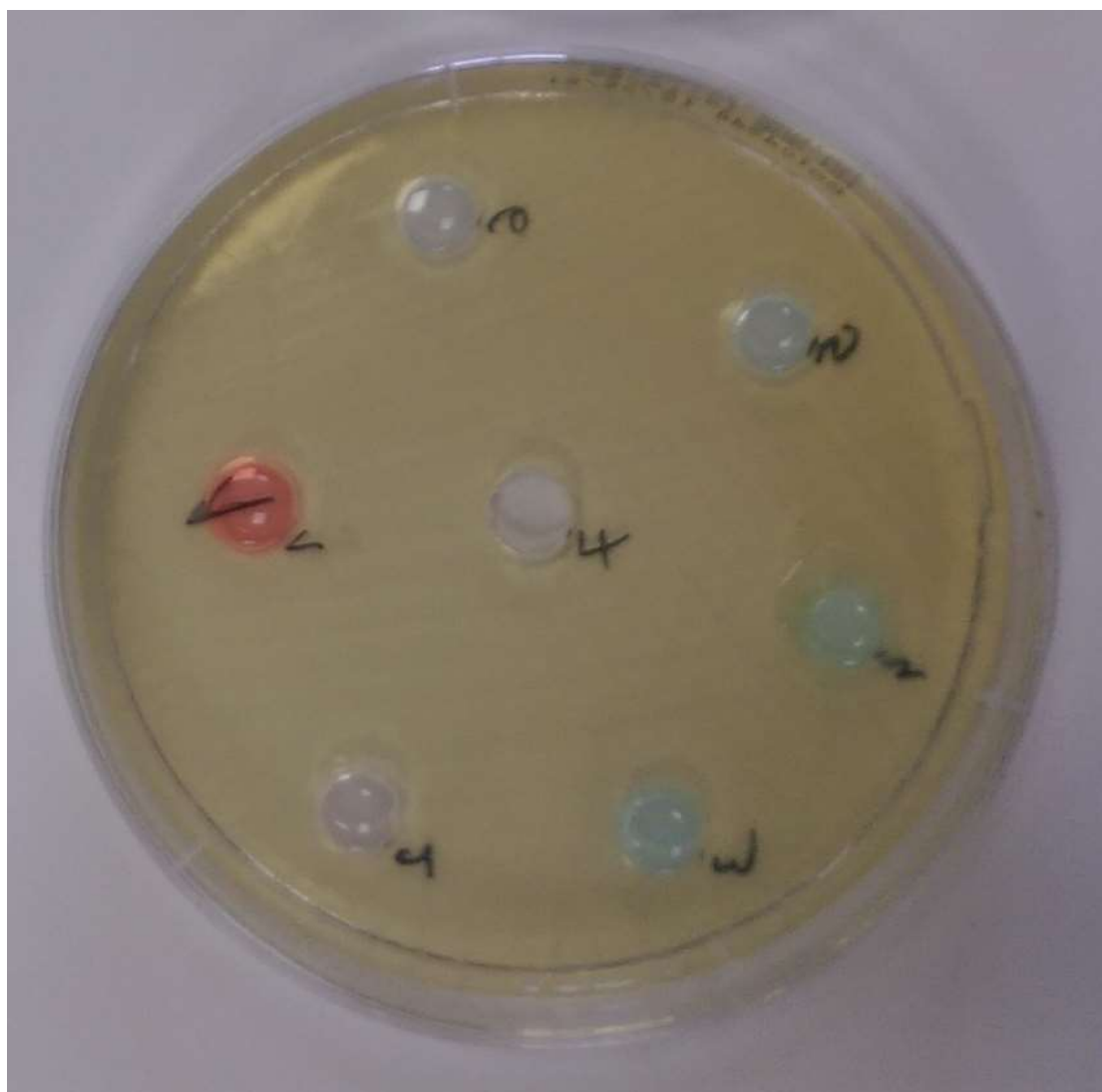
Osjetljivost izabranih sojeva kvasaca testirana je na sredstva za ispiranje usne šupljine disk difuzijskom metodom (Kirby-Bauer), s jažicama, u skladu s *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI standardima) (24).

