

A NEW FORMULATION INHIBITS EGG HATCHING AND REPELS MOSQUITO OVIPOSITION AT BREEDING SITES, CONTRIBUTING TO THE CONTROL OF DENGUE VECTOR

Phung Thi Kim Hue^{1,4*}, Le Tri Vien¹, Dau Minh Nga⁴, Nguyen Thi Thanh Nga⁴,
Than Trong Quang³, Tran Van Loc^{1,2}

¹Institute of Health Research and Educational Development in Central Highlands - 73 Le Hong Phong, Dien Hong, Pleiku city, Gia Lai, Vietnam

²Institute of Chemistry, Vietnam Academy of Science and Technology - 8 Hoang Quoc Viet, Nghia Do, Cau Giay, Hanoi, Vietnam

³Tay Nguyen University - 567 Le Duan, Ea Tam, Buon Ma Thuot city, Dak Lak, Vietnam

⁴Hung Vuong Gifted High School - 48 Hung Vuong, Dien Hong, Pleiku city, Gia Lai, Vietnam

Received 17/12/2021

Revised 25/01/2022; Accepted 04/03/2022

ABSTRACT

Anacardium occidentale is a typical plant species in tropical countries, including Vietnam. Its nut shell extracts possess biological effects, such as larviciding. Solvent extracts of the nut shell of this plant were reported to contain 62.9% anacardic acid (AA). However, AA is a liquid mixture of four compounds, differentiating by the hydrophobicity of side chains, making it water-insoluble. In this study, we aim to overcome this drawback by converting AA into a sodium salt, which exists in anionic condition, and then combine with ethanol extract of lime peel to create a new pellet product (MCA) to evaluate the ovicidal and repellent activities against *Aedes* mosquitoes at their breeding grounds. The results showed that the efficiency of yielding salt form from the AA liquid extract was 96%, which was then mixed with lime peel extract and additives at a 2 : 1 : 7 ratio to produce MCA pellets. The formulation demonstrated egg hatch inhibition upon *Ae. aegypti* (82.9%) and *Ae. albopictus* (90.6%) at 50 ppm, compared to the negative control ($P < 0.05$) and compared to azadirachtin (positive control) ($P > 0.05$). Similarly, at the same concentration, MCA exhibited 68.5% and 78.1% repellent activities toward *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* from the breeding site, respectively, which differed significantly ($P < 0.05$) compared to negative controls. The above results indicated that MCA promises an environmentally friendly new formulation with the potential to manage several dangerous disease-carrying mosquito species.

Keywords: *Anacardium occidentale*, MCA formulation, oviposition deterrence, ovicidal activity.

*Corresponding author

Email address: whitelily109@gmail.com

Phone number: (+84) 914 730 099

<https://doi.org/10.52163/yhc.v63i3.324>



MỘT CÔNG THỨC MỚI CÓ TÁC DỤNG XUA MUỖI ĐỂ TRÚNG VÀO Ổ NƯỚC VÀ ỨC CHẾ TRÚNG NỔ GÓP PHẦN KIỂM SOÁT VECTOR TRUYỀN BỆNH SỐT XUẤT HUYẾT

Phùng Thị Kim Huệ^{1,4*}, Lê Trí Viễn¹, Đậu Minh Nga⁴, Nguyễn Thị Thanh Nga⁴, Thân Trọng Quang³, Trần Văn Lộc^{2,1}

¹Viện Nghiên cứu Sức khỏe và Phát triển Giáo dục Tây Nguyên - 73 Lê Hồng Phong, P. Diên Hồng, Thành phố Pleiku, Gia Lai, Việt Nam

²Viện Hoá, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam - 8 Hoàng Quốc Việt, Nghĩa Đô, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

³Trường Đại học Tây Nguyên - 567 Lê Duẩn, Ea Tam, Thành phố Buôn Ma Thuột, Đắk Lắk, Việt Nam

⁴Trường THPT chuyên Hùng Vương - 48 Hùng Vương, P. Diên Hồng, Thành phố Pleiku, Gia Lai, Việt Nam

