

**UNIVERZITET EDUCONS**  
**Fakultet zaštite životne sredine**  
**Sremska Kamenica**

**Kapsulacija etarskog ulja karanfilića (*Syzygium aromaticum* L.) i biološka aktivnost formulacija**

**Doktorska disertacija**

**Mentor:**  
**Prof. dr Mira Pucarević**  
**Dr Tatjana Popović Milovanović**

**Kandidat:**  
**Mr Zoran Milićević**

**Sremska Kamenica, 2023.**

**KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA**

Redni broj: RBR	
Identifikacioni broj: IBR	
Tip dokumentacije: TD	Monografska dokumentacija
Tip zapisa: TZ	Tekstualni štampani materijal
Vrsta rada (dipl., mag., dokt.): VR	Doktorska disertacija
Ime i prezime autora: AU	Zoran Milićević
Mentor (titula, ime, prezime, zvanje): MN	Dr Mira Pucarević, redovni profesor Dr Tatjana Popović Milovanović, naučni savetnik
Naslov rada: NR	Kapsulacija etarskog ulja karanfilića ( <i>Syzygium aromaticum</i> L.) i biološka aktivnost formulacija
Jezik publikacije: JP	Srpski, latinica
Jezik izvoda: JI	Srpski / engleski
Zemlja publikovanja: ZP	Republika Srbija
Uže geografsko područje: UGP	Republika Srbija
Godina: GO	2023.
Izdavač: IZ	Autorski reprint
Mesto i adresa: MA	
Fizički opis rada: FO	8 poglavlja / 80 stranica / 15 slika / 12 tabela / 209 referenci
Naučna oblast: NO	Zaštita životne sredine

Naučna disciplina: ND	Zaštita životne sredine
Predmetna odrednica, ključne reči: PO	Pupoljak karanfilića, etarsko ulje, zeolit, želatin, kapsulacija, biološka efikasnost
UDK	
Čuva se: ČU	Biblioteka Univerziteta Educons, Sremska Kamenica
Važna napomena: VN	
Izvod: IZ	<p>Rad na disertaciji bio je fokusiran na sintezi novih, ekološki prihvatljivih formulacija zasnovanih na kapsulaciji etarskog ulja dobijenog iz pupoljaka karanfilića (CEO), sa ciljem poboljšanja rastvorljivosti ulja u vodi i biološke efikasnosti produženim oslobađanjem ulja. Kao nosači u formulacijama izabrani su zeoliti (sintetički i prirodni) i želatin. Predviđeno je da se tri novodizajnirane formulacije u vidu koncentrata za emulziju (EC) (nazvane u ovom radu kao F-CSZ, F-CNZ i F-CG) koriste u poljoprivredi u oblasti zaštite bilja, za suzbijanje štetočina i bolesti. Zbog toga je ispitana biološka aktivnost na odabranim štetočinama i patogenima, koji se mogu naći na otvorenom polju kao i u uslovima skladišta: (i) krompirov moljac <i>Phthorimaea operculella</i>, kao jedna od najvećih štetočina useva iz porodice <i>Solanaceae</i>, (ii) patogena gljiva <i>Botritis cinerea</i>, prouzročivač sive truleži, koja napada voćne vrste (jabučasto, koštičavo), jagodičasto voće, vinovu lozu i nekoliko povrtarskih vrsta, i (iii) patogene bakterije, prouzročivač bakterijske vlažne truleži <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. i <i>Dickeya dianthicola</i>, koje zaražavaju širok spektar biljnih kultura. Svi ovi štetni organizmi širokog spektra domaćina surasprostranjeni u Srbiji i poznato je da izazivaju velike gubitke u prinosu na zaraženim domaćinima. Novodizajnirane CEO formulacije su pokazale produženo delovanje na smrtnost <i>P. operculella</i> tokom izlaganja insekata koncentraciji emulzije od <math>40 \mu\text{L L}^{-1}</math> vazduha. Smrtnost se postepeno smanjivala sa verovatnoćom od 100% nakon prva 24 h na 50% nakon 5 dana za F-CSZ ili nakon 4 dana za formulacije F-CNZ i F-CG. Formulacija sa beleženom najvećom efikasnošću</p>

	<p>F-CSZ omogućava aktivnost tokom 14 dana izlaganja, dok je efekat druge dve formulacije trajao 10 dana. Sve tri formulacije su pokazale visok fungicidni efekat u suzbijanju <i>B. cinerea</i>, prevencijom infekcije i razvoja bolesti. Najbolja efikasnost je dokazana korišćenjem F- CSZ (sintetički zeolit kao nosač) koji pokazuje 100% efikasnost kada se koristi čak i pri najnižoj testiranoj koncentraciji aktivnog CEO (1%). Rezultati <i>in vitro</i> testiranja na patogene prouzrokovaoče vlažne truleži su pokazali da MIC vrednost formulacija CEO iznosi 1% aktivnog CEO. Istraživanjem u ovoj disertaciji predstavljena je nova perspektiva upotrebe etarskih ulja kao alternativnog i ekološki prihvatljivog biopesticida. Formulacije CEO mogu se komercijalno koristiti kao fumiganti ili zaštitni premazi za produženje roka trajanja uskladištenih proizvoda ili na tržištu svežeg voća ili povrća.</p>
<p>Datum prihvatanja teme od strane NN veća: DP</p>	
<p>Datum odbrane: DO</p>	
<p>Članovi komisije (ime i prezime, titular, zvanje, naziv institucije, status): KO:</p>	<p>Predsednik: Prof. dr Nataša Stojić, vanredni profesor Educons Univerzitet Fakultet zaštite životne sredine</p> <p>Član: Doc. dr Ljiljana Ćurčić, docent Educons Univerzitet Fakultet zaštite životne sredine</p> <p>Član: Dr Slobodan Krnjajić, viši naučni saradnik Univerzitet u Beogradu Institut za Multidisciplinarna istraživanja</p>

**KEY WORD DOCUMENTATION**

Number *consecutive: ANO	
Identification number: INO	
Document type: DT	Monograph documentation
Type of record: TR	Textual printed material
Contents code (BA/BSc, MA/MSc, PhD): CC	PhD thesis
Author: AU	Zoran Milićević
Mentor: MN	Dr Mira Pucarević, Full Professor Dr Tatjana Popović Milovanović, Principal Research Fellow
Title: TI	Encapsulation of clove bud essential oil ( <i>Syzygium aromaticum</i> L.) and biology activity of formulations
Language of text: LT	Serbian
Language of abstract: LA	English / Serbian
Country of publication: CP	Republic of Serbia
Locality of publication: LP	Republic of Serbia
Publication year: PY	2023
Publisher: PU	Author's reprint
Publication place: PP	
Physical description: PD	8 chapters / 80 pages / 15 figures / 12 tables / 209 references

Scientific field SF	Environmental Science
Scientific discipline SD	Environmental Science
Subject, Key words SKW	Clove bud, essential oil, zeolite, gelatin, encapsulation, biology efficacy
UC (universal class. code)	
Holding data: HD	Library of the University Educons, Sremska Kamenica
Note: N	
Abstract: AB	<p>This dissertation is addressed on the synthesis of new, eco- friendly formulations based on encapsulation of clove bud essential oil (CEO), with the aim of improving oil solubility in water and biological efficacy by prolonging oil release. Zeolites (synthetic and nature) and gelatin were chosen as carriers in formulations. Three newly designed Emulsifiable Concentrate (EC) formulations (coded in this work as F- CSZ, F- CNZ an F-CG) are predicted to be used in agriculture in the field of plant protection, for pests and disease control. Therefore, biological activity was tested on selected pests and pathogens, which can be found in the open field as well as in storage conditions: (i) potato tuber moth <i>Phthorimaea operculella</i>, as one of the most destructive pests of crops in family <i>Solanaceae</i>, (ii) gray mold fungi pathogen <i>Botrytis cinerea</i>, that infects fruits (pome, stone), berries, grapes, and several vegetable species, and (iii) soft rot bacterial pathogens <i>Pectobacterium carotovorum</i> subsp. and <i>Dickeya dianthicola</i> destructive on a wide range of crop plants. All of these harmful organisms with broad-host-range are widely present in Serbia and known to cause severe losses on attacked plant hosts. CEO formulations evinced a prolonged action on mortality of <i>P. operculella</i> during the insects' exposure to the concentration of the emulsions of 40 <math>\mu\text{L L}^{-1}</math> air. The mortality gradually decreased from a probability of 100% after the first 24 h to 50% after 5 days for F-CSZ or after 4 days for F-CNZ and F-CG. The most promising formulation is F-CSZ enabling activity</p>

	<p>during 14 days of exposure, while the effect of the other two formulations lasted 10 days. All three formulations produced a strong fungicidal effect against <i>B. cinerea</i> by preventing infection and disease development. The best efficacy was evidenced with F-CSZ (synthetic zeolite as a carrier) showing 100% efficacy when it was used even at the lowest tested concentration of active CEO (1%). The results of in vitro testing against soft rot pathogens determined the MIC value of CEO formulations to be 1% of active CEO. By this research, a novel perspective on the use of essential oils as an alternative, environmental biopesticide was presented. CEO formulations can be commercially exploited as a fumigant or preserver coatings to extend the shelf life of stored products or the fresh-fruit or vegetable market.</p>
<p>Accepted by Scientific Board on: AS</p>	
<p>Defended/Viva voce PhD exam. on: DE</p>	
<p>PhD Examination Panel: DB</p>	<p>President: Dr Nataša Stojić, associate professor Educons University Faculty of Environmental Protection</p> <p>Member: Dr Ljiljana Ćurčić, assistant professor Educons University Faculty of Environmental Protection</p> <p>Member: Dr Slobodan Krnjajić, senior research associate University of Belgrade Institute for Multidisciplinary Research</p>

## ZAHVALNICA

*Izuzetnu zahvalnost dugujem mentorima dr Tatjani Popović Milovanović i Prof. dr Miri Pucarević na predloženoj temi, kao i vođenju ove doktorske disertacije, svim korisnim savetima tokom eksperimentalnog dela i sugestijama tokom pisanja rada.*

*Posebnu zahvaljujem dugujem dr Slobodanu Krnjajiću na predloženoj ideji doktorske disertacije, kao i ukazanom poverenju i pomoći tokom izrade eksperimentalnog dela disertacije.*

*Zahvalnost dugujem i Žagar Zori, hemijskom tehničaru za nemerljivu pomoć u sprovođenju mojih ideja u pripremi kapsuliranih formulacija etarskih ulja i ispitivanju fizičkih parametara dobijenih formulacija.*

*Najveću zahvalnost dugujem supruzi Zorici.*



# SADRŽAJ

1.	UVOD.....	1
2.	PREGLED LITERATURE .....	4
2.1.	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry (karanfilić).....	4
2.1.1.	Hemijski sastav ulja karanfilića.....	5
2.1.2.	Metode ekstrakcije.....	10
2.1.3.	Primena etarskog ulja karanfilića .....	13
2.1.4.	Insekticidna aktivnost .....	15
2.1.5.	Antimikrobna aktivnost .....	15
2.1.6.	Baktericidna aktivnost .....	16
2.2.	Kapsulacija .....	17
2.3.	Test organizmi .....	20
2.3.1.	Krompirov moljac, <i>Phthorimaea operculella</i> Zeller .....	20
2.3.2.	<i>Botrytis cinerea</i> Pers. (siva trulež) .....	22
2.3.3.	<i>Pectobacterium</i> sp., <i>Dickeya</i> sp. (vlažna trulež) .....	24
3.	RADNA HIPOTEZA .....	26
4.	MATERIJAL I METODE.....	27
4.1.	Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS).....	27
4.2.	Kapsulacija .....	28
4.3.	Insekticidna aktivnost .....	29
4.4.	Antimikrobna aktivnost .....	30
4.4.1.	Antimikrobna aktivnost prema <i>Botrytis cinerea</i> (siva trulež) .....	30
4.4.2.	Baktericidna aktivnost prema prouzrokovačima vlažne truleži .....	32
4.5.	Statistička obrada podataka .....	32
5.	REZULTATI .....	34
5.1.	Sastav etarskog ulja karanfilića .....	34
5.2.	Kapsulirane formulacije etarskog ulja karanfilića.....	35
5.3.	Insekticidna aktivnost .....	36
5.4.	Antimikrobna aktivnost .....	46
5.4.1.	Antimikrobna aktivnost prema <i>Botrytis cinerea</i> (siva trulež) .....	46
5.4.2.	Baktericidna aktivnost prema prouzrokovačima vlažne truleži .....	49

6.	DISKUSIJA.....	53
7.	ZAKLJUČCI.....	59
8.	LITERATURA.....	61

## SPISAK TABELA

Redni broj	NAZIV TABELE	Strana
1.	Poređenje hemijskog sastava (%) etarskog ulja karanfilića od strane različitih autora	9
2.	Dizajniranje EC formulacija etarskog ulja karanfilića	28
3.	Hemijski sastav etarskog ulja karanfilića utvrđen korišćenjem GC-MS analize	35
4.	Fizički parametri kapsuliranih formulacija etarskog ulja karanfilića (radni rastvor 0.5%)	36
5.	Letalne koncentracije ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) etarskog ulja karanfilića i letalno vreme(dani) kapsuliranih CEO EC formulacija sa odgovarajućim intervalima poverenja, chi i <i>p</i> - vrednosti	37
6.	Letalne koncentracije (LC) utvrđene za etarsko ulje karanfilića (nivo poverenja od 95%) za suzbijanje imaga <i>P. operculella</i>	39
7.	Letalno vreme (LT) utvrđeno za formulaciju F-CSZ (nivo poverenja od 95%) za suzbijanje imaga <i>P. operculella</i>	41
8.	Letalno vreme (LT) utvrđeno za formulaciju F-CNZ (nivo poverenja od 95%) za suzbijanje imaga <i>P. operculella</i>	43
9.	Letalno vreme (LT) utvrđeno za formulaciju F-CG (nivo poverenja od 95%) za suzbijanje imaga <i>P. operculella</i>	45
10.	Efikasnost kapsuliranih formulacija etarskog ulja karanfilića u suzbijanju fitopatogene gljive <i>B. cinerea</i> na plodovima maline ( <i>in planta</i> )	47
11.	Efikasnost kapsuliranih formulacija i čistog etarskog ulja karanfilića usuzbijanju fitopatogenih bakterija prouzrokovaca vlažne truleži ( <i>in vitro</i> )	52
12.	Rezultati analize varijanse za različite tretmane čistog etarskog ulja karanfilića i kapsulirane EC formulacije	52

## SPISAK SLIKA

Redni broj	NAZIV SLIKE	Strana
1.	Štete na krtolama krompira usled ishrane gusenicama krompirovog moljca <i>Phthorimaea operculella</i> (1); detalj prikaza oštećenja i uginule gusenice nakon primene etarskog ulja karanfilića (2) (foto S. Krnjajić)	21
2.	Siva trulež grožđa i jagoda ( <i>Botrytis cinerea</i> ) (foto T. Popović Milovanović, M. Stević)	24
3.	Vlažna trulež krompira ( <i>Pectobacterium</i> sp.) (foto T. Popović Milovanović)	25
4.	Ocena ogleda ispitivanja insekticidne aktivnosti formulacija ulja karanfilića	30
5.	Ispitivanje efikasnosti formulacija ulja karanfilića u suzbijanju sive truleži ( <i>B. cinerea</i> ) na plodovima maline <i>in planta</i> (foto M. Stević)	31
6.	GC–MS hromatogram etarskog ulja karanfilića (Probotanic)	34
7.	Verovatnoća mortaliteta imaga <i>P. operculella</i> izloženih različitim koncentracijama etarskog ulja karanfilića 24h nakon tretmana	38
8.	Verovatnoća mortaliteta imaga <i>P. operculella</i> izloženih tretmanu novodizajnirane formulacije F-CSZ tokom 14 dana, vremenska regresija mortaliteta	40
9.	Verovatnoća mortaliteta imaga <i>P. operculella</i> izloženih tretmanu novodizajnirane formulacije F-CNZ tokom 14 dana, vremenska regresija mortaliteta	42
10.	Verovatnoća mortaliteta imaga <i>P. operculella</i> izloženih tretmanu novodizajnirane formulacije F-CG tokom 14 dana, vremenska regresija mortaliteta	44
11.	Siva trulež maline ( <i>B. cinerea</i> ), kontrolni tretman (bez primene formulacija etarskog ulja karanfilića) (foto M. Stević)	48
12.	Tretmani novodizajniranim formulacijama etarskog ulja karanfilića u suzbijanju sive truleži ( <i>B. cinerea</i> ) (foto M. Stević)	48

13.	Tretmani novodizajniranom formulacijom ulja karanfilića F-CNZ u suzbijanju sive truleži ( <i>B. cinerea</i> ) – detalj (foto M. Stević)	49
14.	Baktericidna aktivnost kapsuliranog i čistog etarskog ulja karanfilića prema bakterijama prouzrokovateljima vlažne truleži u <i>in vitro</i> uslovima; (a) formulacija CNZ; (b) formulacija CSZ; (c) formulacija CG; (d) čisto ulje karanfilića	50
15.	Zona inhibicije utvrđena kod primene novodizajniranih formulacija etarskog ulja karanfilića prema fitopatogenim bakterijama, prouzrokovateljima vlažne truleži	51

## 1. UVOD

Imajući u vidu rastući trend korišćenja etarskih ulja u prehrambenim, poljoprivrednim i hemijskim oblastima, značaj njihovog kontinuiranog istraživanja je nesporan. Izazov sa kojim se suočavamo u oblasti poljoprivrede i zaštite bilja je prevazilaženje negativnog uticaja sredstava za zaštitu bilja poznatih kao sintetički pesticidi na životnu sredinu i ljudsko zdravlje, kao i njihovih ostataka i ambalažnog otpada. Primena sintetičkih pesticida svakako značajno utiče na povećanje prinosa prehrambenih useva i zasada tako što kontrolišu gubitke izazvane prisustvom štetnih organizama (uključujući uglavnom insekte, patogene mikroorganizme i korovske vrste), kako pre tako i tokom skladištenja (Stević 2020). Procena potencijalnih gubitaka prinosa usled prisustva štetnih organizama se navodi od 35% u poljskim uslovima, tokom vegetacije i 14% tokom skladištenja, a što dovodi do ukupnog gubitka i do 50% (Pimentel et al. 1991; Oerke 2006; Devi & Maji 2011; Zamani-Zadeh et al. 2014). Prema Moore et al. (2000) konvencionalne metode suzbijanja štetnih organizama zasnovane na primeni sintetičkih pesticida u uskladištenim proizvodima su limitirane iz mnogih razloga, uključujući zdravlje ljudi, negativan uticaj na životnu sredinu, troškove koštanja kao i regulatorna ograničenja.

Globalno tržište u današnje vreme zahteva više svežeg voća i povrća bez ostataka pesticida. Borba protiv zagađenja životne sredine i njegovog uticaja na životne sisteme nametnula je zamenu sintetičkih hemikalija alternativnim. Prekomerna upotreba sintetičkih pesticida u zaštiti bilja uzrokuje negativne posledice na životnu sredinu, a povećani nivo ostataka pesticida u gotovim proizvodima odnosno hrani utiče na zdravlje ljudi. Takođe, zaštita bilja zasnovana na primeni pesticida u uskladištenim proizvodima je ugrožena iz većeg broja razloga, uključujući troškove, regulatorna ograničenja i opasnosti po zdravlje i životnu sredinu (Moore et al. 2000).

U cilju smanjenja primene pesticida širom sveta sprovode se programi integralne zaštite biljaka (Integrated Pest Management - IPM), koji nalažu primenu ekološki prihvatljivih sredstava i metoda, a među kojima su između ostalih i etarska ulja, koja se koriste kao biopesticidi

(Vinceković i sar. 2020; Špirović Trifunović & Tojić 2022). Stoga, uvođenje prirodnih biopesticida, kako mikrobnog tako i biljnog porekla, ima za cilj da bude obećavajuća alternativa konvencionalnim pesticidima.

Etarska ulja su po sastavu složene smeše monoterpena, seskviterpena i fenilpropanskih jedinjenja u različitim koncentracijama. Dve ili tri glavne komponente su najčešće prisutne u višim koncentracijama (20-70%) (Kovačević 2002; Bakkali et al. 2008). Ustanovljeno je da etarska ulja iz mnogih začinskih i lekovitih biljaka poseduju insekticidna, antimikrobna, antibakterijska, antivirusna, nematocidna i fitocidna svojstva i do sada je iz više od 90 biljnih familija izolovano preko 1700 komponenti (Isman 2000; Kumar et al. 2007; Bakkali et al. 2008; Maffei et al. 2011; Dudareva et al. 2013). Biopesticidi na bazi biljnih etarskih ulja dobijaju sve veću pažnju u prehrambenoj i poljoprivrednoj industriji (Isman 2000, 2006; Bakkali et al. 2008; Koulet al. 2008; Majeed et al. 2015; Bakry et al. 2016). Etarsko ulje karanfilića (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry, syn. *Eugenia aromaticum*, *E. caryophyllata*, Myrtaceae family) je poznato po svojoj insekticidnoj, antimikrobnoj i nematocidnoj aktivnosti zahvaljujući eugenolu kao glavnoj aktivnoj komponenti (Sangwan et al. 1990; Ho et al. 1994; Obeng-Ofori & Reichmuth 1997; Wilson et al. 1997; Bakkali et al. 2008; Meyer et al. 2008; Siripornvisal et al. 2009; Taniwiryo et al. 2009; Nurdjannah & Bermawie 2012; Barakat 2014; Hamini-Kadar et al. 2014; Tian et al. 2015; Jairoce et al. 2016; Mossa 2016; Oro et al. 2020; Kačániová et al. 2021; Elnabawy et al. 2022). Eugenol se koristi u tradicionalnoj medicini, kao baktericid, fungicid, nematocid, anestetik, a ima i fitocidno delovanje (Isman 2000; Bakkali et al. 2008; Siripornvisal et al. 2009; Taniwiryo et al. 2009; Tian et al. 2015; Meseldžija & sar. 2017; Elnabawy et al. 2021). Osim eugenola koji čini od 49 do 87% ulja, ulje karanfilića sadrži i  $\beta$ -kariofilen (4-21%), eugenil acetat (0,5–21%), manje količine  $\alpha$ -humulena (<1%) zajedno sa 25 do 35 drugih sastojaka koji su prisutni u tragovima (Santos et al. 2009).

Iako se prema brojnim studijama etarska ulja navode kao izvrsna u biološkom delovanju (Isman 2000; Kumar et al. 2007; Bakkali et al. 2008) njihova upotreba je u praksi ograničena usled nerastvorljivosti u vodi, velike isparljivosti, brze oksidacija i degradacije (Bakry et al. 2016; Vishwakarma et al. 2016). U cilju prevazilaženja ovih problema, različite tehnike mogu obezbediti njihovu fizičku stabilnost, zaštitu od isparavanja i potrebnu rastvorljivost u vodi. Kapsulacija etarskih ulja u odgovarajuće nosače je tehnika gde je bioaktivna supstanca, okružena nosačem matriksa, koji omogućava kontrolu brzine bioaktivnog oslobađanja (Devi & Maji 2011;

Majeed et al. 2015; Vishwakarma et al. 2016; Maes et al. 2019; Liao et al. 2021). Polimer premaz ima tendenciju da poveća stabilnost i efikasnost ulja tako što produžava brzinu oslobađanja aktivne komponente (Devi & Maji 2011; Beirão-da-Costa et al. 2013; Hill et al. 2013; Sun et al. 2013; Majeed et al. 2015; Mohammadi et al. 2015a, 2015b; Vishwakarma et al. 2016). Najčešći polimeri koji se koriste za inkapsulaciju su želatin, arapska guma, skrob i proteini surutke (Beirão-da-Costa et al. 2013; Lević et al. 2014; Majeed et al. 2015; Froio et al. 2019a).

Glavni cilj ove disertacije je da se kroz ponudu novodizajniranog, ekološki prihvatljivog, bezbednog biopesticida omogući alternativa primeni sintetičkih pesticida u poljoprivrednoj proizvodnji.

Stoga, ciljevi doktorske disertacije su bili da se izvrši:

- analiza sastava etarskog ulja karanfilića i sadržaja komponenti u ulju;
- kapsulacija etarskog ulja karanfilića korišćenjem zeolita (prirodnog i sintetičkog) i želatina kao nosača u EC formulaciji (koncentrat za emulziju) sa ciljem poboljšanja rastvorljivosti u vodi i omogućavanja produženog delovanja ulja;
- ispitivanje insekticidne aktivnosti čistog etarskog ulja karanfilića i novosintetisanih formulacija na test organizam (krompirov moljac, *Phthorimaea operculella*);
- ispitivanje antimikrobne aktivnosti čistog etarskog ulja karanfilića i novosintetisanih formulacija na test organizme (fitopatogena gljiva *Botrytis cinerea*, prouzrokovac sive truleži i fitopatogene bakterije prouzrokovaci vlažne truleži: *Pectobacterium carotovorum*, *Dickeya dianthicola*).



## 2. PREGLED LITERATURE

### 2.1. *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry (karanfilić)

*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry (syn. *Eugenia aromaticum*, *E. caryophyllata*), u narodu poznat kao karanfilić, klinčić, karanfilovac, je jednogodišnja biljka koja pripada porodici Myrtaceae, koja obuhvata 145 rodova i između 3800 i 5600 vrsta (Govaerts et al. 2008).

Familija *Myrtaceae* je dobila ime po rodu *Myrtus*, koja broji svega tri priznate vrste (*M. communis*, *M. nivelii* i *M. phyllireaefolia*), dok je rod *Eucalyptus* rod sa najvećim brojem vrsta, a rasprostranjen je u Australiji, Novoj Gvineji i susednim ostrvima. Familija *Myrtaceae* se deli na dve glavne potfamilije: *Leptospermoideae* i *Myrtoideae*. Potfamilija *Leptospermoideae* je rasprostranjena uglavnom u Aziji i Africi, dok se potfamilija *Myrtoideae* nalazi u tropskim krajevima (Amerika, Azija, Australija i Pacifik). Glavne karakteristike potfamilije *Myrtoideae* su mesnat plod i naspramni listovi (Wagner et al. 1990) za razliku od potfamilije *Leptospermoideae* koja ima suv plod (Cronquist 1981). Većina biljaka iz porodice *Myrtaceae* su ili zimzeleno žbunje ili drvenasto drveće. Kod mladih biljaka listovi su okrugli i bliži granama, a kako biljke stare postaju duži i tanji. Listovi su jednostavni, najčešće naspramni i sa celom ivicom, i često su prisutne uljane žlezde. Cvasti su pazušne ili terminalne, cimosne ali različito raspoređene i mogu da sadrže jednu, dve ili veći broj bočnih osnova. Cvetovi su biseksualni, polimorfni ili aktinomorfni. Hipantijum obično straste sa zidom plodnika i izdužuje se iznad njega. Čašični i krunični listići zajedno čine cvetni omotač (perijant), koji se sastoji obično po četiri ili pet listića. Prašnici su obično veoma upadljivi, jarke boje i brojni, grupisani u snopove, a mogu biti i pojedinačni, dok je plodnik podcvetan. Plod je obično lokulicidna kapsula, sferična bobica sa košticom (sa jednom ili više semenki) ili orah. Seme je obično bez endosperma ili retko sa tankim endospermom, dok embrion može biti ravan ili zakrivljen. Budući da mnoge vrste iz

porodice imaju atraktivne zelene listove i šarene cvetove, kao i veliku toleranciju na sušu spadaju u popularne ukrasne biljke.

