

# Nanoformulacije na bazi lavandina (Lavandula x inermia) u suzbijanju kestenjastog brašnara (Tribolium castaneum Herbst)

---

Cecelja, Natalija

Master's thesis / Diplomski rad

2020

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:*

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:151:592766>

*Rights / Prava:* [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-12-01**



Sveučilište Josipa Jurja  
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet  
agrobiotehničkih  
znanosti Osijek**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek - Repository of the Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

**FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK**

Natalija Cecelja

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**NANOFORMULACIJA NA BAZI LAVANDINA (*Lavandula x intermedia*) U  
SUZBIJANJU KESTENJASTOG BRAŠNARA (*Tribolium castaneum* Herbst)**

**Diplomski rad**

**Osijek, 2020.**

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU  
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Natalija Cecelja

Diplomski sveučilišni studij Bilinogojstvo

Smjer Zaštita bilja

**NANOFORMULACIJA NA BAZI LAVANDINA (*Lavandula x intermedia*) U  
SUZBIJANJU KESTENJASTOG BRAŠNARA (*Tribolium castaneum* Herbst)**

**Diplomski rad**

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. dr. sc. Pavo Lucić, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Anita Liška, mentor
3. prof. dr. sc. Vlatka Rozman, član

**Osijek, 2020.**

## SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. CILJ ISTRAŽIVANJA .....	3
2. PREGLED LITERATURE .....	4
2.1. Skladišni štetnici .....	4
2.2. Kestenjasti brašnar ( <i>Tribolium castaneum</i> Herbst).....	5
2.3. Eterična ulja .....	7
2.4. Lavandin ( <i>Lavandula x intermedia</i> ) .....	8
2.5. Nanočestice .....	9
3. MATERIJALI I METODE RADA.....	15
3.1. Priprema nanoemulzije .....	15
3.2. Testni kukci.....	18
3.3. Test akutne toksičnosti.....	19
3.4. Test sa zrnom pšenice .....	20
3.5. Statistička obrada podataka.....	22
4. REZULTATI.....	23
4.1. Rezultati akutne toksičnosti .....	23
4.2. Rezultati tretmana na zrnju pšenice .....	24
5. RASPRAVA .....	26
6. ZAKLJUČAK .....	28
7. POPIS LITERATURE .....	29
8. SAŽETAK.....	35
9. SUMMARY .....	36
10. PRILOZI.....	37
10.1. Popis tablica .....	37
10.2. Popis slika .....	37

## 1. UVOD

Razvojem svijesti ljudi o konzumiranju “zdrave” hrane, biološko suzbijanje bolesti, štetnika i korova je sve više predmet istraživanja znanstvenika, kao i njihova sve veća primjena u praksi. Problem ostatka pesticide u hrani, tlu i vodama, postao je vrlo aktualan pošto je utvrđeno da pesticidi pri određenim koncentracijama mogu djelovati toksično na žive organizme. Iz tih razloga proizvođači pesticida nastoje proizvesti preparate koji se odlikuju visokom selektivnošću i učinkovitošću, koji se koriste u manjim količinama po jedinici površine (Kristek, 2007.).

Eterična ulja i njihove sastavne komponente predstavljaju jednu od obećavajućih alternativa sintetičkim insekticidima u zaštiti uskladištenih poljoprivrednih proizvoda. Eterična ulja se sastoje iz hlapivih i poluhlapivih komponenti, općenito prepoznatljivih po snažnom mirisu, a kao sekundarni metaboliti sastavni su dio mnogih biljnih vrsta (Giunti i sur., 2019.).

Današnji trendovi u fitomedicini nalažu upotrebu ekološki prihvatljivih metoda zaštite uskladištenih proizvoda koje se postižu smanjenjem upotrebe standardnih kemijskih sredstava u skladišnim prostorima, te primjenom preventivnih mjera zaštite i najnovijih metoda bioloških mjera.

Botanički insekticidi predstavljaju značajnu alternativu sintetičkim insekticidima i otvaraju nove mogućnosti u zaštiti uskladištenih žitarica (Liška, 2011).

Utjecaj eteričnih ulja na veliki broj vrsta skladišnih kukaca široko je proučen te su dokazani njihovi različiti načini djelovanja kao što su toksično, repelentno i fumigantno djelovanje. Značajan aspekt i prednost eteričnih ulja u odnosu na sintetičke insekticide ogleda se u širokom spektru djelovanja, niskoj toksičnosti za sisavce te minimalnom utjecaju na okoliš (Rajashekar i sur., 2012.). Međutim upravo njihove karakteristike koje im osiguravaju ovu prednost istovremeno predstavljaju glavni nedostatak koji sprječava širu primjenu eteričnih ulja u realnim uvjetima. Uslijed molekularnih i fizikalnih karakteristika (netopljivost u vodi, kemijska nestabilnost, visoka isparljivost, kratka rezidualna aktivnost) većina komponenata se razgradi u nekoliko dana ili sati radi čega se moraju češće aplicirati (Daglish, 2006.). Češća aplikacija, uz veću cijenu proizvodnje, primjenu botaničkih insekticida uglavnom čini

značajno skupljom od sintetičkih. Kako bi primjena botaničkih insekticida bila što učinkovitija nužne su nove strategije koje obuhvaćaju primjenu inovativnih tehnologija u managementu suzbijanja štetnika.

Upravo nanotehnologija nudi nove metode dizajniranja aktivnih komponenti u nano dimenzijama, kao i razvoj njihovih formulacija koje se skupno označavaju kao nanopesticiidi. Cjelokupno istraživanje u području nanopesticida temelji se na razvoju formulacija koje bi imale značajne prednosti u odnosu na postojeće kontrolne strategije suzbijanja štetnika, a imale bi sljedeće karakteristike (Benelli i Lukehart, 2017.):

- stabilnost i aktivnost u ciljanom okolišu (ne suviše osjetljive na sunčevu svjetlost, temperaturu i vlagu)
- sposobnost prodiranja u ciljani organizam
- neškodljivost za biljke i sisavce
- optimalnost troškova proizvodnje
- izvor novih načina djelovanja na štetnike.

Skladišni kukci čine nekoliko tipova ekonomskih šteta na uskladištenoj robi. Opseg i važnost šteta ovisi o vrsti štetnika, o proizvodu koji se skladišti te o njegovoj namjeni. Prisutnost skladišnih kukaca, dijelova tijela i izmeta mogu predstavljati izvor onečišćenja, što dovodi do smanjenja tržišne vrijednosti proizvoda, odnosno do smanjenja količine uskladištenog proizvoda. Osim toga, skladišni štetnici mogu biti vektori različitih uzročnika bolesti i djelovati kao alergeni. Procijenjeno je da godišnji poslije-žetveni gubici nastali uslijed napada skladišnih kukaca, mikrobiološkog kvarenja i drugih faktora, iznose 10–25 % svjetske proizvodnje

(<https://repozitorij.agr.unizg.hr/islandora/object/agr%3A1242/datastream/PDF/view>).

## **1.1. CILJ ISTRAŽIVANJA**

Cilj istraživanja je bio ispitati djelovanje pripravljene nanoformulacije na bazi lavandina na kestenjastog brašnjara (*Tribolium castaneum*) u tretmanima akutne toksičnosti i tretiranog zrna pšenice. Također, kako bi se potvrdila ili odbacila hipoteza o poboljšanom djelovanju nanoemulzije, obavljani su i testovi djelotvornosti s konvencionalnom formulacijom istog sastava, ali bez primjene nanotehnologije.

## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. Skladišni štetnici

Glavni uzroci nastanka šteta i gubitaka uskladištenih poljoprivredni proizvoda su skladištenje proizvoda s povećanom vlagom uslijed čega se intenziviraju fiziološki procesi proizvoda (disanje) te često dolazi do pojave samozagrijavanja, i napad štetnika (kukaca, grinja i mikroorganizama). Najčešći štetni kukci koji se javljaju u uskladištenim poljoprivrednim proizvodima pripadaju redovima Lepidoptera (leptiri) i Coleoptera (kornjaši).

Skladišni štetnici su nametnici koji su svoj život prilagodili životu u zatvorenom prostoru. Prije su ti štetnici živjeli u prirodi, no kako je čovjek počeo proizvoditi veće količine hrane i počeo stvarati zalihe tako su se ujedno i štetnici prilagođavali novim mikroklimatskim uvjetima u skladištima (file:///C:/Users/PC/Downloads/Najvazniji\_stetnici\_uskladistenedih\_poljoprivrednih\_proizvoda\_na\_podrucju\_BiH%20(1).pdf).

Skladišni štetnici kontaminiraju više hrane nego što konzumiraju, a kontaminirani proizvodi smatraju se neprikladnima za potrošnju. Gotovo su svi sušeni prehrambeni proizvodi podložni infestaciji kukcima (https://repositorij.biologija.unios.hr/islandora/object/bioos%3A65/datastream/PDF/view).