Suspenzije sojeva kvasaca *C. albicans* priređene su u fiziološkoj otopini Api suspenzion medium 2 ml (Biomerieux, France), vorteksirane su na Vortex V-1 plus (Bio San, Riga, Latvia),



nakon toga namještena je mutnoća na 0,5 McFarlanda ( $10^6$ CFU/ml), što je izmjereno na denzitometru DEN 1 McFarland Denzitometer (BioSan, Riga, Latvija). Iza toga, suspenzije sojeva kvasaca su uz pomoć sterilnih briseva (Copan Italia S.p.A, Brescia, Italija) nanese na Müller-Hintonov agar s dodatkom 2 % glukoze i 0,5 µg/l metilenskog modrila (Certifikat, Vukovar, RH), na način da je ploča rotirana u tri smjera.

Za svaki ispitivani soj kvasaca priređena je ploča na kojoj je uz pomoć sterilnog tipsa izbušeno sedam jažica promjera 8 mm. U 6 jažica dodane su različite vodice, dok je u sedmu dodana sterilna fiziološka otopina (negativna kontrola) u količini od 100 µl (Slika 1.).



Slika 1. MH hranilište na koji je nanesen ispitivani soj *C. albicans* i vodice za ispiranje usne šupljine. Izvor: doc. dr. sc. Jasminka Talapko, dipl. ing.

Tako priređena hranilišta inkubirana su u aerobnim uvjetima 48 sati na temperaturi od  $36 (\pm 1)$  °C u aerobnom termostatu (Binder, Njemačka). Nakon inkubacije izmjerene su zone inhibicije u mm. Test je ponovljen tri puta.

#### **4.4. Statističke metode**

Rezultati ovoga istraživanja prikazani su opisnom statistikom (srednja vrijednost i standardno raspršenje, medijan i interkvartilni raspon). Za utvrđivanje značajnosti antifungalnog djelovanja između pojedinih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine korišten je Studentov t-test i analiza varijance (ANOVA), a isti je korišten i za određivanje razlika u antifungalnom djelovanju između svih testiranih vodica za ispiranje usne šupljine. Statistički značajnom smatrana je P vrijednost manja od 0,05. Analiza je napravljena pomoću SPSS statističkog programa (verzija 22.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

## 5. REZULTATI

Ispitivano je antifungalno djelovanje šest vrsta vodica za ispiranje usne šupljine na 31 soju *Candida albicans*. Metoda disk difuzije pokazala je da nemaju sve vrste vodica za ispiranje usne šupljine antifungalno djelovanje na različite sojeve *Candida albicans*. Najveće antifungalno djelovanje imao je Perio Aid, dok Listerine nije pokazao nikakvo antifungalno djelovanje na sojeve *Candida albicans* (Tablica 2.).

Tablica 2. Zone inhibicije različitih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine na sojevima *Candida albicans*

Vodice za ispiranje usne šupljine	Najmanja vrijednost	Najveća vrijednost	Srednja vrijednost ± SD	Medijan (IQR)
Belosept	13	27	20,23 ± 3,13	20 (18 – 22)
Listerine	0	0	0	0
Oral B no alcohol	19	31	25,52 ± 2,55	25 (24 – 27)
Dontodent	20	31	24,94 ± 2,30	25 (23 – 26)
Curasept	22	32	26,13 ± 2,11	26 (25 – 27)
PerioAid	22	38	29,09 ± 3,01	29 (27 – 31)
Amfotericin B (100 µg)	18	18	18 ± 0	18 (18 – 18)

SD – standardno raspršenje, IQR – interkvartilni raspon

Rezultati su pokazali postojanje velikih varijacija u veličini zona inhibicije pojedine vrste vodica za ispiranje usne šupljine na različitim sojevima *Candida albicans* (Slika 2.). Uočeno je da najveće oscilacije u antifungalnom djelovanju ima Perio Aid koje se kod nekih sojeva *C. albicans* kreće od 24 mm do čak 37 mm. Također, Belosept na neke sojeve *Candida albicans* ima malo antifungalno djelovanje (15 mm), dok je na nekim sojevima to djelovanje izrazito jako (26 mm). Najmanje varijacije u antifungalnom djelovanju pokazao je Oral B, čije se zone inhibicije kreću od 23 mm do 30 mm na određenim sojevima *C. Albicans* (Tablica 3.).