Generalno, familija *Myrtaceae* obuhvata pretežno tropsko i suptropsko drveće i žbunje, a kao najpoznatije vrste ove familije navode se ukrasne biljke kao što je *Leptospermum* (australsko drvo čaja), *Eucalyptus*, *Verticordia* (cveće perja) i *Callistemon*. Ekonomski najznačajniji taksoni ove familije su *Eucalyptus*, *Pimenta*, *Psidium*, *Syzygium*, *Melaleuca*, *Eugenia*, *Acca/Feijoa*, *Myrciaria*, *Ugni* i *Rhodomyrtus*.

Vrsta *S. aromaticum* je tropsko, zimzeleno drvo poreklom sa Molučkih ostrva (Indonezija) dostiže visinu od 10 do čak 20 m. Najveće površine pod ovom kulturom nalaze se u Indoneziji, Tanzaniji, Šri Lanci, Maleziji, i na Madagaskaru. Karanfilić ili klinčić je naziv za osušeni cvetni pupoljak karanfilovca. Iako je za njega vezuje karakterističan intenzivan i oštar miris, njegov miris je ujedno i veoma prijatan. U farmaceutskoj industriji se kao sirovina koriste cvetni pupoljci *Caryophylli flos* (*Syzygium aromaticum*, flos) za koje je poznato da imaju lekovita svojstva, dok se za proizvodnju etarskog ulja karanfilića *Caryophylli aetheroleum* (*Syzygium aromaticum*, floris aetheroleum) ujedno koriste i listovi i plodovi, kao i kora drveta. Kora stabla *S. aromaticum* je siva i glatka, a listovi veliki, celi, jajasto dugi eliptični i naspramni. Površina lista je kožasta i gusto prekrivena uljanim žlezdama, a peteljka je vidljiva. Lisni pupoljci su terminalni, sa centralnom stabljikom koja nosi jedan završni list koji se prvi razvija, dok se ostali razvijaju kao završni pupoljci bočnih stabljika ili metlice. Cvetovi su mali, dvopodni, beli ili crvenkasto- ružičaste boje, sastoji se od četiri latice i sakupljeni su u grozdaste cvasti. Pupoljci su beli na početku, zatim postaju zeleni, a kada dostignu dužinu od 1,5 do 2 cm dobijaju crvenu boju (Alfikri et al. 2020). Čašica cveta je cilindrična, cvetovi jarko crveni sa brojnim prašnicima i tučkom koji je niži u odnosu na prašnike. Plod je lažna bobica. Bobice su duguljaste, crvene ili tamno ljubičaste i sadrže jedno ovalno seme. Period cvetanja je od januara do februara, a period plodonošenja je od juna do jula (Wei et al. 2016).

### 2.1.1. Hemijski sastav ulja karanfilića

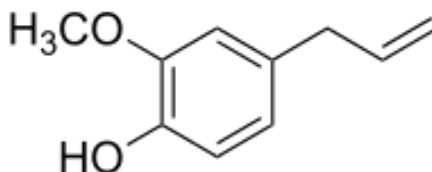
Etarska ulja predstavljaju relativno veliku grupu biljnih metabolita. Sastoje se iz isparljivih, lipofilnih jedinjenja male molekulske mase i visokim naponom pare. Ove osobine im pružaju mogućnost lakog prolaska kroz ćelijski zid, a samim tim i oslobodanje u vanjsku sredinu.

Smeše različitih jedinjenja ulaze u sastav isparljivih organska jedinjenja. Uglavnom se sastoje od terpena (monoterpena i seskviterpena), fenilpropanoida, razgradnih proizvoda masnih kiselina, kao i aminokiselina i alkana, alkena, estera, aldehida i ketona koji mogu biti različitog biosintetskog porekla. Do sada je poznato da je iz preko 90 biljnih familija izolovan velik broj komponenti, preko 1700 (Maffei et al. 2011; Dudareva et al. 2013). Poznato je i to da se mogu sintetisati se u svim biljnim organima, nakon čega se oslobađaju u zemljište ili u atmosferu. Isparljiva jedinjenja (kao što su monoterpeni i seskviterpeni) se sintetišu i nalaze u specijalnim sekretornim tkivima u biljci, u žlezdanim dlakama- egzogeno ili u sekretornim kanalima i šupljinama- endogeno (Maffei 2010). Ova isparljiva jedinjenja su uglavnom okarakterisana sa 2-3 glavna aktivna sastojka, koja se nalaze u višim koncentracijama u ulju (i do 70%). Ove komponente najviše određuju biološke osobine svakog etarskog ulja (Kovačević 2002; Bakkali et al. 2008).

Etarsko ulje pupoljaka karanfilića (CEO) (*eng.* clove bud essential oils) sadrži preko 20 komponenti (Tabela 1) pri čemu su glavne aromatične komponente eugenol i eugenil acetat. Za ove komponente je karakteristično da imaju jaka antioksidativna svojstva, pri čemu ona mogu delovati na dva različita načina (Safrudin et al. 2015). Koncentracija od 500 µg/ml eugenola, eugenil acetata i benzil alkohola inhibira oksidaciju heksanola, dok se u koncentraciji 160 µg/ml inhibira malonaldehid koji nastaje iz uljanog ekstrakta karanfilića (Lee & Shibamoto 2001). Eugenol predstavlja glavnu CEO komponentu koja je zastupljena sa oko 50%, a 10-40% CEO čine eugenil acetat, β-kariofolen i α-humulen. Manje od 10% CEO predstavljaju komponente koja se nalaze u manjem procentu ili u tragovima poput dieril ftalat, kariofilen oksida, α-kopena, 4-(2-propil) fenol i druge prikazane u tabeli 1 (Bakkali et al. 2008; Bakry et al. 2016; El-Saber Batiha et al. 2020).

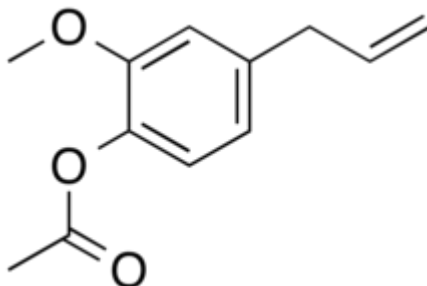
Eugenol (4-alil-2-metoksifenol, C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>, molekulska masa 164.2, CAS 97-53-0) je fenilpropanoidno jedinjenje koje se nalazi u biljkama poput *S. aromaticum*, *Cinnamomum* spp., *Piper nigrum*, *Zingiber officinale*, *Origanum vulgare* i *Thymus vulgaris*. Predstavlja isparljivo jedinjenje čija boja varira od bezbojne do svetlo žute, a odlikuje ga niska rastvorljivost u vodi (približno 2460 mg/L na 25 °C), jak miris i intenzivan ukus. Do sada je pokazao insekticidnu, antimikrobnu, antiinflamatornu, zarastajuću, antivirusnu, antioksidativnu i antikancerogenu aktivnost (Haro-González et al. 2021). Za eugenol je utvrđeno da predstavlja kontaktni, brzo delujući insekticid koji pokazuje dobre rezultate u suzbijanju velikog broja štetočina, zbog čega je

našao primenu u suzbijanju vaši i grinja, naročito na ukrasnim biljkama. Osim kod ukrasnih biljaka, danas se i u organskoj proizvodnji široko koriste komercijalni proizvodi koji po sastavu sadrže ulje karanfilića (Dayan et al. 2009). Osim toga, eugenol se koristi kao baktericid, fungicid, nematocid, a ima i fitocidno delovanje (Isman 2000; Bakkali et al. 2008; Siripornvisal et al. 2009; Taniwiryo et al. 2009; Tian et al. 2015; Meseldžija i sar. 2017; Elnabawy et al. 2022).



Strukturna formula eugenola

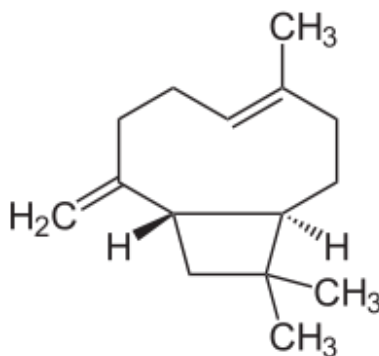
Eugenol-acetat [(2-metoksi-4-prop-2-enilfenil) acetat, C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>, molekulska masa 206.241, CAS 93-28-7] je fenilpropanoidni derivat eugenola koji pokazuje antibakterijsku, antikancerogenu, antimutagenu, antioksidativnu i antivirusnu aktivnost. Utvrđeno je da ima inhibitorno delovanje, zatim opisan kao snažan antioksidans, a takođe je pokazao potencijalnu antifungalnu aktivnost. Osim toga poseduje visoku toksičnost, pa se potencijalno može koristiti i kao larvicid. Slično eugenolu prisutan je kod nekoliko biljaka poput *S. aromaticum*, *Acacia nilotica* i *Piper betle* (Haro-González et al. 2021).



Strukturna formula eugenol-acetata

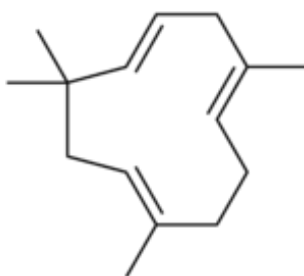
β-kariofilen [4,11,11-trimetil-8-metilen-biciklo(7.2.0)-undek-4-en, C<sub>15</sub>H<sub>24</sub>, molekulska masa 204.36, CAS 87-44-5] je prirodni biciklični seskviterpen. Jedan je od sastojaka velikog broja esencijalnih ulja, posebno ulja karanfilića, potom eteričnog ulja od konoplje (*Cannabis*

*sativa*), ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*), crnog bibera (*P. nigrum*), *Eugenia cuspidifolia*, *E. tapacumensis* i hmelja. Obično se sreće kao smeša sa izomerima izokariofilenom i  $\alpha$ -humulenom ( $\alpha$ -kariofilenom). Kariofilen je specifičan po ciklobutanskom prstenu, koji se retko nalazi u prirodi. Nerastvorljiv je u vodi, ali je rastvorljiv u etanolu. Utvrđeno je da ima antimikrobne, antikancerogene, antiinflamatorne, antioksidativne, anksiolitičke i lokalne anestetičke efekte i antikancerogena svojstva (Haro-González et al. 2021).



Strukturna formula  $\beta$ -kariofilena

$\alpha$ -humulen [(1E,4E,8E)-2,6,6,9-Tetrametilcikloundeka-1,4-8-trien,  $C_{15}H_{24}$ , molekulska masa 204.357, CAS 6753-98-6] je monociklični sekviterpen koji se nalazi u biljkama poput *S. aromaticum*, *Senecio brasiliensis*, *Humulus lupulus* i *Salvia officinalis*. Ovo jedinjenje je pokazalo antiinflamatorno i antitumorsko delovanje kod raka pluća, debelog creva, prostate i dojke. A neke studije su objavile da je  $\alpha$ -humulen pokazao i antiproliferativnu aktivnost i promenu membrane mitohondrijske ćelije u ćelijama raka debelog creva. Osim toga, utvrđeno je da  $\alpha$ -humulen poseduje larvicidno i ovidno dejstvo, kao i visoku toksičnost prema pojedinim insektima (Haro-González et al. 2021).



Strukturna formula  $\alpha$ -humulena

**Tabela 1.** Poređenje hemijskog sastava (%) etarskog ulja karanfilića od stane različitih autora

Komponenta	Golmani et al. (2017)	Kennouche et al. (2015)	Gonzalez-Revira et al. (2016)
Eugenol	+	+	+
Eugenil acetat	+	+	+
$\beta$ -kariofilen	+	+	+
$\alpha$ -humulen	+	+	+
Kariofilen oksid	+	-	+
$\alpha$ -kopaen	-	+	+
Havikol	+	+	-
Metil salicilat	+	+	-
Benzaldehid	+	-	-
Benzil acetat	+	+	-
2-nonanon	+	-	-
Benzil benzoat	+	-	-
Etil benzoat	+	+	-
1,8-cineol	-	+	-
1,3,8-p-mentatrien	-	+	-
2-heptanon	-	+	-
2-heptil acetat	-	+	-
2-nonanol	-	+	-
6-metil coumarin	-	+	-
Acetofenon	-	+	-
Kariofilylen alkohol	-	+	-
Epizonaren	-	+	-
Germacren D	-	+	-
Metil benzoat	-	+	-
Metil eugenol	-	+	-
Metil undekanoat	-	+	-
N-citronelil butirat	-	+	-
Viridiflorol	-	+	-
Z-nerolidol	-	+	-
$\alpha$ -pinen	-	+	-
$\beta$ -kubeben	-	+	-
$\beta$ -pinen	-	+	-
$\gamma$ -gurjunen	-	+	-
$\delta$ -kadinen	-	+	+
$\rho$ -akoradien	-	+	-
$\rho$ -cimen	-	+	-

### 2.1.2. Metode ekstrakcije

Usled velike primene etarskih ulja u industriji (prehrambena, farmaceutska, kozmetička, ali i druge industrije) došlo je do razvoja većeg broja tehnika koje su svoju primenu našle i prilikom ekstrakcije ulja iz biljnog materijala. Zbog velikog broja metoda koje se mogu koristiti izvršena je njihova podele u dve grupe. U okviru prve grupe nalaze se klasične (konvencionalne/tradicionalne), dok su u drugu grupu svrstane inovativne (savremene/novije) metode (Rassem et al. 2016; Špirović Trifunović & Tojić 2022).

U klasične metode, koje se danas u najvećoj meri koriste u svrhu izolovanja etarskih ulja iz biljaka, ubrajaju se: „hidrodestilacija“, „destilacija vodenom parom“, „ekstrakcija rastvaračima“, „Soxhlet ekstrakcija“ i „hladno presovanje“. Jedan od osnovnih nedostataka ovih metoda navodi se korišćenje visokih temperatura koje mogu dovesti do hemijskih promena kod etarskih ulja pa samim tim i kvalitet ekstrahovanog etarskog ulja može biti smanjen (Rassem et al. 2016).

U inovativne metode spadaju „ekstrakcija superkritičnim fluidom“, „hidrodestilacija uz pomoć mikrotalasne pećnice“ i „ultrazvučna ekstrakcija“. Prednost ovih metoda je da se prilikom njihove primene skraćuje proces trajanja ekstrakcije, smanjuje potrošnja energije, kao i upotreba rastvarača i emisije CO<sub>2</sub>, što je posebno značajno prilikom proizvodnje skupih i niskoprinosnih etarskih ulja (Rassem et al. 2016). Kako bi se dobilo etarsko ulje konstantnog sastava potrebno je koristiti uvek istu ekstrakcionu metodu, sa istog organa biljke određene faze razvoja, i sa određenog životnog staništa.

„Hidrodestilacija“ („Hydrodistillation-HD“) je metoda koja se najčešće koristi za ekstrakciju ulja iz biljnog materijala (Meyer-Warnod et al. 1984). Postoje tri vrste hidrodestilacije biljnog materijala: (1) „destilacija vodom“ (meša se sa vodom), (2) „destilacija vodom i parom“ i (3) „destilacija vodenom parom“ (kada nije direktno u kontaktu sa vodom). Ekstrakcija etarskih ulja se zasniva na zagrevanju uzorka, što dovodi do prelaska jedinjenja u gasovitu fazu, nakon čega u kondenzatoru dolazi do njihove kondenzacije. Dobijeno etarsko ulje se suši pomoću anhidrovanog Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, potom čuva u eksikatoru do konstantne mase, nakon čega se meri prinos koji se izražava u g / 100 g (%) suvog biljnog materijala i čuva u frižideru (temperatura 4 °C). Osim ovog načina, etarsko ulje se može ekstrahovati maceracijom. Prilikom ove metode se koriste dva ekstrakta, vodeni čiji macerat treba procediti kroz Buchner-ov levak nakon 24 h i acetonski

koji treba filtrirati korišćenjem filter papira (Šućur 2015). Osim pomenutih načina Abd-ElGawad et al. (2020) su koristili proceduru koja zahteva destilaciju uzorka u aparatu Clevenger, gde nakon 3h dolazi do odvajanja uljanog sloja tečno-tečnom ekstrakcijom sa dietil-etrom do se ulje suši anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ .

„Destilacija vodenom parom“ („Steam Distillation-SD“) je jedna od klasičnih metoda za izolaciju etarskog ulja iz biljnog materijala. U procesu destilacije vodenom parom biljni materijal se izlaže vodenoj pari, tako da para prolazi/cirkuliše kroz materijal i na taj način oštećuje ćelijski zid i iz ćelije se oslobađaju etarska ulja. Nakon ovog procesa dobija se mešavina etarskog ulja i vodene pare, nakon čega se vodena para kondenzuje (Rassem et al. 2016; Špirović Trifunović & Tojić 2022).

„Ekstrakcija rastvaračem“ odnosno „tečno-tečna ekstrakcija“ predstavlja postupak razdvajanja jedinjenja na osnovu njihove rastvorljivosti u jednoj od dve faze kondenzuje (Špirović Trifunović & Tojić 2022). Zahteva korišćenje dve tečnosti čije mešanje nije moguće i perforirane posude u kojima se biljni materijal više puta ispira. Ova metoda se najčešće koristi u proizvodnji parfema, biodizela i biljnih ulja (Rassem et al. 2016). Ono što ograničava primenu ove metode je rastvorljivost jedinjenja u rastvaračima koji se koriste, dok se kao nedostaci metode navode: toplota koja može značajno uticati na količinu i kvalitet ekstrahovanog ulja, trajanje same ekstrakcije; nezadovoljavajući prinos kao i velika potrošnja rastvarača (Dawidowicz et al. 2008).

Soxhlet ekstraktor je uređaj koji je konstruisan od strane Franc von Soxhleta (Soxhlet et al. 1879), pri čemu ova metoda predstavlja cirkulacionu ekstrakciju sa povremenim ispuštanjem ekstrakta. Prilikom ekstrakcije balon sa uzorkom se zagreva i pare rastvarača prolaze kroz cev ekstraktora, nakon čega se kondenzuju se u povratnom kondenzatoru, a potom se vraćaju u zapreminski deo ekstraktora u kome se vrši ekstrakcija. Kada se rastvaračem napuni zapreminski deo ekstraktora dolazi do preliivanja ovog sadržaja preko sifona u balon. Ovaj postupak se ponavlja više puta (najčešće od 15 do 18) tj. do potpune ekstrakcije jedinjenja iz uzorka (Lepojević 2000). Kada se ekstrakcija završi potrebno je ukloniti rastvarač uparavanjem na rotacionom vakuum uparivaču nakon čega sledi određivanje prinosa ekstrakcije. Navedeni postupak je pogodan za ekstrakciju jedinjenja koja imaju manju rastvorljivost (Rassen et al. 2016). Nedostaci metode su: dužina trajanja samog procesa (nekoliko sati do više dana), upotreba



velikih količina rastvarača i mogući gubici usled termičke degradacije i isparavanja (Špirović Trifunović & Tojić 2022).

Jedna od najefikasnijih metoda za ekstrakciju etarskog ulja je „metoda hladnog presovanja“. Ova metoda obezbeđuje 100% čistoću ulja koje se nakon ekstrakcije iz biljnog materijala odvaja centrifugiranjem čime zadržava sva svoja svojstva. Metoda se izvodi se na niskim temperaturama pod pritiskom (Rassen et al. 2016).

„Ekstrakcija superkritičnim fluidom“ („Supercritical Fluid Extraction-SFE“) predstavlja proces u kome dolazi do izdvajanja komponenti iz čvrstog/tečnog materijala korišćenjem superkritičnog fluida (rastvarač) za ekstrakciju. Gasovi koji se koriste u ovom procesu poput etana, propana, freona, ugljen-dioksida i drugih, na temperaturama nižim od kritične temperature i pod pritiskom prelaze u tečnu fazu, posedujući svojstva rastvarača. Ukoliko je temperatura iznad kritičnih vrednosti (superkritično stanje) gasovi pod pritiskom poseduju dobru moć rastvaranja. Ugljen-dioksid ( $\text{CO}_2$ ) se koristi najčešće kao superkritični gas jer ima relativno nizak kritični pritisak i temperaturu, nezapaljiv, bezbedan, relativno netoksičan, nekorozičan, dostupan visoke čistoće i jednostavno se otklanja iz ekstrakta, ali slabije upotrebe zbog manje polarnosti za ekstrakciju polarnih analita (Pourmortazavi et al. 2007; Rozzi et al. 2002). Primenom ovog metodskog postupka dobija se etarsko ulje boljeg kvaliteta i većeg prinosa, što doprinosi njegovim poboljšanim biološkim i funkcionalnim aktivnostima (Capuzzo et al. 2013). Ono što ograničava širu primenu ove metode je cena uređaja i visoki zahtevi prilikom rukovanja.

„Hidrodestilacija uz pomoć mikrotalasne pećnice“ („Microwave-Assisted Hydrodistillation-MAHD“), „mikrotalasna ekstrakcija bez rastvarača“ („Solvent-Free Microwave Extraction-SFME“) i „mikrotalasna hidrodifuzija i gravitacija“ („Microwave Hydrodiffusion and Gravity-MHG“) predstavljaju novije metode mikrotalasne ekstrakcije. Jedna od svrha razvoja ovih metoda je ekstrakcije termolabilnih jedinjenja poput komponenti etarskog ulja. Prema Brachet et al. (2002) metod mikrotalasne ekstrakcije se zasniva na lokalizovanom, dielektričnom zagrevanju vode prisutne u svim prirodnim materijalima, a uspešnost hidrodestilacije u najvećoj meri zavisi od dielektrične konstante vode i uzorka. Prema nekim autorima (Lucchesi et al. 2004; Ferhat et al. 2006) prednosti metode su: kraće vreme ekstrakcije, manja upotreba rastvarača i emisija  $\text{CO}_2$  u atmosferu. Princip zagrevanja zasnovan je na jonskoj provodljivosti i rotaciji dipola koji se u najčešće dešavaju istovremeno (Letellier et al. 1999). Nakon toga dobijeni ekstrakt se suši anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  i čuva u posebnim bočicama (zatvorenim u struji azota na

temperaturi od 4 °C). Mikrotalasna ekstrakcija bez rastvarača zasnovana je na kombinaciji ove dve metode, suve destilacije i mikrotalasne toplotne energije. Čini je mikrotalasna suva destilacija pod atmosferskim pritiskom bez dodavanja vode ili organskog rastvarača (Filly et al. 2014). Sam proces prethodno zahteva potapanje biljnog materijala 1-2 časa u vodu, nakon čega se cedi. Zatim se pomoću kondenzatora iz biljnog materijala skuplja ekstrahovano etarsko ulje. Mikrotalasna hidrodifuzija i gravitacija je metoda koja se izvodi pod atmosferskim pritiskom bez dodavanja vode ili rastvarača. U samom procesu koristi se mikrotalasna pećnica koja je okrenuta „naopačke” čime se sinhronizuje zemljina gravitacija i mikrotalasno grejanje (Špirović Trifunović & Tojić 2022). Za razliku od klasičnih metoda, ova metoda ekstrakcije štedi energiju (i do 90%) zbog čega se naziva i „zelena“ metoda za ekstrakciju (Špirović Trifunović & Tojić 2022).

„Ultrazvučna ekstrakcija“ („Ultrasound-Assisted Extraction-UAE“) se bazira na primeni ultrazvuka frekvencije od 20 kHz do 10 MHz. Pod uticajem ultrazvučnih vibracija dolazi do nastanka mikro pukotina i pora po površini ćelijskog zida što dovodi do povećanja ćelijske permeabilnosti za rastvarače. Sve ovo dalje olakšava oslobađanje i difuziju jedinjenja iz čvrste u tečnu fazu. Prema Henglein & Kormann (1985) na sposobnost ultrazvuka da izazove i poboljšava efikasnost ekstrakcije utiču frekvencija i snaga samog zračenja, viskoznost i površinski napon rastvarača kao i temperatura i pritisak. Ekstrakcije se izvode u ultrazvučnom kupatilu sa erlenmajerima gde se biljni materijal i rastvarač stavljaju u odgovarajućem odnosu (Špirović Trifunović & Tojić 2022).

### **2.1.3. Primena etarskog ulja karanfilića**

Poslednjih godina zahvaljujući osobinama koje poseduju došlo je do sve veće primene etarskih ulja. Među aromatičnim biljkama kao što su cimet, origano, timijan i menta, karanfilić je privukao veću pažnju u odnosu na ostale zbog svog snažnog mikrobnog i antioksidativnog delovanja (Shan et al. 2005). Upravo zbog tih svojstava koje poseduje smatra se da se karanfilić potencijalno može koristiti kao konzervans u mnogim namernicama (npr. u prerađenom mesu) umesto hemijskih konzervansa, a ima potencijal da ublaži i spreči hronične bolesti. Osim toga, našao je široku primenu u medicini (kao antiseptik ili stimulans), u prehrambenoj industriji,

koristi se i u kozmetici za dobijanje parfema, u proizvodnji sapuna i drugih kozmetičkih proizvoda (Cortés-Rojas et al. 2014; El-Saber Batiha et al. 2020).

Osim pomenutih svojstava, utvrđeno je da ekstrakti pupoljaka karanfilića imaju i antiseptičko- antivirusno, antibakterijsko, antifungalno, analgetičko, antispazmodično, antiinflamatorno, anthelmintičko, karminativno, antikancerogeno, citotoksično, i antidepresivno svojstvo. Antibakterijska aktivnost protiv patogena koji se prenose hranom, a koju imaju vodeni i etanolni ekstrakti karanfilića veoma je značajna u spečavanju kontaminacije hrane acidofilnim termofilnim bakterijama. Antifungalna svojstva koja ispoljavaju aktivni sastojci eteričnog ulja karanfilića pokazala su se veoma značajna u suzbijanju brojnih gljiva poput *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Candida albicans*, *Colletotrichum capsici*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium* spp., *Phytophthora parasitica*, *Saccharomyces pastorianus*, *Trichoderma* spp. i dr. Osim toga, pokazuju izraženiju antifungalnu aktivnost od nistatina, imaju antiparazitnu aktivnost, imaju antibakterijski efekat protiv *Staphylococcus aureus*, *Propionibacterium acnes*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella pullorum*, *Streptococcus faecalis*, *Clavibacter michiganensis* subsp. *Sepedonicus* i dr. Takođe, utvrđeno je da mogu da inhibiraju replikaciju virusa *Herpes simplex*, adenovirusa, morbila i polio virusa (Miyazawa et al. 2001; Bhowmik et al. 2012; El-Saber Batiha et al. 2020).

Eterično ulje karanfilića ima neuroprotektivna, neurostimulirajuća, tonizirajuća svojstva, a prema rezultatima brojnih eksperimentalnih studija ekstrakti karanfilića su se pokazali da poseduju značajno antikancerogeno delovanje. Koristi se u ublažavanju bolova i upale (osteoartritis, artroze, povreda, reumatizma i dr.) u dermatologiji kao i skoro svim granama medicine (El-Saber Batiha et al. 2020).

