

T.C.
BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI



GIDA GÜVENLİĞİNİN SAĞLANMASINDA
KULLANILABİLECEK BAZI HETEROHALKALI
BİLEŞİKLERİN SENTEZİ, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ
VE POTANSİYEL KULLANIM ALANLARI

DOKTORA TEZİ

ÖZGE KAVAS

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR
İKİNCİ TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Cevher ALTUĞ

BOLU, TEMMUZ - 2024

KABUL VE ONAY SAYFASI

Özge KAVAS tarafından hazırlanan “**GIDA GÜVENLİĞİNİN SAĞLANMASINDA KULLANILABİLECEK BAZI HETEROHALKALI BİLEŞİKLERİN SENTEZİ, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE POTANSİYEL KULLANIM ALANLARI**” adlı tez çalışması jürimiz tarafından Gıda Mühendisliği Anabilim Dalı’nda Doktora Tezi olarak oy birliğiyle kabul edilmiştir. 29/07/2024

Jüri Üyeleri

İmza

Danışman
Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Semra TURAN
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. H. Ali DÖNDAŞ
Çukurova Üniversitesi

.....

Üye
Prof. Dr. Esra ACAR SOYKUT
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Üye
Dr. Öğr. Üyesi Cem GÖL
Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi

.....

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. İbrahim KÜRTÜL

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Bolu Abant İzzet Baysal Üniversitesi, Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,

aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Teze ilişkin Turnitin adlı programında Enstitü Müdürlüğünce belirlenen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan benzerlik raporuna göre, tezin benzerlik oranı %30'u geçmemektedir.

.....
ÖZGE KAVAS

ÖZET

GIDA GÜVENLİĞİNİN SAĞLANMASINDA KULLANILABİLECEK BAZI HETEROHALKALI BİLEŞİKLERİN SENTEZİ, BİYOLOJİK AKTİVİTELERİ VE POTANSİYEL KULLANIM ALANLARI

DOKTORA TEZİ

ÖZGE KAVAS

BOLU ABANT İZZET BAYSAL ÜNİVERSİTESİ

LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ

GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

(TEZ DANIŞMANI: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)

(İKİNCİ DANIŞMAN: PROF. DR. CEVHER ALTUĞ)

BOLU, TEMMUZ - 2024

XVII + 118

Bu tezde, gıda güvenliğinin sağlanmasında kullanılabilecek bazı heterohalkalı bileşiklerin sentezi, biyolojik aktiviteleri ve potansiyel kullanım alanları incelenmiştir. Çalışma kapsamında, izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit, izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4-oksit ve benzoimidazoliyo asetat türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları İnfrared (IR), ¹H ve ¹³C Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopisi ve Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi (HRMS) yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Bu bileşiklerin antibakteriyel özellikleri Gram pozitif (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*) ve Gram negatif (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella Typhimurium*) bakterilere karşı incelenmiştir. Disk difüzyon yöntemine göre inhibisyon zonu büyük olan (>15 mm) bileşiklerin Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) değerleri belirlenmiştir. Bu özelliğe sahip bileşikler izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit türevleri olup özellikle bir tanesi (**42b** bileşiği), *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı büyük inhibisyon zon çapı (22-33 mm) ve düşük MİK değerleri (2 µg/mL) ile yüksek antibakteriyel etkinlik göstermiştir. MİK değerleri belirlenen izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin, biyofilm oluşturma kapasitesi yüksek olan *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* bakterilerine karşı biyofilm inhibisyonu ve biyofilm eradikasyon özellikleri incelenmiştir. Bileşiklerin MİK, MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonlarında biyofilm inhibisyonu ve MİK konsantrasyonlarında biyofilm eradikasyon özelliklerine (oluşmuş biyofilmi ortadan kaldırma) bakılmıştır. Bileşiklerden bazılarının (**42b**, **42c** ve **42f**) biyofilm inhibisyonu çalışmalarında *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı %100 oranında etkinlik gösterdiği tespit edilmiştir. Diğer taraftan, birçok bileşik Gram negatif bakterilere karşı düşük etkinlik göstermiş ve >500 µg/mL gibi yüksek MİK değerleri sergilemiştir. Heterohalkalı bileşiklerin antibakteriyel ve antibiyofilm aktivitelerinin, özellikle Gram pozitif bakterilere karşı yüksek etkinlik göstermiş olması, bu bileşiklerin gıda güvenliği uygulamalarında potansiyel kullanım alanlarına sahip olabileceğini göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELE: Gıda güvenliği, heterohalkalı bileşikler, antibakteriyel aktivite, antibiyofilm, biyofilm eradikasyon

ABSTRACT

SYNTHESIS, BIOLOGICAL ACTIVITIES AND POTENTIAL USES OF SOME HETEROCYCLIC COMPOUNDS THAT CAN BE USED IN FOOD SAFETY

PHD THESIS

ÖZGE KAVAS

BOLU ABANT İZZET BAYSAL UNIVERSITY

INSTITUTE OF GRADUATE STUDIES

DEPARTMENT OF FOOD ENGINEERING

(SUPERVISOR: PROF. DR. İBRAHİM ÇAKIR)

(CO-SUPERVISOR: PROF. DR. CEVHER ALTUĞ)

BOLU, JULY 2024

XVII + 118

In this thesis, the synthesis, biological activities and potential uses of some heterocyclic compounds that can be used in ensuring food safety were investigated. Within the scope of the study, isoxazolo-1,4-benzothiazine-4,4-dioxide, isoxazolo-1,4-benzothiazine-4-oxide and benzoimidazoltio acetate derivatives were synthesised. The structures of the synthesised compounds were characterised by Infrared (IR), ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance (NMR) spectroscopy and High Resolution Mass Spectrometry (HRMS) methods. The antibacterial properties of these compounds were investigated against Gram positive (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*) and Gram negative (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Salmonella Typhimurium*) bacteria. According to the disc diffusion method, Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values of compounds with a large zone of inhibition (>15 mm) were determined. The compounds with this property were isoxazolo-1,4-benzothiazine-4,4-dioxide derivatives and especially one of them (compound 42b) showed high antibacterial activity against *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* with large inhibition zone diameter (22-33 mm) and low MIC values (2 $\mu\text{g/mL}$). Biofilm inhibition and biofilm eradication properties of isoxazolo-1,4-benzothiazine-4,4-dioxide derivatives, whose MIC values were determined, against *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* bacteria with high biofilm formation capacity were investigated. Biofilm inhibition at MIC, MIC/2 and MIC/4 concentrations and biofilm eradication properties (removal of formed biofilm) at MIC concentrations of the compounds were investigated. Some of the compounds (42b, 42c and 42f) showed 100% activity against *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* in biofilm inhibition studies. On the other hand, many compounds showed low activity against Gram negative bacteria and exhibited high MIC values of >500 $\mu\text{g/mL}$. The antibacterial and antibiofilm activities of heterocyclic compounds showed high activity especially against Gram positive bacteria, indicating that these compounds may have potential applications in food safety applications.

KEYWORDS: Food safety heterocyclic compounds, antibacterial activity, antibiofilm, biofilm eradication,

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
ETİK BEYAN.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ŞEKİL LİSTESİ.....	ix
TABLO LİSTESİ	xii
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ	xiii
FORMÜLLER.....	xv
TEŞEKKÜR	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1 Biyofilm.....	3
2.1.1 Biyofilm yapısı	4
2.1.2 Mikrobiyal biyofilm oluşum aşamaları	4
2.1.3 Biyofilm Kontrol ve Önleme Yöntemleri.....	6
2.2 Heterohalkalı Bileşikler	9
2.2.1 İzoksazol	10
2.2.2 1,4-Benzotiyazin.....	13
2.2.3 Benzimidazol	15
2.3 Mikrodalga ile Organik Sentez.....	16
3. MATERYAL VE YÖNTEM	18
3.1 Materyal.....	18
3.2 Sentez Çalışmaları	19
3.2.1 Benzoizoksazoltiyazin Türevlerinin Sentezi	19
3.2.2 Benzoimidazoltiyazo Asetat Türevleri.....	31
3.3 Mikrobiyolojik Çalışmalar	34
3.3.1 Antibakteriyel Aktivite Testi (Disk Difüzyon Yöntemi).....	34
3.3.2 Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivite Tayini...34	
3.3.3 Biyofilm Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MBİK).....	35
3.3.4 Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu (MBEK)	36
4. BULGULAR	37
4.1 Sentez Çalışmaları	37
4.2 Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	45
4.2.1 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları	45
4.2.2 Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Sonuçları	48

4.2.3 Biyofilm Oluşumunun Önlenmesi.....	50
4.2.1 Biyofilm Eradikasyonu (Oluşan Biyofilmi İnhibe Etme).....	51
5. TARTIŞMA	53
5.1 Sentez Çalışmaları	53
5.2 Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları.....	53
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	58
6.1 Sentez Çalışmaları	58
6.2 Antimikrobiyal Aktivite ve Antibiyofilm Çalışmaları	58
7. KAYNAKLAR.....	60
8. EKLER.....	75



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. Biyofilm oluşum aşamaları.....	5
Şekil 2.2. Antibiyofilm izoksazol yapıları	8
Şekil 2.3. Heterohalkalı bileşikler.....	9
Şekil 2.4. Amanita muscaria mantarından elde edilen analoglarının yapıları ..	10
Şekil 2.5. Çeşitli biyolojik aktiviteye sahip izoksazol türevleri	11
Şekil 2.6. Yeşil kimya yöntemi ile 5-aminoisoksazol sentezi	11
Şekil 2.7. 3,5-disübstitüe izokazollerin sentezi.....	12
Şekil 2.8. TEMPO katalizörü ile izokazol sentezi	12
Şekil 2.9. İzoksazol ile kaynaşmış iminoşeker türevlerinin sentezi.....	12
Şekil 2.10. Flor içeren izoksazol türevlerinin sentezi.....	12
Şekil 2.11. Nitril oksitlerin alkil türevleri ile [3+2] siklizasyonu.....	13
Şekil 2.12. Çeşitli biyolojik aktiviteye sahip 1,4-benzotiyazin türevleri	14
Şekil 2.13. Domino reaksiyonu ile benzotiyazin 1,1-dioksit türevleri sentezi .	14
Şekil 2.14. Elemental kükürt kullanılarak 1,4-benzotiyazin sentezi.....	14
Şekil 2.15. İyodür katalizörü kullanılarak 1,4-benzotiyazin sentezi.....	14
Şekil 2.16. Geçiş metali kullanılmadan 1,4-benzotiyazin sentezi	15
Şekil 2.17. Oksidatif halka genişlemesi yoluyla 1,4-benzotiyazin sentezi	15
Şekil 2.18. Biyolojik aktiviteye sahip benzimidazol bileşikleri	16
Şekil 2.19. Mn(I) katalizörü kullanılarak benzimidazol sentezi	16
Şekil 2.20. Rh (III) katalizli benzimidazo [1,2-a] kinolin sentezi	16
Şekil 3.1. (2-Florobenzen-sülfonil)asetonitril (39) sentezi	19
Şekil 3.2. İzoksazolobenzotiyazin-4,4-dioksit (42) sentezi	20
Şekil 3.3. (2-Florobenzen-sülfonil)asetonitril (43) sentezi	26
Şekil 3.4. İzoksazolobenzotiyazin-4-oksit (45) sentezi	27
Şekil 3.5. Benzoimidazoltiyao asetik asit (48) sentezi	31
Şekil 3.6. Benzoimidazoltiyao asetat türevlerinin (49) sentezi	32
Şekil 4.1. Benzotiyazinizoksazolosülfonun IR spektrumu	39
Şekil 4.2. Benzotiyazinizoksazolosülfoksitin IR spektrumu	39
Şekil 4.3. 42 Numaralı Bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	40
Şekil 4.4. 45 Numaralı Bileşiğin ¹ H NMR spektrumu	40
Şekil 4.5. 42 Numaralı Bileşiğin Genişletilmiş ¹ H NMR spektrumu	41
Şekil 4.6. 45 Numaralı Bileşiğin Genişletilmiş ¹ H NMR spektrumu	41
Şekil 4.7. 42 Numaralı Bileşiğin ¹³ C NMR Spektrumu.....	42
Şekil 4.8. 45 Numaralı Bileşiğin ¹³ C NMR Spektrumu.....	42
Şekil 4.9. 42 Numaralı Bileşiğin LCMS Spektrumu'nda parçalanma ürünlerinin gösterimi.....	43
Şekil 4.10. 9 Numaralı Bileşiğin LCMS Spektrumu'nda parçalanma ürünlerinin gösterimi.....	43
Şekil 4.11. ¹³ C NMR spektrumunda 44 numaralı bileşikteki C-F etkileşmesi .	44
Şekil 4.12. ¹³ C NMR spektrumunda 45 numaralı bileşikteki halkalaşma sonucunda bu etkileşmenin kaybolması	44
Şekil 4.13. 1,4-Benzotiyazin oluşum mekanizması	45
Şekil 4.14. 1,4-Benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin <i>Bacillus subtilis</i> ve <i>Staphylococcus aureus</i> 'a karşı disk difüzyon yöntemi	46

Şekil 4.15. 1,4-Benzotiyazin-4,4-dioksitlerin (42) <i>Staphylococcus aureus</i> ve <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakterilerine karşı MİK yöntemi.....	49
Şekil 4.16. 1,4-Benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin (42) <i>Staphylococcus aureus</i> ve <i>Pseudomonas aeruginosa</i> bakterilerine karşı biyofilm oluşumunu önleme yöntemi	50
Şekil 4.17. 1,4-Benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin (42) biyofilm eradikasyon özelliği.....	52
Şekil 8.1. 42a bileşiğinin IR spektrumu.....	75
Şekil 8.2. 42a bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	75
Şekil 8.3. 42a bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	76
Şekil 8.4. 42a bileşiğinin HRMS spektrumu	76
Şekil 8.5. 42b bileşiğinin IR spektrumu	77
Şekil 8.6. 42b bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	77
Şekil 8.7. 42b bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	78
Şekil 8.8. 42b bileşiğinin HRMS spektrumu	78
Şekil 8.9. 42c bileşiğinin IR spektrumu.....	79
Şekil 8.10. 42c bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	79
Şekil 8.11. 42c bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	80
Şekil 8.12. 42c bileşiğinin HRMS spektrumu	80
Şekil 8.13. 42d bileşiğinin IR spektrumu	81
Şekil 8.14. 42d bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	81
Şekil 8.15. 42d bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	82
Şekil 8.16. 42d bileşiğinin HRMS spektrumu	82
Şekil 8.17. 42e bileşiğinin IR spektrumu.....	83
Şekil 8.18. 42e bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	83
Şekil 8.19. 42e bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	84
Şekil 8.20. 42e bileşiğinin HRMS spektrumu	84
Şekil 8.21. 42f bileşiğinin IR spektrumu	85
Şekil 8.22. 42f bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	85
Şekil 8.23. 42f bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	86
Şekil 8.24. 42f bileşiğinin HRMS spektrumu.....	86
Şekil 8.25. 42g bileşiğinin IR spektrumu.....	87
Şekil 8.26. 42g bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	87
Şekil 8.27. 42g bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	88
Şekil 8.28. 42g bileşiğinin HRMS spektrumu	88
Şekil 8.29. 42h bileşiğinin IR spektrumu	89
Şekil 8.30. 42h bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	89
Şekil 8.31. 42h bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	90
Şekil 8.32. 42h bileşiğinin HRMS spektrumu	90
Şekil 8.33. 42i bileşiğinin IR spektrumu	91
Şekil 8.34. 42i bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	91
Şekil 8.35. 42i bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	92
Şekil 8.36. 42i bileşiğinin HRMS spektrumu	92
Şekil 8.37. 42j bileşiğinin IR spektrumu	93
Şekil 8.38. 42j bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	93
Şekil 8.39. 42j bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	94
Şekil 8.40. 42j bileşiğinin HRMS spektrumu.....	94
Şekil 8.41. 42k bileşiğinin IR spektrumu	95
Şekil 8.42. 42k bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	95
Şekil 8.43. 42k bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	96

Şekil 8.44. 42k bileşiğinin HRMS spektrumu.....	96
Şekil 8.45. 45a bileşiğinin IR spektrumu.....	97
Şekil 8.46. 45a bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	97
Şekil 8.47. 45a bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	98
Şekil 8.48. 45a bileşiğinin HRMS spektrumu	98
Şekil 8.49. 45b bileşiğinin IR spektrumu	99
Şekil 8.50. 45b bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	99
Şekil 8.51. 45b bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	100
Şekil 8.52. 45b bileşiğinin HRMS spektrumu	100
Şekil 8.53. 45c bileşiğinin IR spektrumu.....	101
Şekil 8.54. 45c bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	101
Şekil 8.55. 45c bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	102
Şekil 8.56. 45c bileşiğinin HRMS spektrumu	102
Şekil 8.57. 45d bileşiğinin IR spektrumu	103
Şekil 8.58. 45d bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	103
Şekil 8.59. 45d bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	104
Şekil 8.60. 45d bileşiğinin HRMS spektrumu	104
Şekil 8.61. 45e bileşiğinin IR spektrumu.....	105
Şekil 8.62. 45e bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	105
Şekil 8.63. 45e bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	106
Şekil 8.64. 45e bileşiğinin HRMS spektrumu	106
Şekil 8.65. 45f bileşiğinin IR spektrumu	107
Şekil 8.66. 45f bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	107
Şekil 8.67. 45f bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	108
Şekil 8.68. 45f bileşiğinin HRMS spektrumu.....	108
Şekil 8.69. 45g bileşiğinin IR spektrumu.....	109
Şekil 8.70. 45g bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	109
Şekil 8.71. 45g bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	110
Şekil 8.72. 45g bileşiğinin HRMS spektrumu	110
Şekil 8.73. 45h bileşiğinin IR spektrumu	111
Şekil 8.74. 45h bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	111
Şekil 8.75. 45h bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	112
Şekil 8.76. 45h bileşiğinin HRMS spektrumu	112
Şekil 8.77. 47 bileşiğinin IR spektrumu.....	113
Şekil 8.78. 48 bileşiğinin IR spektrumu.....	113
Şekil 8.79. 48 bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	114
Şekil 8.80. 48 bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	114
Şekil 8.81. 49a bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	115
Şekil 8.82. 49a bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	115
Şekil 8.83. 49b bileşiğinin IR spektrumu	116
Şekil 8.84. 49b bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu.....	116
Şekil 8.85. 49b bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu	117
Şekil 8.86. 49c bileşiğinin IR spektrumu.....	117
Şekil 8.87. 49c bileşiğinin ¹ H-NMR spektrumu	118
Şekil 8.88. 49c bileşiğinin ¹³ C-NMR spektrumu.....	118

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1. 1,4-Benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin elde edilme yöntemlerine göre verimleri	37
Tablo 4.2. 1,4-Benzotiyazin-4-oksit türevlerinin elde edilme yöntemlerine göre verimleri	38
Tablo 4.3. Benzotiyazin-4,4-dioksitlerin (42) İnhibisyon Zon Çapları.....	46
Tablo 4.4. Benzotiyazin-4-oksitlerin (45) İnhibisyon Zon Çapları.....	47
Tablo 4.5. Benzimidazole Türevlerinin (49) İnhibisyon Zon Çapları.....	48
Tablo 4.6. Benzotiyazinlerin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerleri ...	49
Tablo 4.7. 1,4-Benzotiyazin4,4-dioksitlerin Biyofilm Oluşumunu Önleme İnhibisyon Sonuçları (%)	51
Tablo 4.8. 1,4-Benzotiyazin-4,4-dioksitlerin % Eradikasyon Sonuçları.....	52

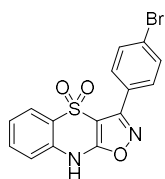
KISALTMA VE SEMBOLLER LİSTESİ

CFU:	Koloni Oluşturan Birim
Cipro:	Ciprofloksasin
Cs₂CO₃:	Sezyum Karbonat
DMF:	Dimetilformamid
DMSO:	Dimetil Sülfoksit
DNA:	Deoksiribonükleik Asit
EPS:	Ekstraselüler Polimerik Madde
EtOAc:	Etil Asetat
FTIR:	Fourier Dönüşümlü Infrared Spektroskopisi
FTS :	Fizyolojik Tuzlu Su
HPLC:	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HRMS:	Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrometresi
IR:	Infrared Spektroskopisi
KBr:	Potasyum Bromür
LC-MS:	Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi
MBEK:	Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu
MBİK:	Minimum Biyofilm İnhibitör Konsantrasyon
MIC:	Minimum İnhibitör Konsantrasyon
m-KPBA:	meta-Kloroperbenzoik Asit
mL :	Mililitre
Na₂S₂O₃:	Sodyum Tiyosülfat
Na₂SO₄:	Sodyum Sülfat
NaCl:	Sodyum Klorür
NaHCO₃:	Sodyum Bikarbonat
NMR:	Nükleer Manyetik Rezonans
PBS:	Fosfat Tamponlu Salin
RNA:	Ribonükleik Asit
TSA :	Tryptic Soy Agar
UV:	Ultraviyole
µL :	Mikrolitre
Semboller:	

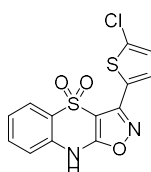
δ : Kimyasal kayma
J: Spin-spin çiftlenme sabiti
m/z: Kütle/yük oranı
Rf: Retansiyon faktörü
s: Singlet (tek pik)
d: Dublet (çift pik)
t: Triplet (üçlü pik)
q: Kuartet (dörtlü pik)
m: Çoklu pik (multiplet)
br: Geniş pik (broad)
Hz: Hertz



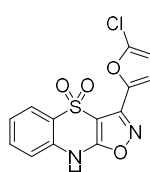
FORMÜLLER



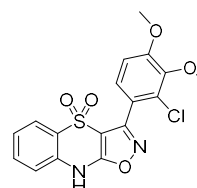
42a



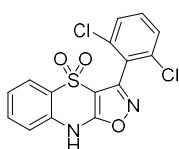
42b



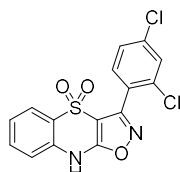
42c



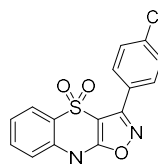
42d



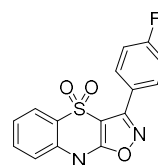
42e



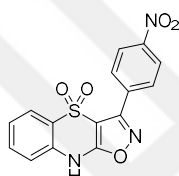
42f



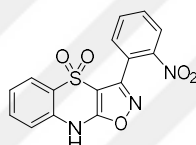
42g



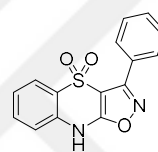
42h



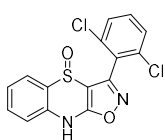
42i



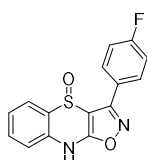
42j



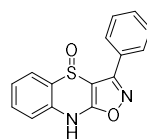
42k



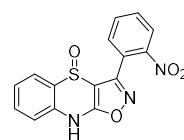
45a



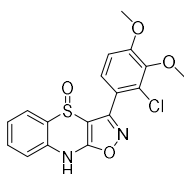
45b



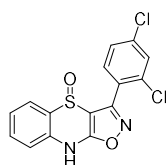
45c



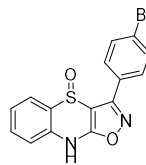
45d



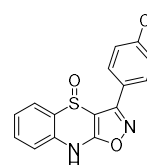
45e



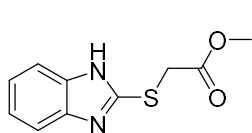
45f



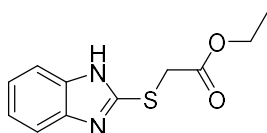
45g



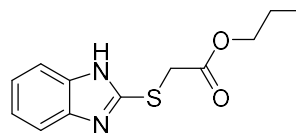
45h



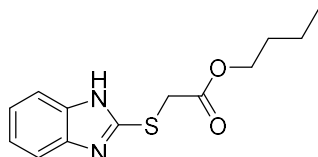
49a



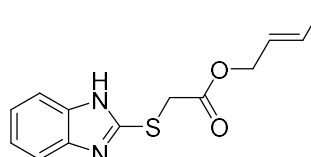
49b



49c



49d



49e

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca değerli bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. İbrahim ÇAKIR'a gösterdiği güven ve sabır için sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Kıymetli önerileri ve teşvikleri sayesinde karşılaştığım zorlukları aşmamda ve bilimsel gelişimimde büyük rol oynayan tez eş danışmanım Prof. Dr. Cevher ALTUĞ'a gösterdiği anlayış ve destek için minnettarım.

Tez izleme komitemde yer alarak çalışmamın her aşamasında bana rehberlik eden, önerileriyle tezimin şekillenmesine katkıda bulunan Prof. Dr. Semra TURAN ve Dr. Öğr. Üyesi Cem GÖL'e her toplantıda çalışmamı titizlikle inceledikleri ve yapıcı geri bildirimlerde bulundukları için teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi değerlendirmek üzere jüri üyeliğini kabul eden Prof. Dr. H. Ali DÖNDAŞ ve Prof. Dr. Esra ACAR SOYKUT'a değerli zamanlarını ayırarak çalışmamı değerlendirdikleri, verdikleri yapıcı eleştiriler ve önerilerle tezime katkıda bulundukları için en içten teşekkürlerimi sunarım.

Akademik yolculuğumda bilgi ve deneyimleriyle destek olup şimdi çalışma hayatımda değerli katkıları ve yol göstericiliği için Doç. Dr. Akın SAĞIRLI'ya minnettarım.

Ayrıca, bu çalışmalarım sırasında her zaman yanımda olan ve desteklerini hep hissettiğim Aslı YILDIRIM, Burcu BİLALOĞLU, Merve ERTEM, Özlem ŞAHİN ve Şeyma Betül ENCU'ya tüm kalbimle teşekkür ederim.