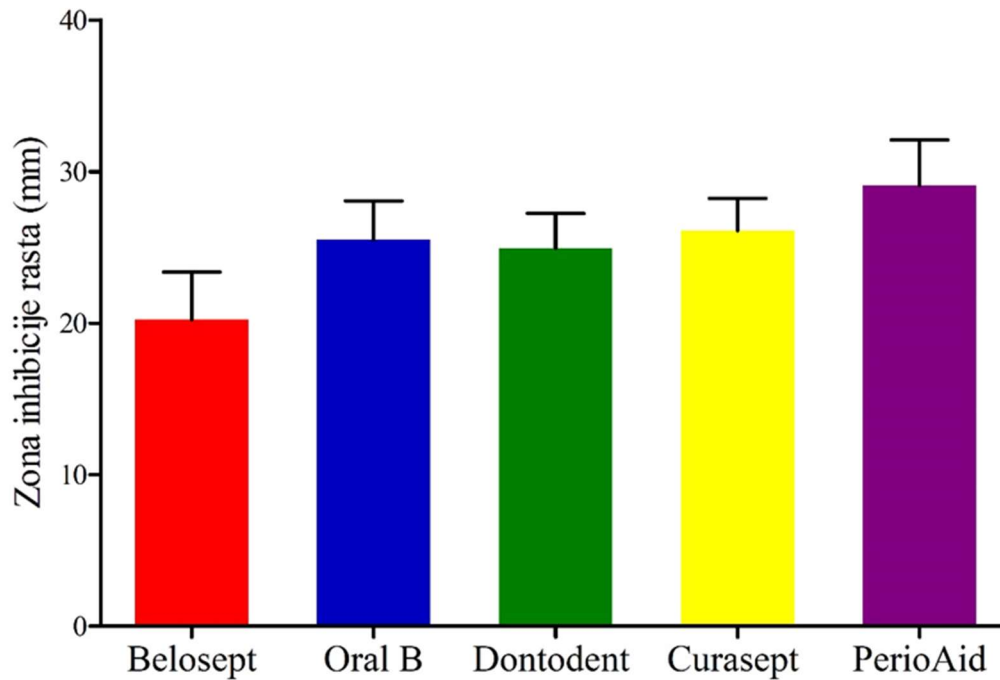
Tablica 3. Zone inhibicije različitih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine na sojevima *Candida albicans*

Br. soja	Belosept	Listerine	Oral B	Dontodent	Curasept	PerioAid
	Medijan (IQR)	Medijan (IQR)	Medijan (IQR)	Medijan (IQR)	Medijan (IQR)	Medijan (IQR)
1.	20 (20 – 20)	0	26 (25 – 26)	24 (23 – 24)	26 (25 – 26)	29 (28 – 29)
2.	23 (22 – 23)	0	29 (28 – 29)	25 (24 – 25)	26 (25 – 26)	31 (30 – 31)
3.	15 (14 – 15)	0	27 (26 – 27)	24 (23 – 24)	25 (24 – 25)	33 (32 – 33)
4.	16 (15 – 16)	0	23 (22 – 23)	23 (22 – 23)	23 (22 – 23)	31 (30 – 31)
5.	17 (16 – 17)	0	27 (26 – 27)	25 (24 – 25)	24 (23 – 24)	30 (29 – 30)
6.	17 (17 – 17)	0	23 (22 – 23)	23 (22 – 23)	25 (24 – 25)	29 (28 – 29)
7.	20 (19 – 20)	0	25 (24 – 25)	22 (21 – 22)	23 (22 – 23)	30 (29 – 30)
8.	20 (19 – 20)	0	26 (25 – 26)	25 (24 – 25)	26 (25 – 26)	31 (30 – 31)
9.	14 (13 – 14)	0	24 (23 – 24)	23 (22 – 23)	30 (29 – 30)	37 (36 – 37)
10.	19 (18 – 19)	0	25 (24 – 25)	21 (20 – 21)	25 (24 – 25)	28 (27 – 28)
11.	21 (19 – 20)	0	30 (29 – 30)	24 (23 – 24)	25 (24 – 25)	32 (31 – 32)
12.	22 (21 – 22)	0	26 (25 – 26)	28 (27 – 28)	25 (24 – 25)	32 (31 – 32)
13.	21 (20 – 21)	0	25 (24 – 25)	23 (22 – 23)	26 (25 – 26)	31 (30 – 31)
14.	18 (17 – 18)	0	24 (23 – 24)	24 (23 – 24)	26 (25 – 26)	30 (29 – 30)
15.	18 (17 – 18)	0	24 (23 – 24)	23 (22 – 23)	24 (23 – 24)	30 (29 – 30)
16.	17 (16 – 17)	0	24 (23 – 24)	23 (22 – 23)	25 (24 – 25)	29 (28 – 29)
17.	19 (19 – 19)	0	25 (24 – 25)	28 (27 – 28)	28 (27 – 28)	32 (31 – 32)
18.	20 (19 – 20)	0	26 (25 – 26)	26 (25 – 26)	27 (26 – 27)	29 (28 – 29)
19.	22 (21 – 22)	0	24 (23 – 24)	24 (23 – 24)	24 (23 – 24)	24 (23 – 24)

