

Effet Répulsif de Faibles Concentrations de l'Huile Essentielle de *Clausena anisata* (Rutaceae) contre les Moustiques (Diptera : Culicidae) au Bénin (Afrique de l'Ouest)

Ayaba Z. Abagli

Lydia Hangnilo

Thiery B. C. Alavo

Laboratoire d'Entomologie Appliquée / Centre Edward Platzer,
Université d'Abomey-Calavi, Godomey, Bénin

Doi: [10.19044/esipreprint.1.2023.p130](https://doi.org/10.19044/esipreprint.1.2023.p130)

Approved: 09 January 2023

Posted: 11 January 2023

Copyright 2023 Author(s)

Under Creative Commons BY-NC-ND

4.0 OPEN ACCESS

Cite As:

Abagli A.Z., Hangnilo L. & Alavo T.B.C. (2023). *Effet Répulsif de Faibles Concentrations de l'Huile Essentielle de Clausena anisata (Rutaceae) contre les Moustiques (Diptera : Culicidae) au Bénin (Afrique de l'Ouest)*. ESI Preprints.

<https://doi.org/10.19044/esipreprint.1.2023.p130>

Résumé

La présente étude a évalué l'effet répulsif de faibles concentrations de l'huile essentielle de *Clausena anisata* contre le moustique *Culex quinquefasciatus* aussitôt après application au laboratoire afin de déterminer la concentration optimale à utiliser pour la mise au point d'un répulsif. L'huile essentielle est extraite des feuilles séchées de *C. anisata* en utilisant la technique de distillation par la vapeur. L'huile essentielle est dissoute dans de l'isopropanol et les concentrations suivantes ont été testées: 0,25%; 0,50%; 0,75%; 1%; 1,25% et 1,50%. La solution ayant la concentration de l'huile essentielle à tester est appliquée sur l'avant-bras des volontaires ayant donné leur consentement éclairé. Immédiatement après application, l'avant-bras traité est placé dans une cage contenant 25 femelles de moustiques *Cx. quinquefasciatus* élevés au laboratoire. Le nombre de moustiques qui viennent se poser sur l'avant-bras traité est compté sur une durée de 15 minutes et le nombre de moustiques effectivement gorgés de sang est déterminé. Les résultats ont montré que le taux de répulsion augmente au fur et à mesure que la concentration de l'huile essentielle augmente. Ce taux de répulsion est de 64,91%; 75% et 84,21% respectivement pour les concentrations de 0,25%; 0,50% et 0,75%. Les concentrations de 1%; 1,25%

et 1,50% ont repoussé 100% des moustiques. Le pourcentage de moustiques gorgés de sang sur l'avant-bras des volontaires traités est de 5,74 ; 1,64 et 1,22 respectivement pour les concentrations de 0,25% ; 0,50% et 0,75% de l'huile essentielle. Pour les concentrations de 1 % ; 1,25% et 1,50% le pourcentage de moustiques gorgés est de 0 %. Sur la base de ces résultats, nous pouvons conclure que les faibles concentrations de l'huile essentielle de *C. anisata* ont un effet répulsif contre les moustiques. Nous suggérons donc l'évaluation de la persistance dans le temps de l'effet répulsif de différentes concentrations de cette huile contre les moustiques.

Mots-clés : Moustiques, *Clausena anisata*, Huiles essentielles, Répulsifs, Lutte anti-vectorielle

Repellent Effect of Low Concentrations of Essential Oil of *Clausena anisata* (Rutaceae) against Mosquitoes (Diptera: Culicidae)

Ayaba Z. Abagli

Lydia Hangnilo

Thiery B. C. Alavo

Laboratoire d'Entomologie Appliquée / Centre Edward Platzer,
Université d'Abomey-Calavi, Godomey, Bénin

