

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

### Abstract

Nanoemulsion formulation has been one of the most effective types of formulation to achieve controlled release of essential oils. In this study, in order 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, *Tribolium confusum* and *Sitophilus oryzae*, in 24 and 48 hours. The essential oils were extracted from dried orange and tangerine peels using a hydrodistillation method and their content were analyzed by gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). 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 was 65 nanometers. Based on preliminary experiments, eight concentrations (5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, and 95 microliters at 125 ml of container) of the essential oils and nanoformulations were prepared for fumigant toxicity evaluation. The bioassays were conducted under controlled conditions at a temperature of  $25\pm 2$  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 *S. oryzae* (96.67 %) at 48 hours and a concentration of 95  $\mu$ l. Results showed higher efficiency of nanoemulsions in 48 h while they were less efficient than non-formulated essential oils in 24 h that is related to their controlled release function.

**Keywords:** plant essential oils, nanoemulsion, stored product pests, fumigant toxicity, controlled release

## ارزیابی اثر رهاسازی کنترل شده نانواسانس‌های پوست پرتقال و نارنگی بر سمیت تدخینی آن-

ها علیه شپشه آرد *Tribolium confusum* (Col.: Tenebrionidea) و شپشه برنج *Sitophilus oryzae* (Col: Curculionidae)

### چکیده

نانوامولسیون یکی از کارآمدترین انواع فرمولاسیون برای رسیدن به هدف رهاسازی کنترل شده اسانس‌ها است. در این تحقیق به منظور نشان دادن اثر رهاسازی کنترل شده، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار، تغییرات سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانواسانس‌های پوست پرتقال و نارنگی روی دو آفت انباری شپشه آرد *Tribolium confusum* و شپشه برنج *Sitophilus oryzae* مورد مطالعه قرار گرفت. اسانس‌ها به روش تقطیر آبی از پوست پرتقال و نارنگی استخراج شده و با کروماتوگرافی گازی طیف سنجی جرمی (GC-MS) محتوای آن‌ها مورد تحلیل قرار گرفت. تبدیل اندازه ذرات اسانس به مقیاس نانومتر با دستگاه تولید امواج مافوق صوت پروب‌دار<sup>۱</sup> (UPS) و تعیین اندازه نانوذرات، با استفاده از دستگاه پراکندگی دینامیکی نور<sup>۲</sup> (DLS) ۶۵ نانومتر برآورد شد. بر پایه آزمایش‌های مقدماتی، غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۹۵ میکرولیتر بر ۱۲۵ میلی‌لیتر حجم ظرف آزمایش از اسانس‌ها و نانواسانس‌ها تهیه شد و جهت ارزیابی سمیت تدخینی مورد استفاده قرار گرفت. زیست‌سنجی‌ها در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس در تاریکی و در ۳ تکرار مستقل در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت انجام شد. سمیت تدخینی اسانس‌ها در ۲۴ ساعت بیشتر بود در حالیکه نانواسانس‌ها در ۴۸ ساعت کارایی بیشتری از خود نشان دادند. بیشترین مرگومیر شپشه آرد و شپشه برنج به ترتیب ۹۰ و ۹۶/۶۷ درصد مربوط به نانواسانس پرتقال در زمان ۴۸ ساعت و غلظت ۹۵ میکرولیتر بر ۱۲۵ میلی‌لیتر مشاهده شد. نتایج این آزمایش، رهاسازی کنترل شده نانواسانس‌ها در زمان ۴۸ ساعت، با وجود کمتر بودن تاثیر آن‌ها در ۲۴ ساعت نسبت به اسانس‌های فرموله نشده را در عمل آشکار ساخت.

**واژگان کلیدی:** اسانس‌های گیاهی، نانوامولسیون، آفات انباری، سمیت تنفسی، رهاسازی کنترل شده

<sup>۱</sup> Ultrasonic probe sonicator

<sup>۲</sup> Dynamic Light Scattering

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 محیط زیست 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 آب و خاک 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 محیط زیست، 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 مورد نظر 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 نانومولسیون‌های 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 نانومولسیون‌ها در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت برای بررسی تاثیر 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.* 2018 Hashem *et al.* 2017) و مشخص شدن جنبه‌های مهمی از تاثیرات 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 2021).

