

Araştırma Makalesi / Research Article

Antibakteriyel ve Antikanser Özellikleri Gösteren Piridin ve Kinolin Temelli Schiff Bazı Türevlerinin Sensör Özellikleri

Bahar YILMAZ^{1*}, Pelin YEŞİLDAŞ¹, Mevlüt BAYRAKCI¹

¹ Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Biyomühendislik Bölümü, Karaman, (ORCID: [0000-0002-6315-3018](https://orcid.org/0000-0002-6315-3018)) (ORCID: [0000-0002-2700-1754](https://orcid.org/0000-0002-2700-1754)) (ORCID: [0000-0002-0416-2870](https://orcid.org/0000-0002-0416-2870))

Öz

Bu çalışmada, literatürdeki güncel sentez yöntemleri izlenerek, piridin ve kinolin grupları içeren Schiff bazı tipinde üç farklı molekül (P-1, P-2 ve P-3) başarıyla sentezlendi. Sentezlenen bileşiklerin yapısal karakterizasyonu spektrofotometrik yöntemler kullanılarak aydınlatıldı. Spektrofotometrik çalışmalarda, P-1 molekülü civaya karşı seçimli bir bağlanma gösterirken, P-2 molekülünün alüminyuma karşı seçimli bir bağlanma sergilediği görüldü. Ayrıca, sentezlenen tüm bileşiklerin antikanser aktivitesi, in vitro koşullarda insan meme kanseri hücresi (MCF-7) ve normal insan embriyonik böbrek hücresi (HEK 293) üzerinde Alamar mavisini testi kullanılarak değerlendirildi. Antikanser aktivite sonuçlarına göre, moleküllerin MCF-7 kanser hücre hattı üzerinde daha fazla ölüme neden olduğu görüldü. Dahası, P-1, P-2 ve P-3 moleküllerinin antibakteriyel çalışmaları disk difüzyon yöntemi kullanılarak gram-pozitif (*B. subtilis*) ve gram-negatif (*E. coli*) bakteri hatları üzerinde başarılı bir şekilde yapıldı. Bu sonuçlar, P-1 ve P-2'nin canlı hücrelerde sağlıklı hücrelere zarar vermeden mükemmel floresans problemleri olarak kullanılabilceğini gösterdi. Ayrıca, bu bileşikler Schiff bazı moleküllerinin antikanser ve antibakteriyel uygulamaları ile ilgili yeni çalışmalar için ilham kaynağı olabilir.

Anahtar kelimeler: Antibakteriyel, Antikanser, Floresans, Sensör, Schiff bazı

Sensor Properties of Pyridine and Quinoline Based Schiff Bases Derivatives Showing Antibacterial and Anticancer Properties

Abstract

In this study, three different Schiff base type molecules (P-1, P-2, and P-3) containing pyridine and quinoline groups were successfully synthesized by following current synthesis methods in the literature. The structural characterization of the synthesized compounds was determined using spectrophotometric methods. In spectrophotometric studies, it was seen that the P-1 molecule had a selective binding against mercury, while the P-2 molecule had a selective binding against aluminum. In addition, the anticancer activity of all the synthesized compounds was evaluated in vitro model using Alamar blue assay on the human breast adenocarcinoma (MCF-7) and normal human embryonic kidney cell (HEK 293). According to the results of anticancer activity, the molecules were shown to cause more deaths on the MCF-7 cancer cell line. Moreover, antibacterial studies of P-1, P-2, and P-3 molecules were successfully performed on gram-negative (*E. coli*) and gram-positive (*B. subtilis*) bacteria lines using disc diffusion method. These results showed that P-1 and P-2 can be used as excellent fluorescent probes in living cells without damage to healthy cells. And also, these molecules can be an inspiration for new studies related to the anticancer and antibacterial application of Schiff base molecules.

Keywords: Antibacterial, Anticancer, Fluorescence, Sensor, Schiff base

1. Giriş

Schiff bazı türevleri, organik bileşikler sınıfında iyi bilinen kondenzasyon ürünleridir. Bu tür moleküllerin endüstride ve biyolojik uygulamalardaki önemi giderek artmaktadır [1]. Farmakolojik ve biyolojik çalışmalar söz konusu olduğunda Schiff bazı türevleri geniş bir uygulama alanına sahiptir [2,

*Sorumlu yazar: bahar.kmu@gmail.com

Geliş Tarihi: 23.03.2021, Kabul Tarihi: 31.05.2021

3]. Schiff bazı bileşiklerinin temeli, yapıdaki biyoaktivite için hayati bir özellik olan imin ($-C = N$) bağına dayanmaktadır. Aynı zamanda sentezlenen birçok Schiff bazı bileşiklerinin yapısında nitrojenin varlığı, biyolojik aktivite göstermesi nedeniyle büyük ilgi görmektedir. Schiff bazı molekülleri birçok metal iyonuna karşı seçilimli olduğundan ağır metallerin tespitinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır [4]. Ağır metal iyonları organizma içerisine, başlangıçta ağız, solunum ve deri gibi birçok yol ile alınabilmektedir. Ağır metallerin organizma içerisine çok az miktarda dahi girmesi metabolizma içerisinde çok yavaş atılmalarından dolayı zamanla organizma bünyesinde birike birike tehlikeli dozlara ulaşip toksik etki yaratmalarına neden olur [5]. Ağır metal katyonlarının vücut içerisinde meydana getireceği etkiler, bu katyonların derişimine bağlı olmasının yanında ayrıca metal iyonunun çözünürlük değerine, fiziksel ve kimyasal yapısına, redoks ve kompleks oluşturabilme yeteneğine bağlıdır [6]. Ayrıca organizma içerisine alınış şekline ve dış ortamlarda bulunma sıklığına da bağlıdır. Ağır metallerin hücre içi metabolik süreçlerde oluşturdukları bozukluklar, vücutta meydana gelen toksik etkinin temel nedenidir. Bu metabolik bozukluklar; DNA yapısının hasarına, oksidatif bir stresin oluşmasına bağlı olarak başta protein yıkımı, mitokondri yapılarında hasara ve hücre ölümü olan apoptozisin indüklenmesine, otoimmün hastalıklara ve nörolojik bozukluklara neden olmaktadır [7].

Ağır metal iyonlarının meydana getirdiği bu ciddi sağlık problemlerinin büyük çoğunluğu kronik ya da kanser hastalıklarına neden olarak sonuçlanmaktadır. Yüksek oranda toksik etkiye neden olan ağır metal iyonlarının başında civa, bakır, çinko, kurşun ve alüminyum gibi metaller gelmektedir. Bu metal iyonlarının neden olduğu sağlık problemlerinin çoğunda da tedavi imkânları çok kısıtlıdır ve çoğunlukla bu sağlık problemleri ölüm ile sonuçlanmaktadır [8]. Bütün bu sebeplerden dolayı bu metal iyonları, birkaç teknik izlenerek saptanabilir ve tahmin edilebilir. Ancak floresans spektrometresi, yüksek duyarlılık ve seçicilik ile birlikte yüksek sinyal kabiliyeti sayesinde önemli derecede ilgi çekmektedir. Bu nedenle, metal iyonları için son derece hassas ve seçici olan sensörlerin tasarımı, son birkaç yıldır araştırma için önemli bir yer edinmiştir [9]. Floresans spektrofotometresi ile metal iyonu tespiti için başta Schiff bazlı moleküller olmak üzere birçok bileşik sensör olarak kullanılmaktadır. Koordinasyon bileşikleri sentezinde ligand olarak kullanılan Schiff bazları ile birçok literatür çalışması gerçekleştirilmiş ve çeşitli yapılar ortaya koyulmuştur [10].