U praksi je upotreba etarskih ulja ograničena usled nerastvorljivosti u vodi, velike isparljivosti i brze oksidacije i degradacije. U cilju prevazilaženja ovih problema koriste se različite tehnike koje mogu da obezbede njihovu veću fizičku stabilnost, zaštitu od isparavanja i potrebnu rastvorljivost u vodi. Jedna od njih je inkapsulacija u odgovarajuće nosače gde je bioaktivna supstanca, okružena nosačem matriksa, koji omogućava kontrolu brzine bioaktivnog oslobađanja. Ona obuhvata korišćenje polimer premaza ima tendenciju da poveća stabilnost i efikasnost ulja tako što produžava brzinu oslobađanja aktivne komponente. Najčešći polimeri koji se koriste za inkapsulaciju su želatin, arapska guma, skrob i proteini surutke (Lević et al. 2014).

#### 2.1.4. Insekticidna aktivnost

Iako se poslednjih godina u svetu intenzivno proučava insekticidno delovanje etarskih ulja, ova oblast je još uvek nedovoljno istražena. Etarsko ulje karanfilića je pokazalo pozitivne rezultate u ispitivanju insekticidne i/ili larvicidne aktivnosti i to u vidu inhibicije rasta i razvoja kako larvenih stadijuma tako i imaga, smrti insekata, ili aktivnošću kao repelent. Do danas je insekticidno delovanje etarskog ulja karanfilića potvrđeno kod sledećih vrsta: *Spodoptera litura* Fabricius (Ajanta et al. 2010), *Anopheles stephensi* Liston (Sheikh et al. 2021), *Bradysia procera* (Hong et al. 2018), *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Haddi et al. 2015; Flores-Dávila et al. 2017), *Drosophila melanogaster* Meigen (Ulfah et al. 2022), *Pericallia ricini* Fabricius (sin. *Olepa ricini*) (Sahu & Singh 2022), *Plutella xylostella* (Mpumi et al. 2020), *Rhyzopertha dominica* (Ibrahim et al. 2022), *Callosobruchus maculatus* (F.), *Callosobruchus chinensis* (Pumnuan et al. 2021), *Tribolium castaneum* Herbst (Ikawati et al. 2021), *Musca domestica* L. (Levchenko et al. 2021). Osim pomenutih, insekticidno delovanje eugenola, jedne od glavnih komponenti ulja karanfilića, potvrđeno je kod krompirovog moljca (*P. operculella*) pri čemu Ebadollahi (2013) navodi uticaj ove komponente ulja na smanjuje reprodukciju insekata, i redukuje piljenje jaja. Etarsko ulje takođe ispoljava i repelentno delovanje na štetne insekte. Uticaj etarskog ulja karanfilića na redukciju piljenja jaja potvrdili su i autori Homam & EL Ghanam (2017), dok autori El-Hamed et al. (2011) navode i njegovo larvicidno delovanje.

#### 2.1.5. Antimikrobna aktivnost

U poslednjih nekoliko decenija došlo je do porasta učestalosti pojave pojedinih fitopatogenih gljiva kao i do sticanja otpornosti na različite fungicide u poljoprivredi pojavom otpornih sojeva. Osim toga, poslednjih godina vrši se veliki pritisak javnosti u pogledu zahteva za smanjenjem upotrebe sintetičkih fungicida u poljoprivredi. Sve veća zabrinutost za uticaj velike upotrebe sintetičkih fungicida na životnu sredinu i potencijalni zdravstveni rizik vezan za upotrebu ovih jedinjenja u svetu doveo je do potrebe za pronalaženjem načina za masovnu upotrebu proizvoda biljnog porekla koja su se pokazali manje toksični za okolinu (Rana et al. 2011).

Vrsta *S. aromaticum* je aromatična biljka čija jaka antimikrobna delovanja utiču na

širok spektar patogenih mikroorganizama (D'Costa et al. 2011; Ghosh et al. 2012). Prema brojnim *in vitro* i *in vivo* ogledima i dobijenim rezultatima, utvrđena je visoka efikasnost etarskih ulja u suzbijanju fitopatogene gljive *Botrytis cinerea*. Dosadašnji testovi pokazuju da eterično ulje karanfilica, tj. komponente eugenol i alil izotocijanat, imaju inhibitorni efekat pri čemu zaustavljaju rast ove fitopatogene gljive. Osim toga, istaživanja su pokazala da kombinacija etarskog ulja karanfilica sa etarskim uljima dobijenim iz drugih aromatičnih ili začinskih biljaka (poput biljke *Brassica nigra*) imaju sinergistički antifungalni efekat te se smatra da je kombinovana primena eteričnih ulja efikasnija od njihove pojedinačne primene. Upotreba etarskih ulja dobijenih iz jedne aromatične biljke ili kombinacija istovremene primene ulja iz različitih biljaka smatra se dobrom zamenom za upotrebu hemijskih sredstava za zaštitu bilja. (Aguilar-González et al. 2015). Visok sadržaj eugenola u etarskom ulju karanfilica imao je jako antifungalno dejstvo i na patogene biljaka i životinja poput *Fusarium moniliforme*, *F. oxysporum*, *Mucor* sp., *Aspergillus* sp., *Microsporum gypseum* i *Trichophyton rubrum*. Istraživanja Rana et al. (2011) pokazuju da etarsko ulje karanfilica dovodi do deformacija ili izobličenja spora prethodno spomenutih patogena. Antifungalno delovanje u vidu inhibicije ili izostanka porasta fitopatogenih gljiva utvrđena su kod *F. oxysporum*, *F. commune* i *F. redolens* (Hamini-Kadar et al. 2014), kao i kod patogena *Alternaria alternata*, *F. chlamydosporum*, *F. graminearum*, *Helminthosporium oryzae* i *Rhizoctonia bataticol* (Beg & Ahmad 2002; Harčárová et al. 2021). Utvrđen je i inhibitorni efekat ulja karanfilica na postžetvene prouzrokovaoče bolesti krompira i paradajza kao što su *Geotrichum candidum*, *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* and *Mucor hiemalis* (Suleiman et al. 2019).

#### **2.1.6. Baktericidna aktivnost**

Upravo zbog svojih antibakterijskih svojstava mnoga etarska ulja pokazala su veću ili manju uspešnost u suzbijanju fitopatogenih bakterija. Njihova primena u praksi za sada je veoma ograničena i uglavnom se odnosi na primenu ekstrakata etarskih ulja različitih biljaka u eksperimentalnim uslovima. Istraživanja koja su sprovedeli Umarusman et al. (2019) ukazuju da ekstrakt *S. aromaticum* ima visoku efikasnost u suzbijanju *Pseudomonas syringae* pv. *pisi*. U toku istraživanja autori su tretirali seme ekstraktima različitih biljaka, budući da se radi o patogenu koji se prenosi semenom i utvrdili da je se uspešnost suzbijanja ove fitopatogene bakterije ekstraktom

*S. aromaticum* kretala od 76 do 98%. Baktericidno delovanje utvrđeno je kako kod gram-negativnih fitopatogenih bakterija: *Erwinia carotovora* pv. *carotovora*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas syringae* i *Xanthomonas campestris* tako i kod gram-pozitivnih fitopatogenih bakterija: *Streptomyces* spp. i *Rhodococcus fascians* (Huang & Lakshman 2010; Kažun et al. 2021). Rezultati ovih istraživanja ukazali su da se etarsko ulje karanfilića veoma efikasno može koristiti za suzbijanje *R. solanacearum* budući da je nakon tretmana došlo do potpunog suzbijanja ove značajne fitopatogene bakterije. Takođe, ispitivanja su pokazala da etarsko ulje karanfilića negativno utiče na porast i razvoj fitopatogene bakterije *Xanthomonas vesicatoria* i redukuje intezitet pojave simptoma na biljci domaćinu (Lucas et al. 2012). Istraživanja *in vitro* koja su sproveli Mikiciński et al. (2012) pokazala su efikasno delovanje etarskog ulja karanfilića na fitopatogene bakterije *Agrobacterium tumefaciens*, *Xanthomonas arboricola*, *Pseudomonas syringae* i *Erwinia amylovora*. Osim pomenutih fitopatogenih bakterija, navodi se efikasno delovanje etarskih ulja, između ostalih i ulja karanfilića, na *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* (Bhat et al. 2017; Kažun et al. 2021), a obećavajući rezultati *in vitro* dobijeni su i u suzbijanju *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum* (Naqvi et al. 2022).

Takođe je utvrđena baktericidna aktivnost eugenola i epoksid-eugenola na soj bakterije *Staphylococcus aureus*, kao i eugenola, timola i nisina na sojeve bakterija *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* i *Listeria monocytogenes* (Tippayatum et al. 2007; Eyambe et al. 2011; Bai et al. 2023a, 2023b).

## 2.2. Kapsulacija

Kapsulacija etarskih ulja predstavlja složen proces koji se sastoji iz pripremne faze, same kapsulacije i dorade dobijenih proizvoda (Lević et al. 2014). U pripremnoj fazi dolazi do mešanja aktivne komponente sa nosačem, dok proces kapsulacije obuhvata dobijanja željenog oblika i dimenzija čestica (Lević et al. 2014). Prema dostupnoj literaturi, navodi se nekoliko tipova kapsulacije: (1) čestice generisane matriksom, poput algininska kiseline, hitozana, ciklodekstina, u kome su dispergovana etarska ulja, (2) kapsule sa membranom (ove kapsule okružuju jezgro u kome se nalaze etarska ulja), (3) kompleksi gde se etarska ulja stabilizuju u šupljinama hemijskim reakcijama i (4) kapljice stvorene u procesu emulzije u sufraktantima. Prema veličini čestica,

kapsulacija se deli na „mikro“ (1-1000  $\mu\text{m}$ ) i „nano“ (<1000 nm) (Macías-Cortés et al. 2020; Špirović Trifunović & Tojić, 2022). Značajno poboljšanje formulacija etarskih ulja pre svega njegovih osobina, funkcije i stabilnosti postignuta je primenom nanotehnologije. Tako nanoemulzija predstavlja emulziju sa kapljicama veoma malih dimenzija (20-200 nm), dispergovanih u vodi i nose lipofilna jedinjenja (Špirović Trifunović & Tojić 2022).

Kapsulacija etarskih ulja sa ciljem dobijanja formulacija koje obezbeđuju kontrolisano oslobađanje ulja je više od dve decenije predmet brojnih istraživanja (Aminabhavi et al. 1998; Kulkarni et al. 1999; Kulkarni et al. 2000; Kumbar et al. 2001). Kapsulacija odgovarajućim nosačima je najperspektivnija tehnika gde je bioaktivna supstanca „zarobljena“, okružena matriksom nosača, što omogućava kontrolisano otpuštanje bioaktivne supstance (Devi & Maji 2011; Majeed et al. 2015; Vishwakarma et al. 2016; Maes et al. 2019; Jovanović et al. 2020; Liao et al. 2021). Oblaganje polimerom povećava stabilnost i efikasnost ulja i prolongira brzinu oslobađanja aktivnih komponenti (Devi & Maji 2011; Beirão-da-Costa et al. 2013; Hill et al. 2013; Sun et al. 2013; Majeed et al. 2015; Mohammadi et al. 2015a, 2015b; Vishwakarma et al. 2016; Froiio et al. 2019a). Najčešće korišćeni polimeri koji se koriste za kapsulaciju su želatin, arapska guma, skrob modifikovani i surutkin („whey“) protein (Beirão-da-Costa et al. 2013; Majeed et al. 2015; Froiio et al. 2019a). Tako npr. pripremu i karakterizaciju kapsuliranog nim ulja (neem oil) (*Azadirachta indica* A. Juss.) su opisali Kulkarni et al. (1999). Kao polimer matrice korišćeni su uraa formaldehid unakrsno vezan skrob (UF–St), aditiv tzv. „guar gum“ (UF–GG) i UF–(St+GG). Oslobađanje aktivnog sastojka iz formulacije zavisi od tipa matrice i sposobnosti „bubrenja“. Kulkarni et al. (2000) navode kapsulaciju nim ulja semena u vidu tečnog pesticida korišćenjem natrijum alginata (Na–Alg) kao polimera za kontrolu oslobađanja ulja (CR) dobijenog nakon vezivanja sa glutaraldehidom (GA). FTIR spektrometrijska studija je potvrdila odsustvo hemijske interakcije između aktivne komponente i polimera kao i vezujućih agensa. Povećanjem vezivanja polimera značajno se povećava oslobađanje ulja iz „kapljice“. Pronalazak i razvoj poboljšane granularne formulacije ekstrakta semena nim ulja koja sadrži Aza-A rezultirao je poboljšanom stabilnosti tokom čuvanja i sposobnosti za postepeno oslobađanje (Sreenivasa et al. 2006). Ova formulacija sadrži inertne čestice kao nosače, najmanje jednu lipofiličnu supstancu kao emulgator, opciono bojač (colorant) i ekstrakt nim ulja koji sadrži Aza-A (Sreenivasa et al. 2006). Prema nekim autorima, kontrolisano oslobađanje mikrokapsula koje sadrže nim ulje se dobija kapsulacijom u polielektrolitnim kompleksima prirodno postojećih polimera zvanim

„karagenan-hitozan“ (carrageenan-chitosan, Devi & Maji 2009a, 2009b), želatin- karagenan (gelatin-carrageenan, Devi & Maji 2010) i želatin-natrijum karboksimetil celuloza (gelatin-sodium carboxymethyl cellulose, Devi & Maji 2011). Kapsulacija se izvodi su optimizovanom odnosu i pH za dobijanje kompleksa između biopolimera sa ciljem dobijanja maksimalnog prinosa i stabilnog polielektrolitnog kompleksa.

Izbor materijala koji se koristi, a posebno nosač za kapsulaciju etarskih ulja od presudnog je značaja; neophodno je da zaštiti ulje, da garantuje njegovo kontrolisano oslobađanje, da je rastvorljivo u vodi, biokompatibilno i biorazgradivo (Froio et al. 2019a). Prema literaturnim izvorima, koriste se četiri kategorije jedinjenja za dobijanje jestivih polimera: hidrokoloide (proteini i polisaharidi), polipeptidi, lipidi, i kompoziti (Froio et al. 2019a). Kapsulacija je, generalno, obećavajuća tehnika za zaštitu osetljivih bioaktivnih jedinjenja od razgradnje. Shodno tome, mnogi istraživači su razvili nekoliko metoda kapsulacije kao što su: filmovi, mikrokapsulacija sušenjem-raspršivanjem, nanoprecipitacija, elektrohidrodinamički procesi, elektrospinoвање i elektrorasprskivanje (Froio et al. 2019b; Munteanu & Vasile 2021; Nguyen et al. 2021).

Kapsulacija se najčešće koristi u prehrambenoj industriji, ali može naći upotrebu i u farmaceutskom sektoru, a u nekim slučajevima i u zaštiti bilja (Froio et al. 2019a, 2019b; Jovanović et al. 2020; Munteanu & Vasile 2021; Nguyen et al. 2021; Barros et al. 2022). Koristeći različite tehnike i/ili nosače, kapsulirana su mnoga etarska ulja kao što su bosiljak, cimet, jasmin, limeta, timijan, limun, limunska trava, narandža, origano, nana, ruzmarin i dr. (Kouassi et al. 2012; Hill et al. 2013; Jovanović et al. 2020; Nguyen et al. 2021; Munteanu & Vasile 2021; Tangpao et al. 2021; Barros et al. 2022). U istraživanjima Sopkova & Janokova (1998) kao nosač pesticida korišćen je prirodni zeolit klinoptilolit, što je slučaj sa čvrstim oblikom sintetičkog piretroidnog insekticida supercipermetrina. Prema Kvachantiradze et al. (1999) prirodni zeolit klinoptilolit se koristio kao nosač za biološke agense tj. za fotostabilizaciju biokontrolnih sojeva bakterije *Bacillus thuringiensis*.



## 2.3. Test organizmi

Biološka aktivnost etarskog ulja karanfilića i kapsuliranih EC formulacija testirana je u ovom radu na štetnoj insekatskoj vrsti i biljnim patogenima, koji se mogu naći na otvorenom polju, ali i u uslovima skladišta, i to su (i) krompirov moljac *Phthorimaea operculella* Zeller (Krnjajić i sar. 2018; Miletakovic et al. 2018), kao jedna od najozbiljnijih štetnih vrsta porodice *Solanaceae* (Slika 1), (ii) fitopatogena gljiva *Botrytis cinerea*, prouzročivač sive truleži, koja zaražava voćne vrste (jabučaste i koštičave voćne vrste), bobičasto voće, vinovu lozu (Slika 2) i neke povrtarske vrste (Wilson et al. 1997; Tsao & Zhou 2000; Siripornvisal et al. 2009; Adebayo et al. 2013; Daniel et al. 2015; Mohammadi et al. 2015a, 2015b), i (iii) fitopatogene bakterije *Pectobacterium* (*carotovorum* i *brasiliense*) i *Dickeya dianthicola*, prouzročivači vlažne truleži, destruktivne bolesti mnogih biljnih vrsta (Popović et al. 2017, 2019a, 2019b; Marković et al., 2021, 2022). Svi ovi štetni organizmi imaju velik kruga domaćina i široko su rasprostranjeni u Srbiji gde izazivaju velike gubitke na napadnutim domaćinima.

### 2.3.1. Krompirov moljac, *Phthorimaea operculella* Zeller.

Krompirov moljac, *Phthorimaea operculella* Zeller. (Lepidoptera, Gelechiidae) je oligofagna insekatska štetna vrsta koja nanosi štetu brojnim ratarskim i povrtarskim usevima, industrijskom bilju i uskladištenim proizvodima (Miletakovic et al. 2018). Jedna je od najznačajnijih štetočina krompira (*Solanum tuberosum* L.) (Slika 1), duvana (*Nicotiana tabacum* L.) i paradajza (*S. lycopersicum* L.). Takođe, štete od krompirovog moljca zabeležene su i na patlidžanu (*S. melongena* L.), paprici (*Capsium annuum* L.) i šećernoj repi (*Beta vulgaris* L.), kao i drugim biljkama iz porodice *Solanaceae* (Kereši i sar. 2015; Aryal & Jung 2019). Prisustvo *P. operculella* u Republici Srbiji prvi put je zabeleženo 2008. godine na području Leskovca, a ubrzo se nakon toga proširio u skoro sve ravničarske regione gajenja krompira. Prve veće štete zabeležene su već 2011. godine, dok su najveći gubici (i do 100%) zabeleženi u okolini Čačka (Kereši i sar. 2015; Milošević et al. 2016). Osim zapadnog Pomoravlja ekonomski značajne štete zabeležene su i u južnom Banatu, Bačkoj i Sremu.

Izuzetno visoka brojnost populacije krompirovog moljca poslednjih sezona, što za posledicu ima velike ekonomske štete, naizraženija je u regionima gde je gajenje krompira

skoncentrisano u jednom rejonu, gde se proizvodnja obavlja u monokulturi i gde se sprovede redukovane agrotehničke mere ili je smanjen broj hemijskih tretmana. Takođe, globalna promena klime, odnosno blage zime, kao i leta i jeseni sa dužim sušnim periodima i temperaturama iznad godišnjeg proseka, pogoduju razvoju i utiču na kalamitnu pojavu ove štetočine.

Štetnost *P. operculella* ogleda se u visokom stepenu oštećenja krtola krompira u skladištima (ponekad dovodi do potpunog gubitka prinosa), kao i u složenosti suzbijanja ove insekatske vrste (Krnjajić i sar. 2018; Miletaković et al. 2018). Štete se smatraju vrlo značajnim u lokalitetima sa najvećim prinosima i proizvodnjom krompira u Srbiji (Miletaković et al. 2018).

U Mediteranskim uslovima krompirov moljac ima 5-7 generacija godišnje, dok kod nas ima 3 ili 4 generacije na otvorenom (poljski uslovi) i 1-2 u skladištima (Kereši i sar. 2015, 2019). Mere zaštite se svode na primenu dozvoljenih insekticida tretiranjem biljaka u polju, a veoma je bitno da se pre ulaska novog krompira izvrši adekvatna priprema prostora za skladištenje. To obuhvata čišćenje i pranje, gajbi i vreća i njihovu dezinfekciju ukoliko su one bile već korišćene ili, po mogućnosti korišćenje novih, zatim po potrebi treba obaviti fumigaciju prostora dozvoljenim pesticidima, kao i stavljanje mreža na sve prozore u cilju sprečavanja uletanja (u jesen) ili izletanja leptira (u proleće).



**Slika 1.** Štete na krtolama krompira usled ishrane gusenicama krompirovog moljca *Phthorimaea operculella* (1); detalj prikaza oštećenja i uginule gusenice nakon primene etarskog ulja karanfilića (2) (foto S. Krnjajić)

### 2.3.2. *Botrytis cinerea* Pers. (siva trulež)

*Botrytis cinerea* Pers. (anamorf: *Botryotinia fuckeliana*), prouzročivač sive truleži (Slika 2), je patogen za preko 200 vrsta biljaka. Ovaj patogen u velikoj meri doprinosi smanjenju proizvodnje povrća, voća, vinove loze i ukrasnog bilja, prouzrokujući bolesti kako biljaka gajenih na otvorenom ili u zaštićenom prostoru, tako i tokom transporta i skladištenja. Siva trulež je među najznačajnijim bolestima koje ograničavaju proizvodnju voćnih i povrtarskih biljnih vrsta u Srbiji. Gljiva napada sve biljne organe u svim fazama razvoja. Najčešći simptomi prouzrokovani sa *B. cinerea*, a koji se pominju u literaturi su: siva ili mrka trulež, siva plesan ili palež, a često se od simptoma pominje i poleganje klijanaca (Verhoeff 1970; Van der Vlugt-Bergmans 1996; Charabany & Shtienberg, 1999; Giraud et al. 1999; Nikolić et al. 2008; Tanović i sar. 2009a, 2009b).

Štete koje uzrokuje *B. cinerea* je teško proceniti pa tako u odnosu na usev ili zasad i vremenske uslove, gubici u prinosu mogu biti i do 50%, ali nekad mogu premašiti i 80% u uslovima povoljnim za razvoj bolesti (kišno i vlažno vreme pre i tokom žetve). Nije neuobičajeno i potpuno propadanje useva usled epifitocije ovim patogenom.

Na fungicide za ovog patogena se godišnje utroši između 15-25 miliona dolara (Elad et al. 2004). Suzbijanje *B. cinerea* nije ni malo jednostavno zbog činjenice da patogen napada skoro sve biljne delove tokom celokupnog razvoja (Gullino 1992), a osim toga, prisutan je i na korovskim biljkama. Ono što dodatno otežava njegovo suzbijanje je to što može da živi i kao saprotrof na biljnim ostacima i organskim materijama u zemljištu, tako da je inokulum u usevu uvek prisutan (Rotem et al. 1978; Jarvis 1980).

Razvoj rezistencije na fungicide je postao ozbiljan problem u suzbijanju *B. cinerea* širom sveta; stoga su potrebna alternativna rešenja za kontrolu ovog patogena. Za uspečnu zaštitu potrebno je dobro poznavanja same biologije patogena, zatim njegove epidemiologije i odnosa sa domaćinom. Kompleks mera kojima se sprečavaju štete od ovog patogena podrazumeva dobru usklađenost u primeni preventivnih mera poput izbegavanja infekcija samog patogena, kreiranje neadekvatnih uslova za razvoj oboljenja ili narušavanje odnosa patogen-domaćin. Adekvatna primena gore pomenutih mera jedino je moguća na osnovu dobrog poznavanja svih direktnih i indirektnih činilaca koji utiču na razvoj oboljenja (Russell 2005). Zbog svega pomenutog mere suzbijanja *B. cinerea* mogu podeliti u četiri osnovne grupe: 1. stvaranje otpornih sorata; 2.

agrotehničke mere; 3. hemijske mere; 4. biološke mere.

Usled poligenkog nasleđivanja i izražene genetičke varijabilnosti vrste *B. cinerea* značajno je otežana selekcija otpornih sorata. Kako major geni koji kontrolišu otpornost na *B. cinerea* nisu poznati, do sada su jedino utvrđene sorte koje pokazuju određeni stepen pasivne otpornosti. Ona je uslovljena morfološkim i fiziološkim karakteristikama kao što su debljine kutikule, maljavosti listova, brzine zarastanja rana. Sve to sprečava duže zadržavanje vodenog filma na površini biljaka i omogućava izbegavanje jačeg napada ili otežava samu infekciju. Adekvatnim agrotehničkim merama može se značajno smanjiti intenzitet oboljenja. Mere poput redovne berbe i uklanjanje biljnih ostataka, obolelih biljaka ili biljnih delova, potom izbegavanje povređivanja biljaka pri izvođenju redovnih agrotehničkih operacija smanjuje količinu inokuluma i obezbeđuju mikroklimatske uslove koji su povoljni za biljku, a nepovoljni za patogene. Osim toga, na sprečavanje širenja patogena povoljno utiču i mere poput malčiranja, prskanja biljaka  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , dobra ventilacija zaštićenih prostora i mnoge druge mere (Stehmann 1995). Pod biološkim suzbijanjem podrazumeva se zaštita u kojoj se umesto konvencionalnih fungicida upotrebljavaju mikroorganizmi bilo samostalno ili kao dopuna tretmanima sa konvencionalnim fungicidima, a sve u cilju smanjenja primene hemijskih materija u poljoprivrednoj proizvodnji. Iako prva istaživanja primene mikroorganizama datiraju još od pedesetih godina prošlog veka, a odnose se na suzbijanje *B. cinerea* (Nethook 1951; Wood 1951), najveći pomak u dobijenim rezultatima zabeležen je početkom XXI veka. Za sada je antagonističko delovanje utvrđeno kod *Bacillus* spp., *Aureobasidium* spp. i *Gliocladium* spp. na *B. cinerea* (Stehmann 1995), a najbolji rezultati zabeleženi su upotrebom mikoparazitne vrste roda *Trichoderma* (Elad et al. 1993; Elad 1994, 2000; Gupta et al. 1999; Okigbo & Ikediugwu 2000). Zadovoljavajući rezultati u suzbijanju *B. cinerea* dobijeni su i primenom preparata na bazi *Pythium oligandrum* (Filajdić et al. 2003), dok je primena komercijalnog preparata na bazi *T. harizanum* u kombinaciji sa konvencionalnim fungicidima pokazala dobre biološke rezultate u efikasnosti (Elad 1994). Za sada je proizvodnja i korišćenje biopreparata još uvek suviše skupa da bi njihovo masovno korišćenje bilo ekonomski isplativo, jer je cena konvencionalnih fungicida znatno niža (Elad 1994; Elad et al. 1994). Za sada hemijsko suzbijanje predstavlja najznačajniji način zaštite zasada i useva od najvećeg broja patogena među koje se ubraja i *B. cinerea*. Za sada još uvek ne postoje pouzdane metode u prognozi pojave fitopatogena, zbog čega se njihovo suzbijanje uglavnom zasniva na preventivnim tretmanima biljaka u najosetljivijim fenofazama (Leroux et al. 2002).



