

Fumigant toxicity of two eucalyptus species on *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) as pure essential oil and nano-capsulated

Farshad Haghghian¹, Shahriar Jafari^{2*}, Mohamad Ebrahim Farashiani³, Maryam Negahban⁴ and Jahanshir Shakarami⁵

1- Ph.D. student, Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

2*-Corresponding author, Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran
E-mail: jafari.s@lu.ac.ir

3- Assistant Prof., Research Institute of Forests and Rangelands, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

4- Associate Prof., Research institute of Plant Protection, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

5- Prof., Department of Plant Protection, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received: 25.06.2023

Accepted: 27.01.2024

Abstract

Background and objectives: The red flour beetle (*Tribolium castaneum* (Herbst)) (Tenebrionidae) is one of the main pests of stored products, especially cereal crops, all over the world. In recent years, to reduce the use of chemical pesticides, plant essential oils have gained attention. But despite their good potential, essential oils are unstable, and their toxicity decreases in a short time after use. Nanocapsule formulations can improve the efficiency of plant essential oils on stored product pests by increasing their toxicity and durability. This study was carried out with the aim of preparing nanocapsule formulations of essential oils of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. and *Eucalyptus globulus* Labill. and comparing their fumigant toxicity effects and non-formulated essential oils on *T. castaneum* adults.

Methodology: Eucalyptus leaves were collected from the Zaghmarz Eucalyptus research station in the south of Behshahr city, Mazandran Province, in July 2018. The collected dried leaves of Eucalyptus were hydrodistilled using a Clevenger-type apparatus. Identification of the constituents of essential oils was performed using GC-MS. Sodium alginate nanocapsules were prepared using basic hydrophilic surfactants. The survey of the surface and wall morphology of nanocapsules was conducted using a transmission electron microscope. The particle size distribution of nanocapsules was also determined. Fumigant toxicity testing was performed separately for each essential oil and nano-capsulated essential oil in four concentrations and at 24, 48, and 72 hours after applying the treatments, along with the control at 25°C and a relative humidity of 65% in darkness. PoloPlus software was used to estimate the LC10, LC25, LC50, and LC95.

Results: According to the results, the number of compounds in the essential oils of *E. globulus* was higher. The most important compounds of the essential oils of the two *Eucalyptus* species were terpenes, and 1,8-cineole, limonene, and pinene- α were the most important terpenes in the essential oils of *E. globulus* and *E. camaldulensis*, respectively. The results obtained from the transmission electron microscope images showed that nanocapsules containing *Eucalyptus* essential oil have nanoscale dimensions. The average particle size distribution for *E. globulus* and *E. camaldulensis* essential oil nanocapsules was determined to be about 150 and 100 nm, respectively. The essential oil of *E. globulus* was more toxic than the essential oil of *E.*

camaldulensis. The values of LC50 at 24, 48, and 72 hours after treatment for essential oil nanocapsules of *E. globulus* and *E. camaldulensis* were 5.9, 4.63, 3.8, and 9.5, 8.67, 6.7, respectively, and LC50 for raw essential oils of *E. globulus* and *E. camaldulensis* were 10.93, 9.63, 5.7, and 15.09, 12.86, 8.2 ml per liter of air, respectively. Based on the results, the nanocapsule formulation of the essential oils of both species, compared to the raw essential oil, showed a decrease in LC50, and the durability of the encapsulated essential oil also increased.

Conclusion: Based on our results, nanoencapsulation of Eucalyptus essential oil increased the fumigant toxicity of the essential oils by enhancing toxicity and the controlled release of effective compounds in controlling this pest. Therefore, this nanocapsule formulation is recommended for further toxicity tests and eventually its use in storage.

Keywords: Stored pests, Nanocapsul, Eucalyptus, Acute toxicity, Essential oil

سمیت تنفسی دو گونه اکالیپتوس علیه شیشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae) به صورت اسانس خالص و فرمولاسیون نانو

فرشاد حقیقیان^۱، شهریار جعفری^{۲*}، محمدابراهیم فراشپانی^۳، مریم نگهبان^۴ و جهانشیر شاکرمی^۵

۱- دانشجوی دکتری حشره‌شناسی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

۲- نویسنده مسئول، استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران، پست الکترونیک: shahriar.jafari@gmail.com

۳- استادیار پژوهش، بخش تحقیقات حمایت و حفاظت، مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۴- دانشیار پژوهش، بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، مؤسسه تحقیقات گیاه‌پزشکی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۵- استاد، گروه گیاه‌پزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۰۷

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۴/۰۴

چکیده

سابقه و هدف: شیشه قرمز آرد (*Tribolium castaneum* (Herbst) (Tenebrionidae)) یکی از آفات مهم محصولات انباری مختلف، به ویژه غلات در سراسر جهان می‌باشد. در سال‌های اخیر برای کاهش استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی، اسانس‌های گیاهی مورد توجه قرار گرفته‌اند. اما اسانس‌ها با وجود ظرفیت مناسب، دوام کمی دارند و سمیت آنها در زمان کوتاهی پس از کاربرد کاهش می‌یابد. تهیه فرمولاسیون‌های نانوکپسول اسانس‌های گیاهی می‌تواند کارایی آنها را در کنترل آفات انباری با افزایش سمیت و دوام آنها افزایش دهند. این پژوهش با هدف تهیه فرمولاسیون نانوکپسول اسانس دو گونه اکالیپتوس *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. و *Eucalyptus globulus* Labill. و مقایسه میزان کشندگی تنفسی این فرمولاسیون و اسانس معمولی آنها روی افراد بالغ *T. castaneum* انجام شد.

مواد و روش‌ها: برگ‌های هر دو گونه اکالیپتوس از ایستگاه تحقیقات زاغمرز در جنوب شهرستان بهشهر استان مازندران در مردادماه ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. اسانس‌گیری برگ‌های خشک به روش تقطیر با آب و شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس با استفاده از دستگاه GC-MS انجام شد. نانوکپسول از نوع آلزینات سدیم با استفاده از سورفکتانت‌های پایه آب‌دوست تهیه شد. بررسی سطح و شکل‌شناسی دیواره نانوکپسول‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری انجام شد. همچنین، توزیع اندازه ذرات نانوکپسول نیز تعیین گردید. آزمایش‌های سمیت تنفسی به صورت جداگانه برای اسانس و نانوکپسول اسانس هر دو گونه اکالیپتوس در چهار غلظت و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمارها همراه با شاهد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۶۵ درصد در تاریکی انجام شد. برای محاسبه LC_{10} ، LC_{25} ، LC_{50} و LC_{95} از نرم‌افزار Poloplus استفاده شد.

نتایج و یافته‌ها: نتایج نشان داد، تعداد ترکیبات موجود در اسانس‌های گونه *E. globulus* بیشتر بود. مهمترین ترکیبات اسانس دو گونه اکالیپتوس متعلق به ترپین‌ها بود و به ترتیب 1,8-cineole، Limonene و α -pinene مهمترین ترپین‌های موجود در اسانس *E. globulus* و *E. camadulensis* بودند. نتایج به دست آمده در تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد، نانوکپسول‌های حاوی اسانس اکالیپتوس دارای ابعادی در مقیاس نانو هستند. میانگین توزیع اندازه ذرات برای نانوکپسول اسانس *E. globulus* و *E. camadulensis* به ترتیب حدود ۱۵۰ و ۱۰۰ نانومتر تعیین شد. اسانس گونه *E. globulus* دارای سمیت بیشتری نسبت به اسانس گونه *E. camadulensis* بود. میزان LC_{50} در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار برای نانوکپسول اسانس *E. globulus*، *E. camadulensis* اسانس $۳/۸$ ، $۴/۶۰$ ، $۵/۹$ به ترتیب $۸/۲$ ، $۱۲/۸۶$ ، $۱۵/۰۹$ میکرولیتر بر لیتر بود. براساس نتایج در فرمولاسیون نانوکپسول اسانس هر دو گونه در مقایسه با اسانس خام، میزان LC_{50} کاهش یافت و دوام اسانس کپسوله‌شده نیز افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: براساس نتایج، نانوکپسول کردن اسانس هر دو گونه اکالیپتوس، سمیت تنفسی اسانس را از طریق افزایش سمیت و رهایش کنترل‌شده ترکیبات مؤثره اسانس در کنترل این آفت افزایش داد، بنابراین این فرمولاسیون نانوکپسول برای آزمایش‌های سمیت بیشتر و در نهایت استفاده از آن در انبار پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آفات انباری، فرمولاسیون نانوکپسول، اکالیپتوس، سمیت حاد، اسانس

مقدمه

شپشه قرمز آرد *Tribolium castaneum* (Herbst) یکی از آفات مهم محصولات انباری مختلف است که دارای انتشار جهانی است و با کاهش کمیت و کیفیت محصولات، باعث خسارت‌های اقتصادی به آنها می‌شود. این خسارت گاهی تا ۱۰۰ درصد محصول نیز می‌رسد. این آفت پلی‌فاژ است و می‌تواند علاوه بر غلات از محصولات انباری مختلف مانند دانه‌های روغنی، بادام زمینی، بذر کتان، کرچک، حبوبات، میوه‌های خشک، ماکارونی، گیاهان دارویی خشک‌شده و حتی کلکسیون‌های جانوری نیز تغذیه کند (Sundar et al., 2021). پوسته‌های لاروی و فضولات این آفت در آرد باعث کاهش شدید کمیت و کیفیت آرد می‌شود و سبب ایجاد حساسیت در بدن مصرف‌کنندگان می‌گردد (Isman, 2020).