Abstract

The present study evaluated the repellent effect of low concentrations of *Clausena anisata* essential oil against *Culex quinquefasciatus* immediately after application in the laboratory in order to determine the optimal concentration to use for the development of a repellent. The essential oil has been extracted from dried leaves of *C. anisata* using the steam distillation technique. The essential oil was dissolved in isopropanol and following oil concentrations were tested: 0,25%; 0,50%; 0,75%; 1%; 1,25% and 1,50%. A known concentration of the essential oil was applied to the forearm of a consenting volunteer. Immediately after application, treated forearm is placed in the cage containing 25 female laboratory reared *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes. The numbers of mosquitoes landing and biting on the forearm during a 15-min period post-application was recorded. Results showed that the repellency rates increased with increasing essential oil concentration. The repellency rate was 64,91%; 75% and 84,21% respectively for 0,25%; 0,50% and 0,75% essential oil concentration. Concentrations of 1% ; 1,25% and 1,50% repelled 100% mosquitoes. The

percentage of mosquitoes taking blood on the volunteers forearm was 5,74; 1,64 and 1,22 respectively for 0,25%; 0,50% and 0,75% of *C. anisata* essential oil. This percentage of mosquitoes taking blood was 0% for concentrations of 1%; 1,25% and 1,50%. Based on these results, we can conclude that low concentrations of *C. anisata* essential oil have a repellent effect against mosquitoes. For investigations further, we suggest in order to assess the persistence of the repellent effect of different concentrations of this essential oil against mosquitoes.

Keywords: Mosquitoes, *Clausena anisata*, Essential oils, Repellents, Mosquito control

Introduction

Les moustiques sont vecteurs de nombreuses maladies comme le paludisme, la filariose, le chikungunya, la dengue, la fièvre jaune, la maladie à virus du Nil occidental et celle à virus Zika (Marimuthu et al. 2016).

Afin de protéger les hommes contre les piqûres de ces moustiques, des répulsifs chimiques de synthèse ont été élaborés. Parmi ces répulsifs chimiques figure le DEET (N,Ndiethyl-m-toluamide). Le DEET est un répulsif à large spectre, efficace et persistant sur la peau (Nerio et al. 2010). Cependant, des études ont montré que ce produit peut entraîner des risques pour l'environnement et pour la santé humaine en particulier pour les femmes enceintes et les enfants (Abagli et Alavo, 2011; Nerio et al. 2010). De plus, le DEET coûte cher et n'est pas abordable pour les populations africaines. Face à tous ces problèmes, il est indispensable d'adopter une méthode de gestion intégrée des moustiques vecteurs de maladies et de rechercher activement des répulsifs anti-moustiques moins coûteux et respectueux de l'environnement.

Actuellement, dans le monde entier, des extraits de plusieurs dizaines de plantes appartenant à plusieurs familles (Rutaceae, Lamiaceae, Meliaceae, Asteraceae, Annonaceae, Malvaceae et Labiatae) sont utilisés comme des insecticides botaniques (Dwijendra, 2014). Parmi ces plantes, figure *Clausena anisata* (Wild) Hook.

De plus, des études ethnobotaniques réalisées en Afrique du Sud, en Éthiopie et au Nigéria sur des plantes traditionnellement utilisées contre les moustiques ont montré que les populations locales utilisent *C. anisata* pour chasser les moustiques (Mavundza et al. 2011; Karunamoorthi et Husen, 2012; Okunade et Olaifa, 1987). Mukandiwa et al. (2016) ont prouvé que les extraits de *C. anisata* ont un effet répulsif sur les adultes de moustique *Aedes aegypti*.

La présente étude a évalué l'effet répulsif de faibles concentrations de l'huile essentielle de *C. anisata* contre le moustique *Culex quinquefasciatus* aussitôt après application au laboratoire pour la mise au point d'un répulsif.

Matériel et Méthodes

Extraction de l'huile essentielle :

Les feuilles de *C. anisata* récoltées dans les régions d'Abomey-Calavi et de Niaouli sont séchées à l'ombre pendant trois jours avant l'extraction de l'huile essentielle. L'extraction de l'huile essentielle est faite par la technique d'entraînement par la vapeur et le dispositif utilisé est un distillateur de type Clevenger.

