Potencijal primjene mikročestica esencijalnih ulja za suzbijanje štetnih organizama u poljoprivredi

Vugrinec, Bruna

Master's thesis / Diplomski rad

2020

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Agriculture / Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:204:686996

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**



Repository / Repozitorij:

Repository Faculty of Agriculture University of Zagreb







SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

POTENCIJAL PRIMJENE MIKROČESTICA ESENCIJALNIH ULJA ZA SUZBIJANJE ŠTETNIH ORGANIZAMA U POLJOPRIVREDI

DIPLOMSKI RAD

Bruna Vugrinec

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

Diplomski studij:

Fitomedicina

POTENCIJAL PRIMJENE MIKROČESTICA ESENCIJALNIH ULJA ZA SUZBIJANJE ŠTETNIH ORGANIZAMA U POLJOPRIVREDI

DIPLOMSKI RAD

Bruna Vugrinec

Mentor:

Izv.prof.dr.sc. Marko Vinceković

Zagreb, rujan, 2020.

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZJAVA STUDENTA

O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI

Ja, **Bruna Vugrinec**, JMBAG 0178107102, rođena 17.05.1996. u Zagrebu,

izjavljujem da sam samostalno izradila diplomski rad pod naslovom:

POTENCIJAL PRIMJENE MIKROČESTICA ESENCIJALNIH ULJA ZA SUZBIJANJE ŠTETNIH ORGANIZAMA U POLJOPRIVREDI

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____ _____

Potpis studentice

Sveučilište u Zagrebu
Agronomski fakultet

University of Zagreb
Faculty of Agriculture

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studentice **Bruna Vugrinec**, JMBAG 0178107102, naslova

POTENCIJAL PRIMJENE MIKROČESTICA ESENCIJALNIH ULJA ZA SUZBIJANJE ŠTETNIH ORGANIZAMA U POLJOPRIVREDI

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____ , dana _____ .

Povjerenstvo:			potpisi:
1.	Izv.prof.dr.sc. Marko Vinceković	mentor	_____
2.	Doc.dr.sc. Luna Maslov-Bandić	član	_____
3.	Doc.dr.sc. Darija Lemić	član	_____

Zahvala

Zahvaljujem svom mentoru izv.prof.dr.sc. Marku Vincekoviću na pomoći i vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada. Hvala Vam na posvećenom mi vremenu i znanju, a svakako na tome što ste uvijek imali strpljenja za moje brojne upite.

Zahvaljujem svim profesorima i asistentima na Zavodu za kemiju na suradnji, ugodnom boravku i stečenom znanju.

Na kraju bih zahvalila svojoj obitelji i prijateljima na moralnoj podršci, strpljenju i povjerenju. Uvijek ste bili tu za mene i u najtežim trenucima. Hvala vam na tome.

Sažetak

Diplomskog rada studentice **Bruna Vugrinec**, naslova

POTENCIJAL PRIMJENE MIKROČESTICA ESENCIJALNIH ULJA ZA SUZBIJANJE ŠTETNIH ORGANIZAMA U POLJOPRIVREDI

Jedan od najvažnijih globalnih problema je zaštita usjeva od štetnih organizama. Za suzbijanje štetnih organizama kontinuirano se koriste sintetičke kemikalije i njihova toksičnost ugrožava zdravlje ljudi i životinja. Ekološki insekticidi temeljeni na esencijalnim uljima (EO) su komplementarni kemijski sintetiziranim insekticidima u suzbijanju štetnih organizama. Njihova prednost je u smanjenju štetnih učinaka kemijskih insekticida na zdravlje ljudi i okoliš te povećavanju prinosa biljnih kultura. EO biljaka pokazuju toksične i odbijajuće učinke na različite štetne organizme. Glavni problem u korištenju biljnih EO kao insekticida u poljskim uvjetima je njihova kemijska nestabilnost u prisutnosti zraka, svjetla, vlage i visokih temperatura koje dovode do isparavanja i propadanja njihovih aktivnih sastojaka. Formulacije mikročestica ispunjenih s EO i njihovim kontroliranim otpuštanjem mogu unaprijediti njihovu primjenu.

Ključne riječi: esencijalna ulja (EO), mikročestice, suzbijanje štetnih organizama

Summery

Of the master's thesis – student **Bruna Vugrinec,** entitled

POTENTIAL OF ESSENTIAL OILS MICROPARTICLES APPLICATION FOR CONTROL OF HARMFUL ORGANISMS IN AGRICULTURE

One of the most important global problems is the protection of crops from harmful organisms. Synthetic chemicals are continuously used to control harmful organisms and their toxicity endangers human and animal health. Organic insecticides based on essential oils (EO) are complementary to chemically synthesized insecticides in pest control. Their advantage is in reducing the harmful effects of chem. insecticides on human health and the environment and increasing crop yields. EO plants show toxic and repulsive effects on various harmful organisms. The main problem in using plant EOs as insecticides in field conditions is their chemical instability in the presence of air, light, moisture and high temperatures leading to evaporation and degradation of their active ingredients. Formulations of microparticles filled with EO and their controlled release can improve their application.

Keywords: essential oils (EO), microparticles, control of harmful organisms

Sadržaj

1. Uvod 4

2. Esencijalna ulja 5

2.1. Mehanizam djelovanja i prodora esencijalnih ulja 8

2.2. Pesticidno djelovanje EO 10

2.2.1. Insekticidno djelovanje EO 10

2.2.3. Baktericidno djelovanje EO 15

2.2.4. Herbicidno djelovanje EO 16

3. Metoda inkapsulacije 18

3.1. Kontrolirano otpuštanje 20

4. Inkapsulacije esencijalnih ulja i suzbijanje štetnih organizama 22

4.1. Priprema formulacija EO s kitozanom i njihovo djelovanje 22

4.2. Priprema formulacija EO s alginatom i njihovo djelovanje 25

4.3. Priprema formulacija EO s ureom i formaldehidom i njihovo djelovanje 29

4.4. Priprema formulacija EO s polietilen glikolom (PEG) i njihovo djelovanje 33

4.5. Priprema formulacija EO s arapskom gumom u smjesi s drugim vrstama polimera i njihovo djelovanje 33

4.6. Priprema formulacija EO s drugim vrstama omotača 34

5. Utjecaj mikročestica na ljude i okoliš 35

6. Zaključak 37

7. Literatura 38

1. Uvod

Dugotrajna primjena sintetičkih kemijskih sredstava za zaštitu bilja rezultirala je akumulacijom raznih rezidua u okolišu te predstavlja rizik za zdravlje ljudi, životinja i druge neciljane organizme. Ekotoksikološke, ekološke i društvene posljedice njihove raširene uporabe u poljoprivredi dovele su znanstvenike do drugih održivih alternativnih metoda koje su ekološki prihvatljivije (Pavela 2015.). Iz tog razloga uporaba botaničkih sredstava za zaštitu bilja (SZB) temeljenih na biljnim ekstraktima mogu pružiti alternativno rješenje trenutno korištenim sredstvima za zaštitu bilja jer sadrže bioaktivne spojeve.

Svi spojevi proizvedeni u prirodi mogu se svrstati u dvije glavne skupine. Prva skupina su primarni metaboliti i čine osnovne građevne jedinice živih organizama, a to su bjelančevine, ugljikohidrati, nukleinske kiseline i lipidi. Druga skupina su sekundarni metaboliti koji se klasificiraju u tri glavne skupine: terpene (npr. esencijalna ulja, karotenoidi i steroli), fenolne kiseline (npr. flavonoidi, tanin i lignin), te spojeve koji sadrže dušik (npr. alkaloidi) (Agostini-Costa i sur. 2012., prema Samar, 2019.) Sekundarni metaboliti igraju važnu ulogu u obrani biljaka protiv mikroorganizama, fitofagnih kukaca i drugih štetnih organizama (Bowsher i sur. 2008., prema Samar, 2019.). U botanička sredstvima za zaštitu bilja ubrajaju se i esencijalna ulja (EO) koje zbog svoje ekonomičnosti i dostupnosti predstavljaju obećavajuću alternativu kemijskim sredstvima. Brzo prodiru te zbog svoje volatilne sposobnosti brzo hlape i ne ostavljaju toksične rezidue (Mossa 2016.). Aromatične biljke ih sintetiziraju kao sekundarne metabolite, a imaju vrlo važnu ulogu u obrani biljaka (protiv biotičkih i abiotičkih stresova) i signalizacijskim procesima, uključujući i privlačenje oprašivača i korisnih kukaca. Uglavnom se sastoje od terpena, ali mogu sadržavati i druge kemijske spojeve (Baser i Buchbauer 2015.).

Međutim, najveći nedostatak u korištenju esencijalnih ulja kao botaničkih sredstva u poljskim uvjetima jest njihova kemijska nestabilnost prilikom izlaganja zraku, svjetlu, vlazi te visokim temperaturama koje dovode do degradacije aktivnih sastojaka (Bertolini i sur. 2001.). Glavni problem esencijalnih ulja je njihova kratkotrajnost i volatilnost koju je riješio razvoj metode inkapsulacije. Inkapsulacija je nova razvijena metoda za kontrolirano i/ili produljeno oslobađanje aktivnog (inkapsuliranog) sredstva (Green i sur. 2007.). Membrana polimera obuhvaća sitne čestice aktivnih sastojaka u cilja zaštite istih od nepovoljnih uvjeta okoliša, poput svjetlosti, vlage i kisika (Samar 2019.). Inkapsulacijom esencijalnih ulja u mikročestice mogli bi se riješiti navedeni problemi zaštitom aktivnih sastojaka od degradacije i isparavanja te tako povećati njihovu stabilnost i kontrolirano otpuštanje (Mossa 2016.).

Tehnologija kontroliranog otpuštanja obećava ne samo da će se EO biti maksimalno iskorištena, već i smanjiti zagađenje okoliša. Također, predstavlja perspektivu kao novi komercijalni proizvod na tržištu. Štoviše, ako su inkapsulirana u prirodni ili obnovljivi polimer mogu biti novi, ekološki i ekonomičniji izbor u suvremenoj, biološkoj i integriranoj zaštiti bilja (Samar 2019.).

Cilj rada bio je analizirati, usporediti i kritički sažeti sve dosadašnje rezultate znanstvenih istraživanja biopesticidnog učinka formulacija mikročestica ispunjenih esencijalnim uljima (EO) u zaštiti bilja.

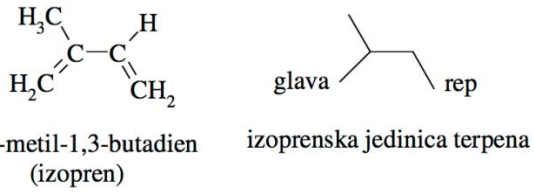
2. Esencijalna ulja

Esencijalna ili eterična ulja su smjese mirisnih, lipofilnih lako hlapljivih spojeva koji su često biološki aktivni. Biljke ih sadrže u posebnim žlijezdama ili su dio stanice omeđen membranom. Primarno se sintetiziraju u plastidima, a poslije se pojavljuju kao kapljice koje jako lome svjetlo u korijenu i podancima, kori, listovima, cvjetovima, plodovima i sjemenkama. Mnoge latice sadrže u citoplazmi svojih stanica hlapljiva esencijalna ulja koja se izlučuju kroz vanjsku stijenku epiderme (kasnije ispare kao cvjetni mirisi). Biološka uloga im je privlačenje kukaca radi oprašivanja, smanjenje transpiracije, odbijanje biljojeda (repelentnosti), zaštita od fitopatogenih mikroorganizama i kukaca te inhibicija rasta (klijanja) drugih biljaka – potencijalnih natjecatelja za isti prostor. Esencijalna ulja pohranjena su u istaknutim, morfološki diferenciranim spremnicima, koji su histološki lako prepoznatljivi i čija je anatomska građa svojstvena cijelom rodu ili porodici (Kuštrak 2005.). Biljka ih pohranjuje na dva načina: egzogeno (na površini biljnog organa) i endogeno (unutar biljnog organa). Aromatične biljke iz kojih se izoliraju esencijalna ulja su najzastupljenije u rodovima Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Pinaceae, Piperaceae, Rutaceae i Zingiberaceae. Procjenjuje se da je poznato 3000 različitih esencijalnih ulja, od kojih je oko 300 od komercijalne važnosti (Van de Braak i Leijten 1999.).

Destilacija vodenom parom najčešći je postupak izolacije esencijalnih ulja iz biljnog materijala, a osim toga koriste se tiještenje i direktno zagrijavanje biljnog materijala. Svi drugi mirisni ekstrakti dobiveni na drugačiji način ne smiju se nazivati esencijalnim uljima. Sintetske smjese ili mješavine sintetskih mirisa s prirodnim esencijalnim uljima ne smiju se nazivati esencijalnim uljima, već samo mirisima. Svježe izolirana esencijalna ulja su bezbojne ili blijedožućkaste tekućine do smeđe boje. Većina EO je na sobnoj temperaturi tekuća, ali neka mogu biti smolasta ili čak čvrsta. Potpuno su hlapiva i nemaju ostataka, dobro se miješaju s lipofilnim otapalima, kao što je apsolutni etanol, kloroform, eter, petroleter, benzen te masna ulja i tekući parafin. Topivost u vodi im je vrlo mala (1:200), ali ipak dovoljna da se mogu izrađivati aromatične vode (Kuštrak 2005.).

Esencijalna ulja su smjese od 20 do 200 kemijski različitih sastavnica, koje se mogu podijeliti prema koncentraciji u ulju na glavne sastavnice (20-95 %), sastavnice u količini 1-20% i sastavnice u tragovima (manje od 1 %). Vodeća sastavnica obično daje glavno obilježje esencijalnom ulju, poput mirisa, kemijskih i fizikalnih svojstava ili farmakološkog djelovanja. Dosad je dokazano više od 3000 kemijskih spojeva kao sastavnica esencijalnih ulja, a one se sastoje od različitih skupina organskih spojeva (alkani, alkeni, alkini, alkoholi, aldehidi, ketoni, karboksilne kiseline, esteri, eteri i laktoni) (Kuštrak 2005.). Esencijalna ulja uglavnom sadrže spojeve u slobodnom obliku, a samo neka sadrže glikozidno vezane sastavnice. Prema skeletu ugljikovodika dijele se na terpene, fenilpropane i druge spojeve.

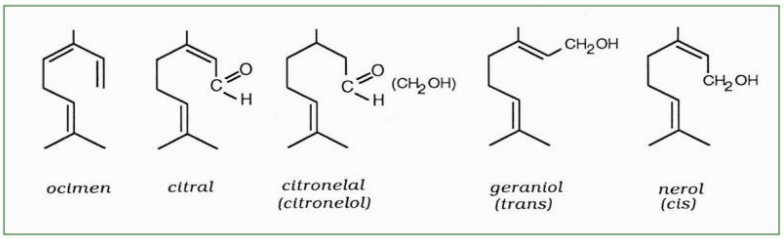
Od svih poznatih sastavnica esencijalnih ulja, najzastupljeniji su terpeni (90 %). Terpeni su vrsta hlapljivih spojeva od kojih uglavnom potječe miris biljaka. Naziv „terpeni“ dobili su spojevi izolirani iz terpentina – hlapljive tekućine iz borova drveta. Nastaju kondenzacijom izoprenskih molekula. Izoprenske su jedinice u terpenskim molekulama poredane na način „glava-rep“ što znači da se razgranati završetak jedne jedinice veže na nerazgranati završetak druge (slika 2.1.) (Kuštrak 2005.).



