

Bazı Yeni 3-Alkil-4-[3-metoksi-4-(*p*-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1*H*-1,2,4-triazol-5-on Bileşiklerinin *in vitro* Antioksidan ve Antimikrobiyal Özellikleri

Sevda MANAP^{1*}, Haydar YÜKSEK¹, Zeynep EKİNCİ¹, Elif SEL¹

¹Kafkas Üniversitesi, Kimya Bölümü, 36100 Kars, Türkiye

Sorumlu yazar: e-posta: manapsevda@gmail.com,

hhigh61@gmail.com,

zeynep.72sinan@gmail.com,

arda_5551@hotmail.com,

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5025-9622>

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1289-1800>

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-1527-5416>

ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-5887-8516>

Geliş Tarihi: 11.10.2021

Kabul Tarihi: 17.03.2022

Öz

Anahtar kelimeler

Schiff bazı; 1,2,4-Triazol-5-on; Sentez; Antioksidan aktivite; Antimikrobiyal aktivite

Bu çalışmada, dokuz yeni 3-alkil-4-[3-metoksi-4-(*p*-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1*H*-1,2,4-triazol-5-on (**3**) bileşiği 3-alkil-4-amino-4,5-dihidro-1*H*-1,2,4-triazol-5-on (**1**) bileşiklerinin 3-metoksi-4-hidroksibenzaldehidin trietilaminli ortamda *p*-nitrobenzoil klorür ile reaksiyonundan elde edilen 3-metoksi-4-(*p*-nitrobenzoksi)-benzaldehyd (**2**) ile reaksiyonundan sentezlenmiştir. Sentezlenen yeni bileşikler IR, ¹H NMR ve ¹³C NMR spektrum verileri kullanılarak karakterize edilmiştir. Çalışmada, ayrıca, yeni bileşiklerin *in vitro* antibakteriyel etkinlikleri altı bakteriye karşı agar kuyucuk yöntemi ile belirlenmiştir. *In vitro* ortamda sentezlenen yeni bileşiklerin antioksidan aktiviteleri üç farklı yöntemle tayin edilmiştir.

In vitro Antioxidant and Antimicrobial Activities of Some Novel 3-Alkyl-4-[3-methoxy-4-(*p*-nitrobenzoxy)-benzylideneamino]-4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazol-5-ones

Abstract

Keywords

Schiff base; 1,2,4-Triazol-5-one; Syntheses; Antioxidant activity; Antimicrobial activity

In this study, nine novel 3-alkyl-4-[3-methoxy-4-(*p*-nitrobenzoxy)-benzylideneamino]-4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazol-5-ones (**3**) were synthesized from the reactions of 3-alkyl-4-amino-4,5-dihydro-1*H*-1,2,4-triazol-5-ones (**1**) with 3-methoxy-4-(*p*-nitrobenzoxy)-benzaldehyde (**2**), which was synthesized by the reaction of 3-methoxy-4-hydroxybenzaldehyde with *p*-nitrobenzoyl chloride by using triethylamine. The structures of novel compounds were established from IR, ¹H NMR and ¹³C NMR spectral data. In addition, *in vitro* antibacterial capacities of the new compounds were determined against six bacteria by means of agar well diffusion method. Furthermore, newly synthesized compounds antioxidant capacities were performed by three different methods.

© Afyon Kocatepe Üniversitesi.

1. Giriş

Yapısında 1,2,4-triazol halkası içeren bileşiklerin biyolojik aktiviteleri ve kullanım alanlarını içeren çok sayıda çalışma rapor edilmiştir (Ahmad *et al.* 2017, Malbec *et al.* 1984, Amir *et al.* 2008, Eswaran *et al.* 2009, Shaker *et al.* 2005, Salgın-Gökşen vd. 2007). Aminotriazol bileşiklerinin aromatik aldehitlerle reaksiyonlarından elde edilen birçok imin tipi Schiff

bazılarının biyolojik aktiviteleri incelenmiştir (Aktaş-Yokuş vd. 2015, Çiftçi vd. 2018, Demirbaş vd. 2002, Yüksek vd. 1997, Yüksek vd. 2013, Sztanke *et al.* 2008).

Vücudun antioksidan savunma sistemi ve hücrelerde lipid katmanlarının peroksidasyonuna sebep olan serbest radikallerin üretimi arasındaki dengenin bozulması, oksidatif stres olarak tanımlanmaktadır Mercan (2004). Organizmaların oksidatif etkiden

korunmasındaki önemleri nedeniyle yeni antioksidan bileşiklerin sentezi giderek önem kazanmaktadır. Nitekim, 1,2,4-triazol türevlerinin antioksidan etkileri de araştırılmıştır (Gürsoy-Kol vd.2013, Manap vd. 2020, Yüksek vd. 2015).

