




Investigation on the effect of orange and tangerine peel nanoemulsion controlled release on their fumigant toxicity against *Tribolium confusum* (Col.: Tenebrionidea) and *Sitophilus oryzae* (Col: Curculionidae)

Moslem Basij¹✉, Farideh Ganjavi², Iman Sharifian³,
Razieh Razavi⁴

1. Corresponding Author, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Jiroft, Jiroft, Iran. E-mail: Moslembasij@ujiroft.ac.ir
2. Central Standard organization of Kerman Province, Kerman, Iran. E-mail: Farideh_ganjavi@yahoo.com
3. Technical and Commercial Department of Syngenta, Khuzestan, Iran. E-mail: Iman.sharifian@syngenta.com
4. Department of Chemistry, University of Jiroft, Jiroft, Iran. E-mail: Raziehravazi60@gmail.com

Article Info	ABSTRACT
Article type: Research Article	Nanoemulsion formulation has been one of the most effective types of formulation to achieve a controlled release of essential oils. In this study, to show the effect of controlled release, fumigant toxicity of essential oils and nanoemulsions from orange and tangerine peels were investigated on two storage pests, <i>Tribolium confusum</i> , and <i>Sitophilus oryzae</i> , in 24 and 48 hours. The essential oils were extracted from dried orange and tangerine peels using a hydrodistillation method and their content was analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). An ultrasonic probe sonicator (UPS) was utilized to convert the essential oil particles into the nanometer scale. Particle sizes were determined using a dynamic light scattering (DLS) instrument and were 65 nanometers. Based on preliminary experiments, eight concentrations (5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, and 95 microliters in 125 ml containers) of the essential oils and nanoformulations were prepared for fumigant toxicity evaluation. The bioassays were conducted under controlled conditions at a temperature of 25±2 °C, in the darkness, and with three independent replicates at 24 and 48 hours. Fumigant toxicity of the essential oils was higher at 24 hours, while the nanoemulsions exhibited greater efficacy at 48 hours. The highest observed mortality percentage was recorded for orange nanoemulsion against <i>S. oryzae</i> (96.67%) at 48 hours and a concentration of 95 µl/125 ml (≈760 µl/L) and LC ₅₀ of 23.26 µl/125 ml (≈186 µl/L). Results showed higher efficiency of nanoemulsions in 48 h while they were less efficient than non-formulated essential oils in 24 h which is related to their controlled release function.
Article history: Received: 8 June 2024 Revised: 17 September 2024 Accepted: 18 September 2024 Published online: Spring and Summer 2024	
Keywords: <i>plant essential oils,</i> <i>nanoemulsion, stored product pests,</i> <i>fumigant toxicity,</i> <i>controlled release.</i>	
Cite this article: Basij, M., Ganjavi, F., Sharifian, I. & Razavi, R. (2024). Investigation on the effect of orange and tangerine peel nanoemulsion controlled release on their fumigant toxicity against <i>Tribolium confusum</i> (Col.: Tenebrionidea) and <i>Sitophilus oryzae</i> (Col: Curculionidae). <i>Iranian Journal of Plant Protection Science</i> , 55 (1), 63-79. DOI: https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.377284.1007060	
	

© The Author(s).

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.377284.1007060>

Publisher: The University of Tehran Press.

Extended Abstract

Introduction

Essential oils as biopesticides have gained significant attention in recent years due to their potential for eco-friendly and sustainable pest management. They don't have any residue on stored products. One of the key challenges in effectively utilizing essential oils is their controlled release and targeted delivery to the target pests. Nanoemulsion formulation has emerged as a promising approach to achieve this goal, as it can enhance essential oils' stability, solubility, and bioavailability. In this study, the fumigant toxicity of essential oils and their nanoemulsion formulations derived from orange and tangerine peels were investigated against two important storage pests, *Tribolium confusum* (confused flour beetle) and *Sitophilus oryzae* (rice weevil). The objectives were to evaluate the impact of nanoemulsion formulation on the controlled release and efficacy of the essential oils compared to the non-formulated oils.

Materials and Methods

The essential oils were extracted from dried orange and tangerine peels using a hydrodistillation method, from shed-dried orange and tangerine peels. Their chemical composition was analyzed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) with a 30-meter capillary column, 0.25 mm internal diameter, and 0.25 μm film thickness. The temperature program of the column was initially set at 70 °C with a 2-minute hold, then increased to 220°C at a rate of 15 °C per minute, and finally increased to 300 °C and held for 2 minutes. The nanoemulsions were synthesized using 5% v/v of the pure essential oils, Tween 80, and water were mixed, and 1% v/v of ethylene glycol was also added to the mixture. Subsequently, the emulsion solution was subjected to ultrasonic waves using an ultrasonic device (USH650, Max power: 650W) at a frequency of 25 kHz for various durations. This step revealed that the samples became completely transparent after 15 minutes of exposure to the ultrasonic waves. The particle sizes of the nanoemulsions were determined using a dynamic light scattering (DLS) instrument. The fumigant toxicity of the essential oils and their nanoemulsion formulations was evaluated under controlled laboratory conditions (temperature of 27 ± 1 °C, relative humidity of $65\pm 5\%$) against 1-day-old mature beetles in 125 ml glass containers. Trials were performed using eight different concentrations based on primary tests (5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, and 95 microliters) and three independent replicates. The mortality rates of the target pests, *T. confusum* and *S. oryzae*, were recorded at 24 and 48 hours. Data were analyzed using SPSS 22.0 software.

Results and Discussion

The results of the study revealed that the fumigant toxicity of essential oils was higher at 24 hours compared to the nanoemulsion formulations. It is probably related to their release rate which is higher than nanoemulsions in 24 h. Also, essential oil and nanoemulsion of orange were more efficient than tangerine in both 24 and 48 h. level of Limonene (an active ingredient in their essential oil) as an efficient insecticide was higher in orange oil (94.8%) compared with tangerine (91.7%). Results showed that the average size of nanoemulsion particles was 65 nanometers for both orange and tangerine nanoemulsions. Smaller particle sizes result in better fumigant toxicity because they can more efficiently penetrate the spiracles and cuticles of insects. The nanoemulsion formulations demonstrated higher efficacy at 48 hours, with the highest observed mortality percentage recorded for the orange nanoemulsion at a concentration of 95 μl . The enhanced performance of the nanoemulsions at 48 hours was attributed to their better-controlled release properties, which allowed for a sustained and prolonged exposure of the target pests to the active compounds. The essential oils were more effective in the short term (24 hours), while the nanoemulsions exhibited superior performance in the longer term (48 hours), suggesting that the nanoemulsion formulation can provide better control and management of the target pests. The findings of this study highlight the potential of nanoemulsion formulation to enhance the controlled release and efficacy of essential oils as biopesticides.

Conclusion

The improved performance of the nanoemulsions at 48 hours, compared to the non-formulated essential oils, underscores the advantages of using nanoemulsion technology for the delivery and sustained release of active compounds in pest management applications. Further studies are suggested to evaluate the efficacy of nanoemulsions in penetrating and distributing within stored crop depths in silos and storages.



ارزیابی اثر رهاسازی کنترل شده نانواسانس های پوست پرتقال و نارنگی بر سمیت تدخینی آن ها علیه شیشه آرد *Tribolium confusum* (Col.: Tenebrionidea) و شیشه برنج *Sitophilus oryzae* (Col: Curculionidae)

مسلم بسیج^۱ | فریده گنجوی^۲ | ایمان شریفیان^۳ | راضیه رضوی^۴

۱. نویسنده مسئول، گروه گیاهپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: Moslembasij@ujiroft.ac.ir

۲. اداره کل استاندارد استان کرمان، کرمان، ایران. رایانامه: Farideh_ganjavie@yahoo.com

۳. بخش فنی و فروش شرکت سینجنتا، خوزستان، ایران. رایانامه: Iman.sharifian@syngenta.com