Elevage des moustiques :

Le moustique *Culex quinquefasciatus* a été utilisé pour les tests. Ces moustiques sont élevés au laboratoire d'entomologie appliquée de l'Université d'Abomey-Calavi (Bénin). Pour l'élevage, les œufs de ces moustiques ont été introduits dans des bacs rectangulaires en plastique de 10L de volume, contenant un volume de 3L d'eau. Les œufs ont été répartis à raison de 15 radeaux par bac. Ces bacs ont été installés dans une salle aérée à température ambiante. Les larves issues des œufs sont nourries trois fois par semaine avec de la provende de poisson T-Catfish Finisher-flot 7. Cette provende est d'abord écrasée puis mélangée avec de l'eau (25 g de provende écrasée pour 1L d'eau). Ce mélange est ensuite versé dans l'eau contenant les larves, ceci en tenant compte de la densité larvaire. Ces bacs sont recouverts de voile de moustiquaire pour empêcher d'autres espèces de moustiques de venir pondre dans l'eau. Les imagos qui émergent de ces larves sont recueillis directement dans des cages couvertes de voile de moustiquaire. Les cages contenant les adultes sont installées dans l'insectarium où la température est réglée à 28°C. Les moustiques adultes sont nourris avec de l'eau sucrée à la concentration de 10%. Les moustiques qui n'ont pas été utilisés pour les tests sont gorgés une fois par semaine. Le repas sanguin est fourni par la volaille (coq, poule).

Tests de répulsion de différentes concentrations de l'huile essentielle de C. anisata

Préparation des solutions

L'huile essentielle est dissoute dans le solvant (isopropanol pur à 99,8%). La préparation de la solution est faite avant le démarrage des tests. La solution est conservée dans des bouteilles sombres hermétiquement fermées et gardées au réfrigérateur. Pour la préparation de la solution à la concentration de 0,25% par exemple, l'huile essentielle pure est dissoute dans le solvant à raison de 0,25 ml d'huile pour 99,75 ml d'isopropanol.

Procédure des tests de répulsion au laboratoire

Les moustiques utilisés pour les tests de répulsion sont âgés d'au moins huit jours. Pour la réalisation des tests, les moustiques sont triés par lot de 25 femelles à l'aide d'un aspirateur à bouche dans les cages couvertes de voile de moustiquaire. Afin de les affamer, ces moustiques sont privés du jus sucré dix heures de temps avant le démarrage des tests.

La solution de l'huile essentielle de *C. anisata* est appliquée directement sur avant-bras humain. Des volontaires (âgés entre 20 et 30 ans) ayant donné leur consentement éclairé ont été utilisés. Un avant-bras de chaque volontaire est traité avec la solution de l'huile essentielle à l'aide de coton hydrophile imbibé de 3 ml de la solution. L'avant-bras traité est introduit dans une cage contenant un lot de 25 femelles. Les tests de répulsion démarrent à 19 heures, heure à laquelle les moustiques *Cx. quinquefasciatus* deviennent actifs.

Durant les 15 premières minutes qui suivent le traitement, le nombre de moustiques qui viennent se poser sur l'avant-bras traité est recensé. Après le test, les moustiques sont aspirés à l'aide d'un aspirateur à bouche dans un gobelet couvert de voile de moustiquaire. Ce gobelet est mis au congélateur afin de tuer les moustiques. Ces moustiques tués sont observés à la loupe binoculaire pour déterminer le nombre de femelles effectivement gorgées de sang.

Avant de tester l'effet des différentes concentrations, nous avons d'abord testé l'effet répulsif du solvant sur les moustiques. Pour le faire, le comportement des moustiques par rapport à l'avant-bras traité avec le solvant (isopropanol pur) a été comparé au comportement des moustiques par rapport à l'avant-bras nu (non traité). Ensuite, les variantes suivantes ont été testées : 0% (isopropanol pur à 99,8%), 0.25%, 0.50%, 0.75%, 1%, 1.25%, 1.50% de l'huile essentielle.

Pour chaque variante, 10 répétitions ont été effectuées à raison d'un volontaire par répétition afin d'éviter que la différence d'attractivité des moustiques par les volontaires n'influe sur les résultats.

Analyses statistiques

Le test de corrélation de Pearson a été réalisé pour déterminer s'il y a une corrélation entre la concentration de l'huile essentielle et le nombre de poses d'une part et d'autre part entre la concentration de l'huile essentielle et le nombre de gorgés. Le Progiciel de statistiques SPSS 16.0 a été utilisé pour réaliser ces tests.