20.	22 (21 – 22)	0	28 (27 – 28)	28 (27 – 28)	29 (28 – 29)	29 (28 – 29)
21.	26 (25 – 26)	0	20 (19 – 20)	26 (25 – 26)	28 (27 – 28)	28 (27 – 28)
22.	26 (25-26)	0	30 (29 – 30)	30 (29 – 30)	24 (23 – 24)	24 (23 – 24)
23.	25 (24-25)	0	30 (29 – 30)	26 (25 – 26)	23 (22 – 23)	23 (22 – 23)
24.	22 (21-22)	0	23 (22 – 23)	26 (25 – 26)	26 (25 – 26)	26 (25 – 26)
25.	19 (18-19)	0	22 (21 – 22)	25 (24 – 25)	26 (25 – 26)	26 (25 – 26)
26.	20 (19-20)	0	24 (23 – 24)	26 (25 – 26)	29 (28 – 29)	29 (28 – 29)
27.	19 (18-19)	0	27 (26 – 27)	26 (25 – 26)	31 (30 – 31)	31 (30 – 31)
28.	25 (24-25)	0	28 (27 – 28)	30 (29 – 30)	28 (27 – 28)	28 (27 – 28)
29.	24 (23-24)	0	28 (27 – 28)	25 (24 – 25)	26 (25 – 26)	26 (25 – 26)
30.	20 (19-20)	0	24 (23 – 24)	24 (23 – 24)	26 (25 – 26)	26 (25 – 26)
31.	20 (19-20)	0	24 (23 – 24)	23 (22 – 23)	28 (27 – 28)	28 (27 – 28)
P*	< 0,001	-	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001

\*One-way ANOVA; IQR – interkvartilni raspon

Utvrđena je statistički značajna razlika u antifungalnom djelovanju između Belospeta, Oral B, Donodenta, Curaspeta i Perio Aid-a (Slika 1, F = 2,89; P = 0,022).



Slika 2. Antifungalni učinak različitih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine na sojeve *Candida albicans*. Podaci su prikazani kao srednja vrijednost i standardno raspršenje.

ANOVA test  $P = 0,022$ .

Ispitano je antifungalno djelovanje na sojeve *Candida albicans* u odnosu na negativnu kontrolu (fiziološka otopina) i pozitivnu kontrolu (amfotericin B). Iz Tablice 4. vidljivo je da sve vodice imaju značajno antifungalno djelovanje u odnosu na negativnu kontrolu, dok u odnosu na pozitivnu kontrolu samo Belosept nije pokazano značajnije antifungalno djelovanje.

Tablica 4. Antifungalno djelovanje različitih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine na sojevima *Candida albicans* u odnosu na negativnu i pozitivnu kontrolu

Vodice za ispiranje usne šupljine	t*	df*	P*	t†	df†	P†
Belosept	2,78	92	0,006	1,10	185	0,27
Listerine	-∞	185	< 0,001	-9,61	92	< 0,001
Oral B no alcohol	5,02	185	< 0,001	3,25	185	0,001
Dontodent	4,83	185	< 0,001	3,05	185	0,002
Curasept	5,24	185	< 0,001	3,47	185	< 0,001
PerioAid	6,06	185	< 0,001	4,38	185	< 0,001
Amfotericin B (100 µg)	6,90	185	< 0,001	-	-	-

\*t-test u odnosu na negativnu kontrolu, †t-test u odnosu na pozitivnu kontrolu, df – stupnjevi slobode

Ispitano je antifungalno djelovanje na sojeve *Candida albicans* između pojedinih parova vodica za ispiranje usne šupljine. Iz Tablice 5. vidljivo je da između Belosepta i svih ostalih vrsta vodica za ispiranje usne šupljine postoji statistički značajna razlika u antifungalnom djelovanju. Isto vrijedi i za Listerine, dok drugi parovi testiranih vodica za ispiranje usne šupljine nisu pokazali statistički značajnu razliku u inhibiciji rasta različitih sojeva *Candida albicans*.

