مجلـه‌ی علمـــی، پژوهشـــی دانشـگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲٦، شمـاره‌ی ۱۱۷، مهر و آبان ۱۳۹۷، صفحات ۹٦تا ۱۰۸

ارزیابی دورکنندگی اسانس کاکوتی بر خون خواری *آنوفل ماکولی‌پنیس* در شهرستان زنجان

دکتر محمدباقر قوامی[۱]، سکینه خوئینی[۲]، دکتر سقراط فقیه‌زاده[۳]

نویسنده‌ی مسئول: دکتر محمد باقر قوامی، گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران Ghavami@zums.ac.ir

دریافت: ۹۵/۱۲/۹ پذیرش: ۹٦/٤/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: *آنوفل ماکولی‌پنیس یکی از گونه‌های مهم پشه‌ها است که با گزش و انتقال بیماری‌ها مسایل زیادی را در دنیا به وجود آورده است. کاربرد حشره کش‌ها و دور کننده‌های مصنوعی (DEET) رایج ترین شیوه کنترل آن است، ولی کاربرد مداوم این ترکیبات باعث آلودگی محیط و توسعه مقاومت به این ترکیبات می شود. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر اسانس کاکوتی بر دور سازی این آنوفل و معرفی ترکیب دور کننده ی موثر و جایگزین بر DEET بود.*

روش بررسی: *بخش‌های هوایی گیاه کاکوتی (Ziziphora tenuior) از شهرستان زنجان جمع آوری و در سایه خشک شد. اسانس پودر کاکوتی با روش هیدرودیستیلاسیون استخراج و اجزای آن با روش گاز-کروماتوگرافی تعیین و رقت‌های سریالی از اسانس کاکوتی و DEET تهیه شد. نمونه‌های پشه بالغ آنوفل ماکولیپنیس (Anopheles maculipennis) از داخل اماکن شهرستان زنجان صید و در شرایط آزمایشگاهی نگهداری شد. بازوی داوطلبان با مقادیر مختلف اسانس و DEET آغشته شد و آنوفل‌های ماده خون نخورده در تماس با آنها قرار گرفت. زیست سنجی آزمایشگاهی به صورت یک سوکور با ۹ داوطلب انجام شد و در آن میزان و طول دوره‌ی دور کنندگی محاسبه گردید.*

یافته‌ها: *تیمول، ژرانیول و کارواکرول اجزای اصلی اسانس کاکوتی بودند و و به ترتیب ۳٦، ۱۱ و ۵ درصد از اسانس را تشکیل می‌دادند. دوز دورکنندگی ۵۰ و ۹۰ درصد این اسانس بر آنوفل ماکولی‌پنیس به ترتیب ۱/۷ و ۳/٦۷ میلی‌گرم بر سانتی مترمربع برآورد شد. غلظت ۳۰ درصد اسانس تا ۲٤۰ دقیقه مانع از گزش‌های آنوفل شد. میزان دور کنندگی اسانس در دوزهای بالای ۲ میلی‌گرم بر سانتی متر مربع مشابه DEET، ولی در دوزهای کمتر از ۱ میلی‌گرم بر سانتی‌متر مربع با DEET متفاوت بود.*

نتیجه گیری: *غلظت ۳۰ درصد اسانس کاکوتی همانند DEET بر آنوفل ماکولی‌پنیس دورکننده بوده و به مدت ۲٤۰ دقیقه مانع از گزش این آنوفل می‌شود. جهت افزایش کارایی این اسانس می‌توان سینرژیست‌هایی چون وانیل ۵ درصد به آن افزود. همچنین مطالعات الکتروفیزیولوژیک، می‌تواند نشان‌دهنده‌ی نحوه‌ی تاثیر تیمول و کارواکرول در سطح مولکولی باشد.*

واژگان کلیدی: ***آنوفل ماکولی پنیس، اسانس کاکوتی، دورکننده ها، DEET، Ziziphora tenuior***

۱- دکترای تخصصی حشره شناسی پزشکی، استاد گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه حشره شناسی پزشکی و مبارزه با ناقلین، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

۳- دکترای تخصصی آمار زیستی، استاد گروه آمار زیستی و پزشکی اجتماعی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

مقدمه

آنوفل ماکولی‌پنیس (*Anopheles maculipennis*) یکی از مهم‌ترین گونه‌های آنوفل‌ها در مناطق مختلف دنیا است که به دلیل داشتن جثه وقطعات دهانی بزرگ، گزش‌های دردناکی ایجاد می‌کند. این پشه علاوه بر گزش و خونخواری، می‌تواند با انتقال بیماری‌های مختلف عفونی، مالاریا، عفونت‌های آربوویروسی و ایجاد حساسیت‌های جلدی مسائل بهداشتی فراوانی را به وجود آورد (۱). این گونه، پشه‌ی غالب استان زنجان بوده و در فصول گرم سال (تابستان) جمعیت زیادی را در مناطق مختلف استان به خصوص اطراف رودخانه قزل‌اوزن دارد (۳ و ۲). بنابراین در چنین مناطقی اقداماتی برای کاهش گزش پشه‌ها از انسان ضروری به نظر می‌رسد. کنترل پشه‌های بالغ مهم‌ترین شیوه‌ی مبارزه با آنوفل ها می باشد که برای کنترل و پیشگیری از بیماری‌های منتقله از این آنوفل نیز موثر است (٤). امروزه از سمپاشی فضاهای بیرونی و درونی توسط مواد شیمیایی طبیعی و مصنوعی برای دورکردن پشه‌ها از انسان و به تبع آن کاهش نرخ گزش پشه‌ها از میزبان انسانی استفاده می‌شود، ولی به‌کارگیری حشره‌کش‌ها باعث ایجاد آلودگی زیست‌محیطی، صرف هزینه های گزاف و کاهش سطح حساسیت این آنوفل به انواع مختلف سموم رایج می شود (۵). امروزه شیوه‌ی جایگزینی که کارشناسان سازمان جهانی بهداشت، جهت حفاظت افراد از گزش پشه‌ها پیشنهاد کرده‌اند، استفاده از ترکیبات دورکننده در بخش های مختلف بدن در داخل و بیرون از اماکن می‌باشد (٤). یکی از پرکاربردترین مواد شیمیایی مصنوعی DEET (N,N- دی‌اتیل ۳-متیل‌بنزامید و در بعضی منابع دی‌اتیل‌تولومایدِ) می‌باشد که موثرترین ماده‌ی شیمیایی علیه تمام گونه‌های پشه طی ٦۰ سال گذشته می‌باشد (۵) و به عنوان دورکننده (Repellent) برای حفاظت افراد مورد استفاده قرار می‌گیرد، اما گزارش‌هایی مبنی بر مقاومت، نوروتوکسیسیتی و مسمومیت‌زایی، حساسیت‌زایی و عوارض جانبی چون خورندگی و سوزانندگی بر الیاف نسبت به این ترکیب ذکر شده‌است (۵). در سال‌های اخیر مردم به استفاده از محصولات دورکننده‌ی گیاهی روی آورده‌اند و بنابراین دانشمندان در پی یافتن جایگزین‌های گیاهی مناسب برای دورکننده‌های مصنوعی هستند. زیرا هم عوارض انسانی کمی دارند و هم از نظر زیست‌محیطی ایمن هستند و در طبیعت جذب/تجزیه‌شده و از بین می‌روند و آثار مخرب بر جای نمی‌گذارند. کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) گیاهی معطر و دارویی است که در تیره نعناییان (Lamiaceae) قرار دارد و در مناطق وسیعی از خاورمیانه و مدیترانه شرقی پراکنده است. این گیاه در طب سنتی برای درمان عفونت های تنفسی، گوارشی و مجاری ادراری به کار می رود. خاصیت ضد التهابی، ضد میکروبی و تقویت کننده سیستم ایمنی اسانس این گیاه در مطالعات آزمایشگاهی مشخص شده است (۹-٦). به علاوه خاصیت لاروکشی (۱۰) و دور کنندگی بر کک انسان به صورت تجربی دیده شده است (۱۱). با این حال مطالعه ای که تاثیر آن را بر رفتار پشه های بالغ به خصوص در خون خواری مشخص کند یافت نشد. هدف از این مطالعه ارزیابی تاثیر اسانس کاکوتی در دورسازی پشه‌های *آنوفل ماکولی‌پنیس* و مقایسه‌ی آن با DEET بود.

