

## *Effect of Cinnamon, Rosemary and Zataria Essential Oils on Food-borne Gastroenteritis Viruses*

Maryam Azizkhani,  
Fahimeh Tooryan

Assistant Professor, Amol University of Special Modern Technologies, Amol, Iran

(Received February 3, 2016 ; Accepted July 4 , 2016)

### *Abstract*

**Background and purpose:** Since long time ago herbal products and spices have been used as powders, essential oils (EOs), and extracts. They consist of antimicrobial components and could be applied as natural food preservatives. In the present work, the antiviral effect of cinnamon, rosemary, and zataria EOs has been investigated against norovirus surrogates including feline calicivirus (FCV) and murine norovirus (MNV).

**Materials and methods:** Different concentrations of EOs were individually mixed with each virus at titers of ca. 7-8 log TCID<sub>50</sub>/ml and incubated for 2 h at 4°C and 37 °C. The infectivity of the recovered viruses was evaluated by cell-culture assays.

**Results:** At 37 °C, 3% of cinnamon, 2.5% of rosemary and 0.1% of zataria EOs decreased the FCV titers by 2.38, 3.38, and 4.51 log TCID<sub>50</sub>/ml, respectively. At lower concentrations they were found to be less effective. Also, different concentrations of EOs decreased MNV titers by 0.25-1.44 log TCID<sub>50</sub>/ml. The maximum titer reduction (4.51 log TCID<sub>50</sub>/ml) was achieved when the FCV was treated at 37 °C with 0.1% of zataria EO.

**Conclusion:** The reduction on the infectivity titers found for the tested norovirus surrogates with these EOs highlighted their potential role as biopreservatives to improve food hygiene and shelflife.

**Keywords:** antiviral, cinnamon, norovirus, rosemary, zataria

J Mazandaran Univ Med Sci 2016; 26(141): 8-15 (Persian).

# بررسی تاثیر اسانس دارچین، رزماری و آویشن شیرازی بر سویه های ویروسی عامل عفونت گوارشی منتقله از غذا

مریم عزیزخانی  
فهیمة توریان

## چکیده

**سابقه و هدف:** فرآورده های گیاهی و ادویه جات، که از گذشته به صورت پودر، اسانس و عصاره مورد استفاده قرار گرفته اند واجد ترکیبات ضد میکروبی و قابلیت کاربرد به عنوان نگهدارنده های طبیعی خوراکی می باشند. در مطالعه حاضر، تاثیر ضد ویروسی اسانس های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی بر عفونت زایی سویه های نورو ویروس، کلسی ویروس گربه (FCV) و نورو ویروس موش (MNV)، مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، هر کدام از ویروس ها در تیتراهای حدود  $10^{7-8}$  TCID<sub>50</sub>/ml، به طور جداگانه، با غلظت های مختلف اسانس ها مخلوط شده و به مدت ۲ ساعت در ۴ و ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری شدند. عفونت زایی ویروس های بازیابی شده از طریق ارزیابی کشت سلولی بررسی گردید.

**یافته ها:** در ۳۷ درجه سانتی گراد، اسانس دارچین در غلظت ۳ درصد، اسانس رزماری در غلظت ۲/۵ درصد و اسانس آویشن شیرازی در غلظت ۰/۱ درصد تیترا FCV را، به ترتیب، به میزان ۲/۳۸، ۳/۳۸ و ۴/۵۱ log TCID<sub>50</sub>/ml کاهش داده و تاثیر آن ها در غلظت های پائین تر کاهش یافت. هم چنین، غلظت های مختلف این اسانس ها موجب کاهش تیترا MNV به میزان  $10^{1/44-0/25}$  log TCID<sub>50</sub>/ml گردید. حداکثر کاهش تیترا FCV طی تیمار ویروس در ۳۷ درجه سانتی گراد با غلظت ۰/۱ درصد اسانس آویشن شیرازی (به میزان  $10^{4/51}$  log TCID<sub>50</sub>/ml) به دست آمد.

**استنتاج:** کاهش مشاهده شده در تیترا عفونت زایی سویه های نورو ویروس توسط اسانس های مورد بررسی، پتانسیل این اسانس ها را برای کاربرد به عنوان نگهدارنده های طبیعی جهت ارتقای سلامت و عمر نگهداری مواد غذایی آشکار می سازد.