روش رایج پیشگیری و کنترل این آفت، ضدعفونی انبارها و استفاده از آفت‌کش‌های شیمیایی مختلف می‌باشد. سموم مورد استفاده دارای دوام زیاد در طبیعت، هزینه تولید بالا و دارای تأثیر روی موجودات غیرهدف هستند و باعث ایجاد مقاومت در آفت می‌شوند و آلودگی‌های زیست‌محیطی ایجاد می‌کنند (Singh et al., 2012; Isman, 2020). امروزه تلاش‌های گسترده‌ای برای یافتن روش‌های جایگزین آفت‌کش‌های شیمیایی انجام شده است، در این رابطه استفاده از حشره‌کش‌های مستخرج از منابع موجود در طبیعت مانند گیاهان مورد توجه قرار گرفته‌اند (Riyaz et al., 2022). به طوری که استفاده از ترکیبات گیاهی کنترل‌کننده حشرات به ویژه اسانس‌های گیاهی برای محافظت از محصول، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته است (Rajendran & Sriranjini, 2008; Riyaz et al., 2022).

اسانس‌های گیاهی به دلیل دارا بودن خواص دورکنندگی، ضدتغذیه‌ای، اثر روی فراسنجه‌های زیستی حشره، کم‌خطر بودن برای انسان و پستانداران از اهمیت ویژه‌ای در کنترل آفات برخوردارند (Chaudhari et al., 2021). اسانس‌های گیاهی موادی فرار هستند که با داشتن خاصیت تدخینی برای کنترل آفات انباری می‌توانند استفاده شوند (Sing et al., 2012). علاوه بر این، به دلیل محل اثر متفاوت اسانس‌ها، آفات کمتر نسبت به آنها از خود مقاومت نشان می‌دهند (Isman, 2020). با این حال، اسانس‌ها در اثر دما، فشار، نور، یا اکسیژن در مدت کوتاهی تبخیر یا تجزیه می‌شوند. بنابراین، قبل از کاربرد اسانس‌ها در کنترل آفات باید به فکر یافتن روش‌های جدیدی بود تا سمیت و دوام آنها را در کنترل آفات افزایش داد. یکی از مهمترین راهکارها، فرموله کردن آنها به کمک فناوری نانوکپسوله کردن در جهت رفع آسیب‌پذیری این ترکیبات و نیز افزایش پایداری و ثبات آنها در محیط است (De Oliveira et al., 2014). مونوترین‌ها، مهمترین ترکیبات موجود در اسانس‌ها به دلیل خاصیت فراریت بالا دارای سمیت تنفسی هستند، این ترکیبات به دلیل چربی دوست بودن به آسانی از جلد حشرات نیز عبور می‌کنند (Riyaz et al., 2022).

اسانس گونه‌های مختلف اکالیپتوس دارای خواص حشره‌کشی، کنه‌کشی، علف‌کشی، قارچ‌کشی، نماتدکشی و باکتری‌کشی هستند (Batish et al., 2008). گونه‌های مختلف اکالیپتوس در سطح نزدیک به ۶۵ میلیون هکتار در سراسر دنیا از جمله ایران کشت می‌شوند (Farashiani et al., 2016; Riyaz et al., 2022). در ایران بیش از ۵۰ گونه و زیرگونه اکالیپتوس وجود دارد که در مناطق مختلف

شود (Yang et al., 2009). نتایج به دست آمده از بررسی تأثیر سمیت تنفسی نانوکپسول اسانس *Cuminum* روی *T. castaneum* نشان داد، اسانس نانوکپسول شده قدرت و دوام حشره کشی بیشتری نسبت به اسانس خالص دارد. میزان LC_{50} اسانس و نانوکپسول اسانس به ترتیب ۳۲/۱۲ و ۱۶/۲۵ میکرولیتر بر لیتر برای این آفت تعیین شد (Negahban et al., 2012a). بررسی سمیت تنفسی اسانس نانوکپسوله شده درمنه (*Artemisia sieberi* Bess. روی شپشه آرد نشان داد، سمیت تنفسی اسانس نانوکپسوله شده به طور معنی داری بیشتر از اسانس معمولی بود (Negahban et al., 2012b). همچنین مطالعه آثار دورکنندگی اسانس نانوکپسوله شده گیاه درمنه روی لارو شب پره پشت الماسی نشان داد، نانوکپسول اسانس درمنه به طور معنی داری دارای تأثیر دورکنندگی بیشتری نسبت به اسانس معمولی است (Negahban et al., 2013). بررسی سمیت تماسی فرمولاسیون نانوکپسول گیاه زیره سبز *C. cyminum* روی شپشه قرمز آرد نشان داد، در زمان ها و غلظت های مختلف، در میزان کشندگی اسانس نانوکپسوله شده گیاه تفاوت معنی داری وجود داشت (Khademi et al., 2014). تأثیر سمیت تنفسی نانوکپسول *Artemisia hausknechtii* Boiss. روی شپشه قرمز آرد و شپشه برنج بررسی و نانوکپسول حاوی اسانس به عنوان آفت کشی مؤثر برای کنترل آفات انباری معرفی شد (Khanahmadi et al., 2017). با توجه به اهمیت کنترل غیرشیمیایی آفت *T. castaneum* و گزارش مؤثر بودن اسانس برخی گونه های اکالیپتوس در کنترل آفات، نقش فرمولاسیون های نانو اسانس در افزایش کارایی و دوام اسانس ها توسط پژوهشگران مختلف و از آنجایی که مطالعه ای در زمینه بررسی اثرهای فرمولاسیون های مختلف دو گونه اکالیپتوس *Eucalyptus camaldulensis* و *E. globulus* انجام نشده بود، پژوهش پیش رو با هدف تهیه فرمولاسیون نانوکپسول آلزینات سدیم اسانس دو گونه اکالیپتوس و مقایسه میزان کشندگی تنفسی این فرمولاسیون و اسانس معمولی این دو گونه اکالیپتوس روی افراد بالغ آفت *T.*

کشور کشت می شوند که گونه *E. camaldulensis* Dehnh. در مقایسه با سایر گونه ها پراکنش بیشتری دارد (Assareh & Sardabi, 2007). ترین ها و ترینویدها مهمترین ترکیبات موجود در اسانس گونه های مختلف اکالیپتوس هستند (Barbosa et al., 2016). در تحقیقات قبلی انجام شده روی خاصیت حشره کشی گونه های مختلف اکالیپتوس مشخص شد، اسانس برخی از گونه های اکالیپتوس از جمله *E. camaldulensis* Dehnh. و *E. globulus* Labill. توان حشره کشی بالایی روی آفات مختلف به ویژه آفات انباری هستند (Farashiani, 2016).

پیشرفت ها در زمینه فناوری نانو و کاربرد گسترده آن باعث شده است که شرکت های تولیدکننده آفت کش ها نیز برای بهبود کیفیت محصولات خود، به دنبال بهره گیری از این فناوری باشند. در سال های اخیر برخی شرکت های تجاری، طیف وسیعی از شیوه نامه های تولید و استفاده از فرمولاسیون های کپسوله شده را ارائه کرده اند (Sushil et al., 2021). پژوهش ها نشان داده است، می توان با استفاده از فناوری نانو تغییرات مفیدی از جمله کاهش میزان مصرف سموم در واحد سطح، افزایش کارایی سموم، سازگاری بیشتر با محیط زیست، بهبود کیفیت و کاهش خطر تماسی در فرمولاسیون آفت کش ها و افزایش ماندگاری را ایجاد کرد (Danaye-Tous et al., 2020, 2022; Heidary et al., 2020). فرموله کردن اسانس ها در مقیاس ذرات نانو می تواند سبب کاهش فرایند تجزیه شیمیایی آنها در اثر عوامل محیطی و پایداری بیشتر این ترکیبات شود. علاوه بر این، کپسوله کردن اسانس ها می تواند به علت رهاش کنترل شده و جذب بهتر سلولی این ترکیبات فعال زیستی، سبب افزایش کارایی فرمولاسیون شود (Ebadollahi et al., 2022). پژوهش هایی نیز در ارتباط با تولید و کاربرد فرمولاسیون های میکرو و نانو کپسول اسانس گیاهان برای کنترل آفات وجود دارد (Heidary et al., 2020, 2021).