Ngày nhận bài: 17 tháng 12 năm 2021

Chỉnh sửa ngày: 25 tháng 01 năm 2022; Ngày duyệt đăng: 04 tháng 03 năm 2022

TÓM TẮT

Loài *Anacardium Occidentale* phổ biến ở nhiều nước trong đó có Việt Nam. Chiết xuất vỏ hạt của nó có tác dụng diệt ấu trùng của muỗi truyền bệnh, khi chiết xuất bằng dung môi cho thấy có chứa 62,9% axit anacardic (AA). Tuy nhiên, AA là hỗn hợp lỏng của bốn hợp chất bởi mức độ không bão hòa của chuỗi bên kỵ nước nên khó tan. Trong nghiên cứu này, chúng tôi khắc phục nhược điểm này bằng cách chuyển đổi AA thành trạng thái muối với natri, dễ tan trong nước và tồn tại ở dạng anion rồi cho phối hợp với chiết xuất ethanol vỏ chanh tạo công thức mới (MCA) nhằm đánh giá hoạt động diệt trứng và xua muỗi *Aedes* khỏi nơi đẻ trứng. Kết quả chỉ ra rằng từ dạng lỏng của AA sau khi tách chiết tạo nên dạng muối AA đạt hiệu suất 86%, khi phối trộn với cao vỏ chanh cùng phụ gia với tỉ lệ 2:1:7 tạo viên MCA đã ức chế được sự nở của trứng đối với *Ae. aegypti* (82,9%) và *Ae. albopictus* (90,6%) ở liều 10 ppm, so với chứng âm có $P < 0,05$ và so với chứng dương (Azadirachtin) với $P > 0,05$. Tương tự, khi ở cùng nồng độ, MCA đã thể hiện hoạt tính xua *Ae. albopictus* và *Ae. aegypti* khỏi nơi đẻ trứng lần lượt là 68.5% và 78.1% đều có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$) so với chứng âm. Kết quả trên đã thể hiện, công thức MCA hứa hẹn là một chế phẩm thân thiện với môi trường, có tiềm năng kiểm soát muỗi truyền bệnh.

Từ khoá: Công thức MCA, xua muỗi đẻ trứng, ức chế trứng nở, *Anacardium Occidentale*.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Loài *Anacardium Occidentale* (Anacardiaceae) được tìm thấy ở các vùng nhiệt đới trên toàn thế giới. Nó

phổ biến ở Brazil, Ấn Độ, Việt Nam... (Mazzetto et al., 2008). Vỏ hạt điều (VĐ) tiết ra một chất lỏng được gọi là dầu vỏ. Chất này là một nguồn tự nhiên của các hợp chất phenol góp phần chống oxy hóa (Andrade et al.,

*Tác giả liên hệ

Email address: whitelily109@gmail.com

Điện thoại: (+84) 914 730 099

<https://doi.org/10.52163/yhc.v63i3.324>

2011), diệt khuẩn (Mukhopadhyay et al., 2010), và các tác dụng không gây độc cho tế bào nhân sơ (George and R. Kuttan, 1997) và tế bào nhân thực (Rojas 2006). Chất lỏng này khi được chiết xuất bằng dung môi có 62,9% anacardic acid (AA), đây là một chất quan trọng, có mùi thơm, ức chế enzyme acetylcholinesterase, có tác dụng diệt côn trùng (Morais et al., 2017). AA là một hỗn hợp lỏng của bốn hợp chất bởi mức độ không hòa của chuỗi bên kỵ nước nên khó tan và khó ứng dụng vào công nghệ sản xuất các chế phẩm sinh học có giá trị. Với những lí do trên, chúng tôi đã khắc phục nhược điểm này bằng cách chuyển đổi AA thành trạng thái muối với natri, để tan trong nước và tồn tại ở dạng anion rồi phối hợp với chiết xuất ethanol vỏ Chanh ta (*Citrus aurantifolia*) để tạo chế phẩm tiện lợi. Chanh ta là loài thảo dược nhỏ, có chứa 70,37% Limonene (LM),... (Russo et al., 2015) ở vỏ quả non (Huang et al., 2019) hay vớt bỏ làm rác thải. LM vừa tạo mùi thơm vừa có tác dụng xua muỗi (Klimek et al., 2020).