روش بررسی

استخراج اسانس: گیاه کاکوتی (*Ziziphora tenuior*) در ماه‌های اردیبهشت و خرداد سال های ۱۳۹٤ و ۱۳۹۵ از مراتع و کوه‌های اطراف روستای سهرین شهرستان زنجان جمع‌آوری و در سایه خشک شد.گیاهان توسط سبزی خردکن، به قطعات ریزتری تبدیل شدند. ۵۰ گرم از کاکوتی خشک‌شده را درون ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب‌مقطر ریخته و اسانس آن به روش هیدرودیستیلاسیون با دستگاه کلونجر در مدت ۲ ساعت استخراج شد. اسانس استخراج‌شده درون شیشه‌های تیره‌ی ۵ میلی‌لیتری ریخته شد و تا زمان آزمون در

دمـــای ٤ درجـــه‌ی ســـانتی گـــراد نگهـــداری شـــد.

تجزیه‌ی شیمیایی اسانس: میزان یک میلی‌لیتر (در ۱۳ تکـرار) از اسانس‌های استخراج شده را توسط سـرنگ شیشـه‌ای یـک میلی‌لیتری برداشته و وزن آن‌ها با دقـت ۰/۰۱ گـرم مشـخص گردید.

آنـالیز کرومـاتوگرافی گـازی-(Gas Cromatography Mass Spectrometry=GC Mass) اسـانس‌هـا توسـط دسـتگاه HP SeriesII 789ON بـا نشـانگر (detector) ستون یونی مدل HP5MS (به قطر ۰/۲۵میلی‌لیتر و به طـول ۳۰ متر) در دمای ۲٦۰ و ۲۷۰ درجه سـانتی‌گـراد (بـه ترتیـب برای تزریق و تشخیص) توسط شرکت دانـش‌پژوهـان پـایش امـین (www.payeshamin.ir) انجـام گرفـت. برنامـه ی دمایی ابتدا ،٦۰ درجه‌ی سانتی‌گراد در مدت ٤ دقیقه و سـپس به ۲۲۵ درجه‌ی سـانتی‌گـراد (هـر دقیقـه ۳۰ درجـه) افـزایش یافت. گاز تشخیصی هلیوم بوده و به میزان یک میلـی‌لیتـر در هر دقیقه به دستگاه تزریق می‌شـد. نمونـه‌هـا بـه نسـبت یـک پنجاهم در دی‌اتیل‌اتر رقیق شده و از هر نمونه اسـانس حجـم یک میکرولیتر به صورت دستی به دستگاه تزریق گردید. آنالیز کمّی اسانس‌ها نیـز توسـط دسـتگاه GC HP SeriesII کـه نشانگر حاوی HP6CS97SC(authentic) در حالـت ev ۷۰ بود انجام گرفت و مقادیر دقیق ترکیبـات نیـز بـه صـورت نسبی که در منابع مختلف و پایگاه سیسـتم GC-MS آمـده، مشخص گردید.

دورکننده‌ها: با استفاده از اتانول ۹۹/٦ درصد، محلول Stock ٦٤ درصد از اسـانس *Ziziphora tenuior* و DEET بـه حجم ۲ میلی‌لیتر تهیه شد و سپس رقـت‌هـای سـریالی ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ٤، ۸، ۱٦ و ۳۲ درصـد از اسـانس *Ziziphora tenuior* و DEET با اتانول، هر کدام در حجم ٤ میلی‌لیتر تهیه شد.

نمونه‌گیری: پشه‌های *آنـوفل ماکولی‌پنـیس* در مـاه‌های تیـر و مرداد سال هـای ۱۳۹٤ و ۱۳۹۵، بـا آسـپیراتورهای برقـی و دستی از اماکن حیوانی واقع در روستای قـره‌بوطـه شهرسـتان زنجان صید شده و نمونه‌های صیدشده به قفس هـدایت و بـه انسکتاریوم دانشکده‌ی پزشکی دانشگاه علوم پزشـکی زنجـان منتقل شدند. در انسکتاریوم این نمونه‌ها با شربت قند (گلـوکز ۱۰ درصد) تغذیه شدند و پلیـت شیشـه‌ای حـاوی آب بـرای تخم ریزی پشه‌ها درون قفس‌ها گذاشته شد. پشه‌ها بـه مـدت ۳ تا ۵ روز در دمای ۲±۲٤ درجـه‌ی سـانتی گـراد و رطوبـت نسـبی ۷۵ درصـد و دوره‌ی فتوپریـودی ۱۲:۱۲(روشـنایی: تاریکی) نگهداری شدند و پس از آن پشه‌های خون‌نخورده و خالی برای آزمون آماده شدند.