**Slika 2.** Siva trulež grožđa i jagoda (*Botrytis cinerea*) (foto T. Popović Milovanović, M. Stević)

### **2.3.3. *Pectobacterium* sp., *Dickeya* sp. (vlažna trulež)**

Prema poslednjoj taksonomiji bakterije koje prouzrokuju bakterioznu vlažnu trulež mnogih biljnih vrsta pripadaju rodovima *Pectobacterium* i *Dickeya*. Rod *Pectobacterium* podeljen je na 17 vrsta (van der Wolf et al. 2021), među kojima su najznačajnije: *P. atrosepticum* [prethodni naziv *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (Van Hall) Dye] (Garden et al. 2003); *P. carotovorum* [prethodni naziv *Erwinia carotovorum* subsp. *carotovora* (Jones) Bergey et al.] (Garden et al. 2003) i *Pectobacterium brasiliense* (Duarte et al. 2004). U rodu *Dickeya* (stariji naziv *Erwinia chrysanthemii*) opisano je do sada 12 vrsta (van der Wolf et al. 2021), među kojima su najznačajnije *D. dianthicola* (*Erwinia chrysanthemii* pv. *dianthicola*), *D. dadanti*, *D. zae* (*Erwinia chrysanthemii* pv. *zae*) i *D. solani* (Samson et al. 2005; Toth et al. 2011; van der Wolf et al. 2013). Sve gore pomenute vrste iz oba roda ubrajaju se među deset ekonomski najznačajnijih bakterija koje ograničavaju prinos gajenih biljnih vrsta, ali i utiču na kvalitet mnogih poljoprivrednih kultura (Mansfield et al. 2012). Patogeni vlažne truleži se ubrajaju u ekonomski značajne patogene velikog broja biljnih domaćina. Od svih pomenutih vrsta, bakterija *P. carotovorum* ima najširi krug domaćina koji su botanički veoma udaljeni (paprika, paradajz, plavi patlidžan, mrkva, peršun, celer, zelena salata, luk, kupus, karfiol, brokoli, komorač, kala, kukuruz, suncokret i druge biljne vrste) (Gavrilović i sar. 2009; Ivanović i sar. 2009; Gašić i sar. 2013, 2014; Waleron et al. 2019), dok su ostale vrste iz ovog roda uglavnom ograničene na

krompir (van der Walf & De Boer 2007; van der Merwe et al. 2010; Waleron et al. 2013). U domaćine *Dickeya* spp., koje su sve prisutnije poslednjih 15 godina, ubrajaju se krompir, paradajz, kukuruz, duvan i neke ukrasne biljke (Toth et al. 2011). Vlažna trulež se često javlja u uslovima skladištenja, pre svega na krompiru (Slika 3). Na krompiru u poljskim uslovima ove bakterije izazivaju bolest zvanu „crna noga krompira“, koja prethodi pojavi vlažne truleži i koja u Srbiji može da umanjuje prinos krompira i do 44,7% (Marković et al. 2021). Simptomi bolesti se javljaju kako na biljkama i krtolama u polju tako i tokom transporta i skladištenja gotovih proizvoda (krtola). Osnovna karakteristika ovih bakterija je da proizvedu širok spektar enzima (pektinaze, celulaze, proteinaze i ksilanaze) kojima razgrađuju komponente ćelijskog zida (van der Walf & De Boer 2007). Osim sluzaste, vlažne truleži, za obolele biljke je karakteristično da se slabije razvijaju, što se manifestuje njihovim zaostajanjem u porastu i biljke postaju kržljave. Lišće zaraženih biljaka je sitno, svetlozeleno ili žućkasto i i uvija se i ima uspravan položaj.

Uspešno suzbijanje crne noge i vlažne truleži krompira predstavlja veliki izazov, jer se patogen može na različitim mestima: duboko u tkivu krtola, u lenticelama ili u ranama na površini krtola pri čemu se u uslovima povećane vlažnosti bakterije se veoma brzo umnožavaju, a vodeni film omogućava stvaranje povoljnih uslova za razvoj bolesti. Zbog toga se osnovne mere zaštite oslanjaju na primeni sertifikovanih shema prilikom proizvodnje i izbegavanje kontaminacije, dok se hemijske mere zasnivaju na uništavanju patogena ili stvaranju nepovoljne sredine za njegov razvoj primenom fungicida na bazi bakra, antibiotika (u zemljama gde je dozvoljena njihova primena), organskih i neorganskih soli ili kombinacija ovih jedinjenja. Iako su se antibiotici pokazali kao veoma perspektivni, usled postojanja rizika od prenošenja gena rezistentnosti na sojeve bakterija koje izazivaju bolesti kod životinja i ljudi, njihova primena nije dozvoljena (Czajkowski et al. 2011).



**Slika 3.** Vlažna trulež krompira (*Pectobacterium* sp.) (foto T. Popović Milovanović)

### **3. RADNA HIPOTEZA**

Izazov sa kojim se suočavamo u oblasti zaštite bilja je prevazilaženje negativnog uticaja sintetičkih pesticida kao i njihovog otpada kroz ponudu alternativnog ekološki bezbednog bioproizvoda. Imajući u vidu specifičnost teme koja se obrađuje, pri ovom istraživanju se polazi od pretpostavki da:

- ✓ Trenutni način zaštite bilja primenom sintetičkih pesticida ima negativan uticaj na životnu sredinu i ljudsko zdravlje,
- ✓ Naučna dostignuća u odabiru prirodnih supstanci koji služe kao alternativa primeni hemijskih mera zaštite bilja rapidno napreduju,
- ✓ Etarska ulja su poznata po biološkoj aktivnosti,
- ✓ Primena kapsuliranih etarskih ulja ima za cilj produženo delovanje na objekat primene, što značajno unapređuje dosadašnje saznanje o primeni ovih ulja u poljoprivrednoj proizvodnji,
- ✓ Primena kapsuliranih ulja ima za cilj unapređenje dosadašnjeg, tradicionalnog načina zaštite bilja (hemijski, primenom pesticida) u smislu smanjenja negativnog uticaja na životnu sredinu i ljudsko zdravlje,
- ✓ Odabir i preporuka formulacije kapsuliranog etarskog ulja koji može naći primenu u poljoprivrednoj proizvodnji, kao vrednim resursom u daljem razvoju i primeni biopesticida.

## 4. MATERIAL I METODE RADA

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je urađen u laboratorijama Field Test-a doo, Instituta za zaštitu bilja i životne sredine, Instituta za multidisciplinarna istraživanja i Poljoprivrednog fakulteta u Zemunu/Beogradu.

### 4.1. Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS)

Gasna hromatografija sa masenom spektrometrijom (GC-MS) je analiza kojom se vršeno utvrđivanje sastava ulja karanfilića (proizvođač Probotanic) kao i sadržaja komponenti u ulju. Analiza je vršena na opremi GC Agilent Technologies model 6890N, na kapilarnoj koloni Agilent Technologies capillary HP-5MS (60 m x 0,25 mm ID; 0,25  $\mu\text{m}$ ), i uparen sa mesenim selektivnim detektorom (MSD5975B, napona jonizacije 70 eV; Agilent, Santa Clara, CA). Kao gas nosač korišćen je helijum, a odgovarajući protok iznosio je 1.2 mL min<sup>-1</sup>.

Temperaturni program je: početna temperatura kolone od 60 °C, nakon čega je sledio porast temperature do 240 °C (3 °C/min), do konačne temperature od 240 °C koja je održavana narednih 5 minuta.

Hromatograf je opremljen odvojenim injektorom koji se koristi u split režimu sa odnosom razdvajanja od 50:1. Pre analize, uzorak je rastvoren sa EtOH u odnosu 1:10 (100  $\mu\text{L}$  ulja karanfilića + 900  $\mu\text{L}$  EtOH). Relativni udeo svake komponente izražen je kao procenat dobijen normalizacijom površine pika, dok su svi relativni faktori odgovora uzeti kao jedan. Njihovi Kováč retencioni indeksi (*eng.* Kovats retention index) su izračunati korišćenjem homologne serije od C8-C25 n-alkana ubrizganih pod istim uslovima.

Identifikacija isparljivih komponenti je vršena poređenjem spektara komponenti sa masenim spektrima iz baze podataka NIST05 Mass Spectral Library (National Institute of Standards and Technology) korišćenjem NIST MASS Spectral Search program Ver 2.0d (June



2005), i poređenjem njihovih GC Kovačevih indeksa koji su dobijeni na bazi retencionog vremena n-alkana C7-C25 (Adams 2007).

#### 4.2. Kapsulacija

Formulacije etarskog ulja karanfilića (proizvođač Probotanic) su dizajnirane u obliku koncentrata za emulziju (EC), korišćenjem tri različita nosača aktivne materije: sintetički zeolit (proizvođač FMC Forest, Španija), prirodni zeolit (proizvođač ZEO-MEDIC, Srbija), i goveđi želatin (*eng.* bovine gelatin, proizvođač Sigma-Aldrich). U radu je korišćen prirodni mineral zeolita klinoptilolit, kapaciteta izmene katjona od 180 mek/100 g i veličine čestica od 20  $\mu\text{m}$ . Molekularno sito sintetičkog zeolita tipa 4A je alkalni aluminosilikat; to je natrijumski oblik kristalne strukture tipa A. Želatin je u obliku praha, iz goveđe kože, Tip B (225g Bloom).

Ulje uljane repice (proizvođač GranumFood, Srbija) je korišćeno kao rastvarač, dok je Tween 20 / POE-20-Sorbitan (Polysorbate 20, proizvođač Sigma-Aldrich) korišćen kao emulgator - nejonski emulgator (Tabela 2). EC formulacije su sintetisane mešanjem etarskog ulja karanfilića, ulja uljane repice i Tween-a 20 u određenom težinskom odnosu (Tabela 2) pri ambijentalnoj temperaturi. Nakon dodavanja svake komponente vršeno je intenzivno mešanje. U tako pripremljene rastvore različiti nosači sa udelom od 0.25% (w/w) su dodavani uz intenzivno mešanje, kako bi se dobila stabilna i homogena EC formulacija.

**Tabela 2.** Dizajniranje EC formulacija etarskog ulja karanfilića

Radni naziv formulacije	Aktivna materija (%)	Nosač (%)	Rastvarač (%)	Emulgator (%)
F-CSZ	Etarsko ulje karanfilića (20.00)	Sintetički zeolit (0.25)	Ulje uljane repice (78.75)	Tween 20 (1.00)
F-CNZ	Etarsko ulje karanfilića (20.00)	Prirodni zeolit (0.25)	Ulje uljane repice (78.75)	Tween 20 (1.00)
F-CG	Etarsko ulje karanfilića (20.00)	Goveđi želatin (0.25)	Ulje uljane repice (78.75)	Tween 20 (1.00)

Fizičke osobine koje se obično determinišu za tip EC formulacija, utvrđivane su kod novosintetisanih formulacija, i to: boja, pH, gustina, postojanost pene i tačka paljenja, korišćenjem standardnih procedura datih od WHO (WHO 2010).

#### 4.3. Insekticidna aktivnost

Insekticidna aktivnost etarskog ulja karanfilića kao i novosintetisanih EC formulacija (F-CSZ, F-CNZ, F-CG) je testirana na imaga insekatske vrste *P. operculella* (krompirov moljac). Insekti su uzgajani u komorama sa kontrolisanim uslovima (temperatura  $25 \pm 1$  °C, relativna vlažnost  $65 \pm 5\%$ , dan-noć režim 16:8 h). U testovima smrtnosti su korišćeni insekti starosti 24 sata. Po 20 jedinki imaga krompirovog moljca je dodavano u staklene volumetrijske boce (ukupne zapremine 720 mL).

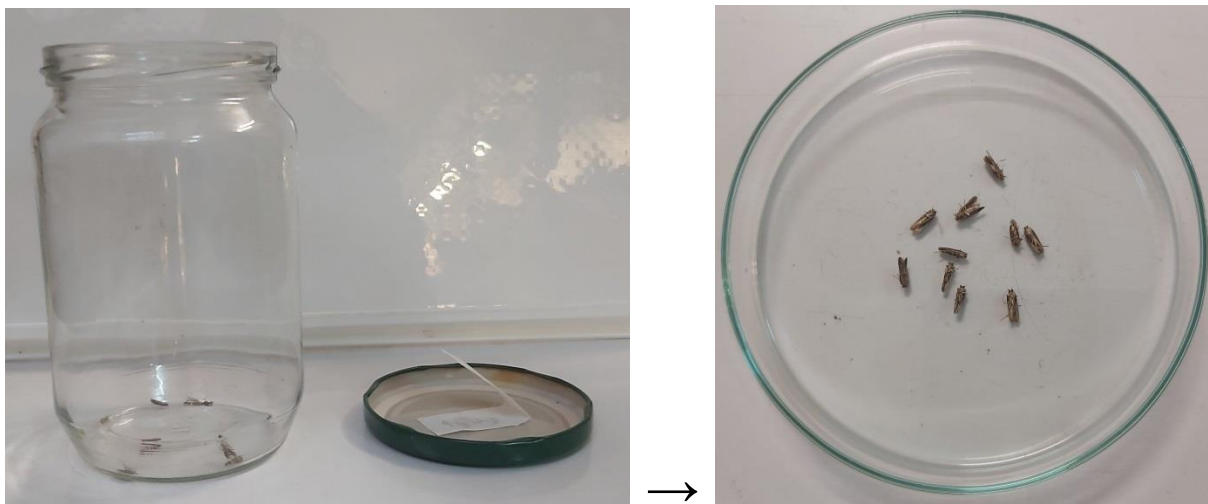
Sa ciljem utvrđivanja efektivne koncentracije etarskog ulja karanfilića koje izaziva smrtnost 95% (letalna koncentracija  $LC_{95}$ ) ili 50% (letalna koncentracija  $LC_{50}$ ) adulta krompirovog moljca, korišćen je metod dat od Negahban et al. (2007). Pet različitih koncentracija etarskog ulja karanfilića (izraženih kao  $\mu\text{L L}^{-1}$  vazduha) su korišćene: 0.5625, 0.375, 0.25, 0.17 i 0.11. Svaka od ovih koncentracija su rastvarane u određenoj količini acetona, za zatim nanošene na trake filter papira (dimenzija 5 x 1 cm), koji su potom fiksirani na poklopce staklenih volumetrijskih boca sa odraslim insektima *P. operculella*. Boce su čvrsto zatvarane, čime su imaga *P. operculella* izložena isparenjima etarskog ulja karanfilića tokom 24 sata.

Kako bi se utvrdilo produženo delovanje (letalno vreme), imaga krompirovog moljca (*Ph. operculella*) su izlagane koncentraciji  $8 \mu\text{L L}^{-1}$  vazduha etarskog ulja karanfilića i koncentraciji  $40 \mu\text{L L}^{-1}$  vazduha EC formulacijama etarskog ulja karanfilića (F-CSZ, F-CNZ, F-CG) tokom 14 dana. Testirana koncentracija je jednaka 10 puta većoj koncentraciji za koju je utvrđeno da izaziva smrtnost 99% imaga *P. operculella* nakon 24 sata tretmana. Svaka od tri kapsulirane formulacije i etarsko ulja karanfilića su nanošene na trake filter papira, koje su zatim fiksirane na poklopce staklenih volumetrijskih boca sa odraslim *P. operculella*, a zatim su čvrsto zatvoreni. Negativna kontrola je pripremljena dodavanjem sterilne destilovane vode na trake filter papira, bez dodavanja etarskog ulja karanfilića ili kapsuliranih formulacija. Tokom narednih 14 dana su na dnevnoj bazi tretirani poklopci prenošeni u nove volumetrijske boce sa 20 novih odraslih

imaga krompirovog moljca starosti do 24 sata.

Smrtnost imaga krompirovog moljca određivana je nakon svakih 24 sata prenošenjem moljaca iz staklenih boca u otvorene Petri kutije (Slika 4). Tokom 30 minuta proveravano je da li su moljci živi, odnosno da li mogu da se kreću ili da lete, na osnovu čega je determinisano letalno vreme  $LT_{90}$  i  $LT_{50}$ .

Eksperiment je postavljen u randomiziranom blok sistemu sa tri ponavljanja i ponovljen je dva puta.



**Slika 4.** Ocena ogleada ispitivanja insekticidne aktivnosti formulacija ulja karanfilića

#### **4.4. Antimikrobna aktivnost**

##### **4.4.1. Antimikrobna aktivnost prema *Botrytis cinerea* (siva trulež)**

Antimikrobna aktivnost tri kapsulirane formulacije etarskog ulja karanfilića (F-CSZ, F-CNZ, F-CG) je testirana za suzbijanje fitopatogene gljive *Botrytis cinerea* (prouzrokovatelj sive truleži) korišćenjem koncentracija 25%, 5% i 2.5%, što redom odgovara koncentracijama 5%, 1% i 0.5% etarskog ulja karanfilića. Efikasnost ovako dobijenih rastvora formulacija ispitana je u *in planta* ogledu na plodovima maline (*Rubus idaeus* L.). U radu je korišćen *B. cinerea* soj *B.*

*cinerea* MSTP-19 izolovan sa maline 2019. godine (Kolekcija dr Milana Stevića, Poljoprivredni fakultet, Beograd) identifikovan na osnovu morfologije i molekularno, primenom metode lančane reakcije polimeraze (PCR) sa univerzalnim prajmer parom ITS1/ITS4 i sekvenciranjem. Soj je za eksperiment održavan kontinuiranim presejavanjem na krompir dekstroznom agaru (PDA) pri temperaturi 23 °C u trajanju 8–10 dana.

Sveži, zdravi plodovi u tehnološkoj zrelosti bez oštećenja ili vidljivih simptoma bolesti potapani su u rastvore kapsuliranih formulacija F-CSZ, F-CNZ i F-CG, gde su držani 30 sekundi, a zatim stavljeni na sterilni filter papir 20 minuta da se osuše. Nakon sušenja, po 10 plodova je stavljano u staklene Petri kutije (prečnika 150 mm) nakon čega su inokulisani suspenzijom spora gljive *B. cinerea* ( $2 \times 10^5$  spora  $\text{mL}^{-1}$ ) pomoću prskalice za tankoslojnu hromatografiju (*eng.* air brush). Petri kutije su postavljane na temperaturu od 5 °C (Slika 5).

Eksperiment je izveden u tri ponavljanja i ponovljen je dva puta. Ocena ogleđa je vršena pet dana nakon tretmana, izražena kao ukupan broj zaraženih odnosno zdravih plodova maline po tretmanu.



**Slika 5.** Ispitivanje efikasnosti formulacija ulja karanfilića u suzbijanju sive truleži (*B. cinerea*) na plodovima maline *in planta* (foto M. Stević)

#### **4.4.2. Baktericidna aktivnost prema prouzročivačima vlažne truleži**

U *in vitro* ogledima testirana je baktericidna aktivnost tri kapsulirane formulacije etarskog ulja karanfilića (F-CSZ, F-CNZ, F-CG) prema bakterijama prouzročivačima vlažne truleži: *Pectobacterium carotovorum* (soj Pcc10), *Pectobacterium brasiliense* (soj Pcb62) i *Dickeya dianthicola* (soj Dd31). Svi tri soja su iz Kolekcije dr Tatjane Popović Milovanović, Institut za zaštitu bilja i životnu sredinu, prethodno molekularno okarakterisani i identifikovani (Popović et al. 2019; Marković et al. 2021). Za izvođenje ogleda, korišćeni su sojevi bakterija starosti 48 sati gajeni na Hranljivom Agar u pri temperaturi od 26 °C.

Mogućnost inhibicije je determinisana korišćenjem metode difuzije u agar (Balouiri 2016). U sterilnu otopljenu podlogu Hranljivi Agar ohlađenu, ali ne stegnutu dodavana je bakterijska suspenzija testiranih sojeva do finalne koncentracije  $10^8$  CFU mL<sup>-1</sup>. Nakon homogenizacije podloga je razlivana u sterilne Petri kutije (prečnika 90 mm). Nakon stezanja, četiri mesta na podlozi su bušena pomoću sterilnog borera (prečnika 7 mm) da bi se napravile rupe.

Tri različite koncentracije kapsuliranih formulacija F-CSZ, F-CNZ i F-CG su testirane: 25% (odgovara 5% etarskog ulja karanfilića), 5% (odgovara 1% etarskog ulja karanfilića) i 2,5% (odgovara 0,5% etarskog ulja karanfilića). U svaki otvor napravljen na podlozi dodavana je zapremina od 100 µL testirane koncentracije. Kako bi se uporedila baktericidna aktivnost testiranih koncentracija kapsuliranih formulacija sa čistim etarskim uljem karanfilića, pripremljena je serija razređenja koja odgovara testiranim (0,5%, 1%, 5%) ali i višim koncentracijama (10%, 25%, 50% i 100%). Kao negativna kontrola korišćena je sterilna destilovana voda. Petri kutije su postavljene tri dana na inkubaciju na temperaturu od 26 °C.

Eksperimenti su izvođeni u dva nezavisna ogleda sa tri ponavljanja korišćenjem potpuno randomizovanog blok sistema. Nakon tri dana inkubacije praćeno je prisustvo ili odsustvo zone inhibicije i meren je prečnik zone inhibicije (izražen u milimetrima).

#### **4.5. Statistička obrada podataka**

U ogledima insekticidne aktivnosti, za čisto etarsko ulje karanfilića vrednosti LC<sub>50</sub> (letalna koncentracija koja izaziva 50% smrtnosti populacije) i LC<sub>95</sub> (letalna koncentracija koja

izaziva 95% smrtnosti populacije) su izračunate probit analizom korišćenjem IBM SPSS verzije 23 (2015). Za kapsulirane formulacije F-CSZ, F-CNZ i F-CG, vrednosti  $LT_{50}$  (letalno vreme koje izaziva 50% smrtnosti populacije) i  $LT_{90}$  (letalno vreme koje izaziva 90% smrtnosti populacije) su takođe izračunate probit analizom korišćenjem istog statističkog softvera.

Za modeliranje zavisnosti verovatnoće smrtnosti insekata tokom vremena za kapsulirane formulacije F-CSZ, F-CNZ i F-CG ili koncentracije čistog etarskog ulje karanfilića, korišćena je probit regresija:

$$p_i = \Phi(\beta_0 + \beta_1 \log_{10} x_i),$$

gde je  $p_i$  je verovatnoća realizacije ishoda kodiranog sa 1 (smrtnost) u vrednosti prediktora  $x_i$  (vreme ili koncentracija) i  $\Phi$  je funkcija standardne normalne kumulativne raspodele.

Primer procene ovog modela je:

$$\hat{p}_i = \Phi(b_0 + b_1 \log_{10} x_i).$$

Za procenu antimikrobne aktivnosti u *in planta* uslovima, rezultati su obrađeni analizom varijanse (One Way ANOVA, Statistica 7 software). Statističke razlike su determinisane korišćenjem Duncan's multiple range ( $p < 0.05$ ). Efikasnost kapsuliranih formulacija izračunata je korišćenjem Abotove formule (Abbott 1925):

$$(\%) = (X - Y)/X \times 100$$

gde je :  $X$  = broj zaraženih plodova u kontroli;

$Y$  = broj zaraženih plodova u tretmanu.

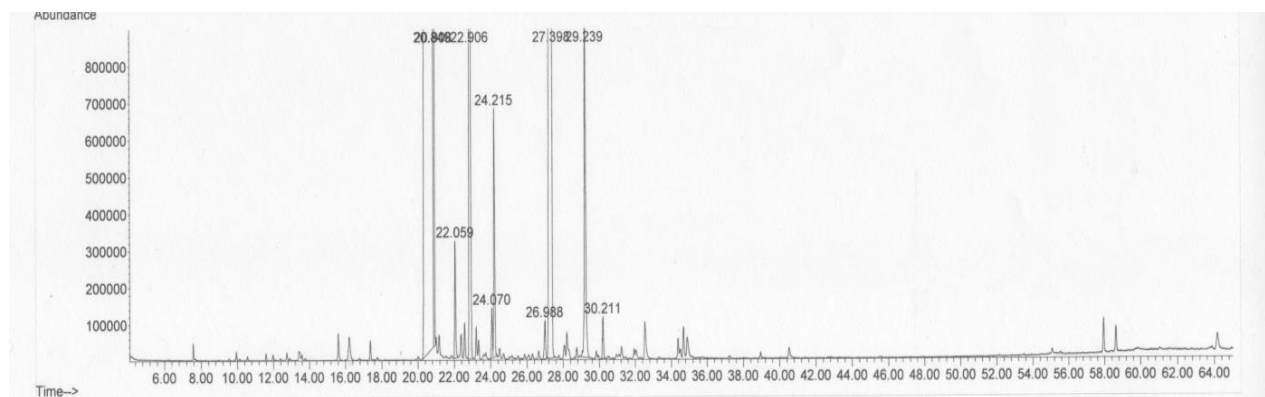
Za procenu baktericidne aktivnosti u *in vivo* uslovima, Tukey's multiple-range F test je primenjen za poređenje tretmana. Standardna greška je izračunata da se ukažu na variranje unutar srednje vrednosti. Programski softver Minitab, version 19.1.0 (Minitab Inc., State College, PA, USA) je korišćen za obradu podataka (free version).

## 5. REZULTATI

Etarsko ulje karanfilića je korišćeno za istraživanja u ovoj disertaciji. U prvom delu disertacije, izvršena je hemijska analiza korišćenog ulja (Probotanic), u smislu ispitivanja sastava i ukupnog sadržaja aktivnih komponenti. Zatim je izvršena kapsulacija ulja sa ciljem dobijanja stabilne formulacije bolje rastvorljivosti i produženog biološkog delovanja. Potom je testirana insekticidna i antimikrobna aktivnost novih formulacija dobijenih kapsulacijom sa različitim nosačima.

### 5.1. Sastav etarskog ulja karanfilića

GC–MS analiza etarskog ulja karanfilića (Probotanic) je detektovala deset komponenti koje čine 98,98% sastava ulja, a među kojima je eugenol (4-alil-2-etoksifenol) utvrđen kao glavna komponenta sa sadržajem od 79.70%. Zatim slede slede tri jedinjenja zastupljena više od 1% (eugenol acetat, kariofilen, kariofilen oksid) (Slika 6, Tabela 3).



**Slika 6.** GC–MS hromatogram etarskog ulja karanfilića (Probotanic)

**Tabela 3.** Hemijski sastav etarskog ulja karanfilića utvrđen korišćenjem GC-MS analize

Komponenta	Sadržaj (%)	Retenciono vreme (min)	Kovač indeks
Eugenol	79.70	20.9212	2773.6
Eugenol acetat	11.83	27.3963	3589.1
Kariofilen (E-)	4.51	22.9065	3023.5
Kariofilen oksid	1.37	29.2375	3821.0
$\alpha$ -Humulen	0.72	24.2154	3188.5
Vanilin	0.35	22.0565	2916.6
Kalamen trans	0.15	26.9725	3535.7
Humilen epoksid II	0.14	30.2112	3943.6
Havikol	0.11	16.2289	2196.0
Koniferil alkohol (E)	0.10	40.5097	5240.6
Ukupno	98.98		

### 5.2. Kapsulirane formulacije etarskog ulja karanfilića

Tri različite, homogene i stabilne formulacije etarskog ulja karanfilića su sintetisane u obliku koncentrata za emulziju (EC), korišćenjem tri različita nosača aktivne materije: prirodnog zeolita (formulacija nazvana kao F-CNZ), sintetičkog zeolita (formulacija nazvana kao F-CSZ) i želatina goveđeg (formulacija nazvana kao F-CG).

Utvrđene vrednosti fizičkih parametara novodizajniranih formulacija prikazane su u Tabeli 4. Dobijeni rezultati ispunjavaju kriterijume preporučene od WHO (2010) za EC formulaciju.