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Vỏ hạt cây Điều (VD) và vỏ quả Chanh (VC), thu hồi hoạt chất AA chuyển đổi thành nguyên liệu thuận lợi để tạo công thức MCA.

2.2. Địa điểm và phạm vi nghiên cứu

Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam; Viện Nghiên cứu Sức khỏe và Phát triển Giáo dục Tây Nguyên.

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp tạo muối natri anacardat

AA thu hồi sau khi tách chiết (Phùng Thị Kim Huệ và CS., 2021), tiến hành tạo muối bằng cách lấy 100 g AA cho vào bình cầu dung tích 10 lít, hòa tan bằng 200 mL CH₂Cl₂ và khuấy đều bằng máy khuấy từ khoảng 15 phút; trong khi khuấy thêm 24,6 g natri hiđroxit, sau khi các phản ứng xảy ra 200 mL nước được thêm và khuấy đều, điều chỉnh độ pH đến trung tính, làm bay hơi trong chân không thu được 86 gam muối natri anacardat (hiệu suất 86%), dạng kết tinh.

Lấy 1 kg mẫu bột VC nạp vào bình cầu 20 lít, cho vào 10 lít dung môi EtOH 95%, đun ở 40°C trong 3h, lọc cất loại dung môi được cao chiết lần 1. Bã thu được cho chiết 2 lần nữa, gộp lại thu được 4,01 gam cao chiết VC chứa 0,5g limonene (Phùng Thị Kim Huệ và CS., 2021).

Sử dụng phương pháp GC-MS và HPLC định lượng AA và LM trong chiết xuất thu được. Sử dụng phương pháp cộng hưởng hạt nhân xác định phổ proton và phổ

carbon qua máy quang phổ NMR biến đổi Fourier của AVANCE III 500 MHz để nhận dạng hợp chất AA.

2.3.2. Phương pháp chế tạo công thức MCA

2.3.2. Phương pháp chế tạo công thức MCA

Công thức MCA được phối trộn từ muối AA, chiết xuất ethanol VC và phụ gia với tỉ lệ (2: 1: 7). AA thu được đem hoà tan rồi cho khuấy trộn cùng cao chiết VC đã được hoà trong ethanol vào khuấy đều, bổ sung hỗn hợp phụ gia và làm khô bằng hơi lạnh đồng thời đập nén tạo viên MCA. Dùng GC-MS để xác định lượng các hoạt chất trong công thức MCA.

2.3.3. Phương pháp đánh giá hiệu quả của công thức MCA

- Thử nghiệm khả năng xua muỗi đẻ trứng khỏi ổ nước của MCA

Bọ gậy *Ae. aegypti* và *Ae. albopictus* được thu thập từ thực địa tại huyện Chư Puh và TP. Pleiku tỉnh Gia Lai và được nuôi ở LAB trong điều kiện 28 ± 1°C (T), độ ẩm tương đối 70–75% (RH); quang chu kỳ 11 ± 0,5 giờ để thu muỗi. Đánh giá hoạt tính xua muỗi của MCA theo phương pháp của Rajkumar (Rajkumar et al., 2002) có hiệu chỉnh cho phù hợp. Muỗi cái *Ae. aegypti* và *Ae. albopictus* (10 ngày tuổi, 2 ngày sau khi cho ăn máu) được chuyển sang các lồng riêng (45 cm × 45 cm × 45 cm) làm bằng lưới chống muỗi. Trong mỗi lồng, các cốc nhựa chứa 200 mL nước được đặt ở các góc đối diện; một cốc được xử lý bằng MCA cho một nồng độ, một cốc được sử dụng để kiểm chứng dương (Azadirachtin, là một loại thuốc diệt côn trùng có nguồn gốc từ thực vật), và cốc còn lại dùng để kiểm chứng âm. Các nồng độ được sử dụng là 5 ppm, 10 ppm, 15 ppm và 20 ppm, lặp lại 3 lần. Sau 72 giờ, đếm trứng dưới kính hiển vi (Su et al., 1998) và ghi lại số lượng trứng mà muỗi đẻ ra trong mỗi cốc. Tỷ lệ muỗi đẻ trứng cho mỗi nồng độ tính theo công thức sau:

$$\text{Khả năng xua muỗi hiệu quả (ER) (\%)} = \frac{N_C - N_T}{N_C} \times 100 (\%)$$