**واژه های کلیدی:** آویشن شیرازی، دارچین، رزماری، ضد ویروس، نورو ویروس

## مقدمه

ملاحظه ای در دهه گذشته افزایش یافته است. ترکیبات گیاهی که از گذشته های دور به عنوان طعم دهنده در مواد غذایی به کار می رفته اند، به علت داشتن ترکیبات ضد میکروبی، واجد قابلیت کاربرد در محصولات غذایی به عنوان نگهدارنده های طبیعی می باشند (۱).

با توجه به افزایش آگاهی مصرف کنندگان نسبت به مضرات افزودنی های غذایی مصنوعی و تمایل به استفاده از فرآورده های غذایی با حداقل تاثیرات سوء بر سلامت و نیز محیط زیست، استفاده از ترکیبات ضد میکروبی طبیعی در تولید محصولات غذایی به طور قابل

E-mail: azizkhani.maryam@gmail.com

**مؤلف مسئول:** مریم عزیزخانی - آمل، خیابان امام خمینی، آفتاب ۲۴، دانشگاه تخصصی فناوری های آمل

استادیار، دانشگاه تخصصی فناوری های نوین آمل، آمل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۱/۱۴ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۴/۱۱/۲۰ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۴/۱۴

(*Zataria multiflora* Boiss.) بر دو سویه قابل کشت نوروویروس، MNV-1 و FCV، در دو دمای ۴ و ۳۷ درجه سانتی گراد بوده است.

## مواد و روش ها

این پژوهش تجربی در سال ۲۰۱۴ در انیستیتو آگروشیمی و صنایع غذایی دانشگاه والنسیا (اسپانیا) انجام شده است.

### سویه های ویروسی و سلول ها

سویه سیتوپاتوژن (ATCC VR-782) FCV F9 و MNV-1 (تهیه شده از دانشکده پزشکی دانشگاه واشنگتن، ایالات متحده امریکا)، به ترتیب در سلول های RAW264.7 و CRFK (Crandell Rees feline kidney) تکثیر و ارزیابی گردید. سپس استوک های نیمه خالص از طریق سانتریفوژ (ایالات متحده امریکا، Eppendorf) هضم شده سلول های آلوده در ۶۶۰ گرم به مدت ۳۰ دقیقه تهیه شد. ویروس های عفونت از طریق تعیین دوز عفونت زدا در ۵۰ درصد کشت بافتی ( $TCID_{50}$ )، با استفاده از ۸ چاهک برای هر رقت و ۲۰ میکرولیتر مایه تلقیح در هر چاهک، شمارش شدند.

### اسانس ها

اسانس های رزماری، دارچین و آویشن شیرازی به صورت خانگی تهیه گردید. اسانس از قسمت های هوایی خشک شده گیاه رزماری و آویشن شیرازی و پوست درخت دارچین با استفاده از دستگاه کلونجر، به روش تقطیر با بخار به مدت سه ساعت، تهیه و کلیه اسانس ها جهت شناسایی ترکیبات با استفاده از کروماتوگرافی گازی- طیف سنجی جرمی (GC/MS) مورد آنالیز قرار گرفتند. دستگاه GC/MS از نوع Thermoquest Trace GC 2000 FINNIGAN (انگلستان) بوده و ویژگی های آن عبارت بود از: ستون موئینه DB5 به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۲۵۰ میکرومتر و ضخامت