در چند سال اخیر، تحقیقات بسیاری تاثیر نانومولسیون‌های ساخته شده بر پایه اسانس‌های گیاهی را علیه آفات انباری مورد بررسی قرار داده‌اند (Draz *et al.* 2022; Hashem *et al.* 2018; Nenaah *et al.* 2015). 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 *Tribolium castaneum* و *Sitophilus oryzae* 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 تاثیر نانومولسیون روی *T. castaneum* بوده است. Nenaah و همکاران (۲۰۱۵) سمیت تدخینی اسانس و نانواسانس سه گیاه *Ageratum* *Achillea fragrantissima*، *conyzoides* و *Tagetes minuta* را علیه سوسک چهارنقطه‌ای *Callosobruchus 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 نانوامولسیون‌ها 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 جمع آوری شده مشاهده نشد. میوه‌ها پس از انتقال به آزمایشگاه، پوست‌کنی و پوست‌های آن‌ها در دمای  $25 \pm 5$  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 آبیگری شد و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای تیره با روپوش آلومینیومی در یخچال (دمای  $4 \pm 2$  درجه سلسیوس) نگهداری شدند (Heidari et al. 2017).

### تهیه نانواسانس‌ها

سنتز نانوامولسیون‌ها توسط دستگاه تولید امواج مافوق صوت پروب‌دار (مدل: UHP 400) صورت گرفت. بدین منظور ۵ درصد حجمی از اسانس خالص، در تویین 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 موثره 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 منحصربه‌فرد 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 تابی 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 نانو امولسیون با استفاده از دستگاه پراکندگی دینامیکی نور (MAL1008078, Malvern.UK) تعیین شد (Manjesh et al. 2022).

## پرورش حشرات

آفات مورد آزمایش در این تحقیق شیشه آرد و شیشه 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  $27 \pm 2$  درجه سلسیوس، رطوبت نسبی  $65 \pm 5$  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 تخم-گذاری 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 زیست‌سنجی 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  $1 \times 2$  سانتی‌متر به عنوان منبع متصاعد کننده اسانس استفاده شد. به‌وسیله 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 ظرف آزمایش و کاغذ صافی‌ها بوسیله طلق نازک به صورتی از در ظروف آویزان شدند که حشرات کامل به طور مستقیم با آن تماس پیدا نکنند. 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. در صورت مرگ‌ومیر در شاهد، درصد مرگ‌ومیر تیمارها با فرمول ابوت تصحیح شد (Abbott, 1925). برای این

آزمایش‌ها سه تکرار در نظر گرفته شد. آزمایشات زیست‌سنجی در دمای  $25 \pm 2$  درجه سلسیوس و در تاریکی انجام گرفت. از آنجایی که درب محفظه‌های شیشه‌ای بسته بود، میزان رطوبت اندازه‌گیری و گزارش نشد. از نرم افزار SPSS 19.0 برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد.

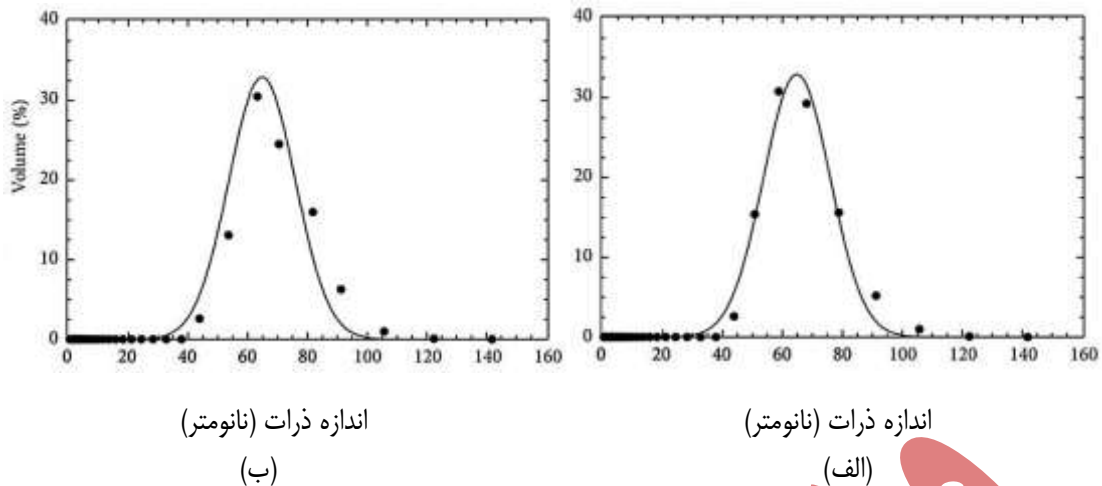
## یافته‌های پژوهش

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- طیف سنجی 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	سایپین	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-تریپینن	۱۰۴۰	۰/۴	----
۱۱	لینالول-اکساید	۱۰۷۳	۰/۵	----
۱۲	آلفا-تریپینولن	۱۰۹۰	۰/۴	۰/۳
۱۳	آلفا-تریپینول	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 نانوامولسیون 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 تایید می‌کند.