Yükseköğretim Kurulu (YÖK) tarafından sağlanan 100/2000 Doktora Bursu kapsamında verilen maddi destek ve akademik gelişimime sağladıkları bu değerli katkıdan dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın yürütülmesinde 114Z181 numaralı proje desteği ile katkı sağlayan Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na (TÜBİTAK) teşekkür ederim.

Son olarak, bu uzun ve zorlu süreçte bana her zaman inanan, yanımda olan ve desteklerini esirgemeyen canlarıma ne kadar teşekkür etsem azdır. Onların sınırsız sevgisi, sabrı ve fedakarlıkları, bu akademik yolculuğu tamamlamamda en büyük motivasyon kaynağım olmuştur. Bu tezi onlara ithaf ederek teşekkür etmek istiyorum.

1. GİRİŞ

Gıda güvenliği, gıdalarda tüketicilerin sağlığına zarar verebilecek tehlikelerin olmaması veya güvenli, kabul edilebilir düzeylerde olması şeklinde tanımlanmaktadır. Gıda güvenliği yöntemleri, üretimden tüketime kadar uzanan tüm gıda zinciri boyunca gıdanın güvenli kalmasını sağlamak için önemli bir role sahip olup hasat, işleme, depolama, dağıtım ve hazırlık aşamalarında etkin bir şekilde uygulanmalıdır (Rai ve Bai, 2018).

Gıda işleme hatlarında hijyenik süreçler önemli ölçüde takip edilmesine rağmen, süreç bir sterilizasyon aşaması içermediği sürece mikroorganizmalardan arındırılmış gıda üretimi zordur. Dolayısıyla mikroorganizma kontaminasyon kaynakları arasında, işleme hatlarındaki ekipman yüzeyleri, ürünlerde tekrarlayan mikroorganizma varlığının başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir. Uygun çevresel koşullar altında, bakteriler yüzeylere yapışarak çoğalabilir. Bu bakteriler, hücrelerini koruyan ve kendi ürettikleri hücre dışı polimer maddelerle çevrili bir matris içinde, biyofilm adı verilen karmaşık mikroorganizma toplulukları oluşturabilirler (Haddad, 2022). Bu yaşam biçiminin, bakterilerin uygun bir ortamda yaşamalarını sağlarken onları dış tehditlerden de koruduğu bilinmektedir (Richter ve Kragh, 2022). Biyofilm oluşumu düzenli temizlik ve dezenfeksiyon ile önlenemeyen bir sorun olmasına rağmen bakterilerin çeşitlilikleri ve özelleşmiş fenotiplerinin gelişmesi, onların planktonik mikroorganizmalara göre daha dirençli hale getirmektedir. Bu nedenle son yıllarda gıda işleme yüzeylerinde meydana gelen biyofilm oluşumunun önlenmesi için yeni yöntemler araştırılmaktadır (Mannan & Kumar, 2023; Rumbaugh & Ahmad, 2014). Dünya Sağlık Örgütü, patojenlere karşı geleneksel ve geleneksel olmayan ajanlar geliştirilmesi konusunda araştırmacıları teşvik etmektedir. Biyofilm iyileştirme stratejilerinin çoğu, biyofilm oluşumunun erken aşamalarını önlemeyi amaçlayan biyofilm inhibisyon ajanlarının veya biyofilm hücre topluluğunu bozmayı amaçlayan biyofilm dağıtıcı ajanların geliştirilmesini içermektedir (Verderosa vd., 2019).

Gıda işleme yüzeylerinde biyofilm oluşumuyla birlikte kontaminasyon meydana gelmekte ve gıda bozulmaları gerçekleşmektedir. Bunu önlemek/kontrol etmek için çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemler geliştirilmeye devam etmektedir.

Gıda kaynaklı birçok hastalık ve gıda zehirlenmesi biyolojik kontaminasyondan kaynaklanmaktadır. Gıda işleme ve muhafaza süreçlerinde hijyenik önlemlerin artırılması, bu tür sorunların önlenmesinde büyük rol oynamaktadır. Dezenfeksiyon işlemlerinde kullanılan fiziksel (ısı dezinfeksiyon, UV ışını, radyasyon, filtrasyon) ve kimyasal (klor bileşikler, hidrojen peroksit, quaterner amonyum bileşikler, ozon) yöntemler yüzeylerde, ekipmanlarda veya gıda maddelerinde bulunan mikroorganizmaların yok edilmesi veya zararsız hale getirilmesi amacıyla kullanılan yöntemlerdir (Deng vd., 2020). Ancak, biyofilm yapılarının dirençli doğası nedeniyle bu önlemler her zaman yeterli olamamaktadır. Bu nedenle, gıda işleme sektöründe biyofilm oluşumunu engelleyebilecek yeni ve etkili yöntemlerin geliştirilmesi gerekmektedir. Heterohalkalı bileşikler, bu bağlamda umut vaat eden kimyasal ajanlar olarak dikkat çekmektedir. Heterohalkalı bileşikler, halkada iki veya daha fazla farklı atom türüne sahip halkalı bir yapıdır. Karbon dışındaki tüm atomlar heteroatom olarak kabul edilmektedir. Bu bileşikler doğada çok yaygın olarak bulunmakla birlikte geniş bir reaktivite ve stabiliteye sahip olduklarından dolayı çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptirler (Joule & Mills, 2011).

Sonuç olarak, gıda güvenliğinin sağlanmasında biyofilm oluşumunu engelleyen ve ortadan kaldıran yeni stratejilerin geliştirilmesi, halk sağlığını koruma ve gıda kaynaklı hastalıkları önleme açısından büyük önem taşımaktadır. Özellikle izoksazol ve benzimidazol türevleri, çeşitli biyolojik aktivitelere sahip olmaları nedeniyle geniş bir araştırma alanına sahiptir. Tez kapsamında heterohalkalı bileşikler sınıfına dahil olan ve kendi aralarında önemli farmakolojik etkilere sahip olan izoksazol ve 1,4-benzotiyazin halkalarının birlikte yer aldığı benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin türevleri ve benzimidazole türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerden antibakteriyel özelliğe sahip olan bileşiklerin antibiyofilm ve biyofilm eradikasyon özellikleri incelenmiştir.

Bu çalışmada, bu bileşiklerin sentezi, biyolojik aktiviteleri ve gıda güvenliği alanındaki potansiyel kullanım alanları detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bu tez çalışması, bu alanda yapılan araştırmalara katkı sağlamayı ve gelecekteki çalışmalar için bir temel oluşturmayı amaçlamaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Gıda, insan yaşamının sürdürülebilmesi için temel bir ihtiyaç olup insan sağlığını koruma ve yaşam kalitesini sürdürme açısından vazgeçilmez bir unsurdur. Dünyada milyarlarca insan güvenli olmayan gıda nedeniyle risk altındadır. Bu riski, gıda zinciri çiftlikten çatala/tağa kadar uzanırken karşılaşılan zorluklar arasında mikrobiyal ve kimyasal zorluklar ile kişisel ve çevresel hijyen eksiklikleri oluşturmaktadır (Fung vd., 2018).

Gıda güvenliği hem tüketiciler hem de gıda endüstrisi için büyük önem taşımaktadır. Ekonomi, yönetim, toplum ve teknolojinin değişen dünya dinamikleri gıda güvenliği ile ilgili endişeleri de değiştirmektedir. Dünyanın bir köşesinde yetiştirilen, işlenen, paketlenen ve taşınan gıdanın tüketiciye güvenli bir şekilde ulaştırılabilmesi için daha gelişmiş bir iş birliğine ihtiyaç vardır (Dar vd., 2022).

Mikrobiyal yaşam hem doğal hem de endüstriyel ortamlardaki yüzeylerde devam etmektedir ve bundan en çok etkilenen endüstri de gıda endüstrisidir. Gıda artıklarının işleme yüzeylerinde kalması durumunda gıdalarda zaten doğal olarak bulunan bazı mikroorganizmalar, bu artıklar üzerinde gelişme şansı bulmaktadır. Hatta bunlardan *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* gibi bakteriler metabolik aktivitelerini devam ettirirken ortama ürettikleri polimerleri salgılayarak kendilerini koruma altına almaktadırlar. Biyofilmin temizlik ve dezenfeksiyon/sanitasyon da dahil olmak üzere çevresel streslere karşı toleransının, bakteriyel patojenlerin kalıcılığına ve gıda ürünlerinin tekrarlayan çapraz kontaminasyonuna neden olabileceği bilinmektedir (Bridier vd., 2015).

2.1 Biyofilm

Biyofilmler, mikroorganizmaların kendi ürettikleri hücre dışı polimerlerle kaplanmış, yüzeye tutunmuş mikroorganizma topluluklarını ifade etmektedir. Bakteriyel biyofilmler, serbest haldeki bakterilerden farklı olarak ortaya çıkan bir bakteriyel yaşam biçimi olarak kabul edilmektedir. Endüstriyel ve tıbbi ortamlarda yaygın olarak bulunur ve mikroorganizmaların çevresel koşullara direnç göstermelerine yardımcı olur. (Hall ve Mah, 2017).

Bakteriyel biyofilmler, ekzopolisakkarit (EPS) matrislerinin yapısal ve işlevsel özelliklerine bağlı olarak sosyal işbirliği ve antimikrobiyallere karşı geliştirilmiş hayatta kalma stratejisini oluşturmaktadır (Flemming vd., 2016).

Bu matris, topluluk için yapısal sertlik ve dış ortamdan koruma sağlamaktan gen düzenlemesi ve besin adsorpsiyonunu kontrol etmeye kadar çeşitli işlevleri yerine getirmektedir. Biyofilm matrisinin çok yönlü doğasının daha iyi anlaşılması, biyofilmle ilişkili hastalıkları kontrol altına almak için daha etkili yaklaşımlara da yol açabilir.

2.1.1 Biyofilm yapısı

Gıda güvenliğini büyük tehlikeye atan biyofilm enfeksiyonlarını kontrol etmek için yeni stratejilerin geliştirilmesi veya endüstriyel ve biyoteknolojik kullanımlar için biyofilm oluşumunun gücünden yararlanmak için biyofilm matrisinin bilinmesi gerekmektedir (Hobley vd., 2015).

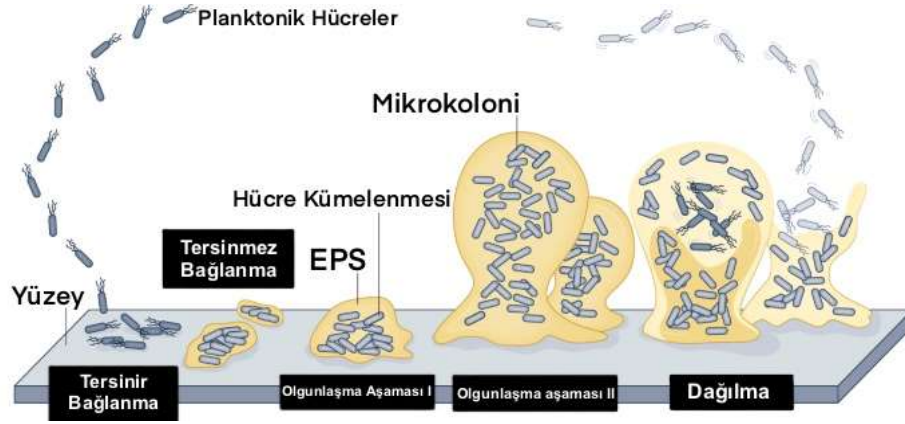
EPS proteinleri ve polisakkaritleri çok çeşitli olmakla birlikte, ortak bileşenler arasında hücre dışı DNA, DNABII (DNA bağlama ve bükme) proteinleri, pili, flagella ve dış membran vezikülleri bulunmaktadır. Flagella, pili gibi hücreyle ilişkili uzantılar bakteriyel yapışmayı ve mekanik stabiliteyi sağlamaktadır. Buna karşılık, salgılanan bakteriyel ekzopolisakkaritler, proteinler, eDNA ve ekstraselüler olarak salınan eRNA, matris iskelesi ve işlevine katkıda bulunmaktadır (Gunn vd., 2016).

Yıllar geçtikçe, EPS'nin işlevsel rolü giderek daha fazla fark edilmiş ve biyofilmlerin ortaya çıkan özellikleriyle yakından ilişkilendirilmiştir. EPS'nin bileşimi ve yapısı, mikroorganizmaların türüne, besin maddelerinin/substratların mevcudiyetine ve konakçı ortamına bağlı olarak büyük ölçüde değişebilmektedir (Karygianni vd., 2020).

2.1.2 Mikrobiyal biyofilm oluşum aşamaları

Biyofilm, bir matris içinde yakın kümelenmiş bakterilerin karmaşık birlikteliğini temsil etmekte; büyümesi bir dizi fiziksel, kimyasal ve biyolojik süreç tarafından yönlendirilmektedir.

Mikrobiyal biyofilm, ilk tersinir bağlanma, tersinmez bağlanma, olgunlaşma aşaması I, olgunlaşma aşaması II ve dağılma gibi beş ardışık aşamadan oluşmaktadır (**Şekil 2.1**).



Şekil 2.1. Biyofilm oluşum aşamaları (Sauer vd., 2022)

İlk aşamada, planktonik mikrobiyal hücreler ya fiziksel kuvvetlerle ya da Pilli veya flagella gibi bakteriyel uzantılarla yüzeye yapışmaktadır. Yüzey işlevselliği, sıcaklık ve basınç gibi farklı faktörler bakteriyel yapışmayı büyük ölçüde değiştirebilmektedir. Bir mikrobiyal hücrenin bir yüzeye tutunması adezyon olarak bilinirken, mikrobiyal hücreler arasındaki bağlanma kohezyon olarak adlandırılmaktadır. Bakterilerin yüzeylere yapışması ile ilgili fiziksel kuvvetler arasında van der Waals kuvvetleri, sterik etkileşimler ve elektrostatik (çift katman) etkileşimler yer almaktadır.

İkinci aşamada, geri dönüşümlü olarak yapışan hücrelerin bir kısmı hareketsiz kalmakta ve çekici kuvvetler itici kuvvetlerden daha büyük olduğunda geri dönüşümsüz olarak yapışmaktadır. Bakterilerin flagella, fimbriae ve pili gibi fiziksel uzantılarının, hücrenin ve yüzeyin elektriksel çift katmanının fiziksel itici kuvvetlerinin üstesinden geldiği ve bakteri ile yüzey arasındaki etkileşimleri pekiştirdiği bildirilmiştir. Hücre yüzeyinin hidrofobikliği, bakteriler hidrofobik polar olmayan bir yüzeye yapıştığında biyofilm oluşumunda da önemli bir rol oynar çünkü yüzey ile bakteri arasındaki hidrofobik etkileşim, aralarındaki itici kuvveti azaltmaktadır. Bu nedenle, özetle, biyofilm gelişiminin birinci ve ikinci aşamalarında, mikrobiyal hücreler başlangıçta ilgili yüzeyle gevşek bir şekilde birleşir, daha sonra bunu spesifik ve güçlü bir yapışma izlemektedir.

Biyofilm oluşumundaki üçüncü aşama olgunlaşma I'dir. Bu aşamada mikrobiyal hücreler, biyofilme özgü genlerin ekspresyonuyla sonuçlanan otoindükleyici sinyallerin üretimiyle birbirleri arasında iletişim kurmaya başlamaktadır. Bu aşamada mikroorganizma, biyofilm ağını stabilize etmek için EPS oluşan bir matris salgılar. Bu bağlamda, *P. aeruginosa*'nın biyofilmin stabilitesini sağlayan aljinat, Pel ve Psl olmak üzere üç polisakkarit ürettiği ve

salgıladığı bildirilmiştir. Aljinat besin maddeleri ve su ile etkileşime girerek biyofilme besin sağlarken, bu aşamada biyofilm çok katmanlı hale gelmekte ve kalınlığı 10 µm'ye kadar artmaktadır.

Bir sonraki aşamada, mikrokoloninin boyutu artmakta ve kalınlığı yaklaşık 100 µm'ye ulaşmaktadır. Biyofilm yapısındaki mikro koloniler genellikle çeşitli mikrobiyal topluluklardan oluşmaktadır. Bu çok türlü mikro-konsorsiyumlar nispeten karmaşık ve koordineli bir şekilde işlev görmekte, yakınlıkları substrat alışverişini, metabolik ürünlerin dağılımını ve toksik son ürünlerin uzaklaştırılmasını geliştirmektedir. Böylece, üçüncü ve dördüncü aşamalar hücrelerin toplanmasını, mikro koloniler oluşturmalarını ve ardından yapışmış hücrelerin büyümesini ve olgunlaşmasını içermektedir. Bu olgunlaşma aşamasında biyofilm, yapısını, fizyolojisini ve metabolizmasını manipüle ederek dış koşullara adapte olmaktadır.

Beşinci aşama, biyofilmin dökülmesini ve sapsız hücrelerin hareketli forma dönmesini işaret eden dağılma aşamasıdır. Son olarak, bu aşamada biyofilm yeni yüzeylere yayılmakta ve kolonize olmaktadır. Bu aşamada, biyofilm içindeki mikrobiyal topluluk, biyofilmi stabilize eden polisakkaritleri kıran ve böylece yeni bir yüzeye kolonizasyon için biyofilm yapısının üstünde bulunan yüzey bakterilerini serbest bırakan farklı sakkarolitik enzimler üretmektedir. Örneğin, *Pseudomonas fluorescens* ve *Pseudomonas aeruginosa* alginat liyaz, *Escherichia coli* N-asetil-heparosan liyaz ve *Streptococcus equi* hiyalüronidaz enzimlerini biyofilm matrisinin parçalanması için üretmektedir. Bu aşamada, mikroorganizmalar flagella proteinlerinin ifadesini düzenlemekte, böylece organizmalar hareketli hale gelmekte ve bakteriler yeni bir bölgeye hareket edebilmektedir. Biyofilm döngüsünde yıkıcı güçler de önemlidir. Çünkü hücrelerin biyofilmden ayrılması enfeksiyonun biyofilmlerden diğer bölgelere yayılmasına yardımcı olmaktadır (Muhammad vd., 2020; Tolker-Nielsen, 2015). *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes*, *Staphylococcus* ve *Bacillus* cinsleri en yaygın biyofilm oluşturma eğilimine sahip olan mikroorganizmalardır (Gupta vd., 2016).

2.1.3 Biyofilm Kontrol ve Önleme Yöntemleri

Bakterileri çevreleyen biyofilm matrisi, bakterileri zorlu çevre ve antibakteriyel tedavilere dirençli hale getirmektedir. Bu nedenle, gıdalardan ve gıda ile temas eden ekipmanlardan biyofilmleri ortadan kaldırmak için önleyici

metodolojiler geliştirmek önemlidir. Hücreslerin yüzeylere tutunması gibi başlangıç süreçleri önlenerek yeni biyofilmlerin oluşumu engellenebilmektedir (Rabin vd., 2015b). Biyofilmlerle mücadele, fiziksel ve/veya mekanik uzaklaştırma, kimyasal temizleme, dezenfektan ve antimikrobiyallerin kullanımına yönelik birkaç yaklaşım bulunmaktadır (Grooters vd., 2024; Sadekuzzaman vd., 2015; Satpathy vd., 2016).

Anti-biyofilm tedavisi için benimsenen mevcut fiziksel stratejiler temel olarak ultrason gücü, elektrik veya manyetik alan, plazma ve ışınlama kullanımına odaklanmıştır (Liu vd., 2022). Gıda işletmelerindeki çelik yüzey modifikasyonları (farklı metal oksitlere sahip nanopartiküller, nanokompozitler, antimikrobiyal polimerler, hidrojeller veya lipozomlar gibi), hücre sinyali inhibisyon stratejileri (laktik ve sitrik asitler gibi), enzimatik bozma stratejileri (selülaşlar, proteaşlar, glikozidazaşlar ve DNAz'lar gibi), termal olmayan plazma işlemleri, bakteriyofajların (P100 gibi), bakteriyosinlerin (nisin gibi), biyosüşfaktanların (likenizin veya süşfaktin gibi) ve bitki uçucu yağlarının (sitril veya karvakrol içeren yağlar gibi) kullanımı gibi çeşitli biyofilm önleme ve bozma yöntemleri bulunmaktadır (Galié vd., 2018; Sharahi vd., 2019).

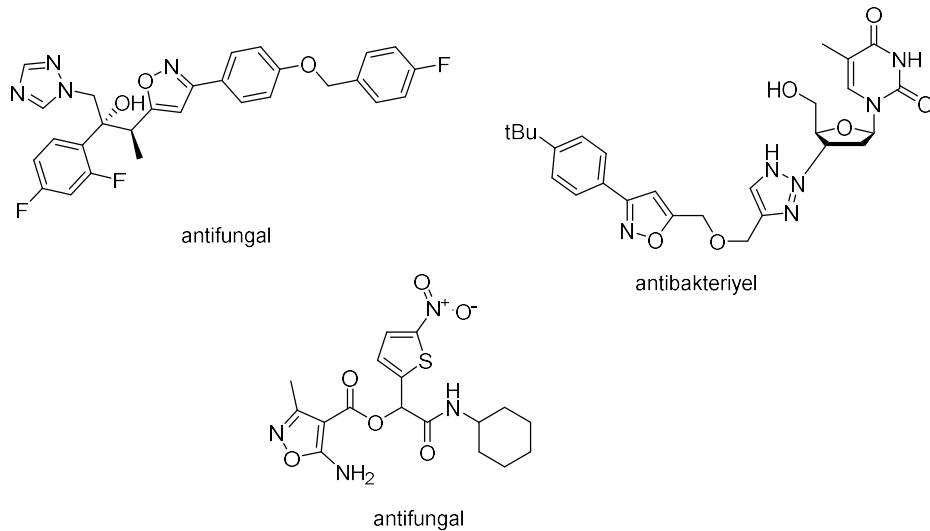
Biyofilm tedavisi olarak çeşitli konsantrasyonlara ve zamana bağlı kimyasal dezenfektanlar kullanılabilir. Mikrobiyal popölasyonları insanlar için güvenli olan seviyelere düşürmek için biyofilm önleme ve bozma yöntemlerinden birisi de kimyasal dezenfektanların kullanılmasıdır. Küçük molekül inhibitörleri, quorum quenching ajanları, antimikrobiyal peptitler (AMP'ler), efflux pompa inhibitörleri (EPI'ler), kuaterner amonyum bileşikleri (QAC'ler) ve doğal fitokonstitüentler gibi yeni kimyasal biyofilm kontrol önlemleri, farklı mekanizmalarla seçici olarak hareket etmek ve dirençle mücadele etmek için beğeni kazanmaktadır. Biyofilm biyogenezi ve mikro ortamlar hakkında ortaya çıkan bilgilerle birlikte, çeşitli ajanlar ve yeni gelişen teknolojiler, biyofilmi yok ederek veya oluşumunu baskılayarak biyofilmi seçici olarak hedeflemek için yeni yaklaşımlar sağlamıştır (Uruén vd., 2020; Vestby vd., 2020).

Biyofilmler çok çeşitli kronik hastalıklara neden olmakta ve bakterilerde antibiyotik direncinin ortaya çıkması nedeniyle, hastalıkların etkili bir şekilde tedavi edilmesini zorlaştırmaktadır. Ayrıca, bugüne kadar mevcut olan antibiyotikler, *in-vivo* toksisiteye neden olabilecek yüksek minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) ve minimum bakterisidal konsantrasyon (MBK) değerleri

nedeniyle bu biyofilm ile ilişkili enfeksiyonları tedavi etmede yetersiz kalmaktadır (Ali vd., 2023). Bununla birlikte, bakteriyel patogenez ve hücreler arası iletişimin giderek daha iyi anlaşılması birçok potansiyel stratejiyi ortaya çıkarmıştır (El-Aleam vd., 2021). Bu nedenle, biyofilmle ilgili enfeksiyonları etkili bir şekilde en aza indirebilecek ve ortadan kaldıracabilecek anti-biyofilm moleküllerinin tasarlanması veya taranması kritik derecede önemlidir (Roy vd., 2018).

Yeni moleküllerin kullanıldığı yaklaşımlar, bakteriyel biyofilmlerin önlenmesi veya yok edilmesi konusunda umut vaat etmektedir (Beloïn vd., 2014). Biyofilmle mücadelede kullanılan kimyasal yaklaşımlardan birisi de heterohalkalı bileşiklerin kullanılmasıdır. İmidazol, fenoller, indol, triazol, sülfid, furanon, bromopirrol, peptidler gibi heterohalkalı moleküller içeren yeni antibiyofilm ajanları biyofilmle mücadeleyi olumlu yönde etkileyeceği düşünülmektedir (Rabin vd., 2015a).

Bu tez çalışmasında sentezlenmiş olan izoksazol türevlerinin antibiyofilm ajan olarak kullanıldığı yayınlar mevcuttur. Benziloksi fenil izoksazol yan zinciri içeren yeni triazoller *C. albicans* SC5314 ve *C. neoformans* H99'da Flukonazol'dan daha etkili anti-biyofilm oluşum aktivitesi göstermiştir (Chi vd., 2023). İzoksazol ve 1,2,3-triazol halkaları içeren timidin türevi *in vitro* biyofilm oluşumu ve virülans faktörlerine karşı mükemmel inhibitör etkisi sergilemiştir (Li vd., 2021). Antimikrobiyal etkileri yüksek olan izoksazol türevlerinin MIC değerlerinden yüksek konsantrasyonları uygulandığında %90'ın üzerinde biyofilm eradikasyon seviyesi elde edilmiştir (Baçhor vd., 2023a).