Le pourcentage de répulsion pour chaque variante de concentration testée au laboratoire a été également calculé en utilisant la formule suivante (Sharma et Ansari, 1994) :

$$\text{Pourcentage de répulsion} = (N_{\text{témoin}} - N_{\text{exp}} / N_{\text{témoin}}) \times 100$$

$N_{\text{témoin}}$ est le nombre de moustiques collectés sur les volontaires servant de témoins

N_{exp} est le nombre de moustiques collecté sur les volontaires traités.

Les différents graphes qui traduisent les résultats obtenus ont été réalisés à l'aide du logiciel Excel.

Résultats

Effet du solvant sur l'activité du moustique Cx. quinquefasciatus

Les figures 1a et b montrent que l'activité des moustiques *Cx. quinquefasciatus* sur l'avant-bras nu et l'avant-bras traité avec le solvant (isopropanol) est pratiquement similaire. Le pourcentage de moustiques posés est de 18 et 12 respectivement sur l'avant-bras nu et l'avant-bras traité avec le solvant (Figure 1a). Le pourcentage de moustiques gorgés de sang est de 3,26 et 3,61 respectivement sur l'avant-bras nu et l'avant-bras traité avec le solvant (Figure 1b). Ces résultats montrent que le solvant (Isopropanol pur) n'a donc aucun effet sur l'activité du moustique *Cx. quinquefasciatus*.

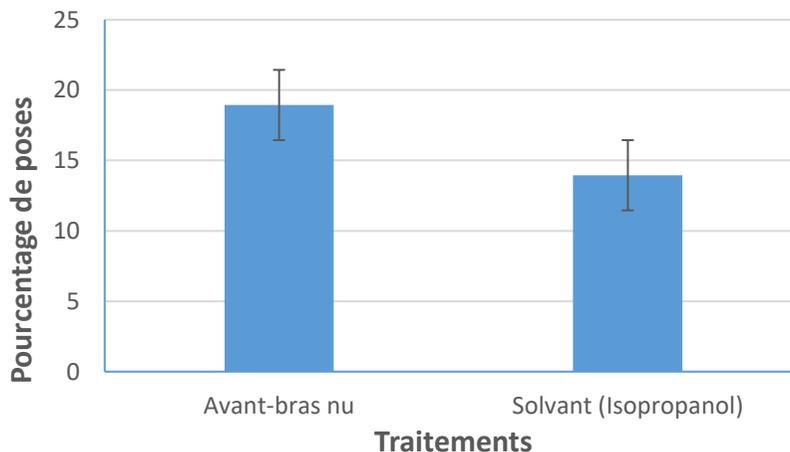


Figure 1a. Effet du solvant (isopropanol) sur l'activité des moustiques : Pourcentage de de moustiques posés sur l'avant-bras

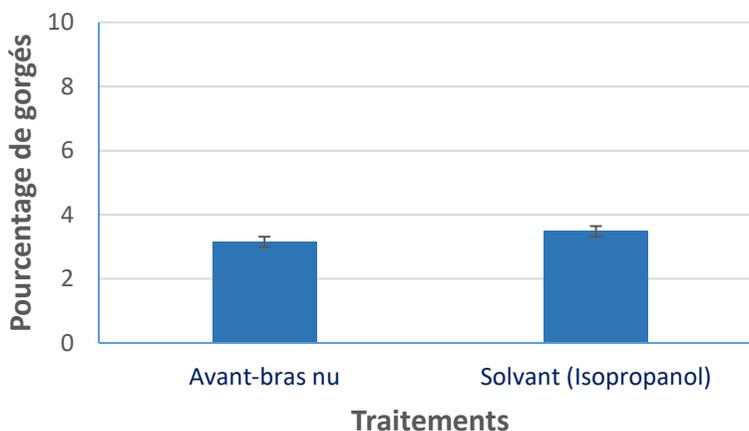


Figure 1b. Effet du solvant (isopropanol) sur l'activité des moustiques : Pourcentage de moustiques gorgés de sang

Effet de l'huile essentielle de *C. anisata* sur les moustiques immédiatement après application

Le pourcentage de moustiques posés sur l'avant-bras des volontaires traités est de 21,63 ; 8,23 ; 2,46 et 3,67 respectivement pour les concentrations de 0% (solvant) ; 0,25% ; 0,50% et 0,75% de l'huile essentielle. Ce pourcentage est de 0% pour les concentrations de 1% ; 1,25% ; et 1,50% (Figure 2a). Ainsi, le taux de répulsion est de 64,91% ; 75% et 84,21% respectivement pour les concentrations de 0,25% ; 0,50% et 0,75% de l'huile essentielle. Quant aux concentrations de 1% ; 1,25% et 1,50%, le taux de répulsion est de 100%.