S obzirom na način ishrane, odnosno na štetu koju čine, skladišni štetnici su podijeljeni u nekoliko skupina:

Primarni štetnici– koji su prema ekonomskoj važnosti najvažniji jer oštećuju zdrava, prethodno neoštećena zrna i izazivaju oko 90% svih šteta.

Sekundarni štetnici– nisu sposobni oštetiti zdrava, cjelovita zrna, a javljaju se gotovo uvijek u zajednici s primarnim štetnicima, koji stvaraju povoljne uvjete za njihov razvoj.

Mikofagne vrste– hrane se micelijem plijesni koji se razvijaju u robi s povećanom vlagom. Ne oštećuju direktno proizvode, već služe kao indikatori loših skladišnih uvjeta, naročito prekomjerne vlage skladišta i robe.



Također u vlažnoj robi, biljnim proizvodima koji su fazi truljenja, se može naći skupina strvinara, koji inače nemaju ekonomsku važnost.

## **2.2. Kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum* Herbst)**

Kestenjasti brašnar pripada među najčešće sekundarne štetnike uskladištenih proizvoda (Macelj, 1999.). Pripada redu Coleoptera (kornjaši) u porodicu Tenebrionidae (mračnjaci). Štetnik je brašna, lomljenog zrna, uljarica i sirovina u tvornicama stočne hrane. Pripada grupi sekundarnih štetnika žitarica, a to znači da ne oštećuje zdravo zrno nego se hrani ranije oštećenim zrnima. Ukoliko je vlaga proizvoda povišena mogu se ubrojiti i među primarne štetnike. Tijelo imaga (slika 1.) je duguljastog oblika od 3-4 mm. Crveno smeđe do kestenjaste boje tijela. Ličinka (slika 2.) je žućkasta do crveno smeđe boje od 6 do 7 mm živi unutar zrna ili proizvoda. Oštećuje suhi materijal životinjskog i biljnog podrijetla najčešće žitarice i žitne prerađevine (<https://rezistentnost-szb.hr/stetnici/agronomija/kestenjasti-brasnar>). Kada temperatura zraka iznosi +7°C kukci ugibaju za 25 dana, a ako je temperatura zraka -6°C ugibaju za samo jedan dan (Ivezić, 2008.).



Slika 1. Imago *Tribolium castaneum*

(foto: A. Liška)



Slika 2. Ličinka *Tribolium castaneum*

(foto: A. Liška)

Štetnici su zbog prevelike upotrebe kemijskih sredstava za njihovo suzbijanje stvorili rezistentnost, tj .postali su otporni na neka kemijska sredstva. Rezistentnost kukaca na insecticide postala je jedno od najvećih problema. Zbog stvorene rezistentnosit na pesticide znanstvenici su se okrenuli prema nekim biološkim riješenjima, a jedno od njih je upotreba eteričnih ulja u suzbijanju štetnika.

## 2.3. Eterična ulja

Dugotrajna primjena kemijskih insekticida rezultirala je nakupljanjem ostataka pesticida u okolišu. Oni štetno djeluje na neciljane organizme, ekosustav i zdravlje ljudi. Stoga se razvijaju i istražuju bio insekticidi „Zeleni pesticidi“ kao alternativa kemijskim insekticidima u poljoprivredi i javnom zdravstvu. Ovo proučavanje usredotočuje se na eterična ulja kao bio-insekticidi za suzbijanje insekata. Eterična ulja imaju insekticidno, fumigantno, atraktivno i repelentno djelovanje protiv širokog spektra insekata. Najveći mortalitet kod kestenjastog brašnara izaziva eterično ulje lavandina. Lucić i sur. 2015. zaključili su da lavandin u kombinaciji s dijatomejskom zemljom može poslužiti kao prirodni insekticid u zaštiti uskladištenih proizvoda.

Eterična ulja su kompleks kemijskih spojeva sa višestrukim načinom djelovanja koji pojačavaju njihovu aktivnost zahvaljujući sinergističkom djelovanju između sastojaka. Zbog svoje isparljivosti u prirodi, eterična ulja se koriste kao sredstvo protiv poljoprivrednih i skladišnih štetnika. Stoga su insekticidi na bazi eteričnih ulja vrlo važni za kontrolu skladišnih štetnika jer imaju brzo djelovanje i nema štetnih rezidua u tretiranim proizvodima (Green%20pesticides.pdf). Zabilježeni su neki problemi (npr. isparljivost) insekticida na bazi eteričnih ulja, što igra važnu ulogu u primjeni eteričnih ulja.

Eterična ulja se obično dobivaju destilacijom vodene pare aromatičnih biljaka, posebno onih koje se koriste kao mirisi i arome za parfeme i prehrambene industrije, odnosno, u novije vrijeme za aromaterapija i kao biljni lijekovi. Eterična ulja se najviše dobivaju od biljaka iz roda Lamiaceae. Sastojci eteričnog ulja su ponajprije lipofilni spojevi koji djeluju kao otrov za ciljanji organizam, te kukac tretiran posljedično prestaje sa ishranom, razmnožavanjem (Isman, 2000.).

Pesticidi na bazi biljnih eteričnih ulja ili njihovih sastavnih dijelova pokazali su učinkovitost protiv velikog broja skladištenih štetnika. Mogu se primijeniti kao fumiganti, u obliku zrnate formulacije ili kao primjena direktnim špricanjem kukaca. Te značajke ukazuju na to da se pesticidi na bazi eteričnih ulja mogu koristiti na različite načine za kontrolu štetnika (Isman, 2005.). Također je vrlo vjerovatno da će se otpornost sporije razvijati prema pesticidima na

bazi eteričnog ulja zbog složenih kemijskih spojeva koji se nalaze u eteričnim uljima (<http://projects.nri.org/adappt/docs/63-84.pdf>).

## 2.4. Lavandin (*Lavandula x intermedia*)

Eterično ulje lavandina ima drugačije djelovanje od onoga prave lavande i bogatije je kamforom (<https://www.svijet-biljaka.hr/index.php/hr/sadnice/lavandin>). Lavandin je križanac prave i širokoliste lavande (slika 3.). Razlog zašto se sadi lavandin je zbog veće iskoristivosti biljke. Naime prava lavanda daje male količine eteričnog ulja, za razliku od lavandina koji daje tri puta više. Osim prinosa, lavanda i lavandin razlikuju se u izgledu, ali i u djelovanju, jer imaju različit kemijski sastav (<https://myoffdays.com/razlika-između-lavande-i-lavandina/>).



Slika 3. Razlika između lavandina i lavande

(izvor: <https://www.google.com/search?q=lavandin>)

Lavanda raste kao grm, veličine 80-120 cm a prilikom cvatnje iznosi i 150 cm. Cvjetne stapke su im duže, a osim glavne stapke, imaju još dvije postrane (slika 4.). Količina ulja kreće se oko 0,9-3,0% u cvijetu. Sjeme je neplodno za razliku od prave lavande. Cvate prvi put krajem

mjeseca srpnja, a drugi put tijekom mjeseca rujna ([http://www.lavanda-lavandin.com/Karakteristike\\_lavande\\_i\\_lavandina.htm](http://www.lavanda-lavandin.com/Karakteristike_lavande_i_lavandina.htm)).



Slika 4. Polje lavandina

(foto: A. Liška)

## 2.5. Nanočestice

Nanočestice se mogu klasificirati kao skupina ultra finih čestica dimenzija od 1 do 100 nm ili manje, posjedujući specifična svojstva po kojima se razlikuju od čestica istog kemijskog sastava ali izvan skale nano veličina (Auffan i sur., 2009.). Nanočestice se mogu formulirati kao emulzije, suspenzije, polimerne ploče i gelovi (Kah i Hofmann, 2014.) ili djeluju kao kapsule na bazi silika gela, kitozana, natrijeva alginata ili polietilen glikola (Shahzad i Manzoor, 2018.).

Mehanizam djelovanja nanoformulacije

U radu koji su objavili Kratz i sur. (2012.) tekst počinje izjavom: "Nanočestice počinju djelovati tek nakon što se postave na željeno mjesto". Drugim riječima, učinkovita formulacija mora ostati neaktivna dok se aktivni spoj ne oslobodi.

Neke od zajedničkih prednosti formulacija pesticida na bazi nanočestica uključuju:

- (a) povećana topljivost u vodi netopljivih aktivnih sastojaka
- (b) povećana stabilnost formulacije
- (c) uklanjanje otrovnih tvari organska otapala u usporedbi s konvencionalnim korištenim pesticidima
- (d) sposobnost sporog otpuštanja aktivnih sastojaka
- (e) poboljšana stabilnost radi sprečavanja njihove rane razgradnje
- (f) poboljšana pokretljivost i veća insekticidna aktivnost zbog manje veličine čestica
- (g) veća površina koja produžuje njihovu dugovječnost (Sasson i sur. 2007.).