آثار لاروکشی نانوکپسول اسانس سیر به همراه پوسته پلی اتیلن گلیکول روی شپشه قرمز آرد *T. castaneum* نشان داد، این فرمولاسیون می تواند مانع تبخیر زود هنگام اسانس

castaneum انجام شد.

مواد و روش‌ها

پرورش *Tribolium castaneum*

حشرات اولیه *T. castaneum* از انبارهای آرد آلوده به شپشه قرمز آرد از سیلوی آرد شهرستان شهرکرد، استان چهارمحال و بختیاری تهیه شدند. برای اطمینان از گونه مورد مطالعه، نمونه‌های جمع‌آوری شده با استفاده از منابع علمی و کلیدهای شناسایی معتبر تشخیص داده شدند (Bosquet, 1990). حشرات اولیه در معرض هیچ نوع ماده شیمیایی قرار نگرفته بودند. برای پرورش حشرات از ظروف شیشه‌ای استوانه‌ای شکل به حجم یک لیتر استفاده شد. برای ایجاد تهویه، دهانه ظروف با پارچه‌های توری پوشانده شد. پرورش شپشه قرمز آرد روی غذای طبیعی شامل آرد گندم مخلوط با مخمر به نسبت ۱۰ به ۱ انجام شد. برای از بین بردن آلودگی احتمالی به سایر حشرات و کنه‌ها، آردهای مورد استفاده به مدت ۷۲ ساعت در فریزر در دمای ۱۰- درجه سلسیوس قرار گرفتند و تا زمان استفاده در یخچال در دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. به منظور پرورش حشرات، به طور تصادفی ۱۰۰ جفت حشره نر و ماده روی محیط‌های پرورش رهاسازی گردید. سپس ظروف پرورش به داخل اتاقک پرورش با شرایط تاریکی، دمای ۱±۲۵ درجه سلسیوس و رطوبت نسبی ۵±۶۵ درصد انتقال داده شدند.

گونه‌های گیاهی و تهیه اسانس

برگ‌های اکالیپتوس *Eucalyptus camaldulensis* و *E. globulus* از درختان ۲۵ ساله واقع در ایستگاه اکالیپتوموم تحقیقات زاغمرز در ۲۵ کیلومتری جنوب شهرستان بهشهر در مردادماه ۱۳۹۷ جمع‌آوری شدند. برای جمع‌آوری، هر برگ به همراه دمبرگ آن جدا شد و برگ‌ها در محیط تاریک خشک شدند و در پاکت‌های کاغذی در فریزر در دمای ۴- درجه سلسیوس نگهداری گردیدند. برای استخراج اسانس از روش تقطیر با آب استفاده شد. در هر نوبت اسانس‌گیری ۵۰ گرم گیاه خشک همراه با ۶۵۰ میلی‌لیتر

آب مقطر با استفاده از دستگاه اسانس‌گیر شیشه‌ای (کلونجر) در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت چهار ساعت اسانس‌گیری شد. اسانس‌های جمع‌آوری شده با کمک سولفات سدیم آب‌گیری و تا زمان استفاده در ظروف شیشه‌ای به حجم دو میلی‌لیتر با پوشش آلومینیومی در داخل یخچال در شرایط دمای چهار درجه سلسیوس نگهداری شدند. بازده اسانس‌دهی برگ برای گونه‌های *E. globulus* و *E. camaldulensis* به کمک فرمول زیر محاسبه شد.

$$\text{درصد بازده} = \left(\frac{\text{وزن اسانس}}{\text{وزن خشک گیاه}} \right) \times 100$$

شناسایی ترکیبات اسانس گونه‌های گیاهی

پس از جمع‌آوری و به حجم رساندن اسانس استخراج شده دو گونه اکالیپتوس مورد مطالعه در حلال n-pentane، حجم یک میکرولیتر از محلول به دستگاه GC-MS تزریق شد. شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس‌ها با مقایسه طیف‌های جرمی و شاخص‌های بازداری به دست آمده با طیف‌های جرمی و شاخص‌های بازداری موجود در منابع معتبر (Davies, 1990)، با استفاده از بانک اطلاعاتی موجود در دستگاه GC-MS انجام شد. آنالیزهای GC از نوع Aglient 7890A و آنالیزهای GC-MS از نوع Aglient 5975C طول ستون ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و قطر خارجی ۲۵ میلی‌لیتر بود. دمای ابتدایی ستون ۶۰ درجه سلسیوس و دمای نهایی ۲۸۰ درجه سلسیوس بود و از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل استفاده شد. درصد نسبی هر یک از ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس با توجه به سطح زیر منحنی در طیف کروماتوگرام حاصل از GC به دست آمد. ضریب بازداری کوآتس به روش زیر محاسبه شد. سپس شاخص بازداری محاسبه شده با شاخص کوآتس استاندارد مقایسه گردید (Adams, 2001).

$$RI = 100n + 100(T_x - T_n / T_{n+1} - T_n)$$

T_x : زمان بازداری نمونه مجهول

T_n : زمان بازداری آلکان نرمال قبلی

Tn+1: زمان بازداری آلکان نرمال بعدی

RI: شاخص بازداری کوآتس

n: تعداد اتم کربن آلکان نرمال قبلی

تهیه نانوکپسول حاوی اسانس

نانوکپسول از نوع آلزینات سدیم با استفاده از سورفکتانت‌های پایه آب دوست تهیه شد. برای تهیه، محلول آبی آلزینات به میزان وزنی یک‌دهم درصد آماده شد و با دور هم‌وزن‌نایزر ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به میزان نیم‌ساعت هم زده شد. سپس به آن سورفکتانت‌های پایه آب دوست از جمله تویین ۸۰ (Tween®80, Ph Eur, JP, NF, ۱130g/mol, Merck, GER) به میزان سه درصد و الکل اتوکسیلات به میزان یک تا سه درصد وزنی اضافه شد و تحت تنش همزن مکانیکی (Hei-TORQUE, Heidolph, Germany) با سرعت ۵۰۰-۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت.

سپس میزان ده درصد وزنی اسانس گیاهی خالص

به تدریج به آن اضافه شد و دور همزن تا ۱۲۰۰ دور در دقیقه بالا برده و اجازه داده شد تا در مدت نیم‌ساعت مواد با هم همگن شوند. سپس به منظور ایجاد نانوکپسول‌ها، کراس‌لینکر کلریدکلسیم به میزان یک درصد وزنی به آرامی به آن اضافه و اجازه داده شد به مدت نیم‌ساعت با دور ۱۲۰۰ دور در دقیقه هم بخورد تا ذرات تشکیل شوند. برای افزایش نفوذپذیری، به آن سولفوساکسینات به میزان یک درصد وزنی اضافه شد و دوباره با دور ۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه هم زده شد تا همگن شود. فرمولاسیون نانوکپسول حاوی اسانس‌های اکالیپتوس با غلظت ده درصد ماده مؤثره تهیه شد. مقدار اسانس بارگذاری نشده از باقی‌مانده آب حاصل از فیلتر فرمولاسیون نانوکپسول به روش تقطیر با آب جدا شد. همچنین میزان کارایی، بازده نانوکپسول و میزان اسانس بارگذاری شده با استفاده از فرمول‌های زیر به دست آمد (Moretti et al., 2002).

$$\text{Nanoencapsulation yield (EY) percentage} = (N/C) \times 100$$

C = وزن نانوکپسول تولیدشده برحسب گرم

N = وزن مواد اولیه برحسب گرم

$$\text{Nanoencapsulation efficiency percentage} = (A/B) \times 100$$

A = وزن اسانس بارگذاری شده برحسب گرم در نانوکپسول

B = وزن اسانس به کاررفته در آزمایش برحسب گرم

$$\text{Oil loading content percentage} = (A/D) \times 100$$

A = وزن اسانس بارگذاری شده برحسب گرم در نانوکپسول

D = وزن نانوکپسول در آزمایش برحسب گرم

کشور آلمان انجام شد.