L'analyse statistique des données a révélé qu'il existe une corrélation négative ($r = -0,589$) entre la concentration de l'huile essentielle et le nombre de poses de moustiques. Ce qui signifie que le nombre de poses de moustiques diminue au fur et à mesure que la concentration de l'huile essentielle de *C. anisata* augmente.

Le pourcentage de moustiques gorgés de sang sur l'avant-bras des volontaires traités est de 10,17 ; 5,74 ; 1,64 et 1,22 respectivement pour les concentrations de 0% ; 0,25% ; 0,50% et 0,75% de l'huile essentielle. Ce pourcentage de moustiques gorgés est de 0% pour les concentrations de 1% ; 1,25% et 1,50% (Figure 2b).

L'analyse statistique des données a révélé qu'il existe une corrélation négative ($r = -0,510$) entre la concentration de l'huile essentielle et le nombre de moustiques gorgés de sang. Ce qui indique que le nombre de moustiques gorgés diminue au fur et à mesure que la concentration de l'huile essentielle de *C. anisata* augmente.

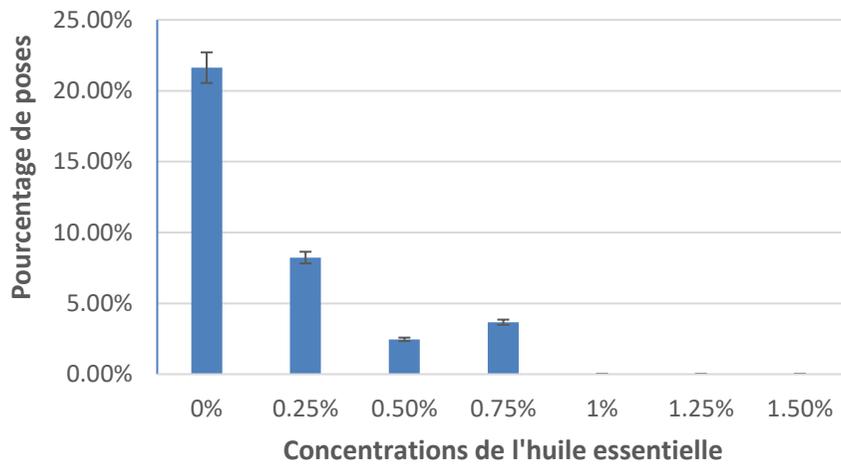


Figure 2a. Effet de différentes concentrations de l'huile essentielle *C. anisata* sur l'activité des moustiques : Pourcentage de poses de moustiques sur l'avant-bras

