

Bilimsel Araştırmalar

5-Nitro-2-(p-Sübstitüefenil)
Benzoksazol Türevlerinin Sentez,
Yapı Açıklamaları ve Mikrobiyolojik
Etkileri - III

Seçkin ÖZDEN(*)
Tuncel ÖZDEN(*)
Esin ŞENER(*)
İsmail YALÇIN(*)
Ahmet AKIN(**)
Sulhiye YILDIZ(**)

Özet : Bu çalışmada, antibakteriyel ve antifungal etkileri araştırılmak üzere, 5. konumunda nitro grubu taşıyan toplam 6 adet 2-(p-sübstitüefenil) benzoksazol türevi sentezlenmiştir. Bileşiklerin sentezleri, 2-amino-4-nitrofenol ve ilgili p-sübstitüebenzoik asitlerin, polifosforik asit varlığında ısıtılması ile gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen bileşiklerin saflıkları, İ.T.K. ile kontrol edildikten sonra, erime dereceleri saptanmış ve yapıları UV, IR, NMR ve Elementel Analiz metodları ile açıklanmıştır.

Sentezlenen bileşiklerin, gram (+) bakterilerden Staphylococcus aureus, Streptococcus faecalis'e karşı, gram (—) bakterilerden Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae ve Pseudomonas aeruginosa'ya karşı antibakteriyel ve Candida albicans'a karşı ise antifungal etkileri, minimum inhibisyonlarının konsantrasyonları (MİK) şeklinde belirlendi.

(*) A.Ü. Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Tandoğan, Ankara.

(**) A.Ü. Eczacılık Fakültesi, Mikrobiyoloji Bilim Dalı, Tandoğan, Ankara.

Türevleri içinde en etkili olarak VI nolu bileşik olan 5-nitro-2-(p-bromofenil) benzoksazol bulunmuştur. Bu bileşik özellikle gram (+) bakterilerinden *S. aureus* ve gram (—) bakterilerden *K. pneumoniae*'ya karşı, MİK : 6.2 µg/ml olarak en yüksek antibakteriyel etkiyi göstermiştir.

**THE SYNTHESIS, STRUCTURE ELUCIDATION AND
MICROBIOLOGICAL ACTIVITIES OF 5-NITRO-2-
(p-SUBSTITUTEDPHENYL) BENZOXAZOLES - III**

Summary : In this research, totally 6 compounds which were 2-(p-substitutedphenyl) benzoxazole derivatives, having nitro group at the fifth position were prepared and the antibacterial, antifungal activities were studied. These compounds were synthesized by condensing 2-amino-4-nitrophenol with appropriate carboxylic acids in the presence of polyphosphoric acid.

The purity of these compounds were controlled by T.L.C. and the melting points were determined. Chemical structures of these compounds were elucidated by using UV, IR, NMR and Elemental Analysis methods.

The minimum inhibitory concentration (MIC) activities of the compounds against bacteria *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus feacalis* (gram (+)), *Escherichia coli*, *Klepsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* (gram (—)) and the fungi *Candida albicans* were tested.

The compound VI, 5-nitro-2-(p-bromophenyl) benzoxazole, showed the best activity, especially against *S. aureus* and *K. pneumoniae* in a concentration of MIC : 6.2 µ/ml.

KEYWORDS : 5-Nitro-2-(p-bromophenyl) benzoxazole, UV, IR, NMR, Elemental Analysis Methods, Microbiological Activity.

GİRİŞ

Önceki çalışmalarımızda, kantitatif etkiye olan katkılarını inceleyebilmek amacıyla 2. konumlarında sübstitüent taşıyan benzoksazol türevleri sentezlenerek, antibakteriyel etkileri incelenmiştir (1).

Bu çalışmada ise 5. konumda, elektron çekici özellikteki nitro

grubu taşıyan 2-p-sübstitüefenil benzoksazol türevlerinin sentezleri planlanmıştır.

Bugüne kadar bu bileşiklerin antibakteriyel etkileri konusunda hiçbir araştırma bulunmamaktadır. Bu nedenle, bu bileşikler de daha önceki çalışmamızda ele alınan (1), gram (+), gram (—) bak-

terilere ve *Candia albicans*'a karşı aktivitelerinin saptanması düşünülmüştür.

GEREÇ VE YÖNTEMLER

Kimyasal Bileşikler :

Sentez başlangıç bileşikleri ve çözücüler, Merck, Aldrich, Riedel ve Ega teknik ve analitik özellikteki arı bileşiklerdir.