داوطلبان آزمون: ۹ نفر داوطلب ۲۵ تا ٦۰ سـاله (٦ مـرد و ۳ زن) در آزمون زیست‌سنجی آزمایشگاهی و تعیین مدت زمـان حفاظت کامل شرکت کردنـد (۱۵-۱۲). داوطلبـان نسـبت بـه نحوه‌ی آزمون و عوارض احتمالی آن توجیه شدند. داوطلبـان افراد غیرسیگاری بودنـد کـه از ۲٤ سـاعت قبـل از آزمـون از خوردن سیر و پیاز و استعمال عطر و ادکلن منع شدند و طبـق پروتکل استاندارد (٤) انتخاب شدند. چنانچه داوطلبان نسـبت به اسانس و ترکیب دورکننـده حساسـیت داشـتند، از مطالعـه خارج می شدند.

زیســت‌ســنجی: توسـط آسـپیراتور بـه شـیوه‌ی صـید دسـتی نمونه‌های آنوفل ماکولی پنیس از قفس‌هـای نگهـداری، صـید شده و در بین آن‌ها پشه‌های ماده‌ی خـون‌نخـورده انتخـاب و بقیه از مطالعه خارج شدند. تعداد ۲۰ عدد از پشه‌های انتخاب شده به اولفاکتومتر رها شـدند. بـازوی میـانی اولفـاکتومتر بـه وکیوم متصل شد و دو بازوی کناری اولفاکتومتر بـرای آزمـون (یکی از بازوها برای کنترل و دیگری برای مورد) استفاده شد. هر دو بازوی اشاره شده جهت جلـوگیری از خـروج پشـه‌هـا توسـط تـوری بسـته شـدند و داوطلبـان سـاعد خـود را در نزدیکترین فاصله به بازو نگه می‌داشتند. آزمون بعد از غـروب

آفتاب شروع شد و تا نیمه‌شب ادامه داشت. بررسی در تاریکی، داخل آزمایشگاه (با دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و رطوبت ۲۷ درصد) صورت پذیرفت و آغشته‌سازی محلول‌ها از کمترین دوز شروع شد. جهت آغشته‌سازی، ۵۰ میکرولیتر از اسانس در سطحی از ساعد دست داوطلبان به مساحت ؟؟۵ سانتی مترمربع به‌طور یکنواخت پخش شده و فرصت داده شد تا خشک شود. ساعد دست دیگر به همان مقدار با اتانول ۹۹/۶ درصد آغشته شد تا به عنوان کنترل در آزمون استفاده شود. پس از خشک شدن محل آزمون، ساعد مورد و کنترل همزمان روی دهانه‌ی اولفاکتومتر قرار گرفت. در این موقع دستگاه وکیوم روشن شده و در حالی که هوای درون اولفاکتومتر را با یک جریان آرام خارج می‌کرد بعد از مدت ۳ دقیقه تعداد پشه‌های جذب شده به هر کدام از بازوها شمارش شدند و پس از پایان آزمون به قفس جداگانه‌ای هدایت شدند. همین آزمون برای ترکیب DEET انجام شد.

تعیین مدت زمان حفاظت کامل اسانس *Z. tenuior* : با توجه به اینکه دوز پوششی ۹۰ درصد، غلظت ۳۰ درصد اسانس برآورد شد میزان ۵۰۰ میکرولیتر از اسانس کاکوتی ۳۰ درصد به‌طور یکنواخت روی ۵ سانتی مترمربع از ساعد داوطلب پخش شد. داوطلب ساعد خود را به‌طور منظم (تا ۲ ساعت هر ۳۰ دقیقه، یک ساعت بعدی هر ۱۵ دقیقه و بعد از آن هر ۵ دقیقه) به مدت ۳ دقیقه درون قفسی که حاوی ۱۰۰عدد پشه‌ی ماده‌ی *آنوفل ماکولی‌پنیس* خون‌نخورده و خالی بودند قرار داد. این‌کار تا زمان جذب اولین پشه روی ساعد ادامه یافت و با جذب دومین پشه آزمون خاتمه پیدا کرد. این بررسی در ٤ تکرار انجام شد.

آنالیز داده‌ها: با احتساب نسبت پشه‌های جذب شده به بازوهای مورد (T) و کنترل (C) جهت خون خواری، میزان دور کنندگی ترکیب مورد مطالعه (P) از فرمول P=1-(T/C) محاسبه شد (۱۱). با استفاده از نرم افزار Priprobit 1.1 مقادیر دوز دورکنندگی ۵۰درصد (ED_{50}) و ۹۰ درصد (ED_{90}) هر کدام از ترکیبات با حدود اطمینان ۹۵ درصد برآورد گردید.

یافته‌ها

در این مطالعه به شیوه تقطیر (هیدرودیستیلاسیون) از پودر گیاه کاکوتی ٦٥ میلی‌لیتر اسانس، به‌دست آمد. رنگ اسانس این گیاه، زرد تیره وچگالی آن (در ۱۳ تکرار) برابر با ۰/۰٤۳ ± ۰/۹۸۸ گرم بر میلی‌لیتر بود. بازده اسانس آن نیز ۰/۸۰ تا ۲/۳۰ میلی‌لیتر به ازای ۱۰۰ گرم از گیاه خشک شده دیده شد.

ترکیبات موجود در اسانس کاکوتی که به روش کروماتوگرافی گازی (GC Mass) به‌دست آمد، شامل ٤٧ جزء بود که حدود ۹۸ درصد اسانس را تشکیل می‌دادند (جدول ۱). مهم‌ترین این ترکیبات تیمول، ژرانیول، کارواکرول، استات-ژرانیل، بنزن۱-متیل-۲-(۱-متیل‌اتیل)، ۱و ۸-سینئول، گاما-ترپینن، بورنئول، لینالول و کارواکرول متیل اتر بودند. در بین این‌ها تیمول، ژرانیول و کارواکرول به ترتیب ۳٦/۲٦، ۱۱/۱٦ و ٤/۹٥ درصد اسانس را تشکیل می‌دادند.