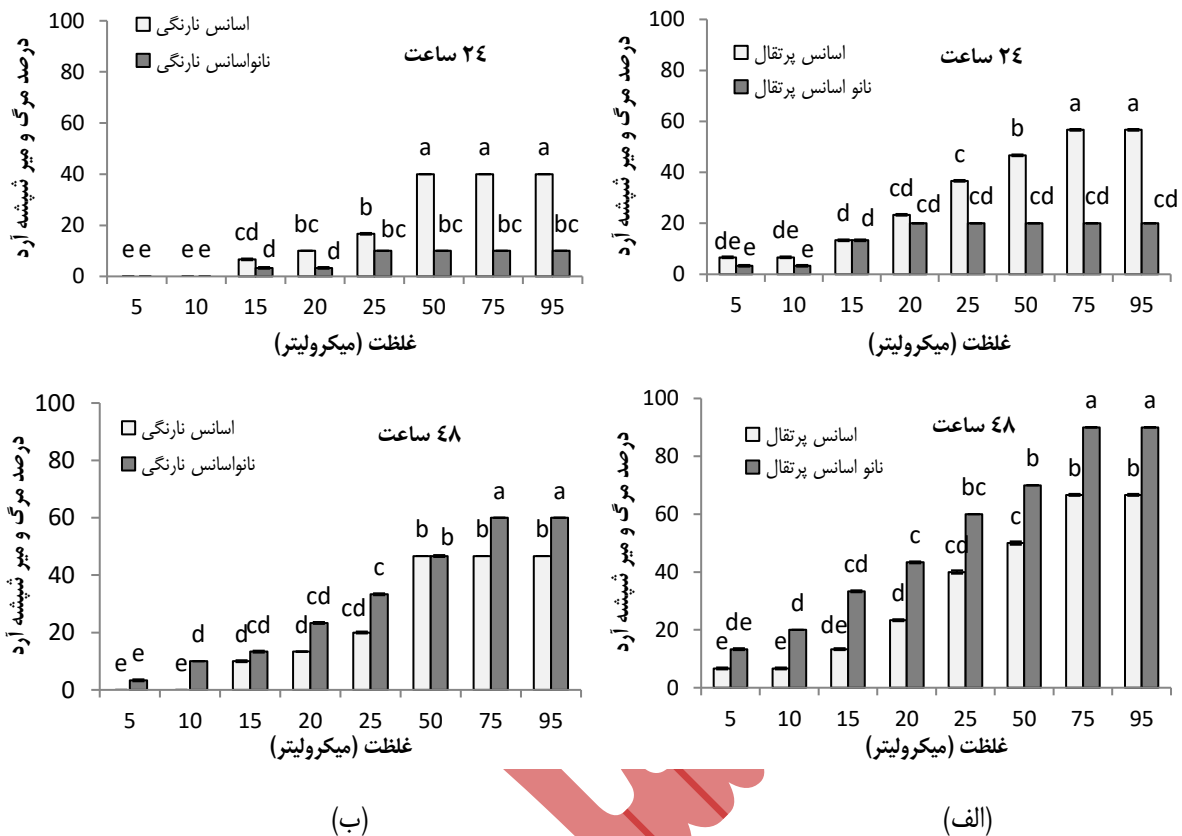
شکل ۱- نمودار خروجی دستگاه پراکندگی دینامیکی نور (DLS) برای نشان دادن ابعاد نانوامولسیون‌های تولید شده (الف) نانوامولسیون پرتقال، (ب) نانوامولسیون نارنگی

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 ( $F=1/8$ ,  $df=1$  و  $P=0/18$ )؛ یعنی حساسیت دو حشره شیشه آرد و شیشه 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 ( $F=113/173$ ،  $df=7$  و  $P=0/000$ ). 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<sup>۴</sup> ماده مؤثره مورد استفاده بوده است.

نتایج مربوط به سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانواسانس‌های نارنگی و پرتقال روی شیشه 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 شیشه 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 مرگومیر شپشه آرد *T. confusum* در اثر سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانواسانس‌های پرتقال (الف) و نارنگی (ب) در زمان‌های ۲۴ و ۴۸ ساعت- حروف کوچک (انگلیسی) متفاوت در بالای هر ستون، نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح اطمینان ۹۵ درصد با آزمون توکی است.