Izraz "nanobiotehnologija" je kombinacija nanotehnologije, biotehnologije, znanosti o nanokristalima i nanobiomaterijalima itd. (Huang i sur., 2007.). Znanstvenici iz biologije i polja kemije aktivno se bave sintezom organskih, anorganski, hibridnih i metalnih nanomaterijala, uključujući različite vrste nanočestica koje imaju neobična optička, fiziološka, biološka svojstva (Rai i Ingle, 2012.). Nanotehnologija se uglavnom bavi uvođenjem novih nanomaterijali koji mogu dovesti do novih revolucionarnih otkrića (Srilatha, 2011.). Nanotehnologija može pružiti veliku priliku za razvoj novih pesticida (Caragliai sur., 2011.; Srilatha, 2011.). Zapravo se nanotehnologijom poboljšava izvedba i prihvatljivost tradicionalnih i novih pesticida povećavajući učinkovitost, ciljano djelovanje, sigurnost pri korištenju, te smanjeni troškovi (Anwunobi i Emeje, 2011.). Možemo koristiti nanočestice za pripremu pesticida nove generacije (Barik i sur., 2008.; Prasad i sur., 2014.; Gajbhiye i sur., 2009.). Iako su mnoge metode pripreme za nanočestice se mogu modificirati tako da stvaraju nanokompozite i nanostrukturirani filmovi, potrebni su potpuno novi pristupi za pripremu nekih vrsta specifičnih nanostrukture (Pandurangappa i Lakshminarasappa, 2011.; Srilatha, 2011.).

Nanoformulacije su poput ostalih uobičajenih formulacija pesticida i one pomažu povećavajući prividnu topljivost slabo topivih aktivnih sastojaka ili u oslobađanju aktivnog sastojka na sporiji ili ciljani način, čime se štiti aktivni sastojak protiv prijevremene razgradnje.

Nanočestice koje imaju insekticidna svojstva mogu se koristiti i kao aktivno sredstvo za proizvodnju pesticida ili biopesticida (Barik i sur. 2008.; Elango i sur. 2016.).

Nanoemulzija je mješavina uljne i vodene tekućine. Kako s vremenom u mješavini uljne i vodene faze dolazi do raspadanja dispergiranih kapljica, njihove segregacije u kapljice većih

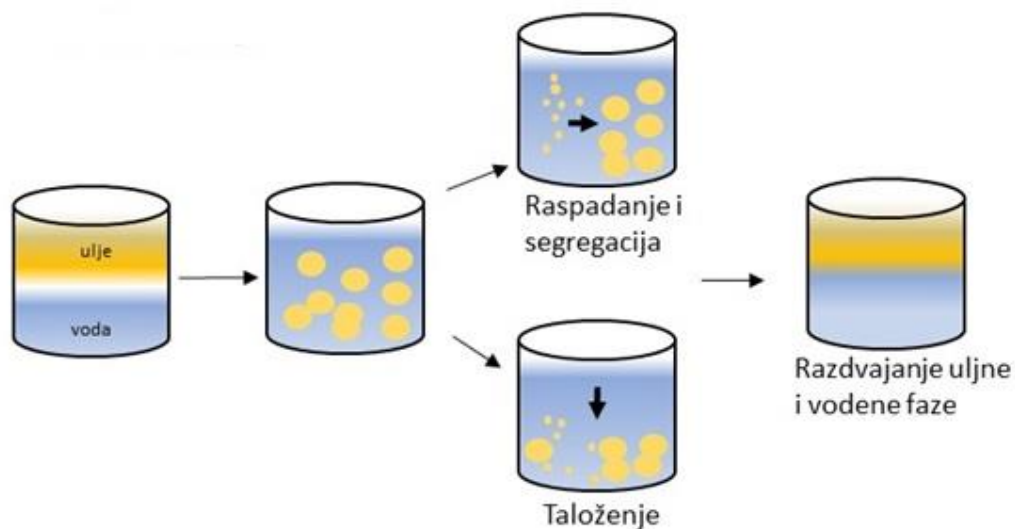
dimenzija i njihove koagulacije, nanoemulziju je potrebno stabilizirati emulgatorima. Emulgatori su površinski aktivne molekule koje u pripremljenoj nanoemulziji štite kapljice nanodimenzija od gravitacijskog taloženja, smanjuju površinsku napetost povećavajući tako kinetičku stabilnost nanoemulzije što ju čini značajno pogodnijom za primjenu od emulzija s makro ili mikro kapljicama (Aswathanarayan i Vittal, 2019.).

Nanoemulzije imaju dimenzije kapljica slične mikroemulzijama u rasponu od <200, a u nekim slučajevima i <100 nm (Saifullah i sur., 2016.). Slično uobičajenim emulzijama, kod nanoemulzijas vremenom dolazi odvajanje faza (McClements i Rao, 2011.). Na nanoemulzije ne utječu fizičke i kemijske promjene, uključujući temperaturu i pH. Za njihovu pripremu potrebna je manja količina emulgatora.

Nanoemulzije imaju mogućnost kapsuliranja funkcionalnih spojeva i aktivnih sastojaka, uključujući antioksidante i nutritivne lijekove. Korisni su i u kontroliranom otpuštanju aromatičnih spojeva u namirnicama (Velikov i Pelan, 2008.; McClements i Rao, 2011.; Ines i sur., 2015.).

Nanoemulzijski pripravak je metoda za poboljšanje karakteristika botaničkih insekticida i učinkovitosti u komercijalnoj upotrebi (Anjali i sur. 2012.). Proizvodni trošak nanoemulzijskih formulacija niži je od one mikroemulzijske formulacije pesticida zbog visoke topivosti u vodi i njihove sposobnosti otapanja hidrofilnih i lipofilnih spojeva, što dovodi do upotrebe manje inertnih i aktivnih sastojaka. U sastavu formulacije s nanoemulzijom, utvrđena je poboljšana biološka učinkovitost pesticida (Green i Beestman 2007.).

Fizikalno-kemijska stabilnost nanoemulzija karakterizira se kao kinetički stabilni sustavi jer se s vremenom raspadaju zbog destabilizirajućih fizičkih mehanizama (gravitacijsko razdvajanje, flokulacija, koalescencija) i kemijske nestabilnosti (Slika 5.). Gravitacijsko odvajanje nastaje zbog različitih relativnih gustoća između raspršene i kontinuirane faze i rezultira stvaranjem gornjeg sloja ili taloženjem. Stvaranje kristalnih lipida ili sitnih kapljica ulja uzrokuje taloženje u uljnim i vodenim nanoemulzijama.



Slika 5. Prikazuje odvajanje uljne i vodene faze

(izvor: Prilagođeno iz: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fsufs.2019.00095/full>)

Kako formiranje nanoemulzije nije spontana pojava, za njeno formiranje je potrebna visoka energija, koju osiguravaju različiti uređaji (visokotlačni homogenizator, mikrofluidizer, ultrazvučni homogenizator) (Maali i Hamed Mosavian, 2013.). Pomoću ovih uređaja primjenjuje se snažna razorna sila za razbijanje dispergirane faze u vrlo sitne kapljice svojstvene nanoemulzijama. Raspon veličina kapljica nanoemulzija kreće se od 20 do 200 nm. Značajne karakteristike nanoemulzija su viša učinkovitost (Anjali i sur., 2010.), smanjena hidroliza i isparenje aktivne tvari (Yang i sur., 2009.). Nadalje, niska površinska napetost nanoemulzije omogućava poboljšano prekrivanje površine prilikom prskanja i raspršenja, kao i bolju penetraciju (Tadros i sur., 2004.). Kako taloženje čestica može utjecati na bioraspoloživost aktivnih tvari emulzija, ova pojava nije slučaj kod nanoemulzija što omogućuje sniženje učestalosti njihove aplikacija (Wang i sur., 2007.). Pojačan unos aktivne tvari primjenom nanoemulzija znanstveno je i dokazan. Tako je u testu s nanoemulzijom na bazi nim ulja utvrđeno kako smanjenje veličine kapljica uvjetuje sniženje  $LC_{50}$  vrijednosti što se može interpretirati kao povećanje unosa sitnijih kapljica (Anjali i sur., 2012.). Također, povećanje unosa aktivne tvari uočeno je kod nanoemulzije na bazi permetrina u odnosu na unos čiste aktivne tvari (Kumar i sur., 2013.).



Autori Moretti i sur. 2002. su predložili mikrokapsulaciju uz uporabu želatine, kao metodu za povećanje učinkovitosti esencijalnih ulja. Nanoenkapsulacija karbamata insekticidom metomils vodenom jezgrom pokazao je veću insekticidnu aktivnost od tradicionalnih metoda (Sun i sur., 2014). Predloženo je da se modificiranom metodom fumigacije, primjenom nanoformulacije, pojača prirodna toksičnost tvari protiv štetnika. Takva metoda, koristeći nano čestice polietilen glikola, značajno povećavaju toksičnost eteričnog ulja protiv *T. castaneum*, *Rhizopertha dominica* (*Bostrichidae*) (Gonzalez-Coloma i sur., 2004.) i lisnog minera rajčice (*Tuta absoluta*) (Campolo i sur., 2017.). Nanoformulacije su također pokazale povećanu aktivnost nanočestica u odnosu na ostale vrste insekticida (Gonzalez i sur., 2016). Štoviše, ova tehnika je povećala postojanost eteričnog ulja i usporila njihovu razgradnju (Sebaaly i sur., 2015.). Nanoformulacije mogu riješiti problem isparavanja eteričnog ulja (Campolo i sur., 2017.) i što je najvažnije, nanoformulacije imaju dobru stabilnost pri skladištenju u širokom rasponu temperature (-10°C do 55°C) (Choupanian i sur., 2017.). Skupina autora Athanassiou i sur., (2013.) izvjestila je o mogućnosti primjene silika gela u mješavini s eteričnim uljima. Ti su autori naglasili da silicij ima nisku toksičnost na sisavce i može se lako ukloniti iz zrna prije prerade.