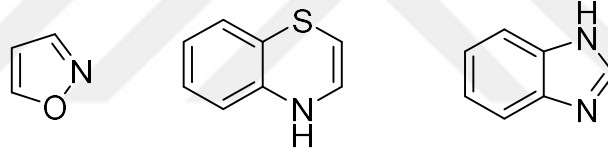
Şekil 2.2. Antibiyofilm izoksazol yapıları

2.2 Heterohalkalı Bileşikler

Heterohalkalı bileşikler genellikle halka boyutuna, türüne ve halkada bulunan heteroatom sayısına göre sınıflandırılmaktadır. Farklı heterohalkalı halka sistemleri arasında, azot içeren heterohalkalı bileşikler doğada daha çok bulunmaktadır. Heteroatomların yanı sıra heterohalkalı yapı iskeletleri biyolojik olarak aktif bileşiklerin %85'inden fazlasında bulunmakta olup en sık olarak da azot içeren yapılar mevcuttur. Bu nedenle heterohalkalı bileşiklerin rolü büyüktür (Heravi ve Zadsirjan, 2020).

Triazoller, tetrazoller, imidazoller/benzimidazoller, pirimidinler ve kinolinler gibi bileşik sınıfları azot içeren heterohalkalı bileşikler sınıfına girmektedir. Bu bileşiklerinin büyük çoğunluğu antibiyotik, antibakteriyel, anti-enflamatuar, antiparazitik ve antitümör aktiviteleri gibi olumlu biyolojik ve farmakolojik özellikler göstermektedir (Ebenezer vd., 2022a).

Bu çalışmada sentezlenecek olan bileşikler, heterohalkalı bileşikler sınıfında yer alan izoksazol, 1,4-benzotiyazin, benzimidazol yapılarını içermektedir.



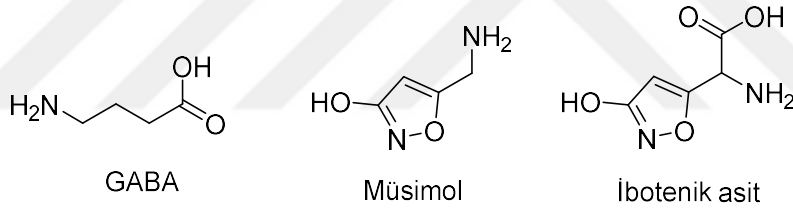
Şekil 2.3. Heterohalkalı bileşikler

Heterohalkalı bileşikler, halkada bir veya daha fazla heteroatom (karbon ve hidrojen atomlarından farklı atomlar) türüne sahip halkalı organik bileşiklerdir. Genellikle halka boyutuna, türüne ve halkada bulunan heteroatom sayısına göre sınıflandırılır. Farklı halka sistemleri arasında azot ve kükürt heterohalkalı bileşikler doğada daha çok bulunmaktadır (Ebenezer vd., 2022b). Bu bileşikler doğada çok yaygın olarak bulunmakla birlikte geniş bir reaktivite ve stabiliteye sahip olduklarından dolayı çeşitli fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklere sahiptirler (Aatif vd., 2022; Shaikh vd., 2018). Ayrıca metabolizmada hayati bir rol oynarlar çünkü yapısal alt birimleri vitaminler, hormonlar, RNA ve DNA'nın pirimidin ve pürin bazları, esansiyel amino asitlerden bazıları, klorofil ve hemoglobin gibi birçok doğal yapılarda bulunmaktadır (D'Souza vd., 2022; Zhang, 2017).

Farmakolojik olarak heterohalkalı bileşiklerin birçoğu klinik kullanımda bulunmaktadır. Penisilin ve sefalosporin gibi antibiyotikler, morfin ve rezerpin gibi alkaloidler doğal olarak bulunan bileşiklerdendir (Davison & Sperry, 2017; Nathwani & Wood, 1993). Bununla birlikte farmasötiklerin büyük çoğunluğu, tarım kimyasalları, boyalar, antikanser maddeleri, analjezikler, hipnotikler, antibakteriyeller, antifungallar, antioksidanlar ve antibiyofilmler gibi yaygın kullanım alanları olan sentetik heterohalkalı bileşiklerdir.

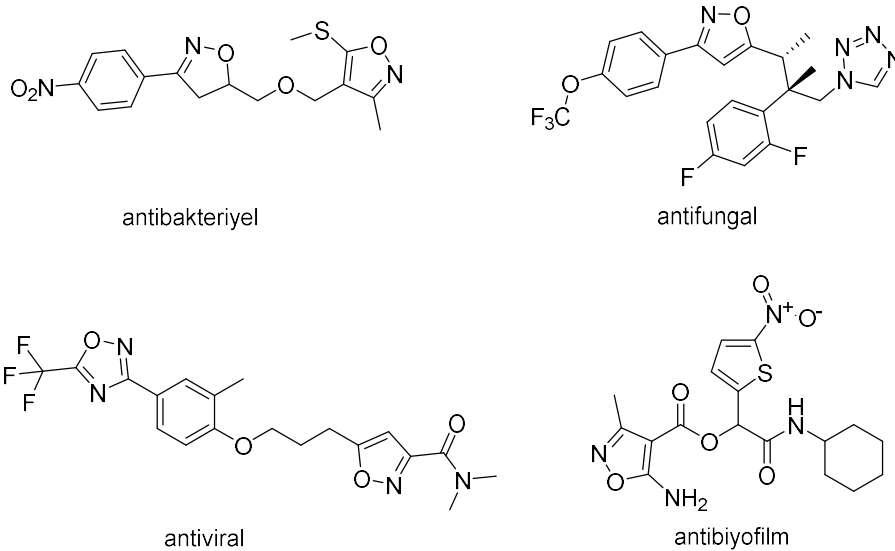
2.2.1 İzoksazol

İzoksazol halkası hedeflediğimiz bileşiklerin yapısında bulunan ve çok sayıda farmakolojik özelliklere sahip olan beş üyeli heterohalkalı bileşiklerin önemli bir üyesidir. İzoksazolün yapısında, bitişik pozisyonda iki heteroatom olan bir oksijen ve bir azot atomu bulunmaktadır (Galenko vd., 2015; Zhu vd., 2018). Doğadan elde edilebilen izoksazol türevleri farklı tepkime yöntemleriyle de elde edilebilmektedirler (Agrawal & Mishra, 2018; Pandhurnekar vd., 2023). Amanita muscaria mantar türlerinden elde edilen müsimol inhibitör nörotransmitter GABA için seçici bir agonist olan izoksazol türevidir (Johnston, 2014).



Şekil 2.4. Amanita muscaria mantarından elde edilen analoglarının yapıları

İzoksazol türevlerini elde etmek için yaygın olarak 1,3-dipolar siklokatalıma, kondensasyon, sikloizomerizasyon ve doğrudan fonksiyonelleştirme reaksiyonları kullanılmaktadır (Morita vd., 2018; Wang vd., 2023). İzoksazoller antibakteriyel (Bommagani vd., 2021; Saleh vd., 2022), antifungal (Ni vd., 2023; Xie vd., 2020), antiviral (Egorova vd., 2020; Yang vd., 2018) ve antibiyofilm (Baçhor vd., 2023b; El Mahmoudi vd., 2023) gibi geniş bir biyolojik aktivite spektrumu sergilemektedirler.

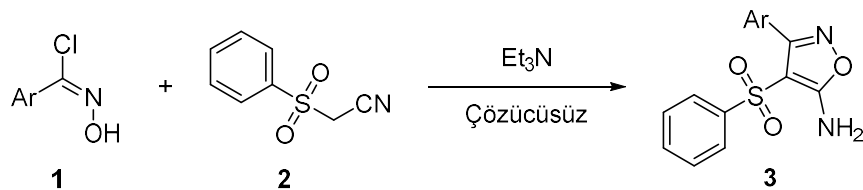


Şekil 2.5. Çeşitli biyolojik aktiviteye sahip izoksazol türevleri

Son yıllarda böcek ve mantar hastalıklarının seçici kontrolü için uygun toksikolojik ve çevresel özelliklere sahip yüksek düzeyde aktif kimyasallar bulmak için yoğun çaba sarf edilmektedir. Yapılan çalışmalar sonucunda izoksazol türevlerinin gelecek vaat eden agrokimyasal ürünler olduğu görülmüştür. Ticari olarak satılan izoksazol tabanlı herbisitler ve fungusitler bulunmaktadır (Bondarenko & Zyk, 2020). Ayrıca son yıllardaki yapılan çalışmalar incelendiğinde izoksazollerin herbisit olarak son derece önemli bileşikler olduğu anlaşılmıştır (Guo vd., 2020; Ye vd., 2019).

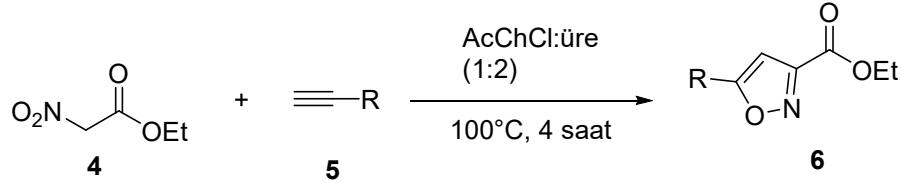
İzoksazol bileşikleri çeşitli organik bileşiklerin sentezlerinde yapı taşı olarak görev almaktadırlar. İzoksazoller aromatik bir yapıya sahip olmalarından dolayı oldukça kararlıdır ve halkadaki oksijen ile azot arasındaki bağ zayıftır. Bu yapısal özellikler 5 üyeli halkanın açılmadan azot ve oksijen atomlarının yer değiştirmesine olanak sağlamakta ve hatta bazı koşullar sağlandığında asiklik geçiş molekülleri elde edilebilmektedir (Galenko vd., 2015).

Yeşil kimya yöntemi kullanılarak α -klorooksimler (1) ve 2-fenilsülfonil asetonitril (2) aracılığıyla 5-aminoisoksazol (3) sentezi için yeni bir yöntem geliştirilmiştir (Altuğ vd., 2014).



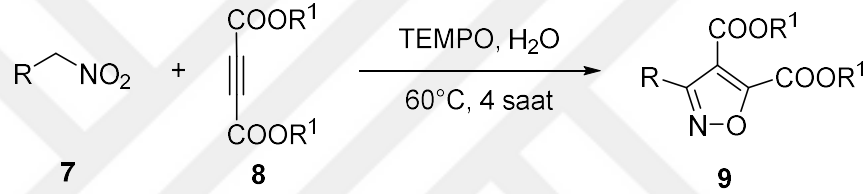
Şekil 2.6. Yeşil kimya yöntemi ile 5-aminoisoksazol sentezi

Farklı 3,5-disüstitüe izokazollerin (6) sentezi, tek kap üç bileşenli reaksiyonda derin ötektik çözücü içinde kolin klorür:ürea kullanılarak sentezlenmiştir (Pérez & Ramón, 2015).



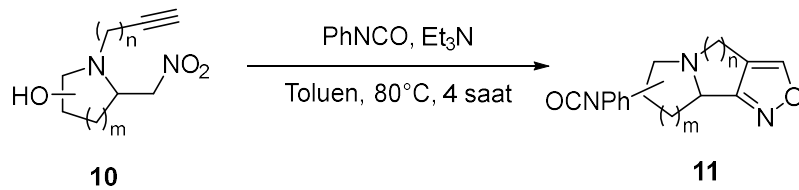
Şekil 2.7. 3,5-disüstitüe izokazollerin sentezi

İzoksazol türevlerinin sentezi Machetti-De Sarlo reaksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, 2,2,6,6-tetrametilpiperidin-N-oksil (TEMPO), primer nitroalkanların (7) alkinlerle (8) siklo kondensasyonunu katalize ederek izoksazol türevleri (9) elde edilmiştir (Vadivelu vd., 2019).



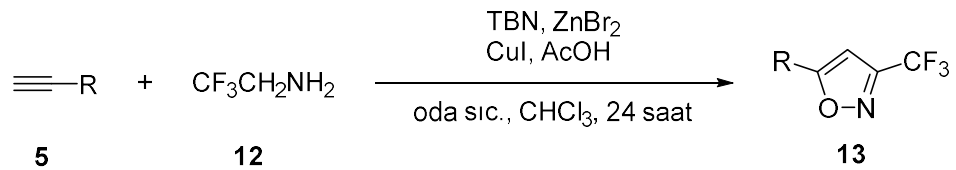
Şekil 2.8. TEMPO katalizörü ile izokazol sentezi

İzoksazol ile kaynaşmış iminoşeker türevlerinin (11) stereoselektif sentezi, nitril oksit öncüleri olarak kullanılan iminoşeker C-nitrometil glikozitlerin (10) 1,3-dipolar siklokatalıma reaksiyonu sonucu gerçekleştirilmiştir (Prasad & Baskaran, 2018).



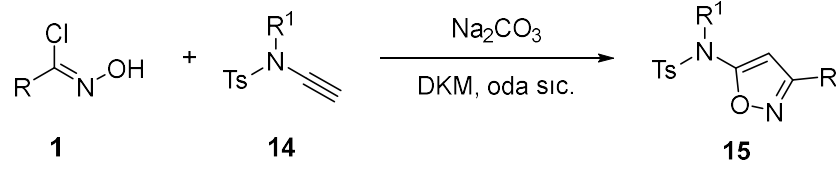
Şekil 2.9. İzoksazol ile kaynaşmış iminoşeker türevlerinin sentezi

Amin (12) ve alkinlerin (5) basit, regioselektif ve bakır katalizörlü reaksiyonu sonucunda flor içeren izoksazollerin (13) sentezi gerçekleştirilmiştir (Zhang vd., 2018).



Şekil 2.10. Flor içeren izoksazol türevlerinin sentezi

Nitril oksitlerin alkil türevleri ile [3+2] siklizasyonu sonucu izoksazol türevleri sentezlenmiştir (Chen & Cui, 2019).



Şekil 2.11. Nitril oksitlerin alkil türevleri ile [3+2] siklizasyonu

Sırasıyla *Cocos nucifera* L., *Solanum lycopersicum* L. ve *Citrus limetta* sularının doğal asit katalizörü olarak kullanıldığı basit, verimli ve çevre dostu tek kap üç bileşenli reaksiyon sonucu izoksazol türevleri elde edilmiştir (Gulati vd., 2021).

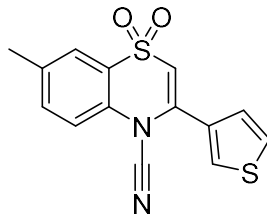
Cryptococcus neoformans'a ve oluşturduğu biyofilme karşı inhibitör aktiviteye sahip yeni antifungal doğal ürün olan Sampangine türevleri trisiklik izoksazoller sentezlenmiştir (Z. Li vd., 2019).

Dimetoksi asetofenonun Claisen reaksiyonu, siklizasyon, alkoksi karbonilasyon, hidroliz, oksidasyon ve aziridin katılması reaksiyonları sonucu sentezlenmiş olan diaziridinil kinon izoksazol türevleri, antimikrobiyal, anti-biyofilm ve sitotoksik aktiviteler açısından incelenmiştir (Swapnaja vd., 2016).

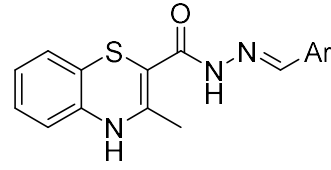
2.2.2 1,4-Benzotiyazin

1,4-Benzotiyazin, hem azot hem de kükürt atomları içeren altı üyeli bir halkaya sahip heterohalkalı bir bileşiktir. Bu yapı, farmakolojik özellikleri ve endüstriyel uygulamaları nedeniyle tıbbi kimya da dahil olmak üzere çeşitli alanlarda önemlidir (Rai vd., 2018). Azot-kükürt heteroatomlarının varlığı ve anti-psikotik ilaç olan fenotiyazinlerle yapısındaki benzerlik, benzotiyazinlerin bir dizi hastalığın tedavisinde ilaç olarak kullanılabilmesine olanak sağlamaktadır (Mir vd., 2020).

1,4-Benzotiyazin türevlerinin *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda antimikrobiyal (Mitra vd., 2016; Tamatam vd., 2019), antiviral (Khalid vd., 2020), antioksidan (Panga vd., 2019), antikanser (Neeraja vd., 2020), COX-2 inhibitörü (Meenakshi vd., 2022; Rai vd., 2018) gibi birçok etki gösterdiği bilinmektedir. Ayrıca Hg tespiti için kolorimetrik florimetrik bir kemosensör olan 1,4-benzotiyazin asetohidrazin rapor edilmiştir (Bahta & Ahmed, 2018).



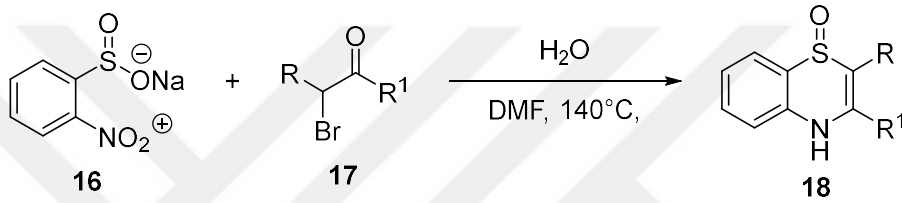
Antimikrobiyal



Antikanser

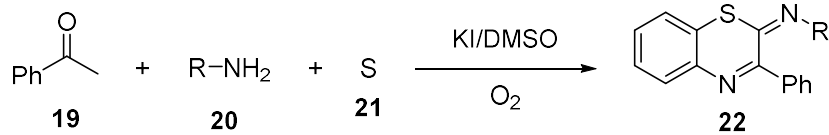
Şekil 2.12. Çeşitli biyolojik aktiviteye sahip 1,4-benzotiyazin türevleri

Yüksek maliyetli metal katalizörler veya zorlu reaksiyon koşulları olmadan sodyum 2-nitrobenzensülfinitlar (16) ve α -bromo ketonların (17) su-gaz değişim reaksiyonu ile benzotiyazin 1,1-dioksit türevleri (18) domino reaksiyonu sonucu kolaylıkla elde edilmiştir (Sharma vd., 2023).



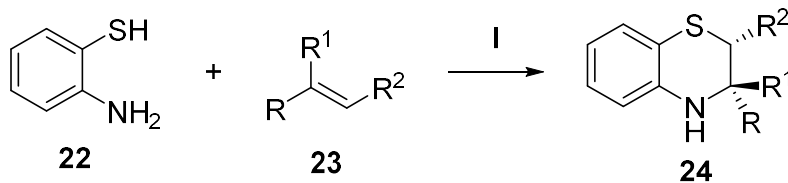
Şekil 2.13. Domino reaksiyonu ile benzotiyazin 1,1-dioksit türevleri sentezi

Elemental kükürt (21) kullanılarak birden fazla C-H bağının fonksiyonelleştirilmesi yoluyla iyodür katalizörlü 1,4-benzotiyazin (22) sentezi gerçekleştirilmiştir (Jiang vd., 2020).



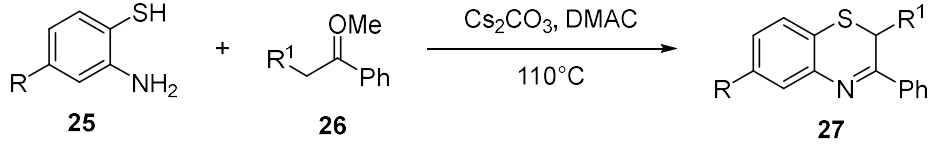
Şekil 2.14. Elemental kükürt kullanılarak 1,4-benzotiyazin sentezi

İyodür katalizörü kullanılarak 2-aminotiyofenol (22) ile bir alken (23) reaksiyonu sonucu regioselektif ve stereoselektif 1,4-benzotiyazin türevleri (24) elde edilmiştir (Alom vd., 2019).



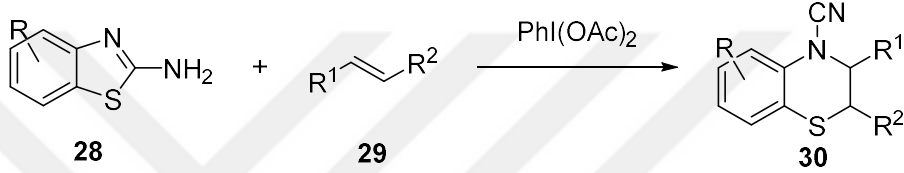
Şekil 2.15. İyodür katalizörü kullanılarak 1,4-benzotiyazin sentezi

Geçiş metali içermeyen koşullar altında 2-aminobenzenetiyol ve α,β -doymamış, siklik, lineer ve fluoroalkil ketonlar dahil olmak üzere çeşitli ketonlar kullanılarak 1,4-benzotiyazin türevleri sentezlenmiştir (Lin vd., 2016).



Şekil 2.16. Geçiş metali kullanılmadan 1,4-benzotiyazin sentezi

2-Aminobenzotiyazollerin (28) olefinlerle (29) metal içermeyen koşullarda oksidatif halka genişlemesi yoluyla dihidro-1,4-benzotiyazin (30) türevleri elde edilmiştir

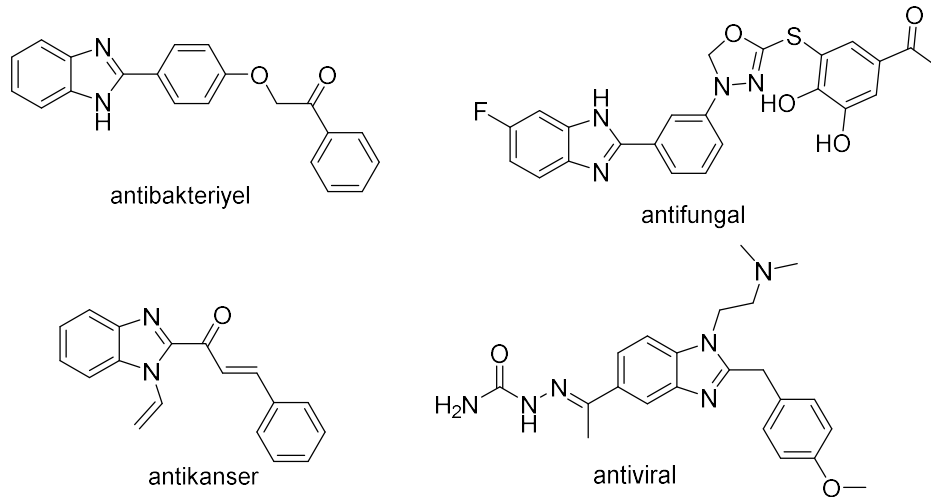


Şekil 2.17. Oksidatif halka genişlemesi yoluyla 1,4-benzotiyazin sentezi

2.2.3 Benzimidazol

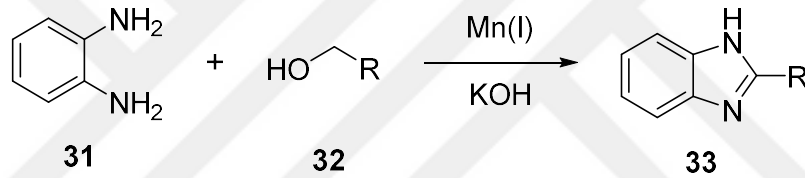
Çeşitli biyolojik aktiviteleri ve klinik uygulamaları göz önüne alındığında, benzimidazol içeren birçok biyoaktif heterohalkalı bileşik birçok araştırmacının ilgi odağı olmuştur. Benzimidazol, nükleotidlerin yapısal bir izosteri olmasından dolayı canlı sistemlerde bulunan çeşitli biyopolimerlerle kolayca etkileşime girebilmektedir. Bu durum göz önüne alındığında, benzimidazol bazlı antibakteriyel ajanların araştırılmasına büyük önem verilmiş ve ilgi çekici profillere sahip birçok yeni kimyasal varlığın keşfedilmesine yol açmıştır (Song & Ma, 2016).

Doğadaki en belirgin benzimidazol bileşiği, B12 vitaminindeki kobalt için eksenel bir ligand görevi gören N-ribozildimetilbenzimidazoldür (Salahuddin vd., 2017). Antihelmintik ilaçlarda bulunan benzimidazol türevleri, ilaç endüstrisinde büyük öneme sahiptir (Elmaaty vd., 2022). Bununla birlikte antibakteriyel (Rep vd., 2022), antikanser (Akhtar vd., 2020; Hsieh vd., 2019), antifungal (Karaburun vd., 2019) ve antiviral (Francesconi vd., 2020) gibi pek çok biyolojik aktiviteye sahip benzimidazol türevleri bulunmaktadır.



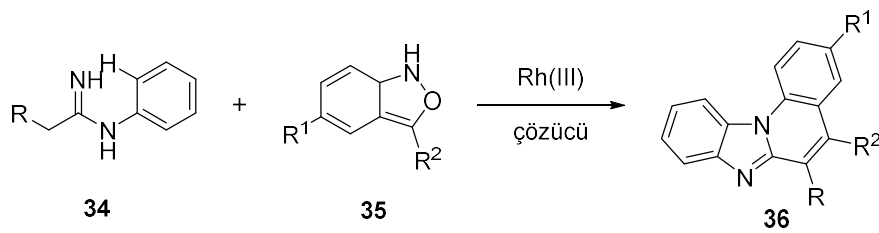
Şekil 2.18. Biyolojik aktiviteye sahip benzimidazol bileşikleri

2-Süstitüe ve 1,2-disüstitüe benzimidazollerin bir manganez (I) kompleksi kullanılarak aromatik diaminin primer alkollerle olan reaksiyonundan benzimidazol türevleri elde edilmiştir (Das vd., 2018).



Şekil 2.19. Mn(I) katalizörü kullanılarak benzimidazol sentezi

Yapılan çalışmada imidamidler ve antranillerin Rh (III) katalizli reaksiyonlarından kaynaşmış benzimidazo [1,2-a] kinolin türevleri basit ve verimli bir şekilde sentezlenmiştir (Hu vd., 2020).



