Journal of Veterinary Research
University of Tehran Press
Homepage: jvr.ut.ac.ir
Online ISSN: 2251-6190
Original Article

J Vet Res, Volume 79, Number 2, 2024, 91-99

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

Sara Mohammadnejad[1]✉, Donya Nikaein[2,3]✉, Alireza Khosravi[2,3]✉, Aghil Sharifzadeh[2,3]✉, Javad Malakoutikhah[4]✉

[1] *Graduated from the Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[2] *Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[3] *Mycology Research Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran*
[4] *Graduated from the Faculty of New Scíense and Recnology, University of Tehran, Tehran, Iran*

***Received:** 14 February 2024, **Accepted:** 15 April 2024*

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 µg/ml for nano-carvacrol and 97 µg/ml for pure carvacrol. Also, the MFC was 3.9 µg/ml for nano-carvacrol and 390 µg/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

 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*. Journal of Veterinary Research, 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.

مجله تحقیقات دامپزشکی
Homepage: jvr.ut.ac.ir
شاپا الکترونیکی: ۲۲۵۱-۶۱۹۰
انتشارات دانشگاه تهران
مقاله پژوهشی

دوره ۷۹، شماره ۲، ۱۴۰۳، ۹۹-۹۱

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

سارا محمدنژاد[۱]، دنیا نیک‌آئین[۲،۳]، علیرضا خسروی[۲،۳]، عقیل شریف‌زاده[۲،۳]، جواد ملکوتی‌خواه[۴]

[۱] *دانش آموخته دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۲] *گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۳] *مرکز تحقیقات قارچ‌شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران*
[۴] *دانش آموخته دانشکده علوم فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران*

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

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.

روش‌کار: در مطالعه حاضر تجربی‌آزمایشگاهی، براساس روش میکرودایلوشن مطابق با آخرین نسخه از روش‌های استاندارد CLSI، پروتکل M38-A2 اصلاح‌شده، 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 ازنظر مورفولوژی سطح با روش میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) تعیین شد و همچنین از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون تحلیل واریانس دوطرفه جهت تجزیه‌وتحلیل اطلاعات استفاده شد (P<۰/۰۵).

نتایج: در مطالعه حاضر مشاهده شد نانوکارواکرول نسبت به کارواکرول دارای اثر ضدقارچی بیشتری علیه *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* بود. براین‌اساس 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: به‌طورکلی 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، میکرودایلوشن، میکروسکوپ الکترونی، نانوامولسیون

نویسنده مسئول: دنیا نیک‌آئین، گروه میکروبیولوژی و ایمونولوژی، 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* ازجمله 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*، *نومیوس* 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 ارگانیسم‌های زنده ازجمله 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. باتوجه‌به 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).

ازآنجایی‌که 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 نورونی، کبدی و کلیوی این ماده پلی‌فنولیک در مدل بیماری‌های مختلف مشخص شده است (۷، ۸). علاوه‌براین 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 ازجمله سیستم تنفس، گوارش و غدد نیز گزارش شده است (۹). خواص ضدقارچی متعددی درخصوص 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* ازجمله میکروارگانیسم‌های آلوده‌کننده مواد غذایی است که با تولید آفلاتوکسین باعث اثرات زیان‌باری بر انسان و حیوان می‌شود. ازجمله 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 اریگانوزاید است (۱۴، ۱۵). با وجود تمام مزایا، کاربرد ترکیبات گیاهی با چالش‌های جدی ازجمله 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، هپاتواستروئید و اسپاسمولیتیک بودن و همچنین شل‌کننده عروق است (۲۰). باتوجه‌به 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 *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* به روش میکرودایلوشن 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 به‌مدت ۱۰ دقیقه هم زده شد. ۲/۳۳ میلی‌لیتر آب دیونیزه به آن اضافه و مخلوط حاضر مجدداً به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰ دور در دقیقه همگن شد. سپس امولسیون حاصله به‌مدت 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 سنتزشده 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 آسپرژیلوس پارازیتیکوس: *آسپرژیلوس پارازیتیکوس سویه* PTCC 5018 از مرکز کلکسیون میکروارگانیسم‌های صنعتی ایران تهیه گردید. سپس در محیط کشت اختصاصی سابرو دکستروز آگار به‌مدت 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 آب‌مقطر، 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 1×10^{6} تنظیم شدند. در تمام مراحل کار از این سوسپانسیون استفاده شد.

تعیین حداقل غلظت مهارکننده (MIC) از رشد به روش میکرودایلوشن: براساس پروتکل مرجع CLSI روش میکروپلیت دایلوشن و پلیت ۹۶ خانه جهت تعیین MIC نانوامولوسیون 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 سانتی گراد 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 موردآزمایش 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 کارواکرول و از ۵۰۰ الی ۰/۹۷ غلظت ماده در ۱ میلیون برای نانوکارواکرول) تا گوده ۱۰ تهیه گردید. درنهایت 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 مهاری رشد و قارچ‌کشی کارواکرول و نانوکارواکرول نسبت به *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* برحسب 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 درصورتی‌که پایین‌تر از ۴ باشد، ترکیب موردنظر قارچ‌کش در نظر گرفته می‌شد.

تجزیه‌وتحلیل آماری نتایج: تمام آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. داده‌ها به‌صورت میانگین±خطای استاندارد (SE) نمایش داده شدند. به‌منظور تجزیه‌وتحلیل داده‌های حاصل از مطالعه حاضر از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱ و آزمون تحلیل واریانس دوطرفه استفاده شد (P<۰/۰۵).

