

Antibakterijsko djelovanje derivata pirazola

Marojević, Ana

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:151:584447>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-17**



Sveučilište Josipa Jurja
Strossmayera u Osijeku

**Fakultet
agrobiotehničkih
znanosti Osijek**

Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK**

Ana Marojević

Diplomski sveučilišni studij Ekološka poljoprivreda

ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE DERIVATA PIRAZOLA

Diplomski rad

Osijek, 2020.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA
FAKULTET AGROBIOTEHNIČKIH ZNANOSTI OSIJEK

Ana Marojević

Diplomski sveučilišni studij Ekološka poljoprivreda

ANTIBAKTERIJSKO DJELOVANJE DERIVATA PIRAZOLA

Diplomski rad

Povjerenstvo za ocjenu i obranu diplomskog rada:

1. izv. prof. dr. sc. Vesna Rastija, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. doc. dr. sc. Dejan Agić, član

Osijek, 2020.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. PREGLED LITERATURE	3
2.1. Rizosfera i korisni mikroorganizmi	3
2.2 Sredstva za zaštitu bilja	4
2.2.1 Procjena rizika sredstava za zaštitu bilja	5
2.2.2 Pesticidi i rezidue pesticida	6
2.2.3 Biološki preparati	8
2.3 Kumarini.....	9
2.3.1 Pirazoli i derivati pirazola.....	10
2.3.2 Biološka aktivnost pirazola i pirazolona	12
3. MATERIJALI I METODE.....	14
4. REZULTATI	18
5. RASPRAVA.....	22
6. ZAKLJUČAK.....	28
7. POPIS LITERATURE.....	29
8. SAŽETAK	33
9. SUMMARY	34
10. POPIS TABLICA	35
11. POPIS SLIKA	36

Temeljna dokumentacijska kartica

Basic documentation card

1. UVOD

Tlo je najbitniji čimbenik za održavanje života na Zemlji. Uloga tla je da nam osigurava dostatnu hranu za život, skladišti i izmjenjuje hranjive tvari, osigurava nam biomasu i sirovine za daljnju proizvodnju i preradu. Bez tla i organizama koji se nalaze u tlu ne bi bilo ni života na zemlji. Velikim dijelom čovjek onečišćuje okoliš općenito ali i tlo. Prevelikim korištenjem prirodnih resursa dolazi do znatne degradacije u vrlo kratkom vremenu, a opće je poznato da ako je tlo degradirano gubi svoje funkcije te mu je potrebno dugi niz godina kako bih se oporavilo. Iako, jako mali oku nevidljivi mikroorganizmi imaju veliku ulogu u prirodnim procesima i pridonose preživljavanju životinja i biljaka. Svjedoci smo prevelikog iskorištavanja tla uslijed čega dolazi do klimatskih promjena, pogoršanja kvalitete i kakvoće zraka i vode koji su nam neophodni za život, dolazi do smanjenja biološke raznolikosti i smanjenja plodnosti tla. Plodnost tla je bitan čimbenik u poljoprivrednoj proizvodnji jer osigura hraniva, vodu, zrak i toplinu biljci.

Za transformaciju organske i mineralne tvari u tlu su zaslužni mikroorganizmi i ostali "stanovnici" tla. Istraživanju štetnih utjecaja pesticida na tlo su se počela provoditi tek kada su se pojavili problemi vezani za oštećenje i onečišćenje produktivnih tala kao posljedica aktivnosti ljudi. Kako će djelovati određeno sredstvo za zaštitu bilja u tlu ovisi o klimatskim uvjetima i mikrobiološkoj aktivnosti. Svako sredstvo za zaštitu bilja ima određena svojstva na pojedinom tipu tla i ta svojstva utječu na ponašanje sredstva za zaštitu bilja. U tlu dolazi do niza fizikalno-kemijskih i bioloških procesa tijekom primjene sredstva za zaštitu bilja kada se aktivna tvar određenog sredstva oslobodi i dođe u dodir s tlom. Sredstva za zaštitu bilja primjenom na tlo podložna su procesima koji mogu utjecati na gubitak ili razgradnju sredstva za zaštitu bilja. Sredstva se zadržavaju u tlu određeno vrijeme u aktivnom obliku i postoji moguća opasnost za okoliš (Bokulić i sur.,2015.).

Susrećemo se s još jednim rizikom, a to je rizik uništavanja neciljanih organizama i voda (Bokulić i sur., 2015.). Rizik je najveći primjenom sredstva za zaštitu bilja na ili u tlo jer se direktno mogu uništiti organizmi sredstvom za zaštitu bilja i njegovim metabolitima, ako se sredstva za zaštitu bilja primjenjuju u zatvorenim prostorima poput plastenika, staklenika itd. rizik za neciljane organizme i okoliš je znatno smanjen. Neke od aktivnih tvari sredstva za zaštitu bilja mogu biti iznimno štetne za neciljane organizme npr. pčele. U praksi je teško gotovo nemoguće izbjeći otrovanje pčela i drugih organizama, ne samo da se truju prilikom aplikacije sredstva nego i nakon hraneći se i skupljajući polen i nektar

koji je tretiran (Znaor, 1996.). Često puta ribe ili ptice mogu biti izložene tom riziku iz razloga što se one hrane ribom ili gujavicama te ostalim organizmima koji su mogli biti u dodiru sa sredstvima za zaštitu bilja. Postoje mjere za smanjenje rizika u slučaju da postoji opasnost za izloženost neciljanih organizama (Bokulić i sur.,2015.).

Cilj ovoga istraživanja bio je utvrditi hoće li derivati pirazola kao potencijalni novi pesticidi imati djelovanje na rast i razmnožavanje *Bacillus subtilis* kao predstavnika korisne bakterijske populacije tla.

2. PREGLED LITERATURE

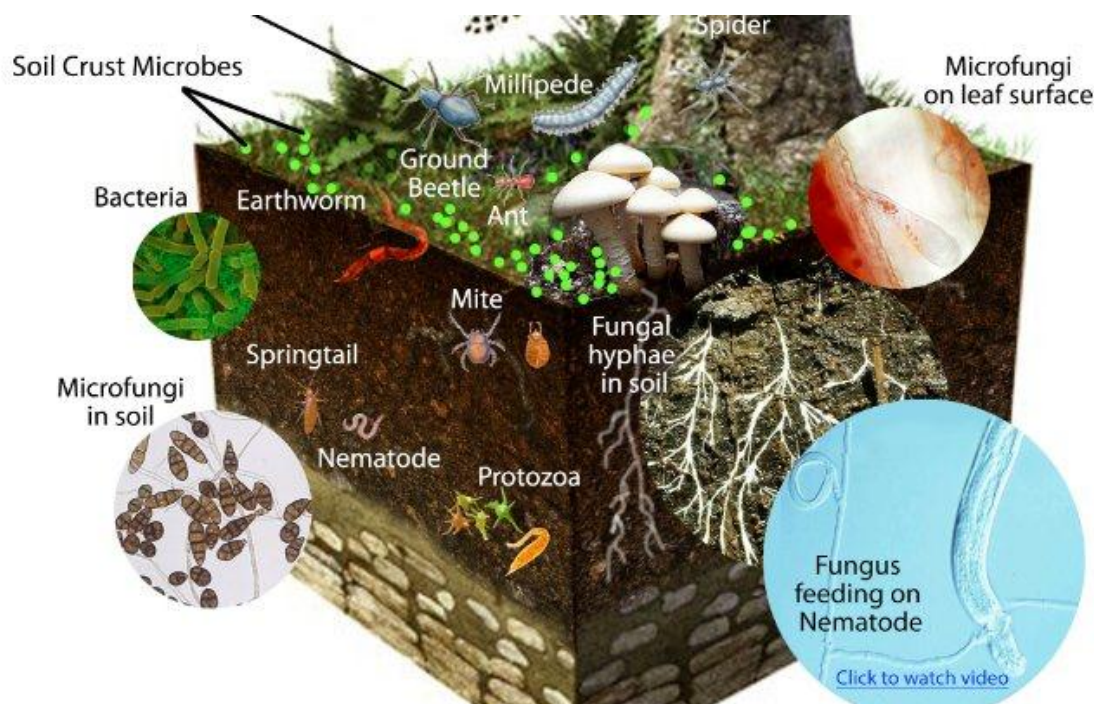
2.1. Rizosfera i korisni mikroorganizmi

Rizosfera obuhvaća dio zemljišta koji je pod utjecajem biljnog korijena (Hiltner, 1904.). Rizosfera je također mjesto kolonizacije mikroorganizama ali i mjesto za njihovu aktivnost koja je vrlo važna (Tilak i sur., 2005.). Najveća biogenost se nalazi oko korjenovih dlačica. Mikroflora rizosfere razgrađuje izlučevine korijena i ima glavnu zadaću u procesima tla koji određuju produktivnost biljke (Tilak i sur., 2005.). Asporogene i sporogene bakterije, aktinomicete, kvržične bakterije, gljive, fiksatori atmosferskog dušika i brojni drugi pripadnici korisnih mikroorganizama predstavljaju rizosfernu mikrofloru (Slika 1.) (Barea i sur., 2005.).

Mikroorganizmi tlo zauzimaju u potpunosti i sudjeluju u oblikovanju njegovih svojstava te u zemljištu mikroorganizmi održavaju njegovu strukturu, nivo organske mase i stabilnost svih drugih svojstava (Jarak i Čolo, 2007.). Sudjeluju u formiranju i održavanju zemljišta, pridonose plodnosti tla i jedan su od najvažnijih čimbenika u sustavu tlo-biljka. Brojnost i aktivnost zemljišnih mikroorganizama zajedno sa pedološkim i kemijskim parametrima koriste se kao pokazatelji plodnosti zemljišta (Vukadinović i Vukadinović, 2018.).

Tlo bi bilo mrtvo bez mikroorganizama i zato su nam oni od izrazite važnosti (Vukadinović i Vukadinović, 2011.). Čak je 80-90% procesa u tlu pod utjecajem mikroorganizama (Coloman i Crossly, 1996.). Mikroorganizmi u tlu razgrađuju organsku tvar tla i nezaobilazni su u procesima humifikacije i dehumifikacije. Prinos i zdravstveno stanje usjeva uvelike ovisi o mikroorganizmima (Welbaum i sur., 2004.). Ahemad i Kiber (2014.) navode da je primarni indirektni učinak korisnih mikroorganizama biokontrola bolesti, također rizobakterije proizvode antifungalne metabolite kao što su fenazin, pirolnitrin cijanovodična kiselina, 2,4-diacetilfloroglukinol, piolureorin, visksinamid i tenazin.