۴. گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه جیرفت، جیرفت، ایران. رایانامه: Raziehravazi60@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>نوع مقاله:</p> <p>مقاله پژوهشی</p>	<p>نانوامولسیون یکی از کارآمدترین انواع فرمولاسیون برای رسیدن به هدف رهاسازی کنترل شده اسانس ها است. در این تحقیق به منظور نشان دادن اثر رهاسازی کنترل شده، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار، تغییرات سمیت تدخینی اسانس ها و نانواسانس های پوست پرتقال و نارنگی روی دو آفت انباری شیشه آرد <i>Tribolium confusum</i> و شیشه برنج <i>Sitophilus oryzae</i> مورد مطالعه قرار گرفت. اسانس ها به روش تقطیر آبی از پوست پرتقال و نارنگی استخراج شده و با کروماتوگرافی گازی طیفسنجی جرمی (GC-MS) محتوای آن ها مورد تحلیل قرار گرفت. تبدیل اندازه ذرات اسانس به مقیاس نانومتر با دستگاه تولید امواج مافوق صوت پروب دار (UPS) و تعیین اندازه نانوذرات، با استفاده از دستگاه پراکندگی دینامیکی نور (DLS) ۶۵ نانومتر برآورد شد. بر پایه آزمایش های مقدماتی، غلظت های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۵ میکرولیتر در ۱۲۵ میلی لیتر حجم ظرف آزمایش از اسانس ها و نانواسانس ها تهیه شد و جهت ارزیابی سمیت تدخینی مورد استفاده قرار گرفت. زیست سنجی ها در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس در تاریکی و در ۳ تکرار مستقل در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. سمیت تدخینی اسانس ها در ۲۴ ساعت بیشتر بود در حالی که نانواسانس ها در ۴۸ ساعت کارایی بیشتری از خود نشان دادند. بیشترین مرگومیر شیشه آرد و شیشه برنج به ترتیب ۹۰ و ۹۶/۶۷ درصد مربوط به نانواسانس پرتقال در زمان ۴۸ ساعت و غلظت ۹۵ میکرولیتر بر ۰/۱۲۵ لیتر (حدودا معادل ۷۶۰ میکرولیتر بر لیتر) با LC₅₀ ۲۳/۲۶ میکرولیتر بر ۰/۱۲۵ لیتر (حدودا معادل ۱۸۶ میکرولیتر بر لیتر) مشاهده شد. نتایج این آزمایش، رهاسازی کنترل شده نانواسانس ها در زمان ۴۸ ساعت، با وجود کمتر بودن تأثیر آن ها در ۲۴ ساعت نسبت به اسانس های فرموله نشده را در عمل آشکار ساخت.</p>
<p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۳/۱۹</p> <p>تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۶/۲۷</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۲۸</p> <p>تاریخ انتشار: بهار و تابستان ۱۴۰۳</p>	
<p>کلیدواژه ها:</p> <p>اسانس های گیاهی، نانوامولسیون، آفات انباری، سمیت تنفسی، رهاسازی کنترل شده.</p>	

استناد: بسیج، مسلم؛ گنجوی، فریده؛ شریفیان، ایمان و رضوی، راضیه (۱۴۰۳). ارزیابی اثر رهاسازی کنترل شده نانواسانس های پوست پرتقال و نارنگی بر سمیت تدخینی آن ها علیه شیشه آرد *Tribolium confusum* (Col.: Tenebrionidea) و شیشه برنج *Sitophilus oryzae* (Col: Curculionidae). نشریه دانش گیاهپزشکی ایران، ۵۵ (۱)، ۶۳-۷۹. DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.377284.1007060>



© نویسندگان.

DOI: <https://doi.org/10.22059/ijpps.2024.377284.100706>

ناشر: مؤسسه انتشارات دانشگاه تهران.

مقدمه

سالانه مقادیر قابل توجهی از محصولات کشاورزی در انبارها و توسط آفات انباری از بین می‌روند. بخش مهمی از این آفات را حشرات آفت انباری تشکیل می‌دهند (Draz *et al.* 2022). راه‌های مختلفی برای کنترل این حشرات در انبارها شناخته شده‌اند. با این وجود، در سال‌های اخیر، توجه‌های بیشتری به روش‌های غیر شیمیایی برای کنترل حشرات آفت انباری معطوف شده است (Jarrahi *et al.* 2016).

استفاده مکرر از آفت‌کش‌های شیمیایی برای کنترل آفات انباری می‌تواند باعث افزایش مقاومت حشرات در برابر آفت‌کش‌های و همچنین افزایش باقیمانده آفت‌کش‌های در محصولات کشاورزی و محیط‌زیست گردد. از طرف دیگر، استفاده از حشره‌کش‌های شیمیایی رایج برای کنترل آفت انباری برای سلامت انسان و دام مضر است (Satya *et al.* 2016). در سال‌های اخیر، روند جدیدی برای توسعه حشره‌کش‌های غیرشیمیایی برای کنترل آفات انباری در جهان شکل گرفته است. بخش مهمی از این ترکیبات را مشتقات گیاهی همچون اسانس‌های گیاهی تشکیل می‌دهند (Souto 2021). اسانس‌ها به سادگی استخراج می‌شوند، با محیط سازگارند و سریع تجزیه می‌شوند و برای حفاظت بلندمدت در آب‌و‌خاک دوام ندارند. علیرغم موارد ذکر شده، ویژگی‌هایی همچون حلالیت پایین، فراریت بالا (قبل از کاربرد آن‌ها)، اکسیداسیون سریع و بی‌ثباتی شیمیایی اسانس‌های گیاهی در حضور نور، هوا، رطوبت و دمای بالا از معایب اسانس‌ها است (Isman 2020).

یکی از راه‌های برطرف کردن این معایب، فرموله کردن اسانس‌های گیاهی است. بسته به نوع استفاده‌ای که از این ترکیبات می‌شود، فرمولاسیون‌های مختلفی از اسانس‌های گیاهی تولید شده و تا کنون مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Sharifian *et al.* 2020, Heydari *et al.* 2011). با ورود فناوری نانو به علم کشاورزی نه تنها تحولات اساسی را در حفاظت از محیط‌زیست، مدیریت بیماری و به حداقل رساندن تلفات مواد مغذی در کوددهی را به همراه داشته است بلکه از این فناوری در تولید فرمولاسیون‌های پایدار از اسانس‌های گیاهی استفاده شده است (Campolo, 2021). با استفاده از این فناوری، مشکل حلالیت اسانس‌ها در فرمولاسیون‌های آب‌پایه نیز برطرف می‌شود.

در سال‌های اخیر، استفاده از امولسیون‌کننده‌ها در فرمولاسیون نانوامولسیون با هدف افزایش کارایی و گسترش کاربردهای بالقوه به طور گسترده مورد توجه قرار گرفته است. با این روش، ضمن امکان رهاسازی کنترل شده و مناسب، پایداری اسانس را برای نگهداری طولانی‌تر آن افزایش می‌دهند و بیشترین اثر در محدوده زمانی موردنظر و کمترین خسارت زیست‌محیطی را نیز دارند. با استفاده از روش ساده و سریع اولتراسونیک، یک سیستم نانوامولسیون پایدار با محدوده اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر تهیه می‌شود (Jesser 2020).

در پژوهش حاضر ابتدا محتویات اسانس‌های پرتقال و نارنگی با کمک تکنیک GC-MS مورد ارزیابی قرار گرفته است. سپس اثر سمیت تدخینی اسانس‌های خالص و نانوامولسیون‌های پوست پرتقال و پوست نارنگی بر حشرات کامل شپشه آرد و شپشه برنج بدون در نظر گرفتن دوز کشنده ۵۰ درصد آن‌ها انجام گرفت. هدف اصلی از انجام این تحقیق، ارزیابی سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانوامولسیون‌ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت برای بررسی تأثیر رهاسازی تدریجی (کنترل شده) بر سمیت تدخینی آن‌ها بوده است.

پیشینه پژوهش

پس از سال‌ها تحقیق روی خواص حشره‌کشی اسانس‌های گیاهی (Jarrahi *et al.* 2016; Dey and Gupta 2016; Oboh *et al.* 2017 Hashem *et al.* 2018) و مشخص شدن جنبه‌های مهمی از تأثیرات این مواد، زمان آن فرارسیده که استفاده از آن‌ها وارد مرحله عملی‌تری شود. دانشمندان در سال‌های اخیر، به منظور افزایش کارایی حشره‌کشی اسانس‌های گیاهی، به بهینه‌سازی فرمولاسیون این ترکیبات روی آورده‌اند (Badawy *et al.* 2019; Draz *et al.* 2022). در این میان،

توجه به نانوفرمولاسیون‌ها همچون نانومولسیون‌ها، نانوکپسول‌ها و نانوزل‌ها مورد توجه بالاتری قرار داشته‌اند (Campolo et al., 2021).

در چند سال اخیر، تحقیقات بسیاری تأثیر نانومولسیون‌های ساخته شده بر پایه اسانس‌های گیاهی را علیه آفات انباری مورد بررسی قرار داده‌اند (Nenaah et al. 2015; Hashem et al. 2018; Draz et al. 2022). Draz و همکاران در سال ۲۰۲۲ سه اسانس گیاهی انیسون *Pimpinella anisum*، آویشن *Thymus vulgaris* و گشنیز *Coriandrum sativum* را به شکل نانومولسیون فرموله کرده و علیه دو سوسک آفت انباری *Sitophilus oryzae* و *Tribolium castaneum* استفاده کردند و سمیت آن‌ها را اندازه‌گیری کردند. نتایج نشان داد که سمیت نانومولسیون‌های تولید شده، به دلیل کوچک‌تر شدن ذرات اسانس و افزایش نفوذ به بدن آفات، بیش از امولسیون فرموله نشده بوده است. هرچند، سمیت ترکیبات را در طول زمان با یکدیگر مقایسه نکردند. در تحقیق Hashem و همکاران (۲۰۱۸) نیز تمرکز بر نحوه تأثیر نانومولسیون روی *T. castaneum* بوده است. Nenaah و همکاران (۲۰۱۵) سمیت تدخینی اسانس و نانواسانس سه گیاه *Ageratum maculatus* مورد آزمایش قرار دادند و دریافتند که سمیت تدخینی اسانس‌ها به شکل معنی‌داری کمتر از نانواسانس‌ها بوده است.