**Tabela 4.** Fizički parametri kapsuliranih formulacija etarskog ulja karanfilića (radni rastvor 0.5%)

Parametar	CEO EC formulacija		
	F-CSZ	F-CNZ	F-CG
Boja	žuta	žuta	žuta
pH	7.6	7.61	7.65
Gustina	0.9158 g mL <sup>-1</sup>	0.9163 g mL <sup>-1</sup>	0.9169 g mL <sup>-1</sup>
Postojanost pene (0.5%)			
10 s	0 mL	1 mL	2 mL
60 s	0 mL	0 mL	1 mL
180 s	0 mL	0 mL	0 mL
720 s	0 mL	0 mL	0 mL
Tačka paljenja	>100 °C	>100 °C	>100 °C

### 5.3. Insekticidna aktivnost

Izlaganje imaga krompirovog moljca (*P. operculella*) prema različitim koncentracijama čistog etarskog ulja karanfilića u trajanju od 24 h rezultiralo je letalnom koncentracijom od 0,225  $\mu\text{L L}^{-1}$  vazduha koja uzrokuje smrtnost od 50% ( $\text{LC}_{50}$ ) i 0,536  $\mu\text{L L}^{-1}$  vazduha koja izaziva smrtnost od 95% ( $\text{LC}_{95}$ ) imaga *P. operculella* (Tabela 5). Koncentracija od 0,768  $\mu\text{L L}^{-1}$  vazduha je uzrokovala mortalitet 99% jedinki imaga *P. operculella* nakon 24 h izloženosti (Slika 7, Tabela 6). Tretmanom sa čistim etarskim uljem karanfilića postignut je 100% mortalitet imaga *Ph. operculella* nakon 24 h izloženosti, dok mortalitet posle 48 h nije utvrđen, odnosno, etarsko ulje karanfilića je izgubilo insekticidnu aktivnost.

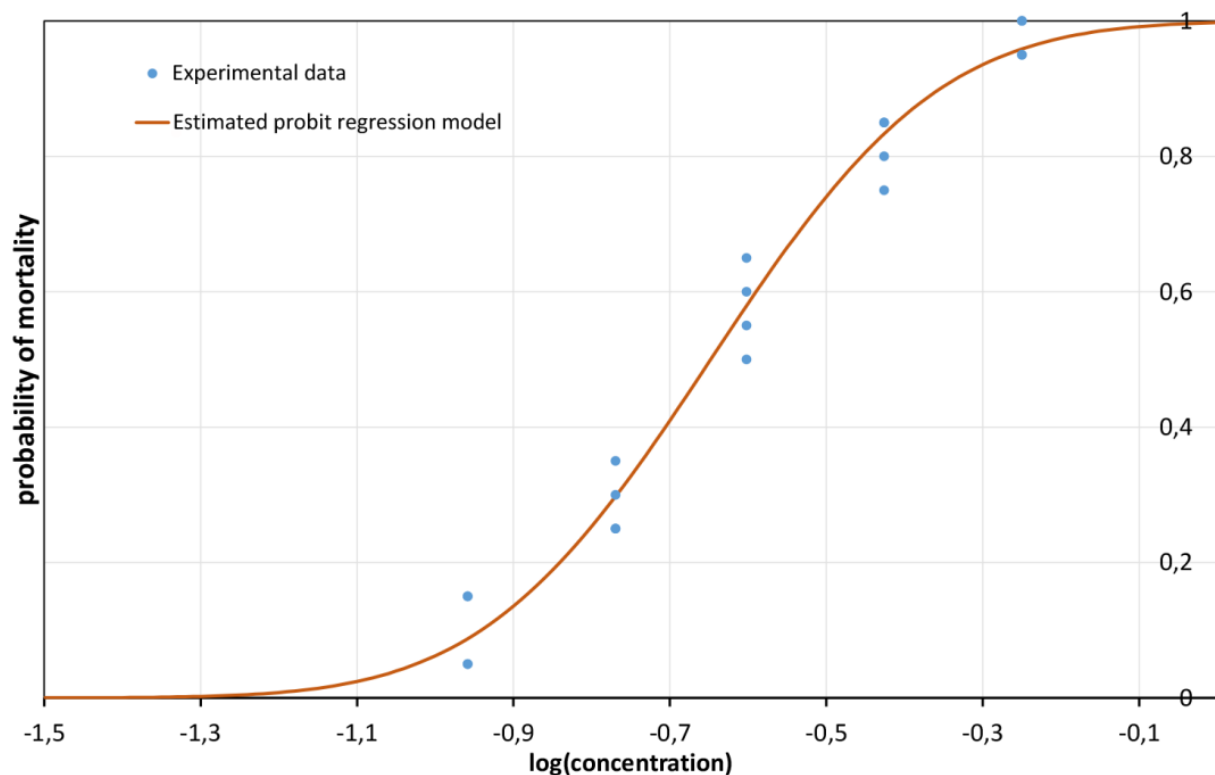
Kod tretmana novodizajniranih kapsuliranih EC formulacija etarskog ulja karanfilića (FCSZ, F-CNZ i F-CG), zabeleženo je produženo delovanje na mortalitet imaga *P. operculella*. Tokom izlaganja imaga koncentraciji emulzije od 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  vazduha, mortalitet se postepeno smanjivao, od 100% nakon prvih 24 h na 50% nakon 5 dana kod primene F-CSZ formulacije ili posle 4 dana kod F-CNZ i F-CG formulacija (Tabela 5). Najvišu efikasnost je pokazala formulacija F-CSZ čijom primenom je omogućeno delovanje ulja tokom 14 dana izloženosti

**Tabela 5.** Letalne koncentracije ( $\mu\text{L L}^{-1}$ ) etarskog ulja karanfilića i letalno vreme (dani) kapsuliranih CEO EC formulacija sa odgovarajućim intervalima poverenja, chi i *p*- vrednosti

<b>Tretman</b>	<b>LC<sub>50</sub></b>	<b>CI<sub>50</sub></b>	<b>LC<sub>95</sub></b>	<b>CI<sub>95</sub></b>	<b>LT<sub>50</sub></b>	<b>TI<sub>50</sub></b>	<b>LT<sub>90</sub></b>	<b>TI<sub>90</sub></b>	<b>Chi</b>	<b><i>p</i></b>
Etarsko ulje karanfilića	0.225	0.208–0.243	0.536	0.466–0.645	-	-	-	-	7.435	0.998
F-CSZ	-	-	-	-	5.898	5.539–6.243	0.954	0.210–1.576	30.762	0.995
F-CNZ	-	-	-	-	4.341	4.031–4.635	0.765	0.112–1.294	26.718	0.915
F-CG	-	-	-	-	4.472	4.189–4.744	1.220	0.652–1.683	19.856	0.993

(Slika 8, Tabela 7), dok je efikasnost druge dve formulacije (F-CNZ i F-CG) trajala 10 dana (Slike 9-10, Tabele 8-9). Kod sve tri formulacije etarskog ulja karanfilića beležen je mortalitet jedinki imaga *P. operculella* viši od 50% i nakon četiri dana od izvođenja tretmana (Tabele 7-9).

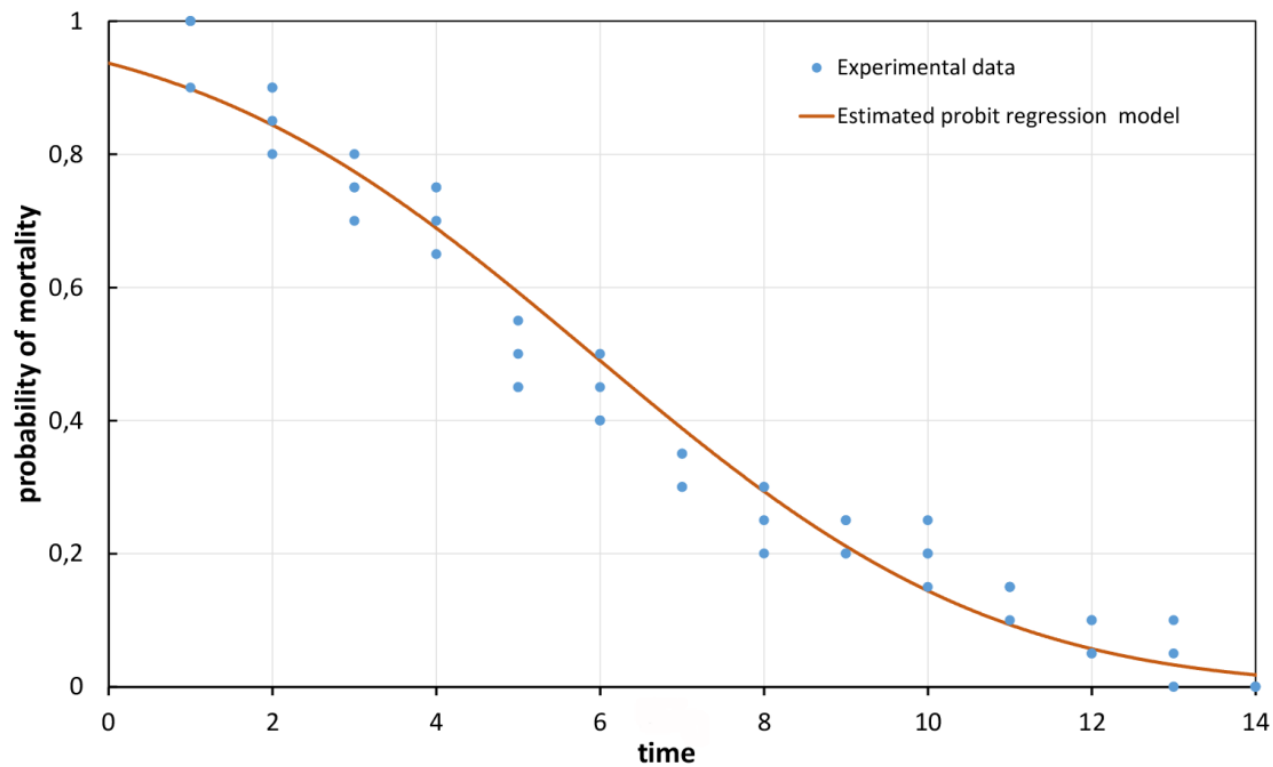
Formulacija F-CSZ je zadržala aktivnost tokom 14 dana izlaganja (Slika 8).



**Slika 7.** Verovatnoća mortaliteta imaga *P. operculella* izloženih različitim koncentracijama etarskog ulja karanfilića 24h nakon tretmana

**Tabela 6.** Letalne koncentracije (LC) utvrđene za etarsko ulje karanfilića (nivo poverenja od 95%) za suzbijanje imaga *P. operculella*

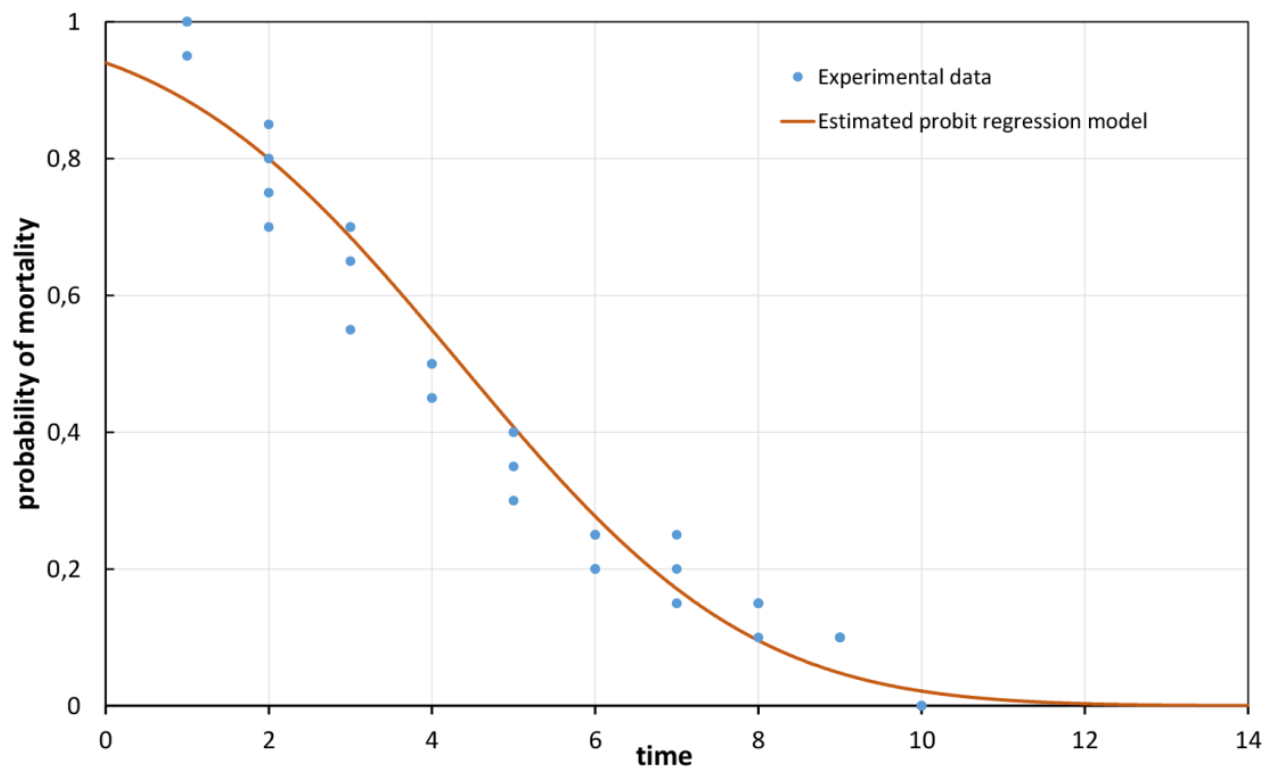
	Verovatnoća	Utvrđena koncentracija	Donja granica	Gornja granica
PROBIT	.010	0,066	0,051	0,080
	.020	0,076	0,060	0,091
	.030	0,083	0,067	0,098
	.040	0,089	0,073	0,104
	.050	0,094	0,077	0,109
	.060	0,099	0,082	0,114
	.070	0,103	0,086	0,118
	.080	0,107	0,090	0,122
	.090	0,111	0,094	0,126
	.100	0,114	0,097	0,130
	.150	0,130	0,113	0,145
	.200	0,144	0,127	0,160
	.250	0,158	0,141	0,173
	.300	0,171	0,154	0,186
	.350	0,184	0,167	0,199
	.400	0,197	0,180	0,213
	.450	0,211	0,194	0,228
	.500	0,225	0,208	0,243
	.550	0,240	0,222	0,261
	.600	0,257	0,238	0,280
	.650	0,276	0,255	0,301
	.700	0,297	0,273	0,327
	.750	0,321	0,294	0,357
	.800	0,351	0,319	0,394
	.850	0,389	0,351	0,444
	.900	0,442	0,394	0,515
	.910	0,456	0,405	0,534
	.920	0,472	0,417	0,556
	.930	0,490	0,431	0,581
	.940	0,511	0,447	0,610
.950	0,536	0,466	0,645	
.960	0,567	0,490	0,689	
.970	0,607	0,520	0,747	
.980	0,665	0,564	0,832	
.990	0,768	0,639	0,986	



**Slika 8.** Verovatnoća mortaliteta imaga *P. operculella* izloženih tretmanu novodizajnirane formulacije F-CSZ tokom 14 dana, vremenska regresija mortaliteta

**Tabela 7.** Letalno vreme (LT) utvrđeno za formulaciju F-CSZ (nivo poverenja od 95%) za suzbijanje imaga *P. operculella*

	Verovatnoća	Utvrđeno vreme (dani)	Donja granica	Gornja granica
PROBIT	.010	14,873	14,034	15,892
	.020	13,822	13,072	14,728
	.030	13,155	12,460	13,990
	.040	12,653	11,999	13,437
	.050	12,244	11,623	12,987
	.060	11,897	11,303	12,604
	.070	11,592	11,022	12,270
	.080	11,319	10,770	11,970
	.090	11,071	10,540	11,698
	.100	10,843	10,328	11,449
	.150	9,897	9,446	10,419
	.200	9,145	8,738	9,607
	.250	8,501	8,124	8,918
	.300	7,922	7,565	8,306
	.350	7,385	7,040	7,747
	.400	6,876	6,534	7,224
	.450	6,383	6,036	6,726
	.500	5,898	5,539	6,243
	.550	5,414	5,035	5,767
	.600	4,921	4,516	5,289
	.650	4,412	3,975	4,801
	.700	3,875	3,399	4,293
	.750	3,296	2,773	3,748
	.800	2,651	2,071	3,146
	.850	1,900	1,249	2,449
	.900	0,954	0,210	1,576
	.910	0,726	-0,042	1,366
	.920	0,478	-0,315	1,138
	.930	0,205	-0,616	0,887
	.940	-0,100	-0,953	0,608
.950	-0,448	-1,337	0,289	
.960	-0,856	-1,788	-0,085	
.970	-1,358	-2,344	-0,544	
.980	-2,025	-3,083	-1,154	
.990	-3,077	-4,249	-2,113	

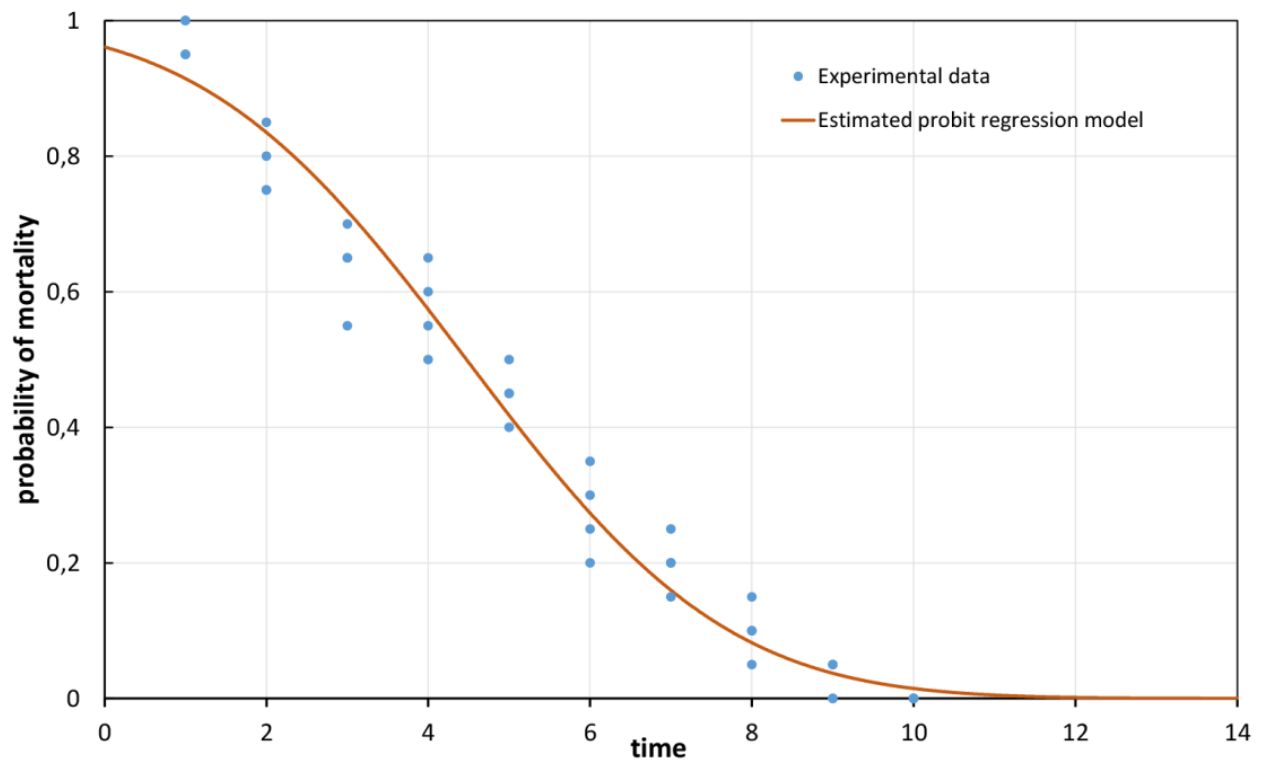


**Slika 9.** Verovatnoća mortaliteta imaga *P. operculella* izloženih tretmanu novodizajnirane formulacije F-CNZ tokom 14 dana, vremenska regresija mortaliteta

**Tabela 8.** Letalno vreme (LT) utvrđeno za formulaciju F-CNZ (nivo poverenja od 95%) za suzbijanje imaga *P. operculella*

	Verovatnoća	Utvrđeno vreme (dani)	Donja granica	Gornja granica
PROBIT	.010	10,832	10,127	11,720
	.020	10,072	9,441	10,860
	.030	9,589	9,006	10,316
	.040	9,226	8,677	9,907
	.050	8,931	8,409	9,576
	.060	8,679	8,181	9,294
	.070	8,459	7,980	9,047
	.080	8,262	7,800	8,826
	.090	8,082	7,636	8,626
	.100	7,917	7,485	8,442
	.150	7,233	6,854	7,684
	.200	6,690	6,347	7,087
	.250	6,223	5,906	6,582
	.300	5,804	5,503	6,134
	.350	5,416	5,123	5,726
	.400	5,048	4,756	5,345
	.450	4,692	4,394	4,984
	.500	4,341	4,031	4,635
	.550	3,991	3,663	4,291
	.600	3,634	3,283	3,948
	.650	3,266	2,885	3,598
	.700	2,878	2,462	3,233
	.750	2,459	2,001	2,844
	.800	1,993	1,484	2,413
	.850	1,449	0,878	1,916
	.900	0,765	0,112	1,294
	.910	0,600	-0,074	1,144
	.920	0,421	-0,276	0,981
	.930	0,223	-0,498	0,803
	.940	0,003	-0,746	0,603
.950	-0,248	-1,030	0,377	
.960	-0,544	-1,363	0,110	
.970	-0,907	-1,773	-0,217	
.980	-1,389	-2,319	-0,651	
.990	-2,150	-3,181	-1,334	





**Slika 10.** Verovatnoća mortaliteta imaga *P. operculella* izloženih tretmanu novodizajnirane formulacije F-CG tokom 14 dana, vremenska regresija mortaliteta

**Tabela 9.** Letalno vreme (LT) utvrđeno za formulaciju F-CG (nivo poverenja od 95%) za suzbijanje imaga *P. operculella*

	Verovatnoća	Utvrđeno vreme (dani)	Donja granica	Gornja granica
PROBIT	.010	10,375	9,727	11,184
	.020	9,683	9,102	10,405
	.030	9,244	8,705	9,912
	.040	8,914	8,405	9,541
	.050	8,645	8,161	9,241
	.060	8,417	7,953	8,985
	.070	8,216	7,770	8,761
	.080	8,037	7,606	8,561
	.090	7,874	7,457	8,380
	.100	7,723	7,319	8,213
	.150	7,102	6,745	7,525
	.200	6,607	6,283	6,983
	.250	6,183	5,883	6,523
	.300	5,802	5,518	6,116
	.350	5,449	5,174	5,743
	.400	5,115	4,842	5,395
	.450	4,791	4,516	5,064
	.500	4,472	4,189	4,744
	.550	4,153	3,858	4,429
	.600	3,829	3,515	4,114
	.650	3,494	3,157	3,792
	.700	3,141	2,776	3,458
	.750	2,760	2,360	3,101
	.800	2,336	1,893	2,707
	.850	1,842	1,345	2,252
	.900	1,220	0,652	1,683
	.910	1,070	0,484	1,546
	.920	0,906	0,302	1,398
	.930	0,727	0,101	1,235
	.940	0,527	-0,124	1,053
.950	0,298	-0,381	0,846	
.960	0,030	-0,682	0,602	
.970	-0,301	-1,054	0,304	
.980	-0,739	-1,548	-0,092	
.990	-1,431	-2,328	-0,716	

## 5.4. Antimikrobna aktivnost

### 5.4.1. Antimikrobna aktivnost prema *Botrytis cinerea* (siva trulež)

Tokom izvođenja oglada antimikrobne aktivnosti formulacija etarskog ulja karanfilića korišćeni izolat fitopatogene gljive *B. cinerea* prouzrokovao je u kontrolnom tretmanu simptome sive truleži na inokulisanim plodovima maline (Slika 11). Kod primene formulacija efikasnost je beležena i do 100% u redukciji infekcije plodova maline korišćenjem formulacija sa 5% aktivnog sastojka (etarskog ulja karanfilića) kod sve tri formulacije (Tabela 10; Slike 12 i 13).

U slučaju primene formulacija sa 1% aktivnog sastojka (etarskog ulja karanfilića), kod formulacija sa zeolitom kao nosačem (F-CSZ i F-CNZ) efikasnost je bila takođe 100%, dok je nakon primene formulacije sa želatinom kao nosačem (F-CG) beležena efikasnost od 93,4%. Primena formulacija sa 0,5% aktivnog sastojka (etarskog ulja karanfilića), je pokazala 100% efikasnost samo za formulaciju sa sintetičkim zeolitom kao nosačem (F-CSZ), dok su druge dve formulacije pokazale smanjenu efikasnost i to od 93,4% i 66,7% za formulaciju sa prirodnim zeolitom kao nosačem (F-CNZ) i formulaciju sa želatinom kao nosačem (F-CG), respektivno (Tabela 10).

Najbolja efikasnost tokom izvođenja oglada antimikrobne aktivnosti formulacija etarskog ulja karanfilića postignuta je sa primenom formulacije F-CSZ (sintetički zeolit kao nosač), sa kojom je postignuta 100% efikasnost u suzbijanju sive truleži (*B. cinerea*), čak i pri najnižoj testiranoj koncentraciji aktivnog sastojka (0,5% etarskog ulja karanfilića). Statistički značajna razlika je utvrđena samo kod tretmana sa primenom formulacije sa želatinom kao nosačem (F-CG) sa 0,5% sadržajem etarskog ulja karanfilića u odnosu na sve ostale testirane tretmane (Tabela 10).