جدول ۱: ترکیبات اصلی اسانس *Ziziphora tenuior* در آنالیز به روش *GC-Mass*

ردیف	نام ترکیب	LRT اندیکس همبستگی خطی (دقیقه)	درصد	کیفیت
۱	trans-chrysanthemal	۱۵/۶۰	۰/۰۷	۷۰
۲	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (E)- (CAS)	۱۰/۶۶	۰/۰۹	۹۶
۳	Thymol acetate	۲۵/۴۲	۰/۰۹	۹۵
٤	α-Terpinolene	۱۲/۸۲	۰/۱۱	۹۸
۵	α-Cadinol	۳۵/۵۱	۰/۱۲	۹۶
٦	Geranyl propionate	۳۳/۹۶	۰/۱۳	۸۷
۷	l-Phellandrene	۹/۲۱	۰/۱۵	۹۵
۸	β- Bourbonene	۲٦/۵۰	۰/۱۸	۹۹
۹	Butanoic acid, 3,7-dimethyl-2,6-octadienyl ester, (E)-	۳۲/٦۷	۰/۱۸	۹۱
۱۰	cis-sabinene hydrate $	۱۳/۲۸	۰/۲۱	۹۷
۱۱	Sabinene	۸/۰۱	۰/۲۳	۹٦
۱۲	δ-Cadinene	۳۱/٤۵	۰/۲۳	۹۹
۱۳	Caryophyllene oxide	۳۳/۳۳	۰/۲٤	۹۳
۱٤	trans-Nerolidol	۳۲/۷۸	۰/۲٦	۹٤
۱۵	Bornyl acetate	۲۲/۵۷	۰/۲۸	۹۸
۱٦	2-β-Pinene	۸/۱۱	۰/۳۰	۹۷
۱۷	(+) spathulenol	۳۳/۱۸	۰/۳۱	۹۵
۱۸	Cis-α-Bisabolene	۳۲/۰۹	۰/۳۲	۹۹
۱۹	Bicyclogermacrene	۳۰/۵٤	۰/٤٦	۹٦
۲۰	Cyclohexene, 1-methyl-4-(5-methyl-1-methylene-4-hexenyl)-, (S)-	۳۰/۹۹	۰/٦۳	۹۸
۲۱	Camphene	۷/۱۰	۰/٦۳	۹۸
۲۲	Z-Citral	۲۰/٤۲	۰/٦٤	۹٤
۲۳	3-Cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)- (CAS) $$ 4-Terpineol	۱٦/۸۷	۰/٦۷	۹۸
۲٤	Comphor	۱۵/۲۹	۰/٦۹	۹۸
۲۵	α-Terpinene	۹/۷۱	۰/٦۹	۹۸
۲٦	α-Pinene	٦/۵۹	۰/۷۱	۹۷
۲۷	Thujene	٦/۳۷	۰/۷۱	۹٤
۲۸	cis-sabinene hydrate	۱۱/۹۰	۰/۷۱	۹۷
۲۹	1,3,6-Octatriene, 3,7-dimethyl-, (Z)-	۱۰/٦٦	۰/۸۱	۹٦
۳۰	Germacrene-D	۳۰/۰۲	۰/۸٤	۹۹
۳۱	E-Citral	۲۱/۹۷	۰/۸۷	۹۵
۳۲	β-Myrcene	۸/۷۰	۰/۹۲	۹۷

۳۳	trans-Caryophyllene	۲۷/۸۱	۱/۰۳	۹۹
۳٤	(+)-Epi-bicyclosesquiphellandrene	۳۵/۱۱	۱/۱۳	۸۱
۳۵	Nerol	۱۹/۸۰	۱/۵۰	۸٦
۳٦	Linalool L	۱۳/٤٦	۲/۲۷	۹۷
۳۷	α- Terpineol	۱۷/۷۰	۲/۳٦	۹۱
۳۸	p-Menth-1-en-8-ol, (S)-	۱۷/۵۵	۲/٤۱	۹۱
۳۹	Carvacrol methyl ether	۲۰/۳۰	۲/۹۸	۹٤
٤۰	1,8-Cineole	۱۰/۳۲	۳/۱٦	۹۹
٤۱	Borneol L	۱٦/۳۸	۳/۲٦	۹۷
٤۲	γ-Terpinene	۱۱/۵۵	۳/۳۳	۹۷
٤۳	Benzene, 1-methyl-2-(1-methylethyl)- (CAS)	۱۰/۰۸	۳/۵۱	۹۷
٤٤	Geranyl acetate	۲٦/٦۸	٤/۷۲	۹۱
٤۵	Carvacrol	۲۳/۵۷	٤/۹۵	۹۷
٤٦	Geraniol	۲۱/٤۵	۱۱/٦۱	۹۵
٤۷	Thymol	۲۳/۳۵	۳٦/۲٦	۹۷
جمع	۹۷/۹۸درصد			

در بررسی زیست‌سنجی مشخص شد که دوز موثر ۵۰ درصد اسانس کاکوتی برای دورسازی پشه‌های *آنوفل ماکولی‌پنیس* با حدود اطمینان ۹۵ درصد در دامنه‌ی (۱/۷۰۹۵۵ – ۰/۹۹٤٦۱) میکروگرم در سانتی مترمربع می‌باشد. همچنین این دوز برای دورسازی ۹۰ و ۹۵ درصد با حدود اطمینان فوق به ترتیب (۳/٦۷٤۷۱ - ۲/۰۷۱۹۸) و (٤/۳۱۳۰۲ – ۲/۲۹٦۱۹) میکروگرم در سانتی مترمربع برآورد شده است.