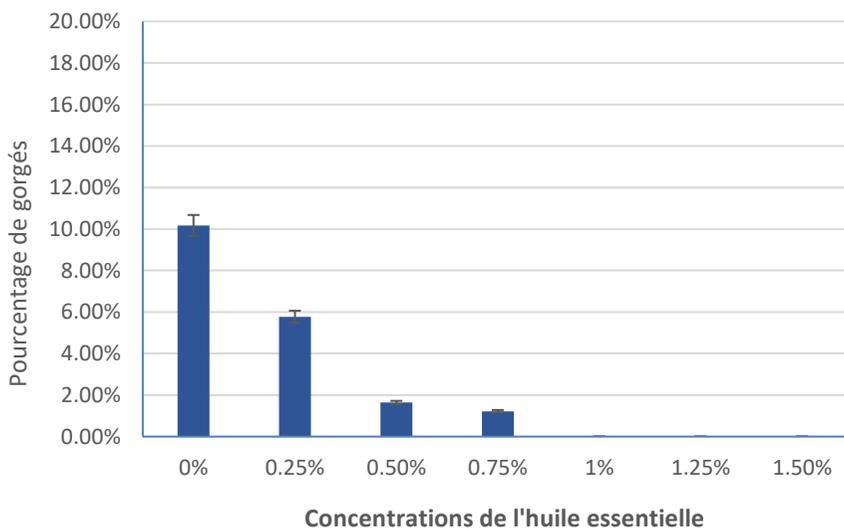


Figure 2b. Effet de différentes concentrations de l'huile essentielle *C. anisata* sur l'activité des moustiques : Pourcentage de moustiques gorgés de sang

Discussion

Avant le début de cette étude, très peu de travaux de recherches ont été consacrés à l'étude de l'effet répulsif de l'huile essentielle de *C. anisata* contre les moustiques. En effet, Khamala, (2004) a prouvé que l'huile essentielle de *C. anisata* a un effet répulsif contre le moustique *An. gambiae* s.s. et Mukandiwa et al. (2016) quant à eux ont testé l'effet répulsif de l'extrait brut d'acétone de *C. anisata* contre les adultes du moustique *Ae*

aegypti et ont conclu que *C. anisata* a un effet répulsif sur ces moustiques. Les résultats de ces chercheurs ne permettent pas de connaître la concentration optimale à utiliser pour la formulation d'un répulsif fait à base de cette huile. En évaluant de façon successive l'effet répulsif de faibles concentrations de l'huile essentielle de *C. anisata* aussitôt après application, la présente étude a permis de déterminer la concentration optimale de l'huile essentielle à utiliser pour une protection maximale contre les moustiques.

Les résultats de cette étude montrent que le pourcentage de moustiques posés et le pourcentage de moustiques gorgés de sang sur l'avant-bras des volontaires traités diminuent au fur et à mesure que la concentration de l'huile essentielle augmente. Pour la concentration de 0,25% de l'huile essentielle, le pourcentage de moustiques posés est de 8,23% et le pourcentage de moustiques gorgés est de 5,74% tandis que pour la concentration de 1%, aucune pose de moustique n'a été enregistrée et aucun moustique ne s'est gorgé de sang soient 0% de pose et 0% de gorgé. La concentration de 1% de l'huile essentielle de *C. anisata* ayant donc permis de chasser 100% des moustiques pendant les 15 premières minutes qui suivent son application et étant donné que, le taux d'élimination des moustiques est de l'ordre de 97% pour les produits chimiques de synthèse reconnus comme efficaces (Balkew et al. 2006), cette concentration de 1% de l'huile essentielle peut alors être considérée comme la concentration optimale à utiliser pour la mise au point d'un répulsif.

Par ailleurs, l'analyse des résultats obtenus permet d'affirmer que l'effet répulsif de l'huile essentielle de *C. anisata* à faibles concentrations est meilleur à l'effet répulsif de l'huile essentielle de *Hyptis suaveolens* à des concentrations élevées. En effet, Abagli et al. (2012) ont testé l'effet répulsif immédiatement après application de différentes concentrations de l'huile essentielle de *H. suaveolens* et ont conclu que le pourcentage de moustiques posés pour les concentrations de 1% et 6% est respectivement de 42 et 2. Pour ces mêmes auteurs, le pourcentage de moustiques gorgés de sang est de 22 et 3 respectivement pour les concentrations de 1% et 6%. En comparant les résultats de ces chercheurs aux résultats obtenus au cours du présent travail, nous pouvons conclure que pour la protection contre les piqûres de moustiques, la faible concentration de 0,25% de l'huile essentielle de *C. anisata* protège plus que la concentration de 1% de l'huile essentielle de *H. suaveolens*. De même, la concentration de 1% de l'huile essentielle de *C. anisata* protège plus que la concentration de 6% de l'huile essentielle de *H. suaveolens*. De plus, la concentration optimale de l'huile essentielle de *H. suaveolens* est de 6% avec un taux de répulsion d'environ 97% (Abagli et Alavo, 2020 et Abagli et al. 2012) et celle de l'huile essentielle de *C. anisata* est de 1% avec un taux de répulsion de 100%. On en déduit alors que pour