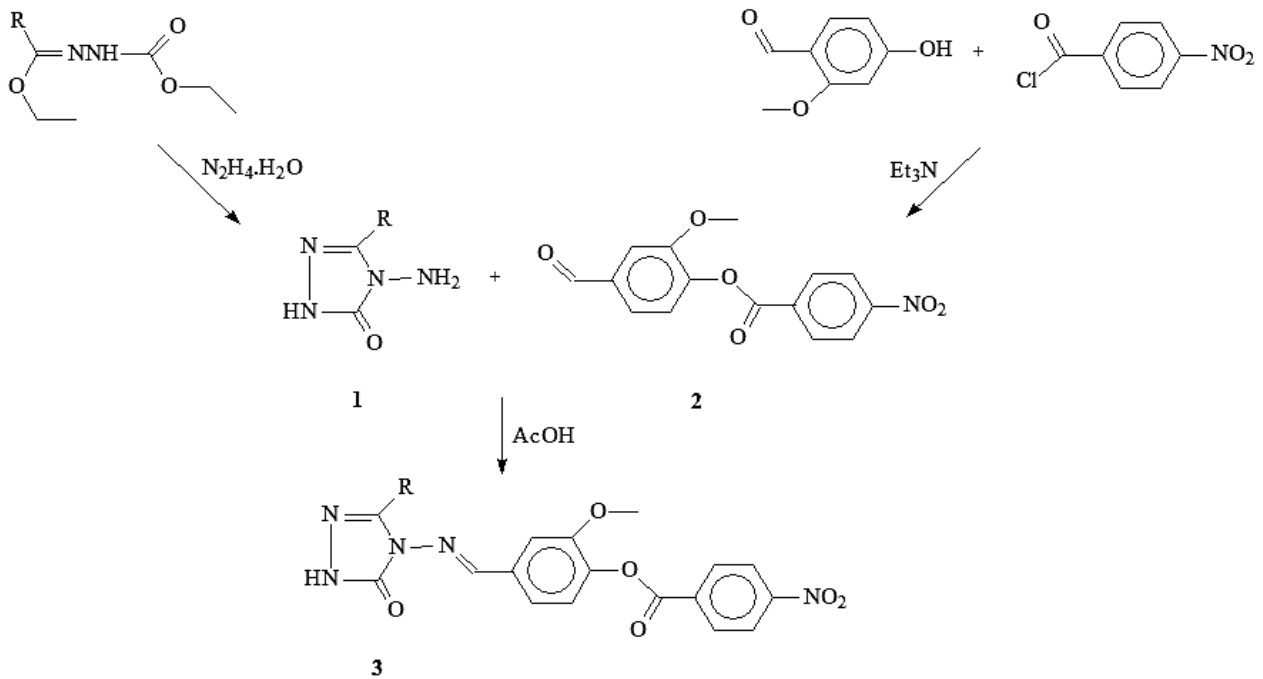
Bu çalışma kapsamında, antioksidan ve antimikrobiyal özelliklerini incelemek amacıyla dokuz yeni bileşik 3-alkil-4-[3-metoksi-4-(*p*-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (**3**) bileşiği sentezlenmiştir. Bu amaçla, bilinen yöntemler (İkizler ve Ün 1979, İkizler ve Yüksek 1993) uygulanarak **1** türevi bileşikler elde edilmiştir.

Daha sonra, **1** tipi bileşiklerin, 3-metoksi-4-hidroksi-benzaldehyd ve *p*-nitrobenzoil klorür ile reaksiyonu sonucu elde edilen 3-metoksi-4-(*p*-nitrobenzoksi)-

benzaldehyd (**2**) ile muamelesinden çalışma için gerekli **3** tipi bileşikler elde edilmiş (Şema 1), yapıları spektrokopik yöntemlerle tanımlanmıştır.

Sentezlenen **3** tipi bileşiklerin antioksidan incelemeleri; Blois metoduna göre Blois (1958) radikal giderme aktivitesi, Oyaizu metoduna göre Oyaizu (1986) indirgeme gücü ve Dinis metoduna göre (Dinis *et al.* 1994) metal şelat aktivite testleri yapılmıştır.

Çalışmada son olarak **3** tipi bileşiklerin antimikrobiyal özellikleri altı bakteriye (Gram negatif *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia* ve *Escherichia coli*, Gram pozitif *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* ve *Staphylococcus aureus*) karşı agar kuyucuk yöntemi ile incelenmiş, sonuçlar uygun antibiyotikler kullanılarak değerlendirilmiştir (Perez *et al.* 1990)



- a) R = CH₃, b) R = CH₂CH₃, c) R = CH₂CH₂CH₃, d) R = CH₂C₆H₅, e) R = CH₂C₆H₄CH₃ (*p*-), f) R = CH₂C₆H₄OCH₃ (*p*-), g) R = CH₂C₆H₄Cl (*p*-), h) R = CH₂C₆H₄Cl (*m*-), i) R = C₆H₅

Şema 1. 1-3 Bileşiklerinin sentezi

2. Materyal ve Metot

Çalışma için gerekli kimyasallar Merck AG'den sağlanmıştır. Erime noktaları tayininde Stuart SMP30 erime noktası aparatı kullanılmıştır. IR spektrumları Alfa-P Bruker FT-IR

spektrofotometresi, ¹H ve ¹³C NMR spektrum verileri, Bruker Avance III spektrofotometresi ile kaydedilmiştir.