Treba naglasiti da su mikroorganizmi najstariji predstavnici živog svijeta i da se oni vrlo uspješno prilagođavaju na razne uvijete. Možemo ih pronaći u svakom kutu i dijelu naše planete, na najtoplijim no i najhladnijim područjima, a svaki mikroorganizam se razlikuje po svojim fiziološkim osobinama (Tešić i Todorović, 1988.).



Slika 1. Mikroorganizmi zastupljeni u rizosferi.

<http://bluegrasslawn.com/wp-content/uploads/soil-microorganisms.jpg>

2.2 Sredstva za zaštitu bilja

Pojam sredstva za zaštitu bilja i pesticidi se nerijetko poklapaju u definicijama, no važno je istaknuti da pojam "pesticidi" obuhvaćaju znatno veći broj tvari. Te tvari se ne primjenjuju samo u poljoprivredi. Njihova primjena obuhvaća puno veći spektar djelatnosti poput javnog zdravstva, komunalne higijene, veterinarstvu kako bi se suzbili nametnici na životinjama i drugo. U Republici Hrvatskoj svako sredstvo za zaštitu bilja koje se stavlja na tržište mora imati odgovarajuću dozvolu koju izdaje Ministarstvo poljoprivrede. Također mora biti i registrirano. Determinacija i određivanje vrste štetnog organizma se koristi za uspješno sprječavanje ili umanjeње šteta od štetnih organizama. Nadalje na osnovi proučavanja i spoznaje njenih bioloških, ekoloških i drugih svojstava izabiru se najpogodnije mjere zaštite bilja (Bokulić i sur., 2015.). Sredstva za zaštitu bilja bih se trebala upotrebljavati samo i ako je to jedino rješenje te u skladu s pragovima štetnosti kad postoje (Bokulić i sur., 2015.).

Kroz redovite preglede usjeva i nakon svih prikupljenih informacija u polju koje moraju biti temeljite sukladno načelima dobre poljoprivredne i okolišne prakse donosi se odluka o

primjeni sredstva za zaštitu bilja. Sredstva za zaštitu bilja možemo podijeliti na razne načine. Bokulić i sur. (2015.) prema podrijetlu sredstva za zaštitu bilja dijele na kemijska i biološka sredstva dok je najčešća dioba prema vrsti štetnog organizma kojeg se eliminira i dijele se na:

1. ZOOCIDI – sredstva za suzbijanje ili odbijanje životinja, podijeljeni su u nekoliko skupina, a to su insekticidi: sredstva koja se koriste za suzbijanje kukaca, akaricidi koji se koriste kao sredstva za suzbijanje grinja, nematocidi koji se koriste kao sredstva za suzbijanje nematoda, limacidi koji se koriste kao sredstva za suzbijanje puževa, rodenticidi koji se koriste kao sredstva za suzbijanje glodavaca, korvifugi koji se koriste kao sredstva za odbijanje ptica od sjemena (Bokulić i sur.,2015.).
2. FUNGICIDI su sredstva koja se koriste za suzbijanje gljiva i pseudogljiva.
3. HERBICIDI su sredstva koja se koriste za suzbijanje korova.
4. Ostala sredstva koja se koriste kao regulatori rasta biljaka i pomoćna sredstva (Bokulić i sur., 2015.).

2.2.1 Procjena rizika sredstava za zaštitu bilja

Pri stavljanju sredstva za zaštitu bilja na tržište važno je naglasiti da postoji određeni rizik i štetnost sredstva za zaštitu bilja te se mora provesti procjena rizika kojom se određuje opasnost korištenja određenih proizvoda. Važno je znati kako se sigurno rukuje sredstvima za zaštitu bilja. Što se tiče procjene rizika ona bih trebala obuhvaćati sve uvijete primjene sredstava za zaštitu bilja, ali i moguće učinke na zdravlje ljudi, okoliš te životinje. Ključni čimbenici su: spektar djelovanja sredstva za zaštitu bilja, doza, način i učestalost te vremenski raspored primjena svojstva sredstva za zaštitu bilja (Bokulić i sur., 2015.). Također su od iznimne važnosti i sastav sredstva za zaštitu bilja, rezidue, ponašanje u okolišu te utjecaj na neciljane organizme (Bokulić i sur., 2015.). Također se određuju opasnosti i rizici pri uporabi sredstava za zaštitu bilja: u slučaju izloženosti ljudi. Rukovanje sredstvima za zaštitu bilja ne znači nužno otrovanje već samo da postoji rizik kod izloženosti na ljudsko zdravlje (Bokulić i sur., 2015.). Postoje i opasnost i rizici pri uporabi sredstva za zaštitu bilja od mogućeg utjecaja na okoliš, od mogućeg utjecaja na neciljane organizme i o mogućnosti utjecaja na učinkovitost (Bokulić i sur., 2015.).

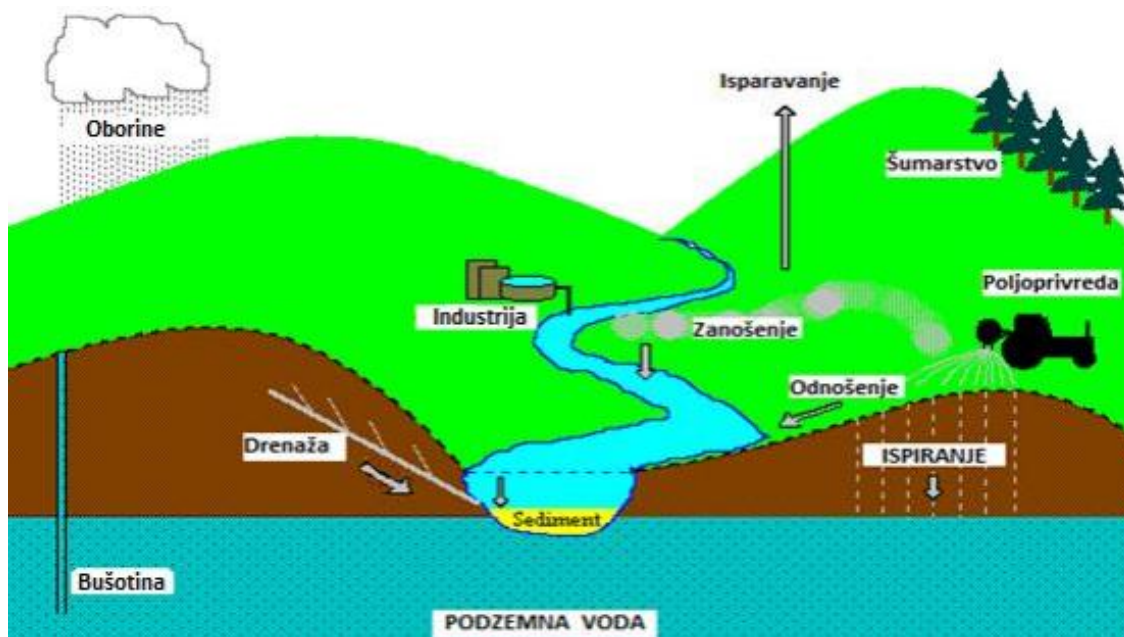
2.2.2 Pesticidi i rezidue pesticida

Organizacija za prehranu i poljoprivredu (FAO) (2002.) definira pesticide kao tvar ili smjesu tvari koje su napravljene s ciljem uništavanja i suzbijanja bilo koje vrste štetočina. Iz davnina je poznato korištenje jednostavnih kemijskih spojeva koji su dostupni u okolišu, a zadatak im je zaštita usjeva. Prije stotinjak godina bolesti i štetnici nisu upućivale na preveliki problem u poljoprivredi. Ako bih se javila potreba za prskanjem to se izvodilo raznim insekticidima biljnog i ponegdje mineralnog podrijetla (Znaor, 1996.). Podaci govore o tome kako su se još prije 3200 godina u drevnoj Kini koristili anorganski spojevi žive i arsena u suzbijanju ušiju (Želježić i Perković., 2010.). Također se spominje kako su Sumerani 2500 godine prije Krista upotrebljavali sumporne spojeve kako bi zaštitili namjernice od insekata dok su se u rimskom dobu gljivične bolesti suzbijale uporabom bakra, a bakar u kombinaciji sa sumporom se vinova loza štiti od najezde gusjenica (Smith i Kennedy, 2002.; Smith i Secoy., 1975.). Godine 1865. se počela upotrebljavati "bordoška juha" odnosno mješavina modre galice i gašenog vapna u suzbijanju peronospore, nakon toga otkriven je diklor-difenil-trikloretan (DDT) koji ima insekticidno djelovanje, a otkrio ga je Paul Muller (Želježić i Perković., 2010.). DDT se počinje sve više upotrebljavati u vrijeme Drugog svjetskog rata. Nakon desetak godina otkriveni su i mnogi drugi sintetski spojevi s pesticidnim djelovanjem, nadalje umjesto traženja novih kemijskih skupina spojeva 1990 godina modificiraju se postojeće aktivne tvari kako bi se smanjilo opterećenje okoliša i rizika za zdravlje ljudi (Ware i Whitacre., 2004.). U razdoblju od 2006.-2009. godine dostupno je novih 30-tak kemijskih spojeva odnosno aktivnih tvari koji imaju pesticidno djelovanje i tako danas na svjetskom tržištu postoje više od 2500 aktivnih tvari (Želježić, Perković., 2010). Kako bi pripravak bio što učinkovitiji dodaju mu se inertne tvari poput emulgatora, otapala i pojačivači pesticidnog djelovanja (Ware i Whitacre., 2004.). Znaor (1996) navodi tri generacije pesticida. Prva generacija takozvanih pravih pesticida sadržavala je teške metale poput žive, bakra, arsena odnosno mineralna ulja i sumpor. Sve ove kemikalije bile su proizvod anorganske kemije i nisu bile nepoznanice. Druga generacija pesticida započinje kemijskom sintezom novih organskih supstanci ili poznatije organo-sintetički pesticidi. To su bile posve nove supstance u prirodi i svima su bile nepoznate. Reakcije organo-sintetičkih pesticida bilo je kao što je i danas sasvim nemoguće predvidjeti. Treća generacija pesticida predstavlja biopesticide o kojima će se pisati detaljnije u nastavku rada. Konvencionalnu proizvodnju gotovo je nemoguće zamisliti bez uporabe pesticida. Pesticidi se koriste pri svim fazama proizvodnje od zaštite

sjemeni i sjetve pa sve do skladištenja poljoprivrednih proizvoda. No pesticidi nose niz negativnih učinaka (Znaor,1996.).