بررسی شکل‌شناسی سطح نانوکپسول با میکروسکوپ الکترونی و توزیع اندازه ذرات

بررسی‌های زیست‌سنجی

در بررسی سمیت تنفسی اسانس‌ها و نانوکپسول اسانس‌های دو گونه اکالیپتوس روی شیشه قرمز آرد، ابتدا محدوده غلظت‌ها با انجام آزمایش‌های مقدماتی تعیین شد. آنگاه پس از مشخص کردن ۲۰ و ۸۰ درصد کشندگی، غلظت‌های اصلی با استفاده از فاصله لگاریتمی تعیین و

برای بررسی سطح و شکل‌شناسی دیواره نانوکپسول‌ها از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission electron microscopy) مدل کارل زایس، اوبرکوخن، آلمان استفاده شد. همچنین توزیع اندازه ذرات نانوکپسول به وسیله دستگاه NANO-flex®180 (Carl Zeiss-EM10C-100kv) ساخت 081 DLS هترودا این بازگشتی GmbH mertrix ساخته

نتایج

بازده اسانس‌دهی برگ و شناسایی ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده اسانس

بازده اسانس‌دهی برگ برای گونه‌های *E. globulus* و *E. camaldulensis* به ترتیب ۲/۴۵ و ۲/۲۲ درصد تعیین شد. مهمترین ترکیب‌های تشکیل‌دهنده اسانس‌های *E. globulus* و *E. camaldulensis* همراه با نام شیمیایی ترکیب، ضریب بازداری و درصد نسبی آنها در جدول ۱ آمده است. نتایج به‌دست‌آمده نشان داد، تعداد ترکیبات موجود در اسانس‌های دو گونه مورد مطالعه به ترتیب ۱۷۹ و ۶۸ ترکیب بود که نشان داد گونه *E. globulus* از تنوع ترکیبات بیشتری برخوردار است. مهمترین ترکیبات اسانس دو گونه اکالیپتوس، متعلق به ترین‌ها بود که در دو گونه به ترتیب 1,8-cineole، Limonene و α -pinene مهمترین ترین‌های موجود در این دو اسانس بودند. در این میان، غلظت 1,8-cineole به‌عنوان مهمترین ترکیب اسانس موجود در گونه‌های مختلف اکالیپتوس، در اسانس گونه *E. globulus* از گونه *E. camaldulensis* بیشتر بود.

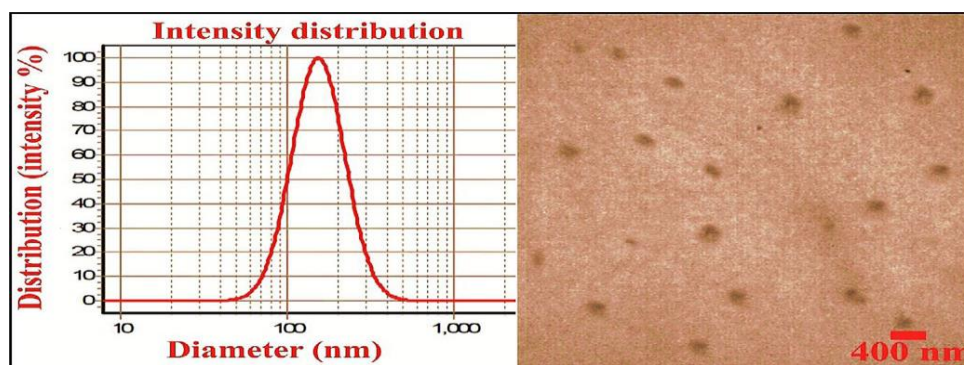
خصوصیات فرمولاسیون نانوکپسول

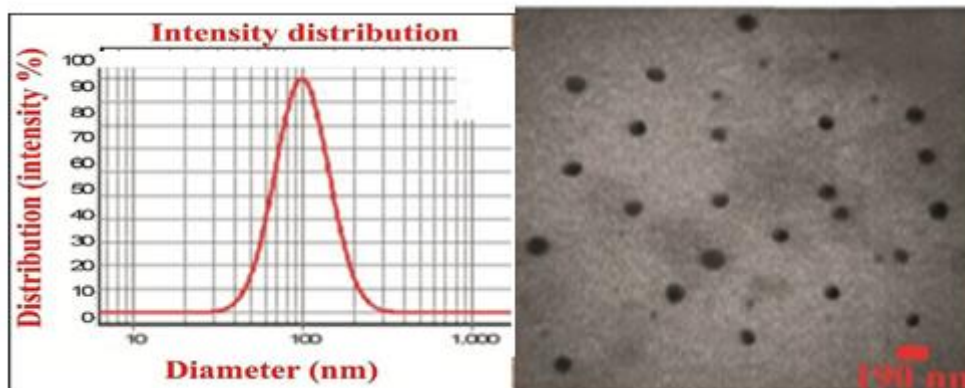
شکل‌های ۱ و ۲ تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری و توزیع اندازه ذرات نانوکپسول اسانس *E. globulus* و *E. camaldulensis* را نشان می‌دهند. در فرایند پلیمریزاسیون نانوکپسول، درصد بازده نانوکپسول ۸۹ درصد، درصد کارایی ۹۰ درصد و درصد مقدار اسانس بارگذاری شده ۸۶/۳ درصد به‌دست آمد. نتایج به‌دست‌آمده در تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد، نانوکپسول‌های حاوی اسانس اکالیپتوس دارای ابعادی در مقیاس نانو هستند. میانگین توزیع اندازه ذرات برای نانوکپسول اسانس *E. globulus* و *E. camaldulensis* حدود ۱۵۰ و ۱۰۰ نانومتر به ترتیب تعیین شد. بررسی ریخت‌شناسی نانوکپسول‌های حاوی اسانس نشان داد، نانوکپسول‌ها دارای سطح خارجی صاف و کروی و دارای ساختار هسته و دیواره مشخص هستند (شکل‌های ۱ و ۲).

آزمایش به‌صورت زیر انجام شد. غلظت‌های ۴، ۵/۶، ۷/۵، ۹/۸ و ۱۳ میکرولیتر بر لیتر و ۴، ۶، ۸/۵، ۱۲ و ۱۷ میکرولیتر بر لیتر به ترتیب برای اسانس‌های *E. globulus* و *E. camaldulensis* و غلظت‌های ۱/۷۷، ۳/۵۵، ۴/۶۲، ۹۵/۰۳ و ۶/۶ میکرولیتر بر لیتر و ۳/۵۵، ۵/۳۲، ۷/۱، ۸/۸۷ و ۱۰/۶۵ میکرولیتر بر لیتر به ترتیب برای نانوکپسول اسانس‌های *E. globulus* و *E. camaldulensis* در نظر گرفته شد. برای انجام آزمایش از ظروف شیشه‌ای با حجم ۱۴۰ میلی‌لیتر استفاده شد. به کمک میکروپیپت غلظت‌های مختلف نانوکپسول اسانس همراه با اسانس خالص با غلظت‌های مشابه نانوکپسول و شاهد روی یک قطعه کاغذ صافی به قطر دو سانتی‌متر ریخته شد. شاهد آزمایش تنفسی اسانس، آب همراه با توپین سه درصد و شاهد آزمایش تنفسی نانوکپسول، فقط نانوکپسول بدون اسانس روی کاغذ صافی بود. توری بین درب حاوی اسانس یا نانوکپسول و محل قرارگیری حشره گذاشته شد تا از تماس با اسانس یا نانوکپسول اسانس جلوگیری شود. درب هر شیشه پس از آماده‌سازی محکم بسته شد و بعد برای اطمینان بیشتر از عدم انتشار ترکیبات فرار با نوار پارافیلیم غیرقابل نفوذ شد. شیشه‌های حاوی حشرات تحت تأثیر تدخین اسانس به انکوباتور منتقل شدند. تعداد ۲۰ عدد حشره کامل نر و ماده ۷ تا ۱۴ روزه شیشه قرمز آرد (از هر جنس ۱۰ عدد) داخل ظرف شیشه‌ای ریخته شد و پس از گذشت زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از زمان اسانس‌دهی درب ظرف‌ها باز و تعداد حشرات مرده در ظروف تیمار و شاهد شمارش شدند. زمان‌های شمارش تلفات مستقل در نظر گرفته شدند. حشراتی که در اثر تماس سوزن داغ با شاخک و اندام‌های حرکتی‌شان واکنشی نشان نمی‌دادند، مرده در نظر گرفته شدند. درصد تلفات طبق فرمول Abbott (۱۹۲۵) محاسبه شد. برای محاسبه LC_{50} از روش Finney (۱۹۷۱) و نرم‌افزار PoloPlus استفاده شد. آزمایش‌های سمیت تنفسی اسانس‌ها و فرمولاسیون‌های نانوکپسول به‌صورت جداگانه برای اسانس هر دو گونه اکالیپتوس و نانوکپسول اسانس همراه با شاهد در دمای 25 ± 2 درجه سلسیوس و رطوبت نسبی 65 ± 5 در تریکی مطلق به‌صورت مجزا انجام شد.

