



## Comparing the Antifungal Properties of Carvacrol and Nano-Carvacrol Obtained From Marjoram Plant Against *Aspergillus parasiticus*

Sara Mohammadnejad<sup>1</sup>, Donya Nikaein<sup>2,3</sup>, Alireza Khosravi<sup>2,3</sup>, Aghil Sharifzadeh<sup>2,3</sup>, Javad Malakoutikhah<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>3</sup> Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran

<sup>4</sup> Graduated from the Faculty of New Science and Recnology, University of Tehran, Tehran, Iran

Received: 14 February 2024, Accepted: 15 April 2024

doi [10.22059/jvr.2023.361055.3361](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.361055.3361)

### Abstract

**BACKGROUND:** *Aspergillus parasiticus* isolates often infect agricultural products in the fields and warehouses in tropical areas. In recent years, the study of plant compounds to reduce the growth of toxin-producing microorganisms has increased. Loading the effective substances of medicinal plants such as marjoram in lipid nanocarriers can reduce the reaction of the active substances of the plants with the surrounding environment, such as water and oxygen, as well as the intensity of transfer or evaporation of the external environment.

**OBJECTIVES:** In this study, we aimed to assess the antifungal effect of a carvacrol-nanoemulsion on the growth of *Aspergillus parasiticus*.

**METHODS:** In this experimental study, using the microdilution method and in accordance with the latest version of the Clinical & Laboratory Standards Institute standard (modified M38-A2 protocol), the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) for different concentrations of carvacrol and nano-carvacrol were determined against the *Aspergillus parasiticus* strain. Physicochemical indicators and structural characteristics of nanoparticles were determined in terms of surface morphology by the Scanning electron microscope (SEM) method. Data were analyzed in SPSS v.21 software using two-way analysis of variance.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

**RESULTS:** Nano-carvacrol has more antifungal effect against *Aspergillus parasiticus* than pure carvacrol. Based on this, the MIC was 0.97  $\mu\text{g/ml}$  for nano-carvacrol and 97  $\mu\text{g/ml}$  for pure carvacrol. Also, the MFC was 3.9  $\mu\text{g/ml}$  for nano-carvacrol and 390  $\mu\text{g/ml}$  for carvacrol, indicating that nano-carvacrol has a higher antifungal effect compared to pure carvacrol. The SEM images showed the spherical shape of the nanoparticles, and their average size was about 80 nm.

**CONCLUSIONS:** The carvacrol-nanoemulsion showed acceptable growth inhibition against *Aspergillus parasiticus* fungus, which can make it a promising agent with high antifungal effects and low side effects. However, further studies are recommended on this nano compound in order to understand its' activity against other mycotoxigenic fungi.

**Keywords:** Carvacrol, Nanocarvacrol, *Aspergillus parasiticus*, Microdilution, Nano

Copyright © Journal of Veterinary Research: Open Access; Copying, distribution and publication are free for full use with attribution. ©The Author(s).

Publisher: University of Tehran

Conflict of interest: The authors declared no conflict of interest.

Corresponding author: Donya Nikaein, Tel/Fax: +9821-61117044/+9821-66933222



### How to cite this article:

Mohammadnejad S, Nikaein D, Khosravi A, Sharifzadeh A, Malakoutikhah J. Comparing the Antifungal Properties of Carvacrol and Nano-Carvacrol Obtained From Marjoram Plant Against *Aspergillus parasiticus*. J Vet Res, 2024; 79(2): 91-99. doi: 10.22059/jvr.2023.361055.3361

### Figure Legends and Table Captions

**Table 1.** Determining the size of the synthesized carvacrol-nanoemulsion using the dynamic light scattering (DLS) method.

**Table 2.** Determining the type of surface charge and stability using zeta potential.

**Figure 1.** SEM image of carvacrol-loaded nanoparticles.



دوره ۷۹، شماره ۲، ۱۴۰۳، ۹۹-۹۱

## مقایسه خواص ضدقارچی کارواکرول و نانوکارواکرول حاصل از اسانس مرزنجوش علیه قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس

سارا محمدنژاد<sup>۱</sup>، دنیا نیک آئین<sup>۲،۳</sup>، علیرضا خسروی<sup>۲،۳</sup>، عقیل شریفزاده<sup>۲،۳</sup>، جواد ملکوتی خواه<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۲</sup> گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۳</sup> مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

<sup>۴</sup> دانش آموخته دانشکده علوم فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۲۵ بهمن ماه ۱۴۰۲، تاریخ پذیرش: ۲۷ فروردین ماه ۱۴۰۳

doi [10.22059/jvr.2023.361055.3361](https://doi.org/10.22059/jvr.2023.361055.3361)

### چکیده

**زمینه مطالعه:** جدایه‌های آسپرژیلوس پارازیتیکوس غالباً در مناطق گرمسیری، محصولات کشاورزی را در مزارع و انبارها آلوده می‌کنند. در سال‌های اخیر، مطالعه بر روی عصاره‌ها و ترکیبات گیاهان جهت کاهش رشد میکروارگانیسم‌های تولیدکننده سم افزایش یافته است. بارگذاری مواد مؤثر ترکیبات گیاهی همراه با نانوذرات باعث کاهش واکنش ماده فعال گیاه با محیط اطراف، مانند آب و اکسیژن می‌شود و شدت انتقال یا تبخیر محیط بیرون را کاهش می‌دهد. جهت کاهش زیان‌های اقتصادی و خطرات جانبی ناشی از این عوامل، استفاده از ترکیبات زیست فعال به‌منظور بهبود ایمنی و نگهداری مواد غذایی مورد توجه قرار گرفته است.