Otkad se susrećemo s pesticidima poznato je da njihovom uporabom u tlu nalazimo ostatke odnosno rezidue pesticida. Rezidue pesticida mogu imati vrlo štetno djelovanje kao i na zdravlje ljudi tako i štetno mogu utjecati na životinje ali i na prirodu i okoliš. Ostatci pesticida mogu sadržavati razne aktivne tvari koje imaju negativno djelovanje i koje su se koristile ili se trenutno koriste u zaštiti bilja, razne produkte razgradnje kao produkte reakcije i nečistoća. Razina ostataka pesticida ovisi o količini primijenjenog sredstva za zaštitu bilja kao i o poljoprivrednoj kulturi i najkraćem razdoblju koje je prošlo od zadnjeg tretiranja kulture, tj. karenci, o broju primjena i fizikalno-kemijskim svojstvima sredstva za zaštitu bilja (Bokulić, i sur., 2015.). Od velike važnosti je primijeniti znanje za pravilnu primjenu sredstva za zaštitu bilja, no zbog neznanja dolazi do neizravnog onečišćenja okoliša sredstvima za zaštitu bilja. (Slika 2.) (Bokulić i sur., 2015.). Do onečišćenja tla može doći i izravnim putem ako se herbicidi primjenjuju izravno na tlo ili ispiranjem na tlima pjeskovite teksture ili lakim tlima te tu dolazi do onečišćenja podzemnih voda, također aktivne tvari koje su lako topljive u vodi nose sa sobom rizik od onečišćenja voda (Bokulić i sur., 2015.). Postoji rizik za organizme u tlu tokom primjene herbicida jer sadrže aktivne tvari koje se jako vežu za tlo su velika opasnost za organizme koji se nalaze u tlu te određene kulture (Bokulić i sur., 2015.).

Zagađenja zraka prilikom primjene pesticida se još uvijek istražuju, no postoje istraživanja koja navode da količina pesticida koja odlazi u atmosferu zastrašujuće velika čak preko 90% (Znaor 1996.). Nizozemski znanstvenik Warmenhoven tvrdi da čak 75-90% primjenjene količine pesticida s parcele ispari u roku od 24 sata nakon aplikacije (Znaor, 1996.).



Slika 2. Putevi onečišćenja okoliša primjenom sredstva za zaštitu bilja

https://www.vup.hr/_Data/Files/prirucnikszb.pdf

2.2.3 Biološki preparati

O štetnosti i sredstvima za zaštitu bilja već je dovoljno rečeno. Degradacija tla i prekomjerno iskorištavanje poljoprivrednih površina nije prihvatljivo. Trendovi u fitomedicini koji se spominju sve više nalažu uporabu ekološki prihvatljivih metoda zaštite bilja. U takvim metodama se spominje manje korištenje kemijskih sredstava za zaštitu bilja te se predlaže provedba najnovijih bioloških mjera zaštite (Baličević i sur., 2007.). Biopesticidi se dijele prema vrsti koju suzbijaju i mogu biti biofungicidi, bioinsekticidi, bioherbicidi i ostali (Igrc-Barčić i Maceljki., 2001.). U različitim literaturama se spominju makrobiološki i mikrobiološki agensi, prirodni pesticidi kao i derivati nekih organizama (Igrc-Barčić i Maceljki., 2001.). Kako bih određeni preparat bio učinkovit u dovoljnoj mjeri važno je da se preparat može proizvesti na tekućem ili polučvrstom supstratu u zadovoljavajućim količinama i da u laboratorijskim uvjetima ne izgube vitalnost, varijabilnost i selektivnost (Klokčar-Šmit i sur., 2006.).

Važno je naglasiti kako biopesticidi traže puno znanja kako bih se mogli ispravno koristiti te su i manje djelotvorniji od kemijskih pesticida. Grahovac i sur. (2009.) navode različite prednosti uporabe biopesticida poput: odsustvo rizika za neciljane organizme i osiguravanja razvoja održive poljoprivredne proizvodnje. Ostali autori poput Filajdića i

sur. (2003.) navode da su biopesticidi ekološki prihvatljiva i dugoročno donose dobre rezultate, manje su fitotoksični i smanjuje se uporaba kemijskih sredstava, sigurnije su za rukovanje i primjenu od kemijskih sredstava, smanjuju rizik od pojave rezistentosti. Naravno biopesticidi imaju i nekoliko nedostataka.

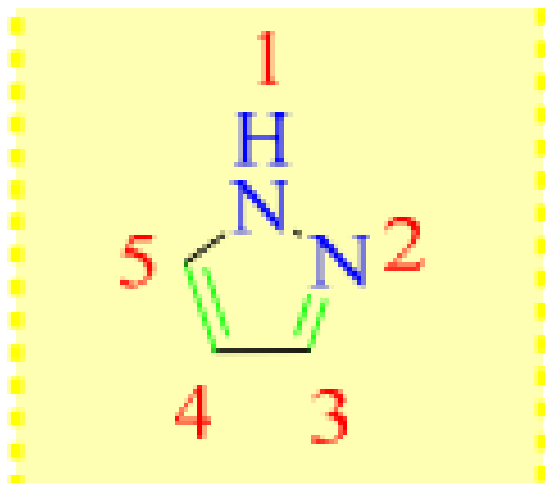
Klokočar-Šmit i sur. (2006.) navode da biopesticidi nemaju eradikativno djelovanje, što znači da oni ne djeluju na infekcije koje su već napredovale, kraći rok trajanja i njihovo skladištenje je teže, cjenovno su izrazito skuplji, u procesu proizvodnje brojne su tehničke i tehnološke poteškoće, potrebno veće znanje poljoprivrednika, slabiji je učinak i djelovanje od kemijskih sredstava prvenstvo jer se koriste preventivno i ne djeluju kada je šteta već nastupila.

2.3 Kumarini

Vrlo važnu skupina heterocikličkih spojeva u farmaceutskoj i sintetskoj kemiji čine kumarini, a nalaze se u raznim biljkama te pridonose biološkoj aktivnosti. Zbog svoje biološke aktivnosti (antibakterijske, antiupalne, antioksidantske, antialergentske, antivirusne i antikancerogene) se istražuju dugi niz godina (Kumar i sur., 2015.). Bijeli prah, ugodnog mirisa (vanilija) ili kako Lui i sur. (2010) navode miris svježe pokošenog sijena predstavlja kumarine. Kao što je već navedeno, kumarini i njegovi derivati imaju brojne pozitivne strane, a koriste se također kao aditivi u hrani, parfemima i kozmetici (sapuni, paste za zube). Imaju određenu ulogu u proizvodnji alkoholnih pića, mogu se primjenjivati i za neutralizaciju neugodnih mirisa u gumenim i plastičnim materijalima (Kontogiorgis i sur., 2012.). Primjenjuju se u industriji radi smanjenja neugodnih mirisa u bojama i sprejevima te u poljoprivredi jer određeni spojevi na bazi kumarina se koriste kao pesticidi i rodenticidi (Molnar i Čačić, 2011.). Laboratorijska sinteza kumarina počela je 1820. godine, kada su izolirani iz plodova tropskog drveta tonkovca (*Dipteryx odorata*) (Molnar i Čačić, 2011.). Izolirao ga je A. Vogel koji mu je dao ime prema lokalnom nazivu te biljke *coumaronna* (Kontogiorgis i sur., 2012.; Molnar i Čačić, 2011.). Možemo ih pronaći u mnogim biljkama, voću i povrću. Također jagode, marelice, višnje, cimet, eterična ulja (cimetna, lavandina) ga imaju u velikim količinama (Molnar i Čačić, 2011.).

2.3.1 Pirazoli i derivati pirazola

S obzirom na korisna biološka svojstva heterocikličkih kumarina, istraživani su utjecaji i drugih heterocikličkih spojeva poput pirazola. Pojam pirazol dolazi od Ludwiga Knorra 1883. godine (Alam i sur., 2015). Prvi prirodni pirazol (1-pirazol-alanin) izoliran je iz sjemenki lubenice 1959. godine. (Čačić, 2011.). Pirazole karakterizira peteročlani prsten od tri ugljikova i dva dušikova atoma u susjednom položaju (Slika 3.). Sintetski kroz reakcije α,β -nezasićenih aldehida s hidrazinom i daljnom dehidrogenacijom nastaju pirazoli (Čačić, 2011). Derivati pirazola poput pirazolona ($C_3H_4N_2O$) imaju keto skupinu ($C=O$) te formiraju peteročlani laktamski prsten. Fizikalno-kemijska svojstva koja karakteriziraju pirazol prikazani su u Tablici 1.



Slika 3. Pirazol

Izvor: https://www.researchgate.net/publication/334604294_A_Review_on_Pyrazole_chemical_entity_and_Biological_Activity

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva pirazola

Pirazol	
Kemijsko ime (IUPAC)	pirazol
Druga imena	1,2-diazol
Kemijska formula	$C_3H_4N_2$
Molarna masa	68,07 g/mol
Točka tališta	66-70 °C
Točka vrelišta	168-188 °C

Izvor: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/352760183X.ch5b>

Poljoprivredne bolesti uzrokovane patogenim gljivama ugrožavaju sigurnost poljoprivrednih usjeva i njihovu kvalitetu značajno smanjuju. Velika potreba ljudi za kvalitetnom hranom i zbog sve većeg iskorištavanja poljoprivrednog zemljišta potražnja za fungicidima raste kako bi se usjevi zaštitili. Postoji potreba za pronalazak novih visoko aktivnih fungicida novog načina djelovanja jer za postojeane komercijalne kemijske fungicide se razvila određena razina otpornosti. Pirazoli i derivati pirazola posljednjih godina privlače pažnju radi svojih raznih bioloških svojstava širokog spektra. Spojevi s funkcionalnim jedinicama pirazola imaju antimikrobno, herbicidno, antitumorsko, insekticidno i fungicidno djelovanje (Slika 4.) (Xue-Ru Liu i sur.,2014.).