Aminlerin aldehit veya ketonlara katılmasıyla oluşan aldiminlerin genel adı olan Schiff bazları ilk kez 1864 yılında Hugo Schiff tarafından bildirilmiştir [11]. Genel olarak asit-baz katalizi ve/veya ısı ortamında oluşturulan ($-HC=N-$) azometin grubunu içeren yapılardır [12]. Sentezleme kolaylığı, yapısal çeşitlilikleri ve elektronik kontrol mekanizmaları sayesinde Schiff bazları yararlı şelatlar olarak bilinmektedir [13]. Ayrıca bu yapılar "ayrıcalklı ligand" olarak da adlandırılırlar. Schiff bazları ve bunların metaller ile yapmış oldukları kompleksler, oksidasyon, hidrojenasyon, epoksidasyon, katalizlenme ve izomerizasyon olaylarında, belirli organik reaksiyonların kükürt içeren hidrokarbonlardan kükürdün uzaklaştırılması gibi, seçici ekstraksiyon alanında farklı çözücü sistemlerindeki metal iyonları ile metalik özellik gösteren iyonlardan ya da organik kirleticilerin atık sularından ayrıştırılması, proteinlerin saflaştırılması gibi çok geniş kullanım alanlarına sahiptirler [2, 3].

Schiff bazları kararlı ve kolay sentezlenebildikleri için çok kullanılırlar [4]. Schiff bazları veya Azometinler; antioksidan, antifungal, antitümör, antibakteriyel, antipiretik ve anti-inflamatuvar uygulamalar başta olmak üzere birçok biyolojik alanda kullanılmaktadırlar [14]. Schiff bazı yapılarının tıp ve farmakoloji alanındaki önemi antikanser aktivite özelliğine sahip olmalarından dolayı daha fazla ilgi görmektedir. Ayrıca kanser hastalıkları ile mücadele etmekte reaktif olarak kullanılmaları ve araştırılmaları için çalışmalar hızla devam etmektedir. Özellikle kemoterapi uygulamalarında aromatik aminlerin Schiff bazı yapıları, birkaç kimyasal reaksiyonlarda farklı substratlara oksijen iletici olarak uygulanmaktadır [2]. Son yıllarda kanser tedavisinde ve kemoterapik özelliği olan ilaçların hazırlanmasında kullanılabilmesi bu alandaki çalışmaların daha da artmasını sağlamaktadır [3]. Ayrıca fareler üzerinde *in vivo* olarak yapılan birçok araştırma, Ascites Carcinoma Virüsüne karşı Schiff bazlarının antikanser etkisinin fazla olduğu kanıtlanmıştır [15]. Ayrıca, Schiff bazlarının antitümöral aktivite yönünden platin içeren komplekslerinin, halo ve nitro türevlerinin hem anti tümöral hem de antimikrobiyal aktiviteye sahip olduğu birçok literatürde gösterilmiştir. Bu moleküllerin gerek biyolojik sistemler gerekse endüstride ki önemi her geçen gün artmaktadır. Metal-imin kompleksleri, antitümör ve herbisidal kullanıma uygun olmasının yanı sıra, AIDS ve diyabet tedavisinde de kullanılmaktadır. Bu moleküllerin antiviral kullanımı yanında antibakteriyel ve antifungal etkileri de yaygın olarak kullanılmakta ve etkili ajan olarak kabul edilmektedir [16, 17]. Yapılan birçok çalışmada farklı oranlarda antimikrobiyal aktiviteye sahip bazı Schiff bazları tespit edildiği görülmüştür. 2,6-di-tert-butil

olarak adlandırılan sterik hidrokarbonlu fenol türevleri sentezlenmiş ve onların kompleks bileşenleri birçok çalışmada kullanılmıştır. Başta polimer ve gıda sanayide kullanılmakta olan bu kompleks bileşenler, eczacılıkta oksidasyon sürecini engelleyen bir koruyucu ajan olarak kullanılmaktadır [14]. Ayrıca bu tür fenollerin antikanser özellik gösterdiği de yapılan araştırmalarla ortaya konulmuştur. Aminoasit Schiff bazları ise, bu moleküllerin antibakteriyel ve antifungal etkilere sahip olduğunu göstermiştir [14]. Metal içerikli Schiff bazı bileşiklerinin antiviral etkilerinin yüksek olduğu da yapılan çalışmalar ile ortaya konulan bir gerçektir [16]. Schiff bazları; boya endüstrisi, iyon seçici elektrot yapımı, katyon taşıyıcı ve korozyon önleyici alanlarda da kullanılmaktadır. Yapılan literatür çalışmaları dikkatle incelendiğinde piridin veya kinolin türevli Schiff bazı yapılarının mevcut olmasına rağmen, bu moleküllerin hem spektroskopik hem de biyolojik çalışmaları içeren literatür çalışmalarına çok az rastlanılmaktadır [17].

Yukarıda anlatılan bilgiler ışığında bu çalışmada piridin ve kinolin gibi aromatik yapıları içeren Schiff bazı moleküllerinin sentezi ve karakterizasyonu başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen ve karakterize edilen Schiff bazlarının; bazı metal iyonlarına karşı sensör özellikleri absorpsiyon ve emisyon ölçümleri ile tespit edilmiştir. Metal sensör olarak değerlendirilen bu Schiff bazlarının, gram negatif ve gram pozitif bakteri türlerine karşı antibakteriyel özellikleri değerlendirilmiş, sağlıklı ve kanser hücre hatlarına karşı da antikanser özellikleri detaylı bir şekilde çalışılmış ve rapor edilmiştir.

2. Materyal ve Metot

2.1. Genel

Tüm çözücüler ve reaktifler Sigma-Aldrich ve Merck firmasından temin edildi. 9-antrasenaldehit ile piridin ve kinolin temelli yapılardan elde edilen Schiff bazı moleküllerinin yapısı ¹H NMR, FT-IR ve elemental analiz yöntemleri ile aydınlatıldı (kimyasal kaymalar ppm cinsinden kaydedildi). UV-vis ve floresans spektrumları, oda sıcaklığında sırasıyla Shimadzu UV-1800 ve Hitachi F-7100 cihazları ile ölçülerek kaydedildi.

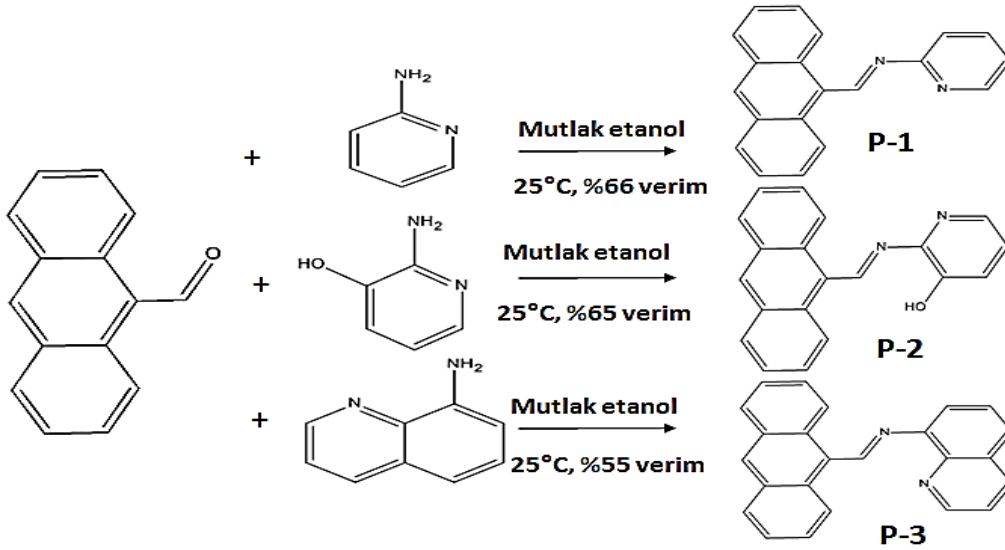
2.2. Schiff Bazlarının Sentezi

Sentezi gerçekleştirilen Schiff bazları literatüre uygun şekilde modifiye edilerek sentezlendi [18]. Schiff bazlarının sentezinde aldehit türevi olarak 9-antrasenaldehit bileşiği kullanılırken, amin bileşikler sırası ile P-1 için 2-amino-piridin, P-2 için 2-amino-3-hidroksi-piridin ve son olarak P-3 için ise 8-amino-kinolin bileşikler kullanıldı. Kısaca, 0.1 mmol aldehit ve amin türevleri ayrı ayrı 20 mL mutlak etanol içerisinde çözüldü, sonra amin çözeltisi aldehit çözeltisi içerisine damla damla ilave edilerek bir gece oda sıcaklığında karıştırıldı. Ardından oluşan renkli çökelek süzülerek soğuk etanolla, 0.1 N HCl ile ve son olarak da asitliği gidene kadar distile su ile yıkanarak reaksiyona girmemiş olan başlangıç bileşikler uzaklaştırıldı. Elde edilen ürünler kloroform-metanol çözücü karışımından kristallendirilerek saf halde ve yüksek verimde P-1, P-2 ve P-3'ün sentezi gerçekleştirildi.