تحقیقات متعددی نیز ثابت کرده‌اند که نانوفرموله کردن اسانس‌های گیاهی باعث رهاسازی تدریجی و کنترل شده آن‌ها و افزایش عملکرد آن‌ها در بازه زمان شده است (Pandit et al. 2016; Weisany et al. 2022). Pandit و همکاران (۲۰۱۶) روش نانوکپسوله کردن را برای افزایش پایداری، حلالیت بهتر در آب و رهاسازی کنترل شده اسانس‌ها مورد مطالعه قرار دادند و ۱۴ روش مختلف برای نانوکپسوله کردن اسانس‌های گیاهی را مورد بررسی قرار دادند. Weisany و همکاران (۲۰۲۲) نیز در یک مقاله مروری بررسی کردند که نانومولسیون‌ها در کاربری‌های مختلف، باعث بهبود عملکرد اسانس‌ها (حلالیت در آب، پایداری و رهاسازی کنترل شده) نسبت به حالت فرموله نشده داشته‌اند.

روش‌شناسی پژوهش

تهیه اسانس‌ها

برای تهیه اسانس، پوست‌های پرتقال *Citrus sinensis* رقم والنسیا و نارنگی *Citrus tangerine* رقم کینو (از باغ‌های میوه شهرستان جیرفت) تهیه گردید. درختان مورد نظر سمپاشی نشده بودند و علائم آفت و بیماری روی میوه‌های جمع‌آوری شده مشاهده نشد. میوه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، پوست‌کنی و پوست‌های آن‌ها در دمای 25 ± 5 درجه سلسیوس خشک شدند. بعد از خشک شدن، پوست‌ها به وسیله آسیاب برقی کاملاً آسیاب شدند. در هر مرتبه اسانس‌گیری، ۶۰ گرم پوست آسیاب شده با ۶۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد. اسانس به وسیله دستگاه کلونجر در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۳ ساعت (تا زمانی که کلیه اسانس از نمونه خارج شود) انجام شد. اسانس‌های استخراج شده به وسیله سولفات سدیم آبگیری شد و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای تیره با روپوش آلومینیومی در یخچال (دمای 4 ± 2 درجه سلسیوس) نگهداری شدند (Heidari et al., 2017).

تهیه نانواسانس‌ها

سنتز نانومولسیون‌ها توسط دستگاه تولید امواج مافوق صوت پروب‌دار (مدل: UHP 400) صورت گرفت. بدین منظور ۵ درصد حجمی از اسانس خالص، در توپین ۸۰ و آب مخلوط گردید و ۱ درصد حجمی اتیلن گلیکول هم به ترکیب اضافه شد.

تویین ۸۰ به عنوان یک سورفکتانت غیریونی، مانع از انفصال و ائولسیون مجدد قطرات امولسیون می‌شود. همچنین با کاهش تنش سطحی بین فاز آبی و روغنی، پایداری امولسیون را افزایش می‌دهد. از طرف دیگر، تویین ۸۰ می‌تواند باعث افزایش نفوذ و جذب مواد مؤثره در امولسیون‌ها شود. این ماده می‌تواند عنوان یک ماده امولسیفایر، حلالیت مواد نامحلول در آب را افزایش دهد. نهایتاً دلیل ما در استفاده از تویین ۸۰ این بوده که یک ماده غیرسمی و سازگار زیستی است (Gomes et al. 2018). خواص منحصر به فرد اتیلن گلیکول از جمله ضد یخ بودن، حلالیت، جذب آب و کاهش تنش سطحی، آن را به یک افزودنی مفید در امولسیون‌ها تبدیل کرده است. در مرحله بعد، محلول امولسیون با استفاده از دستگاه اولتراسونیک (USH650, Max power:650W) در فرکانس ۲۵ کیلوهرتز در مدت زمان‌های گوناگون امواج تابشی گردید (Heydari et al. 2020). این مرحله نشان داد که نمونه‌ها پس از ۱۵ دقیقه قرار گرفتن در معرض امواج اولتراسونیک کاملاً شفاف می‌شود. اندازه و توزیع ذرات نانوامولسیون با استفاده از دستگاه پراکندگی دینامیکی نور (MAL1008078, Malvern.UK) تعیین شد (Manjesh et al. 2022).

پرورش حشرات

آفات مورد آزمایش در این تحقیق شپشه آرد و شپشه برنج پرورش یافته (بیش از ۲۰ نسل) در گروه گیاهپزشکی دانشگاه جیرفت بودند. حشرات در جعبه‌های پلاستیکی شفاف به ابعاد $10 \times 15 \times 25$ سانتی‌متر در دمای 27 ± 2 درجه سلسیوس، رطوبت نسبی 65 ± 5 درصد و دوره نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی، به ترتیب روی دانه‌های آرد و برنج پرورش یافتند. ابتدا حدود ۱۰۰ جفت حشره کامل بدون تفکیک نر و ماده داخل ظروف پرورش رها شدند. پس از گذشت یک هفته و اطمینان از تخم‌گذاری حشرات کامل، بالغین از این ظروف خارج شده و به ظروف دیگر حاوی مواد غذایی منتقل شدند. ظروف حاوی تخم تا زمان خروج حشرات کامل، آن‌ها جدا شده و از حشرات یک روزه به عنوان حشرات کامل هم‌سن، برای انجام زیست-سنجی استفاده شد.

آنالیز اسانس‌ها

شناسایی ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس‌ها با استفاده از شاخص بازداری، بررسی طیف‌های جرمی ترکیب‌ها و مقایسه آن‌ها با طیف‌های جرمی استاندارد انجام شد. در این مطالعه دستگاه GC-MS از نوع Agilent ۶۸۹۰ با ستون موئینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ / میلی‌متر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر از نوع MS5-HP بود. برنامه دمایی ستون در ابتدا به صورت ۷۰ درجه سلسیوس با توقف ۲ دقیقه در این دما، سپس افزایش دما تا ۲۲۰ درجه سلسیوس با سرعت ۱۵ درجه در هر دقیقه و افزایش دمای ستون تا ۳۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ دقیقه بود (Oboh et al. 2017).

سمیت تنفسی اسانس

جهت انجام آزمایش تدخینی اسانس از کاغذ صافی‌های واتمن شماره ۱ به ابعاد 1×2 سانتی‌متر به عنوان منبع متصاعد کننده اسانس استفاده شد. به وسیله میکروپیپت کاغذ صافی با غلظت‌های مختلف اسانس (ماده خالص اسانس، بدون استفاده از حلال) آغشته شد و در قسمت درونی درب ظروف شیشه‌ای به حجم ۱۲۵ میلی‌لیتر قرار داده شد. جهت تعیین غلظت‌های کمینه و بیشینه کشندگی ابتدا آزمایش‌های مقدماتی انجام شد. پس از تعیین محدوده غلظت‌ها، آزمایش‌های اصلی با هشت غلظت انجام گرفت. غلظت‌های مورد استفاده ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۵ میکرولیتر بر ۱۲۵ میلی‌لیتر حجم ظرف آزمایش و کاغذ صافی‌ها به وسیله طلق نازک به صورتی از در ظروف آویزان شدند که حشرات کامل به طور مستقیم با آن تماس پیدا نکنند (Campolo et al. 2014). برای تیمار شاهد از کاغذ صافی‌های بدون اسانس استفاده شد. در هر شیشه، ۱۰ عدد حشره کامل ۱-۲ روزه قرار داده شد، درپوش شیشه‌ها محکم بسته شده و با پارافیلیم مسدود شد تا اسانس به بیرون نفوذ نکند. تعداد تلفات پس از گذشت ۲۴ و ۴۸ ساعت از شروع تیمار، شمارش و ثبت شد. حشراتی که قادر به حرکت دادن پاها و شاخک خود در مقابل تحریک با سوزن داغ نبودند مرده تلقی می‌شدند. برای این آزمایش‌ها سه تکرار در نظر گرفته شد.

زیست‌سنجی در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس و در تاریکی انجام گرفت. از آنجایی که درب محفظه‌های شیشه‌ای بسته بود، میزان رطوبت اندازه‌گیری و گزارش نشد.

آنالیز آماری

برای آنالیز واریانس داده‌ها از نرم‌افزار SPSS 22.0 و از نرم‌افزار Poloplus 2.0 برای محاسبه مقادیر LC_{50} و مقایسه آن‌ها استفاده شد.

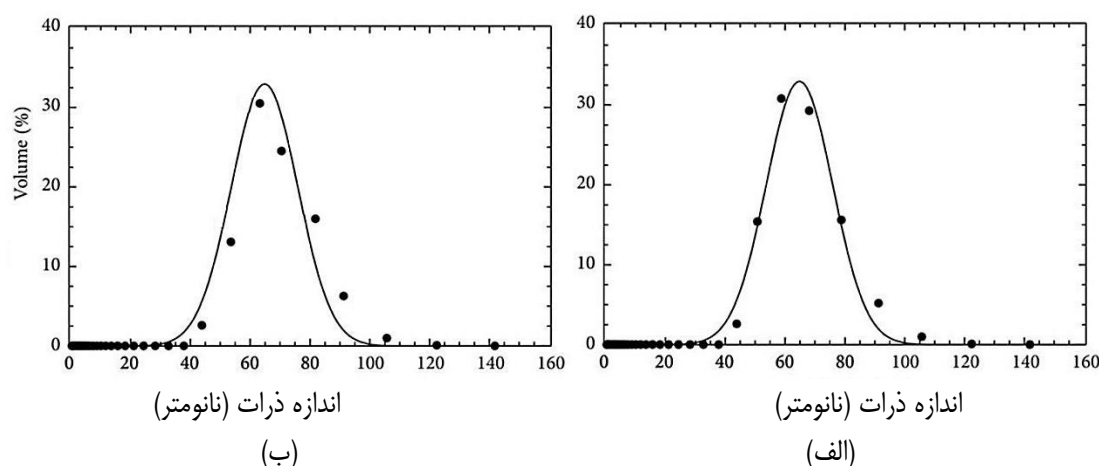
یافته‌های پژوهش

نتایج آنالیز GC-MS اسانس‌های پرتقال و نارنگی در جدول شماره ۱ آورده شده است. همان‌طور که در این جدول مشاهده می‌شود، بیشترین درصد تشکیل دهنده هر یک از اسانس‌های پرتقال و نارنگی ترکیب لیمون است و مقدار آن به ترتیب ۹۴/۸ و ۹۱/۷ درصد است.