Slika 4. Različita biološka svojstva pirazola

Izvor: https://www.researchgate.net/figure/Different-Biological-activities-of-pyrazole-moiety_fig5_334604294

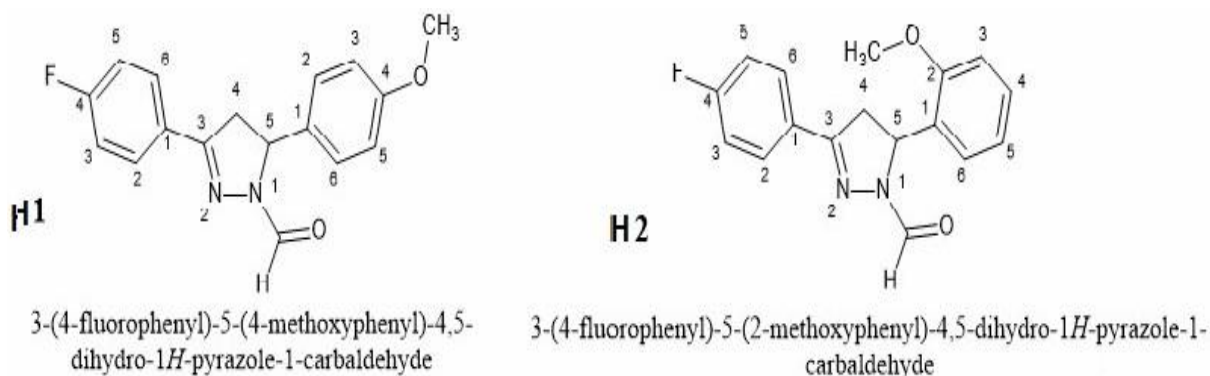
2.3.2 Biološka aktivnost pirazola i pirazolona

U medicini se pirazoloni koriste za opuštanje mišića, suzbijanje grčeva, te korisno djeluju u borbi protiv groznica. Korisni su jer imaju protuupalna antibakterijska svojstva te se koriste kao analgetici. Neki derivati pirazolina su pokazali izvrsna farmakološka svojstva i iz tog razloga se koriste u istraživanju lijekova. U razvoju teorije o heterocikličkoj kemiji, pirazoloni su imali važnu ulogu. Pirazoloni su pokazali da imaju i dobra antitumorska svojstva. Neki derivati imaju i antidepresivna svojstva te se koriste još kao analitički reagensi i sredstva za obojenje (Karthikeyan i sur., 2007). Kao što je već navedeno pirazoloni posjeduju vrlo korisna biološka svojstva. Pirazonima pripadaju brojne farmakološki aktivne molekule kao što su: fenanzon, metapiron, amidopirin (analgetici i

antipiretici), azolid, tanderil (protuupalna svojstva) (Čačić i sur., 2011.). Među izomerima pirazolona najčešće se proučavaju 2-pirazoloni (Lévai i Jekó, 2009.). Neka istraživanja pokazuju da brojni fluorirani i klorirani derivati imaju različitu biološku aktivnost, što ih čini sastojcima u lijekovima i zaštiti bilja koji su od velike važnosti te se mogu koristiti kao antibakterijska i antifungalna sredstva. Dodavanjem fluorova atoma povećava se biološka aktivnost molekula (Karthikeyan i sur., 2007).

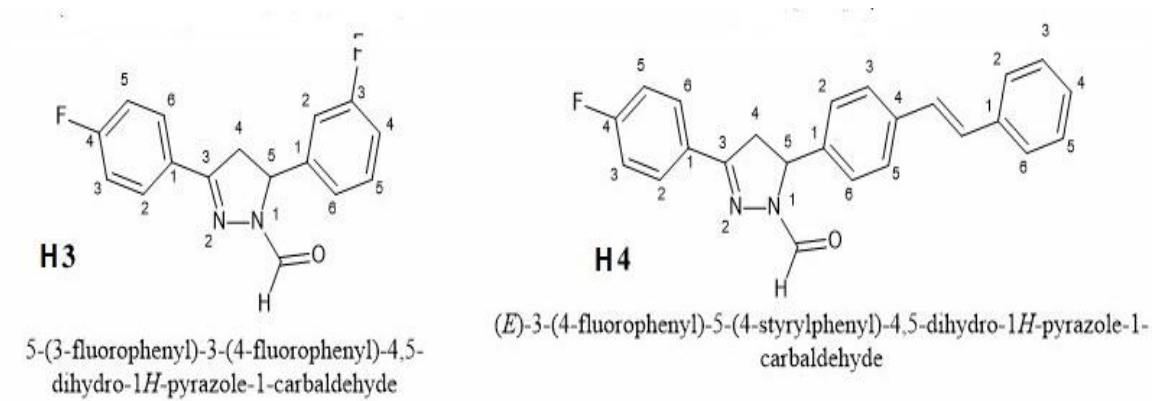
3. MATERIJALI I METODE

U istraživanju je korištena testna kultura *Bacillus subtilis* iz kolekcije Katedre za mikrobiologiju Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek. Čista kultura ispitivane bakterije je umnožena na hranjivom agaru (Slika 6.) (Liofilchem, Italija.) tijekom 48 sati na 30 °C. Ispitani derivati pirazola su sintetizirani na Prehrambeno tehnološkom fakultetu u Osijeku gdje se koristio protokol prema Rostom i sur. (2011.). Ispitana je djelotvornost sljedećih pirazola: 3-(4-fluorofenil)-5-(4-metoksifenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karbaldehid(H1),3-(4-fluorofenil)-5-(2-metoksifenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karbaldehid (H2), 5-(3-fluorofenil)-3-(4-fluorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karbaldehid (H3), (E)-3-(4-fluorofenil)5-(4-stifenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karbaldehid (H4), 3-(4-flourofenil)-5-(3-metoksifenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karbaldehid (H5), 3-(4-flourofenil)-5-(2-hidroksifenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karbaldehid(H6),5-(2,6-dimetoksifenil)-3-(4-fluorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karbaldehid (H7), 5-(4-bromofeni)-3-(4-flourofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karbaldehid (H8), 5-(2-klorofenil)-3-(4-fluorofenil)-4,5dihidro-1H-pirazol-1-karbaldehid (H9), 5-(4-dimetilamino)fenil)-3-(4-fluorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-karbaldehid (H10). Strukture navedenih spojeva prikazane su na sljedećim slikama (Slika 5-9.).



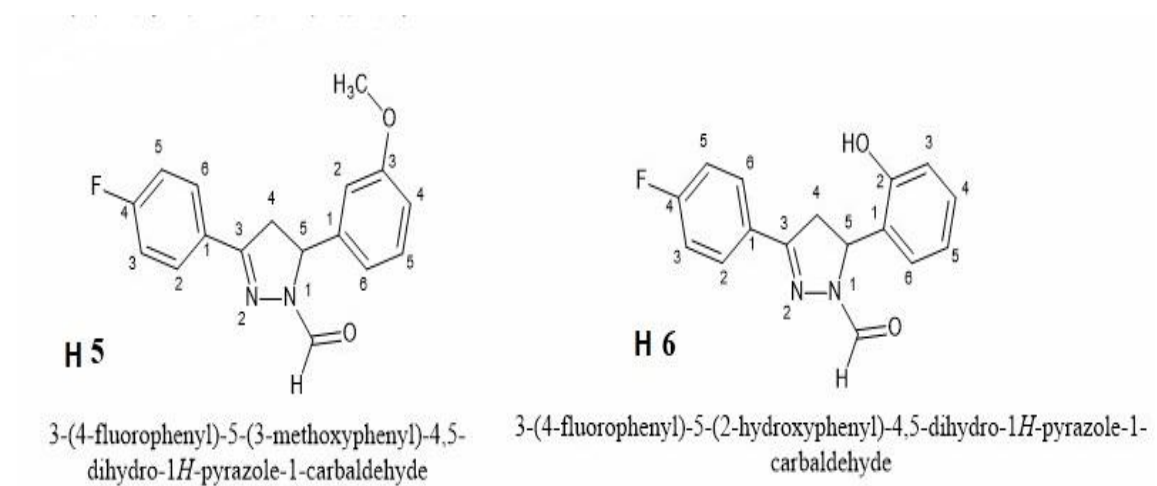
Slika 5. Struktura derivata pirazola H1i H2

Izvor: Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku



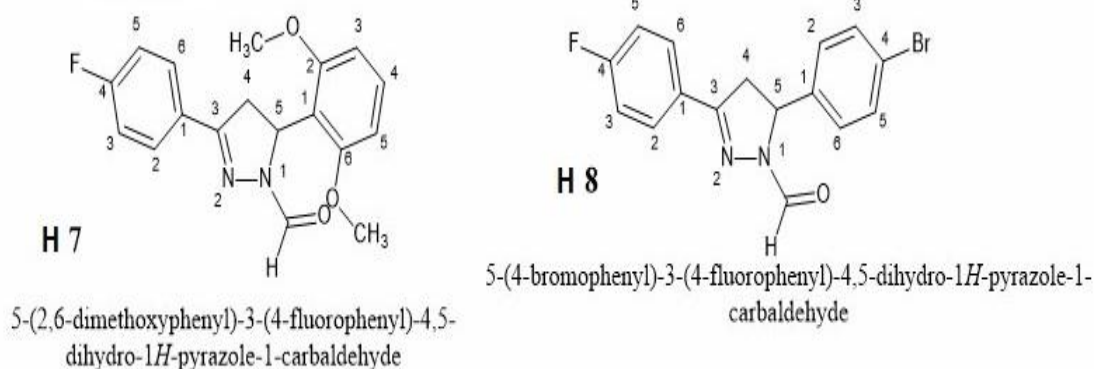
Slika 6. Struktura derivata pirazola H3 i H4