Aletsel analiz çalışmalarında spektrofotometrik saflıkta KBr (Merck) ve metanol (Aldrich), trifloroasetik asit (Merck), kromatografik çalışmalarda adsorban olarak Kieselgel HF₂₅₄ kullanılmıştır.

Elektronik Cihazlar :

Aletsel analiz çalışmalarında Erime Derecesi Tayin Cihazı (Mettler FP-5 ve FP-51), Infrared Spektrofotometresi (Pye Unicam SP 1025), Ultraviyole Spektrofotometresi (Pye Unicam SP 1700), Nükleer Magnetik Rezonans Spektrometresi (Perkin Elmer R 32) ve Elementel Analiz Cihazı (Perkin Elmer Model 240-C) kullanılmıştır.

5-Nitro-2-(p-süstitüefenil) benzok-sazol Halka Sisteminin Oluşturulması :

0.01 mol 2-amino-4-nitrofenol ile 0.02 mol p-süstitübenzoik asit, 13 g polifosforik asit içinde, yağ banyosunda, geri çeviren soğutucu altında karıştırılarak ısıtıldı. Uygulanan ısı ve süreler, her bileşik için ayrı ayrı, bulgular kısmında Tablo 1 de verilmiştir. Bu sürelerin so-

nunda oluşan ürün buzlu suya dökülerek, alkali reaksiyon verinceye kadar ortama % 10 luk NaOH çözeltisi ilave edildi. Alkali çözelti 3 kez benzen ile ekstre edildi. Benzenli tabakalar birleştirildi ve distile su ile yıkandı. Vakumda yoğunlaştırıldı. Susuz sodyum sülfat üzerinden kurutuldu, tekrar vakumda kuruluğa kadar uçuruldu. Etanol içerisinde çözülüp, aktif kömür ile rengi giderildikten sonra kristallendirildi. Süzülüp alınan kristaller vakum etüvünde kurutuldu.

Spektral Analizler :

Bileşiklerin UV spektrumları metanol içerisinde 10^{-3} M çözeltilerinden hazırlanarak alındı. IR spektrumları potasyum bromür pelletleri halinde, NMR spektrumları ise trifloroasetik asit içerisinde çözülerek ve internal standart olarak tetrametilsilan kullanılarak alındı. Sonuçlar, bulgular kısmında Tablo 3 ve 4 de verilmiştir.

Mikrobiyolojik Etkinin Tayini :

Sentezi yapılan bileşiklerin antibakteriyel etkilerin saptanmasında, Tüpte Dilüsyon Yöntemi ile Refik Saydam Merkez Hıfızısıhha Enstitüsü ve Doç. Dr. Ahmet AKIN'ın kişisel koleksiyonundan temin edilen şu mikroorganizmalardan yararlanıldı :

- 1 — *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- 2 — *Streptococcus faecalis* ATCC 10541
- 3 — *Echerichia coli* ATCC 10536

- 5 — *Klebsiella pneumoniae*
NTCC 52211
- 5 — *Pseudomonas aeruginosa*
RSKK 355
- 6 — *Candida albicans* RSKK
628

Yukarıda belirtilen ilk 5 bakteri için «Mueller Hinton Broth» (Meat infusion : 6 g, Casein hydrolysate : 17.5 g, Starch : 1.5 g, Distilled water : 1000 ml) besiyeri, distile su içinde ısıtılarak eritildikten sonra pH : 7.4'e ayarlandı. *Candida albicans* için aynı şekilde «Sabouroud Dextrose Broth» (Neopeptone : 10 g, Dextrose : 40 g, Distilled water : 1000 ml) besiyeri hazırlanıp, pH : 6.0 ya ayarlandı. Besiyerleri steril tüplere 5'er ml taksim edildikten sonra 121°C de 15 dakika otoklavda sterilize edildi.

Antibakteriyel aktiviteleri incelenecek olan bileşiklerin etil alkoldeki steril çözeltilerinden, her bakteri için hazırlanmış serinin ilk tüpüne 400 µg/ml olacak şekilde ilave edilip, tüpten tüpe aktarımlarla 10 dilüsyon (400, 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.5, 0.7 µg/ml) hazırlandı. Son iki tüp besiyeri ve kontrol tüpleri olarak ayrıldı. Yukarıda belirtilmiş olan bakteriler «Nutrient Broth» (Beef extract : 3 g, Peptone : 10 g, Sodium chloride : 5 g, Distilled water : 1000 ml) besiyerine ekilecek 37°C de, *Candida albicans* ise «Sabouroud Dextrose Broth» besiyerine ekilerek, 25°C de 24 saat süreyle inkübe edildi. Sü-

renin sonunda 1/100 oranında sulandırıldı.