Với N_C là số lượng trứng trong lô đối chứng và N_T là số trứng trong lô thực nghiệm.

- Thử nghiệm khả năng ức chế trứng nở thành ấu trùng của chế phẩm Mc

Hoạt động diệt trứng muỗi Aedes được nghiên cứu theo phương pháp của Elango có hiệu chỉnh (Elango et al., 2009). Một cốc đựng nước không có MCA được dùng làm kiểm soát âm. Azadirachtin được sử dụng làm đối chứng dương để so sánh với 5 lần lặp lại. Sau 120 giờ xử lý, trứng được sàng qua vải muslin, rửa kỹ, và đếm

dưới kính hiển vi để đánh giá tỷ lệ chết với công thức như sau:

$$\text{Hoạt tính ức chế trứng nở (EC)} = \frac{\text{Số lượng trứng chưa nở}}{\text{Tổng số trứng được đưa vào}} \times 100 (\%)$$

2.4. Phân tích thống kê

Các số liệu được phân tích, xử lý qua phần mềm Excel

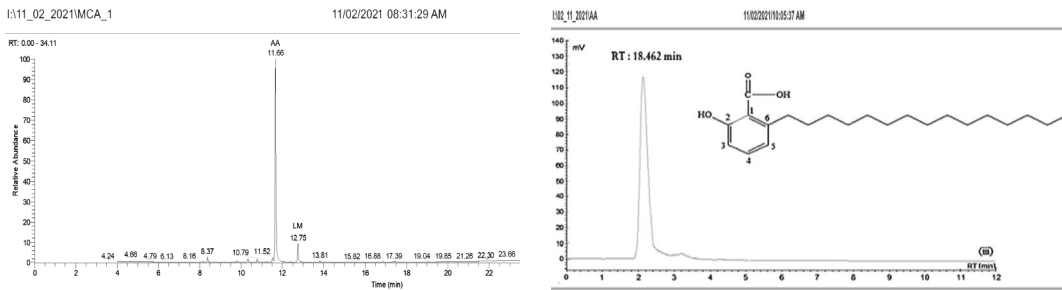
2010. Kiểm định bằng test thống kê.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

3.1. Công thức MCA

Phối trộn AA, chiết xuất VC và phụ gia với tỉ lệ 2: 1: 7 thu được công thức MCA có dạng bột nén thành viên có trọng lượng 500 mg.

Hình 3.1. Sắc kí đồ GC-MS công thức MCA (trái); Phân tích sắc kí anacardic acid trong MCA (phải)



Phân tích sắc kí đồ GS-MS và HPLC (Hình 3.1) các hoạt chất trong MCA xác định thấy có 20.15% AA và 0.86% LM (Bảng 3.1).

Bảng 3.1. Tỉ lệ các hoạt chất AA và LM có chứa trong MCA

STT	Thành phần hoạt chất	Tỉ lệ	Kết quả
1	Anacardic acid	%	20,15
2	Limonene	%	0,86

Khi ở trạng thái muối với natri, thì tan trong nước và tồn tại ở dạng anion. Nghiên cứu trước đây (Phùng Thị Kim Huệ và CS., 2021) đã tạo chế phẩm HKM chứa AA và LM đã cho hiệu lực diệt bọ gậy với IC₅₀ = 68 ppm nhưng phải dùng dung môi là ethanol để hoà tan nên sản phẩm ở dạng lỏng, trong nghiên cứu này, AA được kết tinh dưới dạng muối Na nên dễ tạo sản phẩm và thuận lợi hơn khi sử dụng.