1-(antrasen-9-il)-N-(piridin-2-il)metanimin (P-1) sentezi: Açık sarı katı, verim: 0.74 g (%66), E.N.: 288-290 °C, FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1664 (CH=N). ¹H NMR (600 MHz DMSO-d₆): δ 8.90-8.79 (m, 3H, Ar-H ve CH=N), 7.97-7.73 (m, 5H, Ar-H), 7.50 (m, 1H, Ar-H), 7.43-7.20 (m, 5H, Ar-H). C₂₀H₁₄N₂ için hesaplanan; C, 85.08; H, 5.00; N, 9.92. Bulunan: C, 85.17; H, 4.95; N, 9.89.

2-((antrasen-9-iletillen)amino)piridin-3-ol (P-2) sentezi: Sarı katı, verim: 0.75 g (%65), E.N.: 302-303 °C, FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1666 (CH=N). ¹H NMR (600 MHz DMSO-d₆): δ 8.89-8.74 (m, 2H, Ar-H ve CH=N), 7.98-7.93 (m, 3H, Ar-H), 7.52-7.48 (m, 1H, Ar-H), 7.41-7.16 (m, 5H, Ar-H), 6.64-6.61 (m, 2H, Ar-H), 6.31-6.14 (m, 1H, Ar-H). C₂₀H₁₄N₂O için hesaplanan; C, 80.52; H, 4.73; N, 9.39. Bulunan: C, 80.52; H, 4.75; N, 9.49.

1-(antase-9-il)-N-(kinolin-8-il)metanimin (P-3) sentezi: Sarı katı, verim: 0.72 g (%55), E.N.: 278-280 °C, FT-IR (ATR, cm⁻¹): 1675 (CH=N). ¹H NMR (600 MHz DMSO-d₆): δ 8.74 (bs, 3H, Ar-H, CH=N ve ArCH=N), 8.42 (m, 2H, Ar-H), 7.91-7.74 (m, 4H, Ar-H), 7.40 (m, 6H, Ar-H), 6.67 (m, 1H, Ar-H). C₂₄H₁₆N₂ için hesaplanan; C, 86.72; H, 4.85; N, 8.43. Bulunan: C, 86.66; H, 4.79; N, 8.37.



Şekil 1. P-1, P-2 ve P-3 Schiff bazlarının sentezi

2.3. Spektrofotometrik Çalışmalar

Ligand metal etkileşimlerini absorpsiyon ve emisyon çalışmaları ile incelemek için, Schiff bazı moleküllerinin (2×10^{-3} M) stok çözeltileri dimetilformamid (DMF) yardımı ile çözülerek su içerisinde hazırlandı [19,20]. Li^+ , Na^+ , Al^+ , Ag^+ , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Co^{+2} , Cs^+ , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Ni^{+2} , Sr^{+2} , Zn^{+2} gibi çeşitli metal kationlarının nitrat tuzlarından stok çözeltisi hazırlandı (40×10^{-3} M, DMF). Ölçüm için ligand metal konsantrasyonu 1:20 oranında hazırlanarak absorbans ve emisyon ölçümleri alındı. Spektrofotometrik ölçümler için Shimadzu UV 1800 kullanılarak 200-800 nm arası absorbans ölçümleri alınmış, florometrik ölçümler için ise farklı dalga boylarında uyarılmış ve 300-600 nm arası emisyon ölçümleri Hitachi F-7100 ile alınmıştır.

2.4. Biyolojik Çalışmalar

2.4.1. Sitotoksitite Testi

Çalışmada sitotoksitenin belirlenmesi için Alamar mavisi testi kullanıldı. 96 kuyucuklu plakalarda kuyucuk başı 10000 hücre 18 saat bileşikler ile inkübasyonu sağlandı ve 4 saat Alamar mavisi ile inkübe edilerek gerçekleştirildi. Her bir Schiff bazının 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400 ve 500 μM konsantrasyonları, 2 hücre hattı (MCF-7 ve HEK 293) için de 3 tekrarlı olacak şekilde konuldu. Her bir kuyucuğa 100 μL taze besi yeri ve 10 μL Alamar mavisi reaktifi eklenerek 37°C 'de 4 saat inkübe edildi. Kuyuların absorbans okumaları 570 nm ve 600 nm dalga boylarında ölçüldü ve hücre canlılığı kontrol hücrelerinin yüzdesi cinsinden hesaplandı. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

2.4.2. Disk Difüzyon Testi

Bu test, kağıt disklere emdirilen antibiyotiğin, duyarlılığı araştırılan organizmanın inoküle edildiği besi yerine difüzyonu ile gerçekleştirilen bir yöntemdir [21]. Bu yöntem ile, incelenecek olan mikroorganizmalar *Bacillus subtilis* (*B. subtilis* HFBF-B11) ve *Escherichia coli* (*E. coli*, ATCC®25952) Mueller Hinton Agar (MHA) içerisinde 4-5 saat süreyle 37°C 'de inkübe edildi. Bulanıklık oluştuktan sonra McFarland 0.5 (108 mikroorganizma / ml)'e göre ayarlanarak mikroorganizmalar MHA üzerine inoküle edildi [21]. Üzerine, pozitif kontrol olarak kloramfenikol antibiyotiği (K) emdirilmiş diskler, negatif kontrol için çözücü içeren diskler ve farklı moleküller (P-1, P-2 ve P-3) emdirilen diskler steril bir pens yardımıyla agar yüzeyine yerleştirildi. Daha sonra 18-24 saat süreyle 35°C 'de inkübe edilen petrielerde oluşan inhibisyon zonları ölçüldü. Tüm ölçümler 3 tekrarlı olacak şekilde yapıldı.