Bu şekilde hazırlanmış olan mikroorganizma süspansiyonlarından besiyeri kontrol tüpleri hariç bütün tüplere 0.2 ml ilave edildi. İyiçe karıştırılıp bakteriler için 37°C de 24 saat, *Candida albicans* için 25°C de 5 gün inkübasyona bırakıldı. Sürelerin sonunda besiyeri ve bakteri kontrol tüpleri incelendi. Besiyeri kontrol tüplerinde üremenin bulunmaması, bakteri kontrol tüplerinde ise üremenin mevcut olması halinde, numunelerin Minimal İnhibisyon Konsantrasyonları (MİK) belirlendi.

Her bir numune için üremenin görülmediği en düşük konsantrasyondan bakteriler için «Nutrient Agar» (Beef extract : 3 g, Peptone : 5 g, Sodium chloride : 5 g, Agar : 15 g, Distilled water : 1000 ml), *Candida albicans* için «Sabouroud Dextrose Agar» (Peptone : 10 g, Dextrose : 40 g, Agar : 15 g, Distilled water : 1000 ml) besiyerine ekim yapıp, uygun ısı derecelerinde inkübe edildi. Sonuçta, MİK değeri olarak bulunan konsantrasyonların, aynı zamanda bakterisid oldukları da saptanmıştır.

Mikrobiyolojik etkinin araştırıldığı bileşiklerde, aktivitenin numune çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan etil alkolden ileri gelmediğinin ispatı için, çözücününün 1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512 lik dilüsyonları hazırlanmıştır. Bu dilüsyondaki etil al-

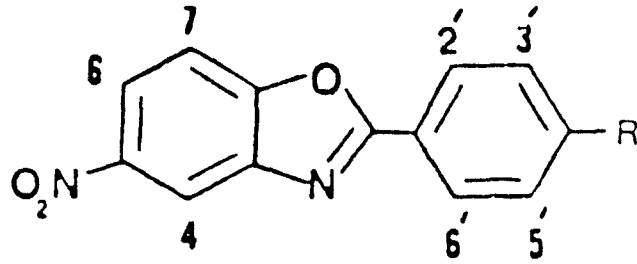
kol çözeltilerinin hiçbirinin antibakteriyel aktivite göstermediği deneysel olarak belirlenmiştir.

Araştırılan mikroorganizmalara karşı, standart ilaç olarak Amoksisilin ve Ampisilin seçilerek, aynı yöntem ve şartlarda gösterdikleri MİK değerleri bulunmuştur.

BULGULAR

5-Nitro-2-(p-süstitüefenil) benzoksazol türevlerinin sentezleri ile

ilgili bilgiler Tablo 1 de, erime dereceleri Tablo 2 de verilmiştir. Bileşiklerin yapıları UV, NMR, IR ve Elementel Analiz yöntemleri ile kanıtlanmıştır. UV, NMR ve Elementel Analiz bulguları Tablo 3, IR bulguları ise Tablo 4 de açıklanmıştır. Bu bileşiklerin antibakteriyel ve antifungal etkilerinin MİK değerleri ($\mu\text{g/ml}$) Tablo 5 de gösterilmiştir.



Tablo 1 : 5-Nitro-2-(p-süstitüefenil)benzoksazol Türevlerinin Sentezleri ile İlgili Bilgiler.

Bil. No.	R	Benzoik Asit Türevi	Isı ($^{\circ}\text{C}$)	Süre (Saat)	Verim (%)
I	H	Benzoik asit	130	2	76
*II	CH_3	p-Toluik asit	170	2.5	45
*III	$\text{C}(\text{CH}_3)_3$	p-ter-Butilbenzoik asit	180	2	54
*IV	NH_2	p-Aminobenzoik asit	170	3	41
V	Cl	p-Klorobenzoik asit	140	2.5	27
*VI	Br	p-Bromobenzoik asit	180	2	36

(*) İlk kez sentezlenmiştir.

Tablo 2 : 5-Nitro-2-(p-süstitüefenil)benzoksazol Türevlerinin Erime Dereceleri.

Bil. No	Bulunan E.D. (°C)	Lit. E.D. (°C)	Lit. No
I	173.4	171.5-172.5	2-5
II	175.1	—————	
III	158	—————	
IV	264	—————	
V	212	190-219	3-6
VI	241.1	—————	

Tablo 3 : 5-Nitro-2-(psüstitüefenil)benzoksazol Türevlerinin UV, NMR ve Elementel Analiz Bulguları.