Şekil 2.20. Rh (III) katalizli benzimidazo [1,2-a] kinolin sentezi

2.3 Mikrodalga ile Organik Sentez

Mikrodalga destekli organik sentez, çok çeşitli kimyasal reaksiyonların yürütülmesi için oldukça etkili bir yöntemdir. Mikrodalga ısınlama, daha önce saatler veya günler süren birçok dönüşümün artık dakikalar içinde tamamlanmasıyla reaksiyonları önemli ölçüde hızlandırabilir. Polar moleküller

tarafından etkili ısı transferi ve mikrodalga enerjisinin seçici emilimi buna katkıda bulunur (De La Hoz vd., 2005).

Organik kimyadaki mikrodalga reaksiyonları, geleneksel ısıtma yöntemlerine kıyasla çeşitli kimyasal reaksiyonların verimliliğini artırma, daha hızlı reaksiyon gerçekleştirme ve daha yüksek saflıkta ürün elde etme nedeniyle son yıllarda büyük ilgi görmüştür (Tiwari vd., 2023).

Mikrodalga destekli reaksiyonlar daha az yan ürün üretme eğiliminde olup, bu da daha yüksek verim ve daha saf ürünlerle sonuçlanmaktadır. Mikrodalgalar reaksiyon karışımını doğrudan ısıtarak enerji tüketimini azaltır ve aşırı ısınma riskini en aza indirmektedir. Mikrodalga ısıtma, reaksiyon sıcaklığı üzerinde daha hassas kontrol sağlar ve belirli bileşenleri seçici olarak ısıtarak reaksiyon verimliliğini artırabilmektedir. Mikrodalga reaksiyonları genellikle daha az çözücü kullanımı gerektirir ve çözücüler olmadan gerçekleştirilebilmekte, bu da onları daha çevre dostu bir uygulama haline getirmektedir (Strauss & Rooney, 2010).

Mikrodalga ile reaksiyon gerçekleştirmenin en önemli avantajı hızlı ısıtma ile çok kısa sürede reaksiyonların gerçekleştirilmesidir. Az miktarda çözücü kullanımı gerektiren bu işlem sayesinde çözücü geri kazanımı ve uzaklaştırılması gibi sorunlar da ortadan kaldırılmaktadır (Banik vd., 2021).

Yapılan araştırmada mikrodalga elektromanyetik dalgalar ve moleküller arasındaki etkileşimin mikrodalga ışınlarının aktivasyon enerjisini azaltmak için kısmen dönüştürüldüğünü ve mikrodalga'nın katalitik bir etki sergilediğini göstermektedir (Zhou vd., 2016).

3. MATERYAL VE YÖNTEM

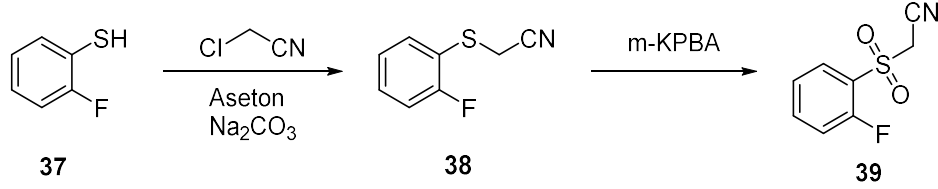
3.1 Materyal

^1H and ^{13}C NMR spektrumları Bruker, Varian ve Jeol spektrometrelerinde (proton için 300, 400, 500 MHz ve karbon için 75 MHz, 100 ve 125 MHz) alınmıştır. IR spektrumları Shimadzu FTIR- 8400S cihazında (KBr pellet) alınmıştır. LC-MS spektrumları Waters 2695 Alliance Micromass ZQ cihazında alınmıştır. HRMS analizleri Waters SYNAPT cihazında yapılmıştır. Erime noktaları MELTEMP cihazında tayin edilmiş ve düzeltilmemiştir. Kolon ve ince tabaka kromatografik ayırmalarda silika jel (Kolon için 230-400 Mesh, İTK için fluoresan indikatörlü (Merck 5735) kullanılmıştır. Sentez aşamasında kullanılan çözücüler Carlo Erba ve Sigma-Aldrich kimyasalları kullanılmıştır. NMR için kullanılan CDCl_3 ve $\text{DMSO}-d_6$ Merck marka olup %99.8 saflıktadır. İTK belirteci olarak permanganat kullanılmıştır. Tepkimeler genel olarak çözücü içinde veya CEM DISCOVER mikrodalga reaktöründe, basınç ayarlı, oda sıcaklığında veya kaynatılarak gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında çalışılan bakterilerin aktifleştirilmesinde Tryptic Soy Broth (TSB; Merck Millipore Corporation), disk difüzyon yönteminde Mueller Hinton Agar (MHA; Merck Millipore Corporation) ve Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) belirlenmesinde Mueller Hinton Broth (MH Broth; Merck Millipore Corporation) besiyerleri kullanılmıştır. Ayrıca bakteri stoklarının muhafazası için gliserol (Merck Millipore Corporation), dilüsyonların hazırlanmasında NaCl (Merck Millipore Corporation) ve MİK analizinde boyama işlemi için 2,3,5-trifenil tetrazolyum klorür (TTC; Merck Millipore Corporation) kullanılmıştır. Siprofloksasin (5µg/disk, Bioanalyse Cat. No ASD05430) diskleri disk difüzyon yönteminde kontrol olarak kullanılmıştır. Analizlerde kullanılan kültürlerin bulanıklığının ayarlanmasında Biosan marka McFarland Densitometre ve biyofilm analizlerinde Allsheng AMR-100T marka ELISA mikropilaka okuyucu kullanılmıştır. Gram pozitif bakteriler *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* ve *Staphylococcus aureus* ile Gram negative bakteriler *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella Typhimurium* tezde çalışılan mikroorganizmalardır.

3.2 Sentez Çalışmaları

3.2.1 Benzoizoksazoltiyazin Türevlerinin Sentezi

3.2.1.1 (2-Florobenzensülfonil)asetonitril (39) Sentezi



Şekil 3.1. (2-Florobenzensülfonil)asetonitril (39) sentezi

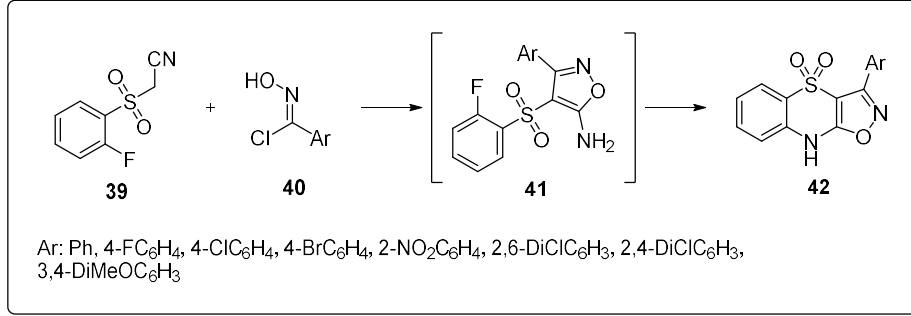
2-Florobenzentiyol (37) (1.0 ek) ve kloroasetonitril (1.0 ek) aseton içerisinde çözüldükten sonra Na₂CO₃ (1.6 ek) karışıma eklenmiş ve reaksiyon karışımı 2 saat 50°C’de ısıtılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra aseton evaporatör ile uzaklaştırılmış ve saflaştırma işlemi uygulanmadan yükseltgeme reaksiyonuna geçilmiştir.

2-((2-Florofenil)tiyo)asetonitril (38) DKM içerisinde çözülerek ve 0°C ‘de meta kloroperbenzoik asit (m-KPBA) yavaş yavaş eklenmiştir. Karışım 2 saat ısıtılıp reaksiyon tamamlandıktan karışım oda sıcaklığında soğumaya bırakılmış ve Na₂S₂O₃ çözeltisi ile reaksiyon sonlandırılmıştır. DKM ile NaHCO₃ çözeltisi, su ve doymuş NaCl çözeltisi kullanılarak ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Na₂SO₄ eklenip kurutulduktan sonra evaporatörde DKM uzaklaştırılmış ve saflaştırmak için kolon kromatografisi (EtOAc1-4Hekzan) uygulanmıştır.

(2-Florobenzensülfonil)asetonitril (39)

Beyaz kristal; 1.85 g, %93 verim. IR (KBr): 3098 (CH), 2994-2943 (CH₂), 2261 (C≡N), 1335-1169 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ = 8.04 (td, J = 8.0, 1.7 Hz, 1H), 7.83 – 7.77 (m, 1H), 7.45 (td, J = 7.9, 0.9 Hz, 1H), 7.35 (t, J = 9.2 Hz, 1H), 4.32 (s, J = 20.0 Hz, 2H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ = 159.6 (d, J = 257.1 Hz), 138.2 (d, J = 9.3 Hz), 131.5 (d, J = 27.0 Hz), 125.4 (d, J = 16.6 Hz), 124.6 (d, J = 14.0 Hz), 117.8 (dd, J = 19.2, 2.4 Hz), 117.5 (d, J = 22.1 Hz), 109.7. MS (TOF ES⁻): m/z (%) = 198 (M-H⁺, %100). HRMS: m/z [M+H]⁺ hesaplanan C₈H₅NO₂FS: 198.0025; bulunan: 198.0016.

3.2.1.2 Geleneksel Yöntemle 42 Numaralı Bileşiğin Sentezlenmesi (42a-k)



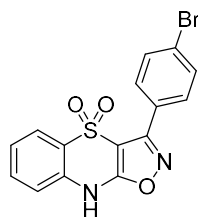
Şekil 3.2. İzoksazolobenzotiyzin-4,4-dioksit (42) sentezi

2-(2-Florofenil)sülfonil asetonitril (39) ile α -klorookzimin (40) Cs₂CO₃ varlığında DMSO içerisindeki reaksiyonuyla in situ elde edilmiştir. (39) ve (40) numaralı bileşikler DMSO içerisinde çözöldükten sonra baz olarak Cs₂CO₃ eklenerek geri soğutucu altında 2 saat ısıtılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra buz-su karışımı eklenerek EtOAc ile ekstraksiyon yapılmıştır. Ardından tuzlu su ile ekstrakte edilip Na₂SO₄ ile kurutulduktan sonra çözücü evaporatörde uzaklaştırılmıştır. Geriye kalan katı benzen-hekzan karışımı ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır.

3.2.1.3 Mikrodalga Kullanılarak 42 Numaralı Bileşiğin Sentezlenmesi

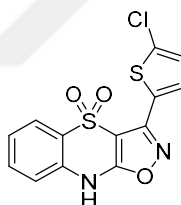
2-(2-Florofenil)sülfonil asetonitril (39) ile α -klorookzimin (42) DMSO içerisinde çözöldükten sonra baz olarak Cs₂CO₃ eklenmiştir. Reaksiyon karışımı mikrodalga cihazında 150°C’de 200W gücünde 10 dk. karıştırılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra buz-su karışımı eklenerek EtOAc ile ekstraksiyon yapılmış ardından tuzlu su ile yıkanmıştır. Na₂SO₄ ile kurutulduktan sonra çözücü evaporatörde uzaklaştırılmış ve geriye kalan katı benzen-hekzan karışımı ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır.

3-(4-Bromofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4,4-dioksit (42a)



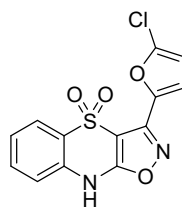
Beyaz katı; 204 mg, %54 (geleneksel), 216 mg, %58 (mikrodalga); mp 253-255 °C; Rf = 0.45 (EtOAc 1:1 Hex). IR (KBr): 3229 (NH), 3090 (CH), 1643 (C=N) and 1269–1142 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.19 (br s, 1H, NH), 8.02 – 8.00 (m, 1H), 7.98 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.83 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H), 7.72 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.41 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.2, 157.3, 133.8, 133.0, 132.4, 129.9, 125.6, 125.3, 125.2, 124.0, 123.3, 118.0, 93.1. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 377 (M+H⁺, %88), 379 (%100), 329 (%20), 307 (%20), 291 (%17). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₅H₁₀⁷⁹BrN₂O₃S: 376.9596; bulunan: 376.9585.

3-(5-Klorotiyofen-2-il)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4,4-dioksit (42b)



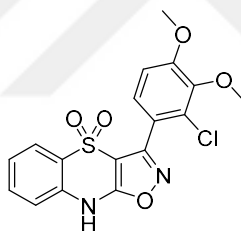
Beyaz katı; 197 mg, %65 (geleneksel), 243 mg, %72 (mikrodalga); mp 215-217 °C; Rf = 0.47 (EtOAc 1:1 Hex). IR (KBr): 3221 (NH), 3082 (CH), 1640 (C=N) and 1265–1138 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.24 (br s, 1H, NH), 8.04 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H), 7.92 – 7.84 (m, 1H), 7.73 (t, *J* = 8.4 Hz, 1H), 7.43 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H), 7.41 – 7.38 (m, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.5, 152.5, 134.3, 133.4, 133.3, 132.2, 128.9, 126.0, 125.7, 124.6, 123.8, 118.6, 92.6. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 339 (M+H⁺, %100), 329 (%53). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₃H₈N₂O₃S₂Cl: 338.9665; bulunan: 338.9674.

3-(5-Klorofuran-2-il)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4,4-dioksit (42c)



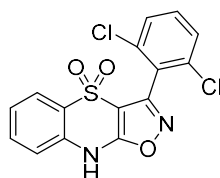
Kahverengi katı; 150 mg, 52% (geleneksel), 206 mg, 64% (mikrodalga); mp 233 °C decomp; R_f = 0.42 (EtOAc 1:1 Hex). IR (KBr): 3225 (NH), 3078 (CH), 1636 (C=N) and 1282–1173 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.20 (br s, 1H, NH), 8.03 (dd, *J* = 8.1, 1.3 Hz, 1H), 7.73 (ddd, *J* = 8.5, 7.3, 1.4 Hz, 1H), 7.44 – 7.41 (m, 2H), 7.41 – 7.38 (m, 1H), 6.86 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 161.7, 147.9, 140.0, 138.9, 133.7, 132.9, 125.3, 124.1, 123.2, 118.1, 118.0, 109.8, 91.3. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 323 (M+H⁺, %100). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₃H₈ClN₂O₃S₂: 322.9893; bulunan: 322.9899.

3-(2-Kloro-4,5-dimetoksifenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4,4-dioksit (42d)



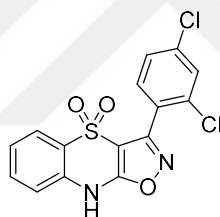
Açık kahverengi katı; 209 mg, %58 (geleneksel), 238 mg, %67 (mikrodalga); mp 197-199 °C; R_f = 0.33 (EtOAc 1:1 Hex). IR (KBr): 3221 (NH), 3090 (CH), 1636 (C=N) and 1261–1142 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.14 (br s, 1H, NH), 7.96 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.72 (ddd, *J* = 8.5, 7.2, 1.4 Hz, 1H), 7.41 (s, 1H), 7.41 – 7.36 (m, 2H), 7.24 (s, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.79 (s, 3H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 161.5, 155.9, 150.9, 147.5, 133.6, 133.1, 125.6, 123.9, 123.7, 123.1, 118.0, 116.4, 114.1, 113.5, 94.5, 56.1 55.8. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 393 (M+H⁺, %100). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₇H₁₄ClN₂O₅S: 393.0312; bulunan: 393.0315.

3-(2,6-Diklorofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4,4-dioksit (42e)



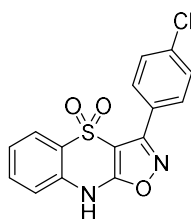
Beyaz katı; 112 mg, 30% (geleneksel), 136 mg, 37% (mikrodalga); mp 228-230 °C; Rf = 0.45 (EtOAc 1:1 Hex). IR (KBr): 3244 (NH), 3090 (CH), 1636 (C=N) and 1261–1142 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.28 (br s, 1H, NH), 7.92 (dd, *J* = 8.2, 1.3 Hz, 1H), 7.76 – 7.72 (m, 1H), 7.72 – 7.63 (m, 3H), 7.45 – 7.41 (m, 1H), 7.40 – 7.37 (m, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 161.9, 154.0, 134.6, 133.6, 133.5, 133.1, 128.5, 125.7, 124.5, 124.2, 122.9, 118.2, 94.4. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 367 (M+H⁺, %100). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₅H₉Cl₂N₂O₃S: 366.9711; bulunan: 366.9706.

3-(2,4-Diklorofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4,4-dioksit (42f)



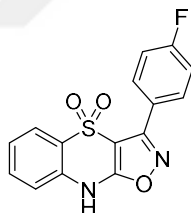
Beyaz katı; 229 mg, %62 (geleneksel), 246 mg, %67 (mikrodalga); mp 229-231°C; Rf = 0.46 (EtOAc 1:1 Hex). IR (KBr): 3214 (NH), 3090 (CH), 1632 (C=N) and 1265–1142 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.20 (br s, 1H, NH), 7.93 (dd, *J* = 8.2, 1.1 Hz, 1H), 7.91 (d, *J* = 2.0 Hz, 1H), 7.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 7.75 – 7.70 (m, 1H), 7.68 (dd, *J* = 8.3, 2.0 Hz, 1H), 7.43-7.36 (m, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.4, 155.6, 137.0, 134.2, 134.0, 133.8, 133.4, 130.4, 128.4, 126.2, 124.9, 124.6, 123.5, 118.7, 95.1. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 367 (M+H⁺, %100), 369 (%65), 329 (%28), 307 (%18), 143 (%12). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₅H₉Cl₂N₂O₃S: 366.9711; bulunan: 366.9703.

3-(4-Klorofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4,4-dioksit (42g)



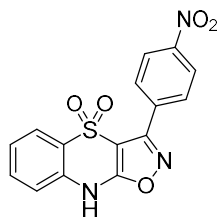
Beyaz katı; 196 mg, %59 (geleneksel), 222 mg, %67 (mikrodalga); mp 241-242°C; R_f = 0.46 (EtOAc 1:1 Hex). IR (KBr): 3244 (NH), 3090 (CH), 1632 (C=N) and 1273–1142 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.16 (br s, 1H, NH), 8.06 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 8.02 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H), 7.74 (app. dd, *J* = 7.2, 1.4 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H), 7.44 – 7.38 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.1, 157.2, 136.3, 133.8, 133.0, 129.7, 129.4, 125.3, 125.2, 124.04, 123.3, 118.0, 93.2. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 333 (M+H⁺, %100), 291 (%35). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₅H₁₀ClN₂O₃S: 333.0101; bulunan: 333.0108.

3-(4-Florofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4,4-dioksit (42h)



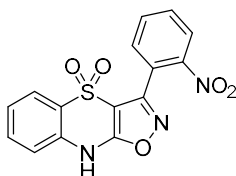
Açık sarı katı; 126 mg, %40 (geleneksel), 184 mg, %58 (mikrodalga); mp 239-240°C; R_f = 0.45 (EtOAc 1:1 Hex). IR (KBr): 3244 (NH), 3090 (CH), 1632 (C=N) and 1269–1142 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ = 13.16 (br s, 1H, NH), 8.11 (dd, *J* = 8.9, ⁴*J*_{H-F} 5.4 Hz, 2H), 8.01 (dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz, 1H), 7.75 – 7.70 (m, 1H), 7.47 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.43 – 7.38 (m, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 164.3 (d, ¹*J*_{C-F} = 249.6 Hz), 162.5, 157.7, 134.2, 133.5, 130.9 (d, ³*J*_{C-F} = 9.0 Hz), 125.8, 124.5, 123.8, 123.3 (d, ⁴*J*_{C-F} = 3.2 Hz), 118.4, 116.9 (d, ²*J*_{C-F} = 22.2 Hz), 93.6. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 317 (M+H⁺, 100%), 281 (15%), 271 (17%). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₅H₁₀FN₂O₃S: 317.0396; bulunan: 317.0407.

3-(4-Nitrofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4,4-dioksit (42i)



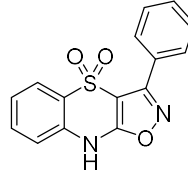
Açık kahverengi katı; 184 mg, %54 (geleneksel), 134 mg, %68 (mikrodalga); mp 285-287°C; Rf = 0.34 (EtOAc 1:1 Hex). IR (KBr): 3221 (NH), 3093 (CH), 1628 (C=N) and 1342–1142 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.18 (br s, 1H, NH), 8.44 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.29 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H), 8.02 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.83 – 7.65 (m, 1H), 7.42 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 160.0, 157.1, 149.6, 134.3, 133.5, 132.8, 129.8, 125.8, 124.9, 124.6, 123.7, 118.6, 93.9. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 344 (M+H⁺, 100%). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₅H₁₀N₃O₅S: 344.0341; bulunan: 344.0324.

3-(2-Nitrofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4,4-dioksit (42j)



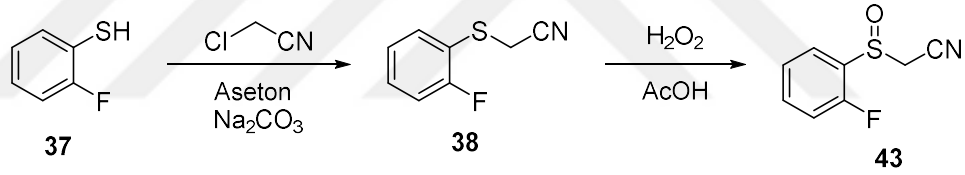
Açık kahverengi katı: 170 mg, %50 (geleneksel), 236 mg, %69 (mikrodalga); mp 253e256°C; Rf = 0.33 (EtOAc 1:1 Hex). IR (KBr): 3221 (NH), 3082 (CH), 1640 (C=N) and 1273–1142 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.26 (br s, 1H, NH), 8.28 (dd, *J* = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 8.01 – 7.96 (m, 1H), 7.95 – 7.88 (m, 3H), 7.73 (ddd, *J* = 8.5, 7.2, 1.4 Hz, 1H), 7.44 – 7.41 (m, 1H), 7.39 (dd, *J* = 8.1, 1.0 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 161.7, 155.6, 147.8, 134.2, 133.7, 133.2, 132.6, 131.8, 125.5, 125.2, 124.1, 122.9, 120.4, 118.2, 94.0. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 344 (M+H⁺, %100), 274 (%25). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₅H₁₀N₃O₅S: 344.0341; bulunan: 344.0344.

3-Fenil-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4,4-dioksit (42k)



Beyaz katı; 136 mg, %46 (geleneksel), 152 mg, %51 (mikrodalga); mp 238-239°C; Rf = 0.45 (EtOAc 1:1 Hex). IR (KBr): 3217 (NH), 3075 (CH), 1640 (C=N) and 1261–1142 (SO₂) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.14 (br s, 1H, NH), 8.08 – 8.04 (m, 2H), 8.01 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.73 (td, *J* = 7.7, 1.3 Hz, 1H), 7.67 – 7.56 (m, 3H), 7.41 (t, *J* = 7.8 Hz, 2H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 162.5, 158.7, 134.2, 133.5, 131.9, 129.7, 128.5, 126.8, 125.9, 124.5, 123.8, 118.4, 93.7. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 299 (M+H⁺, %100). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₅H₁₁N₂O₃S: 299.0490; bulunan: 299.0489.

3.2.1.4 (2-Florobenzensülfinil)asetonitril (43) Sentezi



Şekil 3.3. (2-Florobenzensülfinil)asetonitril (43) sentezi

2-Florobenzentiyl (37) (1.0 ek) ve kloroasetonitril (1.0 ek) aseton içerisinde çözüldükten sonra Na₂CO₃ (1.6 ek) karışıma eklenmiş ve reaksiyon karışımı 2 saat 50°C 'de ısıtılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra aseton evaporatör ile uzaklaştırılmış ve saflaştırma işlemi uygulanmadan yükseltgeme reaksiyonuna geçilmiştir.

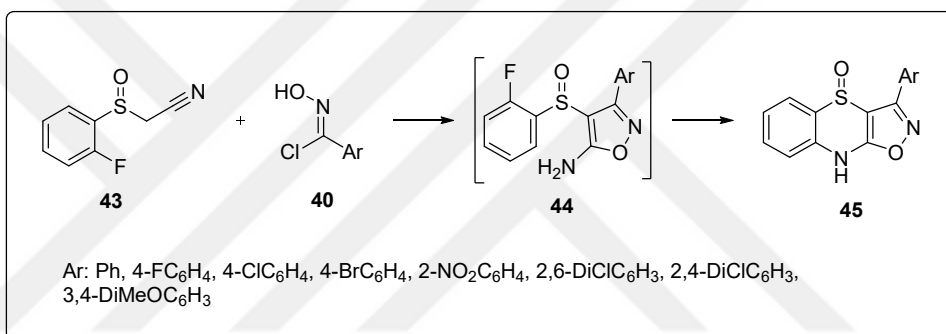
2-((2-Florofenil)tiyo)asetonitril (38) asetik asit içerisinde çözülmüş ve buz banyosunda karıştırılırken %30'luk H₂O₂ eklenmiştir. Daha sonra oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra reaksiyon tamamlandıktan sonra buz-su karışımının içine dökülüp diklorometan (DKM) ve NaHCO₃ ile ekstraksiyon yapılmıştır. Na₂SO₄ eklenip kurutulduktan sonra evaporatörde DKM uzaklaştırılarak saflaştırmak için kolon kromatografisi (EtOAc1:4Hekzan) uygulanmıştır.