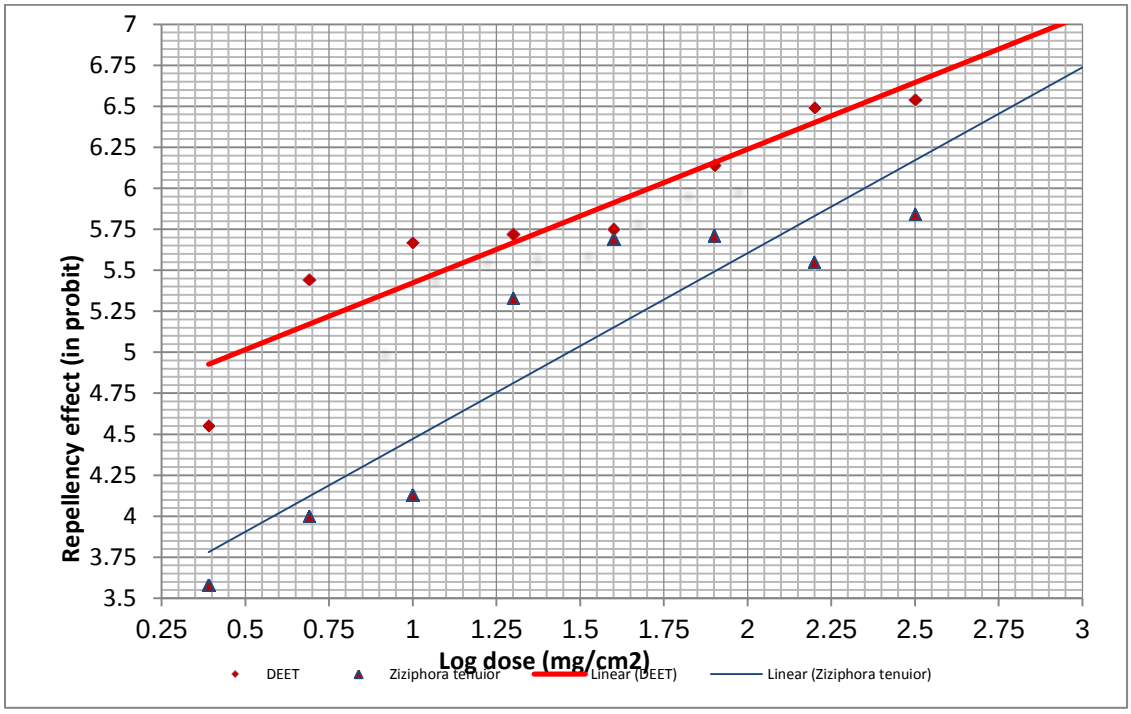
مقادیر دوز موثر ۵۰، ۹۰ و ۹۵ درصد با حدود اطمینان ۹۵درصد برای DEET، به ترتیب (۰/۸۱۳۱۱– ۰/۲۰۲۳۳–) ، (۲/۷۱٦٦۲ – ۱/۷۲۱٦۵) و (۳/٤۵۹۷۲– ۲/۰٦۳۵۸) میکروگرم در سانتی مترمربع است. آنالیز پروبیت داده‌ها نشان داد که بین میزان دورشدن پشه‌ها و دوز مواجهه، همبستگی وجود دارد. پارامترهای آماری این همبستگی در جدول ۲ آمده و نمودار آن نیز در شکل ۱ آمده است.

جدول ۲: پارامترهای همبستگی میزان دورکنندگی مقادیر مختلف اسانس Z. tenuior و DEET بر An. maculipennis در بررسی‌های آزمایشگاهی

نام ترکیب	A	B	ED_{50}* (95%cf)	ED_{90}* (95%cf)	N	X^2	P
Ziziphora tenuior	–۱/٦۰	۱/۱۵	۱/۳۸۹(۰/۹۹٤٦۱ – ۱/۷۰۹۵۵)	۲/٤۹۸(۲/۰۷۱۹۸ - ۳/٦۷٤۷۱)	۱٤۳۹	۱۵/٤۰	۰/۰۰۰
DEET	–۰/۳۹٤	۰/۸۱۸	۰/٤۸۲(–۰/۲۰۲۳۳ –۰/۸۱۳۱۱)	۲/۰٤۸(۱/۷۲۱٦۵ – ۲/۷۱٦٦۲)	٦۵۷	۲/٤۵	۰/۰۲٤

ED = Effective Dose دوز موثر بر حسب میکروگرم در سانتیمترمربع

a = فاصله از مبداء b = شیب منحنی همبستگی



شکل ۱: مقادیر دورکنندگی دوزهای مختلف اسانس کاکوتی و DEET بر An. maculipennis در بررسی های آزمایشگاهی

اسانس ۳۰ درصد کاکوتی که حفاظت ۹۰ درصد می‌دهد برای تعیین مدت زمان حفاظت کامل با ۲ داوطلب در ٤ تکرار بررسی شد و مقادیر هر کدام از آزمون‌ها به ترتیب ۲٤۸، ۲٤٦، ۲۳۱ و ۲۳۸ دقیقه به دست آمد. متوسط دوره‌ی حفاظت کامل اسانس کاکوتی ۲٤۱ دقیقه برآورد شد. در بررسی بالینی هیچگونه عوارض جانبی روی پوست یا سایر قسمت‌های بدن داوطلبان در طی آزمون و حتی تا دو ماه پس از آزمون مشاهده نشد.

بحث

آنوفل ماکولی پنیس مهم‌ترین گونه‌ی آنوفل‌ها در گذشته است که با گزش و خونخواری، انتقال بیماری‌های مختلف عفونی همچون مالاریا، برخی از آربوویروس‌ها و ایجاد حساسیت‌های جلدی مسائل بهداشتی فراوانی را می‌تواند به وجود آورد. تاکنون پژوهش‌هایی که تاثیر دورکنندگی اسانس‌ها را بر پشه‌های *آنوفل ماکولی پنیس* مشخص سازد انجام نشده است و بررسی حاضر اولین تحقیق در این زمینه است. باتوجه به تاثیر دورکنندگی قابل توجه کاکوتی در مقابل *آنوفل ماکولی‌پنیس*، انجام پژوهش‌های آزمایشگاهی و عرصه ای جهت تعیین فرمولاسیون های موثر در آینده ضروری است. بررسی حاضر نشان داد که اسانس کاکوتی همانند دورکننده‌ی مصنوعی DEET خاصیت دورکنندگی بر این آنوفل دارد و محلول الکلی ۳۰ درصد آن می‌تواند به مدت ٤ ساعت مانع از گزش‌های آن شود. طول دوره‌ی حفاظتی اسانس‌ها برحسب گونه‌ی گیاهی، پشه‌ی مورد بررسی و فرمولاسیون کاربردی اسانس، مقادیر مختلفی می‌تواند داشته باشد. بیشترین دوره‌ی حفاظتی (۱۲-۸) ساعت در اسانس گونه‌های *Cympobogon* بر پشه‌های *Aedes*، *Anopheles* و *Culex* گزارش شده‌است. نتایج پژوهش‌های انجام‌گرفته بر اسانس گونه‌های مختلف نعناع بر

آنوفل کولیسی‌فاسیس، *آنوفل آنولاتوس*، *آنوفل استفنسی* و *کولکس کوئین‌کوفاسیاتوس* دوره‌ی حفاظتی ۸ تا ۱۱ساعت را نشان داده‌است (۱٦). همچنین در بررسی‌های انجام یافته بر اسانس‌های *Corymbia martini*، *Lippia javanica* و *Dianthus caryophillum* دوره‌ی حفاظتی را برای گزش‌های *آئدس اجپتی* و *آنوفل گامبیه* ۷ تا ۸ ساعت مشخص کرده است (۱۸ و ۱۷). دوره‌های حفاظتی ٤ تا ٦ ساعت نیز در بررسی‌های انجام یافته در اسانس *Corymbia citrodora* بر *آنوفل استفنسی* و *آنوفل عربینسیس* حاصل شده است (۱۹).