2.1 Sentez

Genel Yöntem: 3-Alkil-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-onların (3) Sentezi

3-Metoksi-4-hidroksibenzaldehidin (0.01 mol) etil asetatteki çözeltisine *p*-nitrobenzoilklorür (0.01 mol) eklenmiş ve karıştırılarak çözeltiye soğukta trietilaminin (0.01 mol) 10 mL etil asetatteki çözeltisi ilave edilmiş ve 2 saat daha karıştırılmıştır. Sonra karışım 3 saat reflaks edilerek süzümüştür. Süzüntü buharlaştırılmış, kalıntı su ile yıkanmış ve kristallendirmesi etanolde yapılarak **2** bileşiği olarak tanımlanmıştır. Verim: 93.0%; e.n. 186°C; IR (ν , cm^{-1}): 2849 ve 2754 (CHO), 1743, 1698 (C=O), 1265 (COO), 814 (1,4-disubstitue benzenoid halka). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) (ppm) δ H: 3.88 (s, 3H, OCH₃), 7.59 (d, 1H, ArH, $J = 8.0$ Hz), 7.66 (dd, 1H, ArH, $J = 8.0, 1.6$ Hz), 8.23 (d, 1H, ArH, $J = 1.6$ Hz), 8.38 (d, 2H, ArH, $J = 8.8$ Hz), 8.43 (d, 2H, ArH, $J = 8.8$ Hz), 10.02 (s, 1H, CHO); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) (ppm) δ C: 56.23 (OCH₃), [112.20, 123.56, 123.77, 124.15 (2C), 131.41 (2C), 133.60, 135.54, 143.86, 150.80, 151.45] (ArC), 162.19 (COO), 192.03 (CHO). Sonra, **1** bileşiği (0.01 mol) etanoik asitte (20 mL) çözülerek üzerine 3-metoksi-4-(*p*-nitrobenzoksi)-benzaldehyd (**2**) (0.01 mol) eklenmiştir. Balon içeriği 1.5 saat reflaks edilmiş ve su ilavesiyle çöktürülerek süzülüp kurutulmuştur. Kalıntı etanoik asit-su (1:3) dan kristallendirilmiştir.

3-Metil-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (3a)

Verim: 80.0%, e.n. 237°C. IR (ν , cm^{-1}): 3152 (NH), 1741, 1707 (C=O), 1606, 1582 (C=N), 1521 and 1349 (NO₂), 1263 (COO), 798 (1,4-disubstitue benzenoid halka). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) (ppm) δ H: 2.31 (s, 3H, CH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 7.45 (d, 1H, ArH, $J = 8.0$ Hz), 7.54 (dd, 1H, ArH, $J = 8.0, 1.6$ Hz), 7.66 (d, 1H, ArH, $J = 1.6$ Hz), 8.37 (d, 2H, ArH, $J = 8.8$ Hz), 8.43 (d, 2H, ArH, $J = 8.8$ Hz), 9.77 (s, 1H, N=CH), 11.85 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) (ppm) δ C: 11.07 (CH₃), 56.12 (OCH₃), [111.67, 120.51, 123.48, 124.12 (2C), 131.37 (2C), 133.02, 133.79, 141.38, 150.75, 151.22] (ArC), 144.30 (Triazol C₃), 151.14 (Triazol C₅), 152.80 (N=CH), 162.39 (COO).

3-Etil-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (3b)

Verim 73.0%, e.n. 265°C. IR (ν , cm^{-1}): 3111 (NH), 1743, 1700 (C=O), 1599 (C=N), 1524 and 1347 (NO₂), 1263 (COO), 815 (1,4-disubstitue benzenoid halka). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) (ppm) δ H: 1.23 (t, 3H, CH₂CH₃, $J = 7.2$ Hz), 2.72 (q, 2H, CH₂CH₃, $J = 7.2$ Hz), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 7.46 (d, 1H, ArH, $J = 8.0$ Hz), 7.59 (d, 1H, ArH, $J = 8.0$ Hz), 7.66 (s, 1H, ArH), 8.38 (d, 2H, ArH, $J = 8.4$ Hz), 8.43 (d, 2H, ArH, $J = 8.4$ Hz), 9.76 (s, 1H, N=CH), 11.87 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) (ppm) δ C: 10.00 (CH₂CH₃), 18.49 (CH₂CH₃), 56.24 (OCH₃), [112.20, 120.50, 123.79, 124.16 (2C), 131.43 (2C), 133.00, 133.80, 141.40, 150.80, 151.45] (ArC), 144.60 (Triazol C₃), 151.25 (Triazol C₅), 152.80 (N=CH), 162.40 (COO).