جدول ۱. نتایج کروماتوگرافی گازی - طیف‌سنجی جرمی اسانس‌های پوست پرتقال و نارنگی

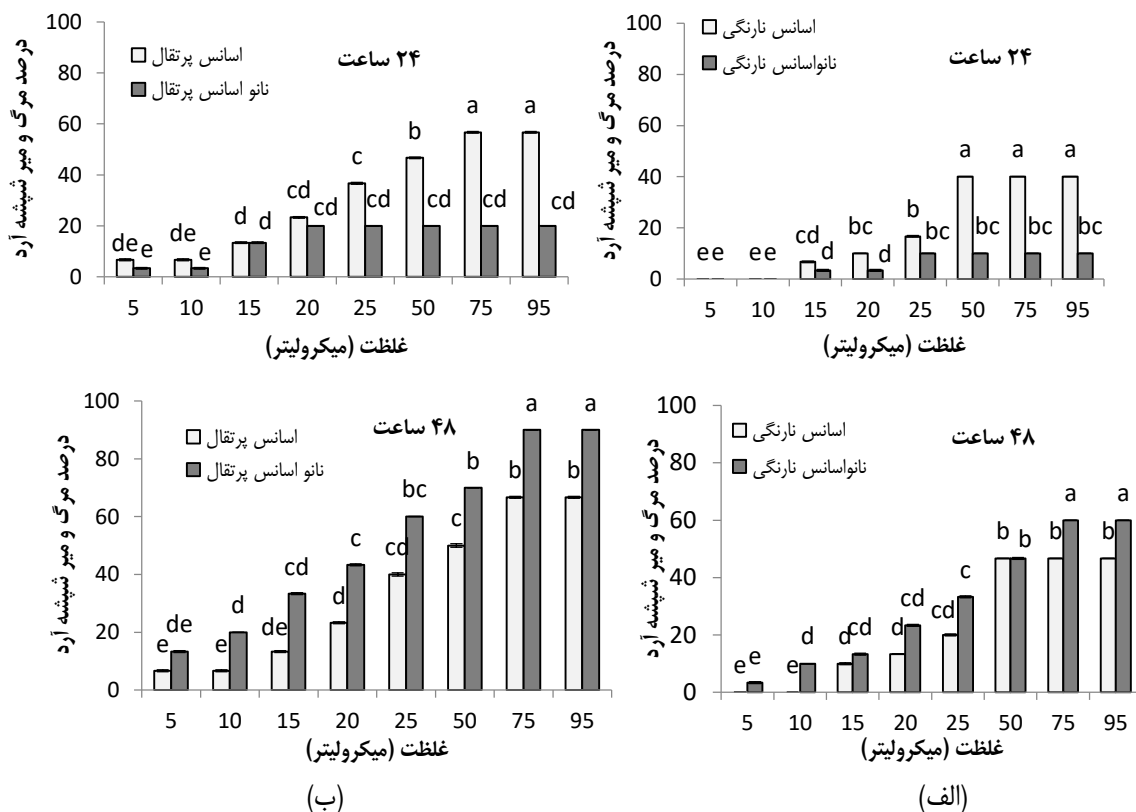
شماره	ترکیبات فرار	شاخص بازداری	نارنگی (%)	پرتقال (%)
۱	آلفا-توجن	۹۲۹	۰/۱	----
۲	آلفا-پینن	۹۳۴	۰/۷	۰/۹
۳	سابینن	۹۷۰	۰/۳	۰/۵
۴	بتا-پینن	۹۷۸	۱	۰/۱
۵	بتا-مایرسن	۹۹۰	۲/۴	۲/۳
۶	اکتانال	۱۰۰۲	----	۰/۵
۷	دلتا-۳-کارن	۱۰۱۲	----	۰/۲
۸	سیگما-سیمن	۱۰۲۵	۰/۱	----
۹	لیمونن	۱۰۳۰	۹۱/۷	۹۴/۸
۱۰	لامبدا-ترینن	۱۰۶۰	۰/۴	----
۱۱	لینالول-اکساید	۱۰۷۳	۰/۵	----
۱۲	آلفا-ترینولن	۱۰۹۰	۰/۴	۰/۳
۱۳	آلفا-ترینتول	۱۱۹۳	۰/۲	----
۱۴	نرال	۱۲۴۵	۰/۱	----
۱۵	جرانیال	۱۲۷۱	۰/۲	----
۱۶	جرانیل-استات	۱۳۸۲	۰/۵	----
	مجموع (%)		۹۹/۹	۹۹/۹

میانگین قطر ذرات محلول نانومولسیون هر دو اسانس ۶۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. شکل ۱، نمودار خروجی دستگاه پراکندگی دینامیکی نور (MAL1008078, Malvern UK) را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، قطر ذرات مشابه نمودار توزیع نرمال اطراف میانگین ۶۵ نانومتر بوده است. این عدد، رسیدن ابعاد ذرات به مقیاس نانو را تأیید می‌کند.



شکل ۱. نمودار خروجی دستگاه پراکنندگی دینامیکی نور (DLS) برای نشان دادن ابعاد نانوامولسیون‌های تولید شده (الف) نانوامولسیون پرتقال، (ب) نانوامولسیون نارنگی

تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از این آزمایش نشان داد که در سطح اطمینان ۹۵ درصد بین مرگومیر دو حشره تحت تأثیر اسانس‌ها و نانواسانس‌های مورد مطالعه، تفاوتی وجود نداشته است ($F=۱/۸$ ، $df=۱$ و $P=۰/۱۸$)؛ یعنی حساسیت دو حشره شپشه آرد و شپشه برنج به اسانس‌های پرتقال و نارنگی و نانوامولسیون آن‌ها با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشته است. اما تفاوت بین مرگومیر ناشی از غلظت‌های مختلف مورد استفاده (۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۵ میکرولیتر) از اسانس‌ها و نانوامولسیون آن‌ها در این آزمایش معنی‌دار بوده است ($F=۱۱۳/۱۷۳$ ، $df=۷$ و $P=۰/۰۰۰$). به این معنی که با افزایش غلظت اسانس‌ها و نانوامولسیون آن‌ها، مرگومیر حشرات مورد مطالعه، به شکل معنی‌داری افزایش نشان داده است. این نتیجه نشان می‌دهد که مرگومیر حشرات در این آزمایش وابسته به دوز ماده مؤثره مورد استفاده بوده است. نتایج مربوط به سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانواسانس‌های نارنگی و پرتقال روی شپشه آرد در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعته را در شکل شماره ۲ مشاهده می‌کنید. در شکل ۲ محورهای افقی نشان‌دهنده غلظت‌های اسانس‌ها و نانواسانس‌های مورد استفاده (میکرولیتر) و محورهای عمودی نشان‌دهنده درصد مرگومیر شپشه آرد در بازه‌های زمانی مختلف هستند. همچنین، دو نمودار سمت راست، سمیت تدخینی اسانس و نانواسانس پرتقال و دو نمودار سمت چپ، مربوط به اسانس و نانواسانس نارنگی هستند.



شکل ۲. درصد مرگ و مبر شپشه آرد *T. confusum* در اثر سمیت تدخینی اسانس ها و نانواسانس های پرتقال (الف) و نارنگی (ب) در زمان های ۲۴ و ۴۸ ساعت - حروف کوچک (انگلیسی) متفاوت در بالای هر ستون، نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد با آزمون توکی است.

همان طور که در شکل ۲ مشاهده می شود، به طور کلی درصد مرگ و مبر شپشه آرد در اثر کاربرد اسانس و نانواسانس پرتقال در ۲۴ و ۴۸ ساعت، بیشتر از اسانس و نانواسانس نارنگی بوده است. بیشترین درصد مرگ و مبر شپشه آرد در زمان ۲۴ ساعت (۵۶/۶۶ درصد) در اثر سمیت تدخینی اسانس پرتقال و در غلظت های ۷۵ و ۹۵ میکرو لیتر مشاهده گردید. همچنین اسانس ها در ۲۴ ساعت، سمیت تدخینی بیشتری از نانواسانس ها (بیشترین درصد مرگ و مبر ۲۰ درصد) نشان داده اند. در حالی که، در مدت زمان ۴۸ ساعت سمیت تدخینی نانواسانس ها به مراتب بیشتر (بیشترین مرگ و مبر ۹۰ درصد در اثر نانومولسیون پرتقال در مقابل مرگ و مبر ۶۶/۶۷ درصدی در اسانس پرتقال) بوده است.