3. Bulgular ve Tartışma

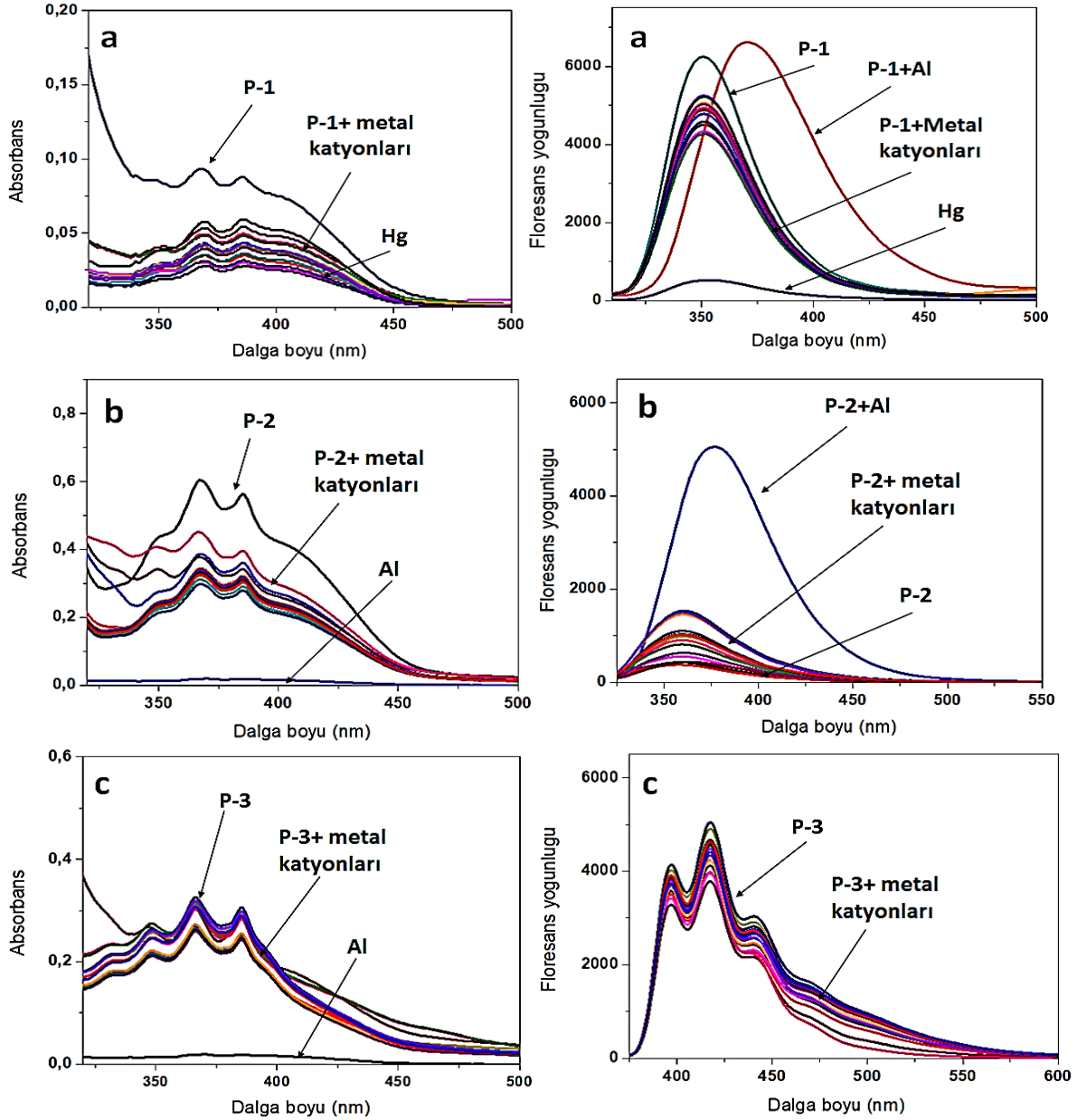
3.1. Sentez ve Karakterizasyon

Sentezi yapılan piridin ve kinolin yapıları Schiff baz bileşiklerinin yapısal karakterizasyonu yapılan diğer çalışmalar ile benzer sonuçlar vermektedir [18].

Bu bileşiklerin ¹H-NMR analizlerinden başlangıç reaktifleri olan 9-antrasenaldehit ve amin yapıları piridin veya kinoline ait karakteristik amin ve aldehit pikleri sırasıyla 4.20-4.45 ve 9.75-10.05 ppm civarında görülmesi gerekirken reaksiyon sonunda görülmemektedir. Ayrıca amin ve aldehit gruplarının kondenzasyonundan elde edilen ve 8.90-8.95 ppm civarında Schiff bazı yapısı olan imin (HC=N) gruplarındaki =CH protonuna ait piklerin varlığı sentezin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini ispatlamıştır. Bazı bileşiklerde bu imin pikleri diğer aromatik piklerle çakışmış olup net olarak yeri belirlenememiştir, ancak yapılan integrasyonda bu yapıları ait birer protonluk imin hidrojen pikleri tespit edilmiştir. FT-IR analizlerinde ise başlangıç reaktiflerine ait olan ve 3300 cm⁻¹ civarında kuvvetli bir gerilme bandı olan primer aminlere (R-NH₂) ait pikler, IR analizlerinde kondenzasyon reaksiyonu sonunda görülmeyip sentez reaksiyonlarının başarıyla gerçekleştiğini ispatlamıştır. Aynı zamanda aldehit türevi olan 9-antrasenaldehit'e ait olan ve genellikle 1715 cm⁻¹ civarında ortaya çıkan aldehit karboniline (-HC=O) ait gerilme piklerinin reaksiyon sonunda ortadan kaybolması da Schiff bazı sentezlerinin gerçekleştiğini göstermiştir. Schiff bazı sentez reaksiyonlarının başarı ile gerçekleştirildiği; yapı aydınlatma çalışmalarında başlangıç maddelerine ait olan karakteristik amin veya aldehit piklerinin reaksiyon sonunda kaybolması ve kullanılan aminler (R-NH₂) ile aldehitin (-HC=O) birleşmesiyle oluşan imin (CH=N) yapılarına ait yeni piklerin analizlerde görülmesi ile kanıtlanmıştır.

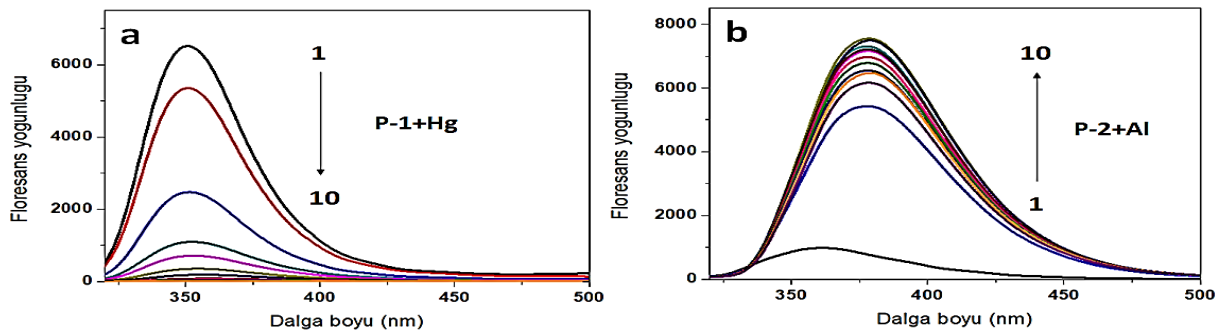
3.2. Absorpsiyon ve Emisyon Çalışmaları

Çalışmanın bu bölümünde bileşiklerin absorpsiyon ve emisyon spektrumları son konsantrasyon 1x10⁻⁷ M ligand, 20x10⁻⁷ M metal konsantrasyonu olacak şekilde DMF-su (1:1000) karışımı içerisinde oda sıcaklığında ölçülmüş ve sonuçlar Şekil 2'de gösterilmiştir. P-1, P-2 ve P-3 ile metal katyonları arasındaki floresans ve UV-Vis ölçümleri için gerçekleştirilen absorpsiyon çalışmalarında; 370 ve 390 nm dalga boylarında P-1, P-2 ve P-3 ligandlarında moleküler etkileşimden kaynaklı iki farklı pik gözlenmiştir [22]. Metal iyonları bu ölçüm aralığında herhangi bir pik değeri sergilememiştir. Metal iyonları P-1, P-2 ve P-3 moleküllerine eklendiğinde bu noktalarda belirgin bir kayma meydana gelmemiştir. Absorpsiyon spektrumlarında meydana gelen değişimleri destekleyebilmek için aynı komplekslerin emisyon spektrumları da ölçülmüştür. Şekil 2.a'da gösterildiği gibi 350 nm'de sentezlenen Schiff bazı (P-1) kuvvetli floresans spektrumu gösterirken, metal katyonları (Li⁺, Na⁺, Ag⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Co²⁺, Cs⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺, Ni²⁺, Sr²⁺, Zn²⁺) eklendiğinde P-1 bileşiğinin floresans emisyonlarında kayda değer bir azalma olmamıştır. Hg²⁺ varlığında ise floresans emisyonunun tamamen kaybolduğu tespit edilmiştir. P-1 molekülüne Al³⁺ iyonu eklendiğinde floresans bir değişim olmamış, ancak uyarılma ışınlarının toplandığı değer 360 nm'den 385 nm'ye kayma göstermiştir. Floresans özellik göstermeyen P-2 bileşiğinin emisyon ölçümleri sonucu, Li⁺, Na⁺, Ag⁺, Ca²⁺, Ba²⁺, Co²⁺, Cs⁺, Cu²⁺, Mg²⁺, Hg²⁺, Mn²⁺, Pb²⁺, Ni²⁺, Sr²⁺, Zn²⁺ metal katyonları eklendiğinde 370 nm'de aşırı düzeyde bir floresans değişim meydana gelmemiş, fakat Al³⁺ iyonu eklendiğinde 380 nm'de 300 kat floresans artış tespit edilmiştir (Şekil 2.b). 390, 425 ve 450 nm'de floresans pikler gösteren P-3 bileşiğinin, metal katyonları eklendiğinde floresans özelliğinde herhangi bir değişim belirlenmemiştir (Şekil 2.c).