**هدف:** در مطالعه حاضر به‌منظور ارتقای کارواکرول، بارگذاری این ترکیب با ذرات نانو صورت گرفته است و اثر ضدقارچی آن بر رشد قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس بررسی شد.

**روش کار:** در مطالعه حاضر تجربی آزمایشگاهی، براساس روش میکرودايلوشن مطابق با آخرین نسخه از روش‌های استاندارد CLSI، پروتکل M38-A2 اصلاح شده، حداقل میزان مهارکنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) در غلظت‌های مختلف از کارواکرول و نانوکارواکرول علیه سویه استاندارد آسپرژیلوس پارازیتیکوس (PTCC 5018) در آزمایشگاه بررسی شد. شاخص‌های فیزیک و شیمیایی و خصوصیات ساختاری نانوذرات از نظر مورفولوژی سطح با روش میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تعیین شد و همچنین از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون تحلیل واریانس دوطرفه جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات استفاده شد ( $P < 0.05$ ).

**نتایج:** در مطالعه حاضر مشاهده شد نانوکارواکرول نسبت به کارواکرول دارای اثر ضدقارچی بیشتری علیه آسپرژیلوس پارازیتیکوس بود. براین اساس حداقل میزان مهارکنندگی رشد (MIC) نانوکارواکرول ۰/۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کارواکرول خالص ۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین حداقل غلظت کشندگی قارچ (MFC) نانوکارواکرول ۳/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کارواکرول ۳۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، مورفولوژی کروی ذرات همراه با نانوکارواکرول و میانگین اندازه ذرات را حدود ۸۰ نانومتر نشان داد.

**نتیجه‌گیری نهایی:** به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر نشان داد نانوامولسیون کارواکرول دارای اثرات ضدقارچی بهتری در مقایسه با کارواکرول علیه قارچ آسپرژیلوس پارازیتیکوس است و این نانوامولسیون در آینده می‌تواند برای کنترل رشد آسپرژیلوس پارازیتیکوس در محصولات دامی استفاده شود.

**کلمات کلیدی:** آسپرژیلوس پارازیتیکوس، کارواکرول، میکرودايلوشن، میکروسکوپ الکترونی، نانوامولسیون

کپی‌رایت © مجله تحقیقات دامپزشکی؛ دسترسی آزاد؛ کپی‌برداری، توزیع و نشر برای استفاده کامل با ذکر منبع آزاد است، © نویسندگان.

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.



نویسنده مسئول: دنیا نیک آئین، گروه میکروبیولوژی و ایمنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

## مقدمه

قارچ‌ها یکی از مهم‌ترین عوامل بیولوژیک دخیل در فساد مواد غذایی به شمار می‌آیند که با تولید سموم مختلف، تهدیدکننده جدی سلامت انسان می‌باشند (۱). *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* از جمله قارچ‌های رشته‌ای می‌باشند که روی انواع فراوانی از مواد آلی فاسدشدنی یافت می‌شوند (۲). ظهور گونه‌های قارچی مقاوم و عوارض جانبی داروهای ضدقارچی، محققین را به گسترش روش‌های جدید درمانی علیه قارچ‌ها وادار کرده است. مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه سمی می‌باشند که برای اعمال طبیعی سلول‌ها ضروری نمی‌باشند. یک گونه قارچ ممکن است مایکوتوکسین‌های مختلف یا مایکوتوکسین شبیه سایر گونه‌ها را تولید کند. اگر شرایط مطلوب باشد، قارچ‌ها زیاد می‌شوند و میزان مایکوتوکسین نیز افزایش می‌یابد.

یکی از مهم‌ترین مایکوتوکسین‌ها، آفلاتوکسین است. آفلاتوکسین‌ها ترکیبات سرطان‌زای قوی می‌باشند که به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه به‌وسیله برخی سویه‌های *آسپرژیلوس فلاووس*، *پارازیتیکوس*، *نومیسوس* و *تاماری* تولید می‌شوند (۳). حداقل ۴ تیپ مختلف آفلاتوکسین در طبیعت تولید می‌شود. آفلاتوکسین‌های  $B_1$  و  $B_2$  به‌وسیله *آسپرژیلوس فلاووس* و *پارازیتیکوس* تولید می‌شوند که آفلاتوکسین  $B_1$  سمی‌ترین نوع آفلاتوکسین است. آفلاتوکسین‌های  $G_1$  و  $G_2$  منحصراً به‌وسیله *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تولید می‌شوند. آفلاتوکسین‌های  $M_1$  و  $M_2$  در شیر گاوهایی که از دانه‌های قارچی تغذیه می‌کنند، وجود دارند. آفلاتوکسین  $M_1$  متابولیت آفلاتوکسین  $B_1$  در انسان‌ها و حیوانات است و آفلاتوکسین  $M_2$  متابولیت آفلاتوکسین  $B_2$  در شیر گاوهایی است که از غذای آلوده تغذیه می‌کنند. در معرض قرار گرفتن با مقدار زیاد آفلاتوکسین باعث نکروزه شدن شدید کبدی و درنهایت سرطان کبد می‌شود. آسیب‌های شدید کبدی با خونریزی، ورم، تغییر در هضم و جذب یا سوخت‌وساز مواد غذایی و تغییرات ذهنی و از دست دادن هوشیاری همراه است. داروهای گیاهی نسبت به داروهای شیمیایی به‌علت داشتن منشأ طبیعی، سازگاری بیشتری با ارگانسیم‌های زنده از جمله بدن انسان دارند (۴). استفاده از گیاهان دارویی و عصاره آن‌ها به‌دلیل عدم عوارض جانبی، در دسترس بودن و همچنین قیمت نسبتاً پایین در حال گسترش است. با توجه به محدود بودن و گران بودن داروهای ضدقارچی موجود در بازار و اثرات سوء شیمیایی و همچنین ایجاد مقاومت دارویی، می‌توان به عصاره گیاهان به‌عنوان داروی مؤثر ضدقارچی اعتماد داشت (۵).