une protection optimale, la quantité de l'huile essentielle de *H. suaveolens* à utiliser est 6 fois supérieure à la quantité de l'huile essentielle de *C. anisata*. Sachant que, le rendement en huile essentielle est d'environ 0,23% pour les feuilles de *H. suaveolens* (Adjou et Soumanou 2013) et de 0,14% pour les feuilles de *C. anisata* (Avlessi et al. 2004), la quantité de l'huile obtenue après extraction à partir des feuilles de ces plantes est donc faible. Par conséquent, pour mettre au point un répulsif fait à base d'une huile essentielle, il serait important de privilégier l'huile qui offre une meilleure protection à une faible concentration. L'huile essentielle de *C. anisata* serait donc la mieux adaptée pour la formulation d'un tel répulsif qui nécessitera une petite quantité d'huile. Ce répulsif sera alors moins coûteux et son prix sera à la portée des populations qui en ont besoin pour se protéger contre les piqures de moustiques.

Notons qu'en Afrique subsaharienne, les moustiquaires imprégnées d'insecticide chimique sont recommandées dans la lutte contre les moustiques vecteurs de maladies. Néanmoins ces moustiquaires ne suffisent pas pour lutter contre ces vecteurs (Abagli et al. 2012), surtout dans les conditions d'Afrique de l'ouest où l'urbanisation anarchique ou mal planifiée permet la prolifération des moustiques (Alavo et al. 2010). En réalité, les populations humaines, avant d'aller se coucher sous les moustiquaires imprégnées, se font piquées par les moustiques qui leur transmettent la maladie. Pour mieux réussir la lutte contre les vecteurs de maladies et réduire considérablement la prévalence du paludisme et autres maladies vectorielles il est alors nécessaire d'opter pour la gestion intégrée de ces moustiques vecteurs de maladies comme l'ont recommandé Okech et al. (2008). Les résultats obtenus au cours des travaux de la présente étude permettent de conclure que l'huile essentielle de *C. anisata* est un produit à prendre en compte dans le système intégré de gestion des moustiques vecteurs de maladies en Afrique.

S'il est vrai que les produits naturels d'origine botanique ont été utilisés pendant une longue période et ont été prouvés traditionnellement non toxiques et appropriés pour le contrôle des vecteurs (Koul, 2008) et étant donné qu'au cours de cette étude, aucune forme d'allergie n'a été signalée ni chez les volontaires, ni chez les auteurs du présent travail qui ont eu à passer eux aussi l'huile essentielle sur la peau, on peut estimer que l'huile essentielle de *C. anisata* est un bon candidat en tant que répulsif anti-moustique à passer sur la peau. Toutefois, il faudra d'une part, effectuer des tests de rémanences pour déterminer la concentration de l'huile essentielle de *C. anisata* qui protégera le plus longtemps possible et d'autre part, effectuer des tests de toxicité afin de confirmer que cette huile essentielle est utilisable sur la peau.

Conclusion

Au regard de ces résultats, nous pouvons conclure que l'huile essentielle de *C. anisata* à faible concentration repousse effectivement le moustique *Cx. quinquefasciatus*.

Nous suggérons donc l'évaluation de la persistance dans le temps de l'effet répulsif de différentes concentrations de cette huile essentielle contre les moustiques.

Remerciements

Nos sincères remerciements à tous les volontaires qui ont participé à cette étude. Ce travail n'a reçu aucun financement.

Conflits d'intérêt: Nous, auteurs, déclarons que nous n'avons pas de conflit d'intérêt.

Paternité : Ayaba Z. Abagli, Lydia Hangnilo et Thiery B. C. Alavo ont contribué à part égale aux travaux et à la rédaction de cette publication.