Bil. No.	λ max log ϵ		NMR (δ ppm)	Element Analiz		
	(nm)			Hesaplanan	Bulunan	
I	215	3.1439	7.47-8.98 (Bütün protonlar, 8H, m)	C%	65.00	64.83
	273	3.2895		H%	3.35	3.51
				N%	11.66	11.78
II	219	3.1855	2.70 (Metil protonları, 3H, s), 7.63 (3' ve 5' konumlardaki protonlar, 2H, d), 7.89-8.89 (2', 6', 4, 5, 6, 7 konumlardaki protonlar, 5H, m).	C%	66.13	66.27
	281	3.2889		H%	3.96	3.75
				N%	11.01	11.14
III	219	3.1812	1.50 (ter-Butil grubunun protonları, 9H, s), 7.82-8.97 (2', 3', 5', 6', 4, 6 ve 7 konumlardaki protonlar, 7H, m)	C%	69.90	68.63
	272	3.2924		H%	5.44	5.52
				N%	9.45	9.50
IV	209*	3.0863	7.56-8.91 (Bütün protonlar, 9H, m).	C%	61.17	61.30
	230	3.1886		H%	3.55	3.35
	329	3.2949		N%	16.46	16.60
	354*	3.2718				
V	218	3.1795	7.52-8.95 (Bütün protonlar, 7H, m).	C%	55.84	57.04
	277	3.2909		H%	2.56	2.66
				N%	10.19	9.96
VI	218	2.8247	7.68-8.98 (Bütün protonlar, 7H, m).	C%	48.93	49.05
	276	3.1209		H%	2.21	2.38
				N%	8.77	8.56

(*) UV de maksimumların omuz yaptığı değerler.

Tablo 4 : 5-Nitro-2-(p-sübstitüefenil)benzoksazol Türevlerinin IR Bulguları.

Absorpsiyon Sahası (cm^{-1})	
3110 - 3000	=C—H gerilimleri
2990 - 2900	—C—H gerilimleri
1630 - 1580	C=N ve C=C gerilimleri
1540	Asimetrik nitro gerilimi
1350	Simetrik nitro gerilimi
1265 - 1050	C—O—C gerilimleri
840 - 700	C—H plan dışı eğilimleri (sübstitüe benzen halkaları)
3505 - 3260	N—H gerilimleri (Bil. no IV)

Tablo 5 : Sentezlenen Bileşiklerin ve Denenen Standart İlaçların Mikroorganizmalara Karşı Bulunan Antibakteriyel ve Antifungal Etkilerinin MİK Değerleri ($\mu\text{g/ml}$).

Bil. No	Staph. aureus	S. faecalis	E. coli	K. pneumonia	Ps. aeruginosa	C. albicans
I	12.5	100	12.5	12.5	12.5	12.5
II	12.5	100	12.5	12.5	12.5	12.5
III	100	100	100	100	12.5	12.5
IV	6.2	25	12.5	12.5	12.5	12.5
V	12.5	12.5	25	12.5	25	12.5
VI	6.2	12.5	12.5	6.2	12.5	12.5
Amoksi- silin	0.3	0.3	1.5	12.5	500	—
Ampisi lin	0.3	0.3	1.5	12.5	1000	—

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bu çalışmada sentezlenen toplam 6 adet 5-nitro-2-(p-sübstitüefenil) benzoksazol türevi, 2-amino-4-nitrofenolün, ilgili p-sübstitüeben-

zoik asitlerle, polifosforik asit varlığında ısıtılması ile elde edilmişlerdir. Polifosforik asit, bu tür yapıların sentezinde kullanılan en uygun halka kapama katalizörüdür (7, 8).

Sentezi gerçekleştirilen bileşiklerin yapıları, UV, IR, NMR, Elementel Analiz metodları kullanılarak ve erime dereceleri bulunarak kanıtlanmıştır (Tablo 2, 3 ve 4).

Sentezlenen bileşiklerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesinde ,daha önceki çalışmamızda uyguladığımız «Tüpte Dilüsyon» yöntemi kullanılmıştır (1). Ayrıca, bu yöntemin diğerlerine oranla (Disk, Oluk ve Silindir Yöntemleri), özellikle yeni sentezlenen maddeler için daha güvenilir sonuçlar verdiği da çeşitli çalışmalar ile gösterilmiştir (9, 10).

Dört tanesi ilk kez sentezlenen bu türevlerin, daha önceki çalışmalarımızda kullandığımız çeşitli gram (+), gram (—) bakterilere ve Candida albicans'a karşı gösterdikleri antibakteriyel ve antifungal etkileri araştırılmış, bulunan MİK değerleri Tablo 5 de verilmiştir.