مشابه یافته‌های اسانس کاکوتی در مطالعه‌ی حاضر، نتایج پژوهش‌های انجام گرفته با اسانس میخک (*Eugenium caryophyllum*) بر *کولکس کوئین-کوفاسیاتوس* و *آنوفل آلبی‌مانوس* که به ترتیب دوره‌ی حفاظتی ٤ و ۳/۵ ساعت(۱۵)، و مرزه‌ی باغی (*Saturea hortensis*) بر *آنوفل استفنسی* دوره‌ی ٤ ساعت (۲۰) دیده شده است. در مقابل یافته‌های اخیر، در مطالعات انجام‌یافته بر اسانس سیر (*Alium sativum*) (۲۱)، دارچین (*Cinnamomum zylanicum*) (۲۲)، لیموترش (*Citrus sinensis*) (۲۱)، نعناع فلفلی (*Mentha piperita*) (۱۳)، ریحان (*Ocimum basilicum*) (۲۳)، همیشه بهار (*Calendula officinalis*) (۲٤)، مورد (*Myrtus comminis*) (۲٤) و رزماری (*Rosmarinus officinalis*) (۲۲) که بر پشه‌های *آنوفل*، *کولکس* و *آئدس* انجام یافته، طول دوره‌ی حفاظتی کمتر از ۳ ساعت گزارش شده است. از گیاهان هم‌خانواده‌ی کاکوتی که مطالعات دورکنندگی بر آنها انجام یافته آویشن باغی (*Thymus vulgaris*) است که دوره‌ی حفاظتی آن بر *آنوفل آلبی مانوس* ۱ تا ۲ ساعت گزارش شده‌است (۲٦ و ۲۵). بررسی‌های اخیر نشان داده که افزودن ترکیباتی چون وانیلین می‌تواند مدت زمان حفاظتی را در اسانس‌ها افزایش دهد (۲۷). در مطالعات آیساواسدی و همکاران (۲۰۱٦) مشخص شد که افزودن وانیلین ۵درصد بر اسانس زردچوبه و اکالیپتوس مدت زمان حفاظتی را دو برابر می‌کند (۲۸). در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد که اسانس ۳۰ درصد کاکوتی حدود ٤ ساعت می‌تواند مانع از گزش *آنوفل ماکولی-پنیس* شود. این مدت برای افرادی که بیرون از اماکن مشغول فعالیت‌های اجتماعی هستند کفایت می‌کند ولی برای حفاظت افراد در داخل به خصوص در شب‌های تابستان که حدود ۸ ساعت است کافی نیست. با توجه به تاثیر سینرژیستی وانیلین ۵ درصد بر اسانس‌ها، لازم است فرضیه‌ی افزایش یافتن طول دوره‌ی حفاظتی اسانس کاکوتی با به‌کارگیری وانیلین ۵درصد در مطالعات بعدی آزموده شود.

در مطالعه‌ی حاضر مشخص شد که مهم‌ترین اجزای اسانس کاکوتی تیمول، ژرانیول و کارواکرول است که به ترتیب ۳٦/۲٦ ، ۱۱/٦۱ و ٤/۹۵ درصد اسانس را تشکیل می‌دهند. خاصیت حشره‌کشی و دورکنندگی تیمول و کارواکرول در مطالعات اخیر محرز شده است (۳۰ و ۲۹). در این مطالعات مشخص شده که در میان مونوترپنوئیدهای موجود در اسانس‌ها، تیمول بیشترین مرگ و میر را ایجاد می‌کند و دور کنندگی آن بر پشه‌ها همچون DEET می‌باشد (۲۷).

گاماترپینن و p-سیمن پیش‌سازهای تیمول و کارواکرول هستند و گاماترپینن به میزان ۳/۳۳ درصد در اسانس کاکوتی وجود دارد. اثر سینرژیستی دو ترکیب کارواکرول و p-سیمن بر تیمول در افزایش دورکنندگی تیمول در مطالعات پاولا و همکاران (۲۰۱۰) دیده شده‌است (۳۱). با توجه به وجود چنین اثری انجام بررسی‌های الکتروفیزیولوژیک برای تعیین تاثیر این ترکیبات و زیست‌سنجی آزمایشگاهی جهت ساخت دورکننده‌های نسل جدید از ترکیب تیمول با پیش‌سازهای آن ضروری است.

بررسی زیست‌سنجی اسانس کاکوتی در مطالعه‌ی حاضر نشان داد که روند پاسخ‌های آنوفل بر دوزهای اسانس کاکوتی مثل DEET نیست و اسانس در دوزهای پائین تا حدودی خاصیت جذب‌کنندگی بر *آنوفل ماکولی‌پنیس* دارد و با افزایش دوز از خاصیت جذب‌کنندگی کم شده و بر میزان دورکنندگی افزوده می‌شود. به‌طور کلی اثر دورکنندگی این ترکیب در غلظت ۳۰ درصد می‌باشد. متفاوت بودن تاثیر دوزهای حشره‌کش‌ها در مطالعه‌ی خالق الزمان و همکاران (۲۰۰۲) نیز دیده شده است (۳۲). به نظر می‌رسد پایین بودن فشاربخار اجزای اصلی ترکیبات دورکننده‌ی اسانس (تیمول و کارواکرول) همان‌طور که در مطالعات مایا و موره (۲۰۱۱) دیده شده (۳۳)، با میزان دورکنندگی اسانس مرتبط باشد. بدین ترتیب تهیه‌ی ترکیب‌های کُندرهش (Slow release) برای افزایش ماندگاری اسانس با بهره‌گیری از فناوری‌های نوین نانوتکنولوژی در مطالعات بعدی ضرورت دارد.