(2-Florobenzensülfinil)asetonitril (43)

Sarı yağımsı madde; 1.40 g, %76 verim. IR (KBr): 3090 (CH), 2978- 2928 (CH₂), 2249 (C≡N), 1053 (SO) cm⁻¹. ¹H NMR (500 MHz, CDCl₃) δ 7.98 (t, J = 7.3 Hz, 1H), 7.67 – 7.62 (m, 1H), 7.52 (t, J = 7.6 Hz, 1H), 7.22 (t, J = 9.0 Hz, 1H), 4.06 (d, J = 16.2 Hz, 1H), 3.80 (d, J = 16.2 Hz, 1H). ¹³C NMR (125 MHz, CDCl₃) δ 157.6 (d, J = 247.6 Hz), 134.5, 128.4 (d, J = 15.4 Hz), 126.8 (d, J = 25.0 Hz), 126.0 (d, J = 12.9 Hz), 116.2 (d, J = 18.4 Hz), 115.8 (d, J = 20.8 Hz), 110.6. MS (TOF ES): m/z (%) = 182 (M+H⁺, %100). HRMS: m/z [M+H]⁺ hesaplanan C₈H₅NOFS: 182.0076; bulunan: 182.0076.

3.2.1.5 Benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4-oksit (45)

Sentezinin Genel Yöntemi

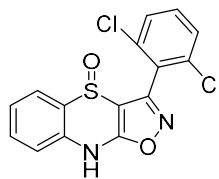


Şekil 3.4. İzoksazolobenzotiyazin-4-oksit (45) sentezi

2-(2-Florofenil)sülfinil asetonitril (43) ile α-klorookzimin (40) Cs₂CO₃ varlığında DMSO içerisindeki reaksiyonuyla in situ elde edilmiştir (Metot A). Bu metot ile istenilen ürünler sentezlenmiş ancak çok düşük verimlerle elde edilmiş olması bizi farklı yollar aramaya sevk etmiştir.

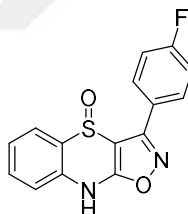
Bu nedenle önce 2-florofenilsülfinil asetonitril (43) ile α-klorookzimin (40) NaOH kullanılarak metanol içerisinde 5-aminoizoksazol (44) elde edilip saflaştırılmıştır. 3-Aril-4-((2-florofenil)sülfinil)izoksazol-5-amin (44) (1.0 ek) DMSO içerisinde çözündükten sonra Cs₂CO₃ (1.0 ek) eklenerek 1 saat geri soğutcu altında karıştırılmıştır. Tepkime tamamlandıktan sonra buzlu su eklenip etil asetat (EtOAc) ile ekstraksiyon yapılmıştır. Daha sonra doymuş tuzlu su ile ekstraksiyon yapıp Na₂SO₄ eklenerek kurutulmuştur. EtOAc uzaklaştırıldıktan sonra saflaştırmak için benzen-hekzan karışımında kristallendirilerek 1,4-benzotiyazin-1-oksit (45) sentezlenmiştir (Metot B).

3-(2,6-Diklorofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4-oksit (45a)



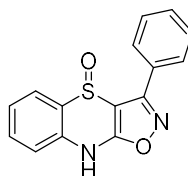
Kahverengi katı; 60 mg, 17% (metot A); mp 209 °C decomp; R_f = 0.31 (EtOAc 2:1 Hex). IR (KBr): 3433 (NH), 1636 (C=N) and 995 (SO) cm⁻¹. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.10 (br s, 1H, NH), 7.96 (dd, *J* = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 7.74 – 7.73 (m, 1H), 7.72 – 7.65 (m, 3H), 7.47 (dd, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 7.36 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 160.9, 157.6, 134.8, 134.4, 133.4, 133.3, 132.9, 132.3, 128.9, 128.6, 124.9, 124.3, 124.1, 118.2, 94.7. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 351 (M+H⁺, 100%). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₅H₉Cl₂N₂O₂S: 350.9762; bulunan: 350.9762.

3-(4-Florofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4-oksit (45b)



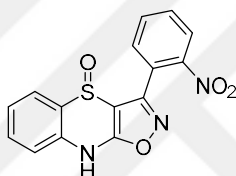
Kahverengi katı; 55 mg, %18 (metot A), mp 165–166 °C; R_f = 0.32 (EtOAc 2:1 Hex). IR (KBr): 3433 (NH), 1636 (C=N) ve 995 (SO) cm⁻¹. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 13.02 (br s, 1H, NH), 8.07 – 8.03 (m, 2H), 8.02 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H), 7.71 (ddd, *J* = 8.5, 7.2, 1.4 Hz, 1H), 7.51 (t, *J* = 8.9 Hz, 2H), 7.46 (dd, *J* = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 7.39 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H). ¹³C NMR (75 MHz, DMSO-*d*₆): δ = 163.7 (d, ¹*J*_{C-F} = 249.0 Hz), 162.0, 161.2, 159.4, 133.2, 132.9, 132.2, 130.1 (d, ³*J*_{C-F} = 8.9 Hz), 123.9, 123.7 (d, ⁴*J*_{C-F} = 2.2 Hz), 117.9, 116.7 (d, ²*J*_{C-F} = 22.1 Hz), 93.0. MS (TOF ES⁺): *m/z* (%) = 301 (M+H⁺, %100). HRMS: *m/z* [M+H]⁺ hesaplanan C₁₅H₁₀FN₂O₂S: 301.0447; bulunan: 301.0144.

3-Fenil-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4-oksit (45c)



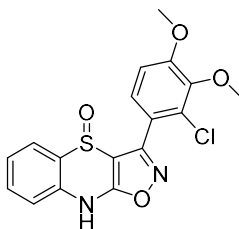
Beyaz katı; 220 mg, %78 (metot B); mp 144–145 °C; R_f = 0.33 (EtOAc 2:1 Hex). IR (KBr): 3445 (NH), 1632 (C=N) and 991 (SO) cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 13.05 (br s, 1H, NH), 8.08 (dd, J = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 8.06 – 8.03 (m, 1H), 8.02 (d, J = 2.5 Hz, 1H), 7.75 (ddd, J = 8.5, 7.2, 1.5 Hz, 1H), 7.72 – 7.65 (m, 3H), 7.50 (dd, J = 8.3, 0.9 Hz, 1H), 7.43 (t, J = 8.1 Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 161.2, 160.2, 133.3, 132.9, 132.2, 131.2, 129.5, 127.6, 127.2, 123.9, 123.7, 118.0, 93.1. MS (TOF ES $^+$): m/z (%) = 283 ($\text{M}+\text{H}^+$, %100). HRMS: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ hesaplanan $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: 283.0541; bulunan: 283.0549.

3-(2-Nitrofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4-oksit (45d)



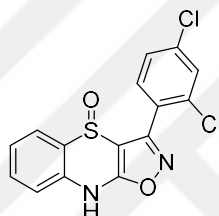
Sarı katı; 272 mg, %83 (metot B); mp 191–193 °C; R_f = 0.14 (EtOAc 2:1 Hex). IR (KBr): 3445 (NH), 1632 (C=N) ve 999 (SO) cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 13.21 (br s, 1H, NH), 8.32 (dd, J = 8.2, 1.1 Hz, 1H), 8.10 – 8.03 (m, 2H), 8.02 – 7.95 (m, 2H), 7.78 (ddd, J = 8.5, 7.3, 1.4 Hz, 1H), 7.54 (dd, J = 8.3, 0.8 Hz, 1H), 7.45 (t, J = 8.1 Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 160.9, 158.5, 148.5, 134.1, 133.2, 133.1, 132.5, 132.4, 131.8, 125.3, 124.2, 123.9, 120.6, 118.2, 94.4. MS (TOF ES $^+$): m/z (%) = 328 ($\text{M}+\text{H}^+$, 100%). HRMS: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ hesaplanan $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_4\text{S}$: 328.0392; bulunan: 328.0399.

3-(2-Kloro-4,5-dimetoksifenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4-oksit (45e)



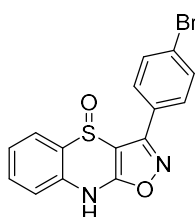
Açık sarı katı; 323 mg, %81 (metot B); mp 164–166 °C; R_f = 0.16 (EtOAc 2:1 Hex). IR (KBr): 3445 (NH), 1624 (C=N) and 984 (SO) cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 13.07 (br s, 1H, NH), 8.06 (dd, J = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 7.76 (ddd, J = 8.5, 7.3, 1.4 Hz, 1H), 7.52 (dd, J = 8.2, 0.8 Hz, 1H), 7.46 – 7.39 (m, 1H), 7.36 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.87 (s, 3H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 160.7, 159.3, 151.0, 147.9, 133.3, 132.9, 132.3, 124.0, 123.9, 123.7, 118.0, 117.1, 113.9, 113.6, 95.0, 56.2, 56.0. MS (TOF ES $^+$): m/z (%) = 377 (M+H $^+$, 100%), 290 (10%), 143 (13%). HRMS: m/z [M+H] $^+$ hesaplanan $\text{C}_{17}\text{H}_{14}\text{ClN}_2\text{O}_4\text{S}$: 377.0363; bulunan: 377.0367.

3-(2,4-Diklorofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4-oksit (45f)



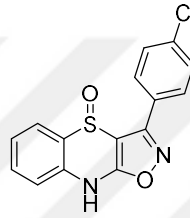
Kahverengi katı; 67 mg, 19% (metot A), 312 mg, %89 (metot B); mp 139–141 °C; R_f = 0.31 (EtOAc 2:1 Hex). IR (KBr): 3433 (NH), 1632 (C=N) and 957 (SO) cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ = 13.14 (br s, 1H, NH), 8.01 (dd, J = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 7.97 (d, J = 1.9 Hz, 1H), 7.79 (d, J = 8.3 Hz, 1H), 7.76 – 7.68 (m, 2H), 7.49 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.39 (t, J = 7.5 Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, DMSO- d_6): δ = 160.9, 158.6, 136.5, 133.4, 133.2, 132.9, 132.8, 132.3, 130.2, 128.2, 124.8, 124.1, 124.0, 118.1, 95.0. MS (TOF ES $^+$): m/z (%) = 351 (M+H $^+$, %100), 203 (%22), 143 (%17). HRMS: m/z [M+H] $^+$ hesaplanan $\text{C}_{15}\text{H}_9\text{Cl}_2\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$: 350.9762; bulunan: 350.9760.

3-(4-Bromofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4-oksit (45g)



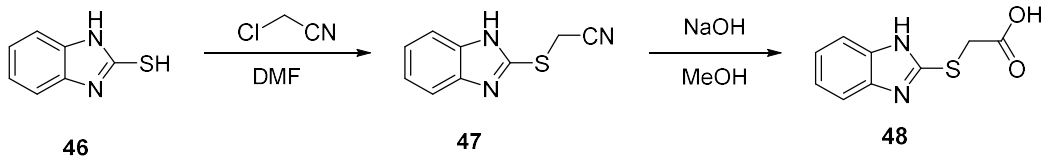
Açık kahverengi katı; 70 mg, %19 (metot A); mp 175–176 °C; R_f = 0.34 (EtOAc 2:1 Hex). IR (KBr): 3445 (NH), 1628 (C=N) and 991 (SO) cm^{-1} . ^1H NMR (300 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 13.05 (br s, 1H, NH), 8.04 (dd, J = 7.9, 1.3 Hz, 1H), 7.93 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.87 (d, J = 8.7 Hz, 2H), 7.71 (ddd, J = 8.4, 7.4, 1.4 Hz, 1H), 7.46 (d, J = 7.5 Hz, 1H), 7.39 (t, J = 7.5 Hz, 1H). ^{13}C NMR (75 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 161.3, 159.4, 133.2, 133.0, 132.6, 132.2, 129.5, 126.3, 124.8, 124.0, 123.6, 118.0, 93.0. MS (TOF ES^+): m/z (%) = 361 ($\text{M}+\text{H}^+$, %98), 363 (%100). HRMS: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ hesaplanan $\text{C}_{15}\text{H}_{10}^{79}\text{BrN}_2\text{O}_2\text{S}$: 360.9646; bulunan: 360.9646.

3-(4-Klorofenil)-9H-benzo[b]izoksazolo[5,4-e][1,4]tiyazin 4-oksit (45h)



Kahverengi katı; 50 mg, %16 (metot A), 257 mg %81 (metot B), mp 165–167 °C; R_f = 0.31 (EtOAc 2:1 Hex). IR (KBr): 3433 (NH), 1632 (C=N) and 991 (SO) cm^{-1} . ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 12.97 (br s, 1H, NH), 8.01 (dd, J = 7.9, 1.1 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.71 (d, J = 8.5 Hz, 2H), 7.68 (dd, J = 8.4, 1.2 Hz, 1H), 7.44 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 7.37 (t, J = 7.5 Hz, 1H). ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$): δ = 161.8, 159.8, 136.5, 133.7, 133.4, 132.7, 130.1, 129.8, 126.5, 124.4, 124.1, 118.5, 93.5. MS (TOF ES^+): m/z (%) = 317 ($\text{M}+\text{H}^+$, %100), 271 (%40), 260 (%32). HRMS: m/z [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ hesaplanan $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$: 317.0152; bulunan: 317.0156.

3.2.2 Benzoimidazoltiyo Asetat Türevleri



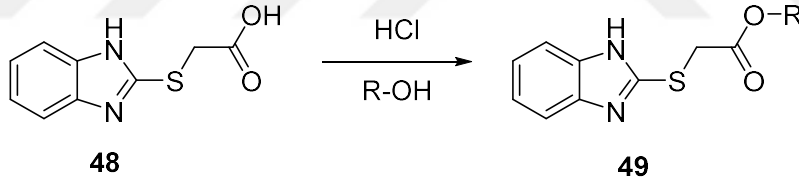
Şekil 3.5. Benzoimidazoltiyo asetik asit (48) sentezi

Benzimidazol tiyol (**46**) ve kloroasetonitril DMF içerisinde oda sıcaklığında bir gece karıştırılmıştır. TLC ile kontrol edilip reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldıktan sonra buz-su karışımı reaksiyon ortamına eklenerek oluşan çökelti süzülerek kurumaya bırakılmıştır. Etil asetat-heksan karışımı ile kristallendirme yapılarak benzimidazoltiyo asetonitril (**47**) nolu bileşik saflaştırılmıştır.

Elde edilen **47** nolu bileşik MeOH içerisinde ısıtıldıktan sonra 4M NaOH reaksiyona eklenmiş ve 4-5 saat geri soğutucu altında ısıtılmıştır. Reaksiyon kontrol edilip bittiği anlaşıldıktan sonra HCl çözeltisi ile asitlendirilmiştir. Oluşan çökelti süzülerek kurumaya bırakılmıştır.

2-((1H-benzo[d]imidazol-2-il)tiyo)asetik asit (**48**)

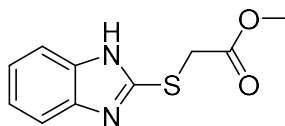
^1H NMR (500 MHz, DMSO) δ 7.56 (dd, $J = 6.0, 3.2$ Hz, 2H), 7.29 (dd, $J = 6.0, 3.1$ Hz, 2H), 4.33 (s, 2H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.8, 148.5, 122.6, 77.29, 5.19, 34.3.



Şekil 3.6. Benzoimidazoltiyo asetat türevlerinin (**49**) sentezi

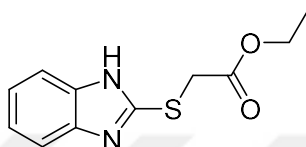
Bir önceki aşamada sentezlenmiş olan benzimidazoltiyo asetik asit (**48**) farklı alkoller içerisinde ısıtılmış ve %37'lik HCl çözeltisi (5-10 damla) eklenerek geri soğutucu altında kullanılan alkolün kaynama noktasına göre ısıtılmıştır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra çözeltinin pH'ı 7'ye ayarlanması için doymuş NaHCO_3 çözeltisi eklenmiştir. Daha sonra çözeltiye DKM eklenerek su ve doymuş NaCl çözeltisi ile ekstraksiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Ekstraksiyondaki organik çözeltiye Na_2SO_4 eklenip kurutulduktan sonra süzülerek DKM evaporatörde uçurularak benzimidazoltiyo asetat türevleri (**49**) sentezlenmiştir.

Metil 2-((1H-benzo[d]imidazol-2-il)tiyo)asetat (**49a**)



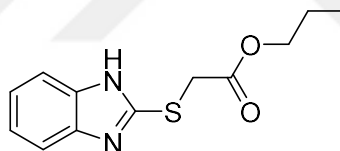
^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.29 (s, 1H), 7.54 (s, 2H), 7.25 – 7.18 (m, 2H), 4.05 (s, 2H), 3.78 (s, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.8, 148.5, 122.6, 77.3, 53.2, 34.3.

Etil 2-((1H-benzo[d]imidazol-2-yl)tiyo)asetat (49b)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.44 (s, 1H), 7.54 (s, 2H), 7.25 – 7.18 (m, 2H), 4.24 (qd, $J = 7.1, 3.1$ Hz, 2H), 4.04 (d, $J = 3.1$ Hz, 2H), 1.31 – 1.25 (m, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.4, 148.6, 122.5, 77.3, 62.4, 34.6, 14.0.

Propil 2-((1H-benzo[d]imidazol-2-yl)tiyo)asetat (49c)



^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) δ 11.31 (s, 1H), 7.54 (s, 2H), 7.24 – 7.18 (m, 2H), 4.15 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 4.04 (s, 2H), 1.72 – 1.63 (m, 2H), 0.94 (t, $J = 7.4$ Hz, 3H). ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) δ 170.5, 148.6, 122.5, 77.3, 68.0, 34.5, 21.8, 10.3.

3.3 Mikrobiyolojik Çalışmalar

3.3.1 Antibakteriyel Aktivite Testi (Disk Difüzyon Yöntemi)

Bileşiklerin Gram pozitif bakteriler *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus* ve *Staphylococcus aureus* ile Gram negative bakteriler *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella Typhimurium* bakterilerine karşı disk difüzyon antibakteriyel aktivite testi uygulanmıştır. Test edilecek olan bakteriler Mueller Hinton broth besiyerinde 37°C'de 18-24 saat inkübasyona bırakılmıştır. Sentezlenmiş olan bileşiklerin 10 mg/mL konsantrasyona sahip stok çözeltileri DMSO içerisinde hazırlanmıştır. Bakterilerin 18 saatlik kültürlerinin yoğunlukları %0,85'lik fizyolojik tuzlu su (FTS) içinde 0,5 McFarland'a ayarlanarak yapılmıştır. Daha önceden hazırlanmış Muller Hilton agar (MHA) üzerine swap yöntemiyle bakterilerin ekimleri yapılmıştır. Laminar Air Flow kabinde 5 dakika kurumaya bırakılan petrilere heterohalkalı bileşiklerin stok çözeltilerden 15 µL damlatılmıştır. Siprofloksasin (5µg/disk, Bioanalyse Cat. No ASD05430) diskleri referans antibiyotik olarak kullanılmıştır. Besiyerleri 37°C'de 20-24 saat inkübasyona bırakılmış, süre sonunda disklerin etrafında oluşan inhibisyon zonları milimetre cinsinden ölçülmüştür.

3.3.2 Mikrodilüsyon Broth Yöntemi ile Antibakteriyel Aktivite Tayini

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak antibakteriyel etkileri gözlemlenen bileşiklerin *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine karşı minimum inhibitör konsantrasyon (MİK) değerleri bulunmuştur. MİK değerleri mikrodilüsyon broth yöntemine göre 96 kuyucuklu mikrotitrasyon plakalarında TTC çözeltileri kullanılarak tespit edilmiştir.

18-24 saatlik aktif bakteri kültürlerinden %0,85'lik FTS içerisinde 0.5 McFarland yoğunluğuna ayarlanmıştır. 96 kuyucuklu steril mikropalakalarının kontrol kuyucukları hariç diğer tüm kuyucuklarına 100 µL MHB besiyeri eklenmiştir. Plakaların ilk sütundaki kuyucuklara kontrol olarak sadece MHB ve son sütundaki kuyucuklara ise 100 µL MHB ve 5 µL bakteri ilave edilmiştir. İkinci sütuna sentezlenen maddelerin stok çözeltilerinden (10 mg/mL) 10 µL ve 190 µL MHB ilave edilmiştir. Böylece plakaların ilk sütundaki kuyucuklarındaki bileşiklerin

konsantrasyonları 500 µg/mL olarak ayarlanmıştır. 3-11. sütundaki kuyucuklara 100 µL MHB eklenmiştir. 2. sütundaki kuyucuktan 100 µL alınarak 2. sütundaki kuyucuğa eklenerek pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. 2. sütundaki kuyucuktan 100 µL alınarak 3. sütundaki kuyucuğa aktararak seyreltme işlemine 11. sütundaki kuyucuklara kadar devam edilmiştir. Daha sonra 0.5 McFarland (10^7 - 10^8 kob/mL) bulanıklığındaki bakterilerden 5 µL eklenerek pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Üzeri kapatılan plaklar 18-24 saat 37°C de inkübasyona bırakılmıştır.

MİK değerleri belirlemek için distile suyla hazırlanıp 0.22 µm filtreden geçirilerek sterilize edilen %0.015'lik TTC çözeltisi kullanılmıştır. Bu çözeltiden her kuyucuğa 40 µL eklenip 15-20 dk. inkübatörde bekletilmiştir. Gelişmenin olduğu kuyucuklar pembe renklenirken gelişmenin olmadığı kuyucuklar ise renksiz kalmıştır. MİK değerleri plakadaki kuyucukların TTC çözeltisinin oluşturmuş olduğu renk değişikliğine göre değerlendirilerek renklenmenin olmadığı kuyucukların en düşük konsantrasyonu MİK değeri olarak bulunmuştur (Jara vd., 2022).

3.3.3 Biyofilm Minimum İnhibitör Konsantrasyonu (MBİK)

MİK değerleri belirlenen bileşiklerin MİK, MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonlarındaki biyofilm oluşumunu inhibe etkisinin değerlendirilmesi için 96 kuyucuklu mikrolaklar kullanılarak kristal viyole yöntemi uygulanmıştır (Haney vd., 2021). Bakterilerin (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*) 18-24 saatlik kültürlerinin konsantrasyonları 0.5 McFarland bulanıklık standardına göre ayarlanmıştır. MİK, MİK/2 ve MİK/4 konsantrasyonlarındaki bileşikler %2 glukoz eklenen TSB ile kuyucuklarda seyreltilmiştir. 0.5 McFarland bulanıklıktaki bakteri kültürlerinden ilk sütun hariç diğer kuyucuklara 5 µL eklenmiş ve pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Kontrol olarak ilk sütunda sadece TSB son sütunda ise TSB+bakteri bulunmaktadır. Üstü kapanan mikrolakalar 37°C'de, 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Plakadaki kuyucuklar ters çevrilerek boşaltılmış ve 3 kere %0,85'lik 300 µL FTS ile dikkatlice yıkanmıştır. Biyofilmlerin boyanması için tüm kuyucuklara 200 µL %1'lik kristal viyole eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk. beklenmiştir. Süre sonunda plakalar ters çevrilerek içeriği boşaltılmış ve piset kullanılarak saf su ile yıkanmıştır. Plakaların her kuyucuğuna 205 µL %96'lık EtOH eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dk. beklenerek kristal viyolenin çözünmesi sağlanmıştır.

Mikroplaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır.

3.3.4 Minimum Biyofilm Eradikasyon Konsantrasyonu (MBEK)

Bileşiklerin biyofilm eradikasyon (oluşan biyofilmin giderilmesi) etkisinin değerlendirilmesi için 96 kuyucuklu mikroplakalar kullanılarak kristal viyole yöntemi uygulanmıştır. Bakterilerin (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus*) 18-24 saatlik kültürlerinin konsantrasyonları 0.5 McFarland bulanıklık standardına göre ayarlanmıştır. %2 glukoz içeren TSB içeren kuyucuklara bakteri kültürlerinden ilk sütun hariç diğer kuyucuklara 5 µL eklenmiş ve pipetaj yapılarak karıştırılmıştır. Kontrol olarak ilk sütundaki kuyucuklarda %2 TSB bulunmaktadır. Üstü kapanan mikroplakalar 37°C’de, 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda plaka ters çevrilerek kuyucuklar boşaltılmış ve 3 kere %0,85’lik 300 µL FTS ile nazikçe yıkanmıştır. MİK değerlerindeki bileşikler %2 TSB içeren kuyucuklara eklenerek 37°C’de, 24 saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda plaka ters çevrilerek kuyucuklar boşaltılmış ve 3 kere %0,85’lik 300 µL FTS ile dikkatlice yıkanmıştır. Biyofilmlerin boyanması için tüm kuyucuklara 200 µL %1’lik kristal viyole eklenmiş ve oda sıcaklığında 30 dk. beklenmiştir. Süre sonunda plakalar ters çevrilerek içeriği boşaltılmış ve piset kullanılarak saf su ile yıkanmıştır. Plakaların her kuyucuğuna 205 µL %96’lık EtOH eklenmiş ve oda sıcaklığında 15 dk. beklenerek kristal viyolenin çözünmesi sağlanmıştır. Mikroplaka okuyucuda 570 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçüm yapılmıştır.

4. BULGULAR

4.1 Sentez Çalışmaları

Bu tez çalışmasında izoksazolo- 1,4-benzotiyazin-4 oksit, izoksazolo- 1,4-benzotiyazin-4,4 dioksitlerin ve benzoimidazol-2-il)tiyo)asetat türevlerinin sentezleri gerçekleştirilmiştir.