همان‌طور که در شکل ۲ مشاهده می‌شود، به‌طور کلی درصد مرگومیر شپشه آرد در اثر کاربرد اسانس و نانواسانس پرتقال در ۲۴ و ۴۸ ساعت، بیشتر از اسانس و نانواسانس نارنگی بوده است. بیشترین درصد مرگومیر شپشه آرد در زمان ۲۴ ساعت (۵۶/۶۶ درصد) در اثر سمیت تدخینی اسانس پرتقال و در غلظت‌های ۷۵ و ۹۵ میکرولیتر مشاهده گردید. همچنین اسانس‌ها در ۲۴ ساعت، سمیت تدخینی بیشتری از نانواسانس‌ها (بیشترین درصد مرگ و میر ۲۰ درصد) نشان دادند. در حالی که، در مدت زمان ۴۸ ساعت سمیت تدخینی نانواسانس‌ها به مراتب بیشتر (بیشترین مرگومیر ۹۰ درصد در اثر نانومولسیون پرتقال در مقابل مرگومیر ۶۶/۶۷ درصدی در اسانس پرتقال) بوده است.

نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که در میزان سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانواسانس‌های نارنگی و پرتقال روی شپشه آرد، در زمان ۲۴ ساعت از لحاظ مرگومیر مشاهده شده، اختلاف معنی‌داری وجود داشته است (جدول ۲). همچنین تجزیه واریانس داده‌های مرگ و میر شپشه آرد تحت تاثیر غلظت‌های ۸ گانه نشان داد که بین غلظت‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری وجود داشته است ( $F=118/362$ ، درجه آزادی= ۷ و  $P=0$ ). همچنین در بازه زمانی ۴۸ ساعت، اثر غلظت، نوع ماده موثره و اثر متقابل غلظت و نوع ماده موثره معنی‌دار بودند (جدول ۲)، که نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین اسانس‌ها و نانومولسیون آن‌ها و تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مورد مطالعه می‌باشد.

جدول ۲- نتایج تجزیه واریانس درصد مرگ و میر شیشه آرد تحت تاثیر ماده مؤثره (اسانس ها و نانواسانس های پرتقال و نارنگی) در ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت روی شیشه آرد

بازه زمانی	منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	F	P
۲۴ ساعت	غلظت	۱۸۴۹/۴۰۵	۷	۱۱۸/۳۶۲	.
	ماده مؤثره	۲۵۸۱/۹۴۴	۳	۱۶۵/۲۴۴	.
	غلظت×ماده مؤثره	۲۳۸/۲۹۴	۲۱	۱۵/۲۵۱	.
۴۸ ساعت	غلظت	۴۹۸۱۷۹/۱۶۷	۷	۲۲۸/۰۱۹	.
	ماده مؤثره	۱۱۲۰۴/۱۶۷	۳	۱۱۹/۵۱۱	.
	غلظت×ماده مؤثره	۱۷۱۲/۵	۲۱	۲/۶۱	۰/۰۰۲

نتایج آنالیز واریانس داده‌ها همچنین نشان داد که بین مرگ‌ومیر ناشی از مواد مؤثره چهارگانه (اسانس نارنگی، اسانس پرتقال، نانواسانس نارنگی و نانواسانس پرتقال) اختلاف معنی‌داری وجود داشته است (جدول ۲). در میان ترکیبات مورد مطالعه در بازه زمانی ۲۴ ساعت، اسانس پرتقال (با مرگ‌ومیر ۵۶/۶۶ درصد) و در بازه زمانی ۴۸ ساعت، نانواسانس پرتقال (با مرگ‌ومیر ۹۰ درصد) بیشترین عملکرد را علیه شیشه آرد داشته‌اند.

نتایج مربوط به سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانواسانس‌های نارنگی و پرتقال روی شیشه 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 شیشه 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 مدت زمان 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).

جدول ۳- نتایج تجزیه واریانس درصد مرگ و میر شپشه آرد تحت تاثیر اسانس‌ها و نانواسانس‌های پرتقال و نارنگی در ۲۴ و ۴۸ ساعت روی شپشه برنج

بازه زمانی	منبع تغییرات	مجموع مربعات	درجه آزادی	F	P
۲۴ ساعت	غلظت	۱۳۲۸۳/۳۳۳	۷	۱۱۳/۸۵۷	.
	ماده مؤثره	۷۹۷۵	۳	۱۵۹/۵	.
	غلظت×ماده مؤثره	۴۲۰۸/۳۳۳	۲۱	۱۲/۰۲۴	.
۴۸ ساعت	غلظت	۵۵۴۵۰	۷	۲۶۲/۲۲۷	.
	ماده مؤثره	۱۲۳۹۱/۶۶۷	۳	۱۳۶/۷۳۶	.
	غلظت×ماده مؤثره	۳۲۰۸/۳۳۳	۲۱	۵/۰۵۷	.