نتایج تجزیه واریانس داده ها نشان داد که در میزان سمیت تدخینی اسانس ها و نانواسانس های نارنگی و پرتقال روی شپشه آرد، در زمان ۲۴ ساعت از لحاظ مرگ و مبر مشاهده شده، اختلاف معنی داری وجود داشته است ($F=165/244$ ، درجه آزادی=۳ و $P=0$). همچنین تجزیه واریانس داده های مرگ و مبر شپشه آرد تحت تأثیر غلظت های ۸ گانه نشان داد که بین غلظت های مختلف، اختلاف معنی داری وجود داشته است ($F=118/362$ ، درجه آزادی=۷ و $P=0$). همچنین در بازه زمانی ۴۸ ساعت، اثر غلظت، نوع ماده مؤثره و اثر متقابل غلظت و نوع ماده مؤثره معنی دار بودند ($F=2/61$ ، درجه آزادی=۲۱ و $P=0/002$) که نشان دهنده تفاوت معنی دار بین اسانس ها و نانومولسیون آن ها و تفاوت معنی دار بین غلظت های مورد مطالعه می باشد. در بازه زمانی ۴۸ ساعت، نانواسانس پرتقال (با مرگ و مبر ۹۰ درصد) بیشترین عملکرد را علیه شپشه آرد داشته است.

همچنین در جدول ۲ میزان LC_{50} (غلظت کشنده ۵۰ درصد) هر یک از ترکیبات به کار رفته در این آزمایش را روی شپشه آرد در زمان ۲۴ ساعت آورده شده است.

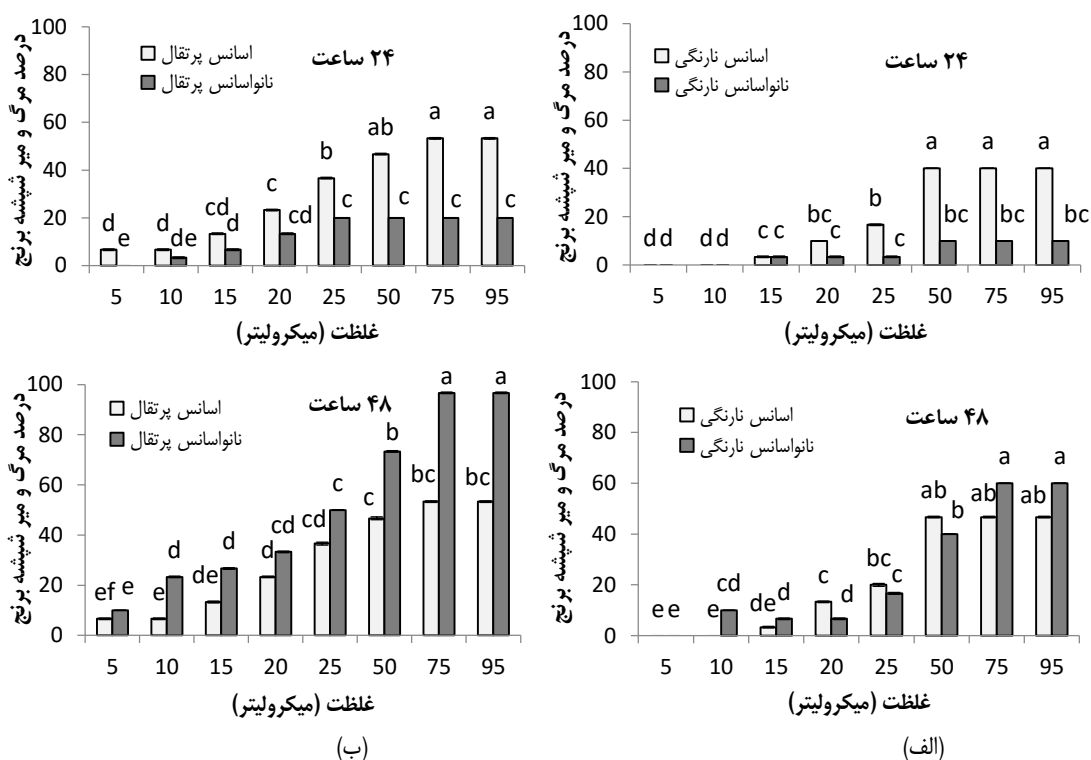
جدول ۲. غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC₅₀) اسانس‌ها و نانواسانس‌های پوست نارنگی و پرتقال روی شپشه آرد *Tribolium confusum* در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت

ماده مؤثره	بازه زمانی	LC ₅₀ (حدبالا-حدپایین)	شیب ± خطای معیار	کای اسکویر (درجه آزادی)	LC ratio (حدبالا-حدپایین)
اسانس نارنگی	۲۴	۹۶/۳۴۱* (۷۱/۶۷-۱۵۷/۱)	۱/۹۸۶±۰/۳۳۲	۶/۷۵ (۲۲)	۱/۲۷۱† (۰/۷۹-۲/۰۵)
	۴۸	۷۵/۷۴۴* (۵۸/۵۷-۱۱۱/۳)	۱/۹۹۴±۰/۳۰۳	۱۰/۳۸۱ (۲۲)	
اسانس پرتقال	۲۴	۶۱/۱۲۱ (۴۵/۵۸-۹۴/۵۵)	۱/۵۲۵±۰/۲۴۳	۶/۹۳۵ (۲۲)	۱/۲۶۸ (۰/۸۲-۱/۹۶)
	۴۸	۴۸/۲۱۴ (۳۸/۰۱-۶۵/۵۹)	۱/۷۸۶±۰/۲۴۹	۸/۸۸۹ (۲۲)	
نانوآمولسیون پرتقال	۲۴	۵۴۸/۱۵ (۱۶۲/۵۴-۱۲۱۰/۰۶)	۰/۷۸۱±۰/۲۵۹	۶/۹۹۹ (۲۲)	۲۴/۸۹ (۳/۳۷-۱۸۳/۴)
	۴۸	۲۲/۰۲ (۱۷/۸۹-۲۶/۹۱)	۲/۰۹۲±۰/۲۵۲	۵/۱۱۴ (۲۲)	
نانوآمولسیون نارنگی	۲۴	۵۱۸/۱۰ (۱۸۷/۰۴-۲۷۷۹/۵)	۱/۲۴۹±۰/۳۸۹	۷/۶۵۷ (۲۲)	۹/۴۱۷ (۱/۸-۴۹/۲۷)
	۴۸	۵۵/۰۱۷ (۴۲/۶-۷۸/۲۹)	۱/۷۱۶±۰/۲۵۲	۴/۴۳۷ (۲۲)	

*: غلظت‌ها بر حسب میکرولیتر بر ۱۲۵ میلی‌لیتر هستند. برای محاسبه غلظت کشنده ۵۰ درصد در فضای معادل ۱ لیتر (μl/L)، عدد مورد نظر در ۸ ضرب می‌شود. †: LC ratio (نرخ غلظت کشنده) عددی است که برای نشان دادن معنی‌دار بودن یا نبودن تفاوت دو مقدار LC₅₀ استفاده می‌شود. اگر بین حد بالا و پایین آن عدد ۱ وجود داشت، اختلاف غیر معنی‌دار و در غیر این صورت، معنی‌دار است.

همان‌طور که در جدول شماره دو مشاهده می‌شود، مؤثرترین ترکیب در زمان ۲۴ ساعت علیه شپشه آرد، اسانس نارنگی (LC₅₀=۶۱/۱۲۱ μl/125ml) بوده است. همچنین در این زمان، کمترین تأثیر مربوط به نانوآمولسیون پرتقال بوده است (LC₅₀=۵۴۸/۱۵ μl/125ml). در بازه زمانی ۴۸ ساعت، تأثیر سمیت تدخینی نانوآمولسیون‌ها نسبت به اسانس خالص، بیشتر بوده است. در این بازه زمانی، مؤثرترین ترکیب، نانوآمولسیون پرتقال (LC₅₀=۵۴۸/۱۵ μl/125ml) و کم اثرترین ترکیب اسانس نارنگی (LC₅₀=۷۵/۷۴ μl/125ml) بوده است (جدول ۲). همان‌طور که در ستون مربوط به LC ratio (نرخ غلظت کشنده) در جدول ۲ مشاهده می‌شود، بین سمیت تدخینی نانوآمولسیون‌ها در ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌دار مشاهده شده است. درحالی‌که سمیت تدخینی اسانس‌ها در ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشته است.

نتایج مربوط به سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانواسانس‌های نارنگی و پرتقال روی شپشه برنج در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعته را در شکل ۳ مشاهده می‌کنید. در شکل ۳ محورهای افقی نشان‌دهنده غلظت‌های اسانس‌ها و نانواسانس‌های مورد استفاده (میکرولیتر بر ۱۲۵ میلی‌لیتر حجم ظرف) و محورهای عمودی نشان‌دهنده درصد مرگ‌ومیر شپشه برنج در بازه‌های زمانی مختلف هستند. همچنین، دو نمودار سمت راست، سمیت تدخینی اسانس و نانواسانس پرتقال و دو نمودار سمت چپ، مربوط به اسانس و نانواسانس نارنگی هستند.