اسانس های گیاهی و یا ترکیبات فعال آن ها که به طور مستقیم به عنوان طعم دهنده در مواد غذایی به کار می روند، در دهه اخیر به عنوان بخشی از ترکیبات مواد بسته بندی جهت کنترل میکروارگانیسم های بیماری زا مانند کامپیلوباکتر ژروانی، لیستریامونوسیژنز، سالمونلا، استافیلوکوکوس اروئوس، اشرشیاکلی O157:H7 مورد استفاده قرار گرفته اند، اما تاثیرات ضدویروسی ترکیبات و اسانس های گیاهی بر ویروس های روده ای انسان تاکنون به طور گسترده مورد مطالعه قرار نگرفته است (۲). شواهد اپیدمیولوژیک نشان می دهد که ویروس های روده ای، به خصوص نوروویروس انسانی (NV)، علت عمده بروز بیماری های ناشی از مواد غذایی در کشورهای توسعه یافته می باشد (۴،۳). علاوه بر این، نوروویروس جزو پنج پاتوژن مهم عامل هزینه های مربوط به بیماری های ناشی از مواد غذایی به شمار می رود (۵). با وجود تلاش هایی که برای کشت نوروویروس های انسانی انجام گرفته (۷،۶)، پژوهش ها در این خصوص به علت عدم وجود حیوانات آزمایشگاهی مناسب و عدم امکان تکثیر ویروس در شرایط آزمایشگاهی با مشکل روبرو بوده است. در نتیجه، سویه هایی از جمله کلیسی ویروس گربه (FCV) و نوروویروس موش (MNV) به طور گسترده ای جهت بررسی اثر ترکیبات نگهدارنده متداول مورد استفاده در صنایع غذایی به کار می رود (۹،۸). MNV موجب بروز عفونت کشنده ای در موش های مبتلا به هیپاتیت، ذات الریه و یا التهاب سیستم عصبی می گردد (۱۰)، در حالی که FCV یک ویروس تنفسی است که نسبت به شرایط محیطی مانند pH پائین حساس تر است (۱۱، ۱۲). از آن جا که MNV از طریق مسیر مدفوعی- دهانی انتقال می یابد، در برابر سطوح پایین تر pH مقاوم بوده و بنابراین به عنوان نماینده ای برای نوروویروس های انسانی توسط برخی از محققان مورد استفاده قرار می گیرد (۱۴-۱۲). هدف این مطالعه، بررسی تاثیر اسانس های دارچین (*Cinnamomum zeylanicum*)، رزماری (*Rosmarinus officinalis* L.) و آویشن شیرازی

ویروس کشی اسانس‌ها از طریق مقایسه تعداد ویروس‌های عفونی کننده در سوسپانسیون‌های فاقد اسانس با سوسپانسیون‌های ویروسی تیمار شده با اسانس تخمین زده شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۲٫۰ جهت انجام تجزیه و تحلیل آماری به کار رفت. معنی دار بودن اختلاف میان میانگین تعداد ویروس‌ها پس از تیمارهای مختلف از طریق آزمون Student's t test با سطح اطمینان  $p < 0/05$  تعیین شد.

### یافته‌ها

#### ترکیبات اسانس‌ها

ترکیبات اصلی اسانس رزماری شامل آلفاپینن (۴۲/۸ درصد)، ورنون (۹/۹ درصد)، کامفن (۷/۵ درصد)، او-۸-سینئول (۵/۸۱ درصد)، ۳-اکتانول (۴/۸ درصد)، بتا-میرسین (۳/۶۶ درصد) و پارا-سیمین (۳/۱۳ درصد)؛ اسانس دارچین شامل سینامالدهید (۷۴/۴۳ درصد)، اوژنول (۱۳/۸۵ درصد)، آلفاپینن (۶/۲۴ درصد) و کاریوفیلین (۲/۳۳ درصد) و اسانس آویشن شیرازی شامل کارواکرون (۷۱/۱۲ درصد)، گاماتریپین (۷/۳۴ درصد)، آلفاپینن (۴/۲۶ درصد) و اوکالیپتول (۳/۳۷ درصد) بود.

#### تعیین سیتوتوکسیسیته اسانس‌ها بر سلول‌های CRFK و RAW 264.7

اسانس‌های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی در غلظت‌های بالاتر از، به ترتیب ۳ درصد، ۲/۵ درصد و ۰/۱ درصد برای هر دو سلول سیتوتوکسیک بودند. لذا این مقادیر حداکثر غلظتی از اسانس‌ها بود که جهت تعیین تاثیرات ضدویروسی اسانس‌ها بر سلول‌های FCV و MNV-1 به کار رفت.