Izvor: Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku



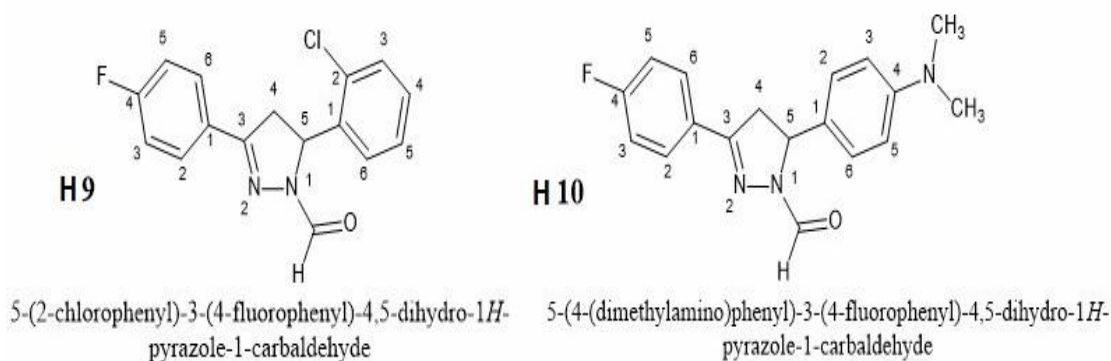
Slika 7. Struktura derivata pirazola H5 i H6

Izvor: Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku



Slika 8. Struktura derivata pirazola H7 i H8

Izvor: Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku



Slika 9. Struktura derivata pirazola H9 i H10

Izvor: Prehrambeno tehnološki fakultet u Osijeku

Djelotvornost derivata pirazola je utvrđena dilucijskom metodom određivanjem minimalne inhibitorne koncentracije na ispitanu testnu bakteriju. Pokus je proveden kroz sterilne mikrotitarske ploče. Najveća ispitana koncentracija je iznosila 512 µg/ml koja je razrijeđena kroz jažice do 1 µg/ml. Svaka jažica se inokulirala s testnom bakterijom u koncentraciji koja odgovara 10^5 stanica po ml. Pozitivna kontrolna jažica je sadržavala tekuću podlogu i bakterijsku kulturu, dok je negativna kontrolna jažica sadržavala samo tekuću podlogu. Nakon 48 h inkubacije očitani su rezultati. Pokus je postavljen u četiri ponavljanja. Svi postupci i materijali su provedeni poštivajući pravila sterilnosti.



Slika 10. Čista kultura *Bacillus subtilis*

Izvor: Ana Marojević

4. REZULTATI

U istraživanju nije utvrđena inhibicija rasta testne bakterije s nijednim ispitanim spojem. (Tablica 2 – 11).

Tablica 2. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H1) na testnu bakteriju *Bacillus subtilis*

SPOJ		TESTNA BAKTERIJA <i>Bacillus subtilis</i>										
	512 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	+	-
											KONTROLA	KONTROLA
H1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+ zabilježen porast , - nije zabilježen porast

Tablica 3. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H2) na testnu bakteriju *Bacillus subtilis*

SPOJ		TESTNA BAKTERIJA <i>Bacillus subtilis</i>										
	512 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	+	-
											KONTROLA	KONTROLA
H2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 4. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H3) na testnu bakteriju *Bacillus subtilis*

SPOJ		TESTNA BAKTERIJA <i>Bacillus subtilis</i>										
	512 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	+	-
											KONTROLA	KONTROLA
H3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 5. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H4) na testnu bakteriju *Bacillus subtilis*

SPOJ		TESTNA BAKTERIJA <i>Bacillus subtilis</i>											
		512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	+	-
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	KONTROLA	KONTROLA
H4		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+ zabilježen porast , - nije zabilježen porast

Tablica 6. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H5) na testnu bakteriju *Bacillus subtilis*

SPOJ		TESTNA BAKTERIJA <i>Bacillus subtilis</i>											
		512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	+	-
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	KONTROLA	KONTROLA
H5		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 7. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H6) na testnu bakteriju *Bacillus subtilis*

SPOJ		TESTNA BAKTERIJA <i>Bacillus subtilis</i>											
		512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	+	-
		µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	µg/ml	KONTROLA	KONTROLA
H6		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

+zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 8. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H7) na testnu bakteriju *Bacillus subtilis*

SPOJ	TESTNA BAKTERIJA <i>Bacillus subtilis</i>											
	512 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	+	-
H7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	KONTROLA	KONTROLA

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 9. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H8) na testnu bakteriju *Bacillus subtilis*

SPOJ	TESTNA BAKTERIJA <i>Bacillus subtilis</i>											
	512 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	+	-
H8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	KONTROLA	KONTROLA

+zabilježen porast,- nije zabilježen porast

Tablica 10. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H9) na testnu bakteriju *Bacillus subtilis*

SPOJ	TESTNA BAKTERIJA <i>Bacillus subtilis</i>											
	512 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	+	-
H9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	KONTROLA	KONTROLA

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

Tablica 11. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H10) na testnu bakteriju *Bacillus subtilis*

SPOJ	TESTNA BAKTERIJA <i>Bacillus subtilis</i>											
	512 µg/ml	256 µg/ml	128 µg/ml	64 µg/ml	32 µg/ml	16 µg/ml	8 µg/ml	4 µg/ml	2 µg/ml	1 µg/ml	+	-
H10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	KONTROLA	KONTROLA

+ zabilježen porast, - nije zabilježen porast

5. RASPRAVA

Rezultati ovoga istraživanja su pokazali da ispitani pirazoli pri koncentracijama od 1 do 512 µg/ml ne utječu na rast testne kulture *B. subtilis*. Ovakvi rezultati istraživanja su poželjni s obzirom da je utvrđeno kako pirazoli ne utječu na rast gram pozitivnog predstavnika korisne bakterijske populacije tla.

Antimikrobnu aktivnost pirazola ispitivali su i drugi istraživači. Brojna istraživanja koja su obrađena su uglavnom usmjerena na utvrđivanju antibakterijskih i antifungalnih osobina patogenih bakterija i gljiva.

U istraživanju Yuvajar i sur (2009.) radilo se na sintezi i procjeni biološke aktivnosti derivata pirazola. Svi sintetizirani spojevi testirani su na antibakterijsku aktivnost protiv gram-pozitivnih i gram-negativnih mikroorganizama. Rezultati istraživanja ovog autora pokazuju obećavajuće rezultate i dobru antibakterijsku aktivnost protiv gram-pozitivne bakterije *Staphylococcus aureus*.

Gautam i sur. (2010.) u svom istraživanju su sintetizirali derivate pirazola i proučavali njihovo antimikrobno djelovanje. Izvijestili su o sintezi 1,3,5 trisupstituiranih derivata pirazola. Spojevi nisu pokazali nikakvu aktivnost protiv *Pseudomonas aeruginosa* i *Aspergillus niger*. Spojevi su pokazali umjerenu aktivnost pri koncentraciji od 50 µg/ml, protiv *B. subtilis*, *S. aureus* i *Escherichia coli*.

Isloor i sur. (2012.) sintetizirali su pirazol koji sadrži derivate cijanopiridona te su ti spojevi testirani na antibakterijsku i antifungalnu aktivnost i pokazali su značajnu aktivnost u usporedbi sa standardnim lijekom streptomycinom. Pokazali su dobru antibakterijsku aktivnost protiv bakterijskog soja *E. coli*, *S. aureus* i *P. aeruginosa* u koncentracijama od 500 do 1000 µg/ml i dobru antifungalnu aktivnost protiv *Aspergillus flavus* u koncentraciji od 500 do 1000 µg/ml. Kod ispitivanja ovih spojeva autori su zaključili da kombinacija dvaju različitih heterocikličkih spojeva, odnosno pirazola i 3-cijano-2-piridona, poboljšava farmakološki učinak te su stoga idealni za daljnja istraživanja kako bi se dobili učinkovitiji antibakterijski spojevi.

Dvije nove serije pirazolina počevši s p-acetamidofenolom (paracetamolom) sintetizirali su Ahamed i sur. (2014.). Istraživali su njihovo antibakterijsko, antifungalno i anituberkularno djelovanje. Novopripremljeni pirazolinski spojevi su pokazali značajnu

antibakterijsku aktivnost protiv *S. aureus*, *E. coli* i *P. aeruginosa* u usporedbi sa standardnim lijekom ciprofloksacinom.

Spoj N-(4-hidroksi-3-(1-izonikotiril-5-(4-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il) fenil) acetamid pokazao je snažnu antibakterijsku aktivnost protiv *P. aeruginosa* i *S. aureus* (MIC: 3.12 µg/ml), također protiv *E. coli* spojevi N-{3-[5-(2,4-diklorofenil)-1-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il]-4-hidroksifenil} acetamid, N-(3-(5-(2,4-diklorofenil)-1-izonicotinoil-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il)-4-fenil) acetamid, N-(4-hidroksi-3-(5-(2-hidroksifenil)-1-izonikotinoil-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il) fenil)acetamid, N-(4-hidroksi-3-(1-izonikotinoil-5-(2-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il)fenil) acetamid i spoj N-(4-hidroksi-3-(1-izonikotiril-5-(4-nitrofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il)fenil) acetamid su imali MIC od 6,25 µg/ml. Autori su utvrdili da je antifungalna aktivnost spoja N-(3-(5-(2,4-diklorofenil)-1-izonikotinoil-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il)-4-fenil) acetamid protiv *Candida albicans* i *A. niger* (MIC: 3.12 µg/ml.) bolja od standardnog lijeka ketokenazola.