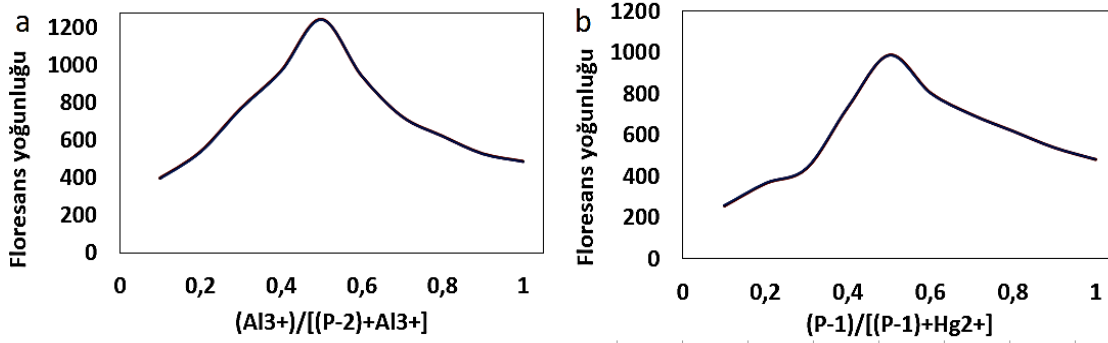
Şekil 2. Farklı metal katyonları varlığında; a) P-1, b) P-2 ve c) P-3 ligandlarının absorpsiyon ve emisyon spektrumları

Hg^{2+} ve Al^{3+} iyonlarına duyarlı olan P-1 ve P-2 ligandlarının Hg^{2+} ve Al^{3+} iyonlarına olan afinitelerini daha fazla incelemek amacıyla iyonların artan konsantrasyonunda (0-10 μM) floresans titrasyon deneyleri yapılmış ve Şekil 3'te artan metal konsantrasyonu ile P-1 ve P-2 ligandlarındaki değişim gözlenmiştir.



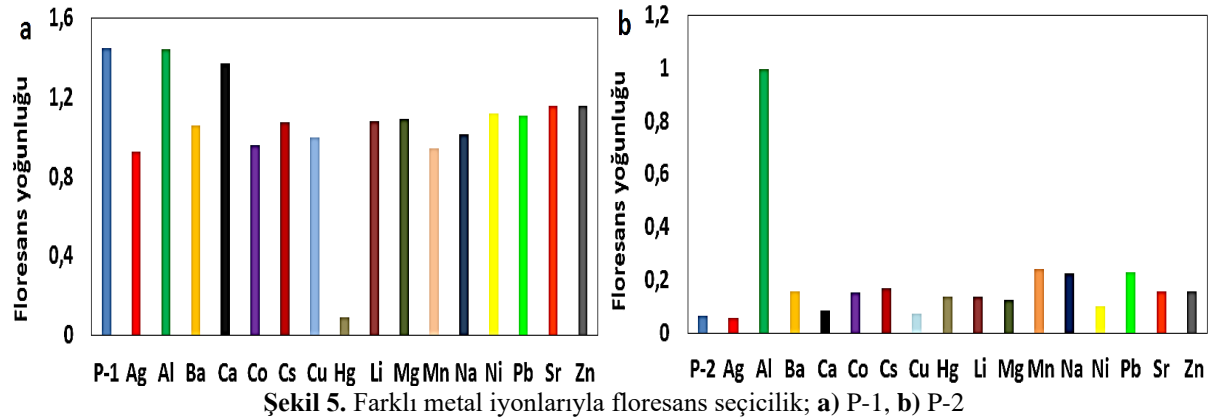
Şekil 3. P-1 (a) ve P-2 (b) ligandlarının floresans titrasyonları

Şekil 4'te P-1 ve P-2 ligandlarının Hg^{2+} ve Al^{3+} 'a bağlanma sitokiyometrisini hesaplamak amacıyla Job's plot yöntemi esas alınmıştır. Bu yöntemde her deneyde toplam konsantrasyon $10 \mu M$ 'da sabit tutularak her seferinde farklı konsantrasyonlarda ligand ve metal iyonu kullanılmıştır. Bu deneyde maksimum emisyon değeri molar fraksiyon 0.5 olarak hesaplanmış ve bu değer floresans titrasyon spektrum verileri ile uygun görülmüştür. Sonuç olarak 1 mol ligand ve 1 mol metal iyonu ile oluşan metal komplekste bağlanma oranı 1:1 olduğu belirlenmiştir.



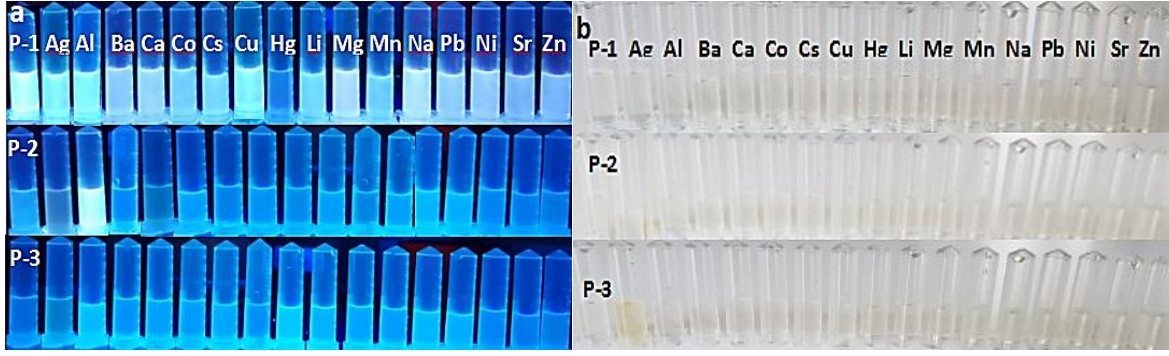
Şekil 4. Job plot tekniği ile P-1 ve P-2 ligandları ve Hg^{2+} ve Al^{3+} iyonları arasındaki kompleks sitokiyometrisi

P-1 ve P-2'nin seçici floresans bir sensör olarak pratik kullanılabilirliğini test etmek amacıyla çeşitli metal iyonlarına (Li^+ , Na^+ , Al^+ , Ag^+ , Ca^{+2} , Ba^{+2} , Co^{+2} , Cs^+ , Cu^{+2} , Mg^{+2} , Hg^{+2} , Mn^{+2} , Pb^{+2} , Ni^{+2} , Sr^{+2} , Zn^{+2}) karşı karşılaştırmalı seçicilik çalışmaları yapılmış ve sonuçlar Şekil 5'te verilmiştir. Aynı koşullar altında ligand içeren çözeltiye metal iyonların eklenmesiyle, floresans yoğunluğunda dikkate değer bir değişkenlik gözlenmezken, bu metallere farklı olarak Hg^{2+} ve Al^{3+} iyonlarına karşı hassas ve seçici bir tutum sergilediği görülmüştür.



Şekil 5. Farklı metal iyonlarıyla floresans seçicilik; a) P-1, b) P-2

Ayrıca P-1, P-2 ve P-3 Schiff bazlarının metal iyonları ile etkileşimlerini daha iyi görmek için hem UV ışık hem de gün ışığı altında görüntüleme yapılmıştır. UV ışık ve gün ışığı altında bakıldığında P-1 ligandında gün ışığında herhangi bir fark gözlenmemiş, ancak UV ışık altında floresans özellik gösteren ligand Hg^{2+} metal iyonu eklendiğinde floresans özelliğinin kaybolduğu tespit edilmiştir. UV ışık altında Al^{3+} iyonlarının varlığında P-2 ligandına ait rengin, renksizden parlak turkuaza dönüşümü net olarak görülmüştür. Bu floresans ışımaya muhtemelen ligandın Al^{3+} metaliyle kompleks oluşumu sırasında azometin azotu ve hidroksil gruplarında bulunan eşleşmemiş elektronların Al^{3+} iyonu tarafından çekilmesiyle oluştuğu düşünülmüştür [23, 24]. Sonuç olarak UV ışık altında P-2 ligandının ortamda bulunan alüminyum iyonlarının varlığını tespit etme noktasında etkili bir sensör olarak kullanılabilmesi öngörülmüştür. P-3 ligandında ise metal iyonları varlığında herhangi bir etkileşim tespit edilmemiştir.

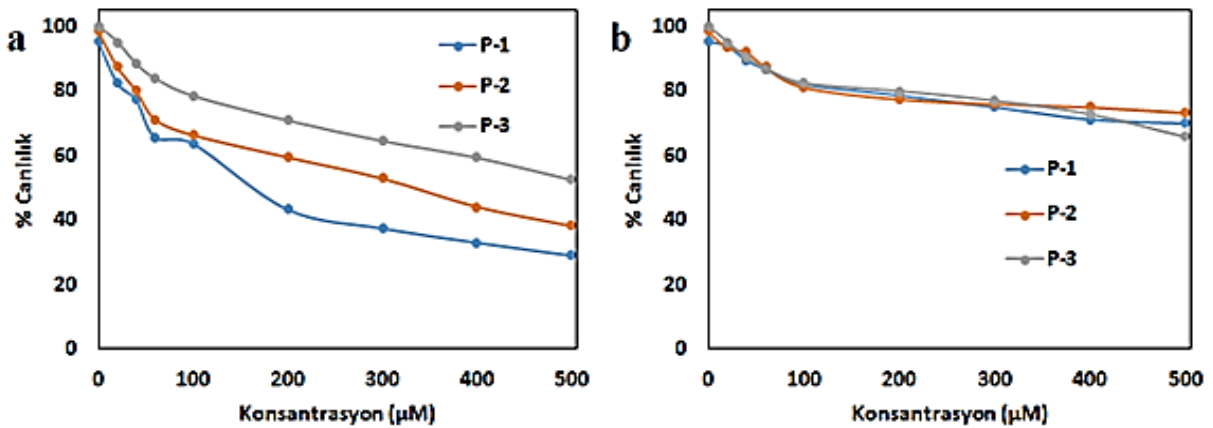


Şekil 6. P-1, P-2 ve P-3 ligandlarının metal kompleksleri ile a) Uv ışığı, b) gün ışığı altındaki görüntüleri

3.3. Biyolojik Uygulamalar

Çalışmada kullanılan farklı konsantrasyonlardaki (0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 200, 300, 400 ve 500 μM) P-1, P-2 ve P-3 bileşikleri 18 saat süre ile MCF-7 ve HEK 293 hücreleri üzerindeki sitotoksik etkisinin belirlenmesi için sitotoksosite testi yapılmıştır. Schiff bazı türevli bileşiklerin MCF-7 ve HEK 293 hücrelerinde 0-500 μM konsantrasyon aralığında 18 saatlik inkübasyon sonrası Alamar mavisi yöntemi ile ölçülen hücre canlılığı üzerine etkileri Şekil 7’de gösterilmiştir.

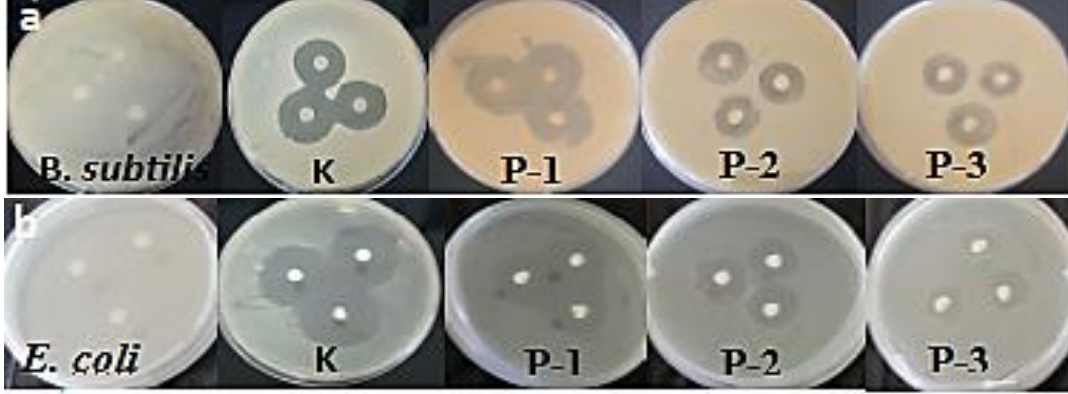
Sentezlenen bileşiklerin her birinin artan konsantrasyonuyla birlikte sitotoksiteside de artmıştır. Bu yöntem, Alamar mavisi (resazurin) ismi verilen bileşiğin, canlı hücreler ile beraber resorufin bileşiğine dönüşmesiyle gerçekleşmiştir. Oksidatif şekilde bulunan mavi renkteki resazurin bir redoks boyası olarak bilinir, hücre zarından serbest bir şekilde geçerek hücreye giriş sağlar ve burada indirgenip floresans özelliği olan pembe renkteki resorufin bileşiğine dönüştüğü görülmüştür [25]. Ölü hücreler, metabolik aktivitelerini kaybettiği için resazurini indirgeyememiş ve floresans sinyali oluşturamamıştır. Canlı hücreler tarafından resazurinin resorufine dönüşmesiyle meydana gelen sinyaller, florometre kullanımı ile tespit edilmiş ve kaydedilmiştir. P-1 ve P-2 molekülleri MCF-7 hücre hattında sırasıyla %70 ve %66 ölüme neden olduğu P-3’ün ise %44 ölüme neden olduğu görülmüştür. Aynı zamanda HEK 293 sağlıklı hücre hattında bu ölüm oranının daha az olması (yaklaşık %30) bu moleküllerin antikanser ajan olarak kullanılabilirliğini göstermiştir. Yapılan çalışmalar, sentezlenen bu bileşiklerin etki mekanizmalarını açıklamaya yönelik yeterli düzeyde çalışma olmamasına rağmen, bu moleküllerin yapısal farklılığına bağlı olarak farklı derecelerde antikanser özelliklerinin olduğunu ortaya koymuştur [26]. İleri sürülen olası hipotezlerden biri, metalin protein ya da enzimlere bağlanma ilgisindeki değişikliğin, DNA ile etkileşim sürecini değiştirdiği ve böylece hücre proliferasyonunun ve DNA replikasyonunun etkilenmesine sebep olduğu şeklinde açıklanmıştır [3, 27].



Şekil 7. A) MCF-7 ve b) HEK 293 hücrelerinin sitotoksosite testi ile belirlenen yüzde canlılıkları

Antikanser özellikleri araştırılan Schiff bazı ligandlarının aynı zamanda antibakteriyel özellikleri de incelenmiştir. Yapılan antibakteriyel çalışmada, disk difüzyon analizi ile bir gece boyunca gram-negatif ve gram-pozitif bakterilerin bulunduğu besi yerlerinde P-1, P-2 ve P-3 (10 μM) ligandları emdirilen diskler kloramfenikol antibiyotiği ile karşılaştırılarak değerlendirilmiş ve oluşan zonlar

sırasıyla 18, 12 ve 6 mm (gram-negatif (*E. coli*)), 17, 10 ve 9mm (gram-pozitif (*B. subtilis*)) olarak ölçülmüştür. Kloramfenikol antibiyotiklerinin oluşturduğu zonlar ise 16 mm (*B. subtilis*) ve 20 mm (*E. coli*) olarak tespit edilmiştir. Gram-negatif ve gram-pozitif özellik gösteren *E. coli* ve *B. subtilis* bakteri hatlarımıza karşı P-1, P-2 ve P-3 ligandlarının zon çapları ve duyarlılıkları P-1> P-2>P-3 şeklinde değerlendirilmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. *E. coli* ve *B. subtilis* suşlarının P-1, P-2 ve P-3 ligandlarını içeren disklerle karşı direnci

4. Sonuç ve Öneriler

Schiff bazları koordinasyon kimyası alanında yeni bir çığır açtı. Ligandların ve metal komplekslerinin basit sentetik yolları, olağanüstü termel stabilite ile birlikte, biyoloji ve tıpta çeşitli uygulamalarda önemli bir etkiye sahip olmuştur. Bazılarının çeşitli hastalıkları tedavi eden ilaçların hazırlanmasında kullanılan potansiyel farmasötik ajanlar olduğu bilinmektedir [28]. Bu nedenle bu çalışma, Schiff baz-metal komplekslerinin biyolojik aktivitesi hakkında, araştırmacılara bu bileşik sınıfını kullanarak yeni ilaçlar tasarlamada yardımcı olacak çok sayıda biyolojik aktivite içermektedir. Bu nedenle, Schiff bazları inkar edilemez bir şekilde en çok tercih edilen ligandlardır.

Sonuç olarak, daha önce yapılan çalışmalar göz önünde bulundurularak alüminyum ve civa iyonlarına seçimli floresans probu olarak üç farklı Schiff bazı bileşiği (P-1, P-2 ve P-3) modifiye edilerek tekrar başarıyla sentezlendi ve sentezlenen bileşiklerin yapısal karakterizasyonu spektrofotometrik yöntemler kullanılarak aydınlatılmıştır. Yapısı aydınlatılan bileşiklerin farklı metal katyonlara bağlanma yetenekleri absorpsiyon ve emisyon spektrumları ile incelenmiştir. Elde edilen spektrofotometrik çalışmalarda P-1 molekülü cıvaya karşı, P-2 molekülü ise alüminyuma karşı seçimli bir bağlanma göstermiştir. Yapılan bu çalışma ile gerek civa gerekse alüminyum iyonlarının seçimli olarak farklı mekanizma ile sentezi gerçekleştirilen P-1 ve/veya P-2 bileşikleri kullanılarak sıvı numunelerde tespit edilebileceği ve bu moleküllerin ise civa veya alüminyuma karşı etkili birer floresans prob olarak kullanılabilmesi görülmüştür.

Biyolojik uygulamalarda ise; P-1, P-2 ve P-3 moleküllerinin MCF-7 ve HEK 293 hücre hatları üzerindeki sitotoksitite testi sonuçlarına bakıldığında, moleküllerin MCF-7 kanser hücre hattı üzerinde daha çok ölüme neden olduğundan antikanser ajan olarak değerlendirilebilecekleri belirlenmiştir. Yine bu çalışma ile sağlıklı hücrelere karşı daha az hasara neden olduğundan dolayı biyolojik dokularda metal sensörü olarak kullanılabilmesi tespit edilmiştir. Bir diğer biyolojik uygulamada ise, mikroorganizmalara (*E. coli* ve *B. subtilis*) uygulanan antibakteriyel test sonuçları, bu çalışmalarda pozitif kontrol olarak kullanılan kloramfenikol antibiyotiklerinin sonuçları ile karşılaştırılmıştır. Yapılan antibakteriyel çalışmalardan P-1 molekülünü patojen özellik gösteren *B. subtilis*'e karşı açtığı zon çapının pozitif kontrol olan kloramfenikol antibiyotikinden elde edilen zon çapına benzer bir etki sergilediği Bayrakçı ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile karşılaştırıldığında benzerlik göstermiştir [29]. Diğer yapıların da belli miktarda zon çapı açtığı ama bunun pozitif kontrole göre daha az etkili olduğu görülmüştür. P-1, P-2 ve P-3 moleküllerin antibakteriyel aktiviteleri üzerinde iki temel etkili faktör, karakteristik özellikleri ve testin yapıldığı bakteri sınıfı olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle, sentezlenen moleküllerin bakterilere karşı bileşimi, büyüklüğü ve yüzeydeki fonksiyonel grupları bakteri zarına zarar verebilir veya serbest radikallere neden olarak bakteriyel ölüme yol açabilir.

Gram-pozitif ve gram-negatif olmak üzere iki bakteri türü vardır, gram-negatif bakteriler oldukça ince ve az-katmanlı hücre duvarlarına sahipken gram-pozitif bakteriler birçok katmana ve kalın bir hücre duvarına sahiptir. Bakteriyel hücrelerin nükleik asit açısından zengin olduğu, fosfat grupları olarak negatif yükler taşıdığı dikkat çekmektedir. Bu negatif yüklü moleküller, iki değerli katyonlar (yani Ca^{2+} ve Mg^{2+}) ile kovalent olmayan bir şekilde çapraz köprüler meydana getirir, sentezlenen moleküller yapılarında bulunan fonksiyonel gruplar sayesinde oluşturdukları komplikasyonlar ile ortamlardaki bakteri hücre duvarını stabilize etmeye yardımcı olur [30]. Sentezlenen bileşiklerin *Escherichia coli* ve *Bacillus subtilis* bakteri suşlarına karşı yapılan antibakteriyel çalışma hem *Bacillus* hem de *Escherichia*'da inhibisyon bölgelerinin oluştuğunu göstermektedir. Farmakolojik değerlendirildiğinde bu moleküller, hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterileri etkileyebildiğinden önemli ve değerlidir. P-1 ve P-2 moleküllerinin P-3 molekülünden daha fazla antibakteriyel etki göstermeleri, moleküler düzeyde incelenecek olursa bileşiklerin içerdikleri fonksiyonel yapıların hücre duvarını stabilize etmesi, direnç gösteren lipopolisakkaridlerin farklı lipid kompozisyonlarına ya da dış membranda bulunan proteinlerin bu guruplardan etkilenerek yer değiştirmesine bağlı olabilir.

Sentezi gerçekleştirilen Schiff bazı molekülleri (P-1 ve P-2) etkili bir antikanser ilaç olarak kullanılması düşünülürken, yapılarının özelliğinden dolayı metal tutucu olmaları vücuda verilen kimyasal ilaçlardan kaynaklanan toksik metalleri tespit edebileceğini göstermiştir. Metallerin varlığında floresans sensör olarak algılanabilen bu moleküller aynı zamanda antibakteriyel özellik taşımalarından dolayı tedavi esnasında bağışıklık zayıflığından yararlanmaya çalışan bakterilere karşı direnç sağlayabilecektir. Bütün bu özellikler göz önünde bulundurulduğunda sentezi yapılan Schiff bazlarının (P-1, P-2 ve P-3) hem antibakteriyel hem metal tutucu olmalarının yanında antikanser ajan olarak tasarlanmalarının başta ilaç sektörü olmak üzere birçok çalışmaya rehber olacağını göstermiştir. Ancak bu moleküllerin *in vivo* denemelerde nasıl sonuçlar vereceği, sağlıklı dokular üzerine nasıl etki yapacağını araştırılması oldukça önem taşımaktadır. Oluşan etki mekanizmalarına yönelik farklı deney protokollerinin tasarlanması ve araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

Yazarların Katkısı

Makale, yazarların birlikte katkıları ile ortaya çıkarılmıştır.

Çıkar Çatışması Beyanı

Yazarlar arasında herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

Araştırma ve Yayın Etiği Beyanı

Yapılan çalışmada araştırma ve yayın etiğine uyulmuştur.

Kaynaklar

- [1] Uddin N., Rashid F., Ali S., Tirmizi S. A., Ahmad I., Zaib S., Haider A. 2020. Synthesis, characterization, and anticancer activity of Schiff bases. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 38 (11): 3246-3259.
- [2] Wang Y., Ma Z.Y., Zhang D.L., Deng J.L., Chen X., Xie C.Z., Xu J.Y. 2018. Highly selective and sensitive turn-on fluorescent sensor for detection of Al^{3+} based on quinoline-base Schiff base. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 195: 157-164.
- [3] Bayrakçı M., Yılmaz B. 2019. DNA ile bağlanabilen suda çözünür sülfonato kaliksaren sentezi ve antimikrobiyal aktivitesi. *Ömer Halisdemir Üniversitesi Mühendislik Bilimleri Dergisi*, 8: 615-620.
- [4] Tahlan S., Narasimhan B., Lim S.M., Ramasamy K., Mani V., Shah S.A.A. 2019. 2-mercaptobenzimidazole Schiff bases: design, synthesis, antimicrobial studies and anticancer activity on HCT-116 cell line. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 19: 1080-1092.
- [5] Manceau A., Nagy K. L., Glatzel P., Bourdineaud J. P. 2021. Acute toxicity of divalent mercury to bacteria explained by the formation of dicysteinate and tetracysteinate complexes bound to

- proteins in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Environmental Science & Technology*, 55(6): 3612-3623.
- [6] Wang T., Yue W. 2017. Carbon nanotubes heavy metal detection with stripping voltammetry: a review paper. *Electroanalysis*, 29: 2178-2189.
- [7] Vasanthi L.A., Revathi P., Rajendran R.B., Munuswamy N. 2017. Detection of metal induced cytopathological alterations and DNA damage in the gills and hepatopancreas of green mussel *Perna viridis* from Ennore Estuary, Chennai, India. *Marine Pollution Bulletin*, 117: 41-49.
- [8] Djurišić A.B., Leung Y.H., Ng A.M., Xu X.Y., Lee P.K., Degger N., Wu R.S.S. 2015. Toxicity of metal oxide nanoparticles: mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. *Small*, 11: 26-44.
- [9] Priyadarshini E., Pradhan N. 2017. Gold nanoparticles as efficient sensors in colorimetric detection of toxic metal ions: a review. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 238: 888-902.
- [10] Mahmoud W.H., Deghadi R.G., Mohamed G.G. 2016. Novel Schiff base ligand and its metal complexes with some transition elements. Synthesis, spectroscopic, thermal analysis, antimicrobial and in vitro anticancer activity. *Applied Organometallic Chemistry*, 30: 221-230.
- [11] Malik M.A., Dar O.A., Gull P., Wani M.Y., Hashmi A.A. 2018. Heterocyclic Schiff base transition metal complexes in antimicrobial and anticancer chemotherapy. *Med. Chem. Comm.*, 9: 409-436.
- [12] Choi Y.W., Park G.J., Na Y.J., Jo H.Y., Lee S.A., You G.R., Kim C. 2014. A single schiff base molecule for recognizing multiple metal ions: a fluorescence sensor for Zn (II) and Al (III) and colorimetric sensor for Fe (II) and Fe (III). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 194: 343-352.
- [13] You G.R., Park G.J., Lee S.A., Ryu K.Y., Kim C. 2015. Chelate-type Schiff base acting as a colorimetric sensor for iron in aqueous solution. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 215: 188-195.
- [14] Amali I.B., Kesavan M.P., Vijayakumar V., Gandhi N.I., Rajesh J., Rajagopal G. 2019. Structural analysis, antimicrobial and cytotoxic studies on new metal (II) complexes containing N₂O₂ donor Schiff base ligand. *Journal of Molecular Structure*, 1183: 342-350.
- [15] Bayrakçı M., Yılmaz B. 2020. Synthesis and spectroscopic properties of optical probe based on Schiff base with biological application. *Iğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 10 (3): 1767-1778.
- [16] Cicekbilek F., Yılmaz B., Bayrakçı M., Gezici O. 2019. An application of a schiff-base type reaction in the synthesis of a new rhodamine-based hg (II)-sensing agent. *Journal of Fluorescence*, 29 (6): 1349-1358.
- [17] Ozcan F., Yılmaz B., Ertul S. 2017. Electrospun nanofibrous polyacrylonitrile/calix [4] arene mats: an excellent adsorbent for the removal of chromate ions from aqueous solutions. *Acta Chimica Slovenica*, 64 (3): 679-685.
- [18] Fathima S.S.A., Meeran M.M.S., Nagarajan E.R. 2019. Synthesis of novel (E)-2-((anthracen-9-ylmethylene) amino) pyridin-3-ol and its transition metal complexes: multispectral characterization, biological evaluation and computational studies. *Journal of Molecular Liquids*, 279: 177-189.
- [19] Markel J. F., Bou-Akl T., Dietz P., Afsari A. M. 2021. The effect of different irrigation solutions on the cytotoxicity and recovery potential of human osteoblast cells In vitro. *Arthroplasty Today*, 7: 120-125.
- [20] Yılmaz B., Bayrakçı M. 2019. Highly sensitive chemosensor for Cu²⁺ and Hg²⁺ based on anthracene anchored calix [4] arene pyridine amide receptor. *Revue Roumaine De Chimie*, 64 (12): 1091-1096.
- [21] Uysal A., Durak Y. 2012. Pulsed-field gel electrophoresis typing, antibiotic resistance, and plasmid profiles of *Escherichia coli* strains isolated from foods. *Canadian journal of microbiology*, 58: 1278-1287.
- [22] Yılmaz B., Bayrakçı M. 2018. Macrocyclic anthracene-anchored calix [4] arene as a sensitive and selective fluorescent chemosensor for ytterbium ions. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 55: 513-518.
- [23] Fekri R., Salehi M., Asadi A., Kubicki M. 2019. Synthesis, characterization, anticancer and antibacterial evaluation of Schiff base ligands derived from hydrazone and their transition metal complexes. *Inorganica Chimica Acta*, 484: 245-254.

- [24] Keskin S., Bayrakci M. 2019. A simple and highly sensitive turn-on Schiff base type naked-eye fluorescent sensor for aluminum ion in living cells. *Acta Chimica Slovenica*, 66: 792-801.
- [25] Yılmaz B., Bayraç A. T., Bayrakci M. 2020. Evaluation of anticancer activities of novel facile synthesized calix [n] arene sulfonamide analogs. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 190 (4): 1484-1497.
- [26] Kalarani R., Sankarganesh M., Kumar G.V., Kalanithi M. 2020. Synthesis, spectral, DFT calculation, sensor, antimicrobial and DNA binding studies of Co (II), Cu (II) and Zn (II) metal complexes with 2-amino benzimidazole Schiff base. *Journal of Molecular Structure*, 1206, 127725.
- [27] Yılmaz B., Keskinates M., Bayrakci M. 2021. Novel integrated sensing system of calixarene and rhodamine molecules for selective colorimetric and fluorometric detection of Hg²⁺ ions in living cells. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 245: 118904.
- [28] Abd El-Halim H.F., Mohamed G.G., Anwar M.N. 2018. Antimicrobial and anticancer activities of Schiff base ligand and its transition metal mixed ligand complexes with heterocyclic base. *Applied Organometallic Chemistry*, 32: e3899.
- [29] Bayrakci M., Keskinates M., Yılmaz B. 2021. Antibacterial, thermal decomposition and in vitro time release studies of chloramphenicol from novel PLA and PVA nanofiber mats. *Materials Science and Engineering: C*, 122: 111895.
- [30] Minhaz A., Khan N., Jamila N., Javed F., Imran M., Shujah S., Shah M.R. 2020. Schiff base stabilized silver nanoparticles as potential sensor for Hg (II) detection, and anticancer and antibacterial agent. *Arabian Journal of Chemistry*, 13 (12): 8898-8908.