یافته‌های زیست‌سنجی پژوهش حاضر نشان داد که دوزهای دورکنندگی ۵۰ و ۹۰ درصد کاکوتی به ترتیب ۱/۷ و ۳/٦۷ میلی‌گرم در سانتی مترمربع است و برای رسیدن به دورکنندگی ۹۰ درصد لازم است دوز دورکنندگی ۵۰ درصد دو برابر شود. در حالی که این دو شاخص برای DEET در این آنوفل به ترتیب ۰/۲ و ۲/۷ میلی‌گرم بر سانتی مترمربع است که در آن برای رسیدن به دورکنندگی ۹۰ درصد، دوز دورکنندگی ۵۰ درصد بایستی ۱۰ برابر شود.

در بررسی پیرمحمدی و همکاران (۲۰۱٦) بر مرزه‌ی باغی (*Satureja hortensis*) مقادیر ED_{50} و ED_{90} اسانس بر *آنوفل استفنسی* به ترتیب ۵/٦ و ٤۵/۷۵ میکرولیتر در سانتی‌متر مربع گزارش شده‌است. همین روند در بررسی اسانس بومادران (*Achillea vermiculata*) بر *آنوفل استفنسی* توسط همین محققین دیده شده‌است (۲۰). نتایج زیست‌سنجی پژوهش حاضر در پاسخ *آنوفل ماکولی‌پنیس* نسبت به DEET مشابه پژوهش‌های اخیر است که در آن‌ها نسبت دوز دورکنندگی ۹۰ درصد ۱۰ برابر دوز دورکنندگی ۵۰ درصد است ولی بررسی زیست‌سنجی کاکوتی با پژوهش‌های اخیر همخوانی ندارد. همان‌طور که در شکل ۱ دیده می‌شود، به نظر می‌رسد که برای شروع پاسخ دورکنندگی اسانس کاکوتی دوز آستانه‌ای لازم باشد و چنانچه مقادیر اسانس از این آستانه کمتر باشد پاسخی کسب نمی‌شود.

نتیجه‌گیری

یافته‌های بررسی حاضر نشان داد که اسانس کاکوتی همانند DEET روی *آنوفل ماکولی‌پنیس* خاصیت دورکنندگی دارد مطالعات تاثیر این اسانس بر پشه های عرصه‌ای و گونه‌های دیگر ناقل بیماری و تهیه‌ی فرمولاسیون‌های جدید با بکارگیری سینرژیست‌ها و بهره‌گیری از فناوری‌های نوین نانوتکنولوژی برای افزایش کارآیی آن در آینده ضرورت دارد. تیمول و کارواکرول اجزای اصلی اسانس کاکوتی هستند که مطالعات الکتروفیزیولوژیک آینده، می‌تواند نحوه‌ی تاثیر این ترکیبات و افزایش کارایی آن‌ها را با به کارگیری سینرژیست‌ها در سطح مولکولی مشخص کند و زمینه را برای ساخت دورکننده‌های نسل جدید فراهم سازد.

تقدیر و تشکر

این مقاله برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد با کد اخلاق ZUMS.REC.1394.254 و حمایت مالی معاونت تحقیقاتی و فناوری اطلاعات دانشگاه علوم پزشکی زنجان انجام یافته است. بدین ترتیب نویسندگان از همکاری‌های آن معاونت قدردانی می‌کنند.

References

1- Service MW (2012). *Medical Entomology for Students*,5th Ed, Cambridge Academic Press. 2012: 34-51.

2- Ghavami MB, Ladoni H. Funa and frequency of *mosquito species* in Zanjan province. *J Zanjan Univ Med Sci*. 2005; 13: 46-54. [in Persian].

3- Ghavami MB. Estimation and comparison of *Anopheles maculipennis* s.l. (Diptera: Culicidae) survival rates with light-trap and indoor resting data. *Iranian J Publ Health.* 2005; 34: 48-57.

4- World Health Organization, A global brief on vector-born diseases. 2014; 1: 30-38.

5- Patel EK, Gupta A, Oswal RJ. A review on: mosquito repellent methods. *IJPCBS*. 2012; 2: 310-17.

6- Senejouxa F, Girarda C, Kerramb P, et al. Mechanisms of vasorelaxation induced by *Ziziphora clinopodioides Lam.* (Lamiaceae) extract in rat thoracic aorta. *J Ethnopharmacol*. 2010; 132: 268-73.

7- Azadmehr A, Mosalla S, Hajiaghaee R, Shahnazi M. Immunomodulatory effects of Ziziphora tenuior L. extract on the dendritic cells. *DARU J Pharm Sci.* 2014; 22: 1-6.

8- Celik C, Tutar U, Karaman I, Hepokur C, Atas M. Evaluation of the antibiofilm and antimicrobial properties of *Ziziphora tenuior L.* Essential oil against multidrug-resistant *Acinetobacter baumanni*. *Int J Pharmacol*. 2016; 12: 28-3.

9- Abu-Darwish MS, Cabral C, Goncalves MJ, et al. *Ziziphora tenuior* L. essential oil from dana biosphere reserve (Southern Jordan); chemical characterization and assessment of biological activities. *J Ethnopharmacol*. 2016; 24: 963-70.

10- Verdian-Rivi M. Effect of the essential oil composition and biological activity of *Ziziphora clinopodiodes Lam.* on the against *Anopheles stephensi* and *Culex pipiens larva* from Iran. *Saudi J Biol Sci*. 2008: 15: 185-88.

11- Ghavami MB, Poorrastgoo F, Taghiloo B, Mohammad J. Repellency effect of essential oils of some native plants and synthetic repellents against human flea, *Pulex irritans* (Siphonaptera: Pulicidae) *J Arthropod Borne Dis.* 2017; 11: 105-15.

12- Choochote W, Chaithong U, Kamsuk K, et al. Repellent activity of selected essential oils against *Aedes aegypti*. *Fitoterapia*. 2007; 78: 359-64.

13- Kumar S, Wahab N, Warikoo R. Bioefficacy of *Mentha piperita* essential oil against dengue fever mosquito *Aedes aegypti* L. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011; 1: 85-88.

14- Moore SJ, Darling ST, Sihuincha M, Padilla N, Devine GJ. A low-cost repellent for malaria vectors in the Americas: results of two field trials in Guatemala and Peru. *Malaria J*. 2007; 6:101-6.

15- Trongtokit Y, Rrongsriyam Y, Komalamisra N Apiwathnasorn CH. Comparative repellency of 38 essential oils against mosquito bites. *Phytother Res*. 2005; 19: 303-9.