شکل ۳. درصد مرگ‌ومیر شپشه برنج *S. oryzae* در اثر سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانواسانس‌های پرتقال (الف) و نارنگی (ب) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت - حروف کوچک (انگلیسی) متفاوت، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آن غلظت در مقایسه با غلظت‌های دیگر در آن نمودار در سطح اطمینان ۹۵ درصد با آزمون توکی است.

همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود، به‌طور کلی درصد مرگ‌ومیر شپشه برنج در اثر کاربرد اسانس و نانواسانس پرتقال در ۲۴ و ۴۸ ساعت، بیشتر از اسانس و نانواسانس نارنگی بوده است. بیشترین درصد مرگ‌ومیر شپشه برنج در زمان ۴۸ ساعت (۹۶/۶۶ درصد) در اثر سمیت تدخینی اسانس پرتقال و در غلظت‌های ۷۵ و ۹۵ میکرولیتر مشاهده گردید. همچنین با کاهش غلظت‌ها، درصد مرگ‌ومیر نیز کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده مؤثر بودن تغییر غلظت اسانس در مرگ‌ومیر حشره است. با نگاه دقیق‌تر، می‌توان متوجه شد که اسانس‌ها در ۲۴ ساعت، سمیت تدخینی بیشتری از نانواسانس‌ها نشان داده‌اند. در حالی که، در مدت‌زمان ۴۸ ساعت سمیت تدخینی نانواسانس‌ها به مراتب بیشتر بوده است. در میان ترکیبات مورد مطالعه در بازه زمانی ۲۴ ساعت، اسانس پرتقال (با مرگ‌ومیر ۵۳/۳۳ درصد) و در بازه زمانی ۴۸ ساعت، نانواسانس پرتقال (با مرگ‌ومیر ۹۶/۶۷ درصد) بیشترین عملکرد را علیه شپشه برنج داشته‌اند (شکل ۳).

همان‌طور که در جدول شماره سه مشاهده می‌شود، مؤثرترین ترکیب در زمان ۲۴ ساعت علیه شپشه برنج، اسانس پرتقال ($LC_{50}=66/168 \mu l/125ml$) بوده است. همچنین در این زمان، کمترین تأثیر مربوط به نانوامولسیون نارنگی بوده است ($LC_{50}=678/35 \mu l/125ml$). در بازه زمانی ۴۸ ساعت، تأثیر سمیت تدخینی نانوامولسیون‌ها نسبت به اسانس خالص، بیشتر بوده است. در این بازه زمانی، مؤثرترین ترکیب، نانوامولسیون پرتقال ($LC_{50}=23/26 \mu l/125ml$) و کم اثرترین ترکیب اسانس نارنگی ($LC_{50}=75/38 \mu l/125ml$) بوده است (جدول ۳). همان‌طور که در ستون مربوط به LC ratio (نرخ غلظت کشنده) در جدول ۳ مشاهده می‌شود، بین سمیت تدخینی نانوامولسیون‌ها در ۲۴ و ۴۸ ساعت اختلاف معنی‌دار مشاهده شده است. در حالی که سمیت تدخینی اسانس‌ها در ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت معنی‌داری نداشته است.

جدول ۳. غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) اسانس‌ها و نانواسانس‌های پوست نارنگی و پرتقال روی شپشه برنج *Sitophilus oryza* در دو بازه زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت

ماده مؤثره	بازه زمانی	LC_{50} (حدبالا-حدپایین)	شیب \pm خطای معیار	کای اسکویر (درجه آزادی)	LC ratio (حدبالا-حدپایین)
اسانس نارنگی	۲۴	۹۶/۲۴*	۱/۹۸ \pm ۰/۳۳۲	۶/۷۵ (۲۲)	۱/۲۷۷ [†] (۰/۸۰-۲/۰۳)
	۴۸	۷۵/۳۸*	۲/۱۶۷ \pm ۰/۳۳۴	۹/۹۸ (۲۲)	
اسانس پرتقال	۲۴	۶۶/۱۶۸	۱/۴۴۴ \pm ۰/۲۴۱	۷/۱۸۶ (۲۲)	۱/۲۹۴ (۰/۸۰-۲/۰۸)
	۴۸	۵۱/۱۴۷	۱/۷ \pm ۰/۲۴۶	۸/۷۹۹ (۲۲)	
نانوآمولسیون پرتقال	۲۴	۴۰۴/۵۶	۰/۸۹۴ \pm ۰/۲۶۵	۶/۳۲ (۲۲)	۱۷/۳۹۲ (۳/۵۳-۸۵/۶)
	۴۸	۳۳/۲۶	۲/۴۵۹ \pm ۰/۲۷۶	۹/۸۸۳ (۲۲)	
نانوآمولسیون نارنگی	۲۴	۶۷۸/۳۵	۱/۱۵۳ \pm ۰/۳۸۷	۷/۹۳۳ (۲۲)	۱۱/۰۷ (۱/۵۵-۷۸/۶۸)
	۴۸	۶۱/۲۸۶	۲/۲۹۹ \pm ۰/۳۰۵	۸/۰۷ (۲۲)	

*: غلظت‌ها برحسب میکرولیتر بر ۱۲۵ میلی‌لیتر هستند. برای محاسبه غلظت کشنده ۵۰ درصد در فضای معادل ۱ لیتر ($\mu\text{l/L}$)، عدد مورد نظر در ۸ ضرب می‌شود. [†]: LC ratio (نرخ غلظت کشنده) عددی است که برای نشان دادن معنی‌دار بودن یا نبودن تفاوت دو مقدار LC_{50} استفاده می‌شود. اگر بین حد بالا و پایین آن عدد ۱ وجود داشت، اختلاف غیر معنی‌دار و در غیر این صورت، معنی‌دار است.

نتایج تجزیه واریانس درصدهای مرگ‌ومیر شپشه برنج نشان داد که بین میزان سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانواسانس‌های نارنگی و پرتقال، در زمان ۲۴ ساعت، اختلاف معنی‌داری وجود داشته است ($F=159/5$ ، درجه آزادی=۳ و $P=0$). همچنین تجزیه واریانس داده‌های مرگ‌ومیر شپشه برنج تحت تأثیر غلظت‌های ۸ گانه نشان داد که بین غلظت‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری وجود داشته است ($F=113/857$ ، درجه آزادی=۷ و $P=0$). همچنین در بازه زمانی ۴۸ ساعت، اثر غلظت، نوع ماده مؤثره و اثر متقابل غلظت و نوع ماده مؤثره معنی‌دار بودند ($F=5/057$ ، درجه آزادی=۲۱ و $P=0$) که نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین اسانس‌ها و نانوآمولسیون آن‌ها و تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مورد مطالعه است.

بحث

پوست میوه‌های درختان خانواده مرکبات، حاوی مقادیر متفاوتی اسانس هستند. به‌طور معمول، پوست میوه‌هایی که حاوی اسانس بیشتری هستند، معطرتر بوده و همچنین خاصیت اشتعال‌پذیری بالاتری نیز دارند؛ اما برای تعیین دقیق محتوای اسانس این مواد، آزمایش‌ها شیمیایی از جمله کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی (GC-MS) مورد نیاز است (Said Al-Ahl et al. 2017). هر چه مقدار مواد مؤثره این اسانس‌ها بیشتر باشد و یا درصد ماده مؤثره با خاصیت حشره‌کشی آن‌ها بالاتر باشد، سمیت تدخینی آن‌ها بیشتر خواهد بود (Khanikor et al. 2021).

آنالیز کروماتوگرافی گازی-طیف سنجی جرمی نشان داد که در هر دو اسانس پرتقال و نارنگی، ماده مؤثره Limonene بیشترین مقدار را داشته است و از این لحاظ با آزمایش های مشابه مطابقت داشته است (Moretti et al. 2002; Khanikor et al. 2021). همچنین به دلیل درصد وزنی بسیار بالا (۹۴/۸ و ۹۱/۷ درصد به ترتیب در اسانس پوست پرتقال و اسانس نارنگی)، می توان بخش عمده ای از خاصیت حشره کشی این اسانس ها را نیز مربوط به این ماده مؤثره دانست. از لیمونن به عنوان ماده مؤثره اصلی پوست مرکبات، در بسیاری از مطالعات برای کنترل حشرات استفاده شده است (Mursiti et al. 2019) سمیت بالاتر اسانس پرتقال نسبت به اسانس نارنگی در آزمایش حاضر نیز می توان به دلیل محتوای بالاتر ترکیبات مؤثره این اسانس همچون لیمونن (Limonene) (۹۴/۸ درصد) نسبت به نارنگی (۹۱/۷ درصد) دانست. در تحقیق Campolo و همکاران (۲۰۱۴) که سمیت تدخینی اسانس حاصل از پوست پنج میوه مختلف از مرکبات را مورد بررسی قرار می داد، نشان داده شد که سمیت این اسانس ها ارتباط مستقیمی با محتوای ماده مؤثره لیمونن در آن ها دارد. این مسئله در تحقیق Ibrahim و همکاران (۲۰۰۳) نیز به خوبی نشان داده شده است.