نتایج تجزیه واریانس درصد‌های مرگ و میر شپشه برنج نشان داد که بین میزان سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانواسانس‌های نارنگی و پرتقال، در زمان ۲۴ ساعت، اختلاف معنی‌داری وجود داشته است (جدول ۳). همچنین تجزیه واریانس داده‌های مرگ و میر شپشه برنج تحت تاثیر غلظت‌های ۸ گانه نشان داد که بین غلظت‌های مختلف، اختلاف معنی‌داری وجود داشته است (جدول ۳). همچنین در بازه زمانی ۴۸ ساعت، اثر غلظت، نوع ماده مؤثره و اثر متقابل غلظت و نوع ماده مؤثره معنی‌دار بودند (جدول ۳)، که نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین اسانس‌ها و نانوامولسیون آن‌ها و تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مورد مطالعه می‌باشد.

## بحث

پوست میوه‌های درختان خانواده مرکبات، حاوی مقادیر متفاوتی اسانس هستند. به طور 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-طیف‌سنجی جرمی نشان داد که در هر دو اسانس پرتقال و نارنگی، ماده مؤثره Limonene بیشترین مقدار را داشته است و از این لحاظ با آزمایشات 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)، می‌توان بخش عمده‌ای از خاصیت حشره‌کشی این اسانس‌ها 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 می‌توان به دلیل محتوای بالاتر ترکیبات مؤثره این اسانس همچون

لیمونن (Limonene) (۹۴/۸ درصد) نسبت به نارنگی (۹۱/۷ درصد) دانست که برای تأیید این فرضیه نیاز به آزمایش‌های تکمیلی هست.

بسیاری از تحقیقات برای تبدیل اندازه ذرات به ابعاد نانو، از ارتعاش امواج مافوق صوت بهره برده‌اند (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<sup>۵</sup> (PHP) استفاده شده است. در تحقیقات مختلف، برای سنجش اندازه ذرات و تعیین رسیدن ابعاد به مقیاس نانو نیز از روش‌های مختلفی استفاده شده است. روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود (Du *et al.*, 2016; Badawy *et al.*, 2019). در آزمایش مشابه که توسط Manjesh و همکاران (۲۰۲۲) انجام گرفت، نتیجه استفاده از DLS نشان داد که اندازه ذرات تهیه شده در مطالعه آن‌ها 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.

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

تفاوت سمیت تدخینی اسانس‌ها و نانواسانس‌ها در طول زمان را می‌توان مربوط به بازده رهاسازی آن‌ها در گذر زمان دانست (Maes *et al.*, 2019). از آنجائی که فرمولاسیون نانوامولسیون، رهاسازی اسانس‌ها را آهسته‌تر می‌کند، می‌توان 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. از این ویژگی می‌توان برای مصارفی که در آن‌ها زمان کوتاه تأثیر مد نظر هست، استفاده نمود. باید به این نکته نیز اشاره کرد که سمیت اسانس‌های گیاهی از لحاظ ماهیت، یک سمیت حاد است و برای گزارش کردن آن معمولاً از بازه زمانی ۲۴ ساعت استفاده می‌شود. زیرا نحوه تأثیر این ترکیبات 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 Rafeali 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 ساده 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 به‌منظور 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).

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). هرچند باید ویژگی‌های دیگری همچون گیاهسوزی آن‌ها نیز مورد مطالعه بیشتر قرار گیرد.

## 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 آزمایشات تکمیلی می‌توان زمان رهاسازی اسانس از نانوامولسیون‌ها را تا پایان رهاسازی، با تکنیک‌های نوین شیمی (همچون روش SPME<sup>۶</sup>) مورد آنالیز قرار داد و با زمان رهاسازی اسانس فرموله نشده مقایسه کرد.

## منابع

- 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
- 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/acsschemeng.5b01058
- 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



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., Moharramipour, 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., & Neelakanthiah, 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<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-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

مجله علمی پژوهشی  
فصلنامه علمی پژوهشی  
فصلنامه علمی پژوهشی

## **Extended Abstract:**

### **Introduction**

The use of essential oils as biopesticides has 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 the effective utilization of 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 the stability, solubility, and bioavailability of essential oils. 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  $\mu\text{m}$  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 $\pm$ 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 were higher at 24 hours compared to the nanoemulsion formulations. It is probably related to their release rate that 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%) in compare with tangerine (91.7%). Results showed that the average size of nanoemulsion particles were 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 cuticle 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 microliters. 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.