3-(*n*-Propil)-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (3c)

Verim 72.6%, e.n. 213°C. IR (ν , cm^{-1}): 3188 (NH), 1743, 1700 (C=O), 1598 (C=N), 1528 and 1347 (NO₂), 1260 (COO), 815 (1,4-disubstitue benzenoid halka). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) (ppm) δ H: 0.97 (t, 3H, CH₂CH₂CH₃, $J = 7.2$ Hz), 1.71 (sext, 2H, CH₂CH₂CH₃, $J = 7.2$ Hz), 2.68 (t, 2H, CH₂CH₂CH₃, $J = 7.2$ Hz), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 7.46 (d, 1H, ArH, $J = 8.4$ Hz), 7.54 (d, 1H, ArH, $J = 8.0$ Hz), 7.66 (s, 1H, ArH), 8.38 (d, 2H, ArH, $J = 8.4$ Hz), 8.43 (d, 2H, ArH, $J = 8.4$ Hz), 9.76 (s, 1H, N=CH), 11.88 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) (ppm) δ C: 13.48 (CH₂CH₂CH₃), 18.97 (CH₂CH₂CH₃), 26.70 (CH₂CH₂CH₃), 56.08 (OCH₃), [111.75, 120.34, 123.53, 124.13 (2C), 131.38 (2C), 133.06, 133.78, 141.36, 150.75, 151.29] (ArC), 146.97 (Triazol C₃), 151.13 (Triazol C₅), 152.78 (N=CH), 162.40 (COO).

3-Benzil-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (3d)

Verim 75.3%, e.n. 210°C. IR (ν , cm^{-1}): 3163 (NH), 1741, 1704 (C=O), 1607, 1579 (C=N), 1529 and 1346 (NO₂), 1263 (COO), 814 (1,4-disubstitue benzenoid halka), 760 ve 701 (monosubstitue benzenoid halka). ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) (ppm) δ H:

3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.09 (s, 2H, CH₂Ph), 7.21-7.25 (m, 1H, ArH), 7.30-7.36 (m, 4H, ArH), 7.43-7.48 (m, 2H, ArH), 7.58 (s, 1H, ArH), 8.37 (d, 2H, ArH, *J* = 8.8 Hz), 8.43 (d, 2H, ArH, *J* = 8.8 Hz), 9.75 (s, 1H, N=CH), 12.01 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) (ppm) δ C: 31.21 (CH₂Ph), 56.09 (OCH₃), [110.94, 121.04, 123.47, 124.13 (2C), 131.37 (2C), 133.00, 133.78, 141.41, 150.76, 151.21] (ArC), [126.71, 128.25 (2C), 128.70 (2C), 135.88] (C₃-ArC), 144.22 (Triazol C₃), 151.11 (Triazol C₅), 152.26 (N=CH), 162.39 (COO).

3-(p-metilbenzil)-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (3e)

Verim 99.3%, e.n. 212°C. IR (*ν*, cm⁻¹): 3112 (NH), 1739, 1697 (C=O), 1602, 1579 (C=N), 1525 and 1347 (NO₂), 1263 (COO), 806 (1,4-disubstitue benzenoid halka). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) (ppm) δ H: 2.25 (s, 3H, PhCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 4.03 (s, 2H, CH₂Ph), 7.12 (d, 2H, ArH, *J* = 8.0 Hz), 7.23 (d, 2H, ArH, *J* = 8.0 Hz), 7.43 (d, 1H, ArH, *J* = 8.0 Hz), 7.47 (d, 1H, ArH, *J* = 8.0 Hz), 7.58 (s, 1H, ArH), 8.37 (d, 2H, ArH, *J* = 8.8 Hz), 8.43 (d, 2H, ArH, *J* = 8.8 Hz), 9.71 (s, 1H, N=CH), 12.00 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) (ppm) δ C: 20.56 (PhCH₃), 30.83 (CH₂Ph), 56.05 (OCH₃), [110.89, 121.05, 123.45, 124.11 (2C), 131.36 (2C), 133.02, 133.77, 141.40, 150.74, 151.22] (ArC), [128.57 (2C), 129.01 (2C), 132.75, 135.78] (C₃-ArC), 146.37 (Triazol C₃), 151.10 (Triazol C₅), 152.16 (N=CH), 162.39 (COO).