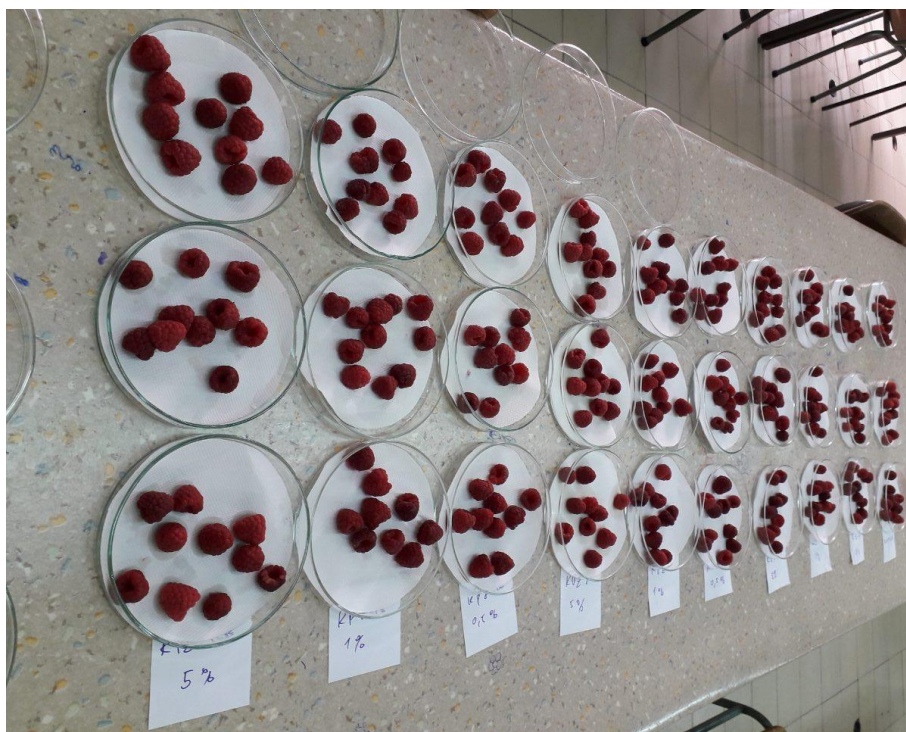
**Tabela 10.** Efikasnost kapsuliranih formulacija etarskog ulja karanfilića u suzbijanju fitopatogene gljive *B. cinerea* na plodovima maline (*in planta*)

Formulacija	Radna koncentracija (%)	Koncentracija CEO (%)	Ponavljanje *			Srednja vrednost	Efikasnost (%)
			I	II	III		
F-CSZ	25	5	0	0	0	0 a	100
	5	1	0	0	0	0 a	100
	2.5	0.5	0	0	0	0 a	100
F-CNZ	25	5	0	0	0	0 a	100
	5	1	0	0	0	0 a	100
	2.5	0.5	0	1	1	0.67 a	93.4
F-CG	25	5	0	0	0	0 a	100
	5	1	1	0	1	0.67 a	93.4
	2.5	0.5	3	3	4	3.3 b	66.7
Kontrola	-	-	10	10	10	10.0 c	0

Legenda: \* broj plodova sa simptomima sive truleži sa ukupno 10 po ponavljanju; vrednosti sa istim slovima se ne razlikuju statistički značajno ( $p < 0.05$ ); Duncan test  $> MS = 0.1111$ ;  $df = 18$ .



**Slika 11.** Siva trulež maline (*B. cinerea*), kontrolni tretman (bez primene formulacija etarskog ulja karanfilića) (foto M. Stević)



**Slika 12.** Tretmani novodizajniranim formulacijama etarskog ulja karanfilića u suzbijanju sive truleži (*B. cinerea*) (foto M. Stević)

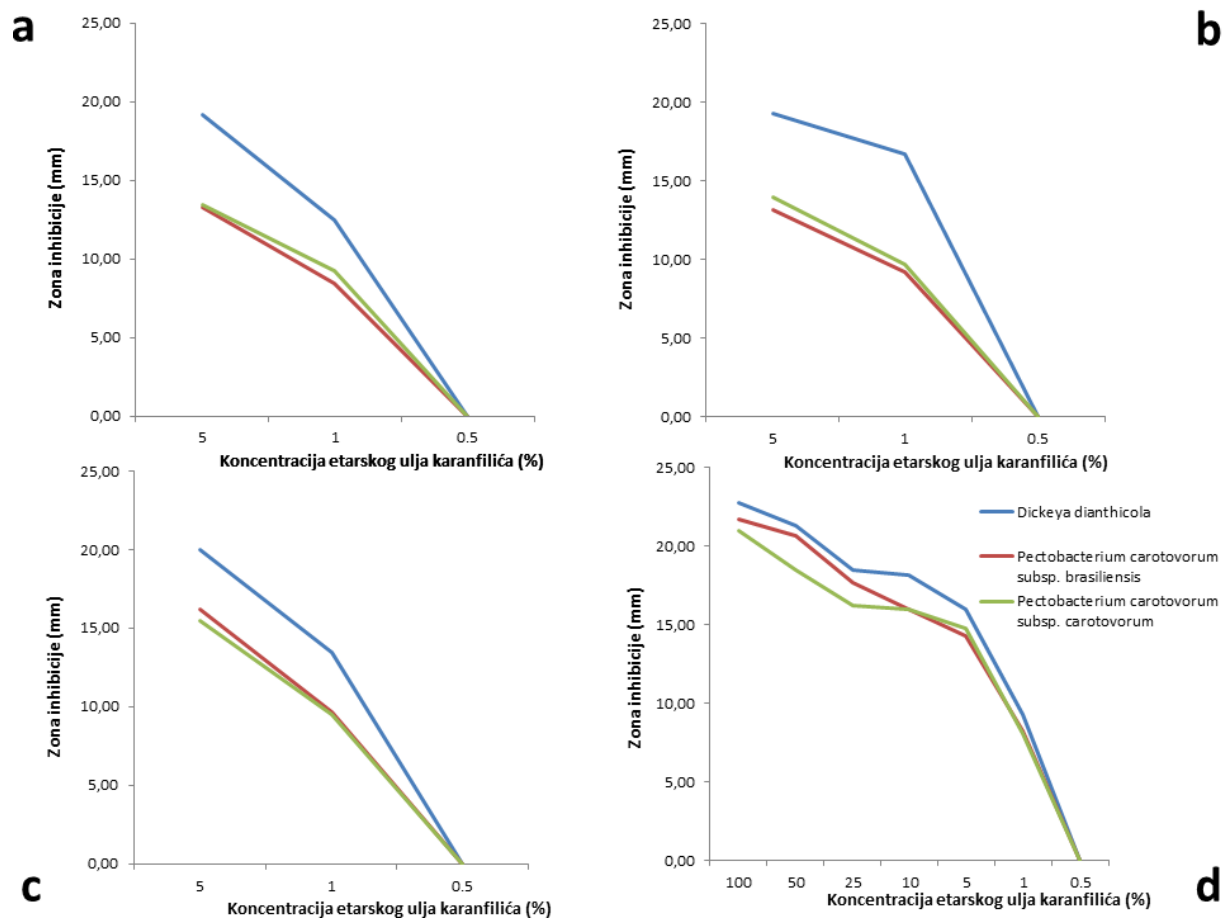


**Slika 13.** Tretmani novodizajniranom formulacijom ulja karanfilića F-CNZ u suzbijanju sive truleži (*B. cinerea*) – detalj (foto M. Stević)

#### **5.4.2. Baktericidna aktivnost prema prouzročivačima vlažne truleži**

Rezultati testiranja antibakterijske aktivnosti kapsuliranih formulacija i čistog etarskog ulja karanfilića prikazani su u Tabelama 11 i 12. *In vitro* ogledima je utvrđena koncentracija od 1% koja pokazuje inhibitorni efekat prema bakterijama prouzročivačima mrke truleži (*P. carotovorum*, *P. brasiliense*, *D. dianthicola*) (Slike 14 i 15; Tabele 11 i 12). Kapsulirane EC formulacije su pokazale sličnu antibakterijsku aktivnost u testiranim koncentracijama u poređenju sa istim koncentracijama čistog etarskog ulja karanfilića (Slika 14). Koncentracija 1% aktivnog čistog etarskog ulja karanfilića je određena kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC).

Prema dobijenim rezultatima ispitivanja viših koncentracija čistog etarskog ulja karanfilića (slika 14d), evidentno je da je etarsko ulje karanfilića pokazalo vrlo sličnu efikasnost ukoliko je korišćeno u nerazređenom obliku kao i u smanjenim koncentracijama sve do koncentracije od 5%. Ovi rezultati ukazuju da povećanje koncentracije čistog etarskog ulja karanfilića nije u korelaciji sa efikasnošću, što znači da je sličan trend efikasnosti dobijen kada se ulje karanfilića koristilo u nerazređenom obliku i u smanjenim koncentracijama sve do 10%.



**Slika 14.** Baktericidna aktivnost kapsuliranog i čistog etarskog ulja karanfilića prema bakterijama prouzročivačima vlažne truleži u *in vitro* uslovima; (a) formulacija CNZ; (b) formulacija CSZ; (c) formulacija CG; (d) čisto ulje karanfilića



**Slika 15.** Zona inhibicije utvrđena kod primene novodizajniranih formulacija etarskog ulja karanfilića prema fitopatogenim bakterijama, prouzrokovateljima vlažne truleži

Prema dobijenim rezultatima, statističke razlike su utvrđene kod tretmana primene različitih koncentracija etarskog ulja karanfilića i kapsuliranih EC formulacija. U grupi najefikasnijih su bili tretmani primene koncentracije 5% za patogena *D. dianthicola* kod svih tretmana, i koncentracije 2,5% kod primene formulacija F-CSZ i F-CNZ (Tabela 11). Sledeću grupu po efikasnosti činili su tretmani primene koncentracija 5% i 2,5% etarskog ulja karanfilića i kapsuliranih EC formulacija u suzbijanju bakterija *Pectobacterium (carotovorum i brasiliense)*, zatim primena koncentracije 1% u suzbijanju bakterije *D. dianthicola*, ali tretmani primene koncentracije 2,5% etarskog ulja karanfilića i kapsulirane formulacije F-CG (Tabela 11). Najslabija efikasnost je beležena kod primene koncentracije 1% etarskog ulja karanfilića i kapsuliranih EC formulacija u suzbijanju bakterija *P. carotovorum* subsp. Primena koncentracije 0,5% etarskog ulja karanfilića i kapsuliranih EC formulacija nije pokazala efikasnost u suzbijanju test organizama (Tabela 11).



**Tabela 11.** Efikasnost kapsuliranih formulacija i čistog etarskog ulja karanfilića u suzbijanju fitopatogenih bakterija prouzrokovaca vlažne truleži (*in vitro*)

Formulacija	Bakterija	Koncentracija (%)			
		5.0	2.5	1.0	0.5
F-CSZ	<i>P. carotovorum</i>	13,5 ghi	11,8 jkl	9,7 m	0 n
	<i>P. brasiliense</i>	13,3 ghij	11,7 kl	9,5 m	0 n
	<i>D. dianthicola</i>	19,2 ab	16,8 cd	13,0 hijkl	0 n
F-CNZ	<i>P. carotovorum</i>	14,0 fgh	12,2 ijkl	9,7 m	0 n
	<i>P. brasiliense</i>	13,2 hijk	11,7 kl	9,5 m	0 n
	<i>D. dianthicola</i>	19,3 ab	16,7 cd	13,8 gh	0 n
F-CG	<i>P. carotovorum</i>	14,3 efgh	12,0 ijkl	9,7 m	0 n
	<i>P. brasiliense</i>	14,0 fgh	11,8 jkl	9,5 m	0 n
	<i>D. dianthicola</i>	19,7 a	15,7 de	13,3 ghij	0 n
Čisto ulje karanfilića	<i>P. carotovorum</i>	14,8 efg	11,8 jkl	9,3 m	0 n
	<i>P. brasiliense</i>	14,3 efgh	11,5 l	9,5 m	0 n
	<i>D. dianthicola</i>	17,8 bc	15,5 def	12,2 ijkl	0 n

Legenda: mala slova predstavljaju statističke razlike. Kod tretmana gde ne postoje statistički značajne razlike, slova su ista. Različite boje predstavljaju statističke grupe.

**Tabela 12.** Rezultati analize varijanse za različite tretmane čistog etarskog ulja karanfilića i kapsulirane EC formulacije

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Tretman	47	11238,94	11238,94	239,13	476,93	0,000
Greška	240	120,33	120,33	0,50		
Total	287	11359,28				

S = 0,708088 R-Sq = 98,94% R-Sq(adj) = 98,73%

## **6. DISKUSIJA**

Dugotrajna i prekomerna upotreba sintetičkih pesticida pokreće potrebu za iznalaženje alternativnih agenasa koji ispoljavaju selektivno delovanje na target organizme, ali i prihvatljivim eko-toksikološkim osobinama, kako bi se njihovim potencijalnim uključivanjem u programe integralne zaštite uvela održiva strategija suzbijanja štetnih organizama u poljoprivrednoj proizvodnji kako u poljskim uslovima i zatvorenom prostoru, tako i tokom skladištenja gotovih proizvoda.

Mnogi pesticidi se poslednjih godina sve više povlače iz primene sa globalnog tržišta, a njihova direktna upotreba je zabranjena na biljnim proizvodima kao što su voće i povrće. Nasuprot tome, tržište biopesticida beleži trend porasta. Biopesticidi su proizvodi nastali od biljka ili njihovih ekstrakata, mikroba ili su mineralnog porekla, a deluju direktno kompeticijom, proizvodnjom antibiotika, parazitizmom ili indukcijom odbrambenog mehanizma biljke.

U ovom radu prikazan je potencijal primene etarskog ulja karanfilića, kao alternativa primeni sintetičkih pesticida, a za uspešnu redukciju i suzbijanje štetnih insekata i biljnih patogena, u novodizajniranim formulacijama koje imaju cilj da ostave hemijski nekontaminirane proizvode tokom čuvanja i skladištenja gotovih proizvoda tj. hrane. Tri nove sintetisane formulacije etarskog ulja karanfilića u obliku EC (koncentrat za emulziju), predstavljaju ekološki prihvatljive formulacije dizajnirane sa ciljem poboljšane bioaktivnosti ulja usled njegovog sporijeg, produženog oslobađanja, i rastvorljivosti ulja u vodi. Ulje karanfilića je odabrano za kapsulaciju obzirom da poseduje izvrsnu efikasnost u suzbijanju insekata i biljnih patogena, koja je i tokom ovog rada potvrđena. Takođe, važno je istaći da se ulje karanfilića se nalazi na listi dozvoljenih etarskih ulja za primenu u zaštiti bilja na području Evropske Unije.

Kapsulacija etarskog ulja karanfilića vršena je korišćenjem različitih nosača (sintetički zeolit, prirodni zeolit i goveđi želatin). Goveđi želatin je poslužio kao polimer matriks u kom su ugrađene kapljice ulja karanfilića, dok zeolit absorbuje kapljice usled svoje poroznosti.

Ideja za korišćenje goveđeg želatina kao nosača je proizašla iz rada Jovanović et al. (2020), gde se ovaj matriks pokazao kao dobro iskorišćen nosač za etarsko ulje limun trave. Zeoliti su odabrani zbog njihove sposobnosti da kontrolišu emisiju i kapacitet absorpcije i kod niskih koncentracija isparljivih organskih jedinjenja, što ih čini pogodnijim za rad sa nižim koncentracijama od aktivnog uglja ili polimera (Cox 1999). Prema De Smedt et al. (2015), zeoliti se mogu primeniti i direktno kao zaštitni film u suzbijanju štetočina i bolesti i mogu delovati kao nosači različitih aktivnih supstanci, obezbeđujući sporo oslobađanje aktivne supstance.

Shodno tome, pretpostavka u ovom radu je bila da se testira zeolit, prirodni i sintetički, kao nosač u formulacijama ulja karanfilića i da te formulacije uporedimo sa formulacijom u kojoj je korišćen eksploatisan nosač želatin (polimer). Neki istraživači su koristili prirodni zeolit, klinoptilolit, kao nosač za sintezu pesticida, kao što je to slučaj sa čvrstim oblikom sintetičkog piretroidnog insekticida supercipermetrina (Sopkova & Janokova, 1998) ili za biološke agense kao što je to slučaj fotostabilizacije *Bacillus thuringiensis* (Kvachantiradze et al. 1999).

Upotreba zeolita kao nosača etarskog ulja je ovom prilikom po prvi put testirana u svetu, čime se ističe značaj ovih istraživanja. Prednost korišćenja zeolita ogleda se u njegovoj ekološkoj i zdravstvenoj bezbednosti te obzirom da nije toksičan nema radnu karencu. Inače, zeoliti su aluminosilikatni materijali. Oni su prihvatljivi ne samo sa aspekta zaštite životne sredine, nego i sa ekonomskog stanovišta. Imaju izuzetne jonoizmenjivačke karakteristike, kao i izraženu sorpcionu mogućnost. Kada se govori o prirodnim zeolitima, njihova efektivnost zavisi od fizičko-hemijskih osobina koje su u uskoj vezi sa njihovim geološkim nalazištima. Pored ovih prirodnih, postoje i sintetički zeoliti koji se zbog čistoće proizvoda i uniformnosti veličina čestica, danas komercijalno češće u praksi koriste nego prirodni. Glavne prednosti sintetičkog zeolita je da se može konstruisati sa većim spektrom hemijskih osobina i veličinom pora, što utiče na veću termičku stabilnost i odlikuje ih većom apsorpcionu moć. Zeolit je u prirodi nereaktivna supstanca, a njegove absorpcione sposobnosti i kapacitet katjonske izmene se aktiviraju mehaničkom obradom tj. sitnjenjem. Aktivirani zeolit se kao ekološki proizvod koristi u građevini, medicini, veterini, stočarstvu, poljoprivredi, zatim kao antioksidans i absorbent za teške i radioaktivne metale. Takođe širu primenu ima u tekstilnoj, prehrambenoj i drugim industrijama. Usled njegove mogućnosti absorpcije primenjuje se za razdvajanje gasova. Takođe, nalazi primenu i kao filter za akvarijume, prečišćavanje voda koje sadrže teške metale i amonijak, absorpciju gasova; zatim kao katalizator, remedijaciju zemljišta, čak i za uklanjanje radioaktivnih elemenata iz otpadnih voda

nuklearnih elektrana, omekšavanje vode, separaciju gasova itd. U hemijskoj industriji najveću primenu ima sintetički zeolit, sa tačno definisanim osobinama, a koje su u skladu sa zahtevima datog procesa, a mogu se upotrebljavati kao katjonski izmenjivači, katalizatori, absorbensi vlage i molekulska sita (Tomić 2016). Aditivi, kao što je Tween 20, je korišćen kao surfaktant za raspršivanje kapljica ulja u rastvoru.

Izbor materijala koji se koristi za oblaganje ili nosač za kapsulaciju etarskog ulja je ključan; mora da štiti ulje, da garantuje njegovo kontrolisano oslobađanje, da bude rastvorljiv u vodi, biokompatibilan i biorazgradiv (Froio et al. 2019b). Prijavljeno je da se četiri kategorije jedinjenja koriste za dobijanje jestivih polimera: hidrokoloide (proteini i polisaharidi), polipeptidi, lipidi i kompoziti (Froio et al. 2019a).

Kapsulacija etarskog ulja je, generalno, obećavajuća tehnika za zaštitu osetljivih bioaktivnih jedinjenja od brze razgradnje. Shodno tome, mnogi istraživači su razvili nekoliko metoda kapsulacije kao što su: filmovi, mikrokapsulacija, nanoprecipitacija, elektrohidrodinamički procesi (*eng.* electrospinning, electrospraying) (Froio et al. 2019b; Munteanu et al. 2021; Nguien et al. 202).

Kapsulacija se najviše koristi u prehrambenoj industriji (Froio et al. 2019a, 2019b; Munteanu et al. 2021), ali može naći primenu i u farmaceutskom sektoru (Nguien et al. 2021), dok u nekim slučajevima i u zaštiti bilja (Jovanović et al. 2020; Barros et al. 2022). Koristeći različite tehnike i/ili nosače, mnoga etarska ulja su kapsulirana, i to: bosiljak, cimet, divlji origano, jasmin, limeta, timijan, limun, limun trava, narandža, origano, menta, ruzmarin itd. (Jovanović et al. 2020; Munteanu et al. 2021; Nguyen et al. 2021; Tangpao et al. 2021; Barros et al. 2022).

Jovanović et al. (2020) su razvili biorazgradivu, ekološki prihvatljivu formulaciju na bazi prirodnih polimera i eteričnog ulja limun trave (*Cymbopogon citratus* L.), za primenu kao „zeleni“ biopesticid za suzbijanje krompirovog moljca (*P. operculella*). Majčina dušica je kapsulirana metodom „spray drying“ i procenjena je efikasnost formulacije na mortalitet i perzistentnost kukuruznog žižka *Sitophilus zeamais* (Barros et al. 2022). Hill et al. (2013) su mikroinkapsulirali inkluzioni kompleks ekstrakta kore cimeta, trans-cinamaldehida, ekstrakta pupoljaka karanfilića, eugenola i mešavine trans-cinamaldehyd:eugenol (2:1) korićenjem tehnike suvog zamrzavanja (*eng.* „freeze-drying“). Ovi kompleksi su bili efikasniji pri nižim koncentracijama aktivnog jedinjenja u poređenju sa čistim uljem, što je verovatno posledica njihove povećane rastvorljivosti

u vodi, a time i povećanog kontakta između biljnog patogena i etarskog ulja. Kouassi et al. (2012) su ugradili *Cinnamomum zeilanicum* u komercijalni vosak citrusa (šelak, karnauba, parafin i polietilen) i ovom postupkom postigli odličnu biološku aktivnost u formulacijama sa primenom šelaka i/ili karnauba voska (Kouassi et al. 2012). Kapsulirana etarska ulja su obećavajući agensi koji se perspektivno mogu koristiti za povećanje antimikrobnih i insekticidnih aktivnosti ulja u lancima ishrane (Majeed et al. 2015). Prema dostupnoj literaturi, bioaktivnost etarskih ulja se povećava u kapsuliranoj matrici u odnosu na čisto ulje, pri istoj, pa čak i nižim koncentracijama ulja u matriksu (Majeed et al. 2015).

U ovom radu je analiziran sastav i sadržaj komponenti ulja karanfilića koji je korišćen tokom rada (Probotanic). Eugenol je detektovan kao glavna komponenta ulja. Prema ranijim istraživanjima, eugenol je beležen kao glavni sastojak i kreće su u ulju karanfilića u granicama 45–90% (Chaieb et al. 2007; Nurdjannah & Bermawie, 2012; Barakat 2014; Jafri et al. 2019). Ulje karanfilića korišćeno u ovom radu je po svom sadržaju odgovaralo kompleksu jedinjenja čija je koncentracija bila u optimalnom opsegu. Međutim, razlike u hemijskom sastavu mogu se javiti i u zavisnosti su od klimatskih, sezonskih i / ili geografskih uslova ili biljnog organa iz kojih se ekstrahuje. Značajne varijacije u sadržaju glavnih jedinjenja mogu se staviti i u korelaciju sa sezonom žetve (Santos-Gomes & Fernandes-Ferreira 2001).

Antimikrobna aktivnost eugenola se zasniva na sposobnosti da permeabiliše ćelijsku membranu i ostvari interakciju sa proteinima (Hildgaard et al. 2012; Jafri et al. 2019), pa je stoga visok sadržaj eugenola poželjan u etarskom ulju karanfilića. Eugenol je pokazao kontaktnu toksičnost i uticao na ishranu i razvoj štetnih insekata u skladištu (Huang et al. 2002).

Biološka aktivnost novosintetisanih formulacija etarskog ulja karanfilića ispitana je na ekonomski značajnim štetnim organizmima koji su zastupljeni na otvorenom polju ali i tokom skladištenja gotovih proizvoda (štetna insekatska vrsta *P. operculella*, fitopatogena gljiva *B. cinerea*, i fitopatogene bakterije *P. carotovorum* i *D. dianthicola*). Neki od najznačajnijih štetnih organizama u Srbiji koji osim u poljskim uslovima prave štetu i tokom čuvanja i skladištenja proizvoda su *P. operculella* (krompirov moljac), *B. cinerea* (siva trulež) i bakterije iz rodova *Pectobacterium* i *Dickeya* (vlažna trulež). Ideja je bila da se provere različiti mehanizmi delovanja novodizajniranih formulacija ulja uljane repice na ciljane organizme; stoga smo za insekte testirali fumigantni način delovanja. Za fitopatogene gljive proverili smo direktno delovanje u vidu premaza, a sa ciljem da se produži rok trajanja hrane (voća i povrća) tj. gotovih

proizvoda (*in planta*), a direktan inhibitorni efekat na rast patogena proveren je kod fitopatogenih bakterija (*in vitro*).

U ovom radu je tokom testiranja insekticidne aktivnosti etarskog ulja karanfilića determinisana koncentracija od  $0.768 \mu\text{L L}^{-1}$  vazduha koja izaziva smrtnost 99% jedinki imaga *P. operculella* posle 24 časa izlaganja. U slučaju primene novodizajniranih formulacija ulja karanfilića, utvrđeno je produženo delovanje ulja i do 14 dana kod formulacije F-CSZ, a kod ostale dve formulacije (F-CNZ i F-CG) do 10 dana. Slično ovim istraživanjima, u studiji Jovanović et al. (2020) formulacija dobijena kapsulacijom limun trave je ispoljila insekticidno delovanje u suzbijanju krompirovog moljca i produženi efekat do sedam dana nakon tretmana.

Etarsko ulje karanfilića se prema dostupnim literaturnim podacima pokazalo kao vrlo perspektivno u suzbijanju štetnih insekatskih vrsta. Potencijal ovog ulja za kontrolu štetnih insekatskih vrsta se ogleda kroz njegovo kontaktno, repelentno ili fumigantno delovanje, a što navodi veći broj autora (Chaieb et al. 2007; Kafle & Shih 2013). Prema Jairoce et al. (2016), ulje karanfilića može da izazove 100% mortalitet pasuljevog i kukuruznog žižka pri koncentracijama od  $17.9$  i  $35 \mu\text{L g}^{-1}$ , sa  $\text{LC}_{50}$  od  $9.45$ – $10.15 \mu\text{L g}^{-1}$ . Slično ovim istraživanjima, Tian et al. (2015) su pokazali da ulje karanfilića ispoljava visoku kontaktnu toksičnost u suzbijanju *Cacopsylla chinensis*, redukujući populaciju za 73.01% (sa primenjenom dozom od  $4.80 \text{ mg mL}^{-1}$ ), 66.18% (sa primenjenom dozom od  $2.40 \text{ mg mL}^{-1}$ ), i 46.56% (sa primenjenom dozom od  $1.20 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Ispitivanjem biološke efikasnosti novodizajniranih formulacija ulja karanfilića u suzbijanju sive truleži kod plodova maline utvrđena je visoka redukcija pojave bolesti, kao i produžen zaštitni period od infekcije. Na osnovu dobijenih rezultata, može se preporučiti komercijalna primena formulacija na voće, povrće ili grožđe, kao efikasan tretman za suzbijanje pojave i/ili širenja sive truleži, čime bi se produžio upotrební rok ovih proizvoda na tržištu.

Prema dostupnoj literaturi, beležena je efikasnost etarskih ulja u kontroli sive truleži (*B. cinerea*) u tretmanima koštičavog voća nakon berbe (Tsao & Zhou, 2000; Adebayo et al. 2013; Lopez-Reyes et al. 2013; Zamani-Zadeh et al. 2014; Elshafie et al. 2015). Siripornvisal et al. (2009) navode antimikrobne osobine etarskog ulja karanfilića u koje se ogledaju u sprečavanju razvoja micelije *B. cinerea*. Daniel et al. (2015) su pokazali da ulje karanfilića kao i ekstrakti belog luka nakon direktne primene imaju kurativni efekat u zasadima jabuke u upravljanju *B. cinerea*, i to bilo kada se primenjuju pojedinačno ili u kombinaciji, navodeći veću efikasnost u odnosu na protektivni tretman. Suzbijanje prouzrokovala sive truleži *B. cinerea* moguća je i

korišćenjem ulja *Zataria multiflora* kapsuliranog u nanočestice hitozana (Mohammadi et al. 2015a, 2015b) ili ulja ruzmarina (*Rosmarinus officinalis*) i mente (*Mentha piperita*) pojedinačno, ili u kombinaciji sa hipobaričnim tretmanom na 50 kPa (Servili et al. 2017). Neke komercijalne formulacije koje kao aktivne sastojke sadrže timol i karvakrol vrše inhibiciju porasta micelije i klijanja spora *B. cinerea* (Adebayo et al. 2013).