Slika 2.1. Strukturna formula izoprena i prikaz izoprenske jedinice

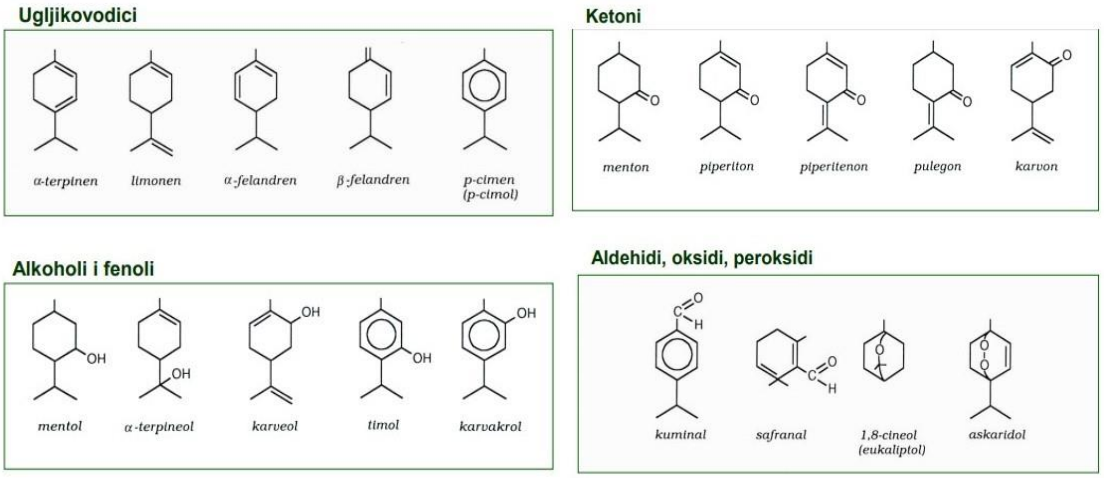
Izvor: https://vdocuments.mx/izoprensko-pravilo.html

U prirodi se pojavljuju monoterpeni (C_{10}), seskviterpeni (C_{15}), diterpeni (C_{20}), sesterterpeni (C_{25}), triterpeni (C_{30}) i tetraterpeni (C_{40}). Monoterpeni ili jednostavni terpeni nastaju kao nezasićeni kondenzacijski produkt dviju izoprenskih jedinica i u strukturi imaju 10 ugljikovih atoma. Mogu biti aciklički (slika 2.2.), monociklički (slika 2.3.) ili biciklički (slika 2.4.). U esencijalnim uljima je dosad nađeno više od 150 različitih monoterpena. Klasificiraju prema stupnju oksidacije: ugljikovodici – alkoholi – aldehidi – ketoni – fenoli – oksidi. Seskviterpeni su nastali od triju izoprenskih jedinica, odnosno 15 ugljikovih atoma, a mogu biti aciklički seskviterpen (slika 2.5.), monciklički (slika 2.6.) te biciklički i triciklički (slika 2.7.). Diterpeni su nastali od četiriju izoprenskih jedinica, odnosno imaju 20 ugljikovih atoma (Kuštrak 2005.).



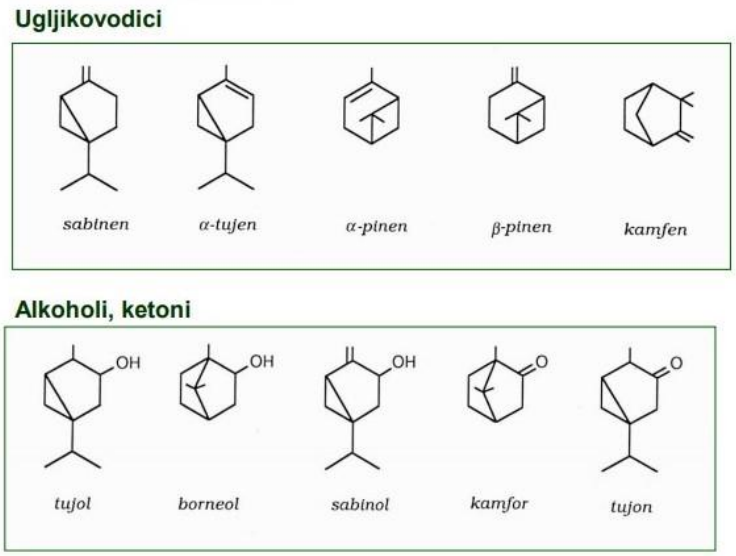
Slika 2.2. Aciklički monoterpeni

Izvor: Kuštrak 2005.

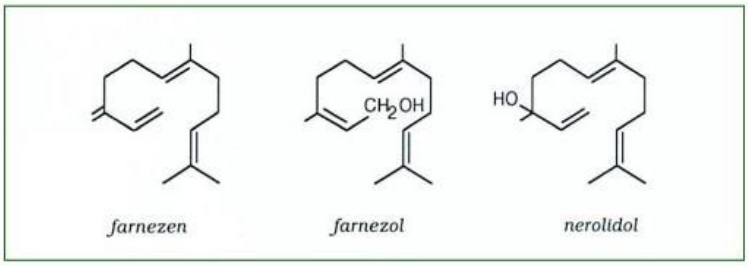


Slika 2.3. Monociklički monoterpeni

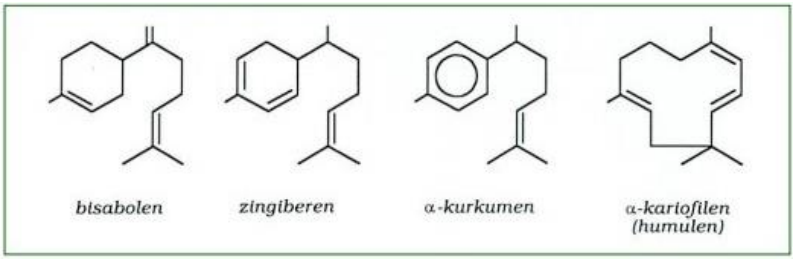
Izvor: Kuštrak 2005.



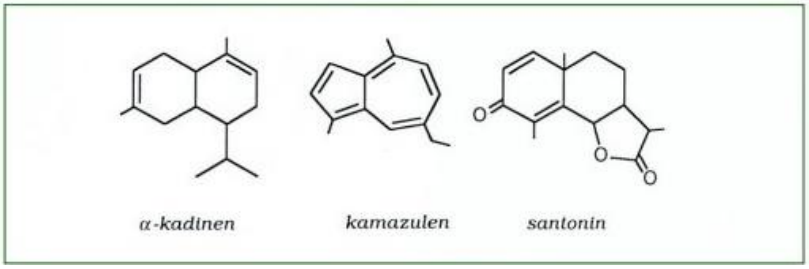
Slika 2.4. Biciklički monoterpeni
Izvor: Kuštrak 2005.



Slika 2.5. Aciklički seskviterpeni
Izvor: Kuštrak 2005.



Slika 2.6. Monociklički seskviterpeni
Izvor: Kuštrak 2005.



Slika 2.7. Biciklički i triciklički seskviterpeni
Izvor: Kuštrak 2005.

Fenilpropani su aromatski spojevi s postranim propilnim lancem vezani na benzensku jezgru. Nastaju direktno iz aminokiseline fenilalanina. U sastavu esencijalnih ulja pojavljuju se također acetogenini, lančani ugljikovodici i njihovi derivati s kisikom te spojevi s dušikom i sumporom: sulfidi, derivati antranilne kiseline, indol i acetilenski derivati. Ovi spojevi se rjeđe pojavljuju u sastavu esencijalnih ulja i uglavnom su karakteristični za pojedine biljne vrste (Kuštrak 2005.).

Sva esencijalna ulja moraju biti botanički i kemijski definirana. Botanički definirana znači da mora biti točno označena vrsta, podvrsta, varijetet i forma, jer botaničke karakteristike imaju veliko značenje za kemijski sastav ulja. Kemijski definirano ulje ima točno definiran udio pojedinih molekula u esencijalnom ulju, izražen kao postotak (%), određen kemijskom analizom plinske kromatografije. Ako je potrebno, kemijska analiza točno definira i kemotip, pojavu da botanički isti materijal može ovisno o mjestu rasta dati esencijalna ulja različitog sastava (Marković 2005.).

Esencijalna ulja visoko su cijenjena među biljnim ekstraktima, zbog cijene, mirisnih osobina i činjenice da se iz velike količine biljnog materijala dobije mala količina esencijalnog ulja. Široko se upotrebljavaju u prehrambenoj, farmaceutskoj, kozmetičkoj i poljoprivrednoj industriji (Bakkali i sur. 2008). S industrijskog stajališta, EO se također koriste kao konzervansi i okusi u hrani, kao i mirisi u sapunima i parfemima (Maes i sur. 2019.).

2.1. Mehanizam djelovanja i prodora esencijalnih ulja

Veliki interes za esencijalna ulja objašnjava se velikim brojem bioloških aktivnosti (Friedman 2014., prema Maes i sur., 2019.). Osim što mogu biti toksični za razne vrste štetnih organizama, mogu na njih djelovati kao regulatori rasta i razvoja te imaju repelentno i fumigantno djelovanje (Samar 2019.). Lee i sur. 2004. (prema Samar 2019.) navode da su esencijalna ulja lipofilna te iz tog razloga mogu prodrijeti u tijelo kukca i tako uzrokovati kemijsku disfunkciju i smrt. Prema Ozols i Bicevskis 1979. (prema Samar 2019.) esencijalna ulja mogu prodrijeti u tijelo kukca inhalacijski, oralno ili putem kože tj. kontaktno. Mogu utjecati na biološku i fiziološku aktivnost kukca i živčani sustav. Razlog ometanja biološke i fiziološke aktivnosti je utjecaj EO na endokrini sustav tj. juvenilni hormon što dovodi do poremećaja rada hormona. Smanjuju plodnost odraslih kukaca, vijabilnost jaja, mogu utjecati na period parenja tako što ga skraćuju što dovodi do smanjenja te djeluju na oktopaminergički put koji je glavni regulatorni sustav za kontrolu jajnika kod kukaca ovulacije (Huang i sur. 2002., prema Samur, 2019.). Esencijalna ulja također mogu ometati i disanje kukaca tako da blokiraju stigme te se tako onemogućuje ulazak zraka u dušnik što dovodi do gušenja. Monoterpeni djeluju kao neurotoksini koji utječe na enzim acetilkolinesterazu (AChE) koji je ključan za prestanak prijenosa signala živčanog impulsa kroz sinaptički put, i to hidrolizom acetilkolina do kolina i acetata. Paraliza i smrt kukca najčešći su rezultat poremećaja rada oktopamina, neurotransmitera i neurohormona, što rezultira slomom živčanog sustava (Enan 2005., prema Samar, 2019.). Ako kukac oralno unese EO dolazi do smanjenja sposobnosti gutanja, poremećaja pretvorbe asimiliranih tvari u hranjive tvari, i može doći do oštećenja probavnog sustava tj. membrana povezanih s apsorpcijom u crijevima što rezultira velikim utroškom energije na detoksikaciju od esencijalnih ulja (Zapata i sur. 2009., prema Samar,

2019.). Esencijalna ulja sigurnija su od ostalih botaničkih insekticida poput rotenona i piretruma. Razlog toga je postojeći metabolizam detoksikacije i bioracionalni način djelovanja monoterpena (Koul i sur. 2013., prema Samar, 2019.). Esencijalna ulja djeluju na sve stadije razvoja kukaca. Time je vjerojatnost stvaranja rezistentnosti vrlo mala što ih čini učinkovitim, netoksičnim rješenjem u integriranoj zaštiti bilja (Gutiérrez i sur. 2009.).

Nazzaro i sur. (2017.) navode kako EO ulja inhibiraju šest mehanizama djelovanja gljiva. Inhibiraju: sporulaciju, sintezu ergosterola, rad mitohondrija, sintezu DNA/RNA i/ili sintezu proteina, diobu stanica, rad pumpi za izbacivanje (bakterijske stanične strukture). Također mogu utjecati na propusnost membrana što uzrokuje smrt bakterije ili gljive. (Viuda-Martos i sur. 2007.; Marzoug i sur. 2011., prema Raveau i sur., 2020.). Imaju negativan učinak na staničnu stijenku (inhibiraju sintezu β-glukana i hitina, dolazi do deformacije stanice i poremećaja homeostaze) i membrane (djeluju na njenu propusnost, transport elektrona, proteina i enzima) (Calo i sur. 2010.; Luciardi i sur. 2010.; Ben Ghnay i sur. 2013., prema Raveau i sur., 2020). Hidrofobnost EO i njihovih komponenata omogućuje EO da probije lipide staničnih membrana i mitohondrije, što rezultira povećanjem propusnosti bakterijskih i gljivičnih membrana (Burt 2004., Friedly i sur. 2009.; Calo i sur. 2010.; prema Raveau i sur., 2020.). Maissa i Walid (2015.) utvrdili su da EO čajevca (lat. *Melaleuca alternifolia* Cheel, 1924) također utječe na propusnost membrane i funkciju organela vrste *Botrytis cinerea* Persoon, 1794 (siva plijesan) (Raveau i sur. 2020.). Detekcija kvoruma, proces kojim bakterije reguliraju ekspresiju gena s obzirom na koncentraciju molekula izlučenu u okoliš također može biti inhibiran djelovanjem EO, pa tako npr. EO limuna inhibira detekciju kvoruma bakterija *Pseudomonas aeruginosa* (Schröter, 1872) Migula, 1900 i gljive *Candida albicans* Berkhout, 1923 (Nazzaro i sur. 2017.).

Ankri i Mirelman 1995. (prema Raveau i sur., 2020.) navode da karvakrol, glavni sastojak EO timijana (lat. *Thymus vulgaris* L.) (45 %) i origana (lat. *Origanum vulgare* L.) (60 do 74 %) ima antibakterijsko djelovanje na velik broj gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Utječe na membrane gram-pozitivnih i njihovu propusnost H^+ i K^+ iona. Također, utječe na membranu gram-negativnih bakterija, povećavajući propusnost citoplazmatske membrane za ATP i oslobađa lipopolisaharide. Zbog membrane bogate liposaharidima, što ograničava kontakt između EO i citoplazmatske membrane, gram-negativne baterije su manje osjetljive na EO nego gram-pozitivne (Marzoug i sur. 2011.; Seow i sur. 2014.; prema Raveau i sur. 2020). Na molekularnoj razini komponenata EO pokazalo se da su fenolni i terpenoidni (terpeni koji sadrže kisik) učinkovitiji u usporedbi s esterima, alkoholima, aldehidima itd. (Nazzaro i sur. 2017.). Zabka i Pavela 2013. (prema Raveau i sur., 2020.) navode kako je razlog toga baktericidno i fungicidno djelovanje hidroksilna skupina u fenolnoj strukturi. Osjetljivost patogena na EO ovisi o različitim čimbenicima, kao što su sastav EO (aktivnih spojeva), koncentracija EO i topljivost u mediju, vrijeme izloženosti patogena EO i perzistentnost EO-a (ovisno volatilnosti EO-a). Uvjeti za rast patogena kao što su temperatura, pH, dostupnost kisika također mogu utjecati na učinkovitost EO (Kalemba i Kunicka 2009., prema Raveau i sur., 2020.).

Fitotoksično djelovanje EO na korove vidljivo je u vidu smanjenog rasta i kloroza. Uz navedene simptome inhibiraju mitozu, smanjuju stanično disanje, dolazi do depolarizacije membrane, skidanja epikutikularnog vosak, smanjuje se sadržaj klorofila, javljaju se oksidacijska oštećenja te dolazi do polimerizacije mikrotubula (Raveau i sur. 2020.).