2-((2-Florofenil)tiyo)asetonitrilin (**38**) m-KPBA ile yükseltgenmesinden 2-((2-florofenil)sülfonil)asetonitril (**39**) ve H₂O₂ ile yükseltgenmesinden 2-((2-florofenil)sülfinil)asetonitril (**43**) elde edilmiştir. Daha sonra, **39** numaralı bileşik α -klorooksim (**40**) ile reaksiyona girerek izoksazolo [5,4-e][1,4]benzotiyazin 4,4-dioksitler (**42 a-k**) sentezlenmiş ve reaksiyon koşulları geleneksel ve mikrodalga ısıtma yöntemleri ile optimize edilmiştir. Mikrodalga ısıtmalı reaksiyonlar, geleneksel ısıtmaya göre biraz daha yüksek verim ve daha kısa reaksiyon sürelerine sahiptir (**Tablo 4.1**). Reaksiyon verimleri, α -klorooksimlerin hem elektron çeken hem de elektron salan sübstitüentleri için benzerdir.

Tablo 4.1. 1,4-Benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin elde edilme yöntemlerine göre verimleri

	Bileşik	Ar	Verim (%) Geleneksel	Verim (%) Mikrodalga
1	42a	4-Br-C ₆ H ₄	54	58
2	42b	5-Cl-2-thienyl	65	72
3	42c	5-Cl-2-furyl	52	64
4	42d	2-Cl-4,5-diMeO-C ₆ H ₃	58	67
5	42e	2,6-di-ClC ₆ H ₃	30	37
6	42f	2,4-di-ClC ₆ H ₃	53	67
7	42g	4-Cl-C ₆ H ₄	59	67
8	42h	4-F-C ₆ H ₄	40	58

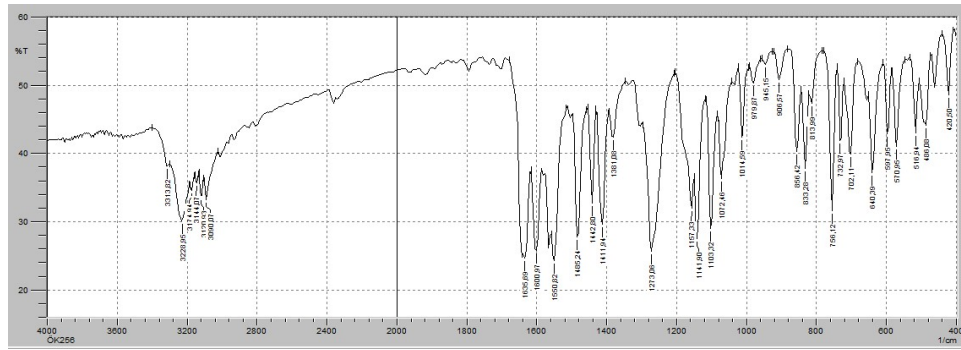
9	42i	4-O ₂ N-C ₆ H ₄	54	68
10	42j	2-O ₂ N-C ₆ H ₄	50	69
11	42k	C ₆ H ₅	46	51

Reaksiyonda sülfon işlevselliğinin kapsamı incelendikten sonra, izoksazolo-1,4- benzotiyazin-4-oksitler (**45 a-h**) sentezlenmiştir. Tek kap reaksiyonu (**Metot A**) gerçekleştirildiğinde düşük verimle elde edildiğinden, önce 5-aminoizoksazol ara maddesi sentezlenip izolasyonu sağlandıktan sonra Cs₂CO₃ varlığında yüksek kaynama noktalı aprotik çözücülerde (DMSO veya DMF) ısıtılarak (**Metot A**) izoksazolo-1,4-benzotiyazin 4-oksitler daha iyi verimle elde edilmiştir (**Tablo 4.2**).

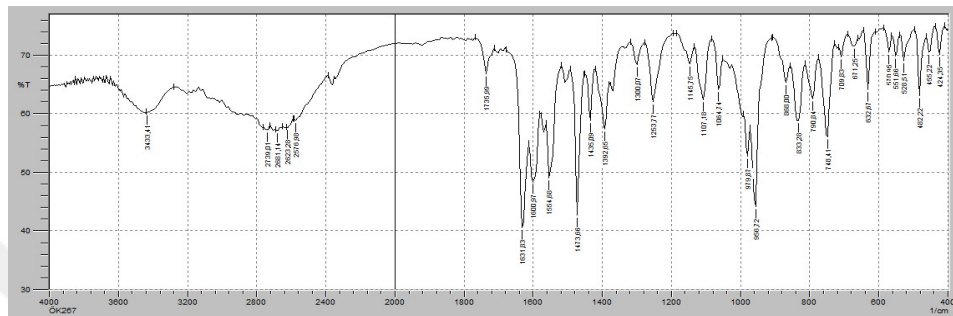
Tablo 4.2. 1,4-Benzotiyazin-4-oksit türevlerinin elde edilme yöntemlerine göre verimleri

	Bileşik	Ar	Verim (%) Metot A	Verim (%) Metot B
1	45a	2,6-di-ClC ₆ H ₃	17	
2	45b	4-F-C ₆ H ₄	18	
3	45c	C ₆ H ₅		73
4	45d	2-O ₂ NC ₆ H ₄		83
5	45e	2-Cl-4,5-diMeOC ₆ H ₃		81
6	45f	2,4-di-ClC ₆ H ₃	19	
7	45g	4-Br-C ₆ H ₄	19	
8	45h	4-Cl-C ₆ H ₄	16	81

Tüm bileşiklerin yapıları IR, ¹H ve ¹³C NMR spektroskopisi ve HRMS yöntemlerine göre aydınlatılmıştır. **42 a-k** bileşiklerinin IR'si 3244 cm⁻¹ ve 3214 cm⁻¹ arasında NH gerilmesi göstermiştir. **42 a-k** bileşiklerinin SO₂ asimetrik gerilmesi 1342-1261 cm⁻¹'de ve simetrik gerilmesi 1173-1142 cm⁻¹'de görülebilir (**Şekil 4.1**). **45 a-h** bileşiklerinin NH gerilme frekansları 3445 ve 3433 cm⁻¹ ve SO frekansı 999-957 cm⁻¹'de görülmektedir (**Şekil 4.2**).

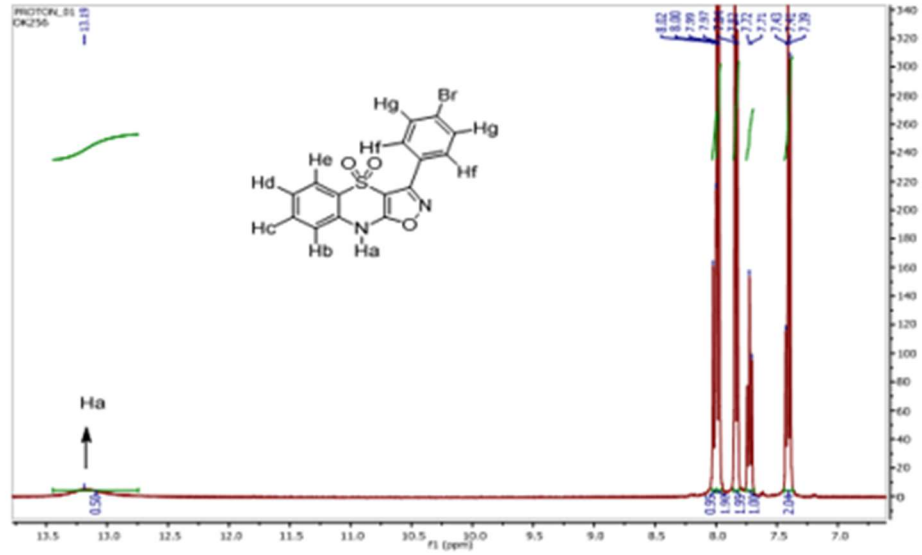


Şekil 4.1. Benzotiyazinizoksazolosülfonun IR spektrumu

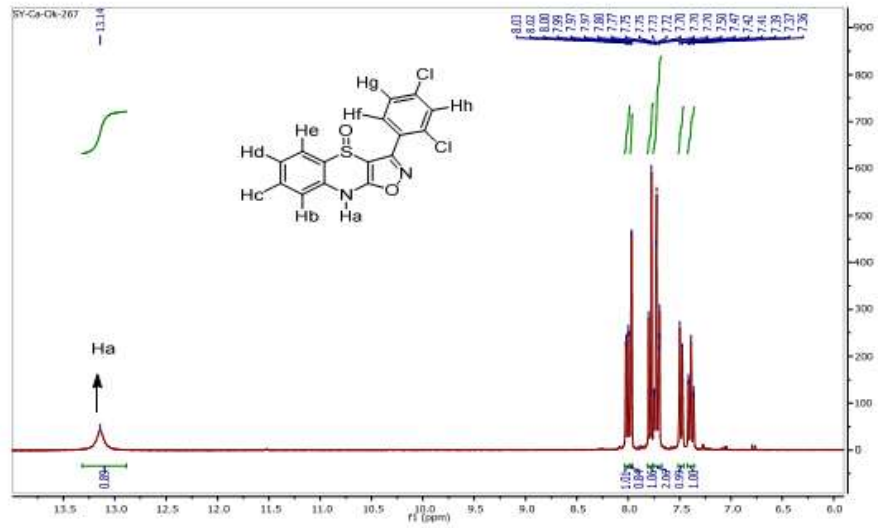


Şekil 4.2. Benzotiyazinizoksazolosülfoksitin IR spektrumu

39 ve **43** numaralı bileşiklerin IR spektrumu incelendiğinde $C\equiv N$ ve CH_2 absorpsiyonlarının kaybolup, **42** ve **45** numaralı bileşiklerde NH absorpsiyonunun olduğu gözlemlenmiştir. Bileşiklerin ^1H NMR spektrumları incelendiğinde, her birinin kendine özel proton sinyalleri ile ürünlerin oluşumları belirlenmiştir. Örneğin; **39** numaralı bileşikte CH_2 protonları 3.95 ppm'de dublet, **43** numaralı bileşik için 4.32 ppm civarında CH_2 için singlet pikler gözlemlenirken **42** ve **45** numaralı bileşiklerde bu proton kaymaları gözlemlenmemektedir. **42** ve **45** numaralı benzoizoksazolotiyazinlerdeki NH protonu bu bileşiklerin oluşumlarının ana göstergeleridir. Bu bileşiklerin spektrumlarındaki 13.14 ve 13.19 ppm civarında gelen NH proton sinyali bu bileşiklere ait özel proton kaymalarıdır (**Şekil 4.3** ve **Şekil 4.4**).

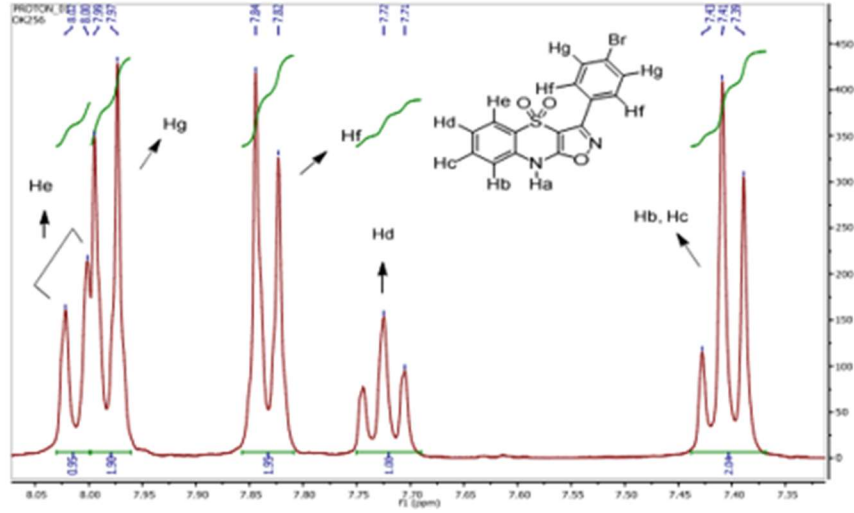


Şekil 4.3. 42 Numaralı Bileşiğin ^1H NMR spektrumu

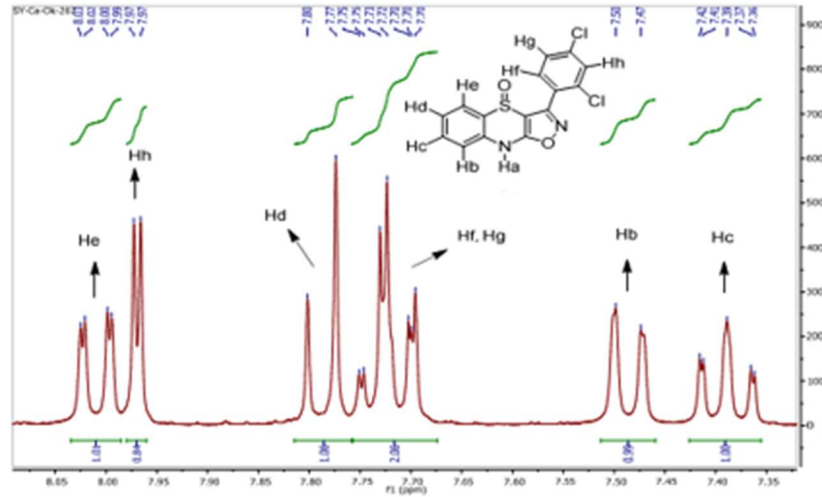


Şekil 4.4. 45 Numaralı Bileşiğin ^1H NMR spektrumu

Benzotiyazin bileşiklerindeki tiyazin halkasına bitişik konumdaki benzen halkasındaki proton kaymaları **42** ve **45** numaralı bileşikler için benzerdir. Tiyazin halkasındaki sülfon ve sülfoksit grubuna komşu proton kaymaları 8.00-8.05 ppm civarında gelmektedir. Tiyazin halkasında bulunan NH grubuna komşu protonların sinyalleri 7.35-7.50 ppm civarında gözlemlenmektedir (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



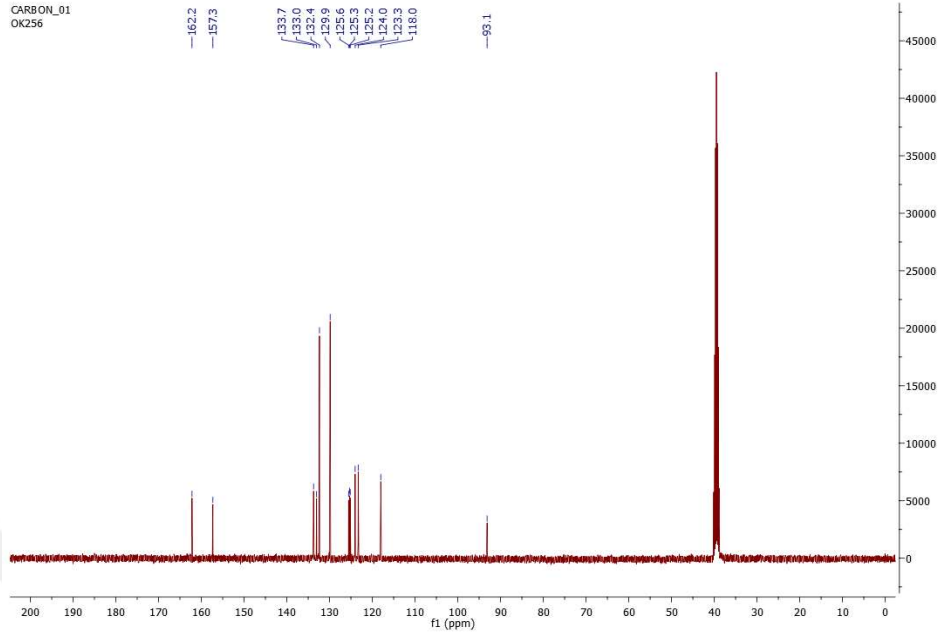
Şekil 4.5. 42 Numaralı Bileşiğin Genişletilmiş ^1H NMR spektrumu



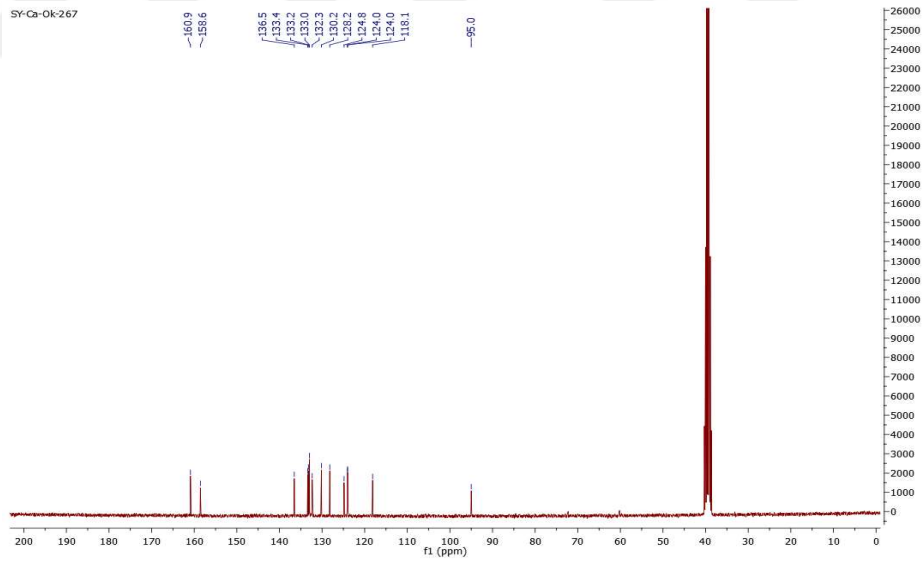
Şekil 4.6. 45 Numaralı Bileşiğin Genişletilmiş ^1H NMR spektrumu

42 ve 45 numaralı bileşiklerin ^{13}C NMR spektrumları, izoksazol karbonları ile uyumlu olarak 163.0–161.5, 158.7–147.9 ve 95.1–91.3 ppm aralığında sinyal içermektedir. Sülfoksit veya sülfon grubunun izoksazol halkasındaki karbon sinyalleri üzerinde iki seri bileşik için de belirgin bir etkisi yoktur. İzoksazol halkasının C5 karbonunda 161.8–160.7 ppm, C4 karbonunda 160.2–157.6 ppm, C3

karbonunda 95.0–93.0 ppm aralığında benzer sinyaller göstermiştir (Şekil 4.7 ve Şekil 4.8).

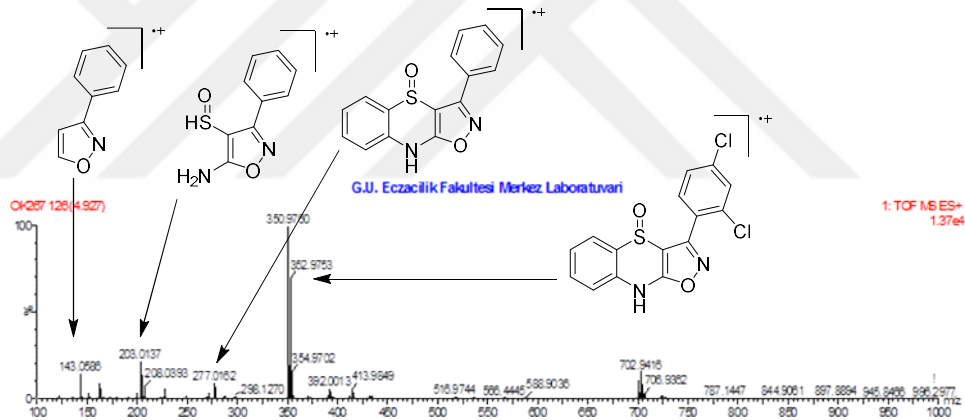
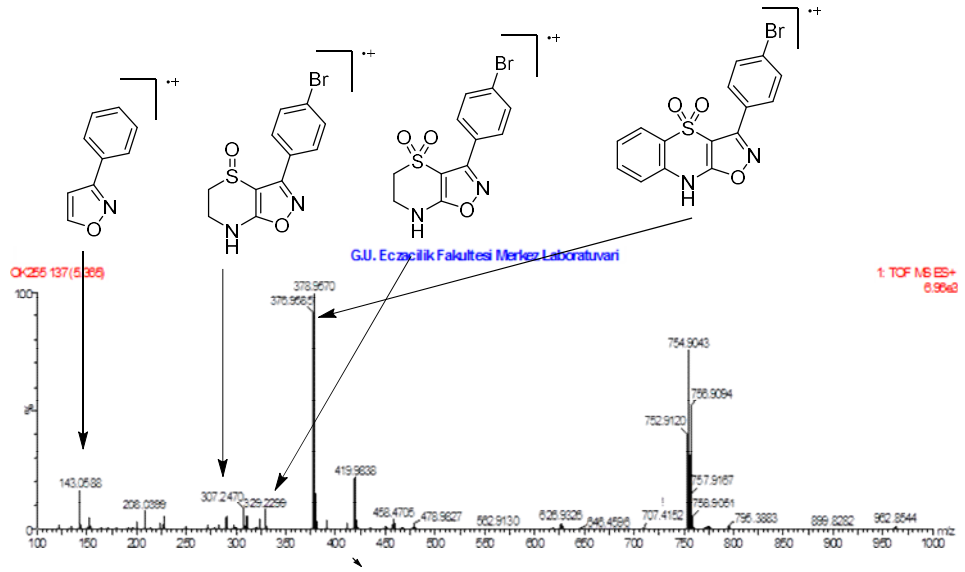


Şekil 4.7. 42 Numaralı Bileşiğin ^{13}C NMR Spektrumu



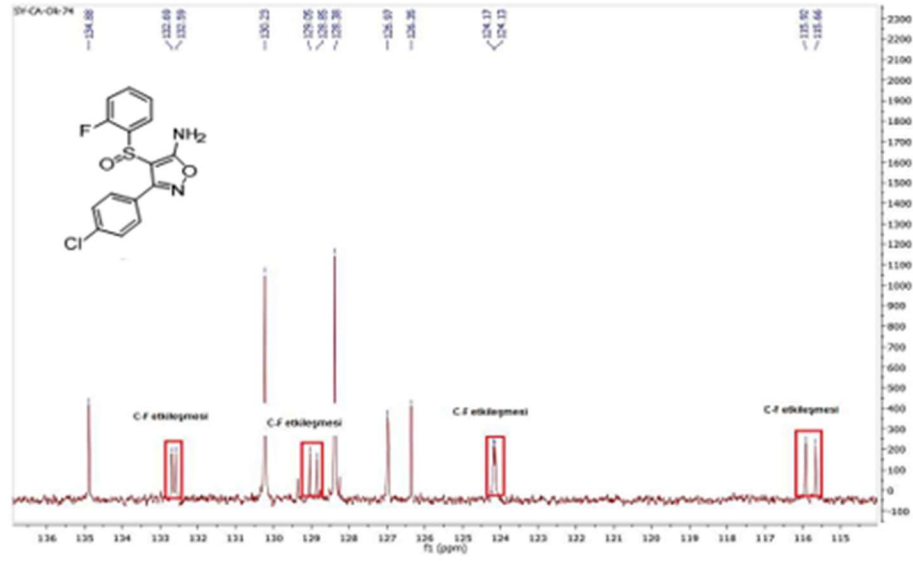
Şekil 4.8. 45 Numaralı Bileşiğin ^{13}C NMR Spektrumu

Bileşiklerin LCMS spektrumundaki parçalanma ürünlerinin oluşumu ve HRMS sonuçlarının beklenen moleküler ağırlıkları ile uyumlu olması, elde etmek istediğimiz bileşiklerin olduğunun kanıtıdır (Şekil 4.9 ve Şekil 4.10).

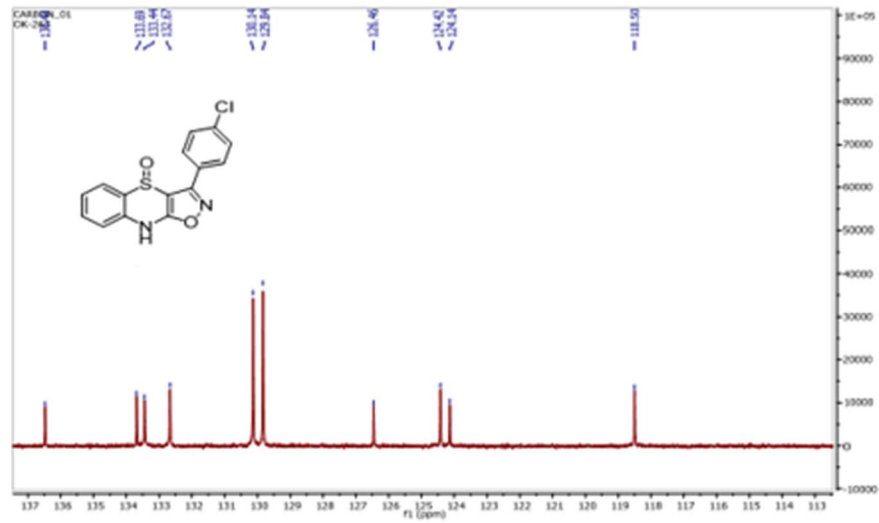


Önerilen moleküllerarası nükleofilik yer değiştirme reaksiyonu, başlangıç maddelerinden C-F etkileşimlerinin kaybolması ile kolayca anlaşılabilir. Bileşik **45 a**'nın ^{13}C NMR'si analiz edildiğinde, 2,6-diklor substitüentleri için sınırlı rotasyonun, halkadaki her karbon atomunun farklı sinyaller vermesine neden olduğu gözlemlenmiştir. Nükleofilik molekül içi yer değiştirme reaksiyonu sonucunda halkalaşmanın gerçekleştiği **44** ve **45** numaralı bileşiklerin ^{13}C NMR'larının kıyaslanmasıyla **44** numaralı bileşikte gözlemlenen C-F

etkileşmesinin **45** numaralı bileşikte bu etkileşmenin olmadığı açıkça görülmektedir (Şekil 4.11 ve Şekil 4.12).