Liu sur. (2014.). u svom istraživanju ispitivali su fungicidno djelovanje i strukturalne odnose 32 derivata pirazola koji će biti navedeni u nastavku kako bi otkrili nove spojeve s dobrim fungicidnim svojstvima. Nadalje ću navesti nazive spojeva koji su pokazali značajne rezultate u navedenom istraživanju: 1. (Etil5-amino-3-(metiltio)-1-(2,3,5,6-tetrafluorofenil)-1H-pirazol-4-karboksilat), 2. (5-amino-3-(benziltio)-1-(2,3,5,6-tetrafluorofenil)-1H-pirazol-4-karbonitril), 3. (5-amino-3-(metiltio)-1-(2,3,5,6-tetrafluorofenil)-1H-pirazol-4-karbonitril), 4. (Etil 5-amino-3-(benziltio)-1-(2,3,5,6-tetrafluorofenil)-1H-pirazol-4-karboksilat), 6. (5-amino-3-(metiltio)-1-(2,4,6-triklorofenil)-1H-pirazol-4-karbonitril), 7. (Etil5-amino-3-(benziltio)-1-(2,4,6-triklorofenil)-1H-pirazol-4-karboksilat), 8. (5-amino-3-(benziltio)-1-(2,4,6-triklorofenil)-1H-pirazol-4-karbonitril), 9. (4-(5-amino-3-(benziltio)-4-cijano-1H-pirazol-1-il)benzojeva kiselina), 10. (4-(5-amino-3-(benziltio)-4-(etoksikarbonil)-1H-pirazol-1-il)benzojeva kiselina), 11. (4-(5-amino-4-(eoksikarbonil)-3-(metiltio)-1H-pirazol-1-il)benzojeva kiselina), 26. (5-amino-3-(metiltio)-1-(4-(trifluorometil) fenil)-1H-pirazol-4-karbonitril), 27. (N-(4-cijano-3-(metiltio)-1-(2,3,5,6-tetrafluorofenil)-1H-pirazol-5-il)-4-fluorobenzamid), 28. (Etil3-(benziltio)-5-(3-klorobenzamido)-1-(2,3,5,6-tetrafluorofenil)-1H-pirazol-4-karboksilat), 29. (Etil3-(benziltio)-5-(3-izotiocijanatopropilamino)-1-(2,3,5,6-tetrafluorofenil)-1H-pirazol-4-karboksilat), 30. (5-(3-izotiocijanatopropilamino)-3-(metiltio)-1-(2,3,5,6-tetrafluorofenil)-1H-pirazol-4-karbonitril), 31. (5-(3-izotiocijanatopropilamino)-3-(metiltio)-1-(2,4,6-triklorofenil)-1H-pirazol-4-karbonitril), 32. (3-(Benziltiol)-5-(3-izotiocijanatopropilamino)-1-(2,4,6-triklorofenil)-1H-pirazol-4-karbonitril) (Xue-Ru Liu i

sur., 2014). Prvotni podaci probnog testiranja fungicidne aktivnosti ispitanih spojeva protiv *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* Kuhn, *Valsa mali* Miyabe et Yamada, *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* Owen, i *Fusarium graminearum* Schw u koncentraciji od 100 mg/l posjeduje umjerene do visoku fungicidnu aktivnosti. Rezultati ukazuju na to da 13 spojeva (2-4, 6, 8, 10, 26-32) imaju stopu inhibicije veće od 80% protiv *B. cinerea*, trinaest spojeva (2-4, 6, 8, 10, 26-32) pokazalo je više od 90%-tnu učinkovitost inhibicije protiv *R. solani*., petnaest spojeva (2-4, 6-10, 26-32) je pokazalo više od 80%-tnu učinkovitost inhibicije protiv *V. mali*, trinaest spojeva (2-4, 6, 8, 10, 26-32) ima više od 80%-tnu učinkovitost inhibicije protiv *T. cucumeris*, deset spojeva (3, 6, 10, 26-32) pokazalo je više od 80% efekta na *F. oxysporum* i jedanaest spojeva (2, 3, 6, 10, 26-32) pokazali su više od 90%-tnu učinkovitost inhibicije protiv *F. graminearum*. Među tim spojevima neki određeni spojevi (3, 6, 26-32) su pokazali su širok spektar fungicidne aktivnosti protiv svih testiranih fitopatogena s više od 90% učinkovitosti inhibicije. Dok su neki spojevi (26, 27, 28, 30, 31) pokazali 100%-tnu aktivnost u dozi od 100 mg/l. Spoj 9 je pokazao posebnu aktivnost protiv *V. mali* pokazujući inhibicijsku aktivnost od 84,30% te pokazuje nisku razinu aktivnosti za *B. cinerea*, *F. oxysporum* i *F. graminearum*. Utvrđeno je da spojevi 1-4, 6-11, 26-32 pokazuju dobre fungicidne aktivnosti te su izabrani za ponovnu provjeru. Ovi spojevi pokazuju inhibitorne aktivnosti rasta s vrijednostima EC50 u rasponu od 2.432-10.627, 2.182-11.024, 1.787-12.877, 1.638-10.253, 8.073-15.320 i 6.043-19.701 µg/ml protiv *B. cinerea*, *R. solani*, *V. Mali*, *T. cucumberis*, *F. oxysporum* i *F. graminearum*. Među njima je najviša aktivnost spoja 26, s vrijednostima EC50 od 2.432, 2.182, 1.787, 1.638, 6.986 i 6.043 µg/ml protiv *B. cinerea*, *R. solani*, *V. Mali*, *T. cucumberis*, *F. oxysporum* i *F. graminearum* (Xue-Ru Liu i sur.,2014.). Također u istraživanju su sintetizirana dva nova spoja 27 i 28 odnosno dva nova derivata pirazola koji su sadržavali amidni dio na petom mjestu pirazolskog prstena. *In vitro* testovi su pokazali da uvođenjem amidne skupine od velike važnosti za poboljšanje bioaktivnost. Npr. kada je 4-klorofenil karboksamid dio uveden u spoj 3 kako bi si stvorio spoj 27, antifungalne aktivnosti su povećane, jer su EC50 vrijednosti trećeg spoja protiv *B. cinerea*, *R. solani*, *V. Mali*, *T. cucumberis*, *F. oxysporum*, i *F. graminearum* je iznosio 5.848, 6.043, 3.738, 5.707, 9.515 i 14.793 µg/ml, dok je EC50 vrijednosti spoja 27 bile 3.742, 3.501, 1.919, 2.383, 8.073, 10.266 µg/ml. Autori su nadalje u spojeve 3,4,6,8 uveli izotiocijanatopropan čime nastaju spojevi 29,30,31,32. U istraživanju je

dokazano da među spojevi 29, 30, 31, 32 koji sadrže izotocijanatnu grupu su aktivniji od spojeva bez takve skupine. Ponajprije spoj 29 čija je EC_{50} vrijednost *T. cucumeris* bila 3.181 $\mu\text{g/ml}$, a spoj 4 ima značajnije nižu EC_{50} (10,253. $\mu\text{g/ml}$) (Xue-Ru Liu i sur.,2014.).

U istraživanju Miniyar i sur.(2015.) proučavana je nova serija jezgre 2-klorkinolina spojenih s pirazolskim prstenom. Spojevi su sintetizirani i testirani na antibakterijsko i antifungalno djelovanje. Autori navode da su dobiveni rezultati vrlo obećavajući protiv bakterijskih, a također i protiv gljivičnih sojeva. U radu je utvrđeno da spoj 1-(3-(4-aminofenil)-5-(2-klorokinolin-3-il)-1H-pirazol-1-il) etanon imaju umjereno djelovanje protiv *Aspergillus fumigatus*, *Penicillium notatum* i *B. subtilis* s MIC 48, 46 i 44 $\mu\text{g/ml}$, dok je spoj 1-(5-(2-klorokinolin-3-il)-3-fenil-1H-pirazol-1-il) etanon bio aktivan protiv *P. notatum*, *B. subtilis* i *E. coli* s MIC 57, 54 i 43 $\mu\text{g/ml}$ u usporedbi sa standardom.

Alam i sur. (2015.) su proučavali antimikrobna aktivnost povezanih derivata pirazola-pirimidina. Rezultati su pokazali da pirazol [1,5-A] pirimidin ima najsnažniju *in vitro* antifungalnu učinkovitost s minimalnom inhibitornom koncentracijom od 6,25 $\mu\text{g/ml}$ protiv *A. fumigatus* i *F. oxysporum*. Sahu i sur. (2008.) sintetizirali su nove 4-((5-(4-klorofenil)-4,5-dihidro-1H-pirazol-3-il)amino) fenole. Derivati su pokazali snažnu antimikrobnu aktivnost i antibakterijsku aktivnost na Muller-Hinton agaru za vrste *S. aureus*, *Salmonella typhi* i *E. coli*. Antifungalno djelovanje ispitano je difuzijskom metodom na agarnim pločama protiv vrsta *C. albicans* i *A.niger*. U oba slučaja, kao standardni lijekovi, korišteni su ciprofloksacin i kotrimazol.

Kumar i sur. (2016) su provodili istraživanje o antimikrobnom djelovanju derivata pirazola. Radila se sinteza 6 derivata pirazola. Među tim spojevima spoj 2 - (3-hidroksi-5-metil-4H-pirazol-4-il) (4-hidroksifenil) metil hidrazinkarboksamid (MIC: 0,25 $\mu\text{g/ml}$) najaktivniji protiv gram negativnog bakterijskog soja *E. coli* u usporedbi sa standardnim Ciprofloksacinom, antifungalna aktivnost spoja 2 - [(4-klorofenil) (3-hidroksi-5-metil-4H-pirazol-4-il) metil] hidrazinkarboksamid (MIC: 1 $\mu\text{g/ml}$) bila je značajno aktivna protiv *A. niger* od standardnog klotrimazola. Autori su zaključili u istraživanju da ti derivati mogu biti od velikog značaja za daljnji razvoj antimikrobnih, a tako i protuupalnih sredstava.