#### تاثیر اسانس دارچین بر سویه‌های ویروسی

در تیمار FCV اسانس دارچین، کاهش تیتراهای عفونت‌زای ویروسی تنها در ۳۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده

لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر، با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد و همراه با افزایش تدریجی ۲/۵ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه. دمای اتاق تزریق ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت جریان گاز هلیوم ۱/۵ ml/min بود. هم‌چنین، طیف سنجی جرمی به روش یونیزاسیون الکترونی (EI) با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون‌ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. اسانس‌ها در اتانول ۵۰ درصد رقیق و تا زمان استفاده در شیشه‌های تیره غیرقابل نفوذ به هوا در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

#### تعیین سیتوتوکسیسیته اسانس‌ها بر سلول‌ها

اسانس‌ها در غلظت‌های مورد آزمایش به چاهک‌های حاوی سلول‌های RAW 264.7 و CRFK در پلیت‌های ۹۶ چاهکی منتقل و به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق تحت ۵% CO2 نگهداری شدند. سپس، سلول‌ها با ۱۵۰ میکرولیتر محیط DMEM حاوی ۲ درصد سرم جنین گاو مخلوط و به مدت ۲-۴ روز دیگر گرمخانه‌گذاری (سوئیس، Metrohm) شدند. تاثیر سیتوتوکسیسیته از طریق جستجوی مشاهده‌ای با استفاده از میکروسکوپ نوری (آلمان، Fein Optic) و مقایسه با گروه کنترل (فاقد اسانس) تعیین گردید.

#### تاثیر ضدویروسی اسانس‌ها

غلظت‌های مختلف اسانس‌ها به سوسپانسیون‌های FCV و MNV در DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) حاوی ۲ درصد سرم جنین گاو (حدود ۷-۸ TCID<sub>50</sub>/ml) منتقل و تیمارها در گرمخانه مجهز به تکان دهنده در ۴ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت نگهداری شدند. کنترل مثبت شامل سوسپانسیون ویروسی حاوی اتانول بود. پس از اتمام دوره گرمخانه‌گذاری، ویروس‌های عفونت‌زا از طریق ارزیابی کشت سلولی، که در بالا توضیح داده شد، شمارش شدند. هر تیمار در سه تکرار انجام شد. فعالیت

شد و تیمار با اسانس در ۴ درجه سانتی گراد تغییر قابل ملاحظه‌ای در تیترو ویروس‌های FCV ایجاد نمود (جدول شماره ۱).

تیتروهای FCV پس از مواجهه با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ درصد اسانس دارچین در ۳۷ درجه سانتی گراد، به ترتیب ۱/۱۴، ۲/۲۰ و ۲/۳۸ TCID<sub>50</sub>/ml کاهش یافت. کاهش تیترو MNV-1 حدود ۱ TCID<sub>50</sub>/ml پس از تیمار با غلظت‌های ذکر شده اسانس در ۳۷ درجه سانتی گراد بود (۰/۹۰، ۱/۰۲ و ۱/۱۳ TCID<sub>50</sub>/ml، به ترتیب، در غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ درصد اسانس). تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس دارچین در ۴ درجه سانتی گراد، تیترو MNV-1 را به میزان ۰/۲۲-۰/۵۱ TCID<sub>50</sub>/ml کاهش داد (جدول شماره ۲).

#### تأثیر اسانس رزماری بر سویه های ویروسی

تیمار سویه‌های FCV و MNV-1 با اسانس رزماری در غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد به مدت ۲ ساعت در ۳۷ درجه سانتی گراد، موجب کاهش تیترو هر دو سویه نوروویروس گردید (جدول شماره ۱ و ۲). تیترو FCV طی تیمار با اسانس رزماری در غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ درصد، به ترتیب به میزان ۱/۵۵، ۲/۰۸، ۲/۷۱ و ۳/۳۸ TCID<sub>50</sub>/ml کاهش یافت؛ هم‌چنین تیترو MNV-1 به میزان ۰/۶۶، ۰/۸۹، ۱/۰۷ و ۱/۴۴ TCID<sub>50</sub>/ml در غلظت‌های مشابه تنزل پیدا کرد. تیمار با غلظت‌های مختلف اسانس رزماری در ۴ درجه سانتی گراد، موجب کاهش تیترو FCV به میزان ۰/۴۳-۰/۸۱ TCID<sub>50</sub>/ml و کاهش تیترو MNV-1 در دامنه ۰/۷۲-۰/۳۵ TCID<sub>50</sub>/ml گردید.