3-(p-Metoksibenzil)-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (3f)

Verim 90.9%, e.n. 204°C. IR (*ν*, cm⁻¹): 3216 (NH), 1743, 1720 (C=O), 1603 (C=N), 1512 and 1349 (NO₂), 1252 (COO), 808 (1,4-disubstitue benzenoid halka). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) (ppm) δ H: 3.70 (s, 3H, OCH₃-*p*), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 4.01 (s, 2H, CH₂Ph), 6.88 (d, 2H, ArH, *J* = 8.8 Hz), 7.26 (d, 2H, ArH, *J* = 8.8 Hz), 7.44 (d, 1H, ArH, *J* = 8.0 Hz), 7.49 (dd, 1H, ArH, *J* = 8.0, 1.6 Hz), 7.60 (d, 1H, ArH, *J* = 1.6 Hz), 8.37 (d, 2H, ArH, *J* = 8.8 Hz), 8.43 (d, 2H, ArH, *J* = 8.8 Hz), 9.72 (s, 1H, N=CH), 11.98 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) (ppm) δ C: 30.34 (CH₂Ph), 55.01 (OCH₃-*p*), 56.09 (OCH₃), [111.00, 121.00, 123.48, 124.13 (2C), 131.37 (2C), 133.02, 133.78, 141.40, 150.73, 151.23]

(ArC), [113.89 (2C), 127.63, 129.77 (2C), 158.10] (C₃-ArC), 146.53 (Triazol C₃), 151.12 (Triazol C₅), 152.26 (N=CH), 162.40 (COO).

3-(p-Klorobenzil)-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (3g)

Verim 71.4%, e.n. 215°C. IR (*ν*, cm⁻¹): 3215 (NH), 1739, 1715 (C=O), 1606, 1580 (C=N), 1527 and 1345 (NO₂), 1265 (COO), 801 (1,4-disubstitue benzenoid halka). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) (ppm) δ H: 3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.11 (s, 2H, CH₂Ph), 7.38 (m, 4H, ArH), 7.43-7.46 (m, 2H, ArH), 7.57 (s, 1H, ArH), 8.37 (d, 2H, ArH, *J* = 8.4 Hz), 8.43 (d, 2H, ArH, *J* = 8.0 Hz), 9.72 (s, 1H, N=CH), 12.04 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) (ppm) δ C: 30.51 (CH₂Ph), 56.10 (OCH₃), [111.00, 121.03, 123.49, 124.13 (2C), 131.37 (2C), 132.94, 133.77, 141.44, 150.76, 151.20] (ArC), [128.40 (2C), 130.64 (2C), 131.42, 134.88] (C₃-ArC), 145.89 (Triazol C₃), 151.12 (Triazol C₅), 152.40 (N=CH), 162.39 (COO).

3-(m-Klorobenzil)-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (3h)

Verim 86.5%, e.n. 238°C. IR (*ν*, cm⁻¹): 3218 (NH), 1732, 1701 (C=O), 1594 (C=N), 1526 and 1348 (NO₂), 1263 (COO), 812 (1,4-disubstitue benzenoid halka), 893 ve 781 (1,3-disubstitue benzenoid halka). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) (ppm) δ H: 3.86 (s, 3H, OCH₃), 4.13 (s, 2H, CH₂Ph), 7.29-7.36 (m, 3H, ArH), 7.43-7.49 (m, 3H, ArH), 7.60 (d, 1H, ArH, *J* = 1.2 Hz), 8.37 (d, 2H, ArH, *J* = 8.8 Hz), 8.43 (d, 2H, ArH, *J* = 8.8 Hz), 9.72 (s, 1H, N=CH), 12.04 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) (ppm) δ C: 30.75 (CH₂Ph), 56.10 (OCH₃), [110.93, 121.11, 123.48, 124.13 (2C), 131.38 (2C), 132.97, 133.78, 141.46, 150.76, 151.14] (ArC), [126.76, 127.49, 128.78, 130.29, 132.93, 138.32] (C₃-ArC), 145.71 (Triazol C₃), 151.14 (Triazol C₅), 152.41 (N=CH), 162.39 (COO).

3-Fenil-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (3i)

Verim 74.1%, e.n. 232°C. IR (*ν*, cm⁻¹): 3289 (NH), 1740, 1720 (C=O), 1605, 1586 (C=N), 1523 and 1347 (NO₂), 1266 (COO),), 805 (1,4-disubstitue benzenoid

halka), 762 ve 688 (monosubstitue benzenoid halka). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) (ppm) δ H: 3.84 (s, 3H, OCH₃), 7.46-7.56 (m, 5H, ArH), 7.65 (s, 1H, ArH), 7.93-7.95 (m, 2H, ArH), 8.37 (d, 2H, ArH, J = 8.8 Hz), 8.43 (d, 2H, ArH, J = 8.8 Hz), 9.73 (s, 1H, N=CH), 12.42 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) (ppm) δ C: 56.00 (OCH₃), [111.52, 120.87 123.59, 124.12 (2C), 131.37 (2C), 132.89, 133.75, 141.55, 150.74, 151.32] (ArC), [126.59, 128.01 (2C), 128.48 (2C), 130.13] (C₃-ArC), 144.57 (Triazol C₃), 151.15 (Triazol C₅), 155.09 (N=CH), 162.39 (COO).

2.2 Bileşiklerinin antioksidan özellikleri

2.2.1. İndirgeme gücü tayin edilmesi

3 Tipi bileşiklerin indirgeme gücünün tayini Oyaizu metoduna Oyaizu (1986) göre literatürde açıklandığı (Gürsoy-Kol vd. 2016) şekilde incelenmiştir.