Tablica 5. Razlike u antifungalnom djelovanju između određenih parova vodica za ispiranje usne šupljine na sojevima *Candida albicans*

Testirani parovi vodica za ispiranje usne šupljine	T	Df	P*
Belosept – Listerin	9,38	92	< 0,001
Belosept – OralB	-2,18	185	< 0,03
Belosept – DontoDent	-1,97	185	0,049
Belosept – Curasept	-2,39	185	0,017
Belosept – PerioAid	-3,36	185	< 0,001
Listerin – OralB	-9,51	92	< 0,001
Listerin – DontoDent	-9,53	92	< 0,001
Listerin – Curasept	-9,55	92	< 0,001
Listerin – PerioAid	-9,51	92	< 0,001
OralB – DontoDent	0,22	185	0,83
OralB – Curasept	-0,23	185	0,82
OralB – PerioAid	-1,24	185	0,21
DontoDent – Curasept	-0,45	185	0,66
DontoDent – PerioAid	-1,46	185	0,14
Curasept – PerioAid	-1,02	185	0,31

\*t-test, df – stupnjevi slobode



## 6. RASPRAVA

Zdravlje usne šupljine ovisi o nekoliko čimbenika, počevši od dobre oralne higijene do redovnih odlazaka stomatologu. Mehaničkim pranjem zubi četkicom i pastom za zube uklanjamo naslage dentalnog plaka na zubima, a vodice za ispiranje usne šupljine uklanjaju preostale mikroorganizme u ustima (25).

Na temelju istraživanja može se zaključiti da su najučinkovitije vodice za ispiranje usne šupljine one na bazi klorheksidina i esencijalnih ulja koji sprječavaju vezivanje *C. albicans* za epitel usne šupljine ili na protetske nadomjestke, a isto tako sprječavaju stvaranje plaka (26).

U ovome radu koristili smo se modificiranom metodom disk difuzije s jažicama te smo rezultate inhibicije rasta gljivica (zone inhibicije) mjerili pomoću ravnala. Na temelju dobivenih rezultata, pomoću Studentovog t-testa i analize varijance (ANOVA), dokazali smo da nemaju sva oralna sredstva za ispiranje usne šupljine sposobnost djelovanja protiv gljivice *Candida albicans*.

Antifungalno djelovanje kombinacije klorheksidina i natrijeva flourida ima slabije antifungalno djelovanje od samog klorheksidina (27). Listerine (aktivni sastojak natrijev flourid) u našem istraživanju nije pokazao antifungalno djelovanje na *Candidu albicans*. Vodice za ispiranje usne šupljine koje u sebi sadrže klorheksidin pokazale su značajno antifungalno djelovanje.

U istraživanju *Giovanna Giuliana* i suradnika, metodom makrodilucije ispitivali su antifungalno djelovanje cetilpiridinijeva klorida (CPC), klorheksidin diglukonata (CHX), heksetidina (HEX), sanguinarina (SNG) i triklozana (TRN). Tekućina s cetilpiridinijevim kloridom bila je najdjelotvornija ( $P < 0,001$ ) iako se po MIF-u ( $P < 0,18$ ) nije razlikovala od klorheksidina. Heksetidin nije imao 100 % učinak na *Candidu albicans* (28).

U našem istraživanju vidljivo je antifungalno djelovanje ( $P < 0,001$ ) u usporedbi s negativnom kontrolom (fiziološka otopina) svih antiseptičkih sredstava. Gore naveden rezultat za heksetidin podudara se s našim istraživanjem u kojemu Belosept (koji je na bazi heksetidina) na temelju srednjih vrijednosti i raspršenja ima najmanji antifungalni učinak.