جدول ۱- مهمترین ترکیبات شیمیایی اسانس برگ گونه‌های *E. camadulensis* و *E. globulus*Table 1. The main chemical compounds in essential oils of *E. globulus* and *E. camadulensis* leaves

N	Compound name	Chemical class	Retention factor	Amount of compound in essential oils of <i>E. globulus</i> (%)	Amount of compound in essential oils of <i>E. camadulensis</i> (%)
1	α -thujene	Monocyclic	928	3.3	<1
2	α -pinene	Bicyclic terpene	935	4.9	8.4
3	β -pinene	Bicyclic terpene	974	<1	<1
4	Myrcene	Acyclic terpene	986	<1	<1
5	α -phellandrene	Monocyclic	1000	<1	<1
6	p-cymene	Monocyclic	1020	<1	3.3
7	Limonene	Monocyclic	1025	6.3	4.14
8	1,8-cineole	Monocyclic	1027	71.4	61.6
9	γ -terpinene	Monocyclic	1057	<1	<1
10	Terpinolene	Monocyclic	1087	<1	<1
11	cis-P-menth-2-en-1-ol	Monocyclic	1121	<1	5.2
12	p-cymene-8-ol	Monocyclic	1185	<1	3.7
13	Trans pinocarveol	Bicyclic terpene	1139	<1	<1
14	Pinocarvone	Bicyclic terpene	1163	<1	<1
15	α -terpineol	Bicyclic terpene	1192	1.4	1.1
16	Geranyl acetate	Acyclic terpene	1379	<1	3.2
17	Caryophyllene	sesquiterpene	1414	<1	<1
18	α -guaiene	sesquiterpene	1439	<1	<1
19	Viridiflorol	Tricyclic	1608	<1	<1
20	Spathulenol	Tricyclic	1589	<1	<1
21	Linanol	Acyclic terpene	1099	<1	1.2
22	Globulol	Tricyclic	1598	2.3	<1
23	γ -eudesmol	sesquiterpene	1660	3.3	<1
24	α -eudesmol	sesquiterpene Bicyclic	1690	4.2	<1

شکل ۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری و توزیع اندازه ذرات نانوکپسول اسانس *E. globulus*Figure 2. Transmission electron microscopy image and size distribution of nanocapsule particles of *E. globulus* essential oils

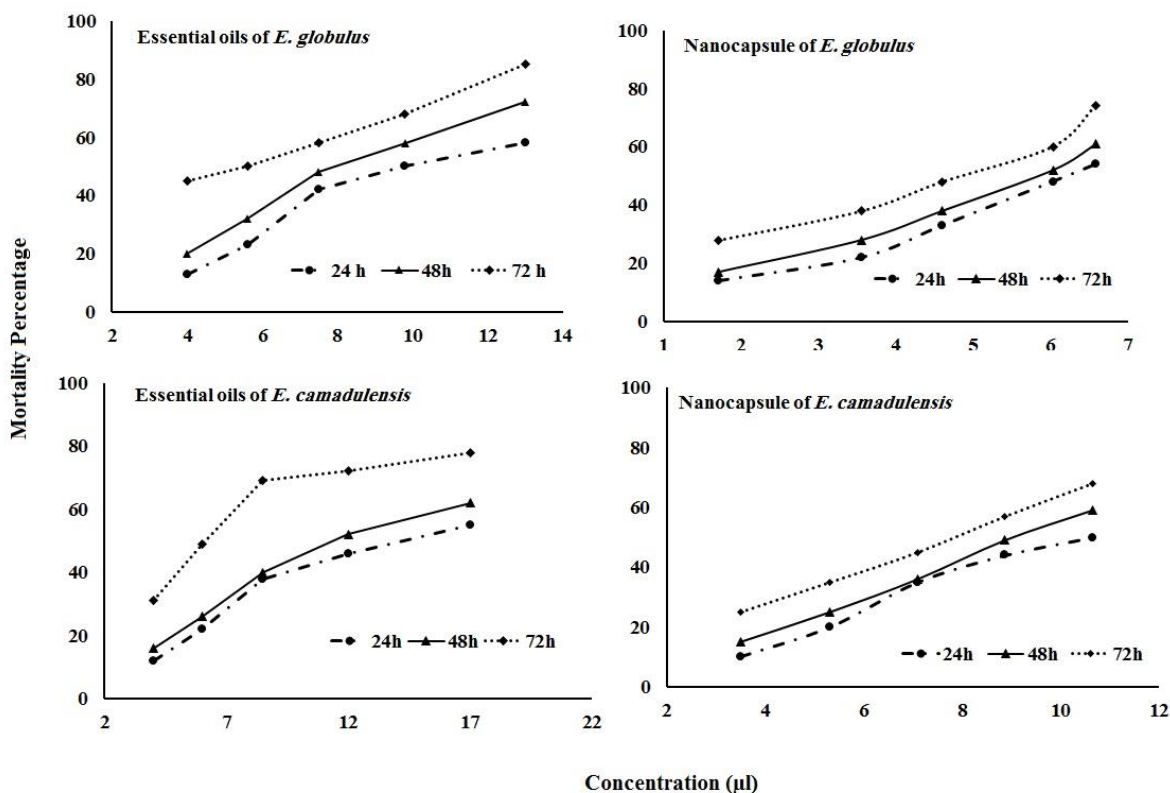


شکل ۲- تصاویر میکروسکوپ الکترونی عبوری و توزیع اندازه ذرات نانوکپسول اسانس *E. camadulensis*

Figure 3. Transmission electron microscopy image and size distribution of nanocapsule particles of *E. camadulensis* essential oils

سمیت تنفسی اسانس خالص و نانوکپسول
شکل ۳، درصد تلفات حشرات کامل شیشه قرمز آرد در
غلظت‌های مختلف اسانس و نانوکپسول اسانس

سمیت تنفسی اسانس خالص و نانوکپسول
شکل ۳، درصد تلفات حشرات کامل شیشه قرمز آرد در
غلظت‌های مختلف اسانس و نانوکپسول اسانس



شکل ۳- درصد تلفات حشرات کامل شیشه قرمز آرد در غلظت‌های مختلف اسانس و نانوکپسول اسانس *E. globulus* و *E. camadulensis*

Figure1. The mortality percentage of *T. castaneum* adults in different concentrations of essential oils and nanocapsul essential oils of *E. globulus* and *E. camadulensis*

شکل ۳ نشان می‌دهد با بالا رفتن غلظت اسانس و مدت زمان تیمار، میزان تلفات افزایش یافته است. به‌عنوان مثال در مورد اسانس *E. globulus*، با افزایش مدت زمان تیمار و افزایش غلظت‌ها، تلفات بیشتری ایجاد شده است. مثلاً در غلظت‌های ۴ و ۱۳ میکرولیتر بر لیتر در مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از اعمال تیمارها میزان تلفات از ۱۳ و ۵۸ درصد به ۴۵ و ۸۵ درصد به ترتیب افزایش یافته است. همچنین در اسانس *E. camadulensis* نیز با بالا رفتن غلظت و مدت زمان تیمار، تلفات افزایش یافته است. در اسانس *E. camadulensis* نیز در غلظت‌های ۴ و ۱۷ میکرولیتر بر لیتر در مدت زمان ۲۴ و ۷۲ ساعت پس از تیمار تلفات از ۱۲ و ۵۵ درصد به ۳۱ و ۷۸ درصد افزایش یافته است. این موضوع در مورد نانوکپسول‌های اسانس این دو گونه اکالیپتوس نیز مشاهده شد. به‌عنوان مثال نانوکپسول اسانس *E. globulus* در غلظت و مدت زمان بیشتر تیمار، تلفات بیشتری در حشرات ایجاد کرد. در حشرات تیمار شده با این نانوکپسول، در غلظت‌های ۱/۷۷ و ۶/۹۵ میکرولیتر بر لیتر و در مدت زمان تماس ۲۴ و ۷۲ ساعت، تلفات از ۱۴ و ۵۴ درصد به ۲۸ و ۷۴ درصد افزایش یافت. در مورد نانوکپسول *E. camadulensis* نیز نتایج مشابه به‌دست آمد و همان‌گونه که شکل ۳ نشان می‌دهد، در غلظت‌های ۳/۵۵ و ۱۰/۶۵ میکرولیتر بر لیتر در مدت زمان تیمار ۲۴ و ۷۲ ساعت، تلفات از ۱۰ و ۵۰ درصد به ۲۵ و ۶۸ درصد افزایش یافت. بنابراین، همان‌طور که در شکل ۳ نشان داده شده است، مدت زمان تماس و غلظت بیشتر باعث تلفات بیشتری در حشرات مورد آزمایش شده است.