Tablo 5 incelendiğinde, 5. konumda nitro grubu taşıyan 2-(p-sübstitüefenil)benzoksazol türevle-

ri içinde en yüksek antibakteriyel etkinin, 5-nitro-2-(p-bromofenil)benzoksazol de (Bileşik VI) olduğu görülmektedir. Bu bileşiğin, denenen gram (+) bakterilerden S. aureus ve gram (—) bakterilerden K. pneumoniae'ya karşı elde edilen MİK değerleri, daha önceki çalışmamızda ele alınan türevlerle karşılaştırıldığında, en yüksek etkiyi verdiği görülmektedir (MİK : 6.2 µg/ml). Aynı türev, 5. konumda hidrojen taşıyan analogu ile kıyaslandığında, 5. konuma nitro grubu girmesi ile antibakteriyel etkinin 16-32 kat arttığı anlaşılmaktadır. Aşağıda, bu iki analog yapıdaki bileşiğin MİK değerleri verilerek, mikrobiyolojik etkileri yönünden karşılaştırmaları yapılmıştır.

2. ve 5. konumlardan süstitüe edilmiş benzoksazol halka sistemi taşıyan bileşiklerin, kantitatif olarak mikrobiyolojik etkiye katkılarının bulunabilmesi amacıyla gerekli olan bileşiklerin sentez ve aktivite çalışmaları sürdürülmektedir.

	2-(p-Bromofenil)- benzoksazol	5-Nitro-2-(p-bromofenil)- benzoksazol
S. aureus	: 200	6.2
S. faecalis	: 200	12.5
E. coli	: 200	12.5
K. pneumoniae	: 100	6.2
Ps. aeruginosa	: 200	12.5
C. albicans	: 200	12.5

KAYNAKLAR

1. Şener, E., Özden, S., Yalçın, İ., Özden, T., Akın, A., Yıldız, S., «2-(p-Sübstütüefenil)benzoksazol Türevlerinin Sentez, Yapı Aydınlatması ve Mikrobiyolojik Etkileri», **FABAD Farm. Bil. Der.** 11(3), 190, 1986
2. Stephens, F.F., Bower, J.D., «The Preparation of Benzimidazoles and Benzoxazoles from Schiff's Bases. Part II.», **J. Chem. Soc.**, 1722-6, 1950.
3. Somayajulu, V.V., Subba Rao, N.V., «Search for Physiologically Active Compounds. VIII. Synthesis of Benzoxazoles from o-Aminophenols and Aromatic Aldehydes.», **Proc. Indian Acad. Sci. Sect. A**, 59 (6), 396-402, 1964. Ref : Chem. Abstr., 62, 1639f, 1965.
4. Nakagawa, K., Onoue, H., Sugita, J., «Oxidation with Nickel Peroxide. IV. The Preparation of Benzoxazoles from Schiff Bases.», **Chem. Pharm. Bull.**, 12 (10), 1135-8, 1964. Ref : Chem. Abstr., 62, 541h, 1965.
5. Nakagawa, K., Ogami, H., «2-Substitutedbenzoxazole Derivatives.», Japan, 15.938, April 13, 1964. Ref : Chem. Abstr., 68, 114585d, 1968.
6. Ciba Ltd., «2-(4-(s-Triazinylamino)phenyl)benzoxazoles.», Belg. 634.193, Dec. 27, 1963. Ref : Chem. Abstr., 60, 14524h, 1964.
7. Hein, D.W., Alheim, R.J., Leavitt, J.J., «The Use of Polyposphoric Acid in The Synthesis of 2-Aryl and 2-Alkylsubstituted Benzimidazoles, Benzoxazoles and Benzothiazoles.», **J. Am. Chem. Soc.**, 79, 427-9, 1957.
8. Higginbottom, R., Suschitzky, H., «Synthesis of Heterocyclic Compound. Part III. Cyclisation of o-Nitrophenyl Oxygen Ether.», **J. Chem. Soc.**, 2367-70, 1962.
9. Branch, A., Starkey, D.H., Power, E.E., «Diversification in the Tube Dilution Test for Antibiotic Sensitivity of Microorganisms.», **Appl. Microbiol.**, 13, 469-72, 1965.
10. Özsan, K., «Antimikrobik Ajanların Kullanılışında Laboratuvarın Yeri.», Tolunay, F.C., Ayhan, İ.H., Kaymakçalan, Ş., **Klinik Farmakoloji**, Ankara, Türk Farmakoloji Derneği Yayınları, Vol. II, 69-93, 1977.