از آنجایی که مصرف ترکیبات گیاهی هیچ‌گونه تأثیر منفی به جای نمی‌گذارد، می‌توان شرایط آزمایشگاهی برون‌تن را به شرایط بدن یا درون‌تن تعمیم داد (۶). کارواکرول ترکیب اصلی گیاهانی، مانند مرزنجوش، آویشن و ترنج وحشی است و خواص مفید این گیاهان نیز به‌دلیل وجود همین ترکیب است. کارواکرول خواص درمانی فراوانی دارد. کارواکرول به‌عنوان ماده آنتی‌اکسیدان، ضداسترس اکسیداتیو و ضدالتهاب قوی شناخته شده است و همچنین اثرات حفاظت نوروئی، کبدی و کلیوی این ماده پلی‌فنولیک در مدل بیماری‌های مختلف مشخص شده است (۷، ۸). علاوه بر این کارواکرول تجمع پلاکتی را مهار می‌کند، قادر است مسیرهای سیگنالینگ درگیر در التهاب و پرولیفراسیون سلولی را نیز تعدیل کند. نقش حفاظتی کارواکرول در بعضی از دستگاه‌های بدن از جمله سیستم تنفس، گوارش و غدد نیز گزارش شده است (۹). خواص ضدقارچی متعددی در خصوص اثرات ضدقارچی گیاهان دارویی مانند شوید، آویشن، گشنیز و گل محمدی بر روی برخی از گیاهان، مانند کلاله زعفران، گیاه خرزهره، اکالیپتوس، مرزنجوش، پیاز، دارچین، زردچوبه، مریم‌گلی، نعناع و همیشه‌بهار اثبات شده است (۱۰، ۱۱). نتایج مطالعات نشان می‌دهد کارواکرول توانایی بالایی در کنترل رشد قارچ‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و تولید سم توسط آن‌ها دارد (۱۲).

قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* از جمله میکروارگانسیم‌های آلوده‌کننده مواد غذایی است که با تولید آفلاتوکسین باعث اثرات زیان‌باری بر انسان و حیوان می‌شود. از جمله راه‌های کنترل این قارچ‌ها جلوگیری از رشد و کنترل آن‌ها بر روی بستر است. کارواکرول را در بازدارندگی از رشد و توکسین‌زایی قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* ارزیابی کردند. نتایج حاصل، حاکی از اثر ترکیبات فوق به‌عنوان ترکیب قارچ‌کش و نگهدارنده ایمن مواد غذایی است (۱۳).

مطالعات فارماکولوژیکی نشان داده‌اند پتانسیل بالا یا آنتی‌اکسیدانی کارواکرول به‌دلیل وجود ترکیبات فنولی، مانند اریگانونزاید است (۱۴)، (۱۵). با وجود تمام مزایا، کاربرد ترکیبات گیاهی با چالش‌های جدی از جمله اثرگذاری نامطلوب بر ارگان‌های غیرهدف و اکسید شدن برخی مواد همراه است. کارواکرول در آب نامحلول ولی در الکل و اتر حل می‌شود (۱۶، ۱۷). مطالعات محققین نشان می‌دهد کارواکرول به‌صورت مولکول‌های کوچک و چربی‌دوست است که به‌راحتی از سد خونی مغزی عبور کرده و اثرات خود را بر قسمت‌های مختلف مغز اعمال می‌کند (۱۸، ۱۹).

همچنین نتایج مطالعات در محیط آزمایشگاهی (*in vitro*) و در داخل بدن موجود زنده (*in vivo*) نشان می‌دهد که کارواکرول دارای خواص مختلف بیولوژیکی و دارویی، مانند آنتی‌اکسیدان، ضدباکتری، ضدقارچ، ضدسرطان، ضدالتهاب، هیپوتاستروئید و اسپاسمولیتیک بودن و همچنین شل‌کننده عروق است (۲۰). باتوجه به خواص متعدد کارواکرول، در طی مطالعه حاضر سعی شده است تا اثر کارواکرول و نانوامولسیون این ترکیب بر مهار رشد و میزان کشندگی این ترکیب در قارچ آسپریلیوس پارازیتیکوس به روش میکروداپلوشن بررسی شود.

## مواد و روش کار

**تهیه کارواکرول:** کارواکرول آماده به‌عنوان ترکیب اصلی اسانس مرزنجوش از شرکت سیگما کشور انگلیس تهیه شد.

**سنتز نانوامولسیون حاوی کارواکرول:** بدین منظور ابتدا ۰/۲ میلی‌لیتر کارواکرول (سیگما، انگلیس) و ۰/۸ میلی‌لیتر سورفکتانت توئین ۸۰ درصد (مرک، آلمان) با یکدیگر ترکیب و با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد. ۲/۳۳ میلی‌لیتر آب دیونیزه به آن اضافه و مخلوط حاضر مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه همگن شد. سپس امولسیون حاصله به مدت نیم‌ساعت با قدرت ۶۰ کیلوهرتز تحت التراسونیک قرار گرفت. جهت تأیید نانوامولسیون کارواکرول از آزمایش‌های DLS و تحلیل Zeta و برای بررسی اندازه و شکل ذرات از میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد (۲۱، ۲۲).