بسیاری از تحقیقات برای تبدیل اندازه ذرات به ابعاد نانو، از ارتعاش امواج مافوق صوت بهره برده اند (Jesser et al., 2020). این روش آسان، ارزان و کارآمد است و در تحقیق حاضر نیز از این روش بهره برده شد. در برخی تحقیقات دیگر همچون تحقیق Nenaah و همکاران (۲۰۱۵) نیز از روش هموژنیزه کردن در فشار بالا (PHP) استفاده شده است. در تحقیقات مختلف، برای سنجش اندازه ذرات و تعیین رسیدن ابعاد به مقیاس نانو نیز از روش های مختلفی استفاده شده است. روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول ها و سوسپانسیون ها استفاده می شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می رود (Du et al., 2019; Badawy et al. 2016). در آزمایش مشابه که توسط Manjesh و همکاران (۲۰۲۲) انجام گرفت، نتیجه استفاده از DLS نشان داد که اندازه ذرات تهیه شده در مطالعه آن ها بین ۱۲/۷۸ تا ۳۸/۹۷ نانومتر بوده است. در آزمایش حاضر، اندازه ذرات برابر با هم و میانگین قطر ذرات، ۶۵ نانومتر بوده است. دلیل احتمالی این مشابهت اندازه ذرات، روش یکسان فرموله کردن دو اسانس و زمان مشابه ارتعاش دهی با امواج مافوق صوت بوده است. اندازه ذرات نانو در تحقیقات مختلف، بسته به نوع امولسیفایر مورد استفاده و زمان ارتعاش دهی با امواج مافوق صوت، کاملاً متفاوت بوده است (Hashem et al. 2018; Draz et al. 2022). در تحقیق Draz و همکاران (۲۰۲۲) اندازه ذرات نانوامولسیون سه اسانس گیاهی انیسون، آویشن و گشنیز در محدوده ۸۸/۸۳ تا ۱۰۳/۵۷ نانومتر ارزیابی گردید. در آزمایش Hashem و همکاران (۲۰۱۸) اندازه ذرات نانوامولسیون تولید شده از گیاه انیسون، ۱۹۸/۹ نانومتر گزارش شد. در تحقیق Giunti و همکاران (۲۰۱۹) سمیت تدخینی نانوامولسیون اسانس پوست پرتقال روی شپشه آرد *T. confusum* مورد بررسی قرار گرفت. در تحقیق مذکور، اندازه ذرات نانو اسانس پرتقال تولید شده برابر با $131/37 \pm 0/29$ نانومتر گزارش شد.

سمیت اسانس های مختلف را می توان از جهات مختلف تأثیر آن ها همچون سمیت تماسی، تدخینی و حتی گوارشی مورد بررسی قرار داد. به دلیل ماهیت فرار بودن این ترکیبات، عموماً سمیت تدخینی آن ها مورد بررسی قرار می گیرد (Dey and Gupta 2016). حتی در آزمایش ها بررسی سمیت تماسی و گوارشی اسانس ها، نقش تدخینی آن ها غیرقابل انکار است. همچنین از دیدگاه کاربردی، سمیت تدخینی اسانس ها برای کاربرد در کشاورزی و کنترل آفات انباری از اهمیت بیشتری نسبت به سایر کاربردهای آن ها برخوردار است (Moretti et al. 2002). در آزمایش حاضر نیز این نوع سمیت دو اسانس پرتقال و نارنگی و فرمولاسیون نانوامولسیون آن ها مورد بررسی قرار گرفته است.

تفاوت سمیت تدخینی اسانس ها و نانواسانس ها در طول زمان را می توان مربوط به بازده رهاسازی آن ها در گذر زمان دانست (Maes et al. 2019). از آنجائی که فرمولاسیون نانوامولسیون، رهاسازی اسانس ها را آهسته تر می کند، می توان انتظار

داشت که حشرات در زمان ۲۴ ساعت در تیمار اسانس فرموله نشده، نسبت به تیمار نانومولسیون، در معرض غلظت بیشتری از اسانس تدخین شده قرار بگیرند و در نتیجه مرگومیر بیشتری را نشان دهند. این می‌تواند دلیلی منطقی برای سمیت بالاتر اسانس‌های نارنگی و پرتقال در مقایسه با نانومولسیون آن‌ها در زمان ۲۴ ساعت باشد. نحوه تأثیر اسانس‌های گیاهی بر روی سیستم عصبی حشرات بوده و عموماً مسمومیت به مسدودکننده‌های سیستم عصبی برعکس آفت‌کش‌های گوارشی و میکروبی، به شکل حاد بروز پیدا می‌کند (Shaaya and Rafaeli 2007). به همین دلیل است که اسانس فرموله نشده در ۲۴ ساعت مؤثرتر بوده است.

ذکر این نکته مهم است که همیشه سرعت رهاسازی یک فرمولاسیون یا ترکیب حشره‌کش، دلیل بر برتر بودن آن نیست. کما اینکه در برخی موارد، ماندگاری بیشتر و تأثیر طولانی مدت یک فرمولاسیون برای کنترل درازمدت آفات در اماکنی مثل انبارهای نگهداری محصولات کشاورزی، از اهمیت بالاتری برخوردار است (Maes et al. 2019). همچنین، برای کنترل نتاج (تخم‌ها و لاروهای) یک حشره آفت در انبار، یا تخم‌های تازه تفریخ‌شده آن چند روز پس از پایان عملیات سمپاشی می‌توان به فرمولاسیون‌های آهسته‌رها (Controlled release) امیدوار بود (Moretti et al. 2002). دلیل استفاده از فرمولاسیون‌های آهسته رها همچون نانومولسیون‌ها در این ترکیبات، افزایش کارایی و عملکرد آن‌ها در بازه‌های زمانی بلندمدت است (Jesser et al. 2020).

اما تفاوت تأثیر دو فرمولاسیون در این آزمایش، در بازه زمانی ۴۸ ساعت معکوس شده و در تیمار نانومولسیون هم رهاسازی بیشتری نشان داده شد و هم کارایی حشره‌کشی بالاتری نسبت به تیمار اسانس فرموله نشده مشاهده گردید. کارایی بیشتر نانومولسیون در مدت زمانی مشابه (۴۸ ساعت)، می‌تواند به دلیل اندازه کوچک‌تر ذرات (مقیاس نانومتر) اسانس در این نوع فرمولاسیون در مقایسه با اسانس فرموله نشده و همچنین ورود راحت‌تر نانومولسیون از طریق تراشه‌های تنفسی و حتی منافذ سطح بدن حشره باشد (Du et al. 2016; Jesser et al. 2020; Campolo 2021). کوچک‌تر کردن اندازه دانه‌های اسانس، یا ابعاد کوچک‌تر فرموله کردن ماده مؤثره به منظور افزایش عملکرد آن، یکی از روش‌هایی است که شرکت‌های بزرگ تولیدکننده مواد شیمیایی در سراسر جهان نیز به آن روی آورده‌اند (Maes et al. 2019; Weisany et al. 2022).

در تحقیق Giunti و همکاران (۲۰۱۹) مقدار LC_{50} نانوفرمولاسیون اسانس پرتقال شیرین (*Citrus sinensis*) علیه شپشه آرد در زمان ۲۴ ساعت ۵۶/۱۷ میلی‌گرم بر لیتر بوده است که نسبت به نتایج آزمایش حاضر که این عدد حدود ۴۸۹ میکرولیتر بر لیتر هست بسیار بیشتر است (سمیت تدخینی کمتری نشان داده است). این تفاوت ممکن است به دلیل تفاوت در حساسیت جمعیت حشرات مورد مطالعه باشد زیرا سطح ماده مؤثره لیمونن در هر دو تحقیق بیش از ۹۳ درصد بوده است.

همچنین در تحقیق حاضر نشان داده شد که LC_{50} اسانس‌های فرموله نشده در ۲۴ و ۴۸ ساعت، تفاوت معنی‌داری نداشته است. اما غلظت کشنده ۵۰ درصد (LC_{50}) نانومولسیون‌ها در بازه‌های زمانی ۲۴ و ۴۸ ساعت، تفاوت معنی‌دار نشان داد که ممکن است به دلیل حفظ رهاسازی تدریجی فرمولاسیون آن‌ها در طول ۲۴ ساعت دوم پس از شروع آزمایش باشد. هر چند در تحقیق Giunti و همکاران (۲۰۱۹) این مقادیر در نانومولسیون اسانس پوست پرتقال، بین ۲۴ و ۴۸ ساعت تفاوت چندانی نشان نمی‌دهند، هر چند سمیت در ۴۸ ساعت افزایش یافته است. پیشنهاد می‌شود برای روشن شدن اثر مذکور، آزمایشات تکمیلی در آینده با نانواسانس‌های دیگر و حشرات دیگر انجام شود.

کاربرد نانومولسیون‌ها به عنوان فرمولاسیونی کارآمد برای اسانس‌های گیاهی، استفاده از آن‌ها را علاوه بر انبارها در گلخانه‌ها نیز میسر ساخته است و مواردی از کاربرد نانواسانس‌ها علیه آفات گلخانه‌ای با نتایج مثبت به ثبت رسیده است (Heydari et al 2020). رهاسازی تدریجی اسانس گیاهی روی سطح برگ، مانع از تبخیر سریع آن‌ها شده و در نتیجه حفاظت طولانی‌تری از گیاه در برابر آفات ایجاد می‌کند (Heydari et al. 2020). هر چند باید ویژگی‌های دیگری همچون گیاه‌سوزی آن‌ها نیز مورد مطالعه بیشتر قرار گیرد. فرمولاسیون‌های دیگری همچون آئروسول (Aerosol) نیز از نانواسانس پرتقال تهیه

شده و حتی نسبت به نانوامولسیون آن، سمیت بیشتری علیه شپشه آرد نشان داده است که برای آینده کاربرد این ترکیبات در انبارها، بسیار امیدبخش است (Giunti *et al.* 2019).