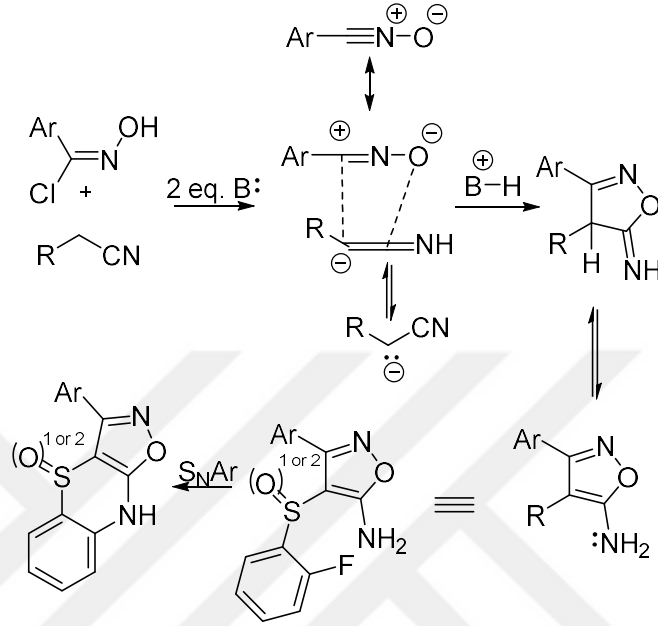
Şekil 4.11. ¹³C NMR spektrumunda **44** numaralı bileşikteki C-F etkileşmesi



Şekil 4.12. ¹³C NMR spektrumunda **45** numaralı bileşikteki halkalaşma sonucunda bu etkileşmenin kaybolması

Son olarak, siklizasyon ilk olarak 5-aminoizoksazollerini vermek üzere OH'nin nitril karbon atomuna saldırması ile gerçekleşir. Başka bir mekanizma da bazik koşullar altında α-kloro oksimlerin nitril oksitler oluşturmasını içerebilir.

Bunlar daha sonra 5-aminoizoksazollerı vermek üzere deprotonlanmış başlangıç materyalı ile 1,3-dipolar siklokatılıma girecektir. Daha sonra florürün NH₂ grubu ile bir S_NAr yer değiştirme reaksiyonu 1,4-benzotiyazinlerin siklizasyonu ile sonuçlanır (şekil 4.13).



şekil 4.13. 1,4-Benzotiyazin oluşum mekanizması

4.2 Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

4.2.1 Antimikrobiyal Aktivite Sonuçları

Mikrobiyolojik çalışmalar kapsamında gerçekleştirilen disk difüzyon yöntemiyle, benzotiyazin bileşiklerinin antibakteriyel özellikleri incelenmiştir. Bu yöntemde, bileşiklerin Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkinliği değerlendirilmiştir. *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella Typhimurium*'a karşı antibakteriyel özellikleri incelemek için disk difüzyon yöntemi uygulanmıştır. şekil 4.14, disk difüzyon yöntemi kullanılarak sentezlenmiş olan tüm heterohalkalı bileşiklerin *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı antibakteriyel etkinliğini göstermektedir. Disk difüzyon yöntemi, çeşitli antibakteriyel ajanların etkilerini ölçmek için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir ve belirli bir maddenin bakteriyel büyümeyi ne kadar etkili bir şekilde durdurduğunu görsel olarak değerlendirmek için

kullanılmaktadır. Zon çapları, antibakteriyel ajanın etkinliğini doğrudan yansıtır; daha büyük zon çapları, daha yüksek antibakteriyel etkinliğe işaret etmektedir.



Şekil 4.14. 1,4-Benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı disk difüzyon yöntemi

Disk difüzyon yöntemi sonuçlarına göre, 1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin diğer 1,4-benzotiyazin-4-oksit ve benzimidazol türevlerine göre bakterilere karşı önemli derecede etkinlik gösterdiği gözlemlenmiştir. **42b** numaralı bileşik, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı en yüksek inhibitör etki gösteren bileşik olmuştur. *Bacillus cereus* ve *Bacillus subtilis*'e karşı yüksek etki gösteren diğer bileşik ise **42d** numaralı bileşiktir. *Staphylococcus aureus*'a karşı **42b**'den sonra inhibisyon etkisi yüksek olan bileşik **42c** numaralı bileşiktir. **42b** ve **42c** numaralı bileşikler incelenmiş olan tüm bakterilere karşı etkili olan iki bileşiktir. **42e** numaralı bileşik ise Gram pozitif ve Gram negatif bakterilerin hiçbirine karşı etki göstermemiştir. Bileşiklerin Gram negatif bakterilere olan etkisi Gram pozitif bakterilere kıyasla oldukça azdır (**Tablo 4.3**).

Tablo 4.3. Benzotiyazin-4,4-dioksitlerin (**42**) İnhibisyon Zon Çapları

	İnhibisyon zon çapları (mm)							
	Gram pozitif					Gram negatif		
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Typhimurium</i>
S.	30	30	38	22	30	38	37	35
42a	-	10	15	-	10	-	11	-

42b	22	26	33	20	23	9	11	9
42c	11	15	22	14	16	9	9	8
42d	20	21	14	-	10	9	7	9
42e	-	-	-	-	-	-	-	-
42f	16	23	15	-	13	-	-	-
42g	10	18	18	-	16	-	-	-
42h	10	16	17	-	14	10	10	8
42i	12	12	-	-	13	-	-	-
42j	7	15	5	-	6	8	7	8
42k	8	13	16	-	10	9	8	9

S: Siprofloksasin

1,4-Benzotiyazin-4-oksit türevlerinden **45a** numaralı bileşik *Staphylococcus aureus*'a karşı en etkili bileşik iken **45c** numaralı bileşik *Bacillus subtilis*'e karşı en yüksek etki gösteren bileşiktir. 1,4-Benzotiyazin-4-oksit türevlerinden *Listeria monocytogenes*'e karşı etkili olan bileşik yoktur. *Salmonella Typhimurium*'a karşı etkili olan tek bileşik ise **45a** numaralı bileşiktir. 1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerine benzer şekilde Gram pozitif bakterilere olan etki, Gram negatif bakterilerden fazladır (**Tablo 4.4**).

Tablo 4.4. Benzotiyazin-4-oksitlerin (**45**) İnhibisyon Zon Çapları

	İnhibisyon zon çapları (mm)							
	Gram pozitif					Gram negatif		
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Typhimurium</i>
45a	11	17	15	-	11	10	8	8
45b	11	-	-	-	-	-	-	-
45c	7	21	7	-	10	10	10	-
45d	10	12	3	-	-	8	6	-
45e	13	10	5	-	-	-	7	-

Bu deney sonuçları, belirli benzotiyazin türevlerinin Gram pozitif bakterilere karşı güçlü antibakteriyel özellikler gösterdiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, bazı bileşiklerin Gram negatif bakterilere karşı etkinliklerinin

daha düşük olduğu, örneğin *Escherichia coli* ve *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı daha küçük zon çapları oluşturdıkları veya hiç zon oluşturmadıkları gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak, disk difüzyon yöntemi benzotiyazin türevlerinin antibakteriyel etkinliklerini göstermekte ve hangi bileşiklerin hangi bakterilere karşı daha etkili olduğunu belirlememize yardımcı olmaktadır. Bu bilgiler, daha ileri çalışmalar için potansiyel antibakteriyel ajanların seçiminde önemlidir.

Benzimidazole bileşiklerinin antibakteriyel etkileri incelendiğinde *Listeria monocytogenes*'e karşı etkili tek bileşik olarak tüm bakterilere karşı inhibisyon etkisi gösteren bileşik **49d** numaralı bileşiktir. *Staphylococcus aureus*'a karşı en etkili bileşik 13 mm zona sahip olan **49e** numaralı bileşik olup 12 mm inhibisyon zonuna sahip **49d** numaralı ise etkili olan diğer bileşiktir (**Tablo 4.5**).

Tablo 4.5. Benzimidazole Türevlerinin (**49**) İnhibisyon Zon Çapları

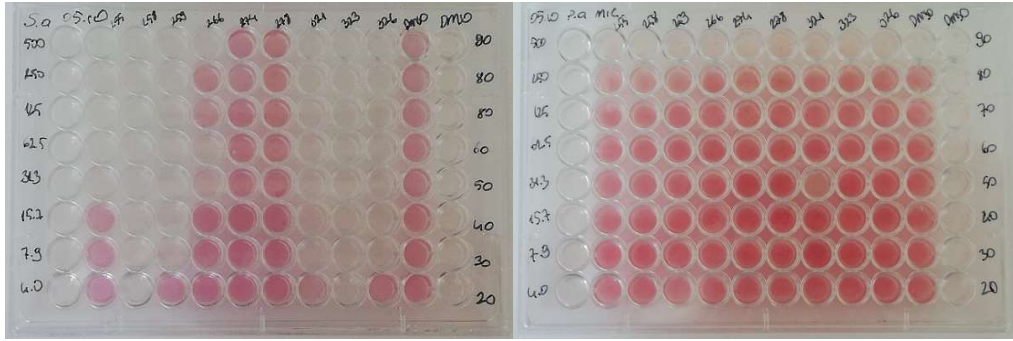
	İnhibisyon zon çapları (mm)							
	Gram pozitif					Gram negatif		
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>M. luteus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Typhimurium</i>
47	6	9	-	8	11	9	10	10
48	9	6	-	5	8	9	7	7
49a	7	8	-	7	8	10	-	-
49b	5	5	-	-	-	10	9	7
49c	8	9	-	8	10	9	9	7
49d	10	11	9	10	12	14	8	9
49e	7	9	-	8	13	8	9	-

4.2.2 Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Sonuçları

Gerçekleştirilen disk difüzyon yönteminde zon çapları büyük olan (>15 mm) bileşikler belirlenip MİK değerleri bulunmuştur. 1,4-Benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin (**42**) dışında zon çapları 15 mm'nin üstünde olmadığı için sadece bu bileşik türlerinin MİK değerleri bulunmuştur.

İzoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin farklı Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı MİK değerleri verilmiştir. Bu değerler, bir antibakteriyel maddenin bakteriyel büyümeyi inhibe ettiği en düşük konsantrasyonu göstermektedir. MİK sonuçları mikrolakaların TTC çözeltisi ile

muamele edilmesi sonrasında renk değişimin gözlemlenmesi ile belirlenmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. 1,4-Benzotriyazin-4,4-dioksitlerin (**42**) *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterilerine karşı MİK yöntemi

MİK değerleri incelendiğinde **42b** bileşiğinin Gram pozitif bakterilere karşı düşük MİK değerleri sergilediği, ancak Gram negatif bakterilere karşı etkinliğinin düşük olduğu belirlenmiştir. **42b** bileşiği en düşük MİK değeri olan 4.0 µg/mL ile *Bacillus cereus*'a karşı oldukça etkilidir. **42c** bileşiği ise 62.5 µg/ MİK değeri ile etkinlik göstermektedir. **42b** bileşiği, 2.0 µg/mL ile en düşük MİK değerini sergileyerek *Bacillus subtilis*'e karşı yüksek etkinlik göstermektedir. **42c** ve **42g** bileşikler ise sırasıyla 31.3 µg/mL ve 7.9 µg/mL MİK değerleri ile *Bacillus subtilis*'e karşı etkili olmuştur. **42b** ve **42g** bileşikler, 2.0 µg/mL ile *Staphylococcus aureus* 'a karşı en düşük MİK değerine sahip olan bileşikler iken **42c** bileşiği 7.9 µg/mL MİK değerine sahiptir. Tüm bileşiklerin Gram negatif bakterilere karşı MİK değerleri >500 µg/mL olup, bu bileşiklerin göstermiş oldukları etki düşük olduğu anlaşılmaktadır (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Benzotriyazinlerin Minimum İnhibitör Konsantrasyon Değerleri

	Minimum İnhibitör Konsantrasyon (MİK) Sonucu (µg/mL)					
	Gram pozitif			Gram negatif		
	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. Typhimurium</i>
42 a	500.0	250.0	500.0	>500	>500	>500
42 b	4.0	2.0	2.0	>500	>500	>500
42 c	62.5	31.3	7.9	>500	>500	>500
42 d	500.0	500.0	500.0	>500	>500	>500
42 e	500.0	500.0	500.0	>500	>500	>500
42 f	500.0	15.7	7.9	>500	>500	>500

Bacillus cereus'a karşı %100 biyofilm önleme oranına sahipken, *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı daha düşük bir etkinlik göstermektedir. **42f** ve **42g** *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı yüksek inhibisyon oranları göstermektedir (%92-99 aralığında).

Tablo 4.7. 1,4-Benzotiyazin4,4-dioksitlerin Biyofilm Oluşumunu Önleme İnhibisyon Sonuçları (%)

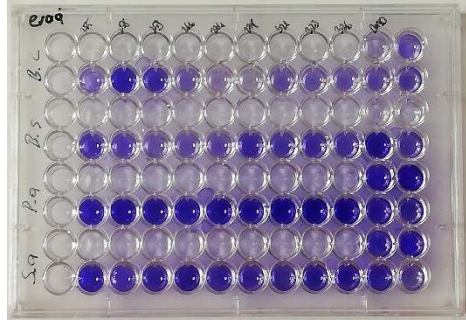
	<i>B. cereus</i>			<i>B. subtilis</i>			<i>P. aeruginosa</i>			<i>S. aureus</i>		
	MİK	MİK/2	MİK/4	MİK	MİK/2	MİK/4	MİK	MİK/2	MİK/4	MİK	MİK/2	MİK/4
42a	-	36	56	-	31	98	2	17	49	54	60	94
42b	100	100	98	95	96	96	-	-	26	100	99	100
42c	100	96	97	93	96	93	3	18	63	67	94	64
42d	-	97	97	54	83	87	-	48	72	89	98	83
42f	88	76	82	97	97	92	-	34	71	99	99	100
42g	-	19	85	63	92	94	-	65	52	62	96	63
42h	85	89	85	91	93	94	-	26	15	98	97	50
42i	-	74	78	29	86	97	-	50	49	14	21	60
42j	42	85	85	78	85	91	-	69	57	97	98	99

Bu bulgular, belirli 1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin (**42**) biyofilm oluşumunu engelleme konusunda yüksek potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Bazı bileşiklerin düşük konsantrasyonlarda bile biyofilm önleme etkinliğini koruyabilmesi bu bileşiklerin potansiyel antibiyofilm ajanları olarak değerlendirilebileceği anlamına gelmektedir. Özellikle düşük konsantrasyonlarda bile etkinlik gösteren bileşikler, daha az yan etki ve toksisite ile kullanılabilme potansiyeline sahiptirler. Genel olarak, bu çalışmalar benzotiyazin türevlerinin hem antibakteriyel hem de antibiyofilm özellikler açısından potansiyelini ortaya koymuştur. Özellikle belirli Gram pozitif bakterilere karşı yüksek etkinlik gösteren bileşiklerin, daha ileri çalışmalar ve potansiyel uygulamalar için aday olabileceği sonucuna varılmıştır.

4.2.1 Biyofilm Eradikasyonu (Oluşan Biyofilmi İnhibe Etme)

Son olarak, 1,4-benzotiyazin4,4-dioksit türevlerinin (**42**) MİK değerlerindeki biyofilm eradikasyon özellikleri incelenmiştir. Biyofilm oluşturmuş

bakterilere karşı yapılan bu testlerde, belirli bileşiklerin biyofilmi tamamen ortadan kaldırma kapasitesi değerlendirilmiştir (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. 1,4-Benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin (42) biyofilm eradikasyon özelliği

Tablo 4.8. 1,4-Benzotiyazin-4,4-dioksitlerin % Eradikasyon Sonuçları

	<i>B. cereus</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
42a	-	-	-	-
42b				15
42c	-	-	-	-
42d	6	-	-	-
42f	-	-	-	43
42g	-	-	-	-
42h	-	13	-	-
42i	41	-	-	-
42j	59	-	-	-

Tablo 4.8, 1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin (42) farklı bakterilere karşı biyofilm eradikasyon yüzdeleri göstermektedir. Bu tablo, bileşiklerin *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakterilere karşı ne kadar etkili olduğunu ortaya koymaktadır.

42d, 42i ve 42j bileşikleri sırasıyla %6, %41 ve %59 eradikasyon yüzdesi ile *Bacillus cereus* bakterisine karşı etkilidir. Diğer bileşikler ise etki göstermemiştir. *Bacillus subtilis*'e karşı yalnızca 42h bileşiği %13 oranında etkili olup, diğer bileşikler etkisizdir. *Pseudomonas aeruginosa* bakterisine karşı ise hiçbir bileşik bu eradikasyon etkisi göstermemiştir. 42b, 42f ve 42h bileşikleri sırasıyla %15, %43 ve %13 eradikasyon oranı ile *Staphylococcus aureus*'a karşı etkili olup, diğer bileşikler etkisizdir.

5. TARTIŞMA

5.1 Sentez Çalışmaları

Bu tez çalışmasında, izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4-oksitler, izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit ve benzimidazole asetat türevlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir.

İzoksazolo-1,4-benzotiyazin-4-oksit türevleri hem geleneksel hem de yeşil kimya sentez yöntemlerinden bir olan mikrodalga yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Elde edilen bulgular, bu iki yöntemin etkinliğini ve verimliliğini değerlendirme açısından önemli bilgiler sunmaktadır. Yapılan literatür araştırmasında geçiş metalleri (Cu, Pd, Rh, Ru, Fe), moleküler iyot/iyodür, Au-katalizli (Ahmad Saddique vd., 2021). Metal katalizörü kullanılmadan yapılan bu sentez çalışması, literatürde yer alan katalizli çalışmalardan önemli ölçüde farklılaşmaktadır. Morita-Baylis-Hillman ketonlarının Cs_2CO_3 varlığında 2-aminotiyofenol ile oksidatif siklizasyon reaksiyonu sonucunda elde edilen 2,2-disüstitüe dihidro-1,4-benzotiyazinler, bu tez çalışmasında elde edilen benzotiyazin sentez yöntemi ile benzerlik göstermektedir (Jha vd., 2022). Geleneksel yöntemle elde edilen sonuçlar, literatürdeki sentezlerle elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldığında, verim açısından benzerlikler göstermektedir. Bununla birlikte, mikrodalga yöntemi, reaksiyon sürelerini önemli ölçüde kısaltarak daha hızlı ve verimli bir sentez süreci sunmuştur. Bu bulgu, literatürde mikrodalga destekli sentezlerin daha hızlı reaksiyonlar ve yüksek verimler sunduğunu belirten çalışmalarla uyumludur.

Aromatik diaminin birincil alkollerle reaksiyonu sonucunda fosfin içermeyen ligand türevi bir mangan (I) kompleksi tarafından katalize edilerek benzimidazollerin sentezi gerçekleştirilmiştir (Das vd., 2018). Tek-kap yöntemi ile $\text{CeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -CuI katalizör sistemi kullanılarak benzimidazoquinazolin türevleri sentezlenmiştir (Cimarelli vd., 2015). Redoks-nötr koşullar altında iridyum(III)-katalizli benzimidazol türevlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir (Xia vd., 2017). Rh (III) katalizli yöntem, imidamidler ve antranillerden benzimidazo [1,2-a] kinolinlerin yüksek verimli bir şekilde sentezlenmesini sağlamıştır (Hu vd., 2020). Ancak bu tez çalışmasında elde edilmiş olan benzimidazol türevleri metal katalizör kullanılmadan asit varlığında verimli şekilde elde edilmişlerdir.

5.2 Mikrobiyolojik Analiz Sonuçları

Tez çalışmasında, elde edilen tüm benzoizoksazolobenzotiyazin ve benzimidazol asetat türevlerinin antibakteriyel aktiviteleri *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Listeri monocytogenes*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* ve *Salmonella* Typhimurium'a karşı disk difüzyon yöntemi ile incelenmiştir. Bu yöntemle belirlenen zon çapları, bileşiklerin bakterilere karşı etkinlik derecelerini göstermektedir. İzoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinden bazılarının Gram pozitif bakterilere karşı inhibisyon çapları oldukça yüksek (>15 mm) olmasına rağmen Gram negatif bakterilere karşı etkisi düşüktür. İzoksazolo-1,4-benzotiyazin-4-oksit ve benzimidazole türevlerinin hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı etkileri azdır. Bu nedenle MİK değerlerinin bulunması ve bu değerlere göre biyofilm çalışmaları izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksitler üzerinden devam edilmiştir. MİK değerleri, bileşiklerin bakteriyel büyümeyi inhibe edici en düşük konsantrasyonlarını belirlemek için kullanılmıştır. Çalışmada incelenen bileşikler arasında, **42b** bileşiği en düşük MİK değerlerine sahip olarak dikkat çekmektedir. *B. cereus*, *B. subtilis* ve *S. aureus*'a karşı sırasıyla 4.0 µg/ml, 2.0 µg/mL ve 2.0 µg/ml MİK değerleri göstermiştir. Bu, **42b** bileşiğinin güçlü antibakteriyel özelliklere sahip olduğunu göstermektedir

Elde edilen bulgular, özellikle Gram-pozitif bakterilere karşı güçlü antibakteriyel ve antibiyofilm özellikler göstermiştir. Bu sonuçlar, literatürde yer alan çeşitli mikroorganizmalar üzerindeki etkilerini inceleyen çalışmalarla tutarlıdır. İzoksazol halkası içeren kalkon ve dihidropirazol türevleri Gram-pozitif *Staphylococcus aureus* ve Gram-negatif *Pseudomonas aeruginosa*, küf *Aspergillus niger* ve maya *Candida tropicalis*'e karşı antimikrobiyal etkileri incelenmiştir. Kalkonlar mükemmel antibakteriyel etki gösterirken, dihidropirazoller standart ilaç olan flukonazole kıyasla muazzam antifungal aktivite göstermiştir (Shaik vd., 2020). Yapılan bir çalışma, sinnolin/izoksazol hibrit türevleri Gram pozitif bakteri türleri *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'un yanı sıra Gram negatif bakteri türleri *Pseudomonas aeruginosa* ve *Escherichia coli* 'ye karşı güçlü antibakteriyel ajanlar olduğunu ortaya koymuştur (Bommagani vd., 2021). İzoksazol-triazol türevleri üç ATCC referans suşu olan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* ATCC BAA-44 ve *Escherichia coli* ATCC 25922 ile hastane ortamından izole edilen bir *Pseudomonas aeruginosa* suşuna karşı antibakteriyel aktiviteleri açısından taranmış ve test edilen bileşiklerden bir tanesi

Escherichia coli ATCC 25922 ve *Pseudomonas aeruginosa* patojenik suşlarına karşı standart antibiyotiklere kıyasla daha güçlü bir antibakteriyel etki sergilediği gözlemlenmiştir (Bouzammit vd., 2024). İzoksazon türevleri ve *Escherichia coli* bakteri suşlarına karşı antibakteriyel potansiyelleri açısından incelenmiş ve oldukça yüksek antibakteriyel aktivite sergilemiştir (Thakur vd., 2023).

Triazol ve oksazolidinon heterohalkalarını içeren 1,4-benzotiyazin türevleri, Gram-pozitif *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ve *Streptococcus fasciens* ATCC 29212 ve Gram-negatif *Escherichia coli* ATCC 4157 ve *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 bakteri suşlarına karşı *in vitro* antibakteriyel aktiviteleri açısından değerlendirilmiş ve antibakteriyel aktivite gösterdiği ortaya konmuştur (Sebbar vd., 2016). 1,2-benzotiyazin-1,1-dioksit türevleri biyolojik aktiviteleri açısından mikrobiyal patojenlere karşı değerlendirilmesi için disk difüzyon ve seri mikrodilüsyon yöntemleri uygulanmış ve Gram-pozitif *Staphylococcus aureus* ve *Enterococcus faecalis* suşlarına karşı antimikrobiyal aktivitesi, Gram-negatif *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Klebsiella pneumoniae* suşlarına karşı aktivitesinden daha fazladır (Dudek-Wicher vd., 2020). 1,2-benzotiyazin bileşikleri, iki Gram-pozitif bakteri (*Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*) ve iki Gram-negatif bakteriye (*Proteus vulgaris* ve *Salmonella typhimurium*) karşı broth mikrodilüsyon metodu kullanılarak antimikrobiyal aktiviteleri açısından değerlendirilmiştir. Bileşiklerin hiçbirinin Gram-negatif bakteriler karşı herhangi bir aktivite göstermezken Gram-pozitif bakterilere karşı 25-600 µg/mL MİK değerleri aralığında etki etmiştir (Patel vd., 2016). Diğer taraftan, birçok bileşik Gram negatif bakterilere karşı düşük etkinlik göstermiş veya 500 µg/mL gibi yüksek MİK değerlerinde bile etki görülememiştir. Bu sonuçlara göre bu tez çalışmasında da etkileri incelenen izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin Gram negaif bakterilere etki göstermemesi açısından benzerlik göstermektedir.

Yapılan literatür araştırmalarında benzimidazol içeren farklı heterohalkalı bileşiklerin antibakteriyel etki gösterdikleri bulunmuştur (Basha, 2023; Mulugeta & Samuel, 2022; Song & Ma, 2016). *Staphylococcus aureus* bakterisine karşı doğal berberin ve benzimidazol yapılarını içeren bileşiklerin potansiyel antibakteriyel ajan oldukları bildirilmiştir (Sun vd., 2021). Triaril benzimidazol bileşikleri çoklu ilaca dirençli bakterilere (*Staphylococci* ve *Enterococci* türleri) karşı umut verici antibakteriyel aktivite göstermiştir (Picconi vd., 2017). Trisüstitüe 1H-

benzimidazol türevlerinden biri *Escherichia coli* ve *Streptococcus faecalis* bakteri suşlarına karşı güçlü antibakteriyel aktivite göstermiştir (Pham vd., 2023). Ancak bu çalışmalardan farklı olarak bu tez çalışmasında sentezlenen benzimidazoltiyaoasetat türevlerinin test edilen Gram pozitif ve Gram negatif bakterilere karşı etkisi çok düşüktür.