**ارزیابی ویژگی‌های نانوامولسیون کارواکرول تهیه‌شده:** جهت تعیین سایز نانوامولسیون سنتز شده از تحلیل DLS استفاده شد. همچنین جهت تعیین نوع بار سطحی و میزان پایداری، تحلیل Zeta بر روی نمونه انجام شد. به‌منظور تعیین مورفولوژی کروی ذرات نانو و میانگین اندازه ذرات از میکروسکوپ SEM استفاده شد (۲۳).

**تهیه آسپریلیوس پارازیتیکوس:** آسپریلیوس پارازیتیکوس سویه PTCC 5018 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه گردید. سپس در محیط کشت اختصاصی سابرو دکستروز آگار به مدت ۷ روز در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد (۲۴). بعد از رشد انبوه و کنیدی‌زایی قارچ، با افزودن ۰/۹ گرم سدیم کلراید به ۱ لیتر آب مقطر، سرم فیزیولوژی حاصل همراه با توئین ۸۰ درصد به محیط کشت اضافه شد و با ایجاد خراش در شرایط استریل روی محیط کشت، سوسپانسیون قارچ‌ها به دست آمد و توسط لام نئوبار و زیر میکروسکوپ، شمارش کنیدی‌ها انجام شد. کنیدی‌ها در غلظت شمارش کلنی بر میلی‌لیتر  $1 \times 10^6$  تنظیم شدند. در تمام مراحل کار از این سوسپانسیون استفاده شد.

**تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) از رشد به روش میکروداپلوشن:** براساس پروتکل مرجع CLSI روش میکروپلیت داپلوشن و پلیت ۹۶ خانه جهت تعیین MIC نانوامولسیون حاوی کارواکرول و کارواکرول خالص استفاده شد. میزان غلظت ترکیب خالص به‌صورت ۱۰۰ درصد و از غلظت ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای نانو کارواکرول استفاده گردید. به‌طور خلاصه ابتدا، کشت ۷ روزه قارچ در محیط کشت اختصاصی سابورو دکستروز آگار در دمای ۲۸ درجه سانتی‌گراد تهیه گردید. به‌منظور تعیین MIC، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط RPMI1640 در هریک از گوده‌های پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت پایه ترکیبات مورد آزمایش بر روی اولین گوده پلیت ۹۶ خانه ریخته شد و از آن رقت‌های سریال دوتایی (از ۵۰۰۰ الی ۹/۷ غلظت ماده در ۱ میلیون برای نانو کارواکرول) تا گوده ۱۰ تهیه گردید. در نهایت به تمام گوده‌ها از شماره ۱ تا ۱۱، ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون قارچی با غلظت  $10^6$  کنیدی در میلی‌لیتر اضافه شد. گوده ۱۲ به‌عنوان کنترل منفی و گوده ۱۱ به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس پلیت ۹۶ خانه ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. در پایان آخرین گوده‌ای که رشدی در آن دیده نمی‌شد، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. تمام آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد.

**تعیین حداقل غلظت کشندگی کارواکرول و نانوامولسیون کارواکرول (MFC):** بعد از انکوباسیون جهت تعیین MFC مقدار ۲۰ میکرولیتر از محتوای گوده MIC و ۲ گوده قبل از آن، برداشته و در محیط سابورو دکستروز آگار کشت داده شد و ۴۸ ساعت در انکوباتور و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. بالاترین رقت موجود از عصاره که رشد قارچ در آن مشاهده نشد به‌عنوان MFC در نظر گرفته شد.

**نسبت MFC به MIC:** میانگین تأثیرات مهارى رشد و قارچ‌کشی کارواکرول و نانوکارواکرول نسبت به آسپیرژیلوس پارازیتیکوس بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محاسبه شد و بررسی اثر بر قارچ تحت آزمایش به دست آمد. چنانچه این نسبت بالاتر یا مساوی ۴ باشد، ترکیب موردنظر مهارکننده قارچ و در صورتی که پایین‌تر از ۴ باشد، ترکیب موردنظر قارچ‌کش در نظر گرفته می‌شد.

**تجزیه و تحلیل آماری نتایج:** تمام آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  خطای استاندارد (SE) نمایش داده شدند. به منظور تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از مطالعه حاضر از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون تحلیل واریانس دوطرفه استفاده شد ( $P < 0.05$ ).

## نتایج

**ارزیابی ویژگی‌های نانوامولسیون کارواکرول تهیه‌شده:** جهت تعیین سایز نانوامولسیون سنتز شده از تحلیل DLS استفاده شد. طبق نتیجه حاصله، نمونه دارای اندازه ۸۸/۵ نانومتر است که بنابر نتایج اعلام‌شده در مقالات متعدد، به مقدار ایدئال نزدیک است (جدول ۱).

همچنین جهت تعیین نوع بار سطحی و میزان پایداری، تحلیل Zeta بر روی نمونه انجام شد. طبق نتیجه حاصله نوع بار سطحی منفی است که به ماده امولسیون‌کننده بستگی دارد و میزان بار سطحی آن ۱۶/۵ میلی‌ولت است که در مقیاس قابل‌قبول است (جدول ۲). تصاویر SEM، مورفولوژی کروی ذرات و میانگین اندازه ذرات را حدود ۸۰ نانومتر نشان داد (تصویر ۱).