نتیجه‌گیری و پیشنهادها

فرموله کردن اسانس‌های گیاهی به شکل نانوامولسیون، موجب افزایش کارایی رهاسازی آن‌ها در بازه زمانی ۴۸ ساعت شده و همچنین سمیت تدخینی آن‌ها را در مقایسه با شکل فرموله نشده آن‌ها بالاتر برد. در آزمایش‌های تکمیلی می‌توان زمان رهاسازی اسانس از نانوامولسیون‌ها را تا پایان رهاسازی، با تکنیک‌های نوین شیمی (همچون روش SPME^۱) مورد آنالیز قرار داد و با زمان رهاسازی اسانس فرموله نشده مقایسه کرد.

REFERENCES

- Badawy, M. E., SA Saad, A. F., HM Tayeb, E. S., Mohammed, S. A., & Abd-Elnabi, A. D. (2019). Development and characterization of nanoemulsions of some insecticides by high energy technique for targeting delivery. *Journal of Agricultural Research* 57(1): 15-23.
- Campolo, O. (2021). Essential oil-based green nano-insecticides: formulation, biological activity and application in ecofriendly pest control strategies. *In III International Organic Fruit Symposium and I International Organic Vegetable Symposium* (pp. 169-180). DOI: 10.17660/ActaHortic.2022.1354.22
- Campolo, O., Malacrinò, A., Zappalà, L., Laudani, F., Chiera, E., Serra, D., ... & Palmeri, V. (2014). Fumigant bioactivity of five *Citrus* essential oils against *Tribolium confusum*. *Phytoparasitica*, 42, 223-233.
- Dey, D., & Gupta, M. K. (2016). Use of essential oils for insect pest management-a review. *Innovative Farming*, 1(2), 21-29.
- Draz, K. A., Tabikha, R. M., Eldosouky, M. I., Darwish, A. A., & Abdelnasser, M. (2022). Biototoxicity of essential oils and their nano-emulsions against the coleopteran stored product insect pests *Sitophilus oryzae* L. and *Tribolium castaneum* herbst. *International Journal of Pest Management*, 1-15. DOI: 10.1080/09670874.2022.2036862
- Du, Z., Wang, C., Tai, X., Wang, G., & Liu, X. (2016). Optimization and characterization of biocompatible oil-in-water nanoemulsion for pesticide delivery. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 4(3), 983-991. DOI: 10.1021/acssuschemeng.5b01058
- Giunti, G., Palermo, D., Laudani, F., Algeri, G. M., Campolo, O., & Palmeri, V. (2019). Repellence and acute toxicity of a nano-emulsion of sweet orange essential oil toward two major stored grain insect pests. *Industrial Crops and Products*, 142, 111869.
- Gomes, A., Costa, A. L. R., & Cunha, R. L. (2018). Impact of oil type and WPI/Tween 80 ratio at the oil-water interface: Adsorption, interfacial rheology and emulsion features. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 164, 272-280.
- Hashem, A. S., Awadalla, S. S., Zayed, G. M., Maggi, F., & Benelli, G. (2018). *Pimpinella anisum* essential oil nanoemulsions against *Tribolium castaneum*—insecticidal activity and mode of action. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 18802-18812. DOI: 10.1007/s11356-018-2068-1
- Heidari, F., Sarailoo, M., Ghasemi, V., & Nadimi, A. (2017). Toxic and oviposition deterrence activities of essential oils from *Citrus sinensis* (L.) Osbeck and *Citrus paradisi* (Macfarlane) fruit peel against adults of *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Crop Protection*, 6(1), 79-88.
- Heydari, M., Amirjani, A., Bagheri, M., Sharifian, I., & Sabahi, Q. (2020). Eco-friendly pesticide based on peppermint oil nanoemulsion: Preparation, physicochemical properties, and its

- aphicidal activity against cotton aphid. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 6667-6679. DOI: 10.1007/s11356-019-07332-y
- Ibrahim, M.A., Kainulainen, P., Aflatuni, A., Tiilikkala, K., Holopainen, J.K., 2003. Insecticidal, repellent, antimicrobial activity and phytotoxicity of essential oils: with special reference to limonene and its suitability for control of insect pests. *Agric. Food Sci. in Finland* 10, 243-259.
- Isman, M. B. (2020). Botanical insecticides in the twenty-first century—fulfilling their promise? *Annual Review of Entomology*, 65, 233-249. DOI: 10.1146/annurev-ento-011019-025010
- Jarrahi, A., Moharrampour, S., & Imani, S. (2016). Chemical composition and fumigant toxicity of essential oil from *Thymus daenensis* against two stored product pests. *Journal of Crop Protection*, 5(2), 243-250.
- Jesser, E., Yeguerman, C., Gili, V., Santillan, G., Murray, A. P., Domini, C., & Werdin-González, J. O. (2020). Optimization and characterization of essential oil nanoemulsions using ultrasound for new ecofriendly insecticides. *ACS sustainable chemistry & engineering*, 8(21), 7981-7992. DOI: 10.1021/acssuschemeng.0c02224
- Khanikor, B., Adhikari, K., & Rabha, B. (2021). Citrus essential oils: a suite of insecticidal compounds. *Citrus—Research, Development and Biotechnology*. DOI: 10.5772/intechopen.95887
- Maes, C., Bouquillon, S., & Fauconnier, M. L. (2019). Encapsulation of essential oils for the development of biosourced pesticides with controlled release: A review. *Molecules*, 24(14), 2539.
- Manjesh, K., Kundu, A., Dutta, A., Saha, S., & Neelakanthaiyah, B. S. (2022). Bio-insecticidal nanoemulsions of essential oil and lipid-soluble fractions of *Pogostemon cablin*. *Frontiers in Plant Science*, 13, 874221.
- Moretti, M. D., Sanna-Passino, G., Demontis, S., & Bazzoni, E. (2002). Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPs PharmSciTech*, 3, 64-74.
- Mursiti, S., Lestari, N. A., Febriana, Z., Rosanti, Y. M., & Ningsih, T. W. (2019). The activity of d-limonene from sweet orange peel (*Citrus Sinensis* L.) extract as a natural insecticide controller of bedbugs (*Cimex lectularius*). *Oriental Journal of Chemistry*, 35(4), 1420.
- Nenaah, G. E., Ibrahim, S. I., & Al-Assiuty, B. A. (2015). Chemical composition, insecticidal activity and persistence of three Asteraceae essential oils and their nanoemulsions against *Callosobruchus maculatus* (F.). *Journal of Stored Products Research*, 61, 9-16. DOI: 10.1016/j.jspr.2014.12.007
- Oboh, G., Ademosun, A. O., Olumuyiwa, T. A., Olasehinde, T. A., Ademiluyi, A. O., & Adeyemo, A. C. (2017). Insecticidal activity of essential oil from orange peels (*Citrus sinensis*) against *Tribolium confusum*, *Callosobruchus maculatus* and *Sitophilus oryzae* and its inhibitory effects on acetylcholinesterase and Na⁺/K⁺-ATPase activities. *Phytoparasitica*, 45, 501-508.
- Pandit, J., Aqil, M., & Sultana, Y. (2016). Nanoencapsulation technology to control release and enhance bioactivity of essential oils. In *Encapsulations* (pp. 597-640). *Academic Press*. DOI: B978-0-12-804307-3.00014-4
- Said Al-Ahl, H. A., Hikal, W. M., & Tkachenko, K. G. (2017). Essential oils with potential as insecticidal agents: A review. *International Journal of Environmental Planting Management* 3(4), 23-33.
- Satya, S. A. N. T. O. S. H., Kadian, N. E. E. R. U., Kaushik, G., & Sharma, U. M. E. S. H. (2016). Impact of chemical pesticides for stored grain protection on environment and human health. In *Proceedings of the 10th international conference on controlled atmosphere and fumigation in stored products*, Winnipeg, Canada (pp. 92-97).
- Shaaya, E., & Rafaeli, A. (2007). Essential oils as biorational insecticides—potency and mode of action. In *Insecticides design using advanced technologies* (pp. 249-261). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. DOI: 10.1007/978-3-540-46907-0_11
- Sharifian, I., Safaralizade, M. H., & Najafi-Moghaddam, P. (2011). Investigation on the insecticidal efficacy of novel pellet formulation against stored products beetles. *Munis Entomology and Zoology*, 6(1), 204-209.

- Souto, A. L., Sylvestre, M., Tölke, E. D., Tavares, J. F., Barbosa-Filho, J. M., & Cebrián-Torrejón, G. (2021). Plant-derived pesticides as an alternative to pest management and sustainable agricultural production: Prospects, applications and challenges. *Molecules*, 26(16), 4835. DOI: 10.3390/molecules26164835
- Weisany, W., Yousefi, S., Tahir, N. A. R., Golestanehzadeh, N., McClements, D. J., Adhikari, B., & Ghasemlou, M. (2022). Targeted delivery and controlled released of essential oils using nanoencapsulation: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 303, 102655. DOI: 10.1016/j.cis.2022.102655