#### تأثیر اسانس آویشن شیرازی بر سویه های ویروسی

تأثیر اسانس آویشن شیرازی بر FCV در ۳۷ درجه سانتی گراد بسیار قابل ملاحظه بود. پس از تیمار با غلظت‌های ۰/۰۲، ۰/۰۴، ۰/۰۸ و ۰/۱ درصد این اسانس، تیترو FCV به ترتیب، ۱، ۱/۹، ۴/۱ و ۴/۵ TCID<sub>50</sub>/ml کاهش یافت. تأثیر ضد ویروسی اسانس در ۴ درجه سانتی گراد ناچیز بود. در رابطه با MNV-1، اسانس آویشن شیرازی در ۳۷ درجه سانتی گراد هیچ کاهش

قابل ملاحظه‌ای در تیترو ویروسی در غلظت‌های ۰/۱ تا ۰/۱ درصد نشان نداد؛ اما در غلظت‌های ۰/۰۸ و ۰/۱ درصد، موجب کاهش تیترو ویروس، به ترتیب به میزان ۰/۵۵ و ۱ TCID<sub>50</sub>/ml گردید (جدول شماره ۱ و ۲).

جدول شماره ۱: تأثیر اسانس های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی بر کلیسی ویروس گربه (FCV) پس از گرمخانه گذاری در ۴ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت

ویروس	تیمار	۴°C	۳۷°C
FCV	کنترل	تیترو بازیایی شده a, ۰/۰۸ ± ۶/۹۱	تیترو بازیایی شده a, ۰/۱۵ ± ۸/۱۶
	۱ درصد دارچین	a, ۰/۱۲ ± ۶/۸۷	b, ۰/۳۳ ± ۷/۰۲
	۲ درصد دارچین	a, ۰/۵۱ ± ۶/۸۱	b, ۰/۵۵ ± ۵/۹۶
	۳ درصد دارچین	a, ۰/۳۵ ± ۶/۷۸	b, ۰/۱۹ ± ۵/۷۸
	کنترل	a, ۰/۳۱ ± ۷/۶۵	a, ۰/۲۸ ± ۸/۱۵
	۱ درصد رزماری	a, ۰/۲۵ ± ۷/۲۲	b, ۰/۶۳ ± ۶/۶۰
MNV-1	کنترل	a, ۰/۲۶ ± ۷/۶۵	a, ۰/۲۵ ± ۶/۲۷
	۰/۱ درصد آویشن شیرازی	-	a, ۰/۲۱ ± ۶/۴۰
	۰/۱ درصد آویشن شیرازی	-	b, ۰/۷۳ ± ۵/۲۳
	۰/۰۴ درصد آویشن شیرازی	a, ۰/۳۱ ± ۷/۵۶	c, ۰/۴۷ ± ۴/۳۶
	۰/۰۸ درصد آویشن شیرازی	b, ۰/۰۷ ± ۷/۴۴	d, ۰/۶۶ ± ۲/۱۰
	۰/۱ درصد آویشن شیرازی	b, ۰/۱۵ ± ۷/۷۷	d, ۰/۲۹ ± ۱/۷۶

a: هر تیمار در سه تکرار انجام شد. حروف مختلف در هر ستون برای هر ویروس نشان دهنده تفاوت آماری قابل ملاحظه بین تیمارها می باشد (P < ۰/۰۵). (-): مورد آزمون قرار نگرفته است.

جدول شماره ۲: تأثیر اسانس های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی بر نورو ویروس موش (MNV-1) پس از گرمخانه گذاری در ۴ و ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت

ویروس	تیمار	۴°C	۳۷°C
MNV-1	کنترل	تیترو بازیایی شده a, ۰/۴۱ ± ۷/۸۴	تیترو بازیایی شده a, ۰/۱۵ ± ۷/۳۵
	۱ درصد دارچین	a, ۰/۱۵ ± ۷/۶۲	b, ۰/۶۵ ± ۶/۴۵
	۲ درصد دارچین	a, ۰/۲۱ ± ۷/۴۷	b, ۰/۵۵ ± ۶/۳۳
	۳ درصد دارچین	a, ۰/۷۵ ± ۷/۳۳	b, ۰/۱۶ ± ۶/۲۲
	کنترل	a, ۰/۱۳ ± ۶/۷۵	a, ۰/۳۶ ± ۸/۰۴
	۱ درصد رزماری	a, ۰/۶۵ ± ۶/۴۰	b, ۰/۶۲ ± ۷/۳۸
FCV	۱/۵ درصد رزماری	a, ۰/۳۴ ± ۶/۳۷	b, ۰/۸۱ ± ۷/۱۵
	۲ درصد رزماری	a, ۰/۱۵ ± ۶/۱۶	b, ۰/۱۴ ± ۶/۹۷
	۲/۵ درصد رزماری	a, ۰/۴۲ ± ۶/۰۳	b, ۰/۵۶ ± ۶/۶۰
	کنترل	a, ۰/۰۱ ± ۷/۰۳	a, ۰/۲۶ ± ۶/۸۱
	۰/۰۱ درصد آویشن شیرازی	-	a, ۰/۴۵ ± ۶/۷۷
	۰/۰۴ درصد آویشن شیرازی	a, ۰/۰۱ ± ۷/۰۳	a, ۰/۱۴ ± ۶/۲۷
MNV-1	۰/۰۸ درصد آویشن شیرازی	b, ۰/۴۰ ± ۶/۴۸	a, ۰/۲۵ ± ۶/۵۲
	۰/۱ درصد آویشن شیرازی	a, ۰/۰۰ ± ۶/۰۲	a, ۰/۳۶ ± ۶/۵۶
	۰/۰۱ درصد آویشن شیرازی	-	a, ۰/۲۹ ± ۱/۷۶
	۰/۰۱ درصد آویشن شیرازی	-	a, ۰/۲۹ ± ۱/۷۶

a: هر تیمار در سه تکرار انجام شد. حروف مختلف در هر ستون برای هر ویروس نشان دهنده تفاوت آماری قابل ملاحظه بین تیمارها می باشد (P < ۰/۰۵). (-): مورد آزمون قرار نگرفته است.

## بحث

نتایج مطالعه حاضر به وضوح نشان می‌دهد که اسانس‌های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی به طور موثری تیترا FCV را در ۳۷ درجه سانتی‌گراد کاهش داده، و با افزایش غلظت اسانس‌ها تیترا FCV به میزان بیش‌تری کاهش می‌یابد. با این حال در ۴ درجه سانتی‌گراد، اسانس‌های مورد آزمایش تاثیر معنی‌داری بر عفونت‌زایی FCV نشان ندادند. به‌طور کلی، روش‌های معمول مورد استفاده برای ارزیابی اثر ضدویروسی در شرایط آزمایشگاهی طی مدت ۱ الی ۳ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد و یا دمای اتاق اجرا می‌گردد (۱۶، ۱۵) و زمانی که ارزیابی در ۴ درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود، تصور می‌گردد که ممکن است فعالیت ضد ویروسی ضعیف‌تر باشد (۱۷).

Saddi و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که اثر ضدویروسی اسانس درمنه بر ویروس هرپس سیمپلکس نوع ۱، هنگامی که مخلوط ویروس - اسانس در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید، بیش‌تر از ۴ درجه سانتی‌گراد بود (۱۸). نتایج مطالعه ما برای FCV در راستای این فرض نشان می‌دهد که این اسانس‌ها بیش‌ترین تاثیر را بر FCV در ۳۷ درجه سانتی‌گراد اعمال نموده‌اند و این امر می‌تواند کاربرد نهایی این اسانس‌ها را در مواد غذایی محدود نماید. با این وجود، تاثیر درجه حرارت بر فعالیت ضدویروسی ترکیبات طبیعی ممکن است به نوع ویروس و تفاوت در ترکیبات اسانس‌ها بستگی داشته باشد. به عنوان مثال Lipson و همکاران (۲۰۰۷) نشان دادند که غیر فعال‌سازی باکتریوفاژ T4 تیمار شده با مخلوط آب آلبالو مستقل از دما می‌باشد (۱۹).

در خصوص MNV-1، غلظت‌های بالای اسانس رزماری به طور فزاینده‌ای موجب کاهش عفونت‌زایی در ۳۷ درجه سانتی‌گراد گردید، اسانس آویشن شیرازی موجب کاهش خفیفی در عفونت‌زایی MNV با حداکثر کاهش ۱ TCID<sub>50</sub>/ml، بدون در نظر گرفتن غلظت‌های مورد استفاده شد. در مقایسه با نتایج منتشر شده اخیر در

خصوص تاثیر اسانس‌های زوفا و مرزنجوش بر MNV-1، نتایج حاصل از مطالعه حاضر امیدوارکننده می‌باشد (۲۰). در رابطه با تاثیر بر FCV، این اسانس‌ها ممکن است دارای پتانسیل‌های کاربرد در پزشکی باشند. از سوی دیگر، ۱ TCID<sub>50</sub>/ml کاهش در ۴ درجه سانتی‌گراد موجب ارتقای ایمنی ماده غذایی طی ذخیره‌سازی شده و نیز می‌توان تاثیر افزایش درجه حرارت ذخیره‌سازی را با هدف کاهش بیش‌تر عفونت‌زایی ویروس مورد بررسی قرار داد. در مجموع، این مطالعه نشان داد که تیمار با اسانس باعث کاهش بیش‌تری در تیترا FCV نسبت به MNV می‌گردد. این تاثیر برای سایر ترکیبات ضد میکروبی طبیعی، مانند عصاره دانه انگور در غلظت ۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نیز گزارش شده که موجب ۴/۶۱ PFU/ml کاهش در FCV و تنها ۱/۷۳ PFU/ml کاهش برای MNV گردیده است. روند مشابهی برای فعالیت کیتوزان، آب قره قاط و پروآنتوسیانیدین‌های قره قاط، آب انار و پلی‌فنول‌های انار نیز گزارش شده است (۱۳). در این مطالعات، کاهش در تیترا MNV کم‌تر از ۲ لوگ، به جز برای تیمار با پروآنتوسیانیدین‌های قره قاط با نزدیک به ۳ لوگ کاهش، مشاهده شد (۱۵). به‌طور کلی MNV در برابر شرایط نامساعد و ترکیبات ضد میکروبی مقاوم‌تر از FCV می‌باشد و در این مطالعه نیز MNV در مواجهه با اسانس‌ها مقاوم‌تر بوده است (۲۱). براساس کاربردهای حال حاضر اسانس‌ها و عصاره‌های گیاهی طبیعی، پتانسیل بسیار بالایی برای بررسی استفاده از اسانس‌ها جهت شستشو و آبکشی میوه‌ها و سبزیجات برای کاهش تعداد پاتوژن‌های ویروسی ناشی از مواد غذایی در محصولات خوراکی وجود دارد. به عنوان مثال، اسانس آویشن، تعداد سالمونلا انتریکا را بیش از ۴ لوگ در گوجه فرنگی، پس از ۵ دقیقه شستشو، کاهش داد (۲۲). اسانس‌های مورد بررسی در این مطالعه جهت کاربرد به عنوان نگهدارنده طی دوره نگهداری محصول در یخچال انتخاب شدند. در این رابطه، تاثیرگذاری اسانس‌ها در زمان‌های طولانی‌تر مواجهه و درجه

## سپاسگزاری

این مطالعه از طریق اعتبار پژوهشی ACOMP/2012/199 اعطا شده از سوی ایالت والنسیا و نیز وزارت علوم، تحقیقات و فناوری ایران حمایت مالی گردیده است. هم چنین، نویسندگان از خانم رزا ازنار (انستیتو آگروشیمی و صنایع غذایی دانشگاه والنسیا، اسپانیا) در رابطه با در اختیار گذاردن فضا و تجهیزات آزمایشگاه و گلوریا سانچز (انستیتو آگروشیمی و صنایع غذایی دانشگاه والنسیا، اسپانیا) در خصوص مساعدت در کشت سلول ها سپاسگزاری می نمایند.

حرارت های بالاتر ذخیره سازی به عنوان مثال ۸ درجه سانتی گراد، ۷ روز، باید مورد ارزیابی قرار گیرد. به عنوان نتیجه، کاهش مشاهده شده در تیترا عفونت زایی سویه های نوروویروس مورد ارزیابی توسط اسانس های دارچین، رزماری و آویشن شیرازی، پتانسیل این اسانس ها را برای کاربرد به عنوان نگهدارنده های طبیعی جهت بهبود ایمنی مواد غذایی و کاهش خطر بروز عفونت های معده ای - روده ای ناشی از مصرف مواد غذایی آلوده به نورو ویروس ها و در نتیجه کاهش هزینه های درمانی مربوطه آشکار می سازد.