**تعیین حداقل غلظت مهارکننده رشد (MIC):** حداقل غلظت مهار از رشد به عنوان کم‌ترین غلظتی از نانوامولسیون و اسانس مورد مطالعه که قادر به جلوگیری از رشد قارچ مورد مطالعه است، تعریف می‌شود. نتایج بررسی MIC نانوامولسیون حاوی کارواکرول و کارواکرول خالص با روش میکروپلیت دایلوژن برای قارچ آسپیرژیلوس پارازیتیکوس تعیین شد. بررسی نتایج نشان داد حداقل غلظت مهارکنندگی رشد قارچ آسپیرژیلوس پارازیتیکوس در حضور نانوکارواکرول ۰/۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کارواکرول خالص ۹۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر است.

**تعیین حداقل غلظت کشندگی نانوامولسیون کارواکرول (MFC):** حداقل غلظت کشندگی ترکیبات مورد استفاده (MFC) در حضور نانوکارواکرول ۳/۹ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کارواکرول تنها ۳۹۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

**تعیین نسبت MFC/MIC:** در مطالعه حاضر نسبت MFC به MIC در هر ۲ ترکیب کارواکرول و نانوکارواکرول علیه قارچ آسپیرژیلوس پارازیتیکوس برابر با ۴ بود که می‌توان گفت هر ۲ ترکیب خاصیت مهار رشد قارچ (فانجیستات) را دارند.

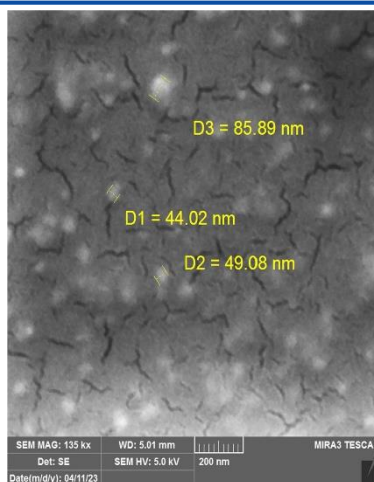
**تعیین ویژگی‌های نانوامولسیون کارواکرول:** طبق نتیجه حاصله، نمونه دارای اندازه ۸۸/۵ نانومتر بود که بنابر نتایج اعلام‌شده در مقالات متعدد، به مقدار ایدئال نزدیک بود (جدول ۱). طبق نتیجه حاصله نوع بار سطحی هیست بود که به ماده امولسیون‌کننده بستگی داشت و میزان بار سطحی آن ۱۶/۵ میلی‌ولت بود که در مقیاس قابل‌قبول است (جدول ۲). تصاویر SEM، مورفولوژی کروی ذرات و میانگین اندازه ذرات را حدود ۸۰ نانومتر نشان داد (تصویر ۱).

جدول ۱. تعیین سایز نانوامولسیون سنتز شده از روش تحلیل DLS.

شماره ماکزیمم	نسبت سطح S.P.	میانگین کل	میانگین	مود
۱	۱	۸۵/۵ نانومتر	۱۶/۸ نانومتر	۸۷/۷ نانومتر
۲	---	---	---	---
۳	---	---	---	---
مجموع	۱	۸۵/۵ نانومتر	۱۶/۸ نانومتر	۸۷/۷ نانومتر

جدول ۲. تعیین نوع بار سطحی و میزان پایداری، تحلیل Zeta.

شماره ماکزیمم	پتانسیل Zeta	تحرك الكترو كوچي
۱	۱۶/۵ - میلی‌ولت	۰/۰۰۰۰۸۵ - سانتی‌متر مربع بر ولت ثانیه
۲	---	---
۳	---	---



تصویر ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی ذرات نانوکارواکرویل.

## بحث

باتوجه به نتایج مطالعه حاضر، خاصیت ضدقارچی نانوامولسیون مورد استفاده به روش میکروپلیت دایلوژن علیه قارچ آسپیرژیلوس پارازیتیکوس کمتر از اسانس کارواکرویل بوده است.

از نتایج مطالعه حاضر همراه با یافته‌های مطالعات تکمیلی جهت تولید داروهای حاصل از نانوکارواکرویل و کارواکرویل جهت درمان بیماری‌های ناشی از آسپیرژیلوس پارازیتیکوس جدا یا همراه با داروهای شیمیایی می‌توان استفاده کرد (۲۵-۲۸).

Abbasi و همکاران در سال ۲۰۱۸ با ارزیابی فعالیت ضدقارچی اسانس‌های آویشن، رزماری و مرزه دریافتند که این ترکیبات قادر به بهبود تیترا آنتی‌بادی علیه ویروس نیوکاسل می‌باشند. همچنین استفاده از جیره‌های حاوی اسانس‌های آویشن، رزماری و مرزه سطح لیپوپروتئین با چگالی بالای سرم خون را افزایش و سطح لیپوپروتئین با چگالی پایین خون را کاهش داد. به‌علاوه غلظت‌های کلسترول و تری‌گلیسیرید در تیمار بدون آنتی‌اکسیدان افزایش معنی‌داری داشت. همچنین نسبت باکتری‌های *اشرشیاکلی* به *لاکتوباسیل*‌ها، در تیمارهای حاوی اسانس رزماری و آویشن نسبت به تیمار بدون آنتی‌اکسیدان کاهش معنی‌داری داشت (۲۹). در مطالعه Shahvardi و همکاران در سال ۲۰۱۹ فعالیت ضدقارچی و قدرت مهارکنندگی و کشندگی اسانس گیاهان دارویی، شامل زیره سبز، رازیانه و گلپر ایرانی بر روی سم زرننون خوراک دام بررسی شد. نتایج نشان داد اسانس این ۳ گیاه دارای فعالیت ضدقارچی و قدرت مهارکنندگی و کشندگی بر روی سم زرننون در شیرابه شکمبه گاو بود (۳۰).