16- Ansari MA, Vasudevan P, Tandon M, Razdan RK. Larvicidal and mosquito repellent action of peppermint (*Mentha piperita*) oil. *Bioresour Technol*. 2000; 71: 267-71.

17- Nzira L, Per M, Peter F, Claus B. *Lippia*

javanica (Burm F) Spreng: its general constituents and bioactivity on mosquitoes. *Trop Biomed*. 2009; 26: 85-91.

18- Tunon H, Thorsell W, Mikiver A, Malander I. Arthropod repellency, especially tick (*Ixodes ricinus*), exerted by extract from *Artemisia abrotanum* and essential oil from flowers of *Dianthus caryophyllum*.*Fitoterapia* 2006; 77: 257-61.

19- Fradin MS, Day JF. Comparative efficacy of insect repellents against mosquito bites. *South Pacific Underwater Medicine Society (SPUMS) Journal*. 2003; 33: 103-4.

20- Pirmohammadi M, Shayeghi M, Vatandoost H, et al. Chemical composition and repellent activity of *Achillea vermiculata* and *Satureja hortensis* against *Anopheles stephensi*. *J Arthropod-Borne Dis*. 2016; 10: 201-10.

21- Sritabutra D, Soonwera M, Waltanachanobon S, Poungjai S. Evaluation of herbal essential oil as repellents against *Aedes aegypti* (L.) and *Anopheles dirus* Peyton & Harrion. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011; 1: 124-8.

22- Govindarajan M. Larvicidal and repellent properties of some essential oils against *Culex tritaeniorhynchus* Giles and *Anopheles subpictus* Grassi (Diptera: Culicidae). *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011; 4: 106-11.

23- Siriporn P, Mayura S. The effects of herbal essential oils on the oviposition-deterrent and ovicidal activities of *Aedes aegypti* (Linn.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison) and *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pac J Trop Biomed*. 2012; 29: 138-50.

24- Tavassoli M, Shayeghi M, Abai MR, et al. Repellency effects of essential oils of myrtle (*Myrtus communis*), Marigold (*Calendula officinalis*) compared with DEET against *Anopheles stephensi* on human volunteers. *Iran J Arthropod Borne Dis*. 2011; 5: 10-22.

25- Omolo MO, Okinyo D, Ndiege IO, Lwande W, Hassanali A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry*. 2004; 65: 2797-802.

26- Park BS, Choi WS, Kim JH, Kim KH. Monoterpenes from thyme (*Thymus vulgaris*) as potential mosquito repellents. *J Am Mosq Control Assoc*. 2005; 21: 80-3.

27- Rehman JU, Ali A, Khan IA. Plant based products: Use and development as repellents against mosquitoes: *Fitoterapia*. 2014; 95: 65-74.

28- Auysawasdi N, Chuntranuluck S, Phasomkusolsil S, Keeratinijakal V. Improving the effectiveness of three essential oils against *Aedes aegypti* (Linn.) and *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison). *Parasitol Res*. 2016; 115: 99-106.

29- Lutgen P. Mosquitocidal and repellent properties of plant extracts.*Malaria World*. 2015; 14: 27.

30- Popovic A, Sucur J, Orcic D, Strbac P. Effects of essential oil formulations on the adult insect *Tribolium castaneum* (Herbst) (Col: Tenebrionidae). *J Central Europe Agriculture*. 2013; 14: 181-93.

31- Pavela R, Benelli G. Ethnobotanical knowledge on botanical repellents employed in the African region against mosquito vectors. *Experimental Parasitology*. 2016; 167: 103-8.

32- Khalequzzaman M, Ara H, Zohura F, Nahar J. Toxic, repellent and attractant properties of some insecticides towards the housefly (*Musca domestica* L.). On; ine. *J Biol Sci*. 2002; 2: 672-76.

33- Maia MF, Moore S. Plant-based insect repellents: a review of their efficacy, development and testing. *Malaria J*. 2011; 10: 11-25.

Evaluation of *Ziziphora tenuior* Essential Oil Repellency Effect Against Blood Feeding of *Anopheles maculipennis* in Zanjan District

Ghavami MB[1], Khoeini S[1], Faghih Zadeh S[2]

[1]Dept. of Medical Entomology & Vector Control, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[2]Dept of. Statistics and Social Medicine, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Ghavami MB, Dept. of Medical Entomology & Vector Control, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

E-mail: Ghavami@zums.ac.ir

Received: 27 Feb 2017 **Accepted:** 8 Jul 2017

***Background and Objective*:** Anopheles maculipennis is one of the most important species of mosquito that can cause serious public health problems worldwide and applying insecticides and synthetic repellents are the current methods used for its control. The continuous application of these chemicals increases the probability of resistance, reduces insecticide efficiency and causes environmental problems. Therefore, introducing alternative substances (especially natural repellents) to control programs is necessary. The aim of this study was to compare the repellency effect of Ziziphoratenuior essential oil (EO) with DEET.

***Materials and Methods*:** *Ziziphoratenuior* was collected from Zanjan and its EO was extracted from dried leaves via a hydro-distillation process. The chief components of the essential oil were identified through the GC-mass method and serial dilutions of the essential oil and DEET were prepared. Adult *An. Maculipennis'* were collected and kept in a laboratory. Contact bioassays were conducted by 9 volunteers, through a single-blind study where their arms were impregnated with repellent solutions. Non-blood fed female mosquitoes were exposed to different doses of repellents. The effective doses of 50% (ED_{50}) and 90% (ED_{90}) and duration of repellency were determined for each repellent.

Results: Thymol, geraniol and carvacrol are the chief components of *Ziziphora* EO and form 36.2%, 11.16% and 4.9% of it, respectively. The ED50 and ED90 for this EO against *An. Maculipennis* were 1.7 and 3.67 mg/cm^2, respectively. A 30% *Ziziphora*solution prevented biting for 240 minutes. The response of *An. Maculipennis* to *Ziziphora* EO in high doses was similar to that of DEET, however, this response differed in doses lower than 1 mg/cm^2.

***Conclusion*:** *Ziziphora* essential oil 30% solution has similar repellency effect to DEET and can prevent biting of *An. Maculipennis* for 240 minutes. Synergists could be added to increase its effectiveness and electrophysiologic studies could determine the mechanism of action of thymol and carvacrol at molecular levels.

Keywords*: *Anopheles maculipennis, Ziziphora essential oil, Repellents, DEET, Ziziphoratenuoir