2.2. Pesticidno djelovanje EO

2.2.1. Insekticidno djelovanje EO

Prema Tripathi i sur. (2009.) dosadašnja istraživanja pokazala su da esencijalna ulja iz porodica Myrtaceae, Lamiaceae, Asteraceae, Apiaceae i Rutaceae imaju visoko insekticidnog djelovanje protiv kukaca iz redova Lepidoptera, Coleoptera, Diptera, Isoptera i Hemiptera. Na kukce imaju repelentno djelovanje, djeluju kao regulatori rasta i razvoja, inhibiraju hranjenje i normalnu funkciju jajnika, djeluju ovicidno i larvicidno (Hikal i sur. 2017.). Primjeri nekih biljaka čija esencijalna ulja imaju insekticidno djelovanje prikazani su u tablici 2.1

Moretti i sur. 2002. (prema Hussein i sur., 2017.) proučavali su učinak različitih esencijalna ulja na ličinke hrastovo gubara (lat. *Limantria dispar,* porodica Lymantridae). Rezultati su pokazali da su testirana EO timijana (lat. *Thymus spp.)*, ružmarina (lat. *Rosmarinus officinalis* L.), obične mirte (lat. *Myrtus communis* L.), eukaliptusa golobusa (lat. *Eucalyptus globules* St.-Lag.) i kadulje (lat. *Salvia officinalis* L.) pokazuju dobar larvicidni učinak na ličinke. Esencijalno ulje mente (lat. *Menta x piperita* L.) ima repelentno djelovanje na mrave (porodica Formicidae), muhe (porodica Muscidae), lisne uši (natporodica Aphidoidea) i žohara (red Blattodea), a pokazalo se učinkovito i protiv četverotočkastog žiška (lat. *Callosobruchus maculatus* Fabricius, 1775) i kestenjastog brašnara (lat. *Tribolium castanum* Herbst, 1797) (Kordali i sur. 2005., prema Hikal i sur., 2017.). Esencijalna ulja cimeta (lat. *Cinnamomum camphora* (L.) J. Presl., *Cinnamomum cassia* (L.) J.Presl i *Cinnamomum zeylanicum* Blume) imaju repeletno djelovanje na komarce (Kim i sur., 2003.; Prajapati i sur. 2005., prema Hussein i sur., 2017.). EO korijena vetiver (lat. *Vetiveria zizanioides* L.) stavlja se u ormare, ladice ili komode kako bi se zaštitila odjeća i drugi materijali od napada raznih kukaca. EO ulje mačje metvice (lat. *Nepeta cateria* L.*)* vrlo je učinkovito kao repelent protiv komaraca i pčela. Glavni sastojak mačje metvice je biciklički monoterpen nepetalakton, koji ima 10 puta jači repelentni učinak na komarce nego DEET (dietiltoluamid). Posebno je učinkovit na vrstu protiv *Aedes aegypti* L. 1762, vektora virusa žute groznice (Mohan i sur. 2011., prema Hussein i sur., 2017.). EO ulja lavande (lat. *Lavandula spp*.), bora (lat. *Pinus spp*.) i mente (lat. *Menta x piperita*) ima toksično djelovanje na zelenu breskvinu uš *(*lat. *Myzus persicae* Sulzer, 1776, Homoptera: Aphididae*)* i cvjetnog štitastog moljca (lat. *Trialeurodes vaporariorum* Westwood, 1856, Homoptera: Aleyrodidae*)* kao i na krumpirovu zlaticu (lat. *Leptinotarsa decemlineata* Say, 1824; Coleoptera: Chrysomelidae) i stjenicu vrste *Stephanitis pyri* Fabricius, 1775 (Mateeva i Karov 1983., prema Regnault-Roger, 1997.). Papachristos i sur. 2004. (prema Hikal i sur., 2017.) ispitiviali su toksično djelovanje EO lavande (lat. *Lavandula hybrida*), ružmarina (lat. *Rosmarinus officinalis*.) eukaliptusa golobusa (lat. *Eucalyptus globules*) na grahovog žiška (lat. *Acanthoscelides obtectus* Say, 1831). Monoterpeni 1,8-cineol, verbenon i kamfor pokazali su se najučinkovitiji. EO pačulija (lat. *Pogostemon heyneanus* Benth.) i bosiljka (lat. *Ocimum basilicum* L.) insekticidno djeluju na rižinog žižaka (lat. *Sitophilus oryzae*, Coleoptera: Curculionidae), krušara (lat. *Stegobium paniceum* Schoenherr, 1838; Coleoptera: Anobiidae), kestenjastog brašnara (lat. *Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) i kineskog žiška (lat. *Callosobruchus chinensis* L. 1758, Coleoptera: Bruchidae) (Regnault-Roger 1997.).

Tablica 2.1. Primjeri biljaka čija esencijalna ulja imaju insekticidni djelovanje

Biljna porodica	Biljke iz kojih je izolirano EO	Kukac
Tropaeolaceae	*Tropaeolum tuberosum*	*Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae)
Meliaceae Amaryllidaceae Anacardiaceae	*Melia azedarach* *Allium sativum* *Schinus molle*	*Phthorimaea operculell*a (Lepidoptera: Gelechiidae)
Lamiaceae Rutaceae Tropaeolaceae Solanaceae Amaryllidaceae	*Minthostachys mollis* *Ruta graveolens* *Tropaeolum tuberosum* *Capsicum frutescens* *Allium cepa*	*Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae)
Poaceae	*Cymbopogon winterianus*	*Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)
Myrtaceae Ericaceae	*Eucalyptus globulus* *Gaultheria procumbens*	*Agrotis ipsilon* (Lepidoptera: Noctuidae)
Amaryllidaceae	*Allium sativum*	*Tribolium castaneum* (Coleoptera: Tenebrionidae) *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae)
Apiaceae Myristicaceae	*Athmanta haynaldii* *Myristica fragrans*	*Lymantria dispar* (Lepidoptera: Erebidae)
Poaceae	*Cymbopogon winterianus*	*Frankliniella schultzei* (Thysanoptera: Thripidae) *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae)
Rutaceae	*Citrus sinensis*	*Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae)
Myrtaceae Anacardiaceae	*Eucalyptus citriodora* *Schinus terebinthifolius*	*Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) *Trialeurodes ricini* (Hemiptera: Aleyrodidae)

Izvor: Samar S. Ibrahim (2019). Essential Oil Nanoformulations as a Novel Method for Insect Pest Control in Horticulture, Horticultural Crops. IntechOpen. London. UK.

2.2.2. Fungicidno djelovanje EO

Fitopatogene gljive odgovorne su za gotovo 30% svih bolesti usjeva, a mogu imati veliki utjecaj na usjeve na kojeg utječu tijekom uzgoja ili nakon berbe te tijekom skladištenja. S ekonomskog stajališta mogu uzrokovati velike gubitke prinos, dok neke gljive (*Aspergillus sp., Fusarium sp.* itd.) proizvode mikotoksine koji su odgovorni za pneumopatije ili sadrže kancerogene spojeve (Raveau i sur. 2020.). U tablici 2.2. prikazana su djelovanja različitih esencijalnih ulja na brojne fitopatogene gljive i pseudogljive istražena u posljednjem desetljeću (Lazar i sur. 2010.; Dean i sur. 2012.;, Tabassum i sur. 2013., prema Raveau i sur., 2020.).

Među svim fitopatogenim gljivama koje su opisane u tablici najviše su proučavane *Alternaria spp., Botrytis spp., Fusarium spp., Penicillium spp.* i *Rhizoctonia spp.* Aminifard i

Mohammadi 2012. (prema Raveau i sur., 2020.) navode kako su određene fitopatogene gljive u kontaktu s EO promjenjivog karaktera ovisno u vrsti EO. Npr. gljivu *Botrytis cinerea* (siva plijesan) inhibira EO kima (lat. *Carum carvi* L.) i komorača (lat. *Foeniculum vulgare* Mill.), ali ne i mente (lat. *Mentha x piperita*). Prisutnost fenolnih (EO komorača) ili aromatskih spojeva (EO kima) pokazuje veću fungicidno djelovanje protiv vrste *B. cinerea*. Vrsta *Aspergillus spp*. pokazala se osjetljivom na EO limunske trave (lat. *Cymbopogon citratus (DC.)* Stapf, 1906), klinčića (lat. *Syzygium aromaticum* L.), origana (lat. *Origanum vulgare*) i timijana (lat. *Thymus vulgaris*), a neosjetljivost na EO cimet (lat. *Cinnamomum zeylanicum*) i đumbir (lat. *Zingiber officinale* Roscoe) (Božik i sur. 2017., prema Raveau i sur., 2020.). Vrsta *Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc. (zelena plijesan) pokazala se osjetljivijom na EO timijana (lat. *Thymus vulgaris*) i čubara (lat. *Satureja hortensis* L.), nego na EO komorača (lat. *Foeniculum vulgare*) i bosiljka (lat. *Ocimum basilicum*) (Ortiz de Elguea-Culebras 2016., prema Raveau i sur., 2020.). Također, EO limunske trave pokazalo je visoko fungicidno djelovanje na vrste *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. i *Aspergillus spp*. i *Fusarium oxysporum* Schlecht. emend. Snyder i Hansen (Božik i sur. 2017.; Sharma i sur. 2017.; Siddiqui i sur. 2017., prema Raveau i sur., 2020.).

Rezultati navedenih istraživanja pokazuju da EO imaju fungicidni učinak na gljive koje uzrokuju bolesti na biljkama tijekom vegetacije i na bolesti u skladištima (bolesti nakon berbe/žetve) (Raveau i sur. 2020.).

Tablica 2.2. Primjeri biljaka čija esencijalna ulja imaju fungicidno djelovanje

Biljke iz kojih je izolirano EO	**Gljiva**	**Bolest koju gljiva uzrokuje**
Carum carvi, Carum opticum, Foeniculum vulgare Thuja plicata, Eugenia caryophillata, Lavandula angustifolia, Origanum vulgare, Salvia sclarea and Thymus vulgaris, Thymus zygiis, Laurus nobilis, Echinophora platyloba	*Alternaria alternata*	pjegavost lista
Asarum heterotropoides	*Alternaria humicola*	alternarioza
Angelica archangelica	*Alternaria solani*	koncentrična pjegavost lista
Pinus pinea Genista quadriflora , Pulicaria mauritanica Warionia saharae	*Alternaria spp.*	alternarioza
Rosmarinus officinalis, Schinus mole, Tagetes minuta, Mentha x piperita, Angelica glauca, Plectranthus rugosus, Valeriana wallichii Mentha spicata, Vetiveria zizanioides Artemisia nilagirica, Michelia alba, Ocimum basilicum	*Aspergillus flavus*	crna plijesan, luči aflatoksin
Santolina chamaecyparissus, Thuja plicata, Eugenia		

caryophillata, Lavandula angustifolia, Origanum vulgare, Salvia sclarea and Thymus vulgaris	*Aspergillus fumigatus*	luči aflatoksin
Ocimum basilicum, Genista quadriflora, Ocimum basilicum, Lallemantia royleana, Artemisia nilagirica, Ocimum basilicum, Vetiveria zizanioides. Solidago canadensis, Marrubium vulgare	*Aspergillus niger*	crna plijesan
Artemisia nilagirica	*Aspergillus ochraceus*	luči okratoksin
Citrus x limon	*Aspergillus parasiticus*	plijesan
Cinnamomum zeylanicum, Thymus vulgaris, Origanum vulgare, Syzygium aromaticum, Cymbopogon citratus, Zingiber officinale	*Aspergillus spp.*	
Piper sarmentosum	*Bipolaris oryzae*	smeđa pjegavost
Eucalyptus erythrocorys, Pinus pinea	*Bipolaris sorokiniana*	pjegavost lista
Eucalyptus spp.	*Biscogniauxia mediterranea*	sušenje
Thymus zygiis	*Botryotinia fuckeliana*	siva plijesan
Cestrum nocturnum, Carum carvi, Foeniculum vulgare, Mentha x piperita, Mentha pulegium, Metasequoia glyptostroboides, Origanum heracleoticum, Origanum majorana, Eucalyptus erythrocorys, Cinnamomum cassia, Melissa officinalis, Angelica archangelica, Melaleuca alternifolia, Tetraclinis articulata, Marrubium vulgare	*Botrytis cinerea*	siva plijesan
Cestrum nocturnum, Metasequoia glyptostroboides, Piper chaba	*Colletotrichum capsici*	pjegavost lista
Cymbopogon spp., Asarum heterotropoides	*Colletotrichum gloeosporioides*	pjegavost lista
Metasequoia glyptostroboides, Eucalyptus erythrocorys, Syzygium aromaticum, Eucalyptus globulus,	*Fusarium oxysporum*	venuće (bolet traheoza)

Cymbopogon citratus, Mentha x piperita		
Thymus spp.	*Pythium spp.*	trulež korijena
Metasequoia glyptostroboides, Eucalyptus erythrocorys, Angelica glauca, Plectranthus rugosus, Valeriana wallichii, Piper chaba, Marrubium vulgare	*Fusarium solani*	venuće
Cestrum nocturnum Pinus pinea , Rosmarinus officinalis , Tetraclinis articulata, Angelica archangelica	*Fusarium spp.*	fuzarioza
Curcuma longa	*Fusarium verticillioides*	fuzarioza klasa i zrna
Mentha pulegium, Solidago canadensis	*Monilinia fructicola*	smeđa trulež
Carum carvi, Carum opticum, Foeniculum vulgare, Marrubium vulgare, Foeniculum vulgare., Satureja hortensis, Ocimum basilicum, Thymus vulgaris	*Penicillium digitatum*	zelena plijesan
Melissa officinalis, Pulicaria mauritanica, Solidago canadensis, Warionia saharae	*Penicillium expansum*	meka trulež plodova
Thymus spp., Rosmarinus officinalis	*Penicillium italicum*	plava plijesan
Bunium persicum, Foeniculum vulgare, Juniperus polycarpus, Mentha spp., Ocimum basilicum, Thymus vulgaris, Zingiber officinale, Piper chaba, Pinus pinea, Thymus sp., Piper sarmentosum, Cestrum nocturnum, Metasequoia glyptostroboides	*Rhizoctonia solani*	trulež korijena
Cestrum nocturnum, Metasequoia glyptostroboides, Ziziphora clinopodioides	*Sclerotinia sclerotiorum*	bijela plijesan
Asarum heterotropoides	*Phytophthora cactorum*	trulež korijena
Salmea scandens, Citrus sinensis Cadenera, Citrus limon Eureka and Citrus bergamia Castagnaro, Thymus spp., Origanum majorana	*Phytophthora infestans*	plamenjača

Thymus spp., Mikania scandens	*Pythium spp.*	trulež korijena

Izvor: Raveau i sur. (2020). Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Productsagainst Plant Pathogens and Weeds: A Review. Foods.

2.2.3. Baktericidno djelovanje EO

Bakterije koje uzrokuju bolesti na biljkama mogu imati značajan ekonomski utjecaj. Kao primjer su bakterijske bolesti uzrokovane *Xanthomonas* spp. koje ima široki krug domaćina, uzrokuje znatnu štetu na biljkama, a samim tim i gubitak prinosa i kvalitete usjeva. (Cavalcanti i sur. 2006.; Ji i sur. 2008.; Al-Reza i sur. 2010., prema Raveau i sur., 2020.). Istraživanja proteklih nekoliko godina o utjecaju baktericidnog djelovanja EO prikazana su u tablici 2.3. Osjetljivost bakterija na EO ili određeni spoj EO ovisi o vrsti bakterije. Moghaddam i sur. 2014. (prema Raveau i sur., 2020.) istraživali su učinkovitost EO bosiljka (lat. *Ocimum basilicum* L.) na različite vrste bakterija. Najučinkovitije se pokazalo protiv vrste *Pseudomonas tolaasii* Paine 1919, a pri većim koncentracijama inhibiralo je rast vrste *Xanthomonas citri* (Hasse 1915) Gabriel i sur. 1989 i *Rhodococcus fascians* (Tilford 1936) Goodfellow 1984. Esencijalno ulje bosiljka pokazalo je baktericidno djelovanje na vrste *Clavibacter michiganensis* (Smith 1910) Davis i sur. 1984 i *Xanthomonas spp.* (Kotan i sur. 2010., prema Raveau i sur., 2020.)

Tablica 2.3. Primjeri biljaka čija esencijalna ulja imaju baktericidno djelovanje

Biljke iz kojih je izolirano EO	**Bakterija**	**Bolest koju uzrokuje**
Achillea biebersteinii	*Erwinia spp.* *Pseudomonas spp.* *Xanthomonas spp.*	ovisi o vrsti
Achillea millefolium	*Erwinia spp.* *Pseudomonas spp.* *Xanthomonas spp.*	ovisi o vrsti
Citrus reticulata	*Pseudomonas aeruginosa*	trulež korijena
Cleistocalyx operculatus	*Xanthomonas spp.*	ovisi o vrsti
Cynara scolymus	*Erwinia amylovora* *Erwinia carotovora* *Pseudomonas syringae* *Xanthomonas vesicatoria*	bakterijska palež bakterijska trulež pjegavost lista bakterijska pjegavost
Juglans regia	*Erwinia amylovora* *Erwinia carotovora* *Pseudomonas syringae* *Xanthomonas vesicatoria*	bakterijska palež bakterijska trulež pjegavost lista bakterijska pjegavost
Metasequoia glyptostroboides	*Xanthomonas spp.*	ovisi o vrsti
Ocimum basilicum	*Pseudomonas aeruginosa*	bakterijska trulež
Origanum vulgare	*Erwinia amylovora* *Erwinia carotovora* *Pseudomonas syringae* *Xanthomonas vesicatoria*	bakterijska palež bakterijska trulež pjegavost lista bakterijska pjegavost

Satureja hortensis	*Erwinia spp.* *Pseudomonas spp.* *Xanthomonas spp.*	ovisi o vrsti
Solidago canadensis	*Pseudomonas spp.* *Xanthomonas spp.*	ovisi o vrsti
Syzygium aromaticum	*Erwinia amylovora* *Erwinia carotovora* *Pseudomonas syringae* *Xanthomonas vesicatoria*	bakterijska palež bakterijska trulež pjegavost lista bakterijska pjegavost
Tanacetum aucheranum	*Agrobacterium tumefaciens* *Erwinia spp.* *Pseudomonas spp.* *Xanthomonas spp.*	rak korijena i korijenovog vrata
Thymus fallax	*Erwinia spp.* *Pseudomonas spp.* *Xanthomonas spp.*	ovisi o vrsti
Thymus vulgaris	*Pseudomonas spp.*	ovisi o vrsti
Vetiveria zizanioides	*Pseudomonas aeruginosa*	trulež korijena
Zataria multiflora	*Xanthomonas campestris*	crna trulež

Izvor: Raveau i sur. (2020). Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Productsagainst Plant Pathogens and Weeds: A Review. Foods.

2.2.4. Herbicidno djelovanje EO

Sposobnost esencijalnog ulja da djeluje na klijavost i rast i razvoj sjemena može biti učinkovito u suzbijanju korova. Primjeri nekih biljaka čija esencijalna ulja imaju herbicidno djelovanje prikazani su u tablici 2.4. Amri i sur. 2013. (prema Raveau i sur., 2020.) navode kako EO imaju fitotoksični i herbicidni učinak na korove. Fitotoksično djelovanje na vrste *Amaranthus retroflexus* L. (oštrodlakavi šćir), *Chenopodium album* L. (bijela loboda) i *Rumex crispum* L. (kovrčava kiselica) pokazalo je EO bosiljka (lat. *Ocimum basilicum*) i EO stolisnika (*Achillea spp*.), a djeluje i na vrste *Cirsium arvense* (L.) Scop. (poljski osjak) i *Lactuca serriola* L. (divlja salata) (Kordali i sur. 2008.; Kordali i sur. 2009., prema Raveau i sur., 2020.). Lins i sur. (2019.) ispitivali su herbicidni učinaka EO cimeta (lat. *Cinnamomum burmannii* (Nees & T.Nees) Blume) i citronele (lat. *Cymbopogon winterianus* Jowitt) i njihovih glavnih kemijskih komponenti, cinamaldehid i citronelal, na vrstu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (talijin uročnjak). Zaključili su da EO i njihove komponente djeluju na plazmatsku membranu, no ne utječu na propuštanje iona (Raveau i sur. 2020.).

Tablica 2.4. Primjeri biljaka čija esencijalna ulja imaju herbicidno djelovanje

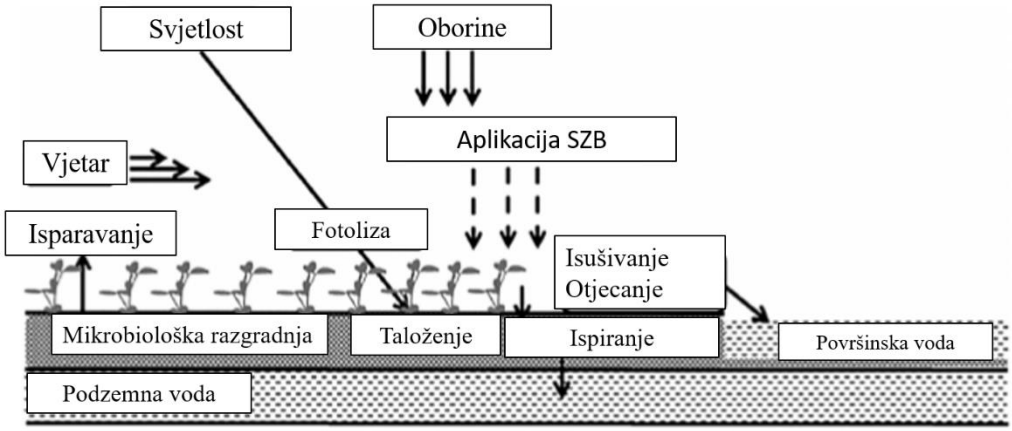
Biljke iz kojih je izolirano EO	**Korovna vrsta**
Achillea gypsicola	*Amaranthus retroflexus,* *Chenopodium album,* *Cirsium arvense,* *Lactuca serriola,* *Rumex crispus*

Achillea biebersteinii	*Amaranthus retroflexus , Chenopodium album, Cirsium arvense, Lactuca serriola, Rumex crispus*
Angelica glauca	*Lemna minor*
Citrus x limon	*Portulaca oleracea*
Citrus aurantiifolia	*Avena fatua, Echinochloa crus-galli,*
Coriandrum sativum	*Amaranthus retroflexus, Chenopodium album, Echinochloa crus-galli*
Eucalyptus spp.	*Annual ryegrass, Echinochloa crus-galli, Lolium multiflorum, Nicotiana glauca, Phalaris minor, Parthenium hysterophorus, Portulaca oleracea, Sinapis arvensis, Solanum elaeagnifolium*
Lavandula spp.	*Lolium rigidum*
Origanum acutidens	*Amaranthus retroflexus, Rumex crispus, Chenopodium album*
Origanum vulgare	*Hordeum vulgare, Lepidium sativum Matricaria chamomilla, Sinapsis alba, Triticum aestivum*
Pinus nigra	*Phalaris canariensis, Trifolium campestre, Sinapis arvensis*
Pinus pinea	*Sinapis arvensis, Raphanus raphanistrum, Lolium rigidum*
Rosmarinus officinalis	*Amaranthus retroflexus Matricaria chamomilla, Phalaris minor, Rhaphanus sativus, Trifolium incarnatum*
Tagetes erecta	*Echinochloa crus-galli*
Tanacetum aucheranum, Tanacetum chiliophyllum	*Amaranthus retroflexus, Rumex crispus, Chenopodium album*
Tetraclinis articulata	*Sinapis arvensis, Phalaris canariensis*
Valeriana wallichii	*Lemna minor*

Izvor: Raveau i sur. (2020). Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Productsagainst Plant Pathogens and Weeds: A Review. Foods.

3. Metoda inkapsulacije

U proteklom desetljeću pokazalo se da metoda inkapsulacije ima veliki potencijal za revoluciju u poljoprivrednoj praksi. Potencijalne primjene ove tehnike u poljoprivredni uključuju tretiranje sjemena, klijanje, rast i rast biljaka, suzbijanje štetnih organizama, isporuku sredstava za zaštitu bilja, gnojiva, genetskog materijala, otkrivanje toksičnih agrokemikalija i otkrivanje patogena. Čestice imaju nova svojstva koja mogu povećati učinkovitost agrokemijskih tvari i učiniti sustav isporuke „pametnim“. Kroz pametan sustav otpuštanja i isporuke formulirane aktivne tvari mogu se ciljano i kontrolirano koristiti kao i lijekovi kod ljudi (Nuruzzaman i sur. 2016.). Učestalo korištenje sredstava za zaštitu bilja uvelike ograničava njihovu primjenu zbog niza problema povezanih s njima. Više od 90% sredstava za zaštitu bilja gube se pod utjecajem okolišnih čimbenika ili ne može doći do ciljanih štetnih organizama za učinkovito suzbijanje (Ghormade i sur. 2011.; Perlatti i sur. 2013., prema Nuruzzaman i sur., 2016.). Van den Berg i sur. 1999. (prema Nuruzzaman i sur. 2016.) navode kako se oko 20-30% gubi kroz emisiju, a taj postotak može porasti 50% posto ukupne primijenjene količine sredstva za zaštitu bilja. Brojni čimbenici, uključujući način primjene, fizikalno-kemijska svojstva sredstva za zaštitu bilja i okolišni uvjeti (npr. vlaga i temperatura) utječu na stupanj gubitka tijekom primjene. Do preostalih gubitaka dolazi kao posljedica apsorpcija od strane biljke, adsorpcija od strane koloida tla, otjecanje, isušivanja, ispiranja, isparavanja, taloženja, razgradnja fotolizom te hidrolizom i mikrobiološkom aktivnošću (Mogul i sur. 1996., prema Nuruzzaman i sur., 2016.). Glavni procesi gubitaka i razgradnje sredstava za zaštitu bilja prikazani su na slici 3.1.



Slika 3.1. Glavni procesi gubitaka i razgradnje sredstava za zaštitu bilja

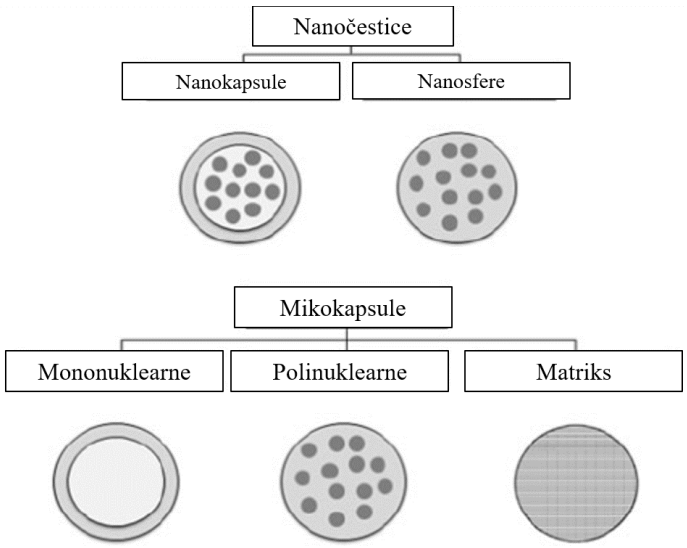
Izvor: Nuruzzaman i sur. (2016). Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. Journal of Agricultural and Food.

Ponovljena i neselektivna primjena SZB rezultira njihovom primjenom u količinama znatno većim od količine koja je zapravo potrebna za suzbijanje štetnih organizama. Kao rezultat, ne samo da se troškovi tretiranja veći, već takva upotreba rezultira nepovoljnim utjecajem na okoliš, uključujući onečišćenje tla i vode što u konačnici predstavlja opasnost za javno zdravlje. Takva upotreba sredstava povećava mogućnost pojeve rezistentnosti štetnih organizama, smanjuje biološku raznolikost tla i fiksaciju dušika, povećava akumulaciju

pesticida, ubija korisne organizme kao što su predatori i oprašivači te uništava staništa i izvore hrane za ptice. Saznanje o negativnim učincima sintetskih kemijskim SZB na javno zdravstvo i okoliš rezultiralo je sve strožim kontrolama njihove uporabe od strane nadležnih tijela (Nuruzzaman i sur. 2016.).

Inkapsulacija je proces kojim se aktivni sastojci imobiliziraju u čestice. Tvar koja se inkapsulira može se nazvati osnovnim materijalom, aktivnim sastojkom, jezgrom ili unutrašnjom fazom. Materijal koji omeđuje jezgru naziva se prevlaka, membrana ili zidni materijal. U jezgri se može biti jedan ili više tvari, a membrana može biti jednoslojni ili dvoslojni polimer. Jezgra može biti sferičnog ili nepravilnog oblika, a može biti čvrstog, tekućeg ili plinovitog stanja (Tolve i sur. 2016.). Svaka vrsta inkapsulacije može se karakterizirati i veličinom stvorenih kapsula: „makro“ (>5.000 μm), „mikro“ (1–1000 μm) ili „nano“ (<1000 nm) (Bouguéon i sur. 2019., prema Maes i sur., 2019.).

Na osnovi veličine kapsule mogu npr. nanokapsule, a metoda se naziva nanoinkapsulacija. Nanokapsule su vezikularni sustavi u kojima je aktivna tvar okružena jedinstvenom polimermembranom, dok su nanosfere matrični sustavi u kojima je aktivna tvar jednoliko raspršena. Ako se veličina čestica kreće od 3 do 800 μm, naziva se mikrosfera, a tehnologija se naziva mikrokapsulacija (Gunasekaran 2014.). Mikrosfere se prema njihovoj morfologiji mogu svrstati u mononuklearne, polinuklearne ili matrične. Mononuklearne mikrokapsule sadrže jezgru oko jezgre, dok polinuklearne kapsule sadrže mnogo jezgara zatvorenih u omotaču (Jyothi i sur. 2010.; Umer i sur. 2011.; Jyothi i sur. 2012., prema Tolve i sur., 2016.) (slika 3.2).

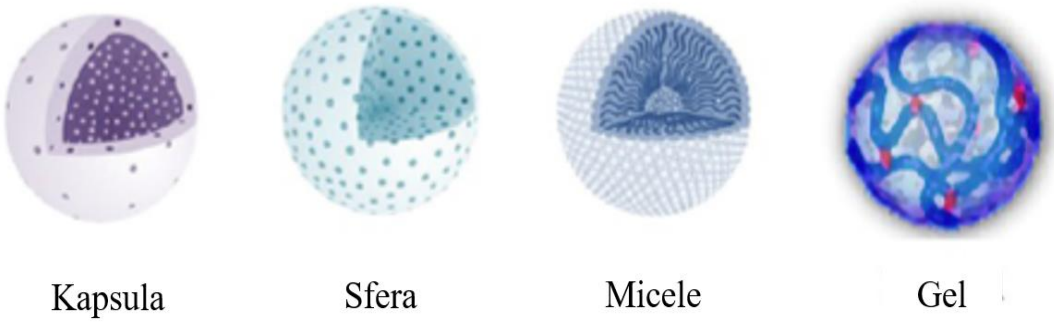


Slika 3.2 Različiti tipovi čestica nano- i mikro- veličine

Izvor: Tolve i sur. (2016). Encapsulation of health-promoting ingredients: Applications in foodstuffs. International Journal of Food Sciences and Nutrition.

Materijali za inkapsulaciju također moraju biti kemijski inertni, netoksični, sterilizirani, stabilni s fizikalno-kemijskog stajališta, mehanički otporni, ne smiju ispuštati nečistoće ili rezidue. Mogu biti različitih kemijskih sastojaka kao što su ugljikohidrati (škrob, modificirani

škrob, dekstrin, saharoza, celuloza i kitozan), gume (arapska guma, alginat i karagenan), lipidi (vosak, parafin, mono- i digliceridi, ulja i hidrogenizirane masti) ili proteini (gluten, kazein, želatina i albumin). Svi se materijali mogu koristiti sami ili u kombinaciji, s ili bez drugih aditiva, poput emulgatora, plastifikatora, surfaktanata ili sredstava za deformiranje (Tolve i sur. 2016.). Već korišteni različiti sintetički i prirodni polimeri za inkapsulaciju SZB tvore različite morfološke oblike čestica prikazane na slici 3.3.



Slika 3.3. Različiti morfološki oblici polimernih čestica
Izvor: Nuruzzaman i sur. (2016). Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. Journal of Agricultural and Food.

Materijali za inkapsulaciju koji se koriste kao SZB ili kao polimer pokazuju korisna svojstva kao što su stabilnost, propusnost, toplinska stabilnost i biorazgradivost u odnosu na najčešće korištena SZB. Polimeri koji ograđuju aktive tvari, štite ih prijevremene razgradnje i omogućavaju njihovo kontrolirano otpuštanje (Nuruzzaman i sur. 2016.).

Izbor metode inkapsulacije određen je fizikalnim i kemijskim svojstvima jezgre i materijala za oblaganje te namjenom primjene. Procesi inkapsulacije mogu se podijeliti u tri kategorije: fizikalni, kemijski i fizikalno-kemijski procesi. Fizikalne metode uključuju sušenje raspršivanjem, hlađenje raspršivanjem, atomiziranje rotacijskim diskom, oblaganje fluidnim slojem, stacionarni ekstruzija, sferizacija ekstruzijom, koekstruziju mlazne šupljine, zračnu suspenziju i centrifugalnu ekstruziju. Kemijski procesi su oni koji uglavnom uključuju polimerizaciju monomera na površinu disperziranog omotača jezgre ili metoda *in situ* plomerizacije. Fizikalno-kemijski procesi odnose se na stvaranje kapsule/sfere iz preoblikovanog polimera koji uključuje procese poput ionskog geliranja, kompleksa polielektrolita, složena tehnika koacervacije, hlađenja raspršivanjem, odvajanje faza i uklanjanja otapala (Tolve i sur. 2016.).

Cilj metode inkapsulacije je zadržavanje svojstava materijala jezgre (npr. EO), kao što su biološka, funkcionalna i fizikalno-kemijska svojstva te izbjeći njigovu degradacije.

3.1. Kontrolirano otpuštanje

Kontrola visoke volatilne sposobnosti esencijalnih ulja glavni je problem koji je riješen razvojem različitih metoda inkapsulacije. Za kozmetičku industriju bilo je prikladno razviti

metodu inkapsulacije u kojoj se kontrolirano otpuštaju mehanička svojstva esencijalnih ulja. Također, u prehrambenoj indrustriji, inkapsulacija EO kao okusa zahtijeva upotrebu umjerenog kontroliranog oslobađanja. Inkapsulacija sredstava za zaštitu bilja mora omogućiti sporo i neprekidno otpuštanje aktivnih sastojaka dozvoljenih doza u okoliš (Maes i sur., 2019.). Minimalna brzina otpuštanja određuje se računanjem učinkovitosti aktivnih sastojaka, a maksimalna ljestvicom fitotoksičnosti. Slika 2.8. prikazuje krivulju idealnog otpuštanja aktivnih sastojaka tijekom sedam dana koja prikazuje početno brzo otpuštanje pri srednjoj koncentraciji između učinkovitosti i toksičnosti, a zatim slijedi dugo i konstantno otpuštanje. Uključeni su parametri: apsorpcija biljke, degradacija, isparavanje, ispiranje. Primijenjena sredstva za zaštitu bilja moraju se otpuštati optimalnom brzinom tako da su prisutni najmanje tjedan dana bez ponovljene aplikacije (Nuruzzaman i sur. 2016.).



Slika 2.8. Krivulja idealnog otpuštanja sredstava za zaštitu bilja

Izbor: Maes i sur. (2019). Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. Molecules.

Kontrolirano otpuštanja proučava se različitim metodama. Prva metoda za ispitivanje kontroliranog otpuštanja je analizom bioaktivnosti, koja pokazuje metode inkapsulacije u kontekstu njihove primjene, ali ne mjeri kvantitativni aspekt otpuštanja (Maes i sur., 2019.) Analiza se može provesti na dva različita načina - na otvorenom (*in situ*) ili u zatvorenom prostoru (*in vitro*). Na primjer, učinkovitost EO-a u kapsuli za njihovo antimikrobno djelovanje može se odrediti proučavanjem učinka na rast bakterija. Ova ispitivanja mogu se provesti u petrijevim zdjelicama, koje su zatvoreni prostor zvani „*in vitro*", ili mogu biti na ciljanom proizvodu (npr. na kolaču u razvoju prirodnog konzervansa u pekarni), koji su stvarni uvjeti zvani „*in situ*". Druga i strogo kvantitativna metoda za ispitivanje otpuštanja je metoda plinske kromatografije zajedno s masenom spektrometrijom, u svrhu mjerenja količine EO-a koje se može otpustiti tijekom određenog vremenskog razdoblja. Metode daju različite relativne rezultate: biološku aktivnost ili količinu otpuštenog esencijalnog ulja po jedinici vremena (Maes i sur., 2019.)

4. Inkapsulacije esencijalnih ulja i suzbijanje štetnih organizama

Esencijalna ulja pokazuju toksično i repelentno djelovanje na različite vrste štetnih organizama. Unatoč ovim obećavajućim svojstvima, problemi koji se odnose na hlapljivost esencijalnih ulja, slabu topljivost u vodi i sposobnost oksidacije moraju se riješiti prije nego što se mogu koristiti kao alternativni sustav za suzbijanje štetnika. Ustanovljeno je da nanoformulacije sredstava za zaštitu bilja pokazuju manju toksičnost prema neciljanim organizmima u usporedbi s komercijalnim formulacijama, pa je primijećena veća selektivnost, a osim toga smanjuju upotrebu SZB i povećavaju postojanost aktivnog tvari (Samar 2019.).

U formuliranim pripravljenim uljnim kapsulama, učinkovitost inkapsulacije (% EE) može se izraziti u postotku od ukupne količine ulja pronađene u formulaciji na kraju postupka pripreme, ili kao omjer mase inkapsuliranog esencijalnog ulja i ukupne mase dodanog esencijalnog ulja. Kapacitet punjenja (% LC) je omjer mase inkapsuliranog esencijalnog ulja i ukupne mase nosača (materijala za oblaganje tj. polimera) (Nayak i sur. 2010., prema Samar, 2019.). Kaur i sur. 2008. (prema Samar, 2019.) navode kako učinkovitost inkapsulacije i kapacitet punjenja ovisi o topivosti i disperziji aktivnog sastojka u otopljenoj lipidnoj fazi, fizikalno-kemijskoj struktura lipidnog matriksa i polimorfnom stanju lipidnog materijala. Također, Nayak i sur. 2010. (prema Samar, 2019.) navode da karakteristike omotača utječu na učinkovitost inkapsulacije i kapacitet punjenja. Postoje tri varijable koje utječu na učinkovitost inkapsulacije: brzina miješanja, kapacitet ulja i količina umrežavajućeg sredstva (Samar 2019.).

4.1. Priprema formulacija EO s kitozanom i njihovo djelovanje

Skuhrovec i sur. (2018.) prvi su ispitivali toksično djelovanje esencijalnog ulja ružmarina (lat. *Rosmarinus officinalis*) s EO limunske trave (lat. *Cymbopogon citratus*) na odrasle oblike te EO pelargonije (lat. *Pelargonium graveolens* L'Hér.) s EO timijana (*Thymus vulgaris*) na ličinke crvenog žitnog balca (lat. *Oulema melanopus* L., 1758). Istraživanje je provedeno u laboratorijskim uvjetima. Ispitane su konvencionalne formulacije EO kao i inkapsuliranih mikročestica s EO. Konvencionalne formulacije EO pripremljene su tako da je 15 ml 10%-tnog EO razrijeđena u komercijalnom repičinom ulju u omjeru 1:1, a za konačno razrjeđenje korištena je 40%-tna vodena otopina polisorbat 20 kao surfaktant. Kao polimeri za izradu mikročestica korišteni su kitozan i želatina uz dodatak octene kiseline, sorbitola i glicerola. Metodom plinske kromatografijom i masenom spektrometrijom (GC-MS) utvrđene su komponente esencijalnih ulja. Ukupno 28 različitih spojeva utvrđeno je u EO limunske trave od kojih su najzastupljeniji monoterpeni geraniol i nerol. U EO pelargonije utvrđena su 22 spoja, najzastupljeniji bili su citronelol i geraniol. EO sadržavalo je 13 različitih spojeva od kojih su u najvećem postotku bili monoterpeni 1,8-cineol, kamfor i α-pinen, dok je u EO timijana utvrđeno 22 spoja od kojih monoterpeni timol i p-cimen.

Tarzalni pokusi stavljeni su u prozirne plastične posude, a na dno je postavljen vlažni filter papir. U posudu s odraslim oblicima dodana 2,5 ml kombinacije EO ružmarina i limunske trave, a kod ličinki 2,5 ml kombinacije EO pelargonije i timijana ručnim raspršivačem. U svakoj kutiji tretirano je 10 odraslih svih koncentracija s pet

ponavljanja, dok je 10 ličinki bilo tretirano sa svim koncentracijama s jednim ponavljanjem. U tablici 4.1. prikazani su rezultati smrtnosti odraslih crvenih žitnih balaca. Rezultati su pokazali da je nešto veća smrtnost zabilježena na jedinkama tretiranim konvencionalnom formulacijom EO, no rezultati s inkapsuliranim EO su bili gotovo identični. Radi niske smrtnosti kontrole utvrđene su vrijednosti LC_{50} i LC_{90} za obje testirane formulacije. Za konvencionalnu formulaciju EO vrijednosti su bile 5105, odnosno 11220 ppm-a, a za inkapsulirano EO 4570 i 11482 ppm-a. Na prve rezultate dobivene testiranjem na ličinkama negativno je utjecala visoka smrtnost kontrole koja je bila 50-60%. Unatoč tome, smrtnost ličinki kod koncentracija od 0.36-1% iznosila je 100% kod konvencionalnog EO, a kod inkapsuliranog EO 80-90% (tablica 4.2).

Rezultati obje formulacije pokazale su relativno visoku smrtnost u niskim koncentracijama. Tarzalni pokus s ličinkama ponovljen s koncentracijom 0.12% u pet ponavljanja. Smrtnost ličinki u kontroli bila je nešto niže od originalnog pokusa s prosjekom od 28%, no i dalje visoka za pouzdano izračunavanje vrijednosti LC_{50} i LC_{90}. Razlika smrtnosti između dvije kontrole (voda i repičino ulje s polisorbatom) vidljiva u tablici 4.3. Razlog je negativni utjecaj repičinog ulja na dišni sustav ličinki. Štete od odraslih oblika u usjevi znatno su manje šteta uzrokovanih od strane ličinki, pa se tretiranje odraslih često ne preporučuje. Skuhrovec i sur. (2018.) navode da bi buduća istraživanja trebala usporediti učinkovitost inkapsuliranih i konvencionalno dostupnih EO u usjevu kao i smrtnost oba razvojna stadija pri niskim koncentracijama.

Tablica 4.1. Smrtnost odraslih crvenih žitnih balaca tretiranih kombinacijom esencijalnih ulja ružmarina i limunske trave u pet različitih koncentracija

	Smrtnost nakon 24h (%)	
Primijenjena koncentracija (%)	Konvencionalno EO	Inkapsulirano EO
0.12	0	0
0.204	8	14
0.36	30	32
0.58	46	66
1	90	86
Kontrola	0.1	

Izvor: Skuhrovec i sur. (2018). Insecticidal activity of two formulations of essential oils against the cereal leaf beetle. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science.

Tablica 4.2. Smrtnost ličinki crvenog žitnog balca tretiranih s pet različitih koncentracija kombinacije esencijalnih ulja ružmarina i limunske

	Smrtnost nakon 24h (%)	
Primijenjena koncentracija (%)	Konvencionalno EO	Inkapsulirano EO
0.12	50	70
0.204	90	80
0.36	100	80
0.58	100	90
1	100	90
Kontrola	60	

Izvor: Skuhrovec i sur. (2018). Insecticidal activity of two formulations of essential oils against the cereal leaf beetle. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science.

Tablica 4.3. Smrtnost ličinki crvenog žitnog balca tretiranih kombinacijom esencijalnih ulja pelargonije i timijana u jednoj koncentraciji

	Smrtnost nakon 24h (%)	
Primijenjena koncentracija (%)	Konvencionalno EO	Inkapsulirano EO
0.12	48	46
Kontrola - voda	28	
Kontrola – repičino ulje i polisorbat	52	

Izvor: Skuhrovec i sur. (2018). Insecticidal activity of two formulations of essential oils against the cereal leaf beetle. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science.

Abreu i sur. (2012.) proveli su istraživanje upotrebe inkapsuliranog esencijalnog ulja vrste *Lippia sidoides* Cham. u nanogel s kitozanom/gumom indijskog oraha. Biljka pripada porodici Verbenaceae a podrijetlom je iz sjeveroistoka Brazila. Glavna aktivna tvar esencijalnog ulja je monoterpenskih fenol – timol (Campos i sur. 2014.). Procijenjeno je otpuštanje nanogela kao u učinkovitost formulacije na ličinke komarca vrste *Aedes aegypti* (Culicidae). Analizom infracrvene spektroskopije potvrđena je prisutnost kitozana, gume indijskog oraha i timola u nenogelovima. Prosječna veličina nanogela bila je u rasponu od 335–558 nm, a zeta potencijal bio je pozitivan. Testovi za otpuštanje provedeni *in vitro* pokazali su da se EO inkapsulirano u nanogelove oslobađa sporije i dugotrajnije, u usporedbi s nekapsuliranim EO. Svi formulirani nanogelovi pokazali su učinkovito larvicidno djelovanje na ličinke vrste *Aedes aegypti*. Utvrđeno je da je stopa smrtnosti povezana s omjerom esencijalno ulje:guma:kitozan. Kada je omjer mase EO:guma:kitozan bio 10:1:1 učinkovitost je bila 70%. Nakon 48h smrtnost je bila 75%, a nakon 72 h 90%. Formulacije su se pokazale učinkovitim te samim time imaju potencijal u primjeni protiv štetnih organizama (Abreu i sur. 2012.).

Hosseini i sur. (2013.) pripremili su formulaciju nanočestice esencijalnog ulja origana (lat. *Origanum vulgare*) koristeći metodu emulzije ulje/voda i ionsko geliranje s kitozana i natrijevim tripolifosfatom. Glavne komponente esencijalnog ulja origana su monoterpenoidni fenoli: karvakrol i timol (Campos i sur. 2014.). Dobivene nanočestice bile su sferični, s prosječnom veličinom između 40 i 80 nm. Učinkovitost inkapusliranog EO origana bila je između 21-47%. Testovi otpuštanja provedeni *in vitro* utvrdili su da nakon početnog naglog otpuštanja slijedi sporije otpuštanje aktivnih tvari. Omjer EO/kitozan također je utjecao na otpuštanje. Ista metoda može se upotrijebiti za inkapsuliranje drugih esencijalnih ulja u formulacije za primjenu u poljoprivredi (Hosseini i sur. 2013.)

Aloui i sur. (2014.) procijenili su učinkovitost formulacija mikročestica različitih esencijalnih ulja roda *Citrus* s kitozanom i karuba gumom (brašno sjemenki rogača) za inhibiciju fitopatogene gljive *Aspergillus flavus* Link, 1809. Gljiva se javlja dva mjeseca nakon svilanja kukuruza ili u skladištu u uvjetima povišene temperature. Proizvodi kancerogene toksine od kojih je najpoznatiji aflatoksin. Toksini zazivaju rak jetre kod sisavaca i razne druge zdravstvene probleme kod (posebno) djece i odraslih (Campos i sur. 2014.). Istraživanje je provedeno *in vitro* na umjetno zaraženim plodovima. Djelovanja na tretirane plodova ocjenjivana su i osjetilima radi provjere odsutnosti neugodnog mirisa i okusa. Utvrđeno je da su esencijalna ulja bergamota (lat. *Citrus bergamia* Risso) i gorke naranče (lat. *Citrus* × *aurantium* L.) bila najučinkovitije. Oba EO značajno su smanjila klijavost konidija što je rezultiralo inhibicijom od 87-90% u usporedbi s kontrolom pri koncentraciji od 2% EO. Formulacije s kitozanom smanjile su gljivičnu razgradnju plodova za 52–62% nakon 12 dana. Rezultati su pokazali potpuna odsutnost neugodnog mirisa i okusa što ukazuje da kombinacija esencijalnih ulja s polimernima može biti korisna tehnika za proizvodnju fungicidnih sredstava za kontroliranju rasta *A. flavusa* nakon žetve. (Aloui i sur. 2014.)

4.2. Priprema formulacija EO s alginatom i njihovo djelovanje

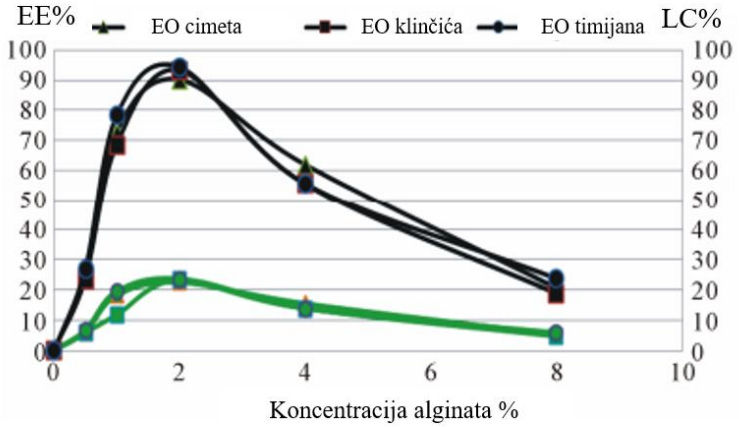
Soliman i sur. (2013.) inkapsulirali su EO klinčića (lat. *Eugenia caryophyllata*), timijana (lat. *Thymus vulgaris*) i cimeta (lat. *Cinnamomum zeylanicum*) s alginatom te ispitivali njihovo fungicidno djelovanje na fitopatogene gljive *Aspergillus niger* van Tieghem, 1867 i *Fusarium verticillioides* (Sacc.) Nirenberg 1976. Mikrokapsule alginata (AMS) pripremljene su metodom ekstruzije. Alginat je polisaharid koji se sastoji od α-L-glukuronska kiselina (G) i β-D-manuronske kiseline (M), a koristi se kao prirodni polimer. Omjer kisalina u alginatu (G:M) određuje propusnu sposobnost nabubrenih čestica alginata. AMS su očvrsnute sredstvom za umrežavanja - kalcijevim kloridom. Za procjenu učinkovitost inkapsulacije (EE, %) i kapacitet punjenja (LC, %) proučavane su tri varijable: koncentracija alginata (0.5 - 8%), količina sredstva za umrežavanje (0.125% - 2%) i vrijeme umrežavanja (5 - 30 min.). Za svaku formulaciju učinkovitost inkapsulacije i kapacitet punjenja mjereni su tri puta te je izračunata srednja vrijednost. U petrijeve zdjelice na hranjivu podlogu inokulirane su 100 µL suspenzije spora *Aspergillus niger* i *Fusarium verticillioides*. U svaku petrijevu zdjelicu dodano je inkapsulirano ili neinkapsulirano EO različitih volumena. Za mjerenje fungicidnog djelovanja neinkapsuliranog EO u poklopac ja umetnut filter papri namočen EO. Prazni filter papira služio

je kao kontrola za neinkapsulirana EO dok su za inkapsulirana EO kontrola bile alginatne mikrokapsule bez EO. Inkubacija je trajala 5 dana. Inhibicija rasta određena je mjerenjem zone rasta gljive.

Rezultati prikazani na grafu 4.3. pokazuju da se s povećanjem koncentracije 0.5% - 2% kapaciteta punjenja se povećao do 23% za sva EO, no daljnjim povećanjem koncentracije smanjio se na ~5%. Razlog porasta kapaciteta punjenja povećanjem koncentracije je stvaranje gustih mrežnih struktura s kohezivnim prazninama (porama) u koje ulaze kapljice esencijalnih ulja. Smanjeni kapacitet punjenja pri koncentracijama alginata iznad 2% je taj što povećanje prostor koji zauzima alginat uzrokuje smanjenje slobodnog volumena unutar polimera (kompaktna struktura i manja veličina pora), a samim time i količina EO koja ulazi u pore. Pri većoj koncentracija alginata dolazi do smanjenja veličina formiranih pora u kapsulama. Rezultati utjecaja koncentracije kalcijeva klorida koji služi kao sredstvom za umrežavanja na kapacitet punjenja prikazani na grafu 4.4. pokazuju da se porastom koncentracije kalcijevog klorida sa 0.125% na 0.5% se povećava kapacitet punjenja do 23% za sva EO. Povećanjem koncentracije kalcijeva klorida na 2% smanjuje se kapacitet punjenja na 18% za EO timijana, 12% za EO klinčića i ~ 15% EO cimeta. Razlog je približavanje alginatnih lanaca što smanjuje veličinu pora. Vrijeme umrežavanja također utječe na kapacitet punjenja. Rezultati su prikazani na grafu 4.5. Utvrđeno je da vrijeme umrežavanja od 5 do 20 minuta povećava kapacitet punjenja, dok produljenje vremena od 30 min dovodi do smanjenja kapaciteta punjenja. Razlog je učinkovitost geliranja (umrežavanje alginata); kohezija nastalog gela i podjela ulja između dva medija (unutar mikrokapsula i vodenog medija) koja utječe na uklapanje EO unutar polimera. Iz rezultata najbolja formulacija bila je: koncentracija natrijevog alginata: 2% w / v, koncentracija kalcijev klorid: 0.5% (w/v) i vrijeme umrežavanja: 20 min. Navedena fromulacija rezultirala je maksimalnim kapacitetom punjenja (EO timijana: 23,4%, EO klinčića ~ 23,5% i EO cimeta ~ 22,5%) i maksimalnom učinkovitost inkapsulacije (EO timijana: ~ 94%, EO klinčića ~ 94% i EO cimeta ~ 90%).

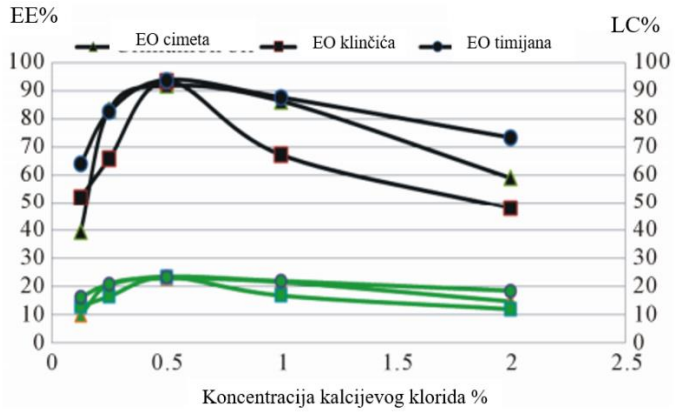
Esencijalno ulje cimeta pokazalo se najučinkovitijim i 100% inhibiralo rasta gljive *Aspergillus niger* (razrijeđenje od 2.5 µl) dok su EO klinčića i EO timijan inhibirali rast za 83% odnosno 71%. Za inhibiciju rasta *Fusarium verticillioides* sva tri EO 100% su ingibirala rast gljive pri različitim razrijeđenjima: EO cimeta pri razrijeđenje od 1 µl, EO timijana pri razrjeđenju od 5 µl i EO klinčića pri razrjeđenju od 10 µl. Usporedbom fungicidnog djelovanja para inkapsuliranog i neinkaspuliranog EO (graf 4.5. i 4.6.) utvrđeno je kako nije bilo značajne razlike čime se zaključuje da inkapsulacija EO nije utjecala na učinkovitost. Rezultati prikazani na grafu 4.7. pokazuju da se fungicidno djelovanje neinkapsuliranog EO smanjilo za 90% nakon dva dana skladištenja, dok nakon 8 dana skladištenja fungicidnog djelovanje gotovo nije bilo. Razlog je brza hlapivost komponenata EO. S druge strane, inkapsulirana EO klinčića i timijana su nakon 8 dana i dalje pokazivala pola fungicidnog djelovanja.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti da se postupak inkapsulacije ispitivanih EO može smatrati jeftinom i učinkovitom metodom koja produžuje fungicidno djelovanje inkapsuliranih EO ulja timijana, klinčića i cimeta. EO su pokazala visoku inhibiciju rasta *Aspergillus niger* i *Fusarium verticillioides*. Sve mikrokapsule održale su 30-50% fungicidnog djelovanja nakon 8 dana, dok su neinkapsulirana EO izgubila sva fungicidna svojstva nakon dva dana skladištenja. Rezultati potvrđuju da se inkapsulacija EO pokazala kao najbolji izbor za produljeno djelovanje EO (Soliman i sur. 2013.).



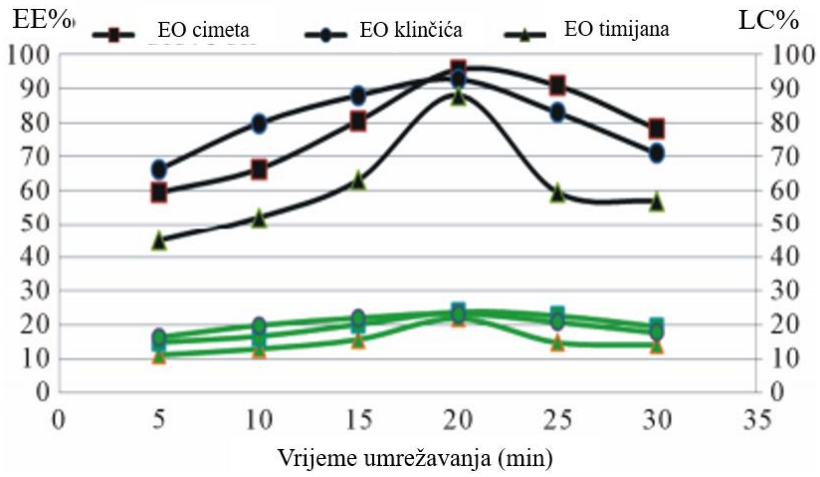
Graf 4.3. Utjecaj koncentracija alginata na kapacitet punjenja i učinkovitost inkapsulacije

Izvor: Solman i sur. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences.



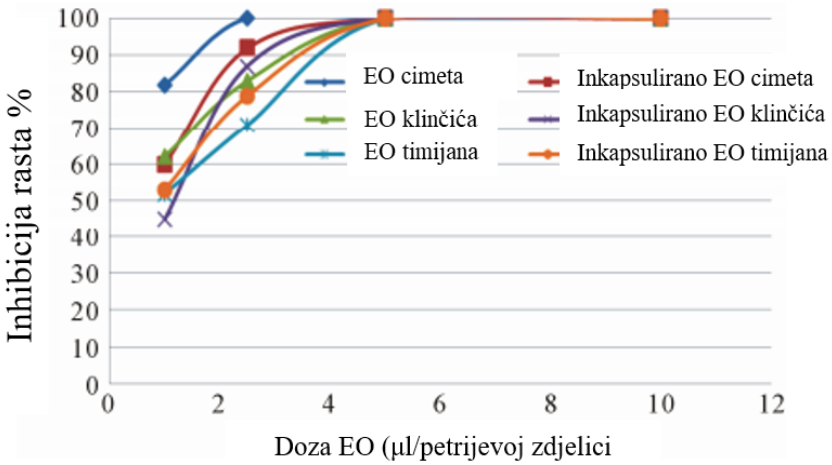
Grafu 4.4. Utjecaj koncentracija kalcijeva klorida na kapacitet punjenja i učinkovitost inkapsulacije

Izvor: Solman i sur. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences.



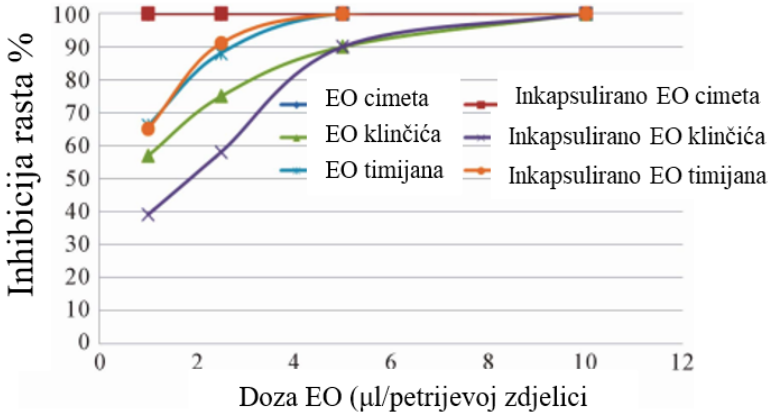
Grafu 4.5. Utjecaj vremena umnožavanja na kapacitet punjenja i učinkovitost inkapsulacije

Izvor: Solman i sur. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences.



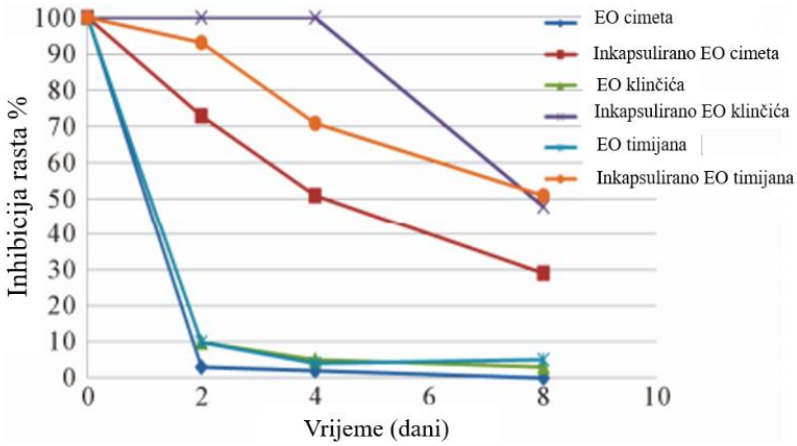
4.5. Fungicidno djelovanje para inkapsuliranog i neinkapsuliranog EO na *A. niger*

Izvor: Izvor: Solman i sur. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences.



4.6. Fungicidno djelovanje para inkapsuliranog i neinkapsuliranog EO na *F. verticillioides*

Izvor: Solman i sur. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences.



Graf 4.7. Fungicidno djelovanje neinkapsuliranih i inkaupsilarnih EO na *A. niger*

Izvor: Solman i sur. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences.

4.3. Priprema formulacija EO s ureom i formaldehidom i njihovo djelovanje

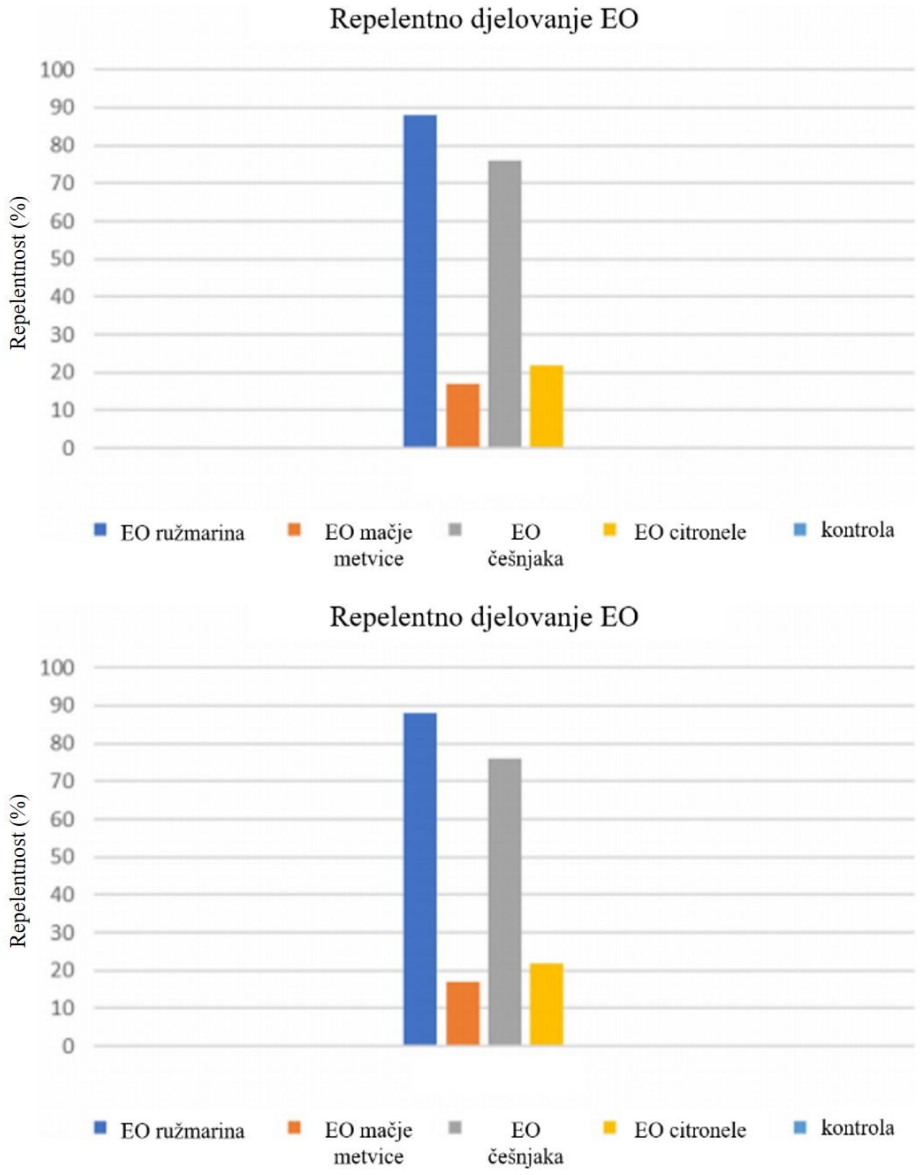
Sabbour (2019.) provela je ispitivanje toksično djelovanje i perzistentnost nanokapsula esencijalnog ulja ružmarina (lat. *Rosmarinus officinalis*), češnjaka (lat. *Allium sativum* L.), citronele (lat. *Cymbopogon sp*.) i mačje metvice (lat. *Nepeta cataria*) protiv četverotočkastog i kineskog žiška (lat. *Callosobruchus maculatus* i *Callosobruchus chinensis*); jednih od najvažnijih štetnika u skladištima. Esencijalna ulja dobivena su parnom destilacijom. Kao omotači korišteni su urea (U) i formaldehid (F) uz dodatak sumporne kiseline kao pufera i polisorbata 80 kao emulgator. Urea-formaldehidnih se u poljoprivredi koristi kao izvor dušičnog gnojiva. Cilj istraživanja je ispitati toksično djelovanje proizvedenih EO i inkapsulirana EO ulje protiv četverotočkastog i kineskog žiška. Istraživanje je provedeno u laboratorijskim uvjetima. Inkapsulacija je provedena metodom polimerizacije. Dobivena suspenzija nanokapsula ohlađena je na sobnu temperaturu, isprana destiliranom vodom, filtrirana i na kraju dehidrirana metodom sušenje smrzavanjem. Insekticidno djelovanje neinkapsuliranog i inkapsulirano EO u različitim koncentracijama ispitivano je na ličinkama trećeg stadija. Za svaki koncentraciju korišteno je četiri staklene posude kao četiri ponavljanja. Po 10 ličinki postavljeno je u svaku posudu i pokriveno pamučnom krpom. Kao kontrola 12 ličinki stavljeno je u zasebnu posudu bez EO. Smrtnost je procijenjena nakon 7 dana, broj mrtvih ličinki izbrojan je u svakoj posudi. Eksperiment je ponovljen četiri puta. Repelentnost je ispitivana testom odabira. Ispitivanje je postavljeno kao arena unutar koje su postavljene ćelije A i B. Ćelija B je postavljena kao kontrola u koju je stavljen filter papir namočen destiliranom vodom i emulgatorom, dok je u ćeliju A postavljen filter papir s EO koncentracije 1%. Dvanaest odraslih žižaka stavljeno je u arenu na 7 dana. Postotak repeletnosti izračunat je formulom $D = [1 - (T/C)] \times 100$ gdje su T i C srednji broj žižaka u ćelijama A i B. Rezultati insekticidnog djelovanja u svim tretmanima pokazali da se postotak smrtnosti ličinki povećao s porastom koncentracije. Ličinke četverotočkastog žiška bile su podložnije tretmanu nego ličinke kineskog žiška. U tablici 4.4. prikazani su rezultati insekticidnog djelovanja inkapsuliranog EO, a u tablici 4.5. neinkapsuliranog EO. Nanokapsule EO pokazale su veću učinkovitost nego neinkapsulirano EO. Rezultati repelentnosti prikazani su na grafu 4.1. za repeletno djelovanje EO na četverotočkastog žiška, a na grafu 4.2. na kineskog žiška. Istraživanje je pokazalo dobru učinkovitost nanokapsula protiv četverotočkastog i kineskog žiška, što potiče i ohrabruje širenje primjene nanokapsula u zaštiti bilja od štetnih organizama (Sabbour 2019.).

Tablici 4.4. Insektidno djelovanje EO na ličinke četverotočkastog i kineskog žiška

Tretmani	**Koncentracija (%)**	**Smrtnost ličinki (%)**	
		četverotočkastog žiška	kineskog žiška
EO ružmarina	0.1	45.4	24.2
	0.25	21.3	19.8
	0.5	23.3	30.3
EO češnjaka	0.1	38.5	36.8
	0.25	20.2	18.7

	0.5	30.1	33.8
EO mačje metvice	0.1	20.3	18.5
	0.25	12.7	11.2
	0.5	18.8	15.9
EO citronele	0.1	26.4	25.1
	0.25	20.7	17.8
	0.5	21.7	17.8
Kontrola		0.0	0.01

Izvor: Sabbour (2019). Efficacy of natural oils against the biological activity on *Callosobruchus maculatus* and *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Tenebrionidae). Bulletin of the National Research Centre.



Grafu 4.1. Repelentno djelovanje EO na četverotočkastog (gore) i kineskog (dolje) žiška

Izvor: Sabbour (2019). Efficacy of natural oils against the biological activity on *Callosobruchus maculatus* and *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Tenebrionidae). Bulletin of the National Research Centre.

Tablici 4.5. Insektidno djelovanje inkapsuliranog EO na ličinke protiv četverotočkastog i kineskog žiška

Tretmani	**Koncentracija (%)**	**Smrtnost ličinki (%)**	
		četverotočkastog žiška	kineskog žiška
EO ružmarina	0.1	85.9	82.2
	0.25	61.3	59.8
	0.5	77.3	70.3
EO češnjaka	0.1	78.5	76.8
	0.25	52.2	50.7
	0.5	64.1	60.8
EO mačje metvice	0.1	30.0	28.5
	0.25	17.7	16.2
	0.5	28.8	21.5
EO citronele	0.1	36.4	35.8
	0.25	20.0	16.6
	0.5	23.3	20.5
Kontrola		0.0	0.01

Izvor: Sabbour (2019). Efficacy of natural oils against the biological activity on *Callosobruchus maculatus* and *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Tenebrionidae). Bulletin of the National Research Centre.

Također, Sabbour (2020.) ispitivala je utjecaj inkapsuliranih EO i neinkapsuliranog EO korijandera (lat. *Coriandrum sativum* L.), kima (lat. *Carum carvi*), Janesville-a i crnog kima (lat. *Nigella sativa* L.) na kestenjastog (lat. *Tribolium* castaneum) i malog (lat. *Tribolium confusum*) brašnara. Esencijalna ulja dobivena su parnom destilacijom. Kao omotači korišteni su urea (U) i formaldehid (F) uz dodatak sumporne kiseline kao pufera i polisorbata 80 kao emulgator. Inkapsulacija je proveden metodom polimerizacije. Insekticidno djelovanje neinkapsuliranog i inkapsuliranog EO u četiri koncentracije ispitivano je na ličinke trećeg stadija. Kumulativni postoci smrtnosti određeni su nakon 7 dana od prve primjene. U tablici 4.6. prikazani su rezultati postotka smrtnosti ličinki tretiranih neinkapsulirano EO, a u tablici 4.7. inkapsuliranog EO. Nanokapsule EO pokazale su veću učinkovitost nego neinkapsulirano EO tj. smrtnost je bila veća. Rezultati insekticidnog djelovanja u svim tretmanima pokazali da se postotak smrtnosti ličinki povećavali s porastom koncentracije. Dobiveni rezultati pokazali su da se postotak smrtnosti ličinke malog i kestenjastog brašnara povećava s povećanjem koncentracija EO. Ličinke malog brašnara bile su podložnije tretmanu nego ličinke kestenjastog brašnara.

Tablica 4.6. Rezultati postotka smrtnosti ličinki malog i kestenjastog brašnara tretiranih neinkapsulirano EO

		Smrtnosti (%)	
Eesencijalno ulje	Vrijeme (dani)	Kestenjasti brašnar	Mali brašnar
Korijander	0	33.1	35.6
	2	46.9	47.8
	4	65.2	69.5
	7	80.3	85.4
Crni kim	0	11.6	12.8

	2	20.3	22.0
	4	26.1	27.7
	7	41.8	40.9
Janesville	0	30.9	34.5
	2	44.9	47.7
	4	67.1	68.8
	7	84.8	87.9
Kim	0	29.8	29.7
	2	34.3	35.1
	4	55.8	55.8
	7	68.9	69.1
Kontrola	0	0	0
	2	0	0
	4	0	0
	7	0	0

Izvor: Sabbour (2020). Efficacy of nano-formulated certain essential oils on the red flour beetle *Tribolium castaneum* and confused flour beetle, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) under laboratory and storage conditions. Bulletin of the National Research Centre.

Tablica 4.6. Rezultati postotka smrtnosti ličinki malog i kestenjastog brašnara tretiranih inkapsulirano EO

		Smrtnosti (%)	
Inkapsulirano EO	Vrijeme (dani)	Kestenjasti brašnar	Mali brašnar
Korijander	0	55.9	56.6
	2	66.9	68.3
	4	79.3	79.6
	7	89.3	89.7
Crni kim	0	20.5	20.9
	2	29.1	29.9
	4	38.5	39.1
	7	40.8	40.9
Janesville	0	45.8	46.2
	2	65.9	66.9
	4	77.2	79.2
	7	84.3	85.7
Kim	0	28.2	30.2
	2	34.3	35.7
	4	59.1	59.8
	7	74.7	77.9
Kontrola	0	0	0
	2	0	0
	4	0	0
	7	0	0

Izvor: Sabbour (2020). Efficacy of nano-formulated certain essential oils on the red flour beetle *Tribolium castaneum* and confused flour beetle, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) under laboratory and storage conditions. Bulletin of the National Research Centre.

4.4. Priprema formulacija EO s polietilen glikolom (PEG) i njihovo djelovanje

Yang i sur. (2009.) ispitivali su upotrebu polietilen glikola (PEG) kao polimera za pripemu nanočestice s esencijalnim uljem češnjaka, (lat. *Allium sativum,* porodica Liliaceae), te je procijenili insekticidno djelovanje formulacija protiv kestenjastog brašnara, *Tribolium castaneum* (Tenebrionidae). Esencijalno ulje češnjaka uglavnom se sastoji od dialil-disulfid-oksida i trisulfida koji pokazuju insekicidno i antibakterijsko djelovanje. Također se koristi u medicini za kontrolu hipertenzije i razine kolesterola (Campos i sur. 2014.). Nanočestice su pripremljene metodom fuzije -disperzije i pokazale učinkovitost inkapsulacije od 80%. Veličine sfernih čestica bila je manja od 240 nm, a izmjerena je tehnikom dinamičkog raspršivanja svjetlosti i metodom transmisijske elektronske mikroskopije (TEM). Nije bilo razlike u razini i količini aktivnih tvari EO prije i poslije inkapsulacije Nakon pet mjeseci, formulacija je pokazala 80% učinkovitosti na odraslih oblike, što je vjerojatno posljedica sporog i kontinuiranog otpuštanja aktivnih komponenata iz nanočestica. Kada se EO češnjaka koristilo samo (u istoj koncentraciji) učinkovitost je bila 11%. Rezultati su pokazali da pripremljene nanočestice EO češnjaka pripremljene s PEG-om daju učinkovite rezultate u zaštićenim prostorima (Yang i sur. 2009.)

Varona i sur. (2010.) su za pripremu polimernih mikrokapsula na bazi esencijalnog ulja lavandina (lat. *Lavandula* x *hybrida* Balb., porodica Lamiaceae) koristili dvije različite vrste polimera (polietilen glikol i škrob) i dvije metode. Glavne aktivne komponente EO lavandina su linalol i linalil acetat (Campos i sur. 2014.). Učinkovitost inkapsulacije između 14 i 66% postignuta je korištenjem PEG mikrokapsula pripremljenih tehnikom zasićenih plinova (SG). Kad se koristio postupak pripreme kapsule metodom zasićenog plina sušenjem (SG-D), kapsule su bile deformirane (došlo je do kristalizacije), dok su kapsule napravljene SG metodom bile sferne i homogene. Otpuštanje aktivnih komponenata iz kapsula pripremljenih SG metodom bilo je sporije nego iz kapsula pripremljenih pomoću SG-D metode, zbog nedostatka kristala. Formulacije pripremljene korištenjem SG metode pokazale potencijal primjene esencijalnog ulja lavandina u poljoprivredi posebno kao repelent (Varona i sur. 2010.).

4.5. Priprema formulacija EO s arapskom gumom u smjesi s drugim vrstama polimera i njihovo djelovanje

Za pripremu mikrokapsula Dong i sur. (2011.) koristili su metodu koacervacije arapske gume i želatine, dodavši transglutaminazu kao sredstvo za učvršćivanje. Procijenjene su morfološke karakteristike i kontrolirano otpuštanje mikrokapsula s esencijalnim uljem paprene metvice (lat. *Mentha x piperita*). Paprena metvica je biljka podrijetlom iz Europe, koja pripada porodici Lamiaceae, a glavne su joj aktivne komponente mentol i menton (Campos i sur. 2014.). Otpuštanje je ispitano koristeći disperziju u vrućoj i hladnoj vodi te peć na visokoj temperaturi. Vlažne mikrokapsule bile polinuklearne, prozirne i sfernu, dok su suhe bile glatke. Na veličinu kapsula i učinkovitost inkapsulacije utjecao je omjer jezgre i omotača. Kapsule s tanjim slojem omotača su pokazale veću učinkovitost i otpuštanje u toploj vrućoj, dok su

kapsule s debljim slojem imale sporije otpuštanje. Tip disperzijskog medija također je imao značajan utjecaj na oslobađanje ulja iz mikrokapsula. U hladnoj vodi otpuštanje je bilo vrlo sporo te je doseglo 7% nakon 40 dana skladištenja. Rezultati su pokazali da su čestice bile visoko stabilne tijekom skladištenja i da je brzina otpuštanja varirala ovisno o disperzivnom mediju. Navedene značajke trebale bi pogodovati njihovoj primjeni u različitim aplikacijama (Dong i sur. 2011.).

Fernandes i sur. (2014.) proveli su inkapsulaciju esencijalnog ulja ružmarina s različitim vrstama polimera koji sadrže arapsku gumu, modificirani škrob, maltodekstrin i inulin. Ružmarin (lat. *Rosmarinus officinalis*) je višegodišnji grm iz porodice Lamiaceae (Campos i sur. 2014.). Ispitivanje je provedeno kako bi se dobile poboljšane formulacije koristeći različite vrste i količine smjesa polimera. Karakteristike čestica određene su metodom sušenja raspršivanjem. Plinskom kromatografijom utvrđeno je da su glavne komponente EO ružmarina u česticama 1,8-cineol, kamfor i α-pinen Prosječna veličina čestica bila je 14,5 μm. Prisutnost inulina poboljšala je vlažnost čestica, ali je smanjila učinkovitost inkapsulacije, dok je smjesa modificiranog škroba i maltodekstrina (1:1, m/m) bila isplativa i osigurala dobru učinkovitost inkapsulacije. Dobivene su glatke čestice kada se koristila smjesa arapske gume i inulina, a najveće čestice bile su kada se koristila smjesa arapske gume i modificiranog škroba. Najbolje formulirane čestice bile s arapskom gumom i inulinom te arapskom gumom i meltadekstrinom jer su pokazale učinkovitost od 20.1 odnosno 39.7%. Istraživanje je pokazalo da su se smjese polimera pokazale pogodnim za inkapsulaciju esencijalnog ulja i drugih aktivnih tvari u svrhu suzbijanja štetnih organizama u poljoprivredi (Fernandes i sur. 2014.).

4.6. Priprema formulacija EO s drugim vrstama omotača

Lai i sur. (2006.) pripremili su čvrste lipidne nanočestice koje sadrže esencijalno ulje vrste *Artemisia arborescens* L. (pravi pelin) za poljoprivrednu primjenu. *A. arborescens* je višegodišnja biljka porodice Asteraceae, a nalazi se u primorskim regijama Sredozemlja, Južne Afrike i dijelovima Azije i Južne Amerike (Campos i sur. 2014.). Esencijalno ulje bogato je terpenskim ketonima poput kamfora i tujona, kao i seskviterpenima. Pripremljene su dvije vrste čvrstih lipidnih čestica postupkom visokotlačne homogenizacije, uz dodatak su dvije vrste surfaktantna (Poloxamer 188 i Miranol Ultra C32). Čestice su karakterizirane na temelju svojih fizikalnih svojstava i brzini isparavanja esencijalnog ulja nakon prskanja. Obje formulacije su pokazale visoku stabilnost na različitim temperaturama tijekom skladištenja u razdoblju od dva mjeseca. Prosječna veličina čestica je bila oko 200 nm te se nije promijenila tijekom skladištenja. Testovi otpuštanja provedeni *in vitro* pokazali su da čvrste lipidne čestice djeluje na smanjenje brzine isparavanja esencijalnog ulja u usporedbi s referentnim emulzijama, što može povećati potencijal primjene EO kao botaničkih sredstava za zaštitu bilja u poljoprivredi (Lai i sur. 2006.)

5. Utjecaj mikročestica na ljude i okoliš

Uvođenje inkapsuliranih SZB u poljoprivrednu prakse može predstavljati nove rizike, kako za ljude tako i za okoliš. Njihov utjecaj još uvijek nije jasan, jer je većina studija istraživala kontrolirano otpuštanje ili nastojala poboljšati preuranjenu degradaciju. Damalas i Eleftherohorinos 2011. (prema Nuruzzaman, 2016.) su analizirali izloženost, sigurnost i potencijalni rizik komercijalnih sredstava za zaštitu bilja. Ljudi koji miješaju, utovaruju, prevoze i primjenjuju formulirana SZB zbog najvećeg izlaganja najugroženija su skupina. U nekim situacijama, izloženost SZB može nastati uslijed slučajnih izlijevanja kemikalija, curenja neispravne opreme za prskanje, što rezultira izravnim ili neizravnim kontaktom s kožom putem kontaminacije odjeće (Nuruzzaman 2016.).

Čimbenici koji utječe na izloženost tijekom rukovanja i primjene SZB su: vrste formulacije SZB, vremenski uvjeti, učestalost i trajanje rukovanja i opće higijensko ponašanje radnika tijekom upotrebe SZB. Unatoč tome, izlaganje opće populacije SZB događa se uglavnom putem prehrambenog lanca, odnosno jedenja hrane i vode kontaminirane SZB. Na temelju tipova izloženosti, može se pretpostaviti da su glavni načini izloženosti čovjeku inkapsuliranim SZB: izravan i neizravni kontakt s inkapsuliranim SZB kao što je dermalna adsorpcija, izravno udisanje inkapsuliranih SZB pesticida ili kontaminacija zraka s inkapsuliranih SZB i izlaganje kroz prehrambeni lanac, odnosno konzumacija hrane i vode kontaminirana inkapsuliranim SZB (Nuruzzaman 2016.). Mortensen i sur. 2008. (prema Nuruzzaman, 2016.) istraživali su prodiranje kvantnih točaka (engl. Quantum Dots, QD) nanočestica u kožu miševa i utjecaj ultraljubičastih zraka (UV). Nanočestice su veličine 1/5000 širine ljudske dlake. Rezultati su pokazali da QD nanočestice prolaze kroz keratinocite (korneocite) rožnatog sloja (*stratum corneum*) i prodiru dublje u epidermis i dermis. Vrlo je važno napomenuti da prodor QD nanočestica ovisi o stanju kože i karakteristikama QD nanočestica. Dermalna izloženost nanočesticama ovisi o svojstvima omotača, posebno o njihovoj topivosti i biorazgradivosti. Također navode da lipofilni ne-biorazgradivi omotači poboljšavaju prodor u kožu i akumuliraju (Nuruzzaman 2016.). Osim dermalne adsorpcija, nanočestica se mogu unijeti u organizam putem disanja ili oralno, što je posebno važno zbog sposobnosti akumulacije čestice u limfni sustavu, jetru, živčani sustavu i dr. Vremenski uvjeti u vrijeme primjene, poput zraka, temperature i vlažnosti zraka, mogu utjecati na isparavanje proizvoda. Niska relativna vlaga i visoka temperatura uzrokovat će brže isparavanje raspršivača između mlaznice za raspršivanje i tretiranog objekta nego visoka relativna vlaga i niska temperatura. Za razliku od komercijalnih pesticida, inkapsulirana SZB smanjuju izlaganje u takvim vremenskim uvjetima jer se inkapsulacijom smanjuje hlapljivosti povećanjem čvrstoće, propusnosti, toplinske stabilnosti i topljivosti (Bordes i sur. 2009., prema Nuruzzaman, 2016.).

Do danas su pripremljene različite formulacije SZB s kontroliranim otpuštanjem inkapsulirane u različite omotače. Omotači (npr. biorazgradivi polimeri) također su istraživani za kontrolirano otpuštanje aktivnih tvari. Zbog svojstava sporog otpuštanja, omotači za inkapsulaciju će sredstvo za zaštitu bilja ispuštati kontrolirano u ljudski organizam, što će smanjiti zdravstvene rizike u usporedbi s neinkapsuliranim SZB. Prehrana je glavni način na koji ljudi mogu biti izloženi inkapsulirnim SZB, posebno ne-biorazgradivim materijalima. Na primjer, metali/metaloidi poput arsena nakupljeni su u ljudskom tijelu kroz prehranu i pitku

vodu. Da bi se osigurala dobra kvaliteta hrane koja dolazi do potrošača, inkapsulirana SZB trebaju biti dizajnirana tako nema ostataka rezidua (Nuruzzaman 2016.).

Konvencionalne formulacije SZB puno su veći probleme zbog njihove široke, ponovljene i slučajne primjene koja uvelike utječe na okoliš. Stoga je potreban precizan sustav suzbijanja štetnih organizama kako bi se smanjila toksičnost primjene SZB i smanjila bilo koja opasnost za okoliš. Šteta nanesena dostupnim SZB nalagala je potragu za novim alternativama kako bi se smanjila njihova upotreba. Od najnovijih tehnologija, inkapsulacija SZB ili pesticidno aktivnih sastojaka s raznim omotačima djeluje najučinkovitije. Inkapsulacija ima prednosti zbog sigurnijeg rukovanja i učinkovitije uporabe SZB uz manje izlaganje u okoliš, što jamči ekološku zaštitu. Smanjuje količinu potrebnu za najučinkovitiju kontrolu. Inkapsulirana SZB pokazala su bolju ekološku stabilnost, kontrolirano otpuštanje, ciljano djelovanje i fizičku stabilnost od ostalih formulacija. Nanoinkapsulirani pesticidi također su pokazali bolju kontrolu štetočina na nižim dozama u usporedbi s komercijalnim formulacijama. (Strom i sur. 2001., prema Nuruzzaman, 2016.). Omotači čestica štite inkapsulirane aktivne tvari od potencijalne brze razgradnje, hlapljenja, fotolize i brzog isparavanja. Neka SZB su po prirodi vrlo pokretna i gube se ispiranjem i odvodnjom, što na kraju uzrokuje zagađenje voda. Omotači čestica minimaliziraju takve gubitke kontroliranim otpuštanjem aktivnih tvari. Kontrolirano otpuštanje, kao i inkapsulacija aktivnih stvari s hidrofobnim omotačima, može također biti učinkoviti alati za sprečavanje gubitaka zbog drenaže (Nuruzzaman, 2016.).

Neselektivnost i ostaci rezidua glavni su problem sredstava za zaštitu bilja, zbog čega su vrlo toksični za neciljane organizme. Inkapsulacijom sredstava za zaštitu bilja formulira tako da nije toksično za neciljane oragnizme. Omotači omogućuju bolju interakciju i modificirani način djelovanja na željenom mjestu gdje se nalazi štetni organiza. zahvaljujući prilagodljivom sustavu za kontrolirano otpuštanje i pokrivno većoj površini (Nuruzzaman 2016.).

6. Zaključak

Prekomjerna upotreba sintetičkih sredstava za zaštitu bilja, koja uzrokuju negativne učinke na okoliš i zdravlje ljudi, pojavu rezistentnosti te povlačenje i ograničenja uporabe SZB na europskoj, ali i svjetskoj razini potiče potrebu za alternativnim metodama suzbijanja i integriranim sustavima suzbijanja štetnih organizama. Integrirana zaštita bilja (IPM) nalaže učinkovitu primjenu ekološki sigurnih sredstava za zaštitu bilja. Među njih se ubrajaju i esencijalna ulja, korištena u integriranoj zaštiti bilja kao botanička sredstva. Imaju insekticidno, baktericidno, fungicidno i herbicidno djelovanje. Koriste se kao repelenti, fumiganti, „antifeedantna" sredstva i regulatori rasta i razvoja. Također, imaju različita neurotoksična, citotoksična, fototoksična i mutagena djelovanjana na različite vrste organizama. Opasnost za okoliš je znatno manja, zbog hlapljive prirode EO, koja dovodi do značajnog smanjenja perzistentnosti u usporedbi sa sintetičkim SZB. Međutim, mali broj EO je homologiran i ima dozvolu na tržištu. Komercijalizacija botaničkih i sintetska sredstava za zaštitu bilja vrlo je složenim postupkom. Zahtijeva ispitivanje raznih testova, poput toksikoloških, okolišna istraživanja i testove učinkovitosti. Bez obzira na to, trenutni trend smanjenja upotrebe sintetičkih sredstava za zaštitu bilja i ubrzavanje postupka odobravanja tvari niskog rizika može omogućiti da EO ili proizvodi na bazi EO budu razvijeni i dođu na tržište.

Međutim, biološka aktivnost esencijalnih ulja može se izgubiti isparavanjem aktivnih sastojaka ili njihovom razgradnjom djelovanjem visokih temperatura, UV svjetla i oksidacijom. Inkapsulacijom esencijalnih ulja u razne formulacije s kontroliranim otpuštanjem spriječilo bi se brzo isparavanje i razgradnja, produljilo kontrolirano otpuštanjen i primjena manjih učinkovitih doza. Dosadašnja istraživanja o inkapsulaciji EO i njihovo djelovanje na štetne organizme pokazala su obećavajuću budućnost u primjeni formulacija na bazi EO za široku primjenu. Kombinacija raznih polimera i specifične metode inkapsulacije omogućuju proizvodnju širokog spektra proizvoda – mikro ili nano - čestica, kapsula, emulzija itd. Povrh toga, EO su vrlo prilagodljiva, što omogućuje različite vrste inksapsuliranih proizvoda. S tehničke strane, glavna razlika između metoda inkapsulacije je fizikalni aspekt proizvoda - neki daju suhi prah (sušenje raspršivanjem i precipitacija), drugi daju gel (ionsko geliranje) ili tekuće proizvode (emulgiranje i koacervacija). Da bi se razvila upotreba inkapsuliranih EO-a na industrijskom nivou, kontrolirano otpuštanje i učinkovitost se moraju optimizirati za potrebu tržišta. S obzirom na to da su esencijalna ulja složeni spojevi, svako s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima, važno ih je dodatno istražiti.

Metoda inkapsulacije ima veliki potencijal, ali potrebno ju je više istražiti da bi uporaba formulacija sredstava za zaštitu bilja postala ekološki prihvatljivija. Unatoč pozitivnim rezultatima istraživanja, broj komercijalnih formulacija sredstava za zaštitu bilja na bazi EO dostupnih u trgovinama je vrlo nizak. Da bi se razvila velika i učinkovita proizvodnja EO za biljnu zaštitu, prije bilo kakve primjene na terenu treba provesti toksikološka istraživanja za procjenu utjecaja esencijalnih ulja, ali i polimera za inkapsulaciju na neciljane organizme, ljude i okoliš. Multidisciplinarni pristup, koji osima agronoma uključuje kemičare i prehrambene tehnologe mogao bi biti put za razvoj novih formulacija sredstva za zaštitu bilja na bazi EO, koje bi mogle biti novo učinkovito rješenje za suzbijanje štetnih organizama u poljoprivredi.

7. Literatura

1. Abreu F.O.M.S, Oliveira E.F., Paula H.C.B., de Paula R.C.M. (2012). Chitosan/cashew gum nanogels for essential oil encapsulation. Carbohydrate Polymers. 89(4): 1277-1282
2. Aloui H., Khwaldia K., Licciardello F., Mazzaglia A., Muratore G., Hamdi M. (2014). Efficacy of the combined application of chitosan and Locust Bean Gum with different citrus essential oils to control postharvest spoilage caused by *Aspergillus flavus* in dates. International Journal of Food Microbiology. 170: 21-28
3. Bakkali F., Averbeck S., Averbeck D., Idaomar M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology. 46(2): 446-475
4. Baser K.H.C., Buchbauer G. (2015). Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications, Second Edition, izdanje 2., CRC Press. Forida. USA.
5. Bertolini A.C., Siani A.C., Grosso C.R.F. (2001). Stability of monoterpenes encapsulated in gum Arabic by spray-drying. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 49(2): 780-785
6. Campos E.V.R., Proença P.L.F., Bakshi M., de Oliveira J.L., Baksh M., Abhilash P.C., Fraceto L.F. (2014). Application of nanotechnology for the encapsulation of botanical insecticides for sustainable agriculture: Prospects and promises. Biotechnology Advances. 32: 1550-1561
7. Dong Z., Ma Y., Hayat K., Jia C., Xia S., Zhang X. (2011). Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. Journal of Food Engineering. 104(3): 455-460
8. Fernandez R.V., de B., Borges S.V., Botrel D.A. (2014). Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. Carbohydrate Polymers. 101:524-532
9. Green J.M., Beestman G.B. (2007). Recently patented and commercialized formulation and adjuvant technology. Crop Protection. 26(3): 320-327
10. Hikal W.M, Baeshen R.S., Said Al-Ahl H.A.H. (2017). Botanical insecticide as simple extractives for pest control. Cogent Biology. 3(1): 1-16
11. Hosseini S.F., Zandi M., Rezaei M., Farahmandghavi F. (2013). Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study. Carbohydrate Polymers. 95(1): 50-56
12. Kuštrak D. (2005.). Farmakognozija, fitofarmacija, izdanje 1., Golden Marketing. Tehnička knjiga. Zagreb
13. Lai F., Wissing S.A., Müller R.H., Fadda A.M. (2006.). *Artemisia arborescens* L. essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. AAPS PharmSciTech. 7(1): 10-18
14. Maes C., Bouquillon S., Fauconnier M.L. (2019). Encapsulation of Essential Oils for the Development of Biosourced Pesticides with Controlled Release: A Review. Molecules. 24(14): 1-17
15. Marković S. (2005.). Fitoaromaterapija. izdanje 2., Centar Cedrus. Zagreb
16. Mossa Abdel-Tawab H. (2016). Green Pesticides: Essential Oils as Biopesticides in Insect-pest Management. Journal of Environmental Science and Technology. 9: 354-378

17. Nazzaro F., Fratianni, F., Coppola, R., Feo V.D. (2017). Essential Oils and Antifungal Activity. Pharmaceuticals. 10(4): 86.
18. Nuruzzaman M., Rahman M.M., Liu, Y., Naidu R. (2016). Nanoencapsulation, Nano-guard for Pesticides: A New Window for Safe Application. Journal of Agricultural and Food. 64(7): 1447-1483
19. Pavela R. (2015). Essential oils for the development of eco-friendly mosquito larvicides: a review. Industrial Crops and Products. 76: 174-187
20. Raveau R., Fontaine J., Lounès-Hadj Sahraoui A. (2020). Essential Oils as Potential Alternative Biocontrol Productsagainst Plant Pathogens and Weeds: A Review. Foods. 9(3): 365
21. Regnault-Roger C. (1997). The potential of botanical essential oils for insect pest control. Integrated Pest Management Reviews. 2(1): 25-34
22. Sabbour M.M. (2019). Efficacy of natural oils against the biological activity on *Callosobruchus maculatus* and *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Tenebrionidae). Bulletin of the National Research Centre. 43(1): 206
23. Sabbour M.M. (2020). Efficacy of nano-formulated certain essential oils on the red flour beetle *Tribolium castaneum* and confused flour beetle, *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae) under laboratory and storage conditions. Bulletin of the National Research Centre. 44(1): 111
24. Samar S. Ibrahim (2019). Essential Oil Nanoformulations as a Novel Method for Insect Pest Control in Horticulture, Horticultural Crops. IntechOpen. London. UK.
25. Skuhrovec J., Douda O., Zouhar M., Maňasová M., Nový P., Božik M., Klouček P. (2018). Insecticidal activity of two formulations of essential oils against the cereal leaf beetle. Acta Agriculturae Scandinavica, Section B - Soil & Plant Science. 68(6): 489-495
26. Solman E.A., El-Moghazy A.Y., El-Din M.S.M., Massoud M.A. (2013). Microencapsulation of Essential Oils within Alginate: Formulation and in Vitro Evaluation of Antifungal Activity. Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences. 3(1): 48-55
27. Tolve R., Galgano F., Caruso M. C., Tchuenbou-Magaia F. L., Condelli N., Favati F., Zhang, Z. (2016). Encapsulation of health-promoting ingredients: Applications in foodstuffs. International Journal of Food Sciences and Nutrition. 67(8): 1-31
28. Tripathi, A.K, Upadhyay, S., Bhuiyan, M., Bhattacharya, P.R. (2009) A review on prospects of essential oils as biopesticide in insect-pest management. Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy. 1(5): 52-63
29. Van de Braak S.A.A.J., Leijten G.C.J.J. (1999). Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries. Rotterdam.
30. Varona S., Kareth S., Martín Á., Cocero M.J. (2010). Formulation of lavandin essential oil with biopolymers by PGSS for application as biocide in ecological agriculture. The Journal of Supercritical Fluids. 54(3): 369-377
31. Yang F.L., Li X.G., Zhu F., 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