در مطالعه Qu و همکاران در سال ۲۰۲۱، اثر ضد میکروبی کارواکرویل بر آسپیرژیلوس فلاووس و کاهش بیان ژن *aflr* در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین بررسی شد. نتایج آزمایش‌های MIC و MFC نشان داد که کارواکرویل به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۳/۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به ترتیب قادر به مهار رشد قارچ به میزان ۳۳ درصد و ۶۷ درصد نسبت به غیاب کارواکرویل است. نتایج مطالعه اشاره شده نشان داد که کارواکرویل دارای فعالیت ضد میکروبی در مقابل آسپیرژیلوس فلاووس نیز می‌باشد. نتیجه RT-PCR نشان داد سطح بیان ژن *aflr* هم کاهش می‌یابد (۳۱).

در مطالعه Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۹، فعالیت ضدقارچی تیمول و کارواکرویل در برابر پاتوژن‌های قارچ *بوتریتیس سینرا* بررسی شد. نتایج نشان داد تیمول و کارواکرویل فعالیت ضدقارچی قوی علیه پاتوژن موردنظر با حداقل غلظت بازدارنده و حداقل غلظت قارچ‌کش ۶۵ میلی‌گرم در لیتر و ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر برای تیمول و ۱۲۰ میکرولیتر در لیتر و ۱۴۰ میکرولیتر در لیتر برای کارواکرویل از خود نشان دادند. تیمول و کارواکرویل مورفولوژی *بوتریتیس سینرا* را با مختل کردن و تخریب میسلیم از طریق میکروسکوپ الکترونی روشی تغییر دادند. نفوذپذیری غشای *بوتریتیس سینرا* با افزایش غلظت ۲ عامل شیمیایی تحریک شد. همچنین با افزایش رسانایی خارج سلولی، آزادسازی اجزای سلولی و کاهش pH خارج سلولی مشهود است. علاوه بر این، کاهش قابل توجهی در محتوای کل چربی سلول‌های *بوتریتیس سینرا* توسط ۲ عامل شیمیایی ایجاد شد که نشان می‌دهد ساختارهای غشای سلولی تخریب شده‌اند؛ بنابراین نتایج



حاضر نشان داد تیمول و کارواکرول می‌توانند به‌عنوان جایگزین مناسبی برای قارچ‌کش‌های معمولی علیه بوتریتیس سینرا/ در کنترل کپک‌های خاکستری در محصولات باغبانی استفاده شوند (۳۲).

در مطالعه حاضر، نتایج آزمایش‌های MIC و MFC نانوکارواکرول به‌ترتیب در غلظت‌های ۰/۹۷ و ۳/۹ میکروگرم بر میکرولیتر مشاهده شد که نشان‌دهنده تأثیر قابل‌ملاحظه نانوذرات همراه با کارواکرول بود و تصاویر SEM، مورفولوژی کروی ذرات را همراه با نانوکارواکرول و میانگین اندازه ذرات را حدود ۸۰ نانومتر نشان داد.

**نتیجه‌گیری نهایی:** به‌طور کلی نتایج مطالعه حاضر اثر ضدقارچی ذرات نانو حاوی کارواکرول با برخورداری از ویژگی‌های مناسب فیزیکوشیمیایی افزایش پایداری دارو را روی آسپرژیلوس پارازیتیکوس ثابت کرد. تمام غلظت‌های استفاده‌شده از نانوکارواکرول تأثیر مہاری بر رشد قارچ داشتند، هم‌چنین در مطالعه حاضر حداقل غلظت میزان کشندگی نانو کارواکرول نسبت به کارواکرول بر سموم آفلاتوکسین قارچ بیشتر بود و می‌تواند نشان‌دهنده این موضوع باشد که مواد مؤثر نانو همراه با کارواکرول تأثیرگذاری بیشتری دارند و می‌تواند یک عامل ضدقارچ امیدوارکننده با اثرات ضدقارچ بالا و عوارض جانبی کم باشد.

## سپاسگزاری

مطالعه حاضر، حاصل پایان‌نامه دکتری تخصصی تصویب و اجراشده در دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران است (شماره گزنت: 30792/6/5).

## تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

## References

1. Garcia-Diaz M, Patino B, Vázquez C, Gil-Serna J. A novel niosome-encapsulated essential Oil formulation to prevent aspergillus flavus growth and aflatoxin contamination of maize grains during storage. *Toxins*. 2019;11(11):646. doi: 10.3390/toxins11110646 PMID: 31698851
2. Priesterjahn E-M, Geisen R, Schmidt-Heydt M. Influence of light and water activity on growth and mycotoxin formation of selected isolates of aspergillus flavus and aspergillus parasiticus. *Microorganisms*. 2020;8(12):2000. doi: 10.3390/microorganisms8122000 PMID: 33333925
3. Al-Huqail A, Behiry S, Z.M. Salem M, M. Ali H, Siddiqui M, Z. M. Salem A. Antifungal, antibacterial, and antioxidant activities of acacia saligna (labill.) h. l. wendl. flower Extract: HPLC analysis of phenolic and flavonoid compounds. *Molecules*. 2019;24(4):700. doi: 10.3390/molecules24040700 PMID: 30781352
4. Kuo L-M Y, Tseng P-Y, Lin Y-C, Liaw C-C, Zhang L-J, Tsai K-C, et al. New hirsutinolide-type sesquiterpenoids from vernonia cinerea inhibit nitric oxide production in LPS-stimulated RAW264.7 cells. *Planta Med*. 2018;84(18):1348-1354. doi: 10.1055/a-0647-1901 PMID: 29986352
5. Rad BZ, Mardjanmehr H, Sasani F, Khosravi A, Gharagozlou MJ. Evaluation of skin repairing and antifungal properties of alcoholic extract of laleh abbasi (mirabilis jalapa) leaf on induced wounds in laboratory white rat model. *J Vet Res*. 2023;78(1):9-19. doi: 10.22059/jvr.2022.340558.3247 (In Persian)
6. Han B, Fu G-W, Wang J-Q. Inhibition of essential oils on growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin B1 production in broth and poultry feed. *Toxins*. 2022;14(10):655. doi: 10.3390/toxins14100655 PMID: 36287924
7. Mirazi N, Movassagh S-N, Rafieian-Kopaei M. The protective effect of hydro-alcoholic extract of mangrove (*Avicennia marina* L.) leaves on kidney injury induced by carbon tetrachloride in male rats. *J Nephropathol*. 2016;5(4):118-122. doi: 10.15171/jnp.2016.22 PMID: 27921022

8. Achar P.N, Quyen P, Adukwu E.C, Sharma A, Msimanga H.Z, Nagaraja H, et al. Investigation of the antifungal and anti-aflatoxigenic potential of plant-based essential oils against aspergillus flavus in peanuts. J Fungi. 2020;6(4):383. [doi: 10.3390/jof6040383](https://doi.org/10.3390/jof6040383) PMID: 33371318
9. Kaeidi A, Rahmani M R, Hassanshahi J. The protective effect of carvacrol and thymol as main polyphenolic compounds of thyme on some biologic systems in disease condition: a narrative review. J Rafsanjan Uni Med Sci. 2020;19(1): 81-96. [doi: 10.29252/jrums.19.1.81](https://doi.org/10.29252/jrums.19.1.81) (In Persian)
10. Khalil N, Ashour M, Fikry S, Singab A. N, Salama O. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of selected *Apiaceous fruits*. Future J Pharm Sci. 2018;4(1):88-92. [doi: 10.1016/j.fjps.2017.10.004](https://doi.org/10.1016/j.fjps.2017.10.004)
11. Kos J, Hajnal E.J, Saric B, Jovanov P, Mandic A, Duragic O, Kokic B. Aflatoxins in maize harvested in the republic of Serbia over the period 2012–2016. Food Addit Contam Part B Surveill. 2018;11(4):246-255. [doi: 10.1080/19393210.2018.1499675](https://doi.org/10.1080/19393210.2018.1499675) PMID: 30157711
12. Singh V.K, Das S, Dwivedy A.K, Rathore R, Dubey K.N. Assessment of chemically characterized nanoencapsulated *Ocimum sanctum* essential oil against aflatoxigenic fungi contaminating herbal raw materials and its novel mode of action as methyglyoxal inhibitor. Postharvest Biol Technol. 2019;153:87-95. [doi: 10.1016/j.postharvbio.2019.03.022](https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2019.03.022)
13. Zheljzkov D.V, Kacaniova M, Dincheva I, Radoukova T, Semerdjieva B. I, Astatkie T, et al. Essential oil composition, antioxidant and antimicrobial activity of the galbuli of six juniper species. Ind Crops Prod. 2018;124:449-458. [doi: 10.1016/j.indcrop.2018.08.013](https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.08.013)
14. Cui Q, Huang Y, Wang H, Fang T. Diversity and abundance of bacterial pathogens in urban rivers impacted by domestic sewage. Environ Pollut. 2019;249:24-35. [doi: 10.1016/j.envpol.2019.02.094](https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.02.094) PMID: 30877966
15. Gao W, Chen Y, Zhang Y, Zhang Q, Zhang L. Nanoparticle-based local antimicrobial drug delivery. Adv Drug Deliver Rev. 2018;127:46-57. [doi: 10.1016/j.addr.2017.09.015](https://doi.org/10.1016/j.addr.2017.09.015) PMID: 28939377
16. Zasadzinski J.A, Wong B, Forbes N, Braun G, Wu G. Novel methods of enhanced retention in and rapid, Targeted Release from liposomes. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2011;16(3):203-214. [doi: 10.1016/j.cocis.2010.12.004](https://doi.org/10.1016/j.cocis.2010.12.004) PMID: 21603081
17. Ouedrhiri W, Mounyr B, Harki El-H, Moja S, Greche H. Synergistic antimicrobial activity of two binary combinations of marjoram, lavender, and wild thyme essential oils. Int J Food Prop. 2017;20(12):3149-3158. [doi: 10.1080/10942912.2017.1280504](https://doi.org/10.1080/10942912.2017.1280504)
18. S. Ghosh S, Saha S, Sengupta D, Chattopadhyay S, De G, Basu B. Stabilized Cu<sub>2</sub>O nanoparticles on macroporous polystyrene resins [Cu<sub>2</sub>O@ARF Improved and reusable heterogeneous catalyst for on-water synthesis of triazoles via click reaction. Ind Eng Chem Res. 2017;56(41):11726-11733. [doi: 10.1021/acs.iecr.7b02656](https://doi.org/10.1021/acs.iecr.7b02656)
19. Hembach N, Schmid F, Alexander J, Hiller C, Rogall E.T, Schwartz T. Occurrence of the mcr-1 colistin resistance gene and other clinically relevant antibiotic resistance genes in microbial populations at different municipal wastewater treatment plant in Germany. Front Microbiol. 2017;8:1282. [doi: 10.3389/fmicb.2017.01282](https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01282) PMID: 28744270
20. Suntres ZE, Coccimiglio J, Alipour M. The bioactivity and toxicological actions of carvacrol. Crit Rev Food Sci Nutr. 2015;55(3):304-318. [doi: 10.1080/10408398.2011.653458](https://doi.org/10.1080/10408398.2011.653458) PMID: 24915411
21. Fan K, Li X, Cao Y, Qi H, Li L, Zhang Q, et al. Carvacrol inhibits proliferation and induces apoptosis in human colon cancer cells. Anticancer Drugs. 2015;26(8):813-823. [doi: 10.1097/CAD.0000000000000263](https://doi.org/10.1097/CAD.0000000000000263) PMID: 26214321
22. Haghirsadat F, Amoabediny G, Sheikhha MH, Forouzanfar T, Helder MN, Zandieh-Doulabi B. A novel approach on drug delivery: Investigation of a new nano-formulation of liposomal doxorubicin and



- biological evaluation of entrapped doxorubicin on various osteosarcoma cell lines. *Cell J.* 2017;19(1):55-65. [doi: 10.22074/cellj.2017.4502](https://doi.org/10.22074/cellj.2017.4502) PMID: 28580308
23. Noorani B, Tabandeh F, Yazdian F, Soheili ZS, Shakibaie M, Rahmani Sh. Thin natural gelatin/chitosan nanofibrous scaffolds for retinal pigment epithelium cells. *Int J Polymeric Mater.* 2018;67(12):754-63. [doi: 10.1080/00914037.2017.1362639](https://doi.org/10.1080/00914037.2017.1362639)
24. Garcia D, Ramos A.J, Sanchis V, Marín S. Modeling kinetics of aflatoxin production by *aspergillus flavus* in maize-based medium and maize grain. *Int J Food Microbiol.* 2013;162(2):182-189. [doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.004](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.004) PMID: 23422844
25. Hashemi S, Ganjkanloo M, Rezayazdi K, Zali A, Rafipour R, Amini M. Study of selenium nanoparticles synthesis and investigation of its effect compared with other selenium sources on the blood parameters associated with the liver functional index of holstein dairy cow. *J Vet Res.* 2020;75(1):17-25. [doi: 10.22059/jvr.2018.237237.2661](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.237237.2661) (In Persian)
26. Zargar A, Ardeshiri M, Khosravi A, Taheri Mirghaed A, Akbarein H, Ahmadpour M, et al. Study of in-vitro antimicrobial effects of *origanum vulgare* and *echinacea purpurea* essential oils on *lactococcus garvieae*. *J Vet Res.* 2023;77(4):213-220. . [doi: 10.22059/jvr.2022.276558.2910](https://doi.org/10.22059/jvr.2022.276558.2910) (In Persian)
27. Maghsoudi A, Saeidi S. Evaluation of antimicrobial activity of ethanol extract of nine zagros native medicinal plants against *Salmonella typhimurium*. *J Vet Res.* 2020;75(3):380-389. [doi: 10.22059/jvr.2019.266899.2857](https://doi.org/10.22059/jvr.2019.266899.2857) (In Persian)
28. Jiao Y, Niu L-N, Ma S, Li J, Tay F.R, Chen j-H. Quaternary ammonium-based biomedical materials: state-of-the-arts, toxicological aspects and antimicrobial resistance. *Prog Polym Sci.* 2017;71:53-90. [doi: 10.1016/j.progpolymsci.2017.03.001](https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2017.03.001) PMID: 32287485
29. Abbasi M.A, Ghazanfari S, Sharif S.D, Ahmadi Gavlighi H. The effect of rosemary, thymus and satreja essential oils, vitamin E and vegetable oils on immune system and intestinal microflora of broiler chicken. *J Vet Res.* 2019;74(2):153-166. [doi: 10.22059/jvr.2018.240068.2688](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.240068.2688) (In Persian)
30. Shahvardi M, Farzaneh M, Nejad-Ebrahimi S, Soltani-Oshyani A. The destructive effects of essential oil and extracts of some medicinal plants (*Apiaceae family*) on the reduction of zearalenone in Rumen fluid. *J Vet Res.* 2019;74(3):360-368. [doi: 10.22059/jvr.2018.248695.2745](https://doi.org/10.22059/jvr.2018.248695.2745) (In Persian)
31. Qu C, Li Z, Wang X. UHPLC-HRMS-based untargeted lipidomics reveal mechanism of antifungal activity of carvacrol against *aspergillus flavus*. *Foods.* 2021;11(1):93. [doi: 10.3390/foods11010093](https://doi.org/10.3390/foods11010093) PMID: 35010219
32. Zhang J, Ma S, Du S, Chen S, Sun H. Antifungal activity of thymol and carvacrol against postharvest pathogens *Botrytis cinerea*. *J Food Sci Technol.* 2019;56(5):2611-2620. [doi: 10.1007/s13197-019-03747-0](https://doi.org/10.1007/s13197-019-03747-0) PMID: 31168143