Etarsko ulje karanfilića je pokazano u ranijim istraživanjima kao efikasno u suzbijanju fitopatogenih bakterija prouzrokovaca vlažne truleži (Popović et al. 2017, 2019a, 2019b), ali i generalno u kontroli Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (Chaieb et al. 2007). U ovim istraživanjima utvrđeno je da je MIC (ili minimalna baktericidna koncentracija, MBC) ulja karanfilića 1% za suzbijanje patogenih prouzrokovaca vlažne truleži. Ulje karanfilića sa MBC/MIC = 1–2 i eugenol sa MBC/MIC = 1–4 su pokazali baktericidni efekat za sedam Gram-negativnih i devet Gram-pozitivnih patogenih bakterija riba (Pathirana et al. 2019). Hajian-Maleki et al. (2019) su u svojim studijama sprovedeli istraživanje kako bi se iskoristio inovativni pristup za upravljanje bolestima vlažne truleži krompira primenom tri nova etarska ulja ekstrahovana iz autohtonih biljaka, uključujući *Hyssopus officinalis*, *Satureja khuzistanica*, i *Zataria multiflora* u uslovima *in vitro* i *in vivo*. Najbolji supresivni efekat je beležen kod *S. khuzistanica* i *Z. multiflora* sa MIC 0.19 i 0.38 g L<sup>-1</sup>. Rezultati ogleada sprovedenih u *in vivo* uslovima su pokazali da je preventivni tretman u odnosu na kurativni imao mnogo veći efekat u kontroli truleži krtola krompira. Pojava bolesti je redukovana za 38.4–70.6% u poređenju sa netretiranim uzorcima (Hajian-Maleki et al. 2019).

Rezultati dobijeni u ovom radu ukazuju na to da etarsko ulje karanfilića kao i njegove kapsulirane EC formulacije sa primenom kao prirodnih i ekološki prihvatljivih biopesticida predstavljaju sastavni deo novog integrativnog pristupa u kontroli štetnih insekatskih vrsta kao i bolesti odnosno biljnih patogena.

## 7. ZAKLJUČCI

U okviru ove disertacije sprovedena su ispitivanja primene etarskog ulja karanfilića (*Syzygium aromaticum*) kao i kapsuliranih EC formulacija ulja u oblasti zaštiti bilja. Na osnovu dobijenih rezultata u ovom radu se mogu izvesti sledeći zaključci:

- ✓ Postupkom analize gasne hromatografije sa masenom spektrometrijom (GC-MS) etarskog ulja karanfilića (Probotanic) detektovano je deset komponenti koje čine 98,98% sastava ulja, među kojima je eugenol utvrđen kao glavna komponenta sa sadržajem od 79.70%.
- ✓ Kapsulacijom etarskog ulja karanfilića dizajnirane su nove formulacije u obliku koncentrata za emulziju (EC), korišćenjem tri različita nosača aktivne materije: sintetički zeolit (formulacija F-CSZ), prirodni zeolit (formulacija F-CNZ) i goveđi želatin (formulacija F-G).
- ✓ Fizičke osobine novodizajniranih EC formulacija etarskog ulja karanfilića: boja, pH, gustina, postojanost pene i tačka paljenja, odgovaraju determinisanim osobinama za tip EC formulacija.
- ✓ Primena čistog etarskog ulja karanfilića rezultirala je letalnom koncentracijom od 0,225  $\mu\text{L L}^{-1}$  vazduha koja uzrokuje smrtnost od 50% ( $\text{LC}_{50}$ ) i 0,536  $\mu\text{L L}^{-1}$  vazduha koja izaziva smrtnost od 95% ( $\text{LC}_{95}$ ) jedinki imaga *P. operculella* nakon izlaganja u trajanju od 24 h, čime je potvrđena insekticidna aktivnost ulja. Mortalitet nije utvrđen posle 48 h, odnosno, etarsko ulje karanfilića je izgubilo insekticidnu aktivnost.



- ✓ Tretmanima novodizajniranih kapsuliranih EC formulacija etarskog ulja karanfilića u koncentraciji emulzija od 40  $\mu\text{L L}^{-1}$  vazduha, postignuto je produženo delovanje na mortalitet imaga krompirovog moljca, *P. operculella*. Tokom izlaganja imaga mortalitet se postepeno smanjivao, od 100% nakon prva 24 h do 50% nakon 5 dana kod primene F-CSZ formulacije ili posle 4 dana kod F-CNZ i F-CG formulacija.
- ✓ Najviša efikasnost u suzbijanju krompirovog moljca, *P. operculella* postignuta je primenom formulacije F-CSZ čijom primenom je omogućeno delovanje ulja tokom 14 dana izloženosti, dok je efikasnost druge dve formulacije (F-CNZ i F-CG) trajala 10 dana. Kod sve tri formulacije etarskog ulja karanfilića beležen je mortalitet jedinki imaga *P. operculella* viši od 50% i nakon četiri dana od izvođenja tretmana.
- ✓ Antimikrobna aktivnost novodizajniranih EC formulacija etarskog ulja karanfilića dokazana je u suzbijanju fitopatogene gljive *B. cinerea* (siva trulež) *in planta*. Beležena je efikasnost 100% u redukciji infekcije plodova maline korišćenjem formulacija sa 5% etarskog ulja karanfilića kod sve tri formulacije (F-CSZ, F-CNZ i F-CG). Najviša efikasnost postignuta je primenom formulacije F-CSZ, jer je čak i pri najnižoj testiranoj koncentraciji aktivnog sastojka (0,5% etarskog ulja karanfilića) postignuta 100% efikasnost.
- ✓ Antibakterijska aktivnost novodizajniranih EC formulacija etarskog ulja karanfilića utvrđena je *in vitro* prema bakterijama prouzrokovateljima mrke truleži (*P. carotovorum*, *P. brasiliense*, *D. dianthicola*). Koncentracija 1% aktivnog čistog etarskog ulja karanfilića je utvrđena kao minimalna inhibitorna koncentracija (MIC). Više koncentracije čistog etarskog ulja karanfilića su pokazale vrlo sličnu efikasnost primenjeno u nerazređenom obliku kao i u smanjenim koncentracijama sve do koncentracije od 5%, čime je pokazano da povećanje koncentracije čistog etarskog ulja karanfilića nije u korelaciji sa efikasnošću.
- ✓ Novodizajnirane EC formulacije etarskog ulja karanfilića mogu naći potencijalnu primenu u poljoprivrednoj proizvodnji odnosno zaštiti bilja, kao vredan resurs u daljem razvoju i primeni biopesticida.

## 8. LITERATURA

- Abbott, W.S. 1925. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. *Journal of Economic Entomology* 18:265–267.
- Abd-El-Gawad, M.A., Elshamy, I.A., El-Amier, A.Y., El Gendy, G.A., Al-Barati, A.S., Dar, A. B., Al-Rowaily, L.S., Assaeed, M.A. 2020. Chemical composition variations, allelopathic, and antioxidant activities of *Symphytotrichum squamatum* (Spreng.) Nesom essential oils growing in heterogeneous habitats. *Arabian Journal of Chemistry* 13:4237–4245.
- Adams, R.P. 2007. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*; Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA.
- Adebayo, O., Dang, T., Bélanger, A., Khanizadeh, S. 2013. Antifungal studies of selected essential oils and a commercial formulation against *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Research* 2(1):217–226.
- Aguilar-González, A.E., Palou, E., López-Malo, A. 2015. Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against gray mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. *Innovative food science & emerging technologies* 32:181–185.
- Ajanta, B., Sharma, T.V.R.S., Shrawan, S., Srivastava, R. C. Effect of aqueous leaf extract of cloves (*Syzygium aromaticum*) on growth and development of tobacco caterpillar (*Spodoptera litura*). *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 2010, 80(6), 534–537.
- Alfikri, F.N., Pujiarti, R., Wibisono, M.G., Hardiyanto, E.B. Yield, quality, and antioxidant activity of clove (*Syzygium aromaticum* L.) bud oil at the different phenological stages in young and mature trees. *Scientifica*, 2020.
- Aminabhavi, T. M., Banerjee, K. Density, viscosity, refractive index, and speed of sound in binary mixtures of dimethyl carbonate with methanol, chloroform, carbon tetrachloride, cyclohexane, and dichloromethane in the temperature interval (298.15– 308.15) K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 1998, 43(6), 1096-1101.

- Aryal, S., Jung, C. 2019. A potential threat to tomato, a congener crop to potato from invaded potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller). *Journal of Asia-Pacific Entomology* 22(1):77–82.
- Avignon-Meseldzija, E, Lepetit, T., Ferreira, P.M., Boust, F. 2017. Negative inductance circuits for metamaterial bandwidth enhancement. *EPJ Applied Metamaterials* 4:11.
- Bai, J., Li, J., Chen, Z., Bai, X., Yng, Z., Wang, Z., Yang, Y. 2023. Antibacterial Activity and Mechanism of Clove Essential Oil Against Foodborne pathogens. *Food Science and Technology* 171:114249.
- Bai, X., Shen, Y., Zhang, T., Meng, R., Zhang, Y., Deng, Y., Guo, N. 2023. Anti-biofilm activity of biochanin A against *Staphylococcus aureus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 107(2-3):867–879.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. 2008. Idaomar, M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and chemical toxicology* 46(2):446–475.
- Bakry, A.M., Abbas, S., Ali, B., Majeed, H., Abouelwafa, M.Y., Mousa, A., Liang, L. 2016. Microencapsulation of oils: A comprehensive review of benefits, techniques, and applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 15:143–182.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S.K. 2016. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6:71–79.
- Barakat, H. 2014. Composition, antioxidant, antibacterial activities and mode of action of clove (*Syzygium aromaticum* L.) buds essential oil. *British journal of applied science and technology* 4:1934–1951.
- Barros, F.A., Radünz, M., Scariot, M.A., Camargo, T.M., Nunes, C.F., de Souza, R.R., Gilson, I.K., Hackbart, H.C., Radünz, L.L., Oliveira, J.V., Tramontin, M.A. 2022. Efficacy of encapsulated and non-encapsulated thyme essential oil (*Thymus vulgaris* L.) in the control of *Sitophilus zeamais* and its effects on the quality of corn grains throughout storage. *Crop Protection* 153:105885.
- Beg, A.Z., Ahmad, I. 2002. In vitro fungitoxicity of the essential oil of *Syzygium aromaticum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 18:317–319.
- Beirão-da-Costa, S., Duarte, C., Bourbon, A.I., Pinheiro, A.C., Januário, M.I.N., Vicente, A.A., Beirão-da-Costa, M.L., Delgadillo, I. 2013. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil. *Food Hydrocolloids* 33(2):199–206.

- Bhat, K.A., Viswanath, H.S., Bhat, N.A., Wani, T.A. 2017. Bioactivity of various ethanolic plant extracts against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing soft rot of potato tubers. *Indian Phytopathology* 70(4):463–470.
- Bhowmik, D., Kumar, K.S., Yadav, A., Srivastava, S., Paswan, S., Dutta, A.S. 2012. Recent trends in Indian traditional herbs *Syzygium aromaticum* and its health benefits. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 1:13–23.
- Brachet, A., Christen, P., Veuthey, J.L. 2002. Focused microwave-assisted extraction of cocaine and benzoylecgonine from coca leaves. *Phytochemical Analysis* 13:162–169.
- Capuzzo, A., Maffei, M.E., Occhipinti, A. 2013. Supercritical fluid extraction of plant flavors and fragrances. *Molecules* 18:7194–7238.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakbi, A.B., Rouabhia, M., Mahdouani, K., Bakhrouf, A. 2007. The chemical composition and biological activity of clove essential oil, *Eugenia caryophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): a short review. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 21(6):501–506.
- Charabany, G., Shtienberg, D. 1999. Epidemiology of *Botrytis cinerea* in Sweet Basil and implications for disease management. *Plant Disease* 83:554–560.
- Cortés-Rojas, D.F., de Souza, C.R.F., Oliveira, W.P. 2014. Clove (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine* 4(2):90–96.
- Cox, L. 1999. Choosing an Adsorption System for VOC: Carbon, Zeolite or Polymers? *Catc Tech. Bull. EPA 456/F-99-004*, U.S. Environmental Protection Agency, Research, NC, USA. Available online: <https://www3.epa.gov/ttnecatc1/dir1/fadsorb.pdf>
- Cronquist, A. 1981. *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. Columbia University Press, New York, p.1262.
- Czajkowski, R., Pérombelon, van Veen, J. A., van der Wolf, J.M. 2011. Control of blackleg and tuber soft rot of potato caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species: a review. *Plant Pathology* 60:999–1013.
- D’Costa, V.M., King, C.E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W.W., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G.B. 2011. Antibiotic resistance is ancient. *Nature* 477(7365):457–461.
- Daniel, C.K., Lennox, C.L., Vries, F.A. 2015. In vivo application of garlic extracts in

- combination with clove oil to prevent postharvest decay caused by *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum* and *Neofabraea alba* on apples. *Postharvest biology and technology* 99:88–92.
- Dawidowicz, A.L., E. Rado, D., Wianowska, M., Mardarowicz, Gawdzik, J. 2008. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L. *Talanta* 76:878–884.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L., Duke, S.O., 2009. Natural products in crop protection. *Bioorganic & medicinal chemistry* 17(12):4022–4034.
- Devi, N., Maji, T.K. 2009a. Preparation and evaluation of gelatin/sodium carboxymethyl cellulose polyelectrolyte complex microparticles for controlled delivery of isoniazid. *Aaps PharmSciTech* 10:1412–1419.
- Devi, N., Maji, T.K. 2009b. A novel microencapsulation of neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seed oil (NSO) in polyelectrolyte complex of  $\kappa$ -carrageenan and chitosan. *Journal of Applied Polymer Science* 113(3):1576–1583.
- Devi, N., Maji, T.K. 2010. Microencapsulation of isoniazid in genipin-crosslinked gelatin-A- $\kappa$ -carrageenan polyelectrolyte complex. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 36(1): 56–63.
- Devi, N., Maji, T. K. 2011. Neem seed oil: Encapsulation and controlled release-search for a greener alternative for pest control. Pesticides in the Modern World-Pesticides Use and Management. *InTech*, 191–322.
- Duarte, V., De Boer, S.H., Ward, L.J., De Oliveira, A.M.R. 2004. Characterization of atypical *Erwinia carotovora* strains causing blackleg of potato in Brazil. *Journal of Applied Microbiology* 96:535–545.
- Dudareva, N., Klempien, A., Muhlemann, J.K., Kaplan, I. 2013. Biosynthesis, function and metabolic engineering of plant volatile organic compounds. *New Phytologist* 198(1):16–32.
- De Smedt, C., Someus, E., Spanoghe, P., 2015. Potential and actual uses of zeolites in crop protection. *Pest management science* 71(10):1355–1367.
- Ebadollahi, A. 2013. Essential oils isolated from Myrtaceae family as natural insecticides. *Annual Research & Review in Biology* 3(3):148–175.
- Elad, Y. 2000. Biocontrol of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19:709–714.

- Elad, Y., Köhl, J. Fokkema, N.J. 1994. Control of infection and sporulation of *Botrytis cinerea* on bean and tomato by saprophytic bacteria and fungi. *European Journal of Plant Pathology* 100:315–336.
- Elad, Y., Zimand, G., Zaqs, Y., Zuriel, S. Chet, I. 1993. Use of *Trichoderma harzianum* in combination or alternation with fungicides to control cucumber grey mould (*Botrytis cinerea*) under commercial greenhouse conditions. *Plant Pathology* 42:324–332.
- Elad, Y. 1994. Biological control of grape grey mould by *Trichoderma harzianum*. *Crop Protection* 13(1):35–38.
- El-Hamed, A., Neama, A., Shaalan, H.S., Fargalla, F.H. 2011. Effectiveness of some plant powders and bioinsecticides against *Phthorimaea operculella* (Zeller.) (Lepidoptera: Gelechiidae) on some potato cultivars. *Journal of Plant Protection and Pathology* 2(4): 475–480.
- El-Saber Batiha, G., Alkazmi, L.M., Wasef, L.G., Beshbishy, A.M., Nadwa, E.H., Rashwan, E.K. 2020. *Syzygium aromaticum* L. (Myrtaceae): Traditional Uses, Bioactive Chemical Constituents, Pharmacological and Toxicological Activities. *Biomolecules* 10(2):202.
- Elnabawy, E.S.M., Hassan, S., Taha, E.K.A. 2022. Repellent and Toxicant Effects of Eight Essential Oils against the Red Flour Beetle, *Tribolium castaneum* Herbst (Coleoptera: Tenebrionidae). *Biology* 11(1):3.
- Elshafie, H.S., Mancini, E., Camele, I., De Martino, L., De Feo, V. 2015. In vivo antifungal activity of two essential oils from Mediterranean plants against postharvest brown rot disease of peach fruit. *Industrial Crops and Products* 66:11–15.
- Eyambe, G., Camales, L., Bonik, B.K. 2011. Antimicrobial Activity of Eugenol Derivatives. *Heterocyclic Letters* 1(2):154–157.
- Ferhat, M.A., Meklati, B.Y., Smadja, J., Chemat, F. 2006. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. *Journal of Chromatography A* 1112(1-2):121–126.
- Filajdić, N., Vukša, P., Ivanović, M. Rekanović, E. 2003. Biološke mere zaštite bilja: problemi i perspektive. *Pesticidi* 18(2):69–75.
- Filly, A., Fernandez, X., Minuti, M., Visinoni, F., Cravotto, G., Chemat, F. 2014. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: from laboratory to pilot and industrial scale. *Food Chemistry* 150:193–198.

- Flores-Dávila, M., Aguirre-Uribe, L. A., Cerna-Chávez, E., Quiñones-Dena, H., Ochoa-Fuentes, Y. M., Frías-Treviño, G. Hernández-Juárez, A., Chacón-Hernández, J. C. 2017. Plant Oils to Control *Sitophilus zeamais* Motschulsky1. *Southwestern Entomologist* 42(3):725–730.
- Froiiio, F., Ginot, L., Paolino, D., Lebaz, N., Bentaher, A., Fessi, H., Elaissari, A., 2019a. Essential oils-loaded polymer particles: Preparation, characterization and antimicrobial property. *Polymers* 11(6):1017.
- Froiiio, F., Mosaddik, A., Morshed, M.T., Paolino, D., Fessi, H., Elaissari, A. 2019b. Edible polymers for essential oils encapsulation: Application in food preservation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 58(46):20932–20945.
- Hajian-Maleki, H., Baghaee-Ravari, S., Moghaddam, M. 2019. Efficiency of essential oils against *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* causing potato soft rot and their possible application as coatings in storage. *Postharvest Biology and Technology* 156:110928.
- Hamini-Kadar, N., Hamdane, F., Boutoutaou, R., Kihal, M. and Henni, J.E., 2014. Antifungal activity of clove (*Syzygium aromaticum* L.) essential oil against phytopathogenic fungi of tomato (*Solanum lycopersicum* L) in Algeria. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 2(5):447–454.
- Hill, L.E., Gomes, C., Taylor, T.M., 2013. Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology* 51(1):86–93.
- Ho, S.H., Cheng, L.P.L., Sim, K.Y., Tan, H.T.W., 1994. Potential of cloves (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. and Perry as a grain protectant against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. *Postharvest Biology and Technology* 4(1-2):179–183.
- Hyldgaard, M., Mygind, T., Meyer, R.L., 2012. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology* 3:12.
- Huang, Y., Ho, S.H., Lee, H.C., Yap, Y.L. 2002. Insecticidal properties of eugenol, isoeugenol and methyleugenol and their effects on nutrition of *Sitophilus zeamais* Motsch.(Coleoptera: Curculionidae) and *Tribolium castaneum* (Herbst)(Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal of Stored Products Research* 38(5):403–412.

- Gardan, L., Gouy, C., Christen, R., Samson, R. 2003. Elevation of three subspecies of *Pectobacterium carotovorum* to species level: *Pectobacterium atrosepticum* sp. nov., *Pectobacterium betavascularum* sp. nov. and *Pectobacterium wasabiae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 53:381–391.
- Gašić, K., Gavrilović, V., Dolovac, N., Trkulja, N., Živković, S., Ristić, D., Obradović, A. 2014. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* – the causal agent of broccoli soft rot in Serbia. *Pesticides & Phytomedicine* 29(4):249–255.
- Gašić, K., Gavrilović, V., Ivanović, Ž., Obradović, A. 2013. First report of broccoli soft rot caused by *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* in Serbia. *Plant Disease* 11:1504.
- Gavrilović, V., Ivanović, Ž., Živković, S., Trkulja, N. 2009. Etiological study of bacterial soft rot of fenel. *Plant protection* (Belgrade) 270:247–256.
- Ghosh, A., Chowdhury, N., Chandra, G. 2012. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *The Indian journal of medical research* 135(5):581.
- Giraud, T., Fortini, D., Levis, C., Lamarque, C., Leroux, P., Lobuglio, K., Brygoo, Y. 1999. Two sibling species of the *Botrytis cinerea* complex, *transposa* and *vacuma*, are found in sympatry on numerous host plants. *Phytopathology* 89:967–973.
- Golmakani, M.T., Zare, M., Razzaghi, S. 2017. Eugenol enrichment of clove bud essential oil using different microwave-assisted distillation methods. *Food Science and Technology Research* 23(3):385–394.
- González-Rivera, J., Duce, C., Falconieri, D., Ferrari, C., Ghezzi, L., Piras, A., Tine, M.R. 2016. Coaxial microwave assisted hydrodistillation of essential oils from five different herbs (lavender, rosemary, sage, fennel seeds and clove buds): Chemical composition and thermal analysis. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 33:308–318.
- Govaerts, R., Sobral, M., Ashton, P., Barrie, F., Holst, B.K., Landrum, L.L., Matsumoto, K., Mazine, F.F., Nic Lughadha, E., Proença, C., Soares-Silva, L.H., Wilson, P.G., Lucas, E. 2008. World Checklist of Myrtaceae. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens.
- Gullino, M.L. 1992. Chemical control of *Botrytis* spp. In: Recent Advances in Botrytis Research (Verhoeff K., Malathrakis N.E., Williamson B., eds.), Pudon Scientific Publishers, Wageningen, The Netherlands.
- Gupta, V.P., Tewari, S.K., Govindaiah D. Bajpai, A.K. 1999. Ultrastructure of mycoparasitism of



- Trichoderma*, *Gliocladium* and *Laetisaria* species on *Botryodiplodia theobromae*. *Journal of Phytopathology*, 147:19–24.
- Haddi, K., Oliveira, E.E., Faroni, L.R., Guedes, D.C., Miranda, N.N. 2015. Sublethal exposure to clove and cinnamon essential oils induces hormetic-like responses and disturbs behavioral and respiratory responses in *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). *Journal of economic entomology* 108(6):2815–2822.
- Hamam, H.B., El Ghanam, M.S. 2017. Ovicidal efficiency of some botanical oils against hatchability of potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* eggs and their side effect on *Chrysoperla carnea* under laboratory conditions. *Egyptian Journal of Agricultural Research* 95(2):625–637.
- Hamini-Kadar, N., Hamdane, F., Boutoutaou, R., Kihal, M., Henni, J. E. 2014. Antifungal activity of clove (*Syzygium aromaticum* L.) essential oil against phytopathogenic fungi of tomato (*Solanum lycopersicum* L) in Algeria. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences* 2(5):447–454.
- Harčárová, M., Čonková, E., Proškovcová, M., Váczi, P., Marcinčáková, D., Bujňák, L. 2021. Comparison of antifungal activity of selected essential oils against *Fusarium graminearum* in vitro. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 28(3):414–418.
- Haro-González J.N, Castillo-Herrera G.A, Martínez-Velázquez M, Espinosa-Andrews H. 2021. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. *Molecules* 26(21):6387.
- Henglein, A., Kormann, C. 1985. Scavenging of OH radicals produced in the sonolysis of water. *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine* 48:251–258.
- Hill, L.E., Gomes, C., Taylor, T.M. (2013). Characterization of beta-cyclodextrin inclusion complexes containing essential oils (trans-cinnamaldehyde, eugenol, cinnamon bark, and clove bud extracts) for antimicrobial delivery applications. *LWT-Food Science and Technology* 51(1):86–93.
- Hong, T.K., Perumalsamy, H., Jang, K.H., Na, E.S., Ahn, Y.J. 2018. Ovicidal and larvicidal activity and possible mode of action of phenylpropanoids and ketone identified in *Syzygium aromaticum* bud against *Bradysia procera*. *Pesticide biochemistry and*

- physiology* 145:29–38.
- Huang, Q., Lakshman, D.K. 2010. Effect of clove oil on plant pathogenic bacteria and bacterial wilt of tomato and geranium. *Journal of Plant Pathology* 92(3):701–707.
- Ibrahim, S.S. 2022. Polyethylene Glycol Nanocapsules Containing *Syzygium aromaticum* Essential Oil for the Management of Lesser Grain Borer, *Rhyzopertha dominica*. *Food Biophysics* 17(4):523–534.
- Ikawati, S., Himawan, T., Abadi, A. L., Tarno, H. 2021. Toxicity nanoinsecticide based on clove essential oil against *Tribolium castaneum* (Herbst). *Journal of Pesticide Science* 46(2):222–228.
- Isman, M.B. 2000. Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection* 19: 603–608.
- Isman, M.B. 2006. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology* 51:45–66.
- Ivanović, M., Gašić, K., Gavrilović, V., Obradović, A. 2009. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* - prouzročivač vlažne truleži biljaka kale u Srbiji i Crnoj Gori. *Pesticides & Phytomedicine* 24:287–293.
- Jafri, H., Ansari, F.A., Ahmad, I. 2019. Prospects of essential oils in controlling pathogenic biofilm. In *New Look to Phytomedicine* (Khan, M.S.A., Ahmad, I., Chattopadhyay, D., eds.). Academic Press: Cambridge, MA, USA, pp. 203–236.
- Jairoce, C.F., Teixeira, C.M., Nunes, C.F., Nunes, A.M., Pereira, C.M., Garcia, F.R. 2016. Insecticide activity of clove essential oil on bean weevil and maize weevil. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental* 20:72–77.
- Jarvis, W.R. 1980. Epidemiology. In: *The biology of Botrytis* (Coley-Smith J.R., Verhoeff K., Jarvis W.R., eds.). Academic Press, London, UK, pp. 219–250.
- Jovanović, J., Krnjajić, S., Ćirković, J., Radojković, A., Popović, T., Branković, G., Branković, Z. 2020. Effect of encapsulated lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against potato tuber moth *Phthorimaea operculella*. *Crop Protection* 132:105109.
- Kačaniová, M., Galovičová, L., Borotová, P., Valková, V., Ďúranová, H., Kowalczewski, P.Ł., Said-Al Ahl, H.A.H., Hikal, W.M., Vukic, M., Savitskaya, T. 2021. Chemical Composition, In Vitro and In Situ Antimicrobial and Antibiofilm Activities of *Syzygium aromaticum* (Clove) Essential Oil. *Plants* 10:2185.