3.2. Hiệu quả kiểm soát muỗi Aedes của công thức MCA

3.2.1. Khả năng ngăn chặn muỗi Aedes đẻ trứng vào ổ nước của công thức MCA

MCA có hoạt tính ngăn chặn sự sinh sản ở các nồng độ được thử nghiệm chống lại con cái loài *Ae. albopictus* và *Ae. aegypti* (Bảng 3.1). So với đối chứng âm, ở nồng độ 20 ppm, MCA đã tác động đến 2 loài *Ae. albopictus* và *Ae. aegypti* trong thí nghiệm này là cao nhất, đối với loài *Ae. aegypti* ghi nhận là 78.9 % và loài *Ae. albopictus* là 88.0% (p<0.05).

Bảng 3.2. % hoạt tính ngăn chặn sự sinh sản mẫu tác động chống lại muỗi cái trưởng thành *Ae. Aegypti*

Mẫu	2.5ppm	5ppm	10ppm	20ppm
MCA	39.9 ± 2.79	44.6* ± 2.61	66.4* ± 1.45	78.9**± 1.62
Đối chứng âm	2.67 ± 2.14	2.81 ± 1.48	4.80 ± 1.87	4.65 ± 1.85
Cao vỏ chanh	6.59 ± 2.42	26.7 ± 2.45	50.5* ± 1.39	66.9* ± 1.70
Anacardic acid	3.99 ± 2.10	4.81 ± 1.32	9.80 ± 1.55	9.80 ± 1.45
Azadirachtin	59.7*± 1.18	59.9* ± 1.12	73.6* ± 4.65	80.5**± 1.49

± độ lệch chuẩn (SD) của năm lần lặp lại; ppm = phần triệu * mức ý nghĩa thống kê, $p \leq 0,05$; ** mức ý nghĩa thống kê, $p \leq 0,01$.

Azadirachtin (20ppm) cho hoạt tính xua đuổi 2 loài muỗi trên là 80.5 % (*Ae. aegypti*) và 78.7% (*Ae. albopictus*) không thể hiện sự khác biệt thống kê so với MCA ở cùng nồng độ.

Bảng 3.3. % hoạt tính ngăn chặn sự sinh sản mẫu tác động chống lại muỗi cái trưởng thành *Ae.albopictus*

Mẫu	2.5ppm	5ppm	10ppm	20ppm
MCA	52.8 ± 5.2	59.6* ± 2.9	71.6* ± 1.48	88.0** ± 1.34
Đối chứng âm	3.06 ± 2.3	0.87 ± 1.51	0.86 ± 1.78	0.78 ± 1.09
Cao vỏ chanh	19.0 ± 2.8	39.2* ± 2.3	62.9* ± 3.45	75.6* ± 1.39
Anacardic acid	4.98 ± 2.3	4.90 ± 2.2	9.80 ± 3.74	8.90 ± 1.25
Azadirachtin	30.3* ± 2.2	51.6* ± 1.3	73.6* ± 4.50	78.7* ± 1.95

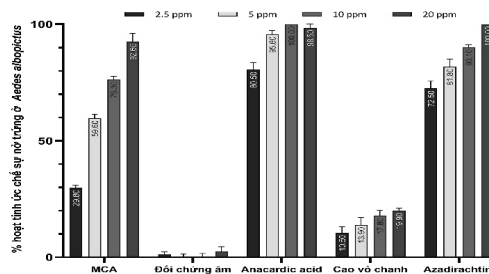
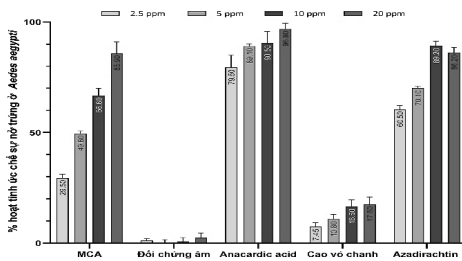
± độ lệch chuẩn (SD) của năm lần lặp lại; ppm = phần triệu * mức ý nghĩa thống kê, $p \leq 0,05$; ** mức ý nghĩa thống kê $p \leq 0,01$.