## References

- Burt S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. *Int J Food Mic* 2004; 94(3): 223-253.
- Pilau MR, Alves SH, Weiblen R, Arenhart S, Cueto AP, Lovato LT. Antiviral activity of the *Lippia graveolens* (Mexican oregano) essential oil and its main compound carvacrol against human and animal viruses. *Braz J Microbiol* 2011; 42(4): 1616-1624.
- Widdowson MA, Sulka A, Bulens SN, Beard RS, Chaves SS, Hammond R. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991e2000. *Emerg Infect Dis* 2005; 11(1): 95-102.
- Bae J, Schwab KJ. Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74(2): 477-484.
- Scharff RL. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J Food Prot* 2012; 75(1): 123-131.
- Straub TM, Honer zu BK, Orosz-Coghlan P, Dohnalkova A, Mayer BK, Bartholomew RA. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerg Infec Dis* 2007; 13(3): 396-403.
- Guix S, Asanaka M, Katayama K, Crawford SE, Neill FH, Atmar RL. Norwalk virus RNA is infectious in mammalian cells. *J Virol* 2007; 81(22): 12238-12248.
- Butot S, Putallaz T, Sanchez G. Effects of sanitation, freezing and frozen storage on enteric viruses in berries and herbs. *Int J Food Microbiol* 2008; 126(1-2): 30-35.
- Baert L, Debevere J, Uyttendaele M. The efficacy of preservation methods to inactivate foodborne viruses. *Int J Food Microbiol* 2009; 131(2-3): 83-94.
- Karst SM, Wobus CE, Lay M, Davidson J, Virgin HW. STAT1-dependent innate immunity to a Norwalk-like virus. *Science* 2003; 299(5612): 1575-1578.
- Duizer E, Bijkerk P, Rockx B, De Groot A, Twisk F, Koopmans M. Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microb* 2004; 70(8): 4538-4543.
- Cannon JL, Papafragkou E, Park GW, Osborne J, Jaykus LA, Vinje J. Surrogates

- for the study of norovirus stability and inactivation in the environment: a comparison of murine norovirus and feline calicivirus. *J Food Prot* 2006; 69(11): 2761-2765.
13. Su X, Zivanovic S, D'Souza DH. Effect of chitosan on the infectivity of murine norovirus, feline calicivirus, and bacteriophage MS2. *J Food Prot* 2009; 72(12): 2623-2628.
  14. Wobus CE, Thackray LB, Virgin HW. Murine norovirus: a model system to study norovirus biology and pathogenesis. *J Virol* 2006; 80(11): 5104-5112.
  15. Su X, Howell AB, D'Souza DH. Antiviral effects of cranberry juice and cranberry proanthocyanidins on foodborne viral surrogates: a time dependence study in vitro. *Food Microbiol* 2010; 27(8): 985-991.
  16. Su X, D'Souza DH. Grape seed extract for control of human enteric viruses. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77(12): 3982-3987.
  17. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV, Maes L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* 2006; 106(3): 290-302.
  18. Saddi M, Sanna A, Cottiglia F, Chisu L, Casu L, Bonsignore L. Antiherpevirus activity of *Artemisia arborescens* essential oil and inhibition of lateral diffusion in Vero cells. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2007; 6: 10.
  19. Lipson SM, Sethi L, Cohen P, Gordon RE, Tan IP, Burdowski A. Antiviral effects on bacteriophages and rotavirus by cranberry juice. *Phytomedicine* 2007; 14(1): 23-30.
  20. Kovac K, Diez-Valcarce M, Raspor P, Hernández M, Rodríguez-Lázaro D. Natural plant essential oils do not inactivate non-enveloped enteric viruses. *Food Environ Virol* 2012; 4(4): 209-212.
  21. Cromeans T, Park GW, Costantini V, Lee D, Wang Q, Farkas T, Lee A, Vinje J. Comprehensive comparison of cultivable norovirus surrogates in response to different inactivation and disinfection treatments. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80(18): 5743-5751.
  22. Lu Y, Wu C. Reduction of *Salmonella enterica* contamination on grape tomatoes by washing with thyme oil, thymol, and carvacrol as compared with chlorine treatment. *J Food Prot* 2010; 73(12): 2270-2275.