Vodice za ispiranje usne šupljine koje imaju dokazano antimikrobno djelovanje mogle bi uskoro zamijeniti antimikote (lijekove koji sprječavaju ili uništavaju rast gljivica). U istraživanju *Giuliana G.* i suradnika, za razliku od gore navedenoga, govori se kako cetilpiridinijev klorid ima veću učinkovitost od klorheksidina (29).

Ako se osvrnemo na ta dva antiseptika i pogledamo naše rezultate, vidjeti ćemo da nije iznenađujuće što je Perio Aid imao najbolje antifungalno djelovanje na *Candidu albicans* s obzirom na činjenicu da je to vodica za ispiranje usne šupljine na bazi klorheksidina i cetilpiridinijeva klorida.

Proizvodi na bazi prirodnih sastojaka dobivaju sve veću pažnju. U biljkama možemo naći fenole koje ubrajamo među najbitnije bioaktivne spojeve (30). U istraživanjima možemo vidjeti da su prirodni preparati učinkoviti protiv upale zubnog mesa, zadaha iz usta (halitoza) te stvaranja karijesa. Iako je studijama dokazano da biljne otopine imaju antifungalno djelovanje, ipak rezultati nisu bili bolji od samog klorheksidina (31).

Stoga, možemo zaključiti da bi najbolja bila kombinacija tih dvaju spojeva, kao na primjer u Curaprox vodici za ispiranje usne šupljine koja sadrži i klorheksidin i bioflavonoid.

Boljim rezultatima od obične mehaničke oralne higijene bez korištenja vodica doprinjet će esencijalna ulja u vodicama za ispiranje usne šupljine. Dokazano je da esencijalna ulja s/bez alkohola djeluju bolje na upaljeno zubno meso i doprinose smanjenju stvaranja biofilma (32).

Usporedimo li vodice koje u sebi sadrže klorheksidin s esencijalnim uljima, vidjet ćemo da je kod esencijalnih ulja zona inhibicije na gljivicu *Candidu albicans* bez pozitivnih rezultata, nema antifungalno djelovanje (33). Dok su u našem istraživanju gotovo sve vodice koje sadrže klorheksidin imale antifungalno djelovanje na *Candidu albicans*, odnosno zona inhibicije varirala je od 13 mm do čak 38 mm.

## 7. ZAKLJUČCI

Na provedenom ispitivanju djelovanja šest različitih vodica za ispiranje usne šupljine na *Candidu albicans* možemo zaključiti :

- nemaju sve vodice za ispiranje usne šupljine antifungalno djelovanje
- najbolje antifungalno djelovanje pokazao je Perio Aid, dok Listerine nije pokazao nikakvo antifungalno djelovanje (zona inhibicije je 0)
- u odnosu na pozitivnu kontrolu (amfotericin B) samo Belosept nije imao bolje antifungalno djelovanje
- vodice za ispiranje usne šupljine na bazi klorheksidina (i /ili cetilpiridinijeva klorida) imaju bolje antifungalno djelovanje od vodica na bazi samo cetilpiridinijeva klorida

## 8. SAŽETAK

**Cilj istraživanja:** U ovome znanstveno-istraživačkom radu dokazali smo različito djelovanje vodica za ispiranje usne šupljine na *Candida albicans*.

**Materijali i metode:** Ispitivanje je provedeno na sojevima kvasaca *Candida albicans* koji su dio zbirke sojeva Laboratorija za mikrobiologiju, Fakulteta za dentalnu medicinu i zdravstvo Josipa J.J. Strossmayera u Osijeku. Vodice za ispiranje usne šupljine koje smo koristili su: Belosept, Listerine, Curasept, Dontodent, Perio Aid i Oral B. Antifungalno djelovanje vodica ispitivali smo metodom disk difuzije s jažicama. Nakon priređenih suspenzija kvasaca, rotiranjem ploče u tri smjera uz pomoć sterilnih briseva nanijeli smo ih na Müller-Hintonov agar. U šest od sedam jažica dodane su različite vodice, a u sedmu je dodana fiziološka otopina (negativna kontrola). Zatim su stavljeni sojevi u aerobnim uvjetima na inkubaciju 48h na temperaturi od 36° C. Analiza varijance i Studentov t-test korišteni su za utvrđivanje antifungalnog djelovanja vodica te za njihovu međusobnu razliku u antifungalnom djelovanju.