Sentezlenen 15 izoksazol türevi, *Staphylococcus aureus* ve *Pseudomonas aeruginosa* ile *Candida albicans*'a karşı disk difüzyon yöntemleri, minimum inhibitör konsantrasyon ve mikropklarda biyofilm azalması yöntemleri uygulanmıştır. Bileşiklerden iki tanesi biyofilm oluşturan hücrelerin %90'ından fazlasını azaltabilmiştir (Bachor vd., 2023b). İzoksazolin/izoksazol sülfonamidler ve hidrazidler biyofilm oluşumunu veya dağılımını etkileme potansiyellerini belirlemek için *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı değerlendirilmiştir. İki türev olgun bir biyofilmi 24 saat içinde yaklaşık %50 oranında destabilize etmiştir (El Mahmoudi vd., 2023). İzoksazol-triazol bileşiği taramalı elektron mikroskobu ile görüntülenen *E. coli* hücrelerinin biyofilm oluşumunu önemli ölçüde inhibe ettiği gözlemlenmiştir (Habib vd., 2020).

Sentezlenen kaynaşmış benzo[1,3]tiyazin-1,2,3-triazol türevleri Gram-pozitif ve Gram-negatif suşlara karşı *in vitro* antibakteriyel inhibisyon etkisi incelenmiş ve *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus epidermidis*'e karşı 3.12 µg/mL MIC değeri ile önemli bir inhibisyon aktivitesi gözlemlenmiştir. Antibakteriyel etkisi güçlü olan bileşikler için anti-biyofilm özelliği incelenerek *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* için önemli biyofilm inhibitörleri olduğu bildirilmiştir (Ramya Sucharitha vd., 2021). Bu çalışmada etki gösteren bileşiklerin 1,3-benzotiyazin olması bu tez çalışmasının farklılığını ortaya koymaktadır.

Bu tez çalışmasındaki izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit türevlerinin MİK değerleri belirlendikten sonra çeşitli konsantrasyonlarda (MİK, MİK/2, MİK/4) biyofilm oluşumunu inhibe etme kapasiteleri değerlendirilmiştir. Çalışma sonuçları, **42b** bileşiğinin *S. aureus*'a karşı %100 inhibitör etkinlik gösterdiğini ortaya koymuştur. Bu bileşik, *B. cereus* ve *B. subtilis*'e karşı da yüksek biyofilm inhibitör etkinlik sergilediği gözlemlenmiştir.

Bileşiklerin biyofilm inhibisyon ve eradikasyon özellikleri karşılaştırıldığında, bazı bileşiklerin biyofilm eradikasyonunda daha düşük etkinlik gösterirken, biyofilm oluşumunu önlemede yüksek etkinlik gösterdiği gözlemlenmektedir. Örneğin, **42b** bileşiği *Bacillus cereus*'a karşı %59 eradikasyon

sağlarken, biyofilm oluşumunu %100 oranında engellemektedir. Benzer şekilde, **42f** bileşiği *Staphylococcus aureus*'a karşı %43 eradikasyon sağlarken, biyofilm oluşumunu %100 oranında engellemektedir.

Yapılan araştırmalara göre izoksazol türevlerinin biyofilm inhibisyonu ve eradikasyonu üzerinde yapılan çalışmalar oldukça azdır. 1,4-Benzotiyazin türevlerinin antibiyofilm çalışmalarına ise rastlanılmamıştır. Bu bağlamda, bu çalışma, izoksazol ve 1,4-benzotiyazin türevlerinin biyofilm inhibisyonu ve eradikasyonu üzerindeki etkilerini detaylı bir şekilde inceleyen öncü bir araştırma niteliği taşımaktadır. İlk kez gerçekleştirilen bu çalışma, söz konusu bileşiklerin antibiyofilm potansiyelini ortaya koyarak, gıda güvenliği alanında yenilikçi ve etkili çözümler sunmayı amaçlamaktadır. Böylelikle, hem bilimsel literatüre önemli bir katkı sağlayacak hem de gelecekte yapılacak araştırmalar için temel oluşturacaktır. Bu bileşiklerin biyofilm eradikasyonunda da potansiyel göstermesi, onların enfeksiyon kontrolü ve tedavisinde kullanılabilecek çok yönlü antibakteriyel ajanlar olarak önemini vurgulamaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

6.1 Sentez Çalışmaları

Bu tez çalışmasında, izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4-oksitler, izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit ve benzimidazole türevleri başarılı bir şekilde sentezlenmiştir. Sentezlenen bileşiklerin yapıları IR, ¹H ve ¹³C NMR spektroskopisi ve HRMS yöntemleri ile doğrulanmıştır. Sentezlenen izoksazolo-1,4-benzotiyazin türevlerinin antibakteriyel aktiviteleri disk difüzyon yöntemi ile değerlendirildikten sonra etkili olan bileşiklerin MİK değerleri incelenmiştir. Disk difüzyon yöntemi sonucunda izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksitlerin etkili olduğu görülmüş olup antibiyofilm çalışmalarına bu bileşik türevleri üzerinden devam edilmiştir. Bu bileşiklerin özellikle Gram pozitif bakterilere (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*) karşı etkili olduğu belirlenmiştir.

Sentez çalışmaları, mikrodalga ısıtma yöntemlerinin geleneksel ısıtma yöntemlerine göre daha kısa sürede ve daha yüksek verimle ürün elde edilmesini sağladığını göstermiştir. Sentezlenen bileşiklerin yüksek verimleri ve başarılı karakterizasyonları, bu bileşiklerin daha ileri araştırmalar ve uygulamalar için uygun olduklarını ortaya koymaktadır.

6.2 Antimikrobiyal Aktivite ve Antibiyofilm Çalışmaları

Disk difüzyon yöntemi kullanılarak yapılan antibakteriyel aktivite testlerinde, sentezlenen izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4-oksitler, izoksazolo-1,4-benzotiyazin-4,4-dioksit ve benzimidazole türevleri hem Gram pozitif hem de Gram negatif bakterilere karşı incelenmiştir. **Tablo 4.4'**te gösterildiği üzere, özellikle **42b** bileşiği *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* 'a karşı en yüksek inhibitör etkiyi göstermiştir. *Bacillus cereus*'a karşı 22 mm, *Bacillus subtilis*'e karşı 26 mm ve *Staphylococcus aureus*'a karşı 33 mm zon çaplarıyla, yüksek antibakteriyel aktivite sergilemiştir. Bu sonuçlar, **42b** bileşiğinin, diğer bileşiklere göre daha güçlü bir antibakteriyel ajan olduğunu ortaya koymaktadır.

MİK testleri, bileşiklerin bakteriyel büyümeyi inhibe edici en düşük konsantrasyonlarını belirlemek amacıyla yapılmıştır. Tablo 4.6'da görüldüğü gibi, **42b** bileşiği *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus* 'a karşı sırasıyla 4 µg/mL, 2 µg/mL ve 2 µg/mL MİK değerleri ile yüksek antibakteriyel etkinlik göstermiştir. Bu düşük MİK değerleri, **42b** bileşiğinin güçlü antibakteriyel

özelliklere sahip olduğunu ve Gram pozitif bakterilere karşı etkili olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte, Gram negatif bakterilere karşı etkinlikleri daha düşük olup, genellikle $>500 \mu\text{g/mL}$ MİK değerleri ile belirlenmiştir. Bu sonuç bu bileşiklerin Gram negatif bakterilere karşı etkinliğinin daha az olduğunu göstermektedir.

Biyofilm oluşumunu önleme çalışmaları, bileşiklerin biyofilm oluşumunu inhibe etme kapasitelerini değerlendirmiştir. **Tablo 4.7'**de, çeşitli bakterilere karşı biyofilm inhibisyon yüzdeleri verilmiştir. Örneğin, **42b** bileşiği, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* ve *Staphylococcus aureus*'a karşı %100 biyofilm inhibisyonu göstererek en yüksek etkinliği sergilemiştir. Biyofilm eradikasyon çalışmalarında ise, bileşiklerin mevcut biyofilmleri ortadan kaldırma kapasiteleri değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgular, heterohalkalı bileşiklerin gıda güvenliği alanında önemli potansiyele sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, gelecekte daha geniş kapsamlı araştırmalar yapılmalı ve farklı gıda patojenleri üzerinde test edilmelidir. Uygulamalı alanlardaki etkilerini değerlendirmek amacıyla gıda işleme tesislerinde ve farklı yüzeylerde biyofilm oluşumunu önleme konusunda uygulamalı çalışmalar yapılmalıdır. Heterohalkalı bileşiklerin gıda güvenliğinde daha etkili kullanılabilmesi için uygun formülasyon ve teslim sistemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu sayede, bileşiklerin stabilitesinin ve etkinliğinin artırılabilceği düşünülmektedir. Sentezlenen bileşiklerin dışında, farklı heteroatom kombinasyonlarına sahip yeni türevlerin sentezlenmesi ve biyolojik aktivitelerinin araştırılması ile daha etkili antibakteriyel ve antibiyofilm ajanlar geliştirilmesinin de mümkün olabileceği öngörülmektedir.

7. KAYNAKLAR

(Bu tez çalışmasında APA atıf sistemi kullanılmıştır.)

- Aatif, M., Raza, M. A., Javed, K., Nashre-ul-Islam, S. M., Farhan, M., & Alam, M. W. (2022). Potential Nitrogen-Based Heterocyclic Compounds for Treating Infectious Diseases: A Literature Review. *Antibiotics*, 11(12), Article 12. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11121750>
- Agrawal, N., & Mishra, P. (2018). The synthetic and therapeutic expedition of isoxazole and its analogs. *Medicinal Chemistry Research*, 27(5), 1309-1344. <https://doi.org/10.1007/s00044-018-2152-6>
- Ahmad Saddique, F., Ahmad, M., Kanwal, A., Aslam, S., & Fawad Zahoor, A. (2021). Recent trends toward the synthesis of fused-benzothiazines and their derivatives. *Synthetic Communications*, 51(3), 351-378. <https://doi.org/10.1080/00397911.2020.1830420>
- Akhtar, Md. J., Yar, M. S., Sharma, V. K., Khan, A. A., Ali, Z., Haider, Md. R., & Pathak, A. (2020). Recent Progress of Benzimidazole Hybrids for Anticancer Potential. *Current Medicinal Chemistry*, 27(35), 5970-6014. <https://doi.org/10.2174/0929867326666190808122929>
- Ali, A., Zahra, A., Kamthan, M., Husain, F. M., Albalawi, T., Zubair, M., Alatawy, R., Abid, M., & Noorani, M. S. (2023). Microbial Biofilms: Applications, Clinical Consequences, and Alternative Therapies. *Microorganisms*, 11(8), Article 8. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11081934>
- Alom, N., Kaur, N., Wu, F., Saluga, S. J., & Li, W. (2019). Catalytic Regio- and Stereoselective Alkene Sulfenoamination for 1,4-Benzothiazine Synthesis. *Chemistry – A European Journal*, 25(28), 6902-6906. <https://doi.org/10.1002/chem.201900549>
- Altuğ, C., Büyükbayram, M., Kavas, Ö., & Yavuz, M. Z. (2014). A green synthesis of new 3-aryl-4-phenylsulfonyl-5-aminoisoxazoles. *Tetrahedron*, 70(22), 3590-3594. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2014.03.106>
- Başçor, U., Junka, A., Brożyna, M., & Mączyński, M. (2023a). The In Vitro Impact of Isoxazole Derivatives on Pathogenic Biofilm and Cytotoxicity of Fibroblast Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), 2997. <https://doi.org/10.3390/ijms24032997>

- Bąchor, U., Junka, A., Brożyna, M., & Mączyński, M. (2023b). The In Vitro Impact of Isoxazole Derivatives on Pathogenic Biofilm and Cytotoxicity of Fibroblast Cell Line. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(3), Article 3. <https://doi.org/10.3390/ijms24032997>
- Bahta, M., & Ahmed, N. (2018). Design and synthesis of 1,4-benzothiazine hydrazide as selective and sensitive colorimetric and turn-on fluorometric sensor for Hg 2+ detection in aqueous medium. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 357, 41-48. <https://doi.org/10.1016/j.jphotochem.2018.02.022>
- Banik, B. K., Sahoo, B. M., Kumar, B. R., & Panda, K. C. (2021). Microwave Induced Green Chemistry Approach Towards the Synthesis of Heterocyclic Compounds via C-N Bond Forming Reactions. *Current Microwave Chemistry*, 8(3), 204-214. <https://doi.org/10.2174/2213335608666210923144201>
- Basha, N. J. (2023). Therapeutic Efficacy of Benzimidazole and Its Analogs: An Update. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 43(7), 6549-6569. <https://doi.org/10.1080/10406638.2022.2118334>
- Beloin, C., Renard, S., Ghigo, J.-M., & Lebeaux, D. (2014). Novel approaches to combat bacterial biofilms. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 61-68. <https://doi.org/10.1016/j.coph.2014.09.005>
- Bommagani, M. B., Yerrabelli, J. R., Chitneni, M., Thalari, G., Vadiyala, N. R., Boda, S. K., & Chitneni, P. R. (2021). Synthesis and antibacterial activity of novel cinnoline-isoxazole derivatives. *Chemical Data Collections*, 31, 100629. <https://doi.org/10.1016/j.cdc.2020.100629>
- Bondarenko, O. B., & Zyk, N. V. (2020). The main directions and recent trends in the synthesis and use of isoxazoles. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, 56(6), 694-707. <https://doi.org/10.1007/s10593-020-02718-0>
- Bouzammit, R., Belchkar, S., El Fadili, M., Kanzouai, Y., Mujwar, S., Alanazi, M. M., Chalkha, M., Nakkabi, A., Bakhouch, M., Gal, E., Gaina, L. I., & Al Houari, G. (2024). New Triazole-Isoxazole Hybrids as Antibacterial Agents: Design, Synthesis, Characterization, In Vitro, and In Silico Studies. *Molecules*, 29(11), 2510. <https://doi.org/10.3390/molecules29112510>

- Bridier, A., Sanchez-Vizuet, P., Guilbaud, M., Piard, J.-C., Naïtali, M., & Briandet, R. (2015). Biofilm-associated persistence of food-borne pathogens. *Food Microbiology*, 45, 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.04.015>
- Chen, C., & Cui, S. (2019). Iterative Assembly of Nitrile Oxides and Ynamides: Synthesis of Isoxazoles and Pyrroles. *The Journal of Organic Chemistry*, 84(18), 12157-12164. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01430>
- Chi, X., Xie, F., Li, L., Hao, Y., Wu, H., Li, X., Xia, G., Yan, L., Zhang, D., Jiang, Y., & Ni, T. (2023). Discovery of novel triazoles containing benzyloxy phenyl isoxazole side chain with potent and broad-spectrum antifungal activity. *Bioorganic Chemistry*, 137, 106572. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106572>
- Cimarelli, C., Di Nicola, M., Diomedi, S., Giovannini, R., Hamprecht, D., Properzi, R., Sorana, F., & Marcantoni, E. (2015). An efficient one-pot two catalyst system in the construction of 2-substituted benzimidazoles: Synthesis of benzimidazo[1,2-c]quinazolines. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 13(48), 11687-11695. <https://doi.org/10.1039/C5OB01777G>
- Dar, B. N., Shah, M. A., & Mir, S. A. (2022). *Shelf Life and Food Safety* (1. bs). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781003091677>
- Das, K., Mondal, A., & Srimani, D. (2018). Selective Synthesis of 2-Substituted and 1,2-Disubstituted Benzimidazoles Directly from Aromatic Diamines and Alcohols Catalyzed by Molecularly Defined Nonphosphine Manganese(I) Complex. *The Journal of Organic Chemistry*, 83(16), 9553-9560. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.8b01316>
- Davison, E. K., & Sperry, J. (2017). Natural Products with Heteroatom-Rich Ring Systems. *Journal of Natural Products*, 80(11), 3060-3079. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00575>
- De La Hoz, A., Díaz-Ortiz, Á., & Moreno, A. (2005). Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chem. Soc. Rev.*, 34(2), 164-178. <https://doi.org/10.1039/B411438H>
- Deng, L.-Z., Mujumdar, A. S., Pan, Z., Vidyarthi, S. K., Xu, J., Zielinska, M., & Xiao, H.-W. (2020). Emerging chemical and physical disinfection technologies of fruits and vegetables: A comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(15), 2481-2508. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1649633>

- D'Souza, A., D'Souza, A. S., Mendonca, A. P., Nayak, P., Poddar, R. K., Sadananda, V., & Gowrish, S. (2022). A review on green multicomponent synthesis of heterocyclic compounds. *International Journal of Health Sciences*, 6(S8), Article S8. <https://doi.org/10.53730/ijhs.v6nS8.13250>
- Dudek-Wicher, R. K., Szczęśniak-Sięga, B. M., Wiglusz, R. J., Janczak, J., Bartoszewicz, M., & Junka, A. F. (2020). Evaluation of 1,2-Benzothiazine 1,1-Dioxide Derivatives In Vitro Activity towards Clinical-Relevant Microorganisms and Fibroblasts. *Molecules*, 25(15), 3503. <https://doi.org/10.3390/molecules25153503>
- Ebenezer, O., Jordaan, M. A., Carena, G., Bono, T., Shapi, M., & Tuszynski, J. A. (2022a). An Overview of the Biological Evaluation of Selected Nitrogen-Containing Heterocycle Medicinal Chemistry Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/ijms23158117>
- Ebenezer, O., Jordaan, M. A., Carena, G., Bono, T., Shapi, M., & Tuszynski, J. A. (2022b). An Overview of the Biological Evaluation of Selected Nitrogen-Containing Heterocycle Medicinal Chemistry Compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(15), Article 15. <https://doi.org/10.3390/ijms23158117>
- Egorova, A., Kazakova, E., Jahn, B., Ekins, S., Makarov, V., & Schmidtke, M. (2020). Novel pleconaril derivatives: Influence of substituents in the isoxazole and phenyl rings on the antiviral activity against enteroviruses. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 188, 112007. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.112007>
- El Mahmoudi, A., Tareau, A.-S., Barreau, M., Chevalier, S., Hourma, C., Demange, L., Benhida, R., & Bougrin, K. (2023). Green synthesis and anti-biofilm activities of 3,5-disubstituted isoxazoline/isoxazole-linked secondary sulfonamide derivatives on *Pseudomonas aeruginosa*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 96, 129517. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2023.129517>
- El-Aleam, R. H. A., F. George, R., H. Georgey, H., & M. Abdel-Rahman, H. (2021). Bacterial virulence factors: A target for heterocyclic compounds to combat bacterial resistance. *RSC Advances*, 11(58), 36459-36482. <https://doi.org/10.1039/D1RA06238G>
- Elmaaty, A. A., Darwish, K. M., Chrouda, A., Boseila, A. A., Tantawy, M. A., Elhady, S. S., Shaik, A. B., Mustafa, M., & Al-karmalawy, A. A. (2022). In Silico and In Vitro Studies for

- Benzimidazole Anthelmintics Repurposing as VEGFR-2 Antagonists: Novel Mebendazole-Loaded Mixed Micelles with Enhanced Dissolution and Anticancer Activity. *ACS Omega*, 7(1), 875-899. <https://doi.org/10.1021/acsomega.1c05519>
- Flemming, H.-C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: An emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563-575. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Francesconi, V., Cichero, E., Schenone, S., Naesens, L., & Tonelli, M. (2020). Synthesis and Biological Evaluation of Novel (thio)semicarbazone-Based Benzimidazoles as Antiviral Agents against Human Respiratory Viruses. *Molecules*, 25(7), 1487. <https://doi.org/10.3390/molecules25071487>
- Fung, F., Wang, H.-S., & Menon, S. (2018). Food safety in the 21st century. *Biomedical Journal*, 41(2), 88-95. <https://doi.org/10.1016/j.bj.2018.03.003>
- Galenko, A. V., Khlebnikov, A. F., Novikov, M. S., Pakalnis, V. V., & Rostovskii, N. V. (2015). Recent advances in isoxazole chemistry. *Russian Chemical Reviews*, 84(4), 335-377. <https://doi.org/10.1070/RCR4503>
- Galié, S., García-Gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., & Lombó, F. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Frontiers in Microbiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
- Grooters, K. E., Ku, J. C., Richter, D. M., Krinock, M. J., Minor, A., Li, P., Kim, A., Sawyer, R., & Li, Y. (2024). Strategies for combating antibiotic resistance in bacterial biofilms. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2024.1352273>
- Gulati, S., Singh, R., & Sangwan, S. (2021). Fruit juice mediated multicomponent reaction for the synthesis of substituted isoxazoles and their in vitro bio-evaluation. *Scientific Reports*, 11(1), 23563. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03057-6>
- Gunn, J. S., Bakaletz, L. O., & Wozniak, D. J. (2016). What's on the Outside Matters: The Role of the Extracellular Polymeric Substance of Gram-negative Biofilms in Evading Host Immunity and as a Target for Therapeutic Intervention *. *Journal of Biological Chemistry*, 291(24), 12538-12546. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.707547>
- Guo, K.-L., Zhao, L.-X., Wang, Z.-W., Gao, Y.-C., Li, J.-J., Gao, S., Fu, Y., & Ye, F. (2020). Design, Synthesis, and Bioevaluation of Substituted Phenyl Isoxazole Analogues as Herbicide

- Safeners. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(39), 10550-10559.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01867>
- Gupta, P., Sarkar, S., Das, B., Bhattacharjee, S., & Tribedi, P. (2016). Biofilm, pathogenesis and prevention—a journey to break the wall: A review. *Archives of Microbiology*, 198(1), 1-15. <https://doi.org/10.1007/s00203-015-1148-6>
- Habib, F., Alam, S., Hussain, A., Aneja, B., Irfan, M., Alajmi, M. F., Hasan, P., Khan, P., Rehman, M. T., Noman, O. M., Azam, A., & Abid, M. (2020). Biofilm inhibition and DNA binding studies of isoxazole-triazole conjugates in the development of effective anti-bacterial agents. *Journal of Molecular Structure*, 1201, 127144.
<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2019.127144>
- Haddad, N. (2022). *Hazards in the Food Processing and Distribution Chain*.
- Hall, C. W., & Mah, T.-F. (2017). Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 41(3), 276-301.
<https://doi.org/10.1093/femsre/fux010>
- Haney, E. F., Trimble, M. J., & Hancock, R. E. W. (2021). Microtiter plate assays to assess antibiofilm activity against bacteria. *Nature Protocols*, 16(5), 2615-2632.
<https://doi.org/10.1038/s41596-021-00515-3>
- Heravi, M. M., & Zadsirjan, V. (2020). Prescribed drugs containing nitrogen heterocycles: An overview. *RSC Advances*, 10(72), 44247-44311. <https://doi.org/10.1039/D0RA09198G>
- Hobley, L., Harkins, C., MacPhee, C. E., & Stanley-Wall, N. R. (2015). Giving structure to the biofilm matrix: An overview of individual strategies and emerging common themes. *FEMS Microbiology Reviews*, 39(5), 649-669. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuv015>
- Hsieh, C.-Y., Ko, P.-W., Chang, Y.-J., Kapoor, M., Liang, Y.-C., Chu, H.-L., Lin, H.-H., Horng, J.-C., & Hsu, M.-H. (2019). Design and Synthesis of Benzimidazole-Chalcone Derivatives as Potential Anticancer Agents. *Molecules*, 24(18), 3259.
<https://doi.org/10.3390/molecules24183259>
- Hu, Y., Wang, T., Liu, Y., Nie, R., Yang, N., Wang, Q., Li, G.-B., & Wu, Y. (2020). Practical Synthesis of Benzimidazo[1,2- a]quinolines via Rh(III)-Catalyzed C–H Activation Cascade Reaction from Imidamides and Anthranils. *Organic Letters*, 22(2), 501-504.
<https://doi.org/10.1021/acs.orglett.9b04256>

- Jara, M. C., Silva, A. C. A., Ritter, M., Da Silva, A. F., Gonçalves, C. L., Dos Santos, P. R., Borja, L. S., De Pereira, C. M. P., & Da Silva Nascente, P. (2022). Dihydropyrimidinones Against Multiresistant Bacteria. *Frontiers in Microbiology*, 13, 743213. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.743213>
- Jha, A. K., Kumari, R., & Easwar, S. (2022). Synthesis of 2,2-Disubstituted Dihydro-1,4-benzothiazines from Morita–Baylis–Hillman Ketones by an Oxidative Cyclization. *The Journal of Organic Chemistry*, 87(9), 5760-5772. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c00087>
- Jiang, J., Tuo, X., Fu, Z., Huang, H., & Deng, G.-J. (2020). Three-component synthesis of 1,4-benzothiazines via iodide-catalyzed aerobic C–H sulfuration with elemental sulfur. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18(17), 3234-3238. <https://doi.org/10.1039/D0OB00074D>
- Johnston, G. A. R. (2014). Muscimol as an Ionotropic GABA Receptor Agonist. *Neurochemical Research*, 39(10), 1942-1947. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1245-y>
- Joule, J. A., & Mills, K. (2011). *Heterocyclic chemistry* (5. ed., [Nachdr.]). Wiley.
- Karaburun, A. Ç., Kaya Çavuşoğlu, B., Acar Çevik, U., Osmaniye, D., Sağlık, B. N., Levent, S., Özkay, Y., Atlı, Ö., Koparal, A. S., & Kaplancıklı, Z. A. (2019). Synthesis and Antifungal Potential of Some Novel Benzimidazole-1,3,4-Oxadiazole Compounds. *Molecules*, 24(1), 191. <https://doi.org/10.3390/molecules24010191>
- Karygianni, L., Ren, Z., Koo, H., & Thurnheer, T. (2020). Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities. *Trends in Microbiology*, 28(8), 668-681. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>
- Khalid, H., Landry, K. B., Ijaz, B., Ashfaq, U. A., Ahmed, M., Kