Study of Antifungal Synergism Effects of Chitosan with Thymol, Carvacrol and Isothiocyanate against *Candida Albicans*

Shohreh Fahimirad[1], Ehasn Zarei Mehrvarz[2], Samira Sadelaji[3], Maryam Parhamfar[4], Mojtaba Didehdar[5], Hamid Abtahi[6]

1. Assistant Professor, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ORCID ID: 0000-0002-9991-0869.
2. MSc student, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ORCID ID: 0000-0002-0065-0420.
3. MSc student, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ORCID ID:0000-0001-6573-8987.
4. MSc, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ORCID ID: 0000-0002-7085-5712.
5. Assistant Professor, Department of Medical Parasitology and Mycology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. ORCID ID: 0000-0003-4677-4768.
6. Professor, Molecular and Medicine Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran. (Corresponding Author), Email: abtahi@arakmu.ac.ir, Tel: 086-34173502, ORCID ID: 0000-0002-3247-3289.

ABSTRACT

Background and Aim: Prevalence of drug resistance in *Candida Albicans* hinders common treatments with conventional antifungal drugs. A stockpile of research is being done to discover novel antifungal drugs. Chitosan has emerged as a promising antimicrobial and biodegradable polymer with various medical applications. The significant antimicrobial potential of some of the secondary metabolites from plants has been confirmed in several studies. Thymol, Carvacrol and Isothiocyanate are three plant secondary metabolites with strong antifungal properties. In this study, the synergistic effect of Thymol, Carvacrol and Isothiocyanate with chitosan against *C. Albicans* was tested.

Materials and Methods: The minimum inhibitory concentration and synergistic effects of chitosan with Thymol, Carvacrol and Isothiocyanate were assessed in checkerboard assay. The minimum fungicidal concentrations against *C. Albicans*, time kill assay and growth curve were tested subsequently.

Results: The results of the checkerboard test confirmed the synergistic effects of chitosan with all three investigated plant metabolites. The Chitosan- Thymol combination represented the most effective antifungal activities against *C. Albicans* based on the time kill and growth curve assay results.

Conclusion: Chitosan- Thymol combination can be a promising compound for control of C. albicans. Chitosan- Thymol combination sharply declined the number of viable cells during the first two hours. This ability can be tested in further studies as a biopolymer or nano-capsulated drug.

Keywords: Chitosan, Thymol, Carvacrol, Isothiocyanate, *C. Albicans*

Received: May 18, 2019 **Accepted:** Jan 12, 2021

How to cite the article: Shohreh Fahimirad, Ehasn Zarei Mehrvarz, Samira Sadelaji, Maryam Parhamfar, Mojtaba Didehdar, Hamid Abtahi. Study of Antifungal Synergism Effects of Chitosan with Thymol, Carvacrol and Isothiocyanate against *Candida albicans* .ŚJKU 2021;26(1):40-52.

Copyright © 2018 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBYNC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و شش / فروردین و اردیبهشت ۱۴۰۰/۵۲-۴۰

مطالعه اثرات هم افزایی ضد قارچی کیتوزان با تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلبیکنس

شهره فهیمی راد[۱]، احسان زارعی مهرورز[۲]، سمیرا سادلجی[۳]، مریم پرهام فر[۴]، مجتبی دیده دار[۵]، حمید ابطحی[۶]

۱. استادیار، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. کد ارکید: ۰۸۶۹-۹۹۹۱-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. کد ارکید: ۰۴۲۰-۰۰۶۵-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. کد ارکید: ۸۹۸۷-۶۵۷۳-۰۰۰۱-۰۰۰۰

۴. کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. کد ارکید: ۵۷۱۲-۷۰۸۵-۰۰۰۲-۰۰۰۰

۵. استادیار، گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. کد ارکید: ۴۷۶۸-۴۶۷۷-۰۰۰۳-۰۰۰۰

۶. استاد، مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران. (نویسنده مسئول)، پست الکترونیک: abtahi@arakmu.ac.ir ، تلفن:۰۸۶۳۴۱۷۳۵۰۲، کد ارکید: ۳۲۸۹-۳۲۴۷-۰۰۰۲-۰۰۰۰

چکیده

زمینه و هدف: شیوع مقاومت دارویی درکاندیدا آلبیکنس، درمان های رایج با داروهای ضدقارچی متعارف را ناکارآمد ساخته است. تحقیقات زیادی برای کشف داروهای ضدقارچی جدید در حال انجام است. کیتوزان یک پلیمر ضد میکروبی و زیست تجزیه پذیر با کاربردهای مختلف درمانی می باشد. توانایی ضد یکروبی برخی از متابولیت های ثانویه گیاهان در مطالعات مختلف ثابت شده است.تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات سه ماده موثره گیاهی با خواص ضد قارچی قوی هستند. لذا این مطالعه،با هدف بررسی اثرات هم افزایی این سه متابولیت گیاهی با کیتوزان علیه کاندیدا آلبیکنس انجام شد.

مواد و روش‌ها: سنجش حداقل غلظت بازدارندگی و اثرات هم¬افزایی ترکیبات کیتوزان با تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات با روش چکربورد انجام گرفت.در ادامه، حداقل غلظت کشندگی قارچ علیه کاندیدا آلبیکنس، روش کشتن در زمان و منحنی رشد آزمون شدند

یافته‌ها: نتایج حاصل از آزمون چکربورد اثر هم افزایی کیتوزان با هر سه ترکیب گیاهی مورد استفاده را تایید کرد. بر اساس نتایج حاصل از آزمون کشتن در زمان و منحنی رشد، ترکیب کیتوزان- تیمول موثرترین فعالیت کشتن قارچ کاندیدا آلبیکنس را داشت.

نتیجه‌گیری: ترکیب کیتوزان- تیمول، می‌تواند یک ترکیب امیدبخش در کنترل کاندیدا آلبیکنس باشد. ترکیب کیتوزان- تیمول به طور چشمگیری تعداد سلولهای زنده را در دو ساعت اول آزمون کاهش داد. این توانایی می‌تواند در مطالعات بعدی به عنوان پلیمرهای زیستی یا نانوکپسوله های دارویی آزمون شود.

واژه های کلیدی: کیتوزان، تیمول، کارواکرول، ایزوتیوسیانات، کاندیدا آلبیکنس

وصول مقاله: ۹۸/۲/۲۸ اصلاحیه نهایی:۹۹/۹/۲۵ پذیرش:۹۹/۱۰/۲۳

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]

مقدمه

عفونت‌های قارچی نرخ بالایی از مرگ و میر را سبب می‌شوند و بیشتر از ۴۰٪ از عفونت‌های خونی به وسیله کاندیدا آلبیکنس ایجاد می‌شوند. محدودیت تعداد داروهای ضد قارچ فعلی، ظهور سیستماتیک عفونت‌های قارچی را تقویت کرده است و گسترش روز افزون مقاومت دارویی در کاندیدا آلبیکانسنیاز برای داروهای ضد قارچی جدید با مکانیسم عملکردی نوین را افزایش داده است (۱-۳).

فلوکونازول یکی از انواع آزولهاست که مسیر بیوسنتز ارگوسترول را مورد هدف قرار می‌هد و رایج ترین داروی مورد استفاده در مهار رشد گونه‌های کاندیدا می‌باشد. اما درمان طولانی و تکراری سبب ظهور و پیدایش ایزوله‌های مقاوم به فلوکونازول در میان گونه های کاندیدا شده است. این امر به دلیل اثرات متعدد جانبی و مقاومت دارویی به عوامل پاتوژن پس از استفاده طولانی مدت از دارو می‌باشد (۴).

کیتوزان یک پلیمر زیستی است که از داستیله کردن کیتین حاصل میشود و در دیواره خارجی حشرات، پوسته سخت پوستان و دیواره قارچها یافت می‌شود. این پلیمر طبیعی، زیست سازگار و قابل تجزیه در محیط زیست و غیر سمی است و کاربردهای فراوانی در زمینه تحویل دارو و یا حامل آنزیم های مختلف دارد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کیتوزان، این پلیمر را گزینه مناسبی برای کپسوله سازی مواد موثره گیاهی ساخته است (۵). کیتوزان در شرایط اسیدی حلالیت مطلوبی دارد اما در pH بالاتر از ۶/۵ حلالیت آن ناچیز است. کیتوزان دارای فعالیت ضد باکتریایی و ضد قارچی علیه طیف وسیعی از میکروارگانیسم ها می‌باشد. این فعالیتهای ضد میکروبی اغلب به شکل بازدارندگی از رشد باکتری و قارچ است و فعالیت کشندگی آن کمتر به اثبات رسیده است. ثابت شده است که کیتوزان با مداخله در ریخت زایی دیواره سلولی قارچ مانع از رشد قارچها می‌شود (۶-۸).

گیاهان گستره وسیعی از متابولیت های ثانویه با عملکردهای فراوان زیستی مطلوب تولید می‌کنند. متابولیت‌های ثانویه گیاهی کارکرد ویژه‌ای در محافظت گیاهان علیه پاتوژنهای بیماری‌زا و محافظت در برابر تنش‌های غیر زیستی دارند (۹-۱۱).

اثرات متقابل بین مواد موثره گیاهی می‌تواند منجر به اثرات آنتی میکروبی آنتاگونیستیک، افزایشی و یا هم‌افزایی شود. معمولا به کارگیری چند ماده موثره گیاهی با هم می‌تواند سبب اختلال در چند فرآیند بیوشیمیایی مختلف شده و عوامل میکروبی را از بین ببرد. در سالهای اخیر گسترش مقاومت پاتوژن‌ها به آنتی بیوتیک‌های رایج و افزایش علاقه به استفاده از مواد ضدمیکروبی طبیعی، تحقیقات روی اثرات ضدمیکروبی مواد موثره گیاهی را افزایش داده است (۱۲).

تیمول (۲- ایزوپروپیل -۵- متیلفنول) مهمترین منوترپن فنولی جدا شده از گیاهان خانواده *Lamiaceae* شامل آویشن، پونه، ریحان و جنس نعنای وحشی می‌باشد. این ماده از نظر سازمان غذا و دارو در محدوده مواد ایمن و قابل استفاده به عنوان افزودنی‌های غذایی قرار گرفته است (۱۳-۱۵). مطالعات مختلف نشان داده است که تیمول خواص ضدعفونی کننده، ضد التهابی و آنتی کسیداتی قوی دارد. فیبروبلاستها با قرارگیری در غلظتهای مختلف تیمول (۲۵ µg/mL تا ۱۰۰) بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت، تا ۹۶٪ زنده ماندند. فعالیت سیتوتوکسیتی تیمول بر روی سلولهای سلول‌های پرومونوسیت در غلظت بیشتر از ۴۰۰ µg/mL گزارش شده است (۱۶).

کارواکرول نیز یک منوترپن فنولی است که فعالیتهای زیستی مختلفی علیه میکروارگانیسم‌های بیماری زا مقاوم به آنتی بیوتیک مانند استافیلوکوکوس اورئوس مقاوم به متی‌سیلین (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus,* MRSA) دارد و فعالیت ضد قارچی آن علیه بیوفیلم‌های *C.albicans, C. glabrata* و *C. parapsilosis* به اثبات رسیده است (۱۷).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]

ایزوتیوسیانات‌ها ترکیبات طبیعی گرفته شده از خانواده *Cruciferous* هستند که طی تبدیلات آنزیمی از متابولیت-هایی به نام گلوکوزینولاتها به دست می‌آیند. این ترکیبات کاربردهای ضدمیکروبی و ضدقارچی ثابت شده‌ای دارند و سالهاست به عنوان افزودنی در صنایع غذایی استفاده می-شوند (۱۸, ۱۹).

در این مطالعه اثرات هم‌افزایی کیتوزان با سه ماده موثره گیاهی تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلبیکنس سنجیده شد. هدف از این مطالعه یافتن بهترین ماده موثره گیاهی با بیشترین میزان هم‌افزایی با کیتوزان به عنوان یک پلیمر زیستی ضدقارچی علیه کاندیدا آلبیکنس بود تا در مطالعات بعدی به عنوان فیلم‌ها یا نانوکپسولهای ضد-میکروبی به شکل متصل با کیتوزان مورد استفاده قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی در این پروژه از استیک اسید غلیظ، معرف رزوزارین، تیمول، کارواکرول، ایزوتیوسیانات و کیتوزان که از شرکت سیگما کره جنوبی و محیط کشت RPMI-1640 و سابورودکستروز آگار از شرکت مرک آلمان استفاده گردید .فعالیت‌های ضدقارچی علیه کاندیدا آلبیکانس(ATCC 76615) که مقاوم به داروی فلوکونازول است سنجیده شد.

آماده‌سازی کیتوزان:

غلظت w/v ۱/۲٪ کیتوزان با حل کردن ۰/۰۶ گرم از کیتوزان در ۵ میلی لیتر از اسید استیک v/v ۲٪ به دست آمد. pH محلول بعدا روی ۵/۶ تنظیم شد تا اثرات اسیدی محیط روی خصوصیات قارچ کشی تاثیری نگذارند (۲۰).

آماده‌سازی مواد موثره گیاهی:

بالاترین غلظتی که در بین پژوهش‌های مختلف به عنوان حداقل غلظت بازدارنده تیمول و کارواکرول علیه کاندیدا آلبیکنس ذکر شده است، ۶۲۵ µg/mL می باشد. لذا ما اولین غلظت بالاتر حاصل دو به توان ۱۰یعنی ۱۰۲۴µg/mL را برای شروع انتخاب کردیم (۲۱). پودر تیمول و ایزو تیوسیانات پس از وزن کردن در دی متیل سولفات ۱٪ حل شد، تا غلظت نهایی۱۰۲۴ µg/mL حاصل شود. محلول کارواکرول با استفاده از دی متیل سولفات ۱٪ به غلظت ۱۰۲۴ µg/mL رسید (۲۲)

آماده‌سازی قارچ:

سوسپانسیون سلولی کاندیدا آلبیکنس بر اساس پروتکل CLSI M27-S4 آماده شد(۲۳). بر این اساس ابتدا کشت ایزوله قارچ کاندیدا آلبیکنس بر روی محیط سابوروی دکستروز براث صورت گرفت و پلیت ها برای ۲۴ ساعت در ۳۵ °C قرار گرفتند. سپس چند کلونی با قطر حدود ۱ میلیمتر در ۵ میلی لیتر محیط BHI مایع حل شد تا کدورت محیط در در طول موج ۶۰۰ nm به ۰/۱ برسد که تعداد سلولها در این حالت، ۵×۱۰^{۶} سلول در میلی لیتر می‌باشد. این سوسپانسیون به نسبت ۱:۱۰۰ رقیق شد و بعد از ورتکس مجددا به نسبت ۱:۲۰ رقیق سازی صورت گرفت تا تعداد سلولها به ۵×۱۰^{۳} رسید.

آماده‌سازی رزوزارین:

معرف رزوزارین (7-hydroxy-3H-phenoxazin-3-one 10-oxide) که در حالت محلول در آب به رنگ آبی است، در مطالعات زیستی به عنوان نشانگر زنده بودن سلولها استفاده می‌شود. رزوزارین در اثر فعالیت‌های دهیدروژناز مولکول NADPH که در سلولهای زنده صورت می گیرد و انتقال الکترونهای H^{+} از $NADPH^{+}$ به رزوروفین به رنگ صورتی تبدیل می‌شود. برای به دست آوردن محلول ۰/۰۲(w/v) رزوزارین، دو میلی‌گرم از پودر رزوزارین در ۲۰ میلی‌لیتر از آب مقطر اتوکلاو شده و استریل حل و ورتکس گردید (۲۴).

سنجش حداقل میزان بازدارندگی:

سنجش حداقل میزان بازدارندگی با استفاده از میکروپلیت های ۹۶ خانه پلی استری انجام شد. تحت شرایط استریل و با استفاده از سمپلر چندکاناله ۵۰ µL از محیط RPMI

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]

1640 حاوی گلوکز ۲٪ به تمام خانه‌های پلیت از ستون یک تا ده اضافه شد. سپس ۵۰ µL از ترکیب ضد میکروبی مورد آزمون (کیتوزان، تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات) به خانه های ستون اول اضافه شد، بعد از یکنواخت نمودن مخلوط درون خانه‌ها، ۵۰ µL از سوسپانسیون یکنواخت درون خانه‌ها برداشته شد و به خانه-های ستون دوم اضافه شد، بعد از پیپت کردن و ایجاد سوسپانسیون یکنواخت مجددا ۵۰ µL از سوسپانسیون برداشته شد و به خانه های ستون سوم اضافه گشت، این روند رقیق سازی ترکیب ضد میکروبی به نصف غلظت ستون قبلی در هر ستون، تا ستون یازدهم ادامه داشت. در نهایت غلظت ترکیب مورد آزمون در خانه‌های ستون ده به ۱ µg/ml رسید. سپس ۵۰ µL از سوسپانسیون آماده کاندیدا آلبیکنس در شرایط استریل به تمام خانه‌ها از ستون یک تا ده اضافه شد. خانه‌های ستون یازده به عنوان کنترل مثبت آزمایش، تنها دارای ۱۰۰ µL از سوسپانسیون کاندیدا آلبیکنس و خانه های ستون دوازده به عنوان کنترل منفی آزمایش و سنجش استریل بودن آزمون، فقط دارای ۱۰۰ µL از محیط کشت بودند. میکروپلیت به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ °C انکوباتور قرار داده شد. سپس به هر یک از خانه های میکروپلیت ۲۰ µL از محلول آماده رزوزارین ۰/۰۲(w/v) ٪ اضافه شد و به مدت دو ساعت در انکوباتور و با دمای ۳۵ °C قرار داده شد. حداقل غلظتی از ترکیب که از رشد قارچ ممانعت به عمل آورد، حداقل غلظت بازدارندگی (Minimum inhibitory concentration, MIC) در برابر آن کاندیدا آلبیکنس ثبت شد (۲۵-۲۷).

تعیین حداقل غلظت قارچ کش:

۱۰۰ µ از سوسپانسیون درون چاهک مربوط به MIC و غلظت بالاتر آن در روی محیط سابورودکستروزآگار کشت شدند و برای ۴۸ ساعت در دمای ۳۵ °C قرار گرفتند. حداقل غلظتی که منجر به عدم رشد شد به عنوان حداقل غلظت قارچ کشی (Minimum fungicidal concentration, MFC) معرفی گردید و از نتایج نسبت MFC/MIC برای تعیین خاصیت قارچ کشی استفاده شد، طوری که اگر نسبت بیشتر از ۴ بود استاتیک و کمتر از ۴ کشنده است (۱۶).

اثر هم‌افزایی:

اثر هم‌افزایی کیتوزان و تیمول، کیتوزان و کارواکرول، کیتوزان و ایزوتیوسیانات با استفاده از آزمون رقت چکربورد علیه کاندیدا آلبیکنس تست شد.

چکربورد می تواند اثرات هم‌افزایی ، افزایشی و آنتاگونیستیک و یا عدم وجود اثر متقابل دو ترکیب ضد میکروبی مورد استفاده را نشان دهد. اثرات متقابل دو ترکیب در شرایط آزمایشگاهی، معمولا بر اساس شاخص غلظت مهاری فراکشنال (Fractional inhibitory concentration, FIC) ارزیابی می‌شود. FIC هر ترکیب ضد میکروبی مورد مطالعه به عنوان مثال ماده A برابر است با MIC آن ماده A در آزمون هم افزایی و در ترکیب با ماده B، تقسیم بر MIC خود ماده A نظر هنگامی‌که به تنهایی مورد استفاده قرار می گیرد. سپس شاخص FIC از فرمول زیر به دست می آید:

$$FIC_I = FIC_A + FIC_B$$

تفسیر میزان هم افزایی بر اساس فرمول زیر به دست می‌آید: FIC_I < ۰/۵ نشان دهنده اثر هم‌افزایی، FIC_I بین ۰/۵ و ۰/۷۵ نشانگر اثر هم‌افزایی نسبی، FIC_I بین ۰/۷۶ و ۱ اثر افزایشی، ۴-۱ < FIC_I نشان‌دهنده عدم تاثیر مواد روی هم و ۴ < FIC_I نشان دهنده اثر بازدارندگی هم خواهد بود (۲۸).

روش کشتن در زمان:

ابتدا سوسپانسیون سلولی قارچ با غلظت نیم مک فارلند تهیه شد. برای هر آزمون چهار فالکون با ۱۰ میلی‌لیتر از سلولهای قارچ با کدورت گفته شده مورد نیاز است. در این تحقیق، کیتوزان و هریک از مواد موثره گیاهی مورد مطالعه، با غلظت دو برابر MIC علیه کاندیدا آلبیکنس به شکل تنها و یا همراه با یکدیگر به کار گرفته شدند. سپس در فواصل

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]

زمانی ۲۰ دقیقه از لحظه صفر و در دقیقه ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از اضافه کردن عوامل ضدمیکروبی، ۱۰۰ µL از هر چهار فالکون برداشته شد و در پلیت‌های نیمه بسته آگار کشت شد. بعد از اینکه پلیت‌ها ۲۴ ساعت در °C ۳۷ نگهداری شدند، تعداد کلونی‌های هر پلیت با کمک دستگاه کلونی شمار به دست آمد. الگوی کاهش تعداد سلولهای زنده بر اساس عدد حاصل از $\log_{10}$ آنها و اثرات هم‌افزایی آنها با هم سنجیده شد (۲۹, ۳۰).

منحنی رشد:

برای بررسی نحوه اثر کیتوزان و هریک از مواد موثره گیاهی مورد مطالعه واثرات متقابل کیتوزان با هر یک از مواد موثره گیاهی مورد مطالعه، بر روی الگوی رشدی کاندیدا آلبیکنس از روش مقایسات منحنی رشد این مواد علیه کاندیدا آلبیکنس در مقایسه با شرایط کنترل مورد استفاده قرار گرفت. برای این منظور ابتدا از کلونی‌های ایزوله هر یک از باکتری‌ها در ده میلی‌لیتر از محیط مولر هینتون مایع کشت شد و در انکوباتور شیکر دار در دمای ۳۷ °C نگهداری شدند تا میزان کدورت آنها بر اساس OD_{600} حدود ۰/۶ شود که نشان دهنده قرارگیری سلولها در اواسط مرحله رشدی لگاریتمی می‌باشد. سپس سلولها با استفاده از محیط مولر هینتون مایع رقیق شدند تا ۰٫۶ ODآنها برابر با ۰/۲ گردید. سپس ۱۰۰۰ µL از سوسپانسیون کاندیدا آلبیکنس در ویالهای جداگانه ریخته شد. کیتوزان با هر یک از مواد موثره گیاهی مورد مطالعه با غلظتی دو برابر غلظت MIC خود علیه کاندیدا آلبیکنس به ویالهای جداگانه حاوی آن اضافه شدند. تیوبها در ترموسایکلر ۳۷ °C نگهداری شدند. در فواصل زمانی مشخص، بعد از یک، دو، چهار، شش و هشت ساعت بعد از افزودن مواد ضد میکروبی به سلولها، با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر کدورت ۶۰۰ OD هر ویال خوانده شد. این آزمون دو مرتبه تکرار شد (۳۱).

آنالیز آماری:

تمام بررسی‌های آماری با استفاده از آزمون تجزیه واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه میانگین تی تست در نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) انجام گرفت. سطوح معنی داری ۰/۰۵ >pدر نظر گرفته شد.

یافته‌ها

سنجش حداقل میزان بازدارندگی:

ترکیب کیتوزان با هر سه ماده تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلبیکنس اثر هم‌افزایی نشان داد. هر چند تیمول و کارواکرول به ترتیب حداقل و حداکثر میزان MIC علیه کاندیدا آلبیکنس را در بین سایر ترکیبات نشان دادند (جدول ۱).

تعیین حداقل غلظت قارچ کش:

ترکیب کیتوزان- تیمول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات اثرات هم افزایی بالایی علیه کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول نشان دادند. در حالیکه این ترکیبات در زمان استفاده به شکل مجزا، بازدارنده رشد قارچ بودند، استفاده همزمان کیتوزان- تیمول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات منجر به کشتن کامل قارچ شد (جدول ۲).

روش کشتن در زمان:

منحنی کشتن در زمان در آزمون هم‌افزایی کیتوزان- تیمول،کیتوزان کارواکرول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات با اعمال کیتوزان، تیمول و ترکیب کیتوزان- تیمول، کیتوزان، کارواکرول و ترکیب کیتوزان- کارواکرول، کیتوزان، ایزوتیوسیانات و ترکیب کیتوزان- ایزوتیوسیانات غلظت دو برابر MIC علیه کاندیدا آلبیکنس انجام شد و نتایج به صورت تغییرات در $\log_{10}$ CFU/mL سلول‌های زنده نشان داده شد و سپس منحنی مربوط با استفاده از نرم افزار Excel رسم شد. بر این اساس ترکیب تیمول کیتوزان و کیتوزان- ایزوتیوسیانات بهترین کارایی و عملکرد را در کشتن کاندیدا آلبیکنس در زمان کوتاهتر نشان دادند. به طوری که طی مدت زمان ۱۰۰ دقیقه کاهش شدیدی در تعداد سلولهای زنده ایجاد کردند و $\log_{10}$ CFU/mL را تا

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]

شش عدد کاهش دادند. درحالیکه ترکیب کیتوزان- کارواکرول در ۱۲۰ دقیقه موفق به کاهش چشمگیر تعداد سلولهای زنده شد (شکل۱).

منحنی رشد:

به منظور مطالعه مکانیسم اثر کیتوزان- تیمول،کیتوزان کارواکرول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلبیکنس کدورت محیطهای کشت حاوی کیتوزان، تیمول، کارواکرول، ایزوتیوسیانات و ترکیب آنها با کیتوزان با غلظت دو برابر MIC در زمانهای مختلف به وسیله اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. ترکیب کیتوزان- تیمول کدورت سلولها را در یک ساعت اول به نصف کاهش داد و در مدت دو ساعت به صفر رسانید. در حالیکه ترکیبات کیتوزان- کارواکرول و کیتوزان- ایزوتیوسانات در مدت دو ساعت کدورت به نصف و بعد از چهار ساعت به نزدیک صفر رسید و تا بعد از هشت ساعت کدورت محیط را در محدوده صفر نگه داشتند (شکل ۲).

جدول۱. سنجش حداقل میزان بازدارندگی ترکیب کیتوزان با تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلبیکنس. MIC: حداقل غلظت بازدارندگی،MIC_A : حداقل غلظت بازدارندگی هر ماده به تنهایی، MIC_B: حداقل غلظت بازدارندگی هر ماده در آزمون هم‌افزایی و در ترکیب با ماده دوم، FIC: غلظت مهاری فراکشنال، FIC_I: شاخص غلظت مهاری فرکشنال که حاصل جمع FIC دو ماده مورد آزمون می‌باشد.

تفسیر نتایج	FIC_I	FIC	MIC (µg/mL)		ترکیبات مورد استفاده
			MIC_B	MIC_A	
هم‌افزایی نسبی	۰/۵۶۲۵	۰/۰۶۲۵	۸	۱۲۸	تیمول
		۰/۵	۱۶	۳۲	کیتوزان
هم‌افزایی نسبی	۰/۶۲۵	۰/۱۲۵	۶۴	۵۱۲	کارواکرول
		۰/۵	۱۶	۳۲	کیتوزان
هم‌افزایی نسبی	۰/۵۳۲۱	۰/۰۳۱	۱۶	۵۱۲	ایزوتیوسیانات
		۰/۵	۱۶	۳۲	کیتوزان

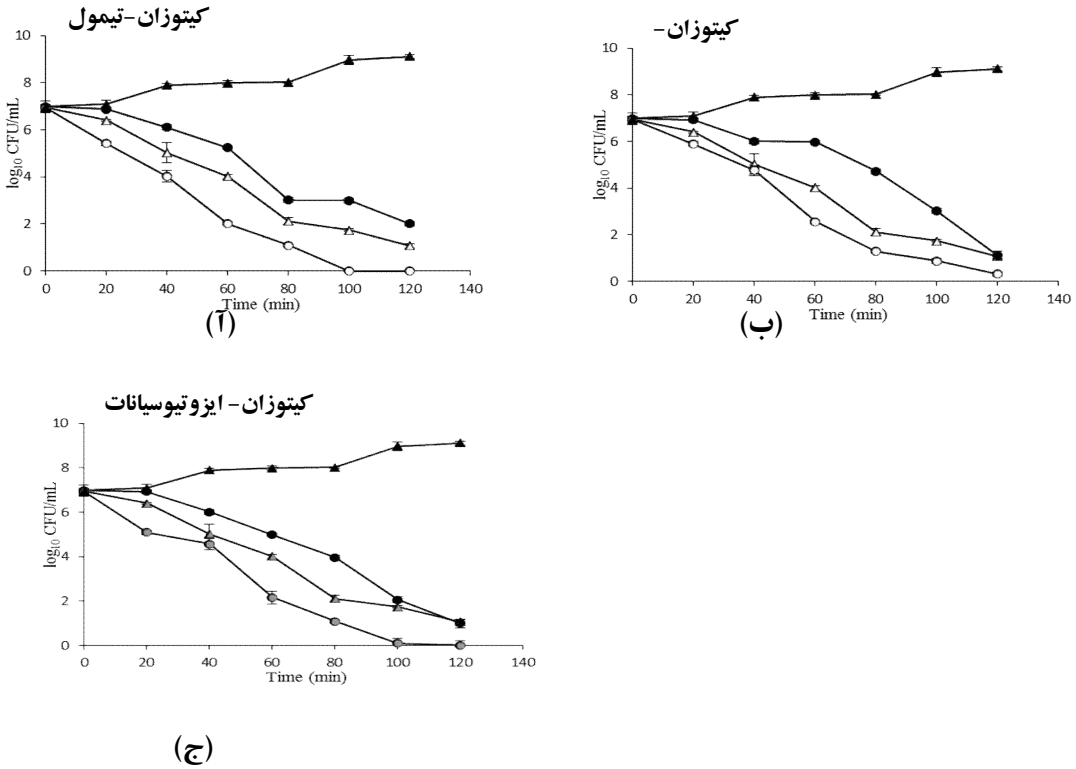
جدول۲. تعیین حداقل غلظت قارچ کش ترکیب کیتوزان با تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات علیه کاندیدا آلبیکنس. MIC: حداقل غلظت بازدارندگی،MIC_A: حداقل غلظت بازدارندگی هر ماده به تنهایی،MIC_B: حداقل غلظت بازدارندگی هر ماده در آزمون هم‌افزایی و در ترکیب با ماده دوم، MFC: حداقل غلظت قارچ‌کشی، MFC_B: حداقل غلظت قارچ‌کشی هر ماده در آزمون هم‌افزایی و در ترکیب با ماده دوم.

ترکیبات مورد استفاده	MIC (µg/mL)					
	MFC_A	MFC/MIC_A	تفسیر نتایج	MFC_B	MFC/MIC_B	تفسیر نتایج
تیمول	۵۱۲	۴	بازدارنده رشد قارچ	۱۶	۴	کشنده قارچ
کیتوزان	۱۲۸	۴	بازدارنده رشد قارچ	۳۲	۲	کشنده قارچ
کارواکرول	>۱۰۲۴	>۴	بازدارنده رشد قارچ	۲۵۶	۴	بازدارنده رشد قارچ

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]

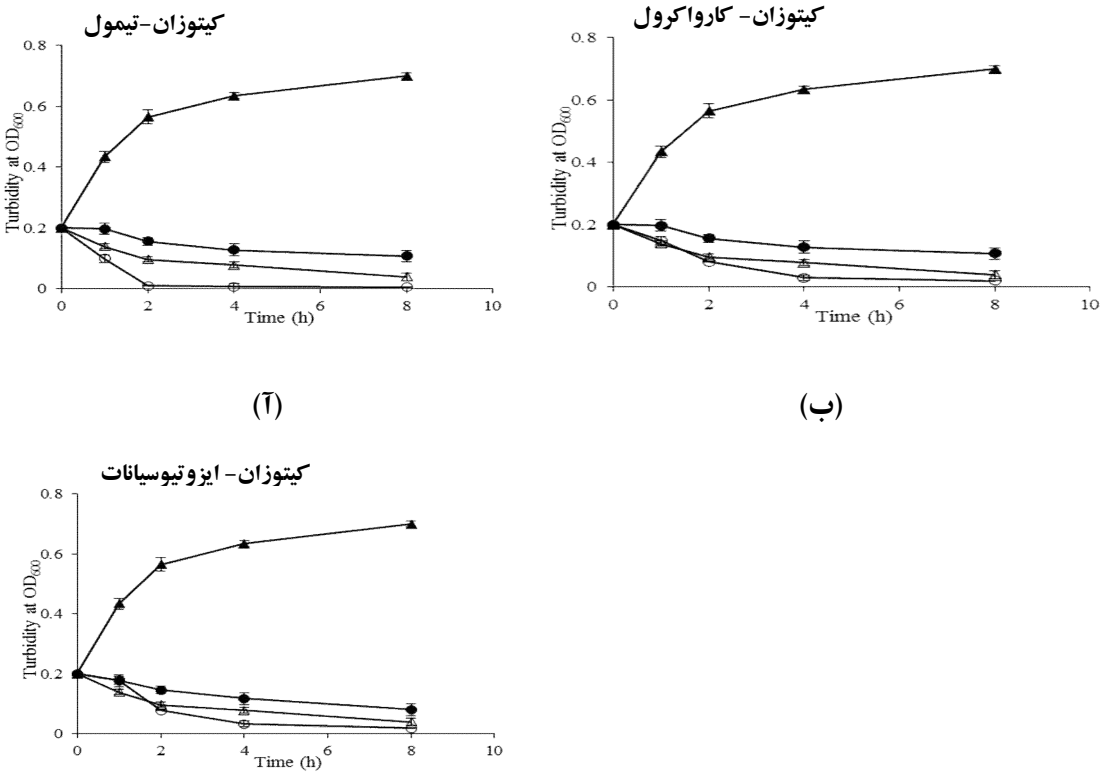
بازدارنده رشد قارچ	۴	۶۴	بازدارنده رشد قارچ	۴	۱۲۸	**کیتوزان**
بازدارنده رشد قارچ	۴	۶۴	بازدارنده رشد قارچ	>۴	>۱۰۲۴	**ایزوتیوسیانات**
کشنده قارچ	۲	۳۲	بازدارنده رشد قارچ	۴	۱۲۸	**کیتوزان**



شکل ۱. منحنی کشتن در زمان ، کیتوزان-تیمول،کیتوزان- کارواکرول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات با غلظت دو برابر حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) علیه کاندیدا آلبیکنس(آ) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان µg/mL ۶۴ (مثلث تو خالی)، تیمول µg/mL ۲۵۶ (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان µg/mL ۶۴ و تیمول µg/mL ۲۵۶ (دایره تو خالی). (ب) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان µg/mL ۶۴ (مثلث تو خالی)، کارواکرول µg/mL ۱۰۲۴ (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان µg/mL ۶۴ و کارواکرول µg/mL ۱۰۲۴ (دایره تو خالی). (ج) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان µg/mL ۶۴ (مثلث تو خالی)، ایزوتیوسیانات µg/mL ۱۰۲۴ (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان µg/mL ۶۴ و ایزوتیوسیانات µg/mL ۱۰۲۴ (دایره تو خالی).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]



(آ) (ب)

(ج)

شکل ۲. منحنی رشد کیتوزان- تیمول, کیتوزان- کارواکرول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات با غلظت دو برابر حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) علیه کاندیدا آلبیکنس (آ) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان µg/mL ۶۴(مثلث تو خالی)، تیمول ۲۵۶µg/mL (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان µg/mL ۶۴ و تیمول µg/mL ۲۵۶ (دایره تو خالی). (ب) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان µg/mL ۶۴(مثلث تو خالی)، کارواکرول µg/mL ۱۰۲۴ (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان µg/mL ۶۴ و کارواکرول µg/mL ۱۰۲۴ (دایره تو خالی). (ج) کنترل (مثلث سیاه پر شده)، کیتوزان µg/mL ۶۴(مثلث تو خالی)، ایزوتیوسیانات µg/mL ۱۰۲۴ (دایره پر شده)، ترکیب کیتوزان µg/mL ۶۴ و ایزوتیوسیانات µg/mL ۱۰۲۴ (دایره تو خالی).

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]

بحث

در این مطالعه اثرات هم‌افزایی کیتوزان با سه ماده موثره گیاهی تیمول، کارواکرول و ایزوتیوسیانات با اثرات ضدقارچی اثبات شده، علیه کاندیدا آلبیکنس مقاوم به فلوکونازول مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل از آزمون چکربورد هر سه ماده در ترکیب با کیتوزان اثرات هم‌افزایی نشان دادند. هر چند کم ترین غلظت بازدارنده رشد مربوط به ترکیب کیتوزان تیمول با غلظت ۸ µg/mL تیمول و ۱۶ µg/mL کیتوزان بود . مطالعات قبلی نشان داده بود نانوذرات کیتوزان حاوی اثر ضد باکتریایی قوی علیه *Staphylococcus aureus* دارند (۵). نتایج آزمون حداقل غلظت کشندگی وجود اثر هم‌افزایی بین کیتوزان و مواد موثره گیاهی مورد استفاده را تأیید کرد. این اثر در ترکیب کیتوزان-تیمول و کیتوزان ایزوتیوسیانات محدوده اثر کیتوزان را از بازدارندگی رشد قارچ به محدوده کشندگی ارتقا داد. در پژوهشی دیگر، نانوکپسوله‌های کیتوزان حاوی اسانس آویشن، اثرات ضدمیکروبی قویتری علیه کاندیدا آلبیکنس نشان داد، به طوریکه افزایش غلظت اسانس آویشن درون نانوکپسوله‌ها منجر به افزایش توانایی ضدقارچی نانوکپسوله‌های کیتوزان علیه کاندیدا آلبیکنس شد (۳۲).

آزمونهای کشتن در زمان و منحنی رشد، اثرات کشندگی و بازدارندگی رشد ترکیب کیتوزان- تیمول در مدت زمان کمتر از دو ساعت علیه کاندیدا آلبیکنس را تأیید کردند. هرچند ترکیب کیتوزان- کارواکرول و کیتوزان- ایزوتیوسیانات نیز با کاهش تعداد سلولهای زنده کاندیدا آلبیکنس به نزدیک صفر، در کمتر از دو ساعت نتایج قارچ کشی موفقی علیه کاندیدا آلبیکنس نشان دادند. اما بهترین و سریعترین ترکیب در کنترل کاندیدا آلبیکنس، ترکیب کیتوزان- تیمول بود (شکل ۱ و۲).

مشخص شده است که غلظت پایین کیتوزان که برای سلول‌های قارچ کشنده نیست، منجر به ایجاد تغییراتی در پایداری یونی و متابولیسم سلولی می‌شود. کیتوزان به دلیل بار مثبت خود قادر به اتصال به غشا سلولی که بار منفی دارد، می‌باشد. در نتیجه این اتصال و ایجاد یک میدان الکتریکی، قدرت تبادل مواد با محیط بیرون سلول کاهش می‌یابد و میزان یون پتاسیم موجود در سطح بیرونی غشا کاهش می‌یابد و لذا یونهای پتاسیم درون سلولی خارج می-شوند. این امر مقدمه تخریب کانالهای غشایی و پلاسمولیز سلولی را فراهم می‌کند (۴). از طرف دیگر تیمول و کارواکرول ترکیباتی چربی دوست هستند که به درون غشا سلولی قارچ نفوذ می‌کنند و مسیر بیوسنتز آرگسترول را هدف قرار می‌دهند و سبب لیز سلولی و در نهایت مرگ سلول قارچ می‌شوند (۲۴). لذا با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، غلظت اندک کیتوزان با ناپایدار کردن غشا، امکان ورود و تاثیر تیمول را افزایش می‌دهد. در نتیجه این دو ماده در حالت ترکیبی با یکدیگر، در غلظتی کمتر از میزان حداقل غلظت بازدارنده خود قادر به ایجاد تخریب در غشا سلول قارچ و کنترل کاندیدا آلبیکنس می-باشند.

مطالعات پژوهشگران قبلی بر روی سمیت تیمول برای سلولهای قرمز خون نشان داد که غلظت پایینتر از ۱۰۰µg/mL تیمول حدود ۲٪ خاصیت همولئوتیکی نشان دادند (۳۳). حتی در غلظت بالای حدود ۲۰۰۰ µg/mL هم این میزان قابل چشم‌پوشی و حدود ۳۰٪ بود همچنین آزمایشات متعدد اثرات سمیت کیتوزان بر روی سلولهای اریتوسیتی انسان، اثرات بسیار جزیی لیزکنندگی را نشان داد و کیتوزان در محدوده مواد ایمن برای استفاده دارویی و یا استفاده به عنوان ناقل داروهای مختلف، قرار داده است (۳۴).

نتیجه گیری

نتایج ضد قارچی و هم افزایی ترکیب تیمول و کیتوزان با غلظت های بسیار پایین ۸ µg/mL تیمول و ۱۶µg/mL

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]

کیتوزان در آزمون تعیین حداقل غلظت بازدارندگی علیه کاندیدا آلبیکنس و عملکرد افزایشی کشندگی این ترکیب با غلظت های بسیار پایین ۱۶ µg/mL تیمول و ۳۲µg/mL کیتوزان علیه این قارچ، با نتایج کارایی این ترکیب در کشتن سریع و آسیب دیواره قارچ کاندیدا آلبیکنس در کمتر از دو ساعت از تیمار سلولهای قارچی در آزمون های کشتن در زمان و منحنی رشد، همخوانی بالایی نشان داد. این نتایج حاکی از کارایی و تاثیر بالای ترکیب تیمول و کیتوزان با غلظت های بسیار پایین و ایمن سلولهای انسانی می‌باشند. بنابراین، پژوهشهای بعدی در راستای تولید فیلم های پلیمری یا نانوکپسولهای ضدقارچی کیتوزان- تیمول می تواند راهگشای مشکل روزافزای مقاومت دارویی در کاندیدا آلبیکنس باشد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی اراک انجام شده است و موفق به دریافت کد اخلاق به شماره IR.ARAKMU.REC.1396.54 شده است. هیچ کدام از نویسندگان این مطالعه تعارض منافعی برای انتشار این مقاله ندارند.

منابع

1.Vengurlekar S, Sharma R, Trivedi P. Efficacy of some natural compounds as antifungal agents. Pharmacogn Rev. 2012;6(12):91- 9.
2.Bassolé IHN, Juliani HR. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. Molecules. 2012;17(4):3989-4006.
3.Mirjamali NA-S, Soufian S, Molaee N, Abbasian SS, Abtahi H. Cloning and expression of the enzymatic region of Streptococcal hyaluronidase. Iran J Basic Med Sci. 2014;17(9):667-72.
4.Ahmad A, Khan A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan L, et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2011;30(1):41-50.
5.Sotelo-Boyás M, Correa-Pacheco Z, Bautista-Baños S, y Gómez YG. Release study and inhibitory activity of thyme essential oil-loaded chitosan nanoparticles and nanocapsules against foodborne bacteria. Int J Biol Macromol. 2017;103:409-14.
6.Goy RC, Britto Dd, Assis OB. A review of the antimicrobial activity of chitosan. Polímeros. 2009;19(3):241-7.
7.Fahimirad S, Ajalloueian F. Naturally-derived electrospun wound dressings for target delivery of bio-active agents. Int J Pharm. 2019;566:307-28.
8.Fahimirad S, Abtahi H, Satei P, Ghaznavi-Rad E, Moslehi M, Ganji A. Wound healing performance of PCL/Chitosan based electrospun nanofiber electrosprayed with curcumin loaded chitosan nanoparticles. Carbohydr Polym [Internet]. 2021 Jan [cited 2021 May 1]; 259: 117640. Available from: https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014486172100028X.doi:10.1016/j.carbpol.2021.117640
9.Ghazavi A, Abtahi H, Karimi M, Mollaghasemi S, Mosayebi G. Antimicrobial activities of water and methanol extracts of bitter apricot seeds. J Med Sci. 2008;8(4):433-6.
10.Fahimirad S, Hatami M. Heavy metal-mediated changes in growth and phytochemicals of edible and medicinal plants. IN: Ghorbanpour M, Varma A, Editors. Medicinal Plants and Environmental Challenges. 1st ed. Germany: Springer, Cham, 2017: 189-214.
11.Ghorbanpour M, Fahimirad S. Plant nanobionics a novel approach to overcome the environmental challenges. IN: Ghorbanpour M, Varma A, Editors. Medicinal Plants and Environmental Challenges. 1st ed. Germany: Springer, Cham, 2017:247-57.
12.Fahimirad S, Abtahi H, Razavi SH, Alizadeh H, Ghorbanpour M. Production of recombinant antimicrobial polymeric protein beta casein-E 50-52 and its antimicrobial synergistic effects assessment with thymol. Molecules. 2017;22(6):822-37.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]

13.Da Silva NB, de Lucena Rangel M, Almeida BB, de Castro RD, Valença AMG, Cavalcanti AL. Antifungal Activity of the Essential Oil of Cymbopogon citratus (DC) Stapf. An in vitro study. J Oral Res. 2017;6(12):319-23.
14.Marchese A, Orhan IE, Daglia M, Barbieri R, Di Lorenzo A, Nabavi SF, et al. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. Food Chem. 2016;210:402-14.
15.Fahimirad S, Razavi SH, Abtahi H, Alizadeh H, Ghorbanpour M. Recombinant production and antimicrobial assessment of beta casein-IbAMP 4 as a novel antimicrobial polymeric protein and its synergistic effects with thymol. Int J Pept Res Ther. 2018;24(1):213-22.
16.Lima IO, Pereira FdO, Oliveira WAd, Lima EdO, Menezes EA, Cunha FA, et al. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against Candida albicans strains. J Essent Oil Res. 2013;25(2):138-42.
17.Dufour V, Stahl M, Baysse C. The antibacterial properties of isothiocyanates. Microbiology. 2015;161(2):229-43.
18.Liang R, Li X, Yuan W, Jin S, Hou S, Wang M, Wang H. Antifungal activity of nanochitin whisker against crown rot diseases of wheat. J agric food chem. 2018;66(38):9907-13.
19.Fahimirad S, Hatami M. Nanocarrier-Based Antimicrobial Phytochemicals. Advances in Phytonanotechnology. IN: Ghorbanpour M, Wani S, Editors. Advances in Phytonanotechnology. 1st ed. United states:Elsevier, Academic Press,2019: 299-314.
20.Reginato CF, Bandeira LA, Zanette RA, Santurio JM, Alves SH, Danesi CC. Antifungal activity of synthetic antiseptics and natural compounds against Candida dubliniensis before and after in vitro fluconazole exposure. Rev Soc Bras Med Trop. 2017;50(1):75-9.
21.Zhou W, Wang Z, Mo H, Zhao Y, Li H, Zhang H, et al. Thymol Mediates Bactericidal Activity against Staphylococcus aureus by Targeting an Aldo–Keto Reductase and Consequent Depletion of NADPH. J agric food chem. 2019;67(30):8382-92.
22.Molaee N, Abtahi H, Mosayebi G. Expression of recombinant streptokinase from *streptococcus pyogenes* and its reaction with infected human and murine sera. Iran j basic med sci. 2013;16(9):985-89.
23.Santos ERd, Forno CFD, Hernandez MG, Kubiça TF, Venturini TP, Chassot F, et al. Susceptibility of Candida spp. isolated from blood cultures as evaluated using the M27-A3 and new M27-S4 approved breakpoints. Rev Soc Bras Med Trop. 2014;56(6):477-82.
24.Elshikh M, Ahmed S, Funston S, Dunlop P, McGaw M, Marchant R, et al. Resazurin-based 96-well plate microdilution method for the determination of minimum inhibitory concentration of biosurfactants. Biotechnol Lett. 2016;38(6):1015-9.
25.Jang WS, Kim HK, Lee KY, Am Kim S, Han YS, Lee IH. Antifungal activity of synthetic peptide derived from halocidin, antimicrobial peptide from the tunicate, Halocynthia aurantium. FEBS Lett. 2006;580(5):1490-6.
26.Ranjbaran M, Zolfaghari M, Japoni-Nejad A, Amouzandeh-Nobaveh A, Abtahi H, Nejad M, et al. Molecular investigation of integrons in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolated from urinary tract infections. J Mazandaran Univ Med Sci. 2013;23(105):20-7.
27.Bao M, Zhang L, Liu B, Li L, Zhang Y, Zhao H, et al. Synergistic effects of anti-MRSA herbal extracts combined with antibiotics. Future Microbiol. 2020;15(13):1265-76.
28.Lora-Tamayo J, Murillo O, Bergen PJ, Nation RL, Poudyal A, Luo X, et al. Activity of colistin combined with doripenem at clinically relevant concentrations against multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa in an in vitro dynamic biofilm model. J Antimicrob Chemother. 2014;69(9):2434-42.
29.Rudilla H, Fusté E, Cajal Y, Rabanal F, Vinuesa T, Viñas M. Synergistic antipseudomonal effects of synthetic peptide AMP38 and carbapenems. Molecules. 2016;21(9):1223-35.
30.Ghazavi A, Abtahi H, Karimi M, Mollaghasemi S, Mosayebi G. Antimicrobial activities of water and methanol extracts of bitter apricot seeds. J Med Sci. 2008; 15;8(4):433-6.
31.Hu Y, Du Y, Wang X, Feng T. Self-aggregation of water-soluble chitosan and solubilization of thymol as an antimicrobial agent. J Biomed Mater Res A. 2009;90(3):874-81.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]

32.Liu T, Liu L. Fabrication and characterization of chitosan nanoemulsions loading thymol or thyme essential oil for the preservation of refrigerated pork. Int J Biol Macromol. 2020;162:1509-15.
33.Chavan PS, Tupe SG. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. Food Control. 2014;46:115-20.
34.Qi L, Xu Z. In vivo antitumor activity of chitosan nanoparticles. Bioorg Med Chem Lett. 2006; 16(16):4243-5.

[Downloaded from sjku.muk.ac.ir on 2026-05-24]

[DOI: 10.52547/sjku.26.1.40]