Nanoformulacija se može uspješno koristiti za povećanje insekticidnog djelovanja i ima veliki potencijal u zaštiti bilja. Nanotehnologija smanjuje količinu korištenih insekticida, izdvajanjem aktivnih sastojaka iz okoliša, što ograničava utjecaj na hranu, okoliš i smanjuje troškovi primjene (Abreu, i sur., 2012.). Polimerni slojeviti silikati također se koriste kao matrica za formulaciju gljivičnih bioinsekticida. Gljivične konidije vrlo su osjetljivi na vanjske čimbenike (abiotski). Dakle, njihova enkapsulacija je potrebna kako bi se osiguralo njihovo stavljanje u promet kao bioinsekticid. Inkapsulirane konidije imaju značajno veću djelotvornost u kontroli štetnika (Batista i sur., 2014.). Druga prednost povezana s primjenom nanočestica za suzbijanje brojnih štetnika, je sporo i kontrolirano otpuštanje eteričnog ulja oslobođenog iz nanogela (Ziaee i sur., 2014). Werdin i sur., (2014.) sugeriraju da je ova metoda jednostavna, isplativa i jednostavna. Važna činjenica je ta da se ova metoda može provoditi na sobnoj temperature (Werdin i sur., 2014.). Ispitano je djelovanje nanogel miritonske kiseline-hitozan seteričnim uljem ekstrahiranim iz biljke kumin *Cumin cyminum L.* protiv *Sitophilus granarius L.* (*Curculionidae*) i *T. confusum* (Ziaee i sur., 2014.). Insekticidna biološka analiza otkrila je da nanogel zajedno s eteričnim uljem ima jače insekticidno

djelovanje od čistog ulja, kumin ulja. Štoviše, ulje kumin je brže izgubilo insekticidno djelovanje (nakon 12 dana, ulje kuminje u potpunosti izgubilo insekticidno djelovanje dok je nanogel izgubio najviše 60% svojeg insekticidnog djelovanja). Aktivnost nanočestica nije testirana samo na odraslim štetnicima. Procijenjen je njihov utjecaj na jaja. Primjerice, u istraživanjima koje su proveli Campolo i sur. (2017.), jaja *T. absoluta* prskana su odgovarajućim polietilen glikolom, eteričnim uljem limuna te je procijenjena smrtnost. Utvrđeno je da eterična ulja djeluju letalno na odrasle štetnike, ali takav učinak nije primijećen u embionalnoj fazi (Campolo i sur., 2017.). Postoje mnoge studije u kojima autori uspoređuju djelotvornost neformuliranih i formuliranih botaničkih tvari. Dobar primjer takvih studija je studija koju su proveli Choupaniani sur. (2017.). Pokazali su da nanoemulzija azadiraktinu odnosu na neformulirani azadiraktin ima značajno učinkovitiju letalnu toksičnost u kontaktnom djelovanju protiv *S. oryzae* (85% do 100%) i *T. castaneum* (74% do 100%).

### 3. MATERIJALI I METODE RADA

#### 3.1. Priprema nanoemulzije

Nanoemulzija (oznake NF) je pripremljena u Laboratoriju za zaštitu uskladištenih proizvoda, Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Korišten je emulgator polisorbit Tween<sup>®</sup>80 dodan kap po kap u staklenu posudu i miješan magnetskom miješalicom u trajanju od 10 min (slika 6.). Nakon toga polako je dodana aktivna komponenta, eterično ulje lavandina (slika 7.) te je mješavina (emulgatora i eteričnog ulja) dalje homogenizirana magnetskim miješanjem (slika 8.). Nakon 20 min dodana je destilirana voda te je sve zajedno izmiješano do potpune homogenizacije. Tako pripremljena emulzija je dalje homogenizirana uz pomoć ultrazvučnog homogenizatora (T18 basicUltraTurrax, IKA<sup>®</sup>) (jačina 3/5, u trajanju od 5 min) (slika 9.) kako bi se dobila nanoemulzija.



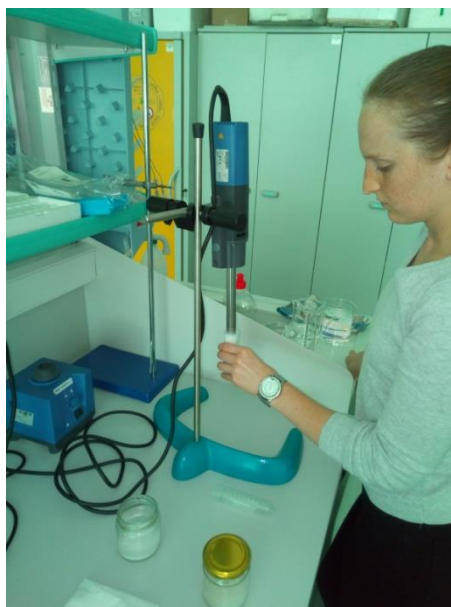
Slika 6. Dodavanje emulgatora Tween<sup>®</sup>80  
(izvor: N. Cecelja)



Slika 7. Dodavanje lavandina  
(izvor: N. Cecelja)



Slika 8. Miješanje svih komponenti magnetskom mješalicom  
(izvor: N. Cecelja)



Slika 9. Priprema nanoemulzije pomoću ultrazvučnog homogenizatora

(izvor: N. Cecelja)

Pripremljene su dvije koncentracije, nanoemulzija 5% i 15%, koje su sadržavale: 5% ulja lavandina; 10% emulgatora Tween<sup>®</sup>80 i 85% vode (5% NF), odnosno 15% ulja lavandina; 5% emulgatora Tween<sup>®</sup>80 i 80% vode (15% NF). (Tablica 1.)

Tablica 1. Sastav formulacija

SASTAV	KONCENTRACIJA	
	5% NF	15% NF
<b>ETERIČNO ULJE LAVANDINA</b>	5%	15%
<b>EMULGATOR TWEEN<sup>®</sup>80</b>	10%	5%
<b>H<sub>2</sub>O DESTILIRANA</b>	85%	80%

Emulzija (oznaka F) s kojom je uspoređivana djelotvornost nanoemulzije pripravljena je u koncentraciji s 15% ulja lavandina i to istom metodom kao i NF, ali je izostavljena homogenizacija ultrazvučnim homogenizatorom.

Pripremljene formulacije NF i F (slika 10.) čuvane su u staklenkama obojanog stakla i držane u tami na sobnoj temperaturi do trenutka primjene.



Slika 10. Pripremljene formulacije  
(izvor: N. Cecelja)

### 3.2. Testni kukci

Korištena je vrsta kestenjasti brašnar (*Tribolium castaneum* Herbst), koja po načinu ishrane pripada primarnim vrstama skladišnih kukaca. Kukci su uzgajani u kontroliranim uvjetima na temperaturi od 24-27°C i rvz 70±5%, na uzgojnoj podlozi od oštrog pšeničnog brašna s dodatkom kvasca. Za testiranje i utvrđivanje insekticidne djelotvornosti testiranih formulacija F i NF, korištene su odrasle jedinice kukaca starosti 2-4 tjedna (slika 11.).



Slika 11. Prosijavanje brašna s *T. castaneum*

(izvor: N. Cecelja)

### 3.3. Test akutne toksičnosti

Test akutne toksičnosti proveden je u Petrijevim posudama (6,0x1,5 cm) koje su sadržavale po 10 odraslih jedinki kukaca. Posude s kukcima su bile kratko izložene niskim temperaturama kako bi se kukci imobilizirali što doprinosi lakšoj aplikaciji formulacija. Formulacije (5% i 15% NF te 15% F) su aplicirane Kartell mikropipetom direktno na prsište odraslih jedinki kukaca (slika 12.) u količini od 0,5  $\mu$ l. Nakon aplikacije Petrijeve posude su poklopljene i stavljene u klima komoru pri 24-27°C i rvz 70 $\pm$ 5%. Test akutne toksičnosti je postavljen u 4 ponavljanja. Kontrolni tretman je postavljen na isti način ali umjesto formulacija, na jedinke kukaca je aplicirana voda u istoj količini. Očitanje akutne toksičnosti je obavljeno u dva navrata, nakon 3 h i 24 h. Jedinke koje nisu pokazivale znakove pomicanja nogu i ticala, smatrani su uginulima.



Slika 12. Apliciranje formulacije Kartell mikropipetom direktno na prsište *T.castaneum*

(izvor: N. Cecelja)

### 3.4. Test sa zrnom pšenice

Test je obavljen na zrnju meke pšenice tretirane formulacijama NF (5% i 15%) i F (15%). U staklenke volumena 200 mL stavljeno je 100 g pšenice s 5% loma zrna pšenice, a formulacije su aplicirane Kartell mikropipetom dozi od 500 ppm (0,05 ml 100 g<sup>-1</sup>). Nakon aplikacije formulacija, staklenke s tretiranim zrnjem su snažno protresene nakon čega je stavljeno po 20 odraslih jedinki kukaca. Posude su hermetički zatvorene poklopcima i čuvane u kontroliranim uvjetima pri 24-27°C i rvz 70±5% (slika 13.). Mortalitet odraslih kukaca bilježen očitanjem iste staklenke nakon 7 i 14 dana od postavljanja tretmana (slika 14.). Nakon očitavanja 14. dana, iz staklenki su izdvojene sve žive i uginule jedinke, a preostali sadržaj staklenki je vraćen i držan u kontroliranim uvjetima do razvoja potomstva F1 generacije (ukupno 63 dana) koje je tada prebrojano. Kontrolni tretman je postavljen na isti način, ali umjesto formulacije na pšenicu je aplicirana voda u istoj količini. Test sa zrnjem pšenice postavljen je u 4 ponavljanja.





Slika 13. Postavljen test sa zrnom pšenice

(izvor: N. Cecelja)



Slika 14. Pregled tretmana

(izvor: N. Cecelja)

### **3.5. Statistička obrada podataka**

Dobiveni rezultati mortaliteta (%) *T. castaneum* i broja potomstva F1 generacije obrađeni su programom SAS/STAT Software 9.4. (SAS Enterprise Guide 7.1 (copyright © 2017 SAS Institut Inc., Cary, NC, USA). Jednosmjerna analiza varijance svih ispitivanih varijabli napravljena je u modulu SAS Analyst i korištena je procedura ANOVA. Utvrđene značajne razlike između tretmana su ispitane Tukey's Studentized Range (HSD) testom na razini vjerojatnosti 0,05.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Rezultati akutne toksičnosti

Rezultati akutne toksičnosti testiranih formulacija ukazuju da su već nakon 3 h od aplikacije djelovale letalno ili paralizirajuće za jedinke *T. castaneum* (Tablica 2.). Međutim, kod izvjesnog broja jedinki, formulacije (NF i F) su izazvale stanje narkoze, što se najviše uočilo kod 5% nanoemulzije NF. Dio jedinki se naknadno oporavilo te je nakon 24 h mortalitet iznosio 57,5% (5% NF) i 92,5% (15% F).

Tablica 2. Mortalitet odraslih jedinki *Tribolium castaneum* nakon akutnog testa s nanoformulacijom NF5%, NF 15% i formulacijom F 15% pri ekspoziciji od 3 h i 24 h

Tretman	Mortalitet (%±Sd)	
	3 h	24 h
NF 5%	82,50±15,00 A	57,50±26,29 B
NF 15%	92,50±9,57 A	92,50±9,57 A
F 15%	97,50±5,00 A	92,50±15,00 A
Kontrola H <sub>2</sub> O* 0,5 µl	0,0±0,0 B	0,0±0,00 C

Df=3; F=98,41; p<0,0001    Df=3; F=30,24; p<0,0001

\*aplicirano na toraks odrasle jedinke *T. castaneum* pri dozi od 0,5 µl.

Nakon 3 h u svim tretmanima (NF 5%, NF 15% i F15%) je utvrđena statistički značajna razlika, u odnosu na kontrolu. Vrijednosti mortaliteta su se kretale od 82,5 % (NF 5%) do 97,5% (F 15%), bez značajnih razlika između formulacija.

Nakon 24 h 30,3% jedinki *T. castaneum* se oporavilo od narkoze te je mortalitet iznosio 57,5%. Značajno viši mortalitet je postignut pri višoj koncentraciji eteričnog ulja lavandina i to kod obje formulacije NF 15% i F 15% (92,5% u oba tretmana). U kontrolnim uzorcima niti nakon 24 h nije bilo uginulih jedinki brašnara.

Tablica 3. Jednosmjerna analiza varijance tretman nakon direktne aplikacije formulacija NF i F na odrasle jedinke *T. castaneum* pri ekspoziciji od 3h i 24 h

One-Way ANOVA; Tukey's studentized Range (HSD) test	Ekspozicija 3h	Ekspozicija 24 h
Alpha	0,05	0,05
Error degrees of freedom	12	12
Error mean square	85,41667	252,0833
Critical value of studentized range	4,19851	4,19851
Minimum significant difference	19,402	33,33

## 4.2. Rezultati tretmana na zrnu pšenice

Prema podacima koji su dobiveni nakon 7 i 14 dana nije utvrđena statistički značajna razlika između tretmana (Tablica 4.). Naime, aplicirane na pšenicu, formulacije nisu pokazale insekticidno djelovanje te nisu uočene razlike u odnosu na kontrolni tretman, niti nakon 14 dana ekspozicije. Vidljivo je da je došlo do porasta potomstva u tretiranom zrnju. Brojnost potomstva F1 generacije se povisilo za 66% (u tretmanu s NF 5%), 96% (u tretmanu s NF 15%) i za čak 134% (u tretmanu s F 15%) u odnosu na brojnost potomstva kontrolnog tretmana. Između tretmana s formulacijama nisu zabilježene statistički značajne razlike. Iz podataka u tablici vidljivo je da se najmanje potomaka razvilo u kontroli (39,5%). Pretpostavka je da je *T. castaneum* zbog prisutnosti eteričnog ulja ubrzao svoj razvoj i došlo je do bržeg razmnožavanja, a kontrola je napravljena s vodom te štetnici nisu osjetili ništa nepoznato i strano, te se nisu osijećali ugroženo. Pretpostavka je da je među jedinkama

brašnara u tretiranom zrnju došlo do povećane potrebe za preživljavanjem te je to moglo rezultirati većim brojem potomstva.

Tablica 4. Mortalitet odraslih jedinki *T. castaneum* i potomstvo F1 generacije u tretmanu sa zrnjem pšenice tretirano nanoformulacijom koncentracije 5% i 15% lavandina i formulacijom koncentracije 15% lavandina pri dozi od 500 ppm (0,05 ml/100g)

Tretman	Mortalitet (%±Sd)		Potomstvo (broj živih odraslih jedinki F1)
	7 dana	14 dana	
NF 5%	0,0±0,00 A	1,2±2,50 A	65,5±31,83 AB
NF 15%	2,5±2,88 A	2,5±2,88 A	77,5±5,50 AB
F 15%	0,0±0,00 A	2,5±2,88 A	92,5±22,48 A
Kontrola H <sub>2</sub> O 0,5µl	2,5±2,88 A	2,5±5,00 A	39,5±14,97 B
	Df=3;F=1,00;p=0,4262	df=3;F=0,13;p=0,9401	df=3;F=4,53;p=0,0241

Tablica 5. Jednosmjerna analiza varijance tretmana sa zrnjem pšenice nakon 7 i 14 dana od aplikacije formulacija NF i F, te potomstva Fi generacije

One-Way ANOVA; Tukey's studentized range (HSD) test	7 dana	14 dana	Potomstvo
Alpha	0,05	0,05	0,05
Error degrees of freedom	12	12	12
Error mean square	8,3333	11,9791	443,5
Critical value of studentized range	4,1985	4,19851	4,1985
Minimum significant difference	6,06	7,26	44,21

## 5. RASPRAVA

Sve veće zanimanje za eterična ulja proizlazi iz brojnih čimbenika, kao što su njihova široka dostupnost, relativno niska cijena i dokazi kako ekstrakti u sastavu biljaka nisu toksični za ljude i kućne ljubimce ([www.hindawi.com/journals/jfq/2018/6906105/](http://www.hindawi.com/journals/jfq/2018/6906105/)). U brojnim istraživačkim radovima eterična ulja su obično pokazali primjetnu akutnu toksičnost (tj. smrtnost) prema ciljanim insektima. Čini se da je to već unaprijed zaključeno, obzirom da ove tvari sintetiziraju biljke kako bi se mogle zaštititi i od insekata. Stoga se postavlja pitanje je li značajka ovisna o dozi, a prema svim podacima čini se da je tako.

Prema prikazanim podacima u radu koje smo dobili pokusom s eteričnim uljem *Lavandula x intermedia* na *T. castaneum* s različitim formulacijama, možemo primjetiti da je nakon 3 h u svim tretmanima vidljiva značajna razlika u odnosu na kontrolu. Vrijednosti mortaliteta su se kretale od 82,5% (NF5%) do 97,5% (F15%) bez značajnih razlika između formulacija. No nakon 24 h 30,3% jedinki *T. castaneum* se oporavilo od narkoze te je mortalitet iznosio 57,5%. Pretpostavka je da su jedinke *T. castaneum* u tretmanu direktne aplikacije na odrasle jedinke zbog jakog mirisa i isparavanja para eteričnog ulja lavandina bile ošamučene, tj. pale u stanje narkoze, te zbog toga u pregledu nakon 3 h nisu pokazivale znakove života, no nakon 24 h sata jedinke koje su bile u stanju narkoze su se oporavile. Djelovanje eteričnih ulja na kukce može biti neurotoksično, sa simptomima sličnim onima koji nastaju pod utjecajem insekticida na bazi organofosfata i karbamata ili inhibitorno na acetilkolin, izazivajući paralizu kukaca (Malašević i sur., 2015). Veći mortalitet postignut je pri većoj koncentraciji eteričnog ulja lavandina i to kod obje formulacije NF 15% i F15% (92,5%). U kontrolnim uzorcima nije utvrđena smrtnost niti nakon 24 h. Autori Bomzan i sur. (2018.) su također u svom istraživanju uočili pojavu narkoze. Naime, odrasle jedinke testiranih kukaca koji su bili izloženi višim koncentracijama piretrina i piretroida razvili su stanje narkoze, odnosno paralize unutar 10 sati izloženosti. Autori naglašavaju kako je dokazano da ove aktivne tvari ulaze u metabolizam kukaca kroz kutikulu do mjesta njihova djelovanja, centralnog i perifernog živčanog sustava. Većina eteričnih ulja i njihovih sastavnih komponenata s insekticidnim djelovanjem imaju sličan način djelovanja na ciljani organizam.

Formulacije aplicirane na zrno pšenice nisu pokazale insekticidno djelovanje te nisu uočene razlike u odnosu na kontrolni tretman ni nakon 14 dana ekspozicije. No vidljivo je da je u tretiranom zrnu došlo do porasta potomstva. Brojnost potomstva F1 generacije se povisilo za 66% (u tretmanima NF 5%), 96% (u tretmanu NF 15%) i 134% (u tretmanu F15%- najjača koncentracija) u odnosu na kontrolu. Prema podacima u tablici vidljivo je da se najmane potomaka razvilo u kontroli i to 39,5%. Pretpostavka je da je *T. castaneum* zbog prisutnosti eteričnog ulja ubrzao svoj razvoj te je došlo do bržeg razmnožavanja, a u kontroli koja je napravljena s vodom nije došlo do povećanog porasta potomstva *T. castaneum*, te se smatra da je razlog tome taj što štetnik nije osjetio ništa strano, te se nije osjećao ugroženo i nije imao potrebu za ubrzanim razvojem tj. bržim razmnožavanjem. Iz podataka vidimo da je u najjačoj koncentraciji najviši porast potomstva *T. castaneum*.

Povećanje potomstva nakon provedenih insekticidnih tretmana roditeljskih parova, dobro argumentira skupina autora Baliota i sur. (2018.). Oni ukazuju da nakon aplikacije insekticida s niskim ili bez insekticidnog djelovanja, tretirani preživjeli kukci nastavljaju s ishranom stvarajući dodatno narušavanje kvalitete uskladištene robe. Nadalje, kukci koji nisu imobilizirani u tretmanu sposobni su se razmnožavati osiguravajući tako pojavu potomstva u kratkom vremenskom periodu od tretmana, čak i u slučaju da smrt roditelja nastupi u kratkom periodu.

## 6. ZAKLJUČAK

Nakon provedenih testiranja insekticidne djelotvornosti razvijenih formulacija na odrasle jedinke *T. castaneum* u tretmanima direktne aplikacije i aplikacije na zrno pšenice te na osnovu dobivenih rezultata možemo iznijeti slijedeće zaključke:

1. Testirane formulacije NF i F su bile učinkovitije direktnoj aplikaciji na samog štetnika. Veći broj štetnika je uginuo, dok je kod izvjesnog broja jedinki, formulacije (NF i F) su izazvale stanje narkoze, što se najviše uočilo kod 5% nanoemulzije NF. Dio jedinki se naknadno oporavilo te je nakon 24h mortalitet iznosio 57,5% (5% NF) i 92,5% (15% F). Viši mortalitet je postignut pri višoj koncentraciji eteričnog ulja lavandina i to kod obje formulacije NF 15% i F 15% (92,5% u oba tretmana), ali bez statistički značajne razlike između tretmana.
2. U tretmanu sa zrnom pšenice niti jedna testirana formulacije nije pokazala značajnije insekticidno djelovanje, te nisu uočene razlike u odnosu na kontrolni tretman, niti nakon 14 dana ekspozicije.
3. Iako do smrtnosti nije došlo, došlo je do suprotne reakcije, do porasta potomstva u tretiranom zrnou. Brojnost potomstva F1 generacije se povisilo za 66% (u tretmanu s NF 5%), 96% (u tretmanu s NF 15%) i za čak 134% (u tretmanu s F 15%) u odnosu na brojnost potomstva kontrolnog tretmana. Pretpostavka je da je *T. castaneum* zbog prisutnosti eteričnog ulja ubrzao svoj razvoj i došlo je do bržeg razmnožavanja. Pretpostavka je da je među jedinkama brašnara u tretiranom zrnou došlo do povećane potrebe za preživljavanjem te je to moglo rezultirati većim brojem potomstva.



## 7. POPIS LITERATURE

1. Abreu, F. O.M. S., Oliveira, 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. AJ, Russell TP, Emrick T, Kolmakov G and Balazs AC. 2012. Probing and Repairing
3. Anjali CH, Sudheer Khan S, Margulis-Goshen K, Magdassi S, Mukherjee A, Chandrasekaran N (2010) Formulation of waterdispersible nanopermethrin for larvicidal applications. *Ecotoxicol Environ Saf* 73:1932–1936
4. Anjali, C.H., Sharma, Y., Mukherjee, A., Chandrasekaran, N. (2012.): Neem oil (*Azadirachta indica*) nanoemulsions as potent larvicidal agent against *Culex quinquefasciatus*. *Pest. Mang. Sci.*, 68(2): 158-163.
5. Anwunobi, A., Emeje, M., 2011. Recent applications of natural polymers in nanodrug delivery. *J. Nanomed. Nanotechnol.* S 4, 002.
6. Aswathanarayan, J.B., Vittal, R.R. (2019.): Nanoemulsions and their potential applications in food industry. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 3(95). doi: 10.3389/fsufs.2019.00095
7. Athanassiou, C. G., Kavallieratos, N. C., Evergetis, E., Katsoula, A. M., & Haroutounian, S. A. (2013). Insecticidal efficacy of silica gel with *Juniperus oxycedrus* ssp. *oxycedrus* (Pinales: Cupressaceae) essential oil against *Sitophilus oryzae* (Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium confusum* (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Economic Entomology*, 106(4), 1902–1910.
8. Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.Y., Lowry, G.V., Jolivet, J.P., Wiesner, M.R. (2009.): Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat. Nanotechnol.* 4: 634-664.
9. Baliota, G., Rumbos, I. C., Athanassiou, G. C. (2018.). From lethality to mortality: exploring the “grey area” of knockdown as an efficacy indicator of different insecticides against major storage insects using a lethality index. *Journal of Pest Science*, 91, 1371–1380.
10. Barik, T., Sahu, B., Swain, V., 2008. Nanosilica—from medicine to pest control. *Parasitol. Res.* 103, 253–258.

11. Batista, D. P. C., Souza, R. d. S., Santos-Magalhães, N. S., de Sena-Filho, J. G., Teodoro, A. V., Grillo, L. A. M., & Dornelas C. B. (2014). Macromolecular Symposia. Polymer/layered silicate nanocomposite as matrix for bioinsecticide formulation. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
12. Benelly, G., Lukehart, C.M. (2017.): Special issue: application of green-synthesized nanoparticles in pharmacology, parasitology and entomology. *Journal of Cluster Science*, 28(1): 1-2.
13. Bomzan, D. P., Bhavya, M. L., Chandu, A. G. S., Manivannan, S., Lavanya, G., Ramasamy, K., Pasha, A. (2018.). Potential of pyrethroid-synergised pyrethrum on stored product insects and implications for use as prophylactic sprays. *Journal of Food Science and Technology* volume 55, 2270–2278.
14. Campolo, O., Cherif, A., Ricupero, M., Siscaro, G., Grissa-Lebdi, K., Russo, A., . . . Palmeri, V. (2017). Citrus peel essential oil
15. Caraglia, M., Rosa, G., Abbruzzese, A., Leonetti, C., 2011. Nanotechnologies: new opportunities for old drugs. The Case of Aminobisphosphonates. *J Nanomed. Biotherap. Discov.* 1, 103e.
16. Choupanian, M., Omar, D., Basri, M., & Asib, N. (2017). Preparation and characterization of neem oil nanoemulsion formulations against *Sitophilusoryzae* and *Tribolium castaneum* adults. *Journal of Pesticide Science*, 42(4), 158–165.
17. Daglish, G. J. (2006.): Opportunities and barriers to the adoption of new grain protectants and fumigants. Proceedings 9 th International Working Conference on Stored Product Protection, Sao Paolo, Brazil, pp: 209-216.
18. Damaged Surfaces with Nanoparticle-Containing Microcapsules. *Nat. Nanotechnol.*, 7: 87-90.
19. Gajbhiye, M., Kesharwani, J., Ingle, A., Gade, A., Rai, M., 2009a. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their activity against pathogenic fungi in combination with fluconazole. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 5, 382–386.
20. Giunti, G., Palermo, D, Laudani, F., Algeri, G.M., Campolo, O. (2019.): Repellence and acute toxicity of nano-emulsion of sweet orange essential oil toward two major grain insect pest. *Industrial Crop & Products*, 142: 111869. DOI:10.1016/j.indcrop.2019.111869.

21. Gonzalez, J. W., Yeguerman, C., Marcovecchio, D., Delrieux, C., Ferrero, A.B., & Ferrero, B. F. (2016). Evaluation of sublethal effects of
22. Gonzalez-Coloma, A., Reina, M., Medinaveitia, A., Guadano, A., Santana, O., Martinez-Diaz, R., . . . De la Fuente, G. (2004). Structural diversity and defensive properties of norditerpenoid alkaloids. *Journal of Chemical Ecology*, 30(7), 1393–1408.
23. Huang, J., Li, Q., Sun, D., Lu, Y., Su, Y., Yang, X., Wang, H., Wang, Y., Shao, W., He, N., 2007. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles by novel sundried *Cinnamomum camphora* leaf. *Nanotechnology* 18, 105104.
24. Islam, M. S., & Talukder, F. A. (2005). Toxic and residual effects of *Azadirachta indica*, *Tagetes erecta* and *Cynodon dactylon* seed extracts and leaf powders towards *Tribolium castaneum*. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 112(6), 594–601
25. Isman, M.B., 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protect.*, 19: 603-608.
26. Ivezić, M. (2008.): Entomologija, Kukci i ostali štetnici u ratarstvu, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku
27. Kah, M., Hofmann, T. (2014.): Nanopesticides research: current trends and future priorities. *Environment International*, 63, 224-235.
28. Kratz K, Narasimhan A, Tangirala R, Moon SC, Revanur R, Kundu S, Kim HS, Crosby
29. Kristek Suzana (2007.): *Agroekologija*, 54
30. Kumar, R.S.S., Shiny, P.J., Anjali, C.H., Jerobin, J., Goshen, K.M., Magdassi, S., et al. (2013). Distinctive effects of nano-sized permethrin in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20(4), 2593–602.
31. Liška, A. (2011.): Insekticidna toksičnost 1, 8-cineola, kamfora i eugenola na *Tribolium castaneum* (Herbst). Doktorski rad. Osijek: Poljoprivredni fakultet u Osijeku.
32. Lucić, P., Liška, A., Rozman, V., Baličević, R., Đumlić, M. (2015.): Potencijal uporabe lavandina (*Lavandula x intermedia*) u zaštiti uskladištene pšenice protiv skladišnih kukaca, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Poljoprivredni fakultet u Osijeku

33. Maali, A., and Hamed Mosavian, M. T. (2013), Preparation application of nanoemulsions in the last decade (2000–2010). *J. Dispers. Sci Tech.* 34, 92–105. doi: 10.1080/01932691.2011.648498
34. Maceljiski M. (1999.): Poljoprivredna entomologija. Zrinski, Čakovec
35. Malešević, S., Grdiša, M., &Carović Stanko, K. (2015). Uporaba eteričnih ulja u zaštiti uskladištenog sjemena. *Agronomski glasnik: Glasilo Hrvatskog agronomskog društva*, 77(1-2), 41-59.
36. McClements, D. J., and Rao, J. (2011). Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 51, 285–330. doi: 10.1080/10408398.2011.559558
37. Moretti, M. D., Sanna-Passino, G., Demontis, S., & Bazzoni, E. (2002). Essential oil formulations useful as a new tool for insect pest control. *AAPSP PharmSciTech*, 3(2), E13.
38. Nanoformulations to control the tomato borer, *Tuta absoluta*: Chemical properties and biological activity. *Scientific Reports*, 7(1), 13036.
39. Pandurangappa, C., Lakshminarasappa, B., 2011. Optical absorption and photoluminescence studies in gamma-irradiated nanocrystalline CaF<sub>2</sub>. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2, 2.
40. polymer-based essential oils nanoformulation on the german cockroach. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 130, 11–18.
41. Prasad, R., Kumar, V., Prasad, K.S., 2014. Nanotechnology in sustainable agriculture: present concerns and future aspects. *Afr. J. Biotechnol.* 13, 705–713
42. Rai, M., Ingle, A., 2012. Role of nanotechnology in agriculture with special reference to management of insect pests. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94, 287–293.
43. Rajashekar, Y., Bakthavatsalam, N., Shivanandappa, T. (2012.): Botanicals as grain protectants. *Psyche*, volume 2012, 13 pages. Doi: 10.1155/2012646740.
44. Saifullah, M., Ahsan, A., and Shishir, M. R. I. (2016). “Production, stability and application of micro- and nanoemulsion in food production and the food processing industry,” in *Nanotechnology in the Agri-Food Industry, Emulsions*, ed A. M. Grumezescu (Cambridge, MA: Academic Press), 405–442. doi: 10.1016/B978-0-12-804306-6.00012-X

45. Sasson, Y., G. Levy-Ruso, O. Toledano and I. Ishaaya, 2007. Nanosuspensions: Emerging Novel Agrochemical Formulations. In: Insecticides Design Using Advanced Technologies, Ishaaya, I., A.R. Horowitz and R. Nauen (Eds.). Chapter 1, Springer-Verlag, Germany, ISBN: 978-3-540-46904-9, pp: 1-39.
46. Shahzad, K., Manzoor, F. (2018.): Nanoformulations and their mode of action in insects: a review of biological interactions. *Drug and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1080/01480545.2018.1525393>
47. Srilatha, B., 2011. Nanotechnology in agriculture. *J. Nanomed. Nanotechnol.* 2, 123.
48. Sun, D., Hussain, H.I., Yi, Z., Siegele, R., Cresswell, T., Kong, L., Cahill, D.M. (2014). Uptake and cellular distribution, in four plant species, of fluorescently labeled mesoporous silica nanoparticles. *Plant Cell Rep.* 33(8), 1389-402.
49. Tadros T, Izquierdo R, Esquena J, Solans C (2004) Formation and stability of nano-emulsions. *Adv Colloid Interface Sci* 108:303–318
50. Velikov, K. P., and Pelan, E. (2008). Colloidal delivery systems for micronutrients and nutraceuticals. *Soft Matter*. 4, 1964–1980. doi: 10.1039/b804863k
51. Wang, L., Li, X., Zhang, G., Dong, J., Eastoe, J. (2007). Oil-in-water nanoemulsions for pesticide formulations. *J. Colloid Interface Sci.* 314, 230-5. Wattanasatcha, A., Rengpipat, S.,
52. Werdin Gonzalez, J. O., Gutierrez, M. M., Ferrero, A. A., & Fernandez Band, B. (2014). Essential oils nanoformulations for stored-product pest control - characterization and biological properties. *Chemosphere*, 100, 130–138.
53. Yang FL, Li XG, Zhu F, Lei CL (2009) Structural characterization of nanoparticles loaded with garlic essential oil and their insecticidal activity against *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). *J Agric Food Chem* 57:10156–10162
54. Ziaee, M., Moharrampour, S., & Mohsenifar, A. (2014). MA-chitosan nanogel loaded with *Cuminum cyminum* essential oil for efficient management of two stored product beetle pests. *Journal of Pest Science*, 87(4), 691–699.

### Internet stranice:

1. <https://repositorij.agr.unizg.hr/islandora/object/agr%3A1242/datastream/PDF/view> 27.2.2020.
2. [file:///C:/Users/PC/Downloads/Najvazniji\\_stetnici\\_uskladistenih\\_poljoprivrednih\\_proizvoda\\_na\\_podrucju\\_BiH%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/PC/Downloads/Najvazniji_stetnici_uskladistenih_poljoprivrednih_proizvoda_na_podrucju_BiH%20(1).pdf) 27.2.2020.
3. <https://repositorij.biologija.unios.hr/islandora/object/bioos%3A65/datastream/PDF/view> 27.2.2020.
4. <https://rezistentnost-szb.hr/stetnici/agronomija/kestenjasti-brasnar> 27.2.2020.
5. [Green%20pesticides.pdf](#) 14.4.2020.
6. <http://projects.nri.org/adappt/docs/63-84.pdf> 27.3.2020.
7. <https://www.svijet-biljaka.hr/index.php/hr/sadnice/lavandin> 27.3.2020.
8. <https://myoffdays.com/razlika-izmedu-lavande-i-lavandina/> 27.3.2020.
9. [http://www.lavanda-lavandin.com/Karakteristike\\_lavande\\_i\\_lavandina.htm](http://www.lavanda-lavandin.com/Karakteristike_lavande_i_lavandina.htm). 27.3.2020.
10. [www.hindawi.com/journals/jfq/2018/6906105/](http://www.hindawi.com/journals/jfq/2018/6906105/) 4.6.2020.

## 8. SAŽETAK

Danas se u poljoprivredi sve više želi potaknuti upotreba ekološki prihvatljivih proizvoda za suzbijanje neželjenih vrsta u samom poljoprivrednom proizvodu. Cilj istraživanja je utvrditi učinkovitost eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* u suzbijanju odraslog stadija *Tribolium castaneum*. U pokusu su pripravljene dvije koncentracije, nanoemulzija 5% i 15%, koje su sadržavale: 5% ulja lavandina; 10% emulgatora Tween<sup>®</sup>80 i 85% vode (5% NF), odnosno 15% ulja lavandina; 5% emulgatora Tween<sup>®</sup>80 i 80% vode (15% NF). Emulzija (oznake F) s kojom je uspoređivana djelotvornost nanoemulzije pripravljena je u koncentraciji s 15% ulja lavandina. Pokus je proveden testom akutne toksičnosti i apliciranjem formulacije na zrno pšenice. Najveći mortalitet zabilježen je direktnim apliciranjem formulacija F i NF pri višoj koncentraciji (15% ulja lavandina) na štetnika, nakon 24 h mortalitet je iznosio 92,5%, dok rezultati u testu sa pšenicom nisu pokazivali insekticidno djelovanje. Između formulacija nije bilo statistički značajnih razlika u djelotvornosti.

**Ključne riječi:** *Lavandula x intermedia*, *Tribolium castaneum*, nanoformulacija, insekticidno djelovanje

## 9. SUMMARY

Today, in agriculture is increasingly encouragement of usage of environmentally friendly products to combat unwanted species in the agricultural product itself. The aim of the study was to determine the effectiveness of *Lavandula x intermedia* essential oil in controlling the adult stage of *Tribolium castaneum*. In the experiment, two concentrations were prepared, nanoemulsions 5% and 15%, which contained: 5% lavender oil; 10% Tween<sup>®</sup>80 emulsifier and 85% water (5% NF) and 15% lavandin oil, respectively; 5% Tween<sup>®</sup>80 emulsifier and 80% water (15% NF). The emulsion (labeled F) with which the nanoemulsion efficiency was compared was prepared in a concentration of 15% lavandin oil. The experiment was performed by the acute test and applying the formulation to the wheat grain. The highest mortality was recorded by direct application of the formulation F and NF at the higher concentration (15% of lavender oil), after 24 h the mortality was 92.5%, while the results from the test in wheat did not show insecticidal activity. There was no statistical differences between tested formulations.

**Key words:** *Lavandula x intermedia*, *Tribolium castaneum*, nanoformulation, insecticidal activity



## 10. PRILOZI

### 10.1. Popis tablica

Tablica 1. Sastav formulacija .....	17
Tablica 2. Mortalitet odraslih jedinki <i>Tribolium castaneum</i> nakon akutnog testa s nanoformulacijom NF5%, NF 15% i formulacijom F 15% pri ekspoziciji od 3 h i 24 h .....	23
Tablica 3. Jednosmjerna analiza varijance tretmananakon direktne aplikacije formulacija NF i F na odrasle jedinke <i>T. castaneum</i> pri ekspoziciji od 3h i 24 h.....	24
Tablica 4. Mortalitet odraslih jedinki <i>T. castaneum</i> i potomstvo F1 generacije u tretmanu sa zrnom pšenice tretirano nanoformulacijom koncentracije 5% i 15% lavandina i formulacijom koncentracije 15% lavandina pri dozi od 500 ppm (0,05 ml/100g) .....	25
Tablica 5. Jednosmjerna analiza varijance tretmana sa zrnom pšenice nakon 7 i 14 dana od aplikacije formulacija NF i F, te potomstva Fi generacije .....	25

### 10.2. Popis slika

Slika 1. Imago <i>Tribolium castaneum</i> .....	6
Slika 2. Ličinka <i>Tribolium castaneum</i> .....	6
Slika 3. Razlika između lavandina i lavande.....	8
Slika 4. Polje lavandina .....	9
Slika 5. Prikazuje odvajanje uljne i vodene faze .....	12
Slika 6. Dodavanje emulgatora Tween <sup>®</sup> 80.....	15
Slika 7. Dodavanje lavandina .....	16
Slika 8. Miješanje svih komponenti magnetskom mješalicom .....	16
Slika 9. Priprema nanoemulzije pomoću ultrazvučnog homogenizatora .....	17
Slika 10. Pripremljene formulacije .....	18
Slika 11. Prosijavanje brašna s <i>T. castaneum</i> .....	19
Slika 12. Apliciranje formulacije Kartell mikropipetom direktno na prsište <i>T.castaneum</i> .....	20
Slika 13. Postavljen test sa zrnom pšenice .....	21
Slika 14. Pregled tretmana.....	21

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku  
Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku  
Sveučilišni diplomski studij bilinogojstva, smjer Zaštita bilja

Diplomski rad

Nanoformulacija na bazi lavandina (*Lavandula x intermedia*) u suzbijanju kestenjastog brašnara (*Tribolium castaneum* Herbst)

Natalija Cecelja

### Sažetak:

Danas se u poljoprivredi sve više želi potaknuti upotreba ekološki prihvatljivih proizvoda za suzbijanje neželjenih vrsta u samom poljoprivrednom proizvodu. Cilj istraživanja je utvrditi učinkovitost eteričnog ulja *Lavandula x intermedia* u suzbijanju odraslog stadija *Tribolium castaneum*. U pokusu su pripremljene dvije koncentracije, nanoemulzija 5% i 15%, koje su sadržavale: 5% ulja lavandina; 10% emulgatora Tween<sup>®</sup>80 i 85% vode (5% NF), odnosno 15% ulja lavandina; 5% emulgatora Tween<sup>®</sup>80 i 80% vode (15% NF). Emulzija (oznake F) s kojom je uspoređivana djelotvornost nanoemulzije pripravljena je u koncentraciji s 15% ulja lavandina. Pokus je proveden testom akutne toksičnosti i apliciranjem formulacije na zrno pšenice. Najveći mortalitet zabilježen je direktnim apliciranjem formulacija F i NFpri višoj koncentraciji (15% ulja lavandina) na štetnika, nakon 24 h mortalitet je iznosio 92,5%, dok rezultati u testu sa pšenicom nisu pokazivali insekticidno djelovanje. Između formulacija nije bilo statistički značajnih razlika u djelotvornosti.

**Rad je izrađen pri:** Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Anita Liška

**Broj stranica:** 37

**Broj grafikona i slika:** 14

**Broj tablica:** 5

**Broj literaturnih navoda:** 54

**Broj priloga:** 2

**Jezik izvornika:** Hrvatski

**Ključne riječi:** *Lavandula x intermedia*, *Tribolium castaneum*, nanoformulacija, insekticidno djelovanje

**Datum obrane:**

**Stručno povjerenstvo za obranu:**

1. dr. sc. Pavo Lucić, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Anita Liška, mentor
3. prof. dr. sc. Vlatka Rozman, član

**Rad je pohranjen u:** Knjižnici fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilištu u Osijeku, Vladimira Preloga 1.

## **BASIC DOCUMENTATION CARD**

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek Graduate thesis**  
**Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek**  
**University Graduate Studies, Plant protection**

Nanoformulations based on lavender (*Lavandula x intermedia*) in suppression of red flour beetle  
(*Tribolium castaneum* Herbst)

Natalija Cecelja

### **Abstract:**

Today, in agriculture is increasingly encouragement of usage of environmentally friendly products to combat unwanted species in the agricultural product itself. The aim of the study was to determine the effectiveness of *Lavandula x intermedia* essential oil in controlling the adult stage of *Tribolium castaneum*. In the experiment, two concentrations were prepared, nanoemulsions 5% and 15%, which contained: 5% lavender oil; 10% Tween<sup>®</sup>80 emulsifier and 85% water (5% NF) and 15% lavandin oil, respectively; 5% Tween<sup>®</sup>80 emulsifier and 80% water (15% NF). The emulsion (labeled F) with which the nanoemulsion efficiency was compared was prepared in a concentration of 15% lavandin oil. The experiment was performed by the acute test and applying the formulation to the wheat grain. The highest mortality was recorded by direct application of the formulation F and NF at the higher concentration (15% of lavender oil), after 24 h the mortality was 92.5%, while the results from the test in wheat did not show insecticidal activity. There was no statistical differences between tested formulations.

**Thesis performed at:** Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek

**Mentor:** Assistant professor Anita Liška

**Number of pages:** 37

**Number of figures:** 14

**Number of tables:** 5

**Number of references:** 54

**Number of appendices:** 2

**Original in:** Croatian

**Key words:** *Lavandula x intermedia*, *Tribolium castaneum*, nanoformulation, insecticidal activity

**Thesis defended on date:**

### **Reviewers:**

1. PhD Pavo Lucić, chair
2. PhD Anita Liška, associate professor, mentor
3. PhD Vlatka Rozman, full professor, member

**Thesis deposited at:** Library, Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek, Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Vladimira Preloga 1.