U istraživanju B'Bhatt i Sharma (2017.) istražena je sinteza novih derivata rodanina koji sadrže dio pirazola (**3a-3h**), a to su : **3a**) 3-(4-klorofenil)-5-((1,3-difenil-1H-pirazol-4-il) metilen-2-tioksotiazolidin-4-on), **3b**) 3-(4-klorofenil)-5-((1-fenil-3-tol-1H-pirazol-4-

il)metilen-2-tioksotiazolidin-4-on), **3c**) 3-(4-klorofenil)-5-((3-(4-hidroksifenil)-1-fenil-1H-pirazol-4-il) metilen-2-tioksotiazolidin-4-on), **3d**) 3-(4-klorofenil)-5-((3-(4-nitrofenil)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)metilen-2-tioksotiazolidin-4-on), **3e**) 3-(4-klorofenil)-5-((3-(4-fluorofenil)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)metilen-2-tioksotiazolidin-4-on), **3f**) 5-((3-(4-bromofenil)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)metilen)-3-(4-klorofenil)-2-tioksotiazolidin-4-on, **3g**) 3-(4-klorofenil)-5-((3-(4-klorofenil)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)metilen-2-tioksotiazolidin-4-on), **3h**) 3-(4-klorofenil)-5-((3-(4-metoksifenil)-1-fenil-1H-pirazol-4-il)metilen-2-tioksotiazolidin-4-on). Nadalje novosintetizirani spojevi testirani su kako bih se utvrdila antibakterijska aktivnost protiv gram-pozitivnih bakterija *S. aureus* i *Streptococcus pyogenes* i gram-negativnih bakterija *E. coli* i *P. aeruginosa*. te protiv tri različite gljive *C. albicans*, *A. niger* i *Aspergillus clavatus*. Kao pozitivna kontrola za bakterije i gljivice korišteni su standardni antibiotici, odnosno ampicilin i grizeofulvin. Spoj 3c koncentracije 62.5 µg/ml imao je najbolji učinak pri inhibiciji *E. coli*. Spoj 3a, 3c, 3g koncentracije 125 µg/ml imao je najbolji učinak pri inhibiciji *P. aeruginosa*. Spoj 3a, 3d, 3g koncentracije 100 µg/ml imao je najbolji učinak pri inhibiciji *S. aureus*. Spoj 3d koncentracije 100 µg/ml imao je najbolji učinak pri inhibiciji *S. pyogenes*. Spoj 3d koncentracije 200 µg/ml imao je najbolji učinak pri inhibiciji *C. albicans*. Spoj 3b koncentracije 200 µg/ml imao je najbolji učinak pri inhibiciji *A. niger*, te spoj 3b koncentracije 200 µg/ml ima najbolji učinak pri inhibiciji *A. clavatus*. Razlog različitih osjetljivosti između gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija može se pripisati morfološkoj razlici između tih mikroorganizama. U istraživanju autori su koristili grizeofulvin kao referenti lijek za usporedbu aktivnosti ispitivanih spojeva, a rezultati su zabilježeni kao postotak inhibicije rasta micelija. Usporedba antimikrobnih rezultata sintetiziranih spojeva pokazala je da dodavanje derivata pirazola poboljšava antimikrobnu aktivnost (B' Bhatt i Sharma, 2017.).

Rastija i sur. (2019.) navodi kako derivati pirazola imaju različite biološke aktivnosti, ovisno o položajima supstituenata na prstenu. Rezultati istraživanja su utvrdila da je spoj 4,5-dihidro-1H pirazol izvrstan antibakterijski lijek protiv bakterije *S. aureus* i *Corynebacterium diphtheriae*. Također je utvrđeno da su 5-aril-1-karboksamidino-3-stiril-4,5-dihidro-1H-pirazol jaki antioksidansi te imaju antimikrobna svojstva protiv *S. typhi*, *S. aureus* i *Streptococcus pneumoniae*. Izvršna antibakterijska aktivnost derivata pirazola (4,5-dihidro-1H) dokazana je i protiv *P. aeruginosa*, *E. coli*, *B. subtilis* i *S. aureus*. Antibakterijsko ispitivanje je pokazalo da su gram-negativne bakterije osjetljivije na testirane spojeve nego gram-pozitivne. Od četiri testirane bakterije gram-pozitivne

bakterije su imale veću rezistenciju na testirane spojeve s do tri puta većim MIC vrijednostima (62,5 µg/ml) za *B. subtilis* i *S. aureus* dok su gram-negativne bakterije imale MIC (62,5 µg/ml) za *E. coli* i *P. aeruginosa* za sve testirane spojeve. Općenito gledano u istraživanju su autori dokazali da gram-pozitivne bakterije imaju veću rezistenciju na testirane spojeve od gram-negativnih bakterija i dolaze do zaključka kako su 4,5-dihidro-1H pirazoli vrlo jako bioaktivni spojevi, a njihove strukturne modifikacije poput uvođenje atoma fluora na fenil prsten može dovesti do povećanja biološke aktivnosti.

6. ZAKLJUČAK

Obzirom na brojne pozitivne biološke aktivnosti heterocikličkih spojeva, istraživala su se svojstva novih derivata pirazola. Brojne bolesti s kojima se susrećemo u poljoprivredi mogu biti rezultat prisutnosti patogenih gljiva i bakterija. Takve situacije mogu dovesti do pada kvalitete proizvoda i smanjenja prinosa. Zbog sve veće potrebe ljudi za kvalitetnom hranom raste i potražnja za raznim sredstvima za zaštitu bilja kako bih se zaštitili usjevi. Na razna sredstva za zaštitu bilja brojne kulture su razvile otpornost na njih. Posljednjih godina pažnju privlače pirazoli i derivati pirazola jer imaju brojna biološka svojstva. Pirazoli imaju antimikrobno, herbicidno, antitumorsko, insekticidno i fungicidno djelovanje. U medicini se koriste jer imaju i antiupalna i antibakterijska svojstva te se koriste i kao analgetici. U ovom istraživanju ispitani pirazoli su pokazali da ne utječu na rast testne kulture *B. subtilis*. Ovakvi rezultati istraživanja su poželjni s obzirom da je utvrđeno kako pirazoli ne utječu na rast predstavnika korisne bakterijske populacije tla. Potrebna su buduća istraživanja kako bi se utvrdilo djelovanje pirazola i na drugim korisnim mikroorganizmima tla.

7. POPIS LITERATURE

Ahemad, M., Kibret, M. (2014.): Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: Current perspective. *Journal of King Saud University, Science*, 26: 1-20.

Ahmad, A., Husain, A., Khan, S.A., Mujeeb, M., Bhandari, A. (2014.) Synthesis, antimicrobial and antitubercular activities of some novel pyrazoline derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, 20: 577-84.

Alam, Md. J., Alam, O., Alam, P., Naim, M. J. (2015.) A review on Pyrazole chemical entity and Biological Activity. *International Journal of Pharma Sciences and Research*, 6 (12): 1433-1442.

Baličević, R., Parađiković, N., Šamota, D. (2007.): Control of soil parasites (*Pythium debaryanum*, *Rhizoctonia solani*) on tomato by a biological product. *Cereal Research Communications* 35 (2): 1001-1004.

Barea, J. M., Pozo, M. J. (2005.) Azco'n, R., Azco'n-Aguilar. C. (2005.): Microbial co-operation in the rhizosphere, *Journal of Experimental Botany*, 56(417):1761–1778.

B'Bhatt, H., Sharma, S. (2017.): Synthesis and antimicrobial activity of pyrazole nucleus containing 2-thioxothiazolidin-4-one derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(2):S1590-S1596.

Bokulić, A., Budinščak Ž., Čelig, D., Deždek, B., Hamel, D., Ivić, D., Novak, M., Mrnjavčić Vojvoda, A., Nikl, N., Novak, N., Novaković, V., Pavunić Miljanović, Z., Peček, G., Poje, I., Prpić, I., Rehak, T., Ševar, M., Šimala, M., Turk, R. (2015.): Priručnik za sigurno rukovanje i primjenu sredstava za zaštitu bilja, Ministarstvo poljoprivrede, Zagreb.

Coloman, D.C., Crossly D.A. (1996.): *Fundamentals of soil ecology*. Academic Press, San Diego.

Čačić, M., Molnar, M., Strelec, I. (2011.): Synthesis and biological evaluation of a novel series of 1,3- dicoumarinyl-5-aryl-2-pyrazolines. *Heterocycles* 83: 1553-1566.

Filajdić, N., Vukša, P., Ivanović, M., Rekanović, E. (2003.): Biološke mere zaštite bilja: problemi i perspektive. *Pesticidi*, 18(2): 69-75.

Food and Agriculture organization of the United Nation/FAO (2002.): International Code of Conduct on the Distribution and Use of Pesticides. Rim.

Gautam, V., Chawla, V., Sonar, P., Saraf, K. (2010.): Synthesis, characterisation and antimicrobialevaluation of some 1,3,5-trisubstituted pyrazole derivatives. Chemistry—A European Journal, 7(3):1190-1195.

Grahovac, M., Inđić, D., Lazić, S., Vuković, S. (2009.): Biofungicidi i mogućnosti primene u savremenoj poljoprivredi . Pesticides and Phytomedicine, 24(4): 245-258.

Hiltner, L. (1904.): Uber neuere erfahrungen und probleme auf dem gebiet der boden bakteriologie und unter besonderer berucksichtigung det grundungung und branche. Arbeiten Deutsche Landwirtschafts-Gesellschaft, 98: 59-78.

Hu, S., van Bruggen, A. H. C., Grünwald, N. J. (1999.): Dynamics of bacterial populations in relation to carbon availability in a residue–amended soil. Applied Soil Ecology. 13: 21-30.

Igrc-Barčić, J., Maceljiski, M. (2001.): Ekološki prihvatljiva zaštita bilja od štetnika. Zrinski d.d., Čakovec.

Jarak, M., Milošević N., Milić, V., Mrkovački N., Đurić, S., Marinković J. (2005.): Mikrobiološka aktivnost – pokazatelj plodnosti i degradacije zemljišta. Ekonomika poljoprivrede, 52(4): 483-493.

Karthikeyan, M. S., Holla, B. S., Kumari N.S. (2007.): Synthesis and antimicrobial studies on novel chlorofluorine containing hydroxy pyrazolines. European Journal of Medicinal Chemistry, 42: 30-36.

Kontogiorgis, C., Detsi, A., Hadjipavlou-Litina, D. (2012.). Expert Opinion on Therapeutic Patents, 22:437-454.

Klokočar-Šmit, Z., Šovljanski, R., Inđić, D. (2006.): Biopreparati- alternativa u zaštiti plodovitog povrća. Biljni lekar, 34(1): 19-30.

Kumar, K. A., Renuka, N., Pavithra, G., Kumar, G. V., (2015.): Comprehensive review on coumarins: molecules of potential chemical and pharmacological interest. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research 7(9): 67-81.

- Kumar, R.S., Arif, I.A., Ahamed, A., Idhayadhulla, A. (2016.) Anti-inflammatory and antimicrobial activities of novel pyrazole analogues. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23:614-620.
- Lévai, A., Jekő, J. (2009.): Synthesis of 5-aryl-1-carboxyphenyl-3-(3-coumarinyl)-2-pyrazolines. *Arkivoc*, 6: 63-70.
- Liu, B., Raeth, T., Beuerle, T., Beerhues, L. (2010.): A novel 4-hydroxycoumarin biosynthetic pathway. *Plant Molecular Biology*, 72: 17–25.
- Malladi, S, Isloor, A.M., Peethamber, S.K., Ganesh, B.M., Goud P.S. (2012.): Synthesis and antimicrobial activity of some new pyrazole containing cyanopyridone derivatives. *Der Pharma Chemic*, 24(2): 43-52.
- Miniyar, P.B., Barmade, M.A., Mahajan, A.A. (2015.): Synthesis and biological evaluation of 1-(5-(2-chloroquinolin-3-yl)-3-phenyl-1H-pyrazol-1-yl)ethanone derivatives as potential antimicrobial agents. *Journal of Saudi Chemical Society*, 19:655-60.
- Molnar, M., Čačić, M. (2011.): Biological activity of coumarin derivatives—a review. *Croatian journal of food science and technology* 3(2): 55-64.
- Rastija, V., Brahmabhatt, H., Molnar, M., Lončarić, M., Strelec, I., Komar, M., Pavić, V. (2019.): Synthesis, Tyrosinase Inhibiting Activity and Molecular Docking of Fluorinated Pyrazole Aldehydes as Phosphodiesterase Inhibitors. *Applied Sciences*, 9(8): 1-11.
- Rostom, S.A.F., Badr, M.H., Abd El Razik, H.A., Ashour, H.M.A., Abdel Wahab, A.E. (2011.): Synthesis of some pyrazolines and pyrimidines derived from polymethoxy chalcones as anticancer and antimicrobial agents. *Archiv der Pharmazie*, 344: 572-584.
- Smith, A.E., Secoy, D.M (1975.): Forerunners of Pesticides in Classical Greece and Rome. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 23(6): 1050-1056.
- Smith, E.H., Kennedy, G.G (2002.): History of Pesticides. U: Pimentel, D. (ur.), *Encyclopedia of Pest Management*. Informa Taylor & Francis Group, London.
- Tilak, K. V. B. R., Ranganayaki, N., Pal, K.K., De, R., Saxena, A.K., Nautiyal, C.S., Mittal, S., Tripathi, A.K., Johri, B.N. (2005.): Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. *Current Science*, 89: 136-150.

Ware, G., Whitacre, D.(2004.): The pesticide book,6th edition. Thompson Publishing Group, Tampla Florida.

Welbaum, G., Sturz, A. V., Dong, Z., Nowak, J. (2004.): Fertilizing soil microorganisms to improve productivity of agroecosystems. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 23(2): 175-193.

Xue-Ru Liu, X, Wu, H., He, Z., Ma, Z, Feng, J., Zhang, X. (2014.): Design, synthesis and fungicidal activities of some novel pyrazole derivatives. *Molecules*, 19: 14036-14051.

Yuvaraj, S., Sunith, D.K., Ahmed, T.K., Soumya, E.N., Prajitha, P.P. (2009.): Synthesis, analysis and antibacterial evaluation of pyrazole derivatives. *HYGEIA:journal for drugs and medicines*, 1(4): 36-37.

Želježić D., Perković P. (2010.): Uporaba pesticida i postojeće pravne odredbe za njezinu regulaciju. *Sigurnost : časopis za sigurnost u radnoj i životnoj okolini*, 53(2): 141-150.

Knjige

Vukadinović, V. i Vukadinović, V. (2011.): *Ishrana bilja*, Poljoprivredni fakultet, Osijek.

Tešić, Ž, Todorović. M. (1988.): *Mikrobiologija*. Poljoprivredni fakultet, Beograd.

Jarak, M., Čolo, J. (2007.): *Mikrobiologija zemljišta*, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.

Znaor, D.(1996.): *Ekološka poljoprivreda- poljoprivreda sutrašnjice*. Nakladni zavod Globus d.o.o., Zagreb.

8. SAŽETAK

Pirazoli su heterociklički spojevi široke primjene i obimnog spektra djelovanja: antibakterijskog, antifungalnog, herbicidnog, insekticidnog ali posjeduju i mnogobrojne farmakološke aktivnosti. Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi djelovanje derivata pirazola kao potencijalnih novih pesticida na rast i razmnožavanje autohtonog predstavnika korisne bakterijske populacije tla *Bacillus subtilis*. U istraživanju je korišteno 10 derivata pirazola, a rezultati su pokazali da niti jedan od njih nema inhibitornu aktivnost na rast *B. subtilis*. Potrebna su daljnja istraživanja kako bih se utvrdilo djelovanje pirazola i na druge korisne predstavnike mikroorganizme tla.

Ključne riječi: derivati pirazola, pesticidi, *Bacillus subtilis*, tlo

9. SUMMARY

Pyrazoles are heterocyclic compounds with a wide application and a wide spectrum of action: antibacterial, antifungal, herbicidal, insecticidal, but they also have numerous pharmacological activities. The aim of this study was to determine the effect of pyrazole derivatives as potential new pesticides on the growth and reproduction of the indigenous representative of the beneficial bacterial soil population *Bacillus subtilis*. Ten pyrazole derivatives were used in the study, and the results showed that none of them had inhibitory activity on *B. subtilis* growth. Further research is needed to determine the effect of pyrazoles on other beneficial representatives of soil microorganisms.

Key words: pyrazole derivatives, pesticides, *Bacillus subtilis*, soil

10. POPIS TABLICA

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva pirazola.....	11
Tablica 2. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H1) na testnu bakteriju <i>Bacillus subtilis</i>	18
Tablica 3. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H2) na testnu bakteriju <i>Bacillus subtilis</i>	18
Tablica 4. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H3) na testnu bakteriju <i>Bacillus subtilis</i>	18
Tablica 5. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H4) na testnu bakteriju <i>Bacillus subtilis</i>	19
Tablica 6. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H5) na testnu bakteriju <i>Bacillus subtilis</i>	19
Tablica 7. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H6) na testnu bakteriju <i>Bacillus subtilis</i>	19
Tablica 8. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H7) na testnu bakteriju <i>Bacillus subtilis</i>	20
Tablica 9. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H8) na testnu bakteriju <i>Bacillus subtilis</i>	20
Tablica 10. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazol (H9) na testnu bakteriju <i>Bacillus subtilis</i>	20
Tablica 11. Rezultati istraživanja djelotvornosti derivata pirazola (H10) na testnu bakteriju <i>Bacillus subtilis</i>	21

11. POPIS SLIKA

Slika 1. Mikroorganizmi zastupljeni u rizosferi.....	4
Slika 2. Putevi onečišćenja okoliša primjenom sredstva za zaštitu bilja.....	8
Slika 3. Pirazol.....	10
Slika 4. Različita biološka svojstva pirazola.....	12
Slika 5. Struktura derivata pirazola H1 i H2.....	14
Slika 6. Struktura derivata pirazola H3 i H4.....	15
Slika 7. Struktura derivata pirazola H5 i H6.....	15
Slika 8. Struktura derivata pirazola H7 i H8.....	16
Slika 9. Struktura derivata pirazola H9 i H10.....	16
Slika 10. Čista kultura <i>Bacillus subtilis</i>	17

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek
Sveučilišni diplomski studij, smjer Ekološka poljoprivreda

Diplomski rad

Antibakterijsko djelovanje derivata pirazola

Ana Marojević

Sažetak: Pirazoli su heterociklički spojevi koji su građeni od tri ugljikova atoma i dva dušikova atoma u susjednom položaju. Cilj ovog istraživanja je bio utvrditi hoće li derivati pirazola kao potencijalni novi pesticidi imati djelovanje na rast i razmnožavanje *Bacillus subtilis*. U istraživanju je korišteno 10 derivata pirazola, a rezultati su pokazali da niti jedan od njih nema inhibitornu aktivnost na rast *Bacillus subtilis*, koja predstavlja korisnu bakterijsku populaciju tla. Potrebna su daljnja istraživanja kako bih se utvrdilo djelovanje pirazola i na druge korisne mikroorganizme tla.

Ključne riječi: pirazoli, derivati pirazola, pesticidi, *Bacillus subtilis*

Rad je izrađen pri: Fakultet agrobiotehničkih znanosti Osijek

Mentor: Gabriella Kanižai Šarić

Broj stranica: 32

Broj grafikona i slika: 10

Broj tablica: 11

Broj literaturnih navoda: 41

Broj priloga: 0

Jezik izvornika: hrvatski

Ključne riječi: pirazol, derivati pirazola, pesticidi, *Bacillus subtilis*

Datum obrane:

Stručno povjerenstvo za obranu:

1. izv. prof. dr. sc. Vesna Rastija, predsjednik
2. izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. doc. dr. sc. Dejan Agić, član

Rad je pohranjen u: Knjižnica Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Sveučilište J.J. Strossmayer u Osijeku i u digitalnom repozitoriju završnih i diplomskih radova Fakulteta agrobiotehničkih znanosti Osijek, Vladimira Preloga 1.

BASIC DOCUMENTATION CARD

**Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek
University Graduate Studies, Organic agriculture**

Graduate thesis

Antibacterial activity of pyrazole derivatives

Ana Marojević

Abstract: Pyrazoles are heterocyclic compounds that are made up of three carbon atoms and two nitrogen atoms in an adjacent position. This study aimed to determine whether they would want to get pyrazoles as potential new pesticides to affect and reproduction *Bacillus subtilis*. Ten pyrazoles derivatives were used in the study, and the results showed that none of them had inhibitory activity on the growth of *Bacillus subtilis*, which represents a beneficial bacterial population of the soil. Further research is needed to determine the effect of pyrazoles on other beneficial soil microorganisms as well.

Thesis performed at: Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek

Mentor: Gabriella Kanižai Šarić

Number of pages: 32

Number of figures: 10

Number of tables: 11

Number of references: 41

Number of appendices: 0

Original in: Croatian

Key words: Pyrazole, pyrazole derivatives, pesticides, *Bacillus subtilis*

Thesis defended on date:

Reviewers:

1. izv. prof. dr. sc. Vesna Rastija, chairman
2. izv. prof. dr. sc. Gabriella Kanižai Šarić, mentor
3. doc. dr. sc. Dejan Agić, member

Thesis deposited at: Library of Faculty of Agrobiotechnical Sciences Osijek and in digital repository of Faculty of Agrobiotechnical sciences Osijek, Vladimira Preloga 1.