علاوه‌براین شکل ۳ نشان می‌دهد، اسانس فرموله‌شده در مقایسه با اسانس خالص تلفات بیشتری ایجاد کرده است. به‌عنوان مثال در مقایسه با اسانس خالص، *E. globulus*، *E. camaldulensis* اسانس فرموله‌شده در مدت زمان تماس ۷۲ ساعت تلفات بیشتری را ایجاد کرده است. در بالاترین غلظت استفاده‌شده، میزان تلفات حشرات تیمار شده در اسانس خالص *E. globulus* و *E. camaldulensis* به ترتیب ۷۴ و ۶۸ است و در اسانس‌های فرموله‌شده به مقدار ۸۵ و ۷۸ افزایش پیدا کرده است. در زمان‌های تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز اسانس فرموله‌شده در مقایسه با اسانس خالص *E. globulus* و *E. camaldulensis* خاصیت حشره‌کشی بالاتری نشان داد و فرمولاسیون در افزایش حشره‌کشی اسانس مؤثر بود.

جدول ۲ تجزیه پروبیت برای تعیین LC_{10} ، LC_{25} ، LC_{50} و LC_{95} و معادله خط رگرسیون تلفات حشرات کامل شپشه آرد را پس از تأثیر تدخینی اسانس و نانوکپسول اسانس گونه‌های *E. globulus* و *E. camadulensis* نشان می‌دهد. میزان LC_{50} در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از تیمار برای اسانس خالص *E. globulus* به ترتیب ۱۰/۹۳، ۹/۶۳، ۵/۷ میکرولیتر بر لیتر و برای نانوکپسول اسانس *E. globulus*، به ترتیب ۵/۹، ۴/۶۰ و ۳/۸ میکرولیتر بر لیتر تعیین شد. این نتایج نشان می‌دهد، میزان LC_{50} فرمولاسیون نانوکپسول اسانس کاهش و مدت دوام اسانس کپسوله‌شده نیز افزایش یافته است. در مورد *E. camaldulensis* نیز نتایج مشابهی مشاهده شد. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، در فرمولاسیون نانوکپسول اسانس *E. camaldulensis* میزان LC_{50} کاهش و مدت دوام اسانس کپسوله‌شده نیز افزایش یافته است. بنابراین، براساس نتایج به‌دست‌آمده فرم نانوکپسول اسانس هر دو گونه اکالیپتوس در مقایسه با فرم خام اسانس سبب افزایش سمیت تنفسی شد.

علاوه‌براین شکل ۳ نشان می‌دهد، اسانس فرموله‌شده در مقایسه با اسانس خالص تلفات بیشتری ایجاد کرده است. به‌عنوان مثال در مقایسه با اسانس خالص، *E. globulus*، *E. camaldulensis* اسانس فرموله‌شده در مدت زمان تماس ۷۲ ساعت تلفات بیشتری را ایجاد کرده است. در بالاترین غلظت استفاده‌شده، میزان تلفات حشرات تیمار شده در اسانس خالص *E. globulus* و *E. camaldulensis* به ترتیب ۷۴ و ۶۸ است و در اسانس‌های فرموله‌شده به مقدار ۸۵ و ۷۸ افزایش پیدا کرده است. در زمان‌های تیمار ۲۴ و ۴۸ ساعت نیز اسانس فرموله‌شده در مقایسه با اسانس خالص *E. globulus* و *E. camaldulensis* خاصیت حشره‌کشی بالاتری نشان داد و فرمولاسیون در افزایش حشره‌کشی اسانس مؤثر بود.

جدول ۲- تجزیه پروبیت برای تعیین LC₉₅, LC₅₀, LC₂₅, LC₁₀ و معادله خط رگرسیون تلفات حشرات کامل شپشه قرمز آرد تحت تأثیر تدخینی اسانس و نانوکپسول اسانس *E. camadulensis* و *E. globulus* گونه‌های

Table2. Probit analysis for determination of LC₉₅, LC₅₀, LC₂₅, LC₁₀ and regression line equation parameters for the mortality in *T. castaneum* adults treated with *E. globulus* and *E. camadulensis* essential oils and their nanocapsulated essential oils

Plant	Time (h)	Slop (b)	Intercept (a)	P	χ^2	LC ₉₅ (µL/L air)	LC ₅₀ (µL/L air)	LC ₂₅ (µL/L air)	LC ₁₀ (µL/L air)
<i>E. globulus</i> (EO*)	24	2.55	-2.65	0.11	3.57	25.48 (24.6-82.9)	10.93 (9.8-12.56)	5.94 (5.23-6.55)	3.4 (2.64-4.08)
	48	2.59	-2.55	0.13	4.55	41.4 (30.34-66.7)	9.63 (8.7-10.79)	5.3 (3.1-5.88)	3.09 (2.36-3.7)
	72	1.92	-2.53	0.14	12.65	25.61 (18-51.8)	5.7 (4.6-6.62)	3.1 (1.9-3.9)	1.79 (0.8-2.6)
<i>E. globulus</i> (EON*)	24	2	-1.8	0.12	5.17	30.24 (18.66-76.8)	5.9 (5.17-7.4)	3.08 (2.4-3.6)	1.7 (1.03-2.2)
	48	2.32	-1.5	0.07	11.2	23.8 (14.32-75.2)	4.6 (3.8-5.8)	2.39 (1.5-3)	1.3 (0.58-1.9)
		1.56	-0.66	0.06	3.65	14.65 (12.1-44.8)	3.8 (3.1-4.9)	2.2 (1.5-3.1)	1.2 (0.7-1.9)
<i>E. camadulensis</i> (EO)	24	2.02	-2.39	0.07	8.57	97.72 (61.5-98.8)	15.09 (13.11-18.41)	7.01 (6.4-7.9)	3.52 (2.5-4.3)
	48	2.04	-2.26	0.09	16.55	82.39 (54.6-93.2)	12.86 (11.37-15.13)	6 (5.07-6.8)	3.02 (2.15-3.78)
	72	2.24	-2.05	0.11	13.65	44.37 (31.01-79.28)	8.2 (7.4-9.1)	4.1 (3.3-4.7)	2.2 (1.47-2.8)
<i>E. camadulensis</i> (EON)	24	2.63	-2.58	0.16	5.57	40.37 (28.64-69.9)	9.5 (8.6-10.9)	5.03 (4.6-5.8)	3.11 (2.3-3.7)
	48	2.6	-2.47	0.15	9.6	37.8 (27.32-64.01)	8.67 (8.08-10.01)	4.89 (4.24-5.42)	2.86 (2.15-3.4)
	72	2.4	-2.03	0.12	11.25	31.37 (22-50.59)	6.7 (6.11-7.34)	3.5 (2.8-4.14)	2.02 (1.38-2.5)

EO=essential oil; EON= essential oil nanocapsul

مطالعه 1,8-cineole و α -pinene و Limonene مهمترین ترین‌های موجود بودند و بیش از ۷۰ درصد ترکیبات اسانس موجود در آنها را تشکیل می‌دهند. در این میان غلظت 1,8-cineole به‌عنوان مهمترین ترکیب اسانس موجود در گونه‌های مختلف اکالیپتوس، در اسانس گونه *E. globulus* از گونه *E. camadulensis* بیشتر بود. به‌طور مشابهی ترکیب 1,8-cineole به‌عنوان ترکیب غالب اسانس اکالیپتوس گونه *Eucalyptus dundasii* Maiden (Aref et al., 2015) و *E. globulus* (Yang et al., 2004).

پژوهش‌های گذشته روی سمیت اسانس اکالیپتوس‌های ایران نشان داده است، ظرفیت استفاده در کنترل آفات انباری را دارند (Farashiani et al., 2016). Farashiani و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند، از ۵۳ گونه اکالیپتوس مورد مطالعه، اسانس گونه‌های *E. globulus* و *E. camadulensis* با در نظر گرفتن جنبه‌های مختلف، جزو مناسب‌ترین گونه‌ها برای کنترل آفت انباری *Sitophilus oryzae* (L.) هستند. یافته‌های این پژوهش نیز نشان داد، اسانس گونه‌های *E. globulus* و *E. camadulensis* سمیت تنفسی مناسبی برای کنترل شپشه قرمز آرد دارند. مطالعات فراوانی نشان داده است، اسانس سایر گونه‌های اکالیپتوس نیز دارای خاصیت حشره‌کشی هستند. البته سمیت تنفسی گونه *Eucalyptus leucoxydon* L. برای سه گونه آفت انباری نیز گزارش شده است (Kambouzia et al., 2009). همچنین، سمیت تنفسی اسانس گونه *Eucalyptus floribunda* L. روی دو آفت انباری *Rhyzopertha dominica* (F.) و *Oryzaephilus surinamensis* (L.) گزارش و LC_{50} سمیت تنفسی حشره برای این دو گونه به ترتیب ۴۱/۶۹ و ۵۷/۹۲ میکرولیتر بر لیتر هوا تعیین شد (Aref et al., 2016).