نتایج

ارزیابی ویژگی‌های نانوامولسیون کارواکرول تهیه‌شده: جهت تعیین سایز نانوامولسیون سنتزشده 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 نانوامولوسیون حاوی کارواکرول و کارواکرول خالص با روش میکروپلیت دایلوشن برای قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تعیین شد. بررسی نتایج نشان داد حداقل غلظت مهارکنندگی رشد قارچ *آسپرژیلوس 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 مورداستفاده (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 *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* برابر با ۴ بود که می‌توان گفت هر ۲ ترکیب خاصیت مهار رشد قارچ (فانجیستات) را دارند.

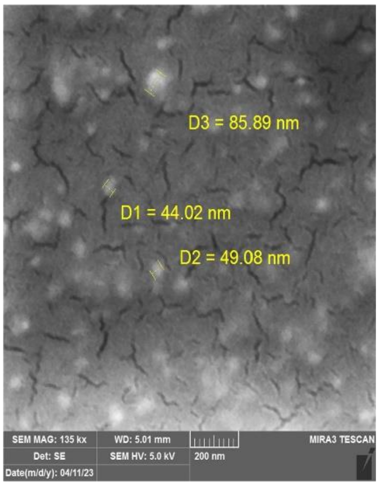
تعیین ویژگی‌های نانوامولسیون کارواکرول: طبق نتیجه حاصله، نمونه دارای اندازه ۸۸/۵ نانومتر بود که بنابر نتایج اعلام‌شده در مقالات متعدد، به مقدار ایدئال نزدیک بود (جدول ۱). طبق نتیجه حاصله نوع بار سطحی هیست بود که به ماده امولسیون‌کننده بستگی داشت و میزان بار سطحی آن ۱۶/۵ میلی‌ولت بود که در مقیاس قابل‌قبول 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 سنتزشده 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	---	---نانومتر	---نانومتر	---نانومتر
۳	---	---نانومتر	---نانومتر	---نانومتر
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	تحرک الکتروکوچی
۱	۱۶/۵- میلی‌ولت	۰/۰۰۰۰۸۵- سانتی‌متر مربع بر ولت ثانیه
۲	---میلی‌ولت	--- سانتی‌متر مربع بر ولت ثانیه
۳	---میلی‌ولت	--- سانتی‌متر مربع بر ولت ثانیه



تصویر ۱. تصویر میکروسکوپ الکترونی ذرات نانوکارواکرول.

بحث

باتوجه به نتایج مطالعه حاضر، خاصیت ضدقارچی نانوامولسیون مورد استفاده به روش میکروپلیت دایلوشن علیه قارچ *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* کمتر از اسانس کارواکرول بوده است.

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

Abbasi و همکاران در سال ۲۰۱۸ با ارزیابی فعالیت ضدقارچی اسانس‌های آویشن، رزماری و مرزه دریافتند که این ترکیبات قادر به بهبود تیتر 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 تری‌گلیسرید در تیمار بدون آنتی‌اکسیدان افزایش معنی‌داری داشت. همچنین نسبت باکتری‌های *اشرشیاکلی* به لاکتوباسیل‌ها، 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 زرالنون خوراک دام بررسی شد. نتایج نشان داد اسانس این ۳ گیاه دارای فعالیت ضدقارچی و قدرت مهارکنندگی و کشندگی بر روی سم زرالنون در شیرابه شکمبه گاو بود (۳۰).

در مطالعه Qu و همکاران در سال ۲۰۲۱، اثر ضدمیکروبی کارواکرول بر *آسپرژیلوس فلاووس* و کاهش بیان ژن aflr در مسیر بیوسنتز آفلاتوکسین بررسی شد. نتایج آزمایش‌های MIC و MFC نشان داد که کارواکرول 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 کارواکرول است. نتایج مطالعه اشاره شده نشان داد که کارواکرول دارای فعالیت ضدمیکروبی در مقابل *آسپرژیلوس 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 کارواکرول در برابر پاتوژن‌های قارچ *بوتریتیس سینرا* بررسی شد. نتایج نشان داد تیمول و کارواکرول 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 کارواکرول از خود نشان دادند. تیمول و کارواکرول مورفولوژی *بوتریتیس سینرا* را با مختل کردن و تخریب میسلیوم ازطریق میکروسکوپ الکترونی روبشی تغییر دادند. نفوذپذیری غشای *بوتریتیس سینرا* با افزایش غلظت ۲ عامل شیمیایی تحریک شد. همچنین با افزایش رسانایی خارج‌سلولی، آزادسازی اجزای سلولی و کاهش pH خارج‌سلولی مشهود است. علاوه‌براین، کاهش قابل‌توجهی 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: به‌طورکلی 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 مهاری بر رشد قارچ داشتند، هم چنین 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 گرنت: 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. Microogranisms. 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 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 (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

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 PMID: 30157711

12. Singh V.K, Das S, Dwivedy A.K, Rathore R, Dubey K.N. Assessment of chemically characterized nanoencapuslated *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

13. Zheljazkov 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

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 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 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 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

18. S. Ghosh S, Saha S, Sengupta D, Chattopadhyay S, De G, Basu B. Stabilized Cu_2O nanoparticles on macroporous polystyrene resins [cu_2o@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

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 Ge4many. Front Microbiol. 2017;8:1282. doi: 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 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 PMID: 26214321

22. Haghiralsadat 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 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

24. Garcia D, Ramos A.J, Sanchis V, MarÌn S. Modeling kinetics of aflatoxin production by aspergillus flavus in maize-based medium and maize grain. Int J Food Microbial. 2013;162(2):182-189. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.01.004 PMID: 23422844

25. Hashemi S, Ganjkhanloo 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 (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 (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 (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 PMID: 32287485

29. Abbasi M.A, Ghazanfari S, Sharif S.D, Ahmadi Gavlighi H. The effect of rosemary, thymus and satureja 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 (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 (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 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 PMID: 31168143