**Rezultati:** Dobiveni rezultati pokazali su da najveće antifungalno djelovanje na sojeve *Candida albicans* ima Perio Aid, dok Listerine nije imao nikakvo. Također, najveću zonu inhibicije imao je Perio Aid (od 24 mm do 37 mm), dok je najmanju imao Oral B (od 23 mm do 30 mm).

**Zaključak:** Sve su vodice za ispiranje usne šupljine pokazale antifungalno djelovanje u odnosu na negativnu kontrolu osim Listerina, a u odnosu na pozitivnu kontrolu (amfotericin B) samo Belosept nije pokazao bolje antifungalno djelovanje. Bolje rezultate pokazale su vodice na bazi aktivnog sastojka klorheksidina (ili i cetilpiridinijeva klorida) u usporedbi s vodicama samo na bazi cetilpiridinijeva klorida.

Ključne riječi: antifungalno djelovanje; antiseptici; *Candida albicans*; klorheksidin

## 9. SUMMARY

### *In vitro* studies of the effect of oral mouthwashes on *Candida albicans* strains

**Objective of the research:** In this scientific research work, we proved the different effects of mouthwashes on *Candida albicans*.

**Materials and methods:** The study was conducted on yeast strains of *Candida albicans* that are part of the collection of strains of the Laboratory of Microbiology, Faculty of Dental Medicine and Health J. J. Strossmayer University of Osijek. The mouthwashes we used were: Belosept, Listerine, Curasept, Dontodent, Perio Aid and Oral B. The antifungal effect of the mouthwash was examined by the method of disc diffusion with wells. After the yeast suspensions were prepared, they were applied to Müller-Hinton agar by rotating the plate in three directions using sterile swabs. Different mouthwash was added to six of the seven wells, and saline (negative control) was added to the seventh. The strains were then placed under aerobic conditions for 48 h incubation at 36 ° C. Analysis of variance and Student's t-test were used to determine the antifungal activity of the mouthwashes and for their mutual difference in antifungal activity.

**Results:** The obtained results showed that Perio Aid had the greatest antifungal effect on *Candida albicans* strains, while Listerine had none. Also, Perio Aid had the largest zone of inhibition from 24 mm to 37 mm, while Oral B had the smallest from 23 mm to 30 mm.

**Conclusion:** All mouthwashes showed significant antifungal activity compared to the negative control, and compared to the positive control (amphotericin B) only Belosept did not show better antifungal activity. Mouthwashes based on the active ingredient chlorhexidine (or cetylpyridinium chloride) also showed better results compared to mouthwashes containing only cetylpyridinium chloride.

Key words: antifungal effect; antiseptics; *Candida albicans*; clorhexidine

**10. LITERATURA**

1. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Usna šupljina. Dostupno na stranici: <https://www.enciklopedija.hr/Natuknica.aspx?ID=63421>  
Datum pristupa: 8. 4. 2021.
2. Kalenić S. i suradnici. Medicinska mikrobiologija. Zagreb: Medicinska naklada; 2013.
3. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol.* 2005;43(11):5721-32.
4. Gulati M, Nobile CJ. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect.* 2016;18(5):310-21.
5. Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I i sur. *Candida albicans*-The Virulence Factors and Clinical Manifestations of Infection. *J Fungi (Basel).* 2021;7(2):79.
6. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 2001;9(7):327-35.
7. Baumgardner DJ. Oral Fungal Microbiota: To Thrush and Beyond. *J Patient Cent Res Rev.* 2019;6(4):252-261.
8. Hellstein JW, Marek CL. Candidiasis: Red and White Manifestations in the Oral Cavity. *Head Neck Pathol.* 2019;13(1):25-32.
9. R AN, Rafiq NB. Candidiasis. 2021.
10. Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža. Antiinfektivi. Dostupno na stranici: <https://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?ID=3031>  
Datum pristupa: 9. 4. 2021.
11. Sitheequ MAM, Samaranayake LP. Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia). *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(4):253-67.
12. Kirkpatrick CH. Chronic mucocutaneous candidiasis. *Pediatr Infect Dis J.* 2001;20(2):197-206.
13. Choo A, Delac DM, Messer LB. Oral hygiene measures and promotion: review and considerations. *Aust Dent J.* 2001;46(3):166-73.