به‌طور کلی سمیت تنفسی مهمترین خصوصیت حشره‌کشی اسانس‌ها از جمله اسانس گونه‌های مختلف اکالیپتوس روی آفات انباری است که در دهه‌های اخیر مطالعه شده است (Farashiani, 2016). در پژوهش پیش‌رو میزان سمیت

محاسبه مقادیر LC_{50} و LC_{95} با استفاده از تجزیه پروبیت داده‌ها در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت نشان داد، با گذشت زمان این مقادیر کاهش می‌یابد، و غلظت کمتری از اسانس برای کنترل حشرات کامل شپشه آرد مورد نیاز است. همچنین، با توجه به مقادیر χ^2 و احتمال مربوطه، معلوم می‌شود که داده‌ها همگن هستند. همچنین، میزان سمیت تنفسی نانوکپسول فرمولاسیون *E. globulus* بیشتر از نانوکپسول اسانس *E. camadulensis* است. اسانس گونه *E. globulus* دارای سمیت بیشتری نسبت به اسانس گونه *E. camadulensis* بود. نتایج LC_{50} حاصل از سمیت تنفسی ماده مؤثره اسانس قبل و بعد از نانوکپسول شدن نشان داد، در روز اول مقادیر LC_{50} به‌دست‌آمده از اسانس خالص کمتر از اسانس نانوکپسول بود، اما پس از گذشت ۷۲ ساعت، مقادیر LC_{50} به‌دست‌آمده برای اسانس نانوکپسوله همچنان کمتر از مقادیر آن در اسانس معمولی ماند که نشان می‌دهد اسانس نانوکپسوله‌شده با گذشت زمان مؤثرتر از اسانس خالص است.

بحث

آثار زیستی همه اسانس‌ها به میزان زیادی وابسته به ترکیبات شیمیایی موجود در آنهاست. براساس یافته‌های این تحقیق مهمترین ترکیبات اسانس دو گونه اکالیپتوس متعلق به ترین‌ها بود، بنابراین، کشندگی اسانس‌ها را می‌توان به این ترکیبات نسبت داد. از میان ترکیبات ضروری موجود در اسانس‌ها، مونوترپن‌ها دارای بیشترین فعالیت تنفسی علیه آفات محصولات انباری هستند (Rajendran & Sriranjini, 2008). این مواد می‌توانند از طریق مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز باعث مرگ آفات شوند (Houghton et al., 2006). ساختار شیمیایی ترین‌ها بر میزان نفوذ، توانایی حرکت، تأثیر آنها بر محل اثر و تجزیه‌پذیری آنها تأثیر می‌گذارد. نتایج به‌دست‌آمده در این پژوهش نیز نشان داد، میزان سمیت تنفسی اسانس‌ها با توجه به غلظت ماده مؤثره در اسانس آنها تفاوت دارد. در اسانس هر دو گونه مورد

اسانس‌های مختلف و تأثیر متقابل این ترکیبات روی یکدیگر، همچنین میزان حساسیت مختلف گونه‌های مختلف حشرات به نانوکپسول اسانس‌های مختلف، نوع و روش تهیه نانوکپسول و شرایط به‌کارگیری ترکیبات مختلف متفاوت است. در این تحقیق از آلزینات سدیم در کپسوله کردن اسانس اکالیپتوس استفاده شد. این ترکیب دارای منشأ جلبک‌های دریایی است، زیست‌تخریب می‌باشد و خاصیت حشره‌کشی ندارد و روی حشرات هدف و غیرهدف بی‌تأثیر است (Choukaife et al., 2020). این پلی‌ساکارید در تولید محصولات نانو در صنایع آفت‌کش‌ها، داروسازی و غیره کاربرد دارد. از دیگر مزایای این پلیمر، زیست‌تخریب‌پذیری و عدم سمیت سلولی است و از مهمترین ترکیبات برای کپسوله‌کردن اسانس‌ها و سایر ترکیبات فرار است (Artusio et al., 2021).

درنهایت پژوهش پیش‌رو نشان داد، سمیت تنفسی اسانس گونه‌های اکالیپتوس *E. globulus* و *E. globulus* رضایت‌بخش بود، همچنین فرمولاسیون به‌کاررفته باعث افزایش کارایی آن شد، بنابراین می‌تواند گزینه مناسبی برای استفاده در مطالعات آینده علیه آفات انباری باشد. پژوهش‌های بعدی در زمینه نحوه فرمولاسیون و تولید نانوکپسول به شکل تجاری، تأثیر جانبی فرمولاسیون روی محصولات انباری به پیشرفت موضوعات مطرح‌شده در زمینه کنترل این آفت کمک بسزایی خواهد کرد. همچنین، لازم است قابلیت‌های فرمولاسیون جدید نانوکپسول در محیط انبار نیز آزمایش شود.

منابع مورد استفاده

- Abbott, W.S., 1925. A method for computing the effectiveness of an insecticide. *Journal of Economic Entomology*, 18: 265-267.
- Adams, R.P., 2001. Identification of essential oil compounds by gas chromatography/mass spectrometry. (4th Ed.). Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL, USA. 456 p.
- Ahmadi, Z., Saber, M., Akbari, A. and Mahdavinia, G.R., 2018. Encapsulation of *Satureja hortensis* L. (Lamiaceae) in chitosan/TPP nanoparticles with enhanced acaricide activity against *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). *Ecotoxicology*

تدخینی گونه *E. globulus* بیشتر از گونه *E. camadulensis* بود که با نتایج سایر پژوهشگران در این مورد مطابقت دارد (Alzogaray et al., 2011; Jemaa et al., 2012). مطالعه تأثیر کشندگی اسانس ۱۱ گونه اکالیپتوس، نشان داد، اسانس‌های دارای بیشترین مقادیر 1,8-cineole و α -pinene دارای قدرت کشندگی سریع (knockdown) بودند (Alzogaray et al., 2011). تفاوت در میزان کشندگی تنفسی اسانس گونه‌های مختلف بیشتر ناشی از تفاوت در ترکیبات شیمیایی تشکیل‌دهنده اسانس است (Artusio et al., 2021).

فرایند نانوکپسوله‌کردن یکی از راهبردهای مناسب افزایش دوام ماده مؤثر اسانس گیاهان با رهایش کنترل‌شده و مؤثر آن (De Oliveira et al., 2014; Ahsaei et al., 2020; Ebadollahi et al., 2022; Sushil et al., 2021). نتایج این مطالعه مانند یافته‌های سایر پژوهشگران نشان داد، نانوکپسول‌کردن اسانس می‌تواند کارایی اسانس را از طریق افزایش سمیت و افزایش دوام آن بیشتر کند (De Oliveira et al., 2014). نتایج نشان داد، با گذشت زمان در غلظت‌های مختلف سمیت تنفسی در اسانس نانوکپسوله در مقایسه با اسانس معمولی خاصیت افزایشی بیشتری داشت. درصد بالای کشندگی نانوکپسول، به‌علت رهایش تدریجی اسانس و ایجاد آثار طولانی‌مدت در فرمولاسیون نانوکپسول اسانس گیاه زیره سبز برای کنترل شیشه آرد در انبارها در مقایسه با فرمولاسیون خام آن گزارش شده است (Khademi et al., 2014). به‌طور مشابهی افزایش سمیت تنفسی اسانس‌های گیاهی با تکنیک نانوکپسوله گزارش شده است (Ahmadi et al., 2018; Khoshraftar et al., 2019; Negahban et al., 2011). در نانوکپسول اسانس به‌دلیل ریز بودن اندازه ذرات در مقایسه با اسانس، ذرات سطح تماس بیشتری دارند و تعداد نانو ذرات در غلظت به‌کاررفته افزایش می‌یابد و تعداد ذرات بیشتری در محیط، یا تماس با حشرات قرار می‌گیرند (De Oliveira et al., 2014).