References:

1. Abagli, A. Z., & Alavo, T. B. C. (2011). Essential oil from bush mint, *Hyptis suaveolens*, is as effective as DEET for personal protection against mosquito bites. *The Open Entomology Journal* 5, pp. 45-48
2. Abagli, A. Z., Alavo, T. B. C., Avlessi, F., & Moudachirou, M. (2012). Potential of the bush mint, *Hyptis suaveolens* essential oil for personal protection against mosquito biting. *Journal of the America Mosquito Control Association*. 28(1), 15-20.
3. Abagli, A. Z., & Alavo, T. B. C. (2020). Potentialités insectifuges du gros baume, *Hyptis suaveolens* Poit. (Lamiaceae) : Perspectives pour la lutte contre les moustiques en zones tropicales. Review Paper. *Journal of Applied Biosciences* 149: 15330 - 15337
4. Adjou, E. S., & Soumanou, M. M. (2013). Efficacité des extraits de plantes contre les moisissures toxigènes isolées de l'arachide en post-récolte au Bénin *Journal of Applied Biosciences* 70:5555– 5566
5. Alavo, T. B. C, Abagli, A. Z., Accodji, M., & Djouaka, R. (2010). Unplanned urbanization promotes the proliferation of disease vector mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Open Entomol J* 4:1–7.
6. Avlessi, F., Dangou, J., Wotto, V. D., Alitonou G. A., Sohounhloue, D. K., & Menut, C. (2004) Propriétés antioxydantes de l'huile essentielle des feuilles de *Clausena anisata* (Wild) Hook. C. R. Chimie 7 : 1057–1061 Balkew, M., Elhassen, I., Ibrahim, M., Gebre-Michael, T., & Engers, H. (2006). Very high DDT-resistant

- population of *Anopheles pharoensis* Theobald (Diptera: Culicidae) from Gorgora, northern Ethiopia. *Parasite* 13(4) pp. 327-329.
7. Dwijendra, S., (2014). *Advances in Plant Biopesticides* ISBN 978-81-322-2006-0. DOI 10.1007/978-81-322-2006-0_19, © Springer India (eBook).
 8. Karunamoorthi, K., & Husen, E. (2012) Knowledge and self-reported practice of the local inhabitants on traditional insect repellent plants in Western Hararghe zone, *Ethiopia Journal of Ethnopharmacology* 141:212– 219.
 9. Khamala, S. S. (2004). Bioevaluation of Insecticidal and Repellent Plants from Central Region of Kenya and Chemical Identification of Bioactive Derivatives. A thesis submitted in partial fulfillment for the award of the degree of Master of Science of Kenyatta University
 10. Koul, O. (2008). Phytochemicals and insect control: an antifeedant approach. *Crit Rev Plant Sci* 27:1-24.
 11. Marimuthu, G., Shine, K., Naiyf, S. A., & Giovanni, B. (2016). Acute toxicity and repellent activity of the *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) essential oil against four mosquito vectors of public health importance and its biosafety on non-target aquatic organisms. *Environ Sci Pollut Res* DOI 10.1007/s11356-016-7568-2ui
 12. Mavundza, E.J., Maharaj, R., Finnie, J.F., Kabera, G., & Van Staden, J. (2011). An ethnobotanical survey of mosquito repellent plants in uMkhanyakude district, KwaZulu-Natal province, South Africa. *J. Ethnopharmacol.* 137, pp. 1516-1520
 13. Mukandiwa, L., Eloff, N.J., & Naidoo, V. (2016). Repellent and mosquitocidal effects of leaf extracts of *Clausena anisata* against the *Aedes aegypti* mosquito (Diptera: Culicidae) *Sci Pollut Res* 23: pp. 11257–11266.
 14. Nerio, L. S., Olivero-Verbel, J., & Stashenko E. (2010). Repellent activity of essential oils: A review. *Bioresource Technology* 101: pp. 372–378
 15. Okech, B. A., Mwobobia, I. K., Kamau, A., Muiruri, N., Mutiso, N., Nyambura, J., Mwatele, C., Amano, T., & Mwandawiro, C.S. (2008). Use of integrated malaria management reduces malaria in Kenya. *PLoS One* 3:e4050.
 16. Okunade, A.L.I., & Olaifa, J. I. (1987). Estragole: an acute toxic principle from the volatile oil of the leaves of *Clausena anisata*. *Journal of Natural Products* 50, pp. 990–991
 17. Sharma, V. P., & Ansari, M. A. 1994. Personal protection from mosquitoes (*Diptera: Culicidae*) by burning neem oil in kerosene. *J Med. Entomol.*, 31: pp. 505-507.