14. Vergara-Buenaventura A, Castro-Ruiz C. Use of mouthwashes against COVID-19 in dentistry. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2020;58(8):924-927.
15. Glažar I. i sur. Priručnik oralne higijene. Rijeka: Medicinski fakultet sveučilišta u Rijeci; 2017. Dostupno na adresi: [https://bib.irb.hr/datoteka/872177.Prirucnik\\_oralne\\_higijene\\_1.pdf](https://bib.irb.hr/datoteka/872177.Prirucnik_oralne_higijene_1.pdf)  
Datum pristupa: 20. 5. 2021.
16. Tartaglia GM, Tadakamadla SK, Connelly ST, Sforza C, Martín C. Adverse events associated with home use of mouthrinses: a systematic review. *Ther Adv Drug Saf.* 2019;10:2042098619854881.
17. Joshipura KJ, Muñoz-Torres FJ, Morou-Bermudez E, Patel RP. Over-the-counter mouthwash use and risk of pre-diabetes/diabetes. *Nitric Oxide.* 2017;71:14-20.
18. Belupo web stranica. Dostupno na adresi: <https://www.belupo.hr/hr/> Datum pristupa: 23. 5. 2021.
19. Fine DH. Listerine: past, present and future--a test of thyme. *Dent* 2010;38Suppl 1:S2-5.
20. Curasept web stranica. Dostupno na adresi: <https://www.curaseptworldwide.com/index.php> Datum pristupa: 27. 5. 2021.
21. Oral B web stranica. Dostupno na adresi: <https://oralb.com/> Datum pristupa: 23. 5. 2021.
22. Dm web stranica. Dostupno na adresi: <https://www.dm.hr/search?query=dontodent%20vodica&searchType=product> Datum pristupa: 23. 5. 2021.
23. Dentaaid web stranica. Dostupno na adresi: <https://www.dentaaid.com/en/brands/perio-aid>  
Datum pristupa: 23. 5. 2021.
24. CLSI: Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline. 2nd ed., M44-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2009; Wayne, PA.
25. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu WH i sur. The human oral microbiome. *J Bacteriol.* 2010;192(19):5002-17.
26. Paulone S, Malavasi G, Ardizzoni A, Orsi CF, Peppoloni S, Neglia RG i sur. *Candida albicans* survival, growth and biofilm formation are differently affected by mouthwashes: an in vitro study. *New Microbiol.* 2017;40(1):45-52.

27. Malhotra N, Rao SP, Acharya S, Vasudev B. Comparative in vitro evaluation of efficacy of mouthrinses against *Streptococcus mutans*, *Lactobacilli* and *Candida albicans*. *Oral Health Prev Dent*. 2011;9(3):261-8.
28. Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Musotto GC, Giangreco R. In vitro antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. *J Periodontol* 1997;68(8):729-33.
29. Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Giangreco R. In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999J;87(1):44-9.
30. Rezzoug M, Bakchiche B, Gherib A, Roberta A, Flamini G, Kilinçarslan Ö i sur. Chemical composition and bioactivity of essential oils and Ethanolic extracts of *Ocimum basilicum* L. and *Thymus algeriensis* Boiss. & Reut. from the Algerian Saharan Atlas. *BMC Complement Altern Med*. 2019;19(1):146.
31. Dabholkar CS, Shah M, Kathariya R, Bajaj M, Doshi Y. Comparative Evaluation of Antimicrobial Activity of Pomegranate-Containing Mouthwash Against Oral-Biofilm Forming Organisms: An Invitro Microbial Study. *J Clin Diagn Res*. 2016;10(3):ZC65-9.
32. Lynch MC, Cortelli SC, McGuire JA, Zhang J, Ricci-Nittel D, Mordas CJ i sur. The effects of essential oil mouthrinses with or without alcohol on plaque and gingivitis: a randomized controlled clinical study. *BMC Oral Health*. 2018;18(1):6.
33. Handschuh Briones RA, Silva Arcos EN, Urrutia M, Godoy-Martínez P. Antifungal activity of mouthwashes against *Candida albicans* and *Rhodotorula mucilaginosa*: An in vitro study. *Rev Iberoam Micol*. 2020;37(2):47-52.