Bảng 3.3 cho thấy AA lại biểu hiện hoạt tính ít nhất ở tất cả các nồng độ.

3.2.2. Khả năng ức chế trứng nở thành ấu trùng của công thức MCA

Ở nồng độ 5 ppm (Hình 3.2), đối chứng dương Azadirachtin ghi nhận hoạt tính ức chế sự nở của trứng lần lượt là 70.1% và 81.8 % đối với *Ae. aegypti* và *Ae.albopictus*.

Hình 3.2. Hoạt tính ức chế trứng nở của muỗi *Ae. Aegypti* và *Ae.albopictus* ở các mẫu và các nồng độ khác nhau



± độ lệch chuẩn (SD) của năm lần lặp lại; ppm = phần triệu * mức ý nghĩa thống kê, $p \leq 0,05$; ** mức ý nghĩa thống kê, $p \leq 0,01$.

Để làm rõ điều này, chúng tôi cho tác động tăng dần gấp đôi đến liều 20 ppm (Hình 3.2), AA thu được chỉ tiêu này đạt đến 100% với cả 2 loài muỗi trên, trong khi MCA cũng đã tăng hiệu lực ức chế trứng nở đến mức cao là 85.9% (*Ae. aegypti*) và 92.6 % (*Ae.albopictus*); trong khi cao vỏ chanh hoạt tính này chỉ là 17.6 % (*Ae. Aegypti*) và 19.9 % (*Ae.albopictus*). Trong khi đó, hoạt tính ức chế sự nở trứng của AA đối với *Ae. aegypti* (96,9%) và *Ae.albopictus* (98,5%). Như vậy, hoạt tính diệt trứng muỗi là nhờ hoạt chất AA có trong MCA.

Phối trộn AA, chiết xuất VC và phụ gia với tỉ lệ 2: 1: 7 thu được công thức MCA có dạng bột nén thành viên có trọng lượng 500 mg.

Azadirachtin là loại thuốc diệt côn trùng có nguồn gốc thực vật tốt nhất trên thế giới (Aribi et al., 2020) được xem là đối chứng dương trong nghiên cứu này. Qua đó cho thấy, MCA có hoạt tính ngăn chặn sự đẻ trứng đối với 2 loài vector truyền virus SXH có hiệu lực không kém so với Azadirachtin. Trong nghiên cứu trước đây, tác giả đã chỉ ra chiết xuất ethanol VC có tác dụng xua *Ae. aegypti* (Phùng Thị Kim Huệ và CS., 2021). Zarrad báo cáo rằng, LC_{50} của LM ở côn trùng là 10,65 ppm (Zarrad et al., 2017). Như vậy, tác dụng xua muỗi khỏi nơi mà chúng đến đẻ trứng có thể là do LM?.

AA lại biểu hiện hoạt tính ức chế ở tất cả các nồng độ

4. BÀN LUẬN



(Bảng 3.2). Điều đó thể hiện rằng, hoạt tính ngăn chặn muỗi sinh sản vào ổ nước của **MCA** đối với 2 loài muỗi *Aedes* là nhờ vào LM. Đã có nhiều công bố phù hợp với nghiên cứu này, LM chiết từ vỏ Cam là chất tạo mùi thơm (Xiao et al, 2017), có tác dụng xua muỗi (Klimek et al., 2020); vừa có tác dụng xua đuổi và diệt côn trùng (Mursiti et al., 2019), tác dụng xua tăng lên khi tăng nồng độ và thời gian tiếp xúc (Hebeish et al., 2008), vì chúng là chất dễ bay hơi, chỉ thị mùi liên kết với protein thụ thể nằm trên các sợi lông của tế bào thần kinh thụ cảm mùi chuyên biệt ở muỗi khi tiếp xúc với môi trường bên ngoài giúp nó lảng tránh nơi có mùi (Ditzen et al., 2008) là ổ nước có xử lí **MCA**. Tuy nhiên, Alves lại chỉ ra rằng, chiết xuất cây Điều cho chỉ số hấp dẫn trứng rụng là -0,1 thể hiện có sự chống lại *Ae. aegypti* đến đẻ trứng vào ổ nước (Alves et al., 2018). Song, rõ ràng rằng **MCA** đã làm tăng hoạt tính xua muỗi ở cả 2 loài *Ae. aegypti* và *Ae. albopictus* so với cao chiết VC. Như vậy, có thể có sự phối hợp giữa AA và LM trong **MCA** đã tạo nên tác dụng hợp đồng đối với khả năng ngăn chặn sự sinh sản muỗi *Aedes*. Điều này cần làm rõ ở những nghiên cứu trong tương lai. Farias cho rằng muối Na của AA chống lại sự nở của trứng *Ae. aegypti* với $EC_{50} = 162,93 \pm 29,93$ mg/ml. Fang báo cáo rằng ức chế enzyme tyrosinase mã hoá con đường melanization liên quan đến quá trình làm cứng vỏ trứng.

5. KẾT LUẬN

Công thức **MCA** chứa 20,15% AA (được chiết từ vỏ hạt Điều) và 0,86% LM (chiết xuất vỏ Chanh) có dạng viên 500 mg. Công thức này đã thể hiện khả năng ức chế được 82,9% số trứng đối với *Ae. aegypti* và 90,6% số trứng của *Ae. albopictus* ở liều 10 ppm, so với chứng âm có $P < 0,05$ và so với chứng dương (Azadirachtin) với $P > 0,05$. Tương tự, khi ở cùng nồng độ, **MCA** đã thể hiện hoạt tính xua *Ae. albopictus* và *Ae. aegypti* khỏi nơi đẻ từng lần lượt là 68.5 % và 78.1%, có ý nghĩa thống kê ($P < 0.05$) so với chứng âm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Mukhopadhyay AK, Hati AK, Tamizharasu W et al., “Larvicidal properties of cashew nut shell liquid (*Anacardium occidentale* L) on immature stages of two mosquito species,” *Journal of Vector Borne Diseases*, 2010, 47(4): 257–260.
- [2] Fang J, Han Q, Johnson JK et al., Functional expression and characterization of *Aedes aegypti* dopachrome conversion enzyme. *Biochemical and biophysical research communications*, 2002, 290(1): 287-293.
- [3] Farias DF, Cavalheiro MG, Viana SM et al., Insecticidal action of sodium anacardate from Brazilian cashew nut shell liquid against *Aedes aegypti*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2009, 25(3): 386-389.
- [4] Acevedo HR, Rojas MD, Arceo SDB et al., “Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood,” *Mutation Research—Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 2006, 609(1), 43–46.
- [5] Klimek-Szczykutowicz M, Szopa A, Ekiert H, Citrus limon (Lemon) phenomenon—a review of the chemistry, pharmacological properties, applications in the modern pharmaceutical, food, and cosmetics industries, and biotechnological studies. *Plants*, 2020, 9(1): 119
- [6] Morais SM, Facundo VA, Bertini LM et al., Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2017, 35: 670-675.
- [7] Hue PTK, Evaluating on larvicidal effectiveness of HKM formulation against aedes mosquito transmitting dengue fever and zika (extracts of cashew nut shell and lemon peel). *Journal of Malaria and Parasite Diseases Control*, 2021, 4(121): 189–200.
- [8] Hue PTK, Optimizing citrus limon peel extraction process and evaluating repellent activity of the extract as against *Aedes aegypti*. *Journal of Biotechnology*, 2021, 19 (5): 688-695, ISSN 1811- 4989.
- [9] Mazzetto SE, Lomonaco D, Mele G, “Cashew nut oil: opportunities and challenges in the context of sustainable industrial development,” *Quimica Nova*, 2009, 32(3): 732–741.
- [10] Andrade TDAD, Araújo BQ, Citó AMDL et al., “Antioxidant properties and chemical composition of technical Cashew Nut Shell Liquid (tCNSL),” *Food Chemistry*, 2011, 126(3): 1044–1048.