میزان تلفات و قدرت کشندگی نانوکپسول اسانس‌های به‌کاررفته علاوه‌بر نوع ترکیبات موجود در نانوکپسول

- and Farazmand, H., 2020. Evaluation of field efficiency of the nanocapsule sex pheromone dispensers of carob moth *Ectomyelois ceratoniae* (Lep.: Pyralidae). *Plant Pest Research*, 10(3): 49-60.
- Danaye-Tous, A.H., Jafari, S., Heidary-Alizadeh, B. and Farazmand, H., 2022. Efficacy of nanocapsules loaded with *Ectomyelois ceratoniae* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae) sex pheromone as evaluated in wind tunnel and field trapping experiments. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 129: 853-860.
- Davies, N.W., 1990. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. *Journal of Chromatography*: 503: 1-24.
- De Oliveira, J.L., Campos, E.V.R., Bakshi, M., Abhilash, P.C. and Fraceto, L.F., 2014. Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: prospects and promises. *Biotechnology Advances*, 32(8): 1550-1561.
- Ebadollahi, A., Jalali Sendi, J., Setzer, W.N. and Changbunjong, T., 2022. Encapsulation of *Eucalyptus largiflorens* essential oil by mesoporous silicates for effective control of the cowpea weevil, *Callosobruchus maculatus* (Fabricius) (Coleoptera: Chrysomelidae). *Molecules*, 27(11): 3531.
- Farashiani, M.E., Awang, R.M., Assareh, M.H., Omar, D. and Rahmani, M., 2016. Fumigant toxicity of 53 Iranian Eucalyptus essential oils against stored product insect, *Sitophilus oryzae*. *Iranian Journal of Forest and Range Protection Research*, 13(2): 135-144 (In Persian).
- Finney, D.J., 1971. Probit analysis. 3rd ed. Cambridge University Press, London., 333 p.
- Heidary, M., Jafari, S., Karimzadeh, J., Negahban, M. and Shakarami, J., 2020. The effects of pure and nanocapsulated formulations of *Thymus daenensis* Celak. (Lamiaceae) essential oil on life table parameters of cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae* L.) (Hem.: Aphididae). *Plant Pest Research* 10(2): 15-32 (In Persian).
- Heidary, M., Karimzadeh, J., Jafari, S., Negahban, M. and Shakarami, J., 2021. Aphicidal activity of urea-formaldehyde nanocapsules loaded with the *Thymus daenensis* Celak essential oil on *Brevicoryne brassicae* L. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(2): 1285-1296.
- Houghton, P.J., Ren, Y. and Howes, M.J., 2006. Acetylcholinesterase inhibitors from plants and fungi. *Natural Product Reports*, 23(2): 181-199.
- Isman, M.B., 2020. Botanical insecticides in the twenty-first century fulfilling their promise. *Annual Review of Entomology*, 65: 233-249.
- Jemaa, J. M.B., Haouel, S. and Khouja, M.L., 2013. and Environmental Safety, 161: 111-119.
- Ahsaei, S.M., Rodríguez-Rojo, S., Salgado, M., Cocero, M.J., Talebi-Jahromi, K. and Amoabediny, G., 2020. Insecticidal activity of spray dried microencapsulated essential oils of *Rosmarinus officinalis* and *Zataria multiflora* against *Tribolium confusum*. *Crop Protection*, 128: 104996.
- Alzogaray, R.A., Lucia, A., Zerba, E.N. and Masuh, H.M., 2011. Insecticidal activity of essential oils from eleven *Eucalyptus* spp. and two hybrids: lethal and sublethal effects of their major components on *Blattella germanica*. *Journal of Economic Entomology*, 104(2): 595-600.
- Aref, S.P. and Valizadegan, O., 2015. Fumigant toxicity and repellent effect of three Iranian *Eucalyptus* species against the lesser grain beetle, *Rhyzopertha dominica* (F.) (Col.: Bostrichidae). *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 3(2): 198-202.
- Aref, S.P., Valizadegan, O. and Farashiani, M.E., 2016. The insecticidal effect of essential oil of *Eucalyptus floribundi* against two major stored product insect pests; *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Oryzaephilus surinamensis* (L.). *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19(4): 820-831.
- Artusio, F., Casà, D., Granetto, M., Tosco, T. and Pisano, R., 2021. Alginate nanohydrogels as a biocompatible platform for the controlled release of a hydrophilic herbicide. *Processes*, 9(9): p. 1641.
- Assareh, M., and Sardabi, H., 2007. Eucalyptus. Forest and rangeland research institute of Iran press, Tehran, 672 p. (In Persian).
- Barbosa, L.C.A., Filomeno, C.A. and Teixeira, R.R., 2016. Chemical variability and biological activities of *Eucalyptus* spp. essential oils. *Molecules*, 21(12): 1671.
- Batish, D.R., Singh, H.P., Kohli, R.K. and Kaur, S., 2008. Eucalyptus essential oil as a natural pesticide. *Forest ecology and Management*, 256 (12): 2166-2174.
- Bosquet, Y., 1990. Beetles associated with stored products in Canada: an identification guide. Publication-Agriculture Canada (English ed.), (1837). 214p.
- Chaudhari, A.K., Singh, V.K., Kedia, A., Das, S. and Dubey, N.K., 2021. Essential oils and their bioactive compounds as eco-friendly novel green pesticides for management of storage insect pests: prospects and retrospects. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(15): 18918-18940.
- Choukaife, H., Doolaanea, A.A. and Alfatama, M., 2020. Alginate nanoformulation: influence of process and selected variables. *Pharmaceuticals*, 13(11): 335-336.
- Danaye-Tous, A.H., Jafari, S., Heidary-Alizadeh, B.

- Negahban, M., Moharramipour, S., Zandi, M. and Hashemi, S.A., 2012b. Fumigant properties of nano-encapsulated essential oil from *Artemisia sieberi* on *Tribolium castaneum*. *Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Product*, 101-105.
- Negahban, M., Moharramipour, S., Zandi, M. and Hashemi, S.A., 2013. Efficiency of nanoencapsulated essential oil of *Artemisia sieberi* Besser on nutritional indices of *Plutella xylostella*. *Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants*, 29(3): 692-708.
- Rajendran, S. and Sriranjini, V., 2008. Plant products as fumigants for stored-product insect control. *Journal of Stored Products Research*, 44(2): 126-135.
- Riyaz, M., Mathew, P., Zuber, S.M. and Rather, G.A., 2022. Botanical pesticides for an eco-friendly and sustainable agriculture: new challenges and prospects. In *sustainable agriculture* (pp. 69-96). Springer, Cham
- Singh, P., Pandey, A.K. and Tripathi, N.N., 2012. Essential oils: a renewable source for the management of stored product insects-a review. *Agricultural Reviews*, 33(3): 226-236.
- Sundar, B., Rashmi, V., Duraimurugan, P., Matcha, N. and Ramesh, K., 2021. Biology of red flour beetle *Tribolium castaneum* (Hbst.) (Coleoptera: Tenebrionidae) on stored sesame. *Biological Forum—An International Journal*, 13(2): 516-521.
- Sushil, A., Kamla, M., Nisha, K., Karmal, M. and Sandeep, A., 2021. Nano-enabled pesticides in agriculture: budding opportunities and challenges. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 21(6): 3337-3350.
- Yang, Y.C., Choi, H.Y., Choi, W.S., Clark, J.M. and Ahn, Y.J., 2004. Ovicidal and adulticidal activity of *Eucalyptus globulus* leaf oil terpenoids against *Pediculus humanus capitis* (Anoplura: Pediculidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(9): 2507-2511.
- Yang, F.L., Li, X.G., Zhu, F. and Lei, C.L., 2009. Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(21): 10156-10162.
- Efficacy of Eucalyptus essential oils fumigant control against *Ectomyelois ceratoniae* (Lepidoptera: Pyralidae) under various space occupation conditions. *Journal of Stored Products Research*, 53: 67-71.
- Kambouzia, J., Negahban, M. and Moharramipour, S., 2009. Fumigant toxicity of *Eucalyptus leucoxydon* against stored product insects. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*, 3(2): 229-233.
- Khademi, N., Moharramipour, S. and Negahban, M., 2014. Insecticidal properties of essential oils of *Carum copitum* and *Cuminum cyminum* and their formulations on *Sitophilus oryzae* and *Tribolium castaneum*. M.Sc. thesis, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, 108 p (In Persian).
- Khanahmadi, M., Pakravan, P., Hemati, A., Azandaryani, M.N. and Ghamari, E., 2017. Fumigant toxicity of *Artemisia haussknechtii* Boiss. essential oil and its nano-encapsulated form pharmaceuticals. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 5(2): 1776-1783.
- Khoshraftar, Z., Safekordi, A.A., Shamel, A. and Zaefizadeh, M., 2019. Synthesis of natural nanopesticides with the origin of *Eucalyptus globulus* extract for pest control. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 12(3): 286-298.
- Moretti, M. D., Sanna-Passino, G., Demontis, S. and Bazzoni, E., 2002. Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 3(2): 64-74.
- Negahban, M., Moharramipour, S. and Sarbolouki, M.N., 2011. Nanocapsulation of *Artemisia sieberi* oil as a new formulation against *Callosobruchus maculatus*. *Integrated Protection Stored Product I/OBC/WPRS Bull*, 69: 249.
- Negahban, M., Moharramipour, S., Zandi, M., Hashemi, S.A. and Ziayee, F., 2012a. Nano-insecticidal activity of essential oil from *Cuminum cyminum* L. on *Tribolium castaneum*. In: Navarro, S., Banks, H. J., Jayas, D. S., Bell, C. H., Noyes, R. T., Ferizli, A. G., Emekci, M., Isikber, A. A. and Alagu-sunda-ram, K. [Eds.] *Proceedings of the 9th. International Conference on Controlled Atmosphere and Fumigation in Stored Products*, Antalya, Turkey. 15 -19 October 2012, ARBER Professional Congress Services, Turkey, pp: 63-68.