2.2.2. Serbest radikal giderme aktivite tayini

3 Tipi bileşiklerin serbest radikal giderme potansiyellerinin tayini DPPH kullanılarak Blois yöntemine Blois (1998) göre literatürde belirtildiği (Gürsoy-Kol vd. 2016) şekilde yapılmıştır.

2.2.3. Metal şelatlama aktivitesinin tayini

Metal şelat aktivite tayini Dinis yöntemine göre (Dinis et al. 1994) literatürde uygulanan yöntem doğrultusunda (Gürsoy-Kol vd, 2016) belirlenmiştir.

2.3 Yeni bileşiklerin antimikrobiyal özelliklerinin incelenmesi

Sentezi yapılan yeni bileşiklerin *P. aeruginosa* (ATCC-27853), *K. pneumoniae* (ATCC-4352), *E. coli* (ATCC-25922) *B. subtilis* (ATCC-11774), *B. cereus* (ATCC-11778) ve *S. aureus* (ATCC-6538) suşlarına olan etkinlikleri değerlendirilmiştir. Referans antibiyotikler olarak Ampicillin (X3261), Neomycin (X3360) ve Streptomycin (X3385) kullanılmıştır.

Antimikrobiyal aktivite incelenmelerinde agar kuyucuk difüzyon metodu kullanılmıştır (Lu et al. 2021, Zhao et al. 2021).

3 Tipi bileşiklerinin *in vitro* antibakteriyal aktiviteleri verilen referansda (Manap vd. 2020) açıklandığı şekilde uygulanmıştır.

3. Bulgular ve Tartışma

Bu çalışmada, 1 tipi bileşiklerinin 3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzaldehyd (2) ile reaksiyonundan 3-alkil-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (3) bileşikleri sentezlenmiş ve karakterizasyonları spektroskopik yöntemlerle belirlenmiştir.

3.1. Antioksidan aktivite incelemeleri

Yeni bileşiklerin antioksidan özellikleri incelenerek sonuçların değerlendirilmesi aşağıda verilmiştir:

3.1.1. İndirgeme gücü

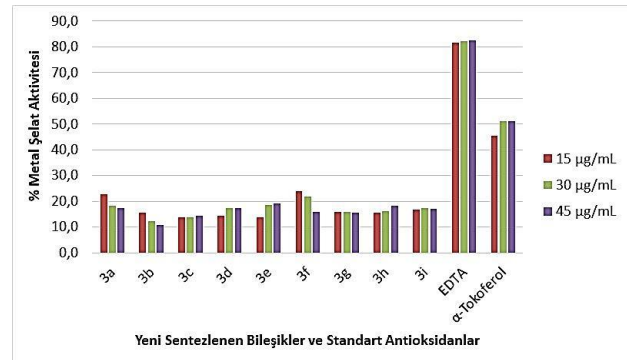
Sentezi yapılan bileşiklerin 700 nm de ölçülen indirgeme gücü testlerinden ele geçen bulgular sonucunda, sentezlenen bileşiklerin absorpsiyon değerlerinin, referans antioksidanlara (BHT, BHA ve α-tokoferol) kıyasla çok daha düşük olduğu görülmüştür.

3.1.2. Serbest radikal giderme aktivitesi

Yeni 3 tipi bileşiklerin 517 nm'de farklı derişimlerde yapılan radikal giderme aktivite testleri sonucunda bileşiklerin radikal giderici özelliğe sahip olmadıkları görülmüştür.

3.1.3. Metal şelat aktivitesi

Yapılan metal şelatlama aktivite testlerinin sonuçları, 3 tipi bileşikler, EDTA ve α-tokoferol referans antioksidanları için Şekil 1'de % inhibisyon olarak gösterilmektedir. Grafikte 3c-e ve 3h bileşiklerinin anlamlı olarak konsantrasyonun artmasıyla metal şelatlama aktivitelerinin de arttığı görülmektedir, ancak yine de bahsi geçen bileşikler etkin şelatörler değildir.



Şekil 1. 3 Tipi bileşiklerin ve referans antioksidanların farklı konsantrasyonlardaki metal şelat aktiviteleri

3.2. Antimikrobiyal aktivite incelemeleri

Bu çalışmada elde edilen dokuz yeni bileşiğin antimikrobiyal özellikleri agar kuyucuk metodu ile incelenmiştir. Bileşiklerin *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC-4352), *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Bacillus subtilis* (ATCC-11774), *Bacillus cereus* (ATCC-11778), *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538), suşlarına karşı aktiviteleri değerlendirilmiştir. Referans antibiyotikler olarak Ampicillin (X3261), Neomycin (X3360) ve Streptomycin (X3385) kullanılmıştır. Sonuç olarak dokuz adet yeni bileşiğin altı farklı mikroorganizma ile testleri yapılmış ve aşağıdaki tabloda antimikrobiyal aktivitelerine ilişkin zon çapları verilmiştir.

Çizelge 1. 3 Tipi bileşiklerin bakterilere karşılık gelen zon çap değerleri

Bileşik no	ZON çap değerleri (mm)					
	Bs	Bc	Pa	Kp	Sa	Ec
3a	14	13	9	12	12	10
3b	16	16	11	14	14	11
3c	10	9	11	19	16	9
3d	10	13	-	11	11	9
3e	10	9	12	12	12	10
3f	13	15	9	13	10	-
3g	14	10	11	10	14	10
3h	15	13	13	9	13	9
3i	11	11	-	10	10	9
Amp.	33	36	36	35	37	34
Neo.	17	17	17	16	13	16
Str.	12	12	12	11	21	10

İnhibisyon zonu: (-): <5.5 mm; (+): 5.5-10 mm; (++) : 11-16 mm; (+++): ≥17 mm

Pa: *Pseudomonas aeruginosa*, Kp: *Klebsiella pneumoniae*, Ec: *Escherichia coli*, Bs: *Bacillus subtilis*, Bc: *Bacillus cereus*, Sa: *Staphylococcus aureus*, Amp.: Ampicillin, Neo.: Neomycin, Str.: Streptomycin.

Bacillus subtilis'a karşı **3a**, **3b**, **3f-i** bileşikleri ılımlı aktivite; *Bacillus cereus*'a karşı **3a**, **3b**, **3d**, **3f**, **3h**, **3i** bileşikleri ılımlı aktivite; *Pseudomonas aeruginosa*'a karşı **3b**, **3c**, **3e**, **3g**, **3h** ılımlı aktivite; *Klebsiella pneumoniae*'a karşı **3c** bileşiği iyi aktivite, **3a**, **3b**, **3d-f** bileşikleri ılımlı aktivite; *Staphylococcus aureus*'a karşı **3a-3e**, **3g**, **3h** bileşikleri ılımlı aktivite ve son olarak *Escherichia coli*'ye karşı **3b** bileşiği ılımlı aktivite göstermiştir. *Pseudomonas aeruginosa*'a karşı **3d**, **3i** bileşikleri ve *Escherichia coli*'ye karşı **3f** bileşiği hiç aktivite göstermemiştir. Diğer bileşikler

ise belirtilen bakterilere karşı düşük aktivite göstermiştir.

4. Sonuç

Bu çalışmada, yeni 3-alkil-4-[3-metoksi-4-(p-nitrobenzoksi)-benzilidenamino]-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-on (**3**) bileşikleri sentezlenmiş ve spektral yöntemler kullanılarak karakterize edilmiştir. Ayrıca, 3 tipi bileşiklerin üç farklı yöntemle *in vitro* antioksidan özellikleri incelenerek düşük aktivite gösterdikleri görülmüştür. Son olarak sentezlenen **3** tipi bileşiklerin 6 farklı bakteriye karşı antimikrobiyal aktiviteleri agar kuyucuk yöntemi ile incelenmiş, bulunan sonuçlar Ampicillin, Neomycin ve Streptomycin antibiyotiklerinin sonuçları ile mukayese edilerek genelde ılımlı aktivite gösterdikleri değerlendirilmiştir.

5. Kaynaklar

- Ahmad, A., Varshney, H., Rauf, A., Sherwani, A. and Owais, M., 2017. Synthesis and anticancer activity of long chain substituted 1,3,4-oxadiazol-2-thione,1,2,4-triazol-3-thione and 1,2,4-triazolo [3,4-b]-1,3,4-thiadiazine derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, **10**, S3347-S3357.
- Amir, M., Kumar, H. and Javed, S.A., 2008. Condensed bridgehead nitrogen heterocyclic system: Synthesis and pharmacological activities of 1,2,4-triazolo-[3,4-b]-1,3,4-thiadiazole derivatives of ibuprofen and biphenyl-4-yloxy acetic acid. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **43**(10), 2056-2066.
- Aktaş-Yokuş, Ö., Yüksek, H., Gürsoy-Kol, Ö. and Alpay-Karaoğlu, S., 2015. Synthesis and biological evaluation of new 1,2,4-triazol derivatives with their potentiometric titrations. *Medicinal Chemistry Research*, **24**, 2813–2824.
- Blois, M., 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, **181**, 1199-1200.
- Çiftçi, E., Beytur, M., Calapoğlu, M., Gürsoy Kol, Ö., Alkan, M., Toğay, V.A., Manap, S. and Yüksek, H., 2018. Synthesis, characterization, antioxidant and antimicrobial activities and DNA damage of some novel 2-[3-alkyl (aryl)-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-one-4-yl]-phenoxyacetic acids in Human Lymphocytes. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, **9**(5), 1760-1771.
- Demirbas, N., Ugurluoglu, R. and Demirbas, A., 2002. Synthesis of 3-alkyl(Aryl)-4-alkylidenamino-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-ones and 3-alkyl-4-

- alkylamino-4,5-dihidro-1H-1,2,4-triazol-5-ones as antitumor agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, **10(12)**, 3717-3723.
- Dinis, T.C.P., Madeira, V.M.C. and Almeida, L.M., 1994. Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **315(1)**, 161-169.
- Eswaran, S., Adhikari, A.V. and Shetty, N.S., 2009. Synthesis and antimicrobial activities of novel quinoline derivatives carrying 1,2,4-triazole moiety. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **44(11)**, 4637-4647.
- Gürsoy-Kol, O., Yuksek, H. and Islamoglu, F., 2013. Synthesis and in vitro antioxidant activities of novel 4-(3-methyl-2-thienylmethyleneamino)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives with their acidic properties. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, **35(4)**, 1179-1190.
- Gürsoy-Kol, Ö., Yuksek, H., Manap, S. and Tokalı, F. S., 2016. Synthesis, characterization, and antioxidant activities of novel 1-(morpholine-4-yl-methyl)-3-alkyl(aryl)-4-[4-(dimethylamino)-benzilidenamino]-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones. *JOTCSA, Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, **3(3)**, 105-120.
- İkizler, A.A. and Ün, R., 1979. Reactions of ester ethoxycarbonylhydrazones with some amine type compounds. *Chimica Acta Turcica*, **7**, 269-290.
- İkizler, A. and Yuksek, H., 1993. Acetylation of 4-amino-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones. *Organic Preparations and Procedures International*, **25(1)**, 99-105.
- Lu, L., Li, Z., Shan, C., Ma, S., Nie, W., Wang, H., Chen, G., Li, S. and Shu, C., 2021. Whole transcriptome analysis of schinifoline treatment in *Caenorhabditis elegans* infected with *Candida albicans*. *Molecular Immunology*, **135**, 312-319.
- Malbec, F., Milcent, R., Vicart, P. and Bure, A.M., 1984. Synthesis of new derivatives of 4-amino-2,4-dihydro-1,2,4-triazol-3-one as potential antibacterial agents. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, **21(6)**, 1769-1774.
- Manap, S., Gürsoy-Kol, Ö., Alkan, M. and Yuksek, H., 2020. Synthesis, *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of some novel 3-substitued-4-(3-methoxy-4-isobutyryloxy-benzilideneamino)-4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives. *Indian Journal of Chemistry -Section B*, **59B(02)**, 271-282.
- Mercan, U., 2004. Toksikolojide Serbest Radikallerin Önemi. *Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, **15**, 91-96.
- Oyaizu, M., (1986). Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, **44(17)**, 307-315.
- Perez, C., Pauli, M. and Bazerque, P., 1990. An antibiotic assay by the well agar method. *Acta Biologia et Medicine Experimentals*, **15**, 113-115.
- Salgin-Goksen, U., Gokhan-Kelekci, N., Goktas, O., Köysal, Y., Kılıç, A., Işık, Ş., Aktay, G. and Özalp, M., 2007. 1-Acylthiosemicarbazides, 1,2,4-triazole-5(4H)-thiones, 1,3,4-thiadiazoles and hydrazones containing 5-methyl-2-benzoxazolinones: synthesis, analgesic-anti-inflammatory and antimicrobial activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **15(17)**, 5738-5751.
- Shaker, R.M., Mahmoud, A.F. and Abdel-Latif, F.F., 2005. Synthesis and biological activities of novel 1,4-bridged bis-1,2,4-triazoles, bis-1,3,4-thiadiazoles and bis-1,3,4-oxadiazoles. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, **180(2)**, 397-406.
- Sztanke, K., Tuzimski, T., Rzymowska, J., Pasternak, K. and Kandefers-Szerszen, M., 2008. Synthesis, determination of the lipophilicity, anticancer and antimicrobial properties of some fused 1,2,4-triazole derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **43(2)**, 404-419.
- Yüksek, H., Demirbaş, A., İkizler, A., Johansson, C.B., Çelik, C. and İkizler, A.A., 1997. Synthesis and antibacterial activities of some 4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-ones. *Arzneimittel Forschung-Drug Research*, **47**, 405-409.
- Yüksek, H., Akyıldırım, O., Yola, M.L., Gürsoy-Kol, Ö., Çelebier, M., Kart, D. (2013). Synthesis, *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of some new 4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives. *Archiv Der Pharmazie*, **346(6)**, 470-480.
- Yüksek, H., Koca, E., Gürsoy-Kol, Ö., Akyıldırım, O. and Çelebier, M., 2015. Synthesis, *in vitro* antioxidant activity, and physicochemical properties of novel 4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one derivatives. *Journal of Molecular Liquids*, **206**, 359-366.
- Zhao, W., Wang, X., Zhao, C. and Yan, Z., 2021. Immunomodulatory mechanism of *Bacillus subtilis* R0179 in RAW 264.7 cells against *Candida albicans* challenge. *Microbial Pathogenesis*, **157**, 104988.