- Kafle, L., Shih, C.J. 2013. Toxicity and repellency of compounds from clove (*Syzygium aromaticum*) to red imported fire ants *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae). *Journal of Economic Entomology* 106(1):131–135.
- Kałużna, M., Sobiczewski, P., Dobreva, A.M., Baeva, G.S., Dzurmanski, A.G., Dimkova, S.D., Zapryanova, N.G., Atanassova, B.Y., Iakimova, E.T. 2021. Preliminary in vitro tests on inhibitory activity of distinct plant extracts toward bacterial pathogens of fruit and nut trees. *Journal of Plant Pathology* 103(2):635–642.
- Kennouche, A., Benkaci-Ali, F., Scholl, G., Eppe, G. 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* Cloves extracted by conventional and microwave techniques. *J. Biol. Act. Prod. Nat.*, 5, 1–11.
- Kennouche, A., Benkaci-Ali, F., Scholl, G., Eppe, G. 2015. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* cloves extracted by conventional and microwave techniques. *Journal of Biologically Active Products from Nature* 5(1):1–11.
- Kereši, T., Konjević, A., Popović, A. 2019. Posebna entomologija 2. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, pp. 289.
- Kereši, T., Sekulić, R., Tanasković, S., Konjović, A. 2015. Krompirov moljac – sve važnija štetočina krompira u Srbiji. *Biljni lekar* 43(6):608–621.
- Kouassi, K.H.S., Bajji, M., Jijakli, H. 2012. The control of postharvest blue and green molds of citrus in relation with essential oil–wax formulations, adherence and viscosity. *Postharvest Biology and Technology* 73:122–128.
- Koul, O., Walia, S., Dhaliwal, G.S. 2008. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International* 4(1):63–84.
- Kovačević, N. 2002. Osnovi farmakognozije. Drugo dopunjeno izdanje. Srpska skolska knjiga, Beograd.
- Krnjajić S., Popović T., Oro V., Radović V. 2018. Efikasnost etarskih ulja za imaga moljca krompira (*Phthorimaea operculella*). XV Savetovanje o zaštiti bilja, 26-30.novembar, Zlatibor, Srbija. Zbornik rezimea radova, pp. 30–31.
- Kulkarni, N., Shendye, A., Rao, M. 1999. Molecular and biotechnological aspects of xylanases. *FEMS Microbiology Reviews* 23(4):411–456.
- Kulkarni, P., Marsan, A., Dutta, D. 2000. A review of process planning techniques in layered

- manufacturing. *Rapid Prototyping Journal* 6(1):18–35.
- Kumbar, S.G., Kulkarni, A.R., Dave, A.M., Aminabhavi, T.M. 2001. Encapsulation efficiency and release kinetics of solid and liquid pesticides through urea formaldehyde crosslinked starch, guar gum, and starch+ guar gum matrices. *Journal of Applied Polymer Science* 82(11):2863–2866.
- Kvachantiradze, M., Tvalchrelidze, E., Kotetishvili, M., Tsitsishvili, T. 1999. Application of clinoptilolite as an additive for the photostabilization of the *Bacillus thuringiensis* formulation. In *Porous Materials in Environmentally Friendly Processes* (Kiricsi, I., Pal-Borbély, G., Nagy, J.B., Karge, H.G., eds.). Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, pp. 731–735.
- Kumar, R., Srivastava, M., Dubey, N.K. 2007. Evaluation of *Cymbopogon martinii* oil extract for control of postharvest insect deterioration in cereals and legumes. *Journal of Food Protection* 70(1):172–178.
- Lee, K.G., Shibamoto, T. 2001. Antioxidant property of aroma extract isolated from clove buds [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. et Perry]. *Food Chemistry* 74(4):443–448.
- Lepojević, Ž. 2000. Praktikum hemije i tehnologije farmaceutskih proizvoda. Zmaj.
- Leroux, P., Fritz, R., Debieu, D., Albertini, C., Lanen, C., Bach, J., Gredt, M., Chapeland, F. 2002. Mechanisms of resistance to fungicides in field strains of *Botrytis cinerea*. *Pest Management Science* 58:876–888.
- Letellier, M., Budzinski, H., Charrier, L., Capes, S., Dorthe, A.M. 1999. Optimization by factorial design of focused microwave-assisted extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from marine sediment. *Journal of Analytical Chemistry* 364:228–237.
- Levchenko, M.A., Silivanova, E.A., Khodakov, P.E., Gholizadeh, S. 2021. Insecticidal efficacy of some essential oils against adults of *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *International Journal of Tropical Insect Science* 41(4):2669–2677.
- Lević, S., Kalušević, A., Đorđević, V., Bugarski, B., Nedović, V. 2014. Savremeni procesi inkapsulacije u tehnologiji hrane. *Hrana i ishrana* 55:7–12.
- Liao, J., Chen, Q. 2021. Biodegradable plastics in the air and soil environment: Low degradation rate and high microplastics formation. *Journal of hazardous materials* 418:126329.
- Liao, W., Badri, W., Dumas, E., Ghnimi, S., Elaissari, A., Saurel, R., Gharsallaoui, A. 2021. Nanoencapsulation of essential oils as natural food antimicrobial agents: An overview.

- Applied Sciences* 11(13):5778.
- Lopez-Reyes, J.G., Spadaro, D., Prella, A., Garibaldi, A., Gullino, M.L. 2013. Efficacy of plant essential oils on postharvest control of rots caused by fungi on different stone fruits in vivo. *Journal of Food Protection* 76(4):631–639.
- Lucas, G.C., Alves, E., Pereira, R.B., Perina, F.J., Souza, R.M D. 2012. Antibacterial activity of essential oils on *Xanthomonas vesicatoria* and control of bacterial spot in tomato. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 47:351–359.
- Lucchesi, M., Chemat, F., Smajda, J. 2004. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. *Journal of Chromatography A* 1043:323–327.
- Macías-Cortés, E., Gallegos-Infante, J.A., Rocha-Guzmán, N.E., Moreno-Jiménez, M.R., Medina-Torres, L., González-Laredo, R.F. 2020. Microencapsulation of phenolic compounds: Technologies and novel polymers. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 19(2):491–521.
- 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): 2539.
- Maffei, M.E. Plant natural sources of the endocannabinoid (E)- $\beta$ -caryophyllene: A systematic quantitative analysis of published literature. *International Journal of Molecular Sciences* 21(18):6540.
- Maffei, M.E., Gertsch, J., Appendino, G. 2011. Plant volatiles: production, function and pharmacology. *Natural Product Reports* 28(8):1359–1380.
- Majeed, H., Bian, Y.Y., Ali, B., Jamil, A., Majeed, U., Khan, Q.F., Fang, Z. 2015. Essential oil encapsulations: Uses, procedures, and trends. *RSC Advances* 5(72):58449–58463.
- Mansfield, J., Genin, S., Magori, S., Citovsky, V., Sriariyanum, M., Ronald, P., Dow, M., Verdier, V., Beer, S.V., Machado, M.A., Toth, I., Salmond, G., Foster, G.D. 2012. Top 10 plant pathogenic bacteria in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology* 13: 614–629.
- Mariano, F.V., Aguirre-Uribe, L.A., Cerna-Chávez, E., Quiñones-Dena, H., Ochoa-Fuentes, Y.M., Frías-Treviño, G.A., Hernández-Juárez, A., Chacón-Hernández, J.C. 2017. Plant Oils to Control *Sitophilus zeamais* Motschulsky1. *Southwestern Entomologist* 42(3):725–

730.

- Marković, S., Stanković, S., Jelušić, A., Iličić, R., Kosovac, A., Poštić, D., Popović, T. 2021. Occurrence and Identification of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* and *Dickeya dianthicola* Causing Blackleg in some Potato Fields in Serbia. *Plant Disease* 105(4):1080–1090.
- Marković, S., Milić Komić, S., Jelušić, A., Iličić, R., Bagi, F., Stanković, S., Popović, T. 2022. First report of *Pectobacterium versatile* causing blackleg of potato in Serbia. *Plant Disease* 106(1):312.
- Meyer, S.L., Lakshman, D.K., Zasada, I.A., Vinyard, B.T., Chitwood, D.J. 2008. Phytotoxicity of clove oil to vegetable crop seedlings and nematotoxicity to root-knot nematodes. *HortTechnology* 18:631–638.
- Meyer-Warnod, B. 1984. Natural essential oils: extraction processes and application to some major oils. *Perfumer & flavorist* 9(2):93–104.
- Meseldžija, M., Babec, I., Dudić, M. 2017. Efekti etarskih ulja karanfilića (*Syzygium aromaticum* L.) i cimeta (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) i kao potencijalnih bioherbicida na *Datura stramonium* L. i *Stellaria media* (L.) Vill. *Acta Herbologica* 26(1):59–68.
- Mikiciński, A., Sobiczewski, P., Berczyński, S. 2012. Efficacy of fungicides and essential oils against bacterial diseases of fruit trees. *Journal of Plant Protection Research* 52(4):467–471.
- Miletaković, S., Stanković, S., Krnjajić, S., Todorović, M.J., Tomić, V., Jovanović, R. 2018. Economic justification of biological measures for potato tuber moth control. Proceedings of the IX International Scientific Agriculture Symposium AGROSYM, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 4–7 October, pp. 1030–1033.
- Milošević, D., Bugarčić, Ž., Milenković, S., Bročić, Z., Jovović, Z. 2016. Incidence, harmfulness and control of potato tuber moth (*Phthorimaea operculella*). XXI Savetovanje o biotehnol. Zbornik Radova, pp. 319–325.
- Mitra, S.K., Irenaes, T.K.S., Gurung, M.R., Pathak, P.K. 2012. Taxonomy and importance of Myrtaceae. In III International Symposium on Guava and other Myrtaceae 959 (pp. 23-34).
- Miyazawa, M., Hisama, M. 2001. Suppression of chemical mutagen-induced SOS response by alkylphenols from clove (*Syzygium aromaticum*) in the *Salmonella typhimurium* TA1535/pSK1002 umu test. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(8):4019–

4025.

- Mohammadi, A., Hashemi, M., Hosseini, S.M. 2015a. Nanoencapsulation of *Zataria multiflora* essential oil preparation and characterization with enhanced antifungal activity for controlling *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mould disease. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 28:73–80.
- Mohammadi, A., Hashemi, M., Hosseini, S.M. 2015b. The control of *Botrytis* fruit rot in strawberry using combined treatments of Chitosan with *Zataria multiflora* or *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *Journal of Food Science and Technology* 52:7441–7448.
- Moore, D., Lord, J.C., Smith, S.M. 2000. Pathogens. In: *Alternatives to Pesticides in Stored-Product IPM* (Subramanyam, B., Hagstrum, D., eds.). Kluwer Academic: New York, USA, pp. 193–228.
- Mossa, A.T.H. 2016. Green pesticides: Essential oils as biopesticides in insect-pest management. *Journal of Environmental Science and Technology* 9(5):354.
- Mpumi, N., Machunda, R., Mtei, K., Ndakidemi, P. 2021. Insecticidal Efficacy of *Syzygium aromaticum*, *Tephrosia vogelii* and *Croton dichogamus* Extracts against *Plutella xylostella* and *Trichoplusia ni* on *Brassica oleracea* crop in Northern Tanzania. *AIMS Agriculture and Food* 6(1):185–202.
- Munteanu, B.S., Vasile, C. 2021. Encapsulation of Natural Bioactive Compounds by Electrospinning—Applications in Food Storage and Safety. *Polymers* 13(21):3771.
- Naqvi, S.A.H., Iqbal, S., Farooq, U., Hassan, M.Z., Shahid, M.N., Noor Shah, A., Abbas, A., Mubeen, I., Farooq, A., Ghareeb, R.Y., Kalaji, H.M. 2022. Evaluation of Bacterial Perpetuation Assays and Plant Biomolecules Antimicrobial Activity against Cotton Blight Bacterium *Xanthomonas citri* subsp. *malvacearum*; An Alternative Source for Food Production and Protection. *Plants* 11(10):1278.
- Negahban, M., Moharramipour, S., Sefidkon, F. 2007. Fumigant toxicity of essential oil from *Artemisia sieberi* Besser against three stored-product insects. *Journal of Stored Products Research* 43:123–128.
- Nethook, F.J. 1951. Microbial control of *Botrytis cinerea* Pers. II Antagonism by fungi and actinomycetes. *Annals of Applied Biology* 35:185–202.
- Nguyen, T.T.T., Le, T.V.A., Dang, N.N., Nguyen, D.C., Nguyen, P.T.N., Tran, T.T., Nguyen, Q.V., Bach, L.G., Thuy Nguyen Pham, T.D. 2021. Microencapsulation of essential oils by

- spray-drying and influencing factors. *Journal of Food Quality* 2021:1–15.
- Nikolić, M., Milivojević, J., Ivanović, M. 2008. Strawberry production in Serbia—the state and perspectives. VI International Strawberry Symposium, 842, pp. 615–618.
- Nurdjannah, N., Bermawie, N. 2012. Cloves. In *Handbook of Herbs and Spices*, 2nd edition (Peter, K.V., ed.). Woodhead Publishing: Cambridge, UK, pp. 197–215.
- Obeng-Ofori, D.E., Reichmuth, C.H. 1997. Bioactivity of eugenol, a major component of essential oil of *Ocimum suave* (Wild.) against four species of stored-product Coleoptera. *International Journal of Pest Management* 43(1):89–94.
- Oerke, E.C. 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144(1):31–43.
- Okigbo, R.N., Ikediugwu, F.E.O. 2000. Studies on biological control of postharvest rot in Yams (*Dioscorea* spp.) using *Trichoderma viridae*. *Journal of Phytopathology* 148:351–355.
- Oro, V., Krnjajic, S., Tabakovic, M., Stanojevic, J.S., Ilic-Stojanovic, S. 2020. Nematicidal Activity of Essential Oils on a Psychrophilic *Panagrolaimus* sp. (Nematoda: Panagrolaimidae). *Plants* 9(11):1588.
- Pathirana, H.N.K.S., Wimalasena, S.H.M.P., De Silva, B.C.J., Hossain, S., Heo, G. 2019. Antibacterial activity of clove essential oil and eugenol against fish pathogenic bacteria isolated from cultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Slovenian Veterinary Research* 56:31–38.
- Pimentel, D., McLaughlin, L., Zepp, A., Lakitan, B., Kraus, T., Kleinman, P., Selig, G. 1991. Environmental and Economic Effects of Reducing Pesticide Use: A substantial reduction in pesticides might increase food costs only slightly. *Bioscience* 41:402–409.
- Popović, T., Kostić, I., Milićević, Z., Gašić, K., Kostić, M., Dervišević, M., Krnjajić, S. 2017. Essential oils as an alternative bactericides against soft-rot bacteria, *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum*. Proceedings of the VIII International Scientific Agriculture Symposium Agrosym, Jahorina, Bosnia and Herzegovina, 5–8 October 2017, pp. 1377–1383.
- Popović, T., Milićević, Z., Ilić, R., Marković, S., Oro, V., Jelušić, A., Krnjajić, S. 2019. Antibacterial activities of essential oils of wild oregano, clove bud, rosemary, peppermint, basil and lemongrass against growth of soft rot bacteria. Proceedings of the 1st International Symposium: Modern Trends in Agricultural Production and Environmental Protection, Tivat, Montenegro, 2–5 July, pp. 230–242.



- Popović, T., Jelusić, A., Marković, S., Iličić, R. 2019. Characterization of *Pectobacterium carotovorum* subsp. *carotovorum* isolates from a recent outbreak on cabbage in Bosnia and Herzegovina. *Pesticides & Phytomedicine* 34(3-4):211–222.
- Pourmortazavi, S.M., Hajimirsadeghi, S.S. 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. *Journal of Chromatography A* 1163:2–24.
- Pumnuan, J., Sarapothong, K., Sikhao, P., Pattamadilok, C., Insung, A. 2021. Film seeds coating with hexane extracts from *Illicium verum* Hook. f. and *Syzygium aromaticum* (L.) Merrill & Perry for controlling *Callosobruchus maculatus* (F.) and *Callosobruchus chinensis* L. *Pest Management Science* 77(5):2512–2521.
- Rana, I.S., Rana, A.S., Rajak, R.C. 2011. Evaluation of antifungal activity in essential oil of the *Syzygium aromaticum* (L.) by extraction, purification and analysis of its main component eugenol. *Brazilian Journal of Microbiology* 42:1269–1277.
- Rassem, H.H.A., Nour, A.H., Yunus, R.M. 2016. Techniques for extraction of essential oils from plants: A review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences* 10:117–127.
- Rotem, J., Cohen, Y., Bashi, E. 1978. Host and environmental influences on sporulation in vivo. *Annual Review of Phytopathology* 16:83–101.
- Rozzi, N.L., Phippen, W., Simon, J.E., Singh, R.K. 2002. Supercritical fluid extraction of essential oil components from lemon-scented botanicals. *Lebensmittel Wissenschaft und Technologie* 35:319–324.
- Russell, P.E. 2005. Centenary review - A century of fungicide evolution. *Journal of Agricultural Science* 143:11–25.
- Safrudin, I., Maimulyanti, A., Prihadi, A.R. 2015. Effect of crushing of clove bud (*Syzygium aromaticum*) and distillation rate on main constituents of the essential oil. *American Journal of essential oils and natural products* 2(3):12–15.
- Sahu, D.M., Singh, K.P. 2022. Developmental inhibitory effect of the *Syzygium aromaticum* essential oil on the postembryonic stages of a polyphagous pest, *Pericallia ricini* (Lepidoptera: Arctiidae). *Invertebrate Reproduction & Development* 66(2):147–156.
- Samson, R., Legendre, J.B., Christen, R., Fischer-Le Saux, M., Achouak, W., Gardan, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. (1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya*

- dadantii* sp. nov., *Dickeya dianthicola* sp. nov., *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zaeae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 55:1415–1427.
- Sangwan, N.K., Verma, B.S., Verma, K.K., Dhindsa, K.S. 1990. Nematicidal activity of some essential plant oils. *Pesticide Science* 28(3):331–335.
- Santos, A., Chierice, G., Alexander, K., Riga, A., Matthews, E. 2009. Characterization of the raw essential oil eugenol extracted from *Syzygium aromaticum* L. *Journal of thermal analysis and calorimetry* 96(3):821–825.
- Santos-Gomes, P.C., Fernandes-Ferreira, M. 2001. Organ-and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49:2908–2916.
- Servili, A., Feliziani, E., Romanazzi, G. 2017. Exposure to volatiles of essential oils alone or under hypobaric treatment to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology* 133:36–40.
- Shan, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H. 2005. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(20):7749–7759.
- Sheikh, Z., Amani, A., Basseri, H.R., Kazemi, S.H.M., Sedaghat, M.M., Azam, K., Azizi, M., Amirmohammadi, F. 2021. Repellent Efficacy of *Eucalyptus globulus* and *Syzygium aromaticum* essential oils against malaria vector, *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Iranian Journal of Public Health* 50(8):1668.
- Siripornvisal, S., Rungprom, W., Sawatdikarn, S. 2009. Antifungal activity of essential oils derived from some medicinal plants against grey mould (*Botrytis cinerea*). *Asian Journal of Food and Agro-Industry* (Special Issue) 2:S229–S233.
- Soliman, W., Ibrahim, M., El Baz, H. 2019. In vitro evaluation of *Syzygium aromaticum* L. ethanol extract as biocontrol agent against postharvest tomato and potato diseases. *Egyptian Journal of Botany* 59(1):81–94.
- Sopková, A., Janoková, E. 1998. An insecticide stabilized by natural zeolite. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* 53:477–485.
- Soxhlet, F. 1879. Die gewichtsanalytische Bestimmung des Milchfettes. *Dingler's Polytechnisches Journal* (in German) 232:461–465.

- Špirović Trifunović, B., Tojić, T. 2022. Metode ekstrakcije i identifikacije etarskih ulja i njihov bioherbicidni potencijal. *Acta herbologica* 31(1):5–26.
- Sreenivasa, R.D., Davendra, K., Liza, J., Chandrasekaran, G.M. 2006. Granular formulation of neem seed extract and its process thereof. United States Patent 20060099233.
- Stehmann, C. 1995. Biological activity of triazole fungicides towards *Botrytis cinerea*. Wageningen University and Research.
- Stankovic, S., Kostic, M., Kostic, I., Krnjajic S. 2020. Practical Approaches to Pest Control: The Use of Natural Compounds. In *Pests, Weeds and Diseases in Agricultural Crop and Animal Husbandry Production*. London, UK: IntechOpen.
- Stević, M. 2020. Fungicidi. Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet, 216 p.
- Sun, P., Zeng, M., He, Z., Qin, F., Chen, J. 2013. Controlled release of fluidized bed-coated menthol powder with a gelatin coating. *Drying Technology* 31(13-14):1619–1626.
- Tangpao, T., Krutmuang, P., Kumpoun, W., Jantrawut, P., Pusadee, T., Cheewangkoon, R., Sommano, S.R., Chuttong, B. 2021. Encapsulation of Basil Essential Oil by Paste Method and Combined Application with Mechanical Trap for Oriental Fruit Fly Control. *Insects*, 12(7):633.
- Taniwiryo, D., Berg, H., Riksen, J.A.G., Rietjens, I.M.C.M., Djiwantia, S.R., Kammenga, J.E., Murk, A.J. 2009. Nematicidal activity of plant extracts against the root-knot nematode, *Meloidogyne incognita*. *Open Natural Products Journal* 2(1):77–85.
- Tanović, B., Delibašić, G., Hrustić, J. 2009a. Biološke karakteristike izolata *Botrytis cinerea*, patogena kupine. VI Congress of Plant Protection with Symposium about Biological Control of Invasive Species, Zlatibor, Serbia, Book of Abstracts, pp. 73–74.
- Tanović, B., Delibašić, G., Milivojević, J., Nikolić, M. 2009b. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. *Archives of Biological Sciences* 61(3):419–429.
- Tian, B.L., Liu, Q.Z., Liu, Z.L., Li, P., Wang, J.W., 2015. Insecticidal potential of clove essential oil and its constituents on *Cacopsylla chinensis* (Hemiptera: Psyllidae) in laboratory and field. *Journal of Economic Entomology* 108(3):957–961.
- Tippayatum, P., Chonhenchob, V. 2007. Antibacterial Activities of Thymol, Eugenol and Nisin Against Some Food Spoilage Bacteria. *Agriculture and Natural Resources* 41(5):319–323.
- Tomić, Ž. 2016. Mogućnost primene sintetičkog zeolita CR-100 (Crystal-Right™) za adsorpciju

- amonijaka iz podzemnih voda Banatskog akvifera. Doktorska disertacija. Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet. Novi Sad, pp. 1–150.
- Toth, I.K., van der Wolf, J.M., Saddler, G., Lojkowska, E., Hélias, V., Pirhonen, M., Tsrör (Lahkim), L., Elphinstone, J.G. 2011. *Dickeya* species: an emerging problem for potato production in Europe. *Plant Pathology* 60:385–399.
- Tsao, R., Zhou, T. 2000. Antifungal activity of monoterpenoids against postharvest pathogens *Botrytis cinerea* and *Monilinia fructicola*. *Journal of Essential Oil Research* 12(1):113–121.
- Ulfah, M., Murdifin, M., Mamada, S.S., Arfiansyah, R., Roska T.P., Rakib, A., Emran T.B., Nainu F. 2022. Insecticidal Activity of Essential Oil of *Syzygium Aromaticum* Flower in *Drosophila*. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 12(2):2669–2677.
- Umarusman, M.A., Aysan, Y.E.Ş.İ.M., Özgüven, M. 2019. Investigation of the antibacterial effects of different plant extracts against pea bacterial leaf blight disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *peasi*. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty* 16(3):297–314.
- Van der Merwe, J., Coutinho, T., Korsten, L., Van Der Waals, J. 2010. *Pectobacterium carotovorum* subsp. *brasiliensis* causing blackleg on potatoes in South Africa. *European Journal of Plant Pathology* 126:175–185.
- Van der Vlugt-Bergmans, C.J.B. 1996. Genetic variation and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. Agricultural University, Wageningen.
- Van der Wolf, J.M., et al. 2021. Diseases caused by *Pectobacterium* and *Dickeya* species around the world. In *Plant Diseases Caused By Dickeya And Pectobacterium Species*, eds F. Van Gijsegem, I.K. Toth, J.M. van der Wolf (Cham: Springer), pp.215-261.
- Van der Wolf, J.M., De Boer, S.H. 2007. Bacterial pathogens of potato. In: *Potato Biology and Biotechnology: Advances and Perspectives* (Vreugdenhil D, ed.). Elsevier, Oxford, UK, pp. 595–617.
- Van der Wolf, J.M., Nijhuis, E.H., Kowalewska, M.J., Saddler, G.S., Parkinson, N., Elphinstone, J.G., Pritchard, L., Toth, I.K., Lojkowska, E., Potrykus, M., Waleron, M., de Vos, P., Cleenwerck, I., Pirhonen, M., Garlant, L., Hélias, V., Pothier, J.F., Pflüger, V., Duffy, B., Tsrör, L., Manulis, S. 2013. *Dickeya solani* sp. nov., a pectinolytic plant pathogenic bacterium isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 64:768–774.

- Verhoeff, K. 1970. Spotting of tomato fruits caused by *Botrytis cinerea*. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 76:219–226.
- Vinceković, M., Jurić, S., Vlahoviček-Kahlina, K., Vugrinec, B., Lemić, D. 2020. Primjena inkapsuliranih eteričnih ulja u suzbijanju štetnih organizama. *Glasilo biljne zaštite* 20(6):584–606.
- Vishwakarma, G.S., Gautam, N., Babu, J.N., Mittal, S., Jaitak, V. 2016. Polymeric encapsulates of essential oils and their constituents: A review of preparation techniques, characterization, and sustainable release mechanisms. *Polymer reviews* 56(4):668–701.
- WHO 2010. *Manual on Development and Use of FAO and WHO Specifications for Pesticides. November 2010—Second Revision of the First Edition*. FAO: Rome, Italy. Available online: <http://www.fao.org/3/a-y4353e.pdf>
- Wagner, W.L., Herbst, D.R., Sohmer, S.H. 1990. *Manual of the Flowering Plants of Hawaii*. University of Hawaii Press and Bishop Museum Press, Honolulu, Hawaii, p.1853.
- Waleron, M., Misztak, A., Waleron, M., Franczuk, M., Jonca, J., Wielgomas, B., Mikiciński, A., Popović, T., Waleron, K. 2019. *Pectobacterium zantedeschiae* sp. nov. a new species of a soft rot pathogen isolated from Calla lily (*Zantedeschiae* spp.). *Systematic and Applied Microbiology* 42(3):275–283.
- Waleron, M., Waleron, K., Lojkowska, E. 2013. Occurrence of *Pectobacterium wasabiae* in potato field samples. *European Journal of Plant Pathology*, 137:149–158.
- Wei, M.C., Xiao, J., Yang, Y.C. 2016. Extraction of  $\alpha$ -humulene-enriched oil from clove using ultrasound-assisted supercritical carbon dioxide extraction and studies of its fictitious solubility. *Food chemistry* 210:172–181.
- Wilson, C.L., Solar, J.M., El Ghaouth, A., Wisniewski, M.E. 1997. Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81(2):204–210.
- Wood, R.K.S. 1951. The control of diseases of lettuce by use of antagonistic microorganisms I. The control of *Botrytis cinerea* Pers. *Annals of Applied Biology* 38:203–216.
- Zamani-Zadeh, M., Soleimani-Zad, S., Sheikh-Zeinoddin, M., Goli, S.A.H. 2014. Integration of *Lactobacillus plantarum* A7 with thyme and cumin essential oils as a potential biocontrol tool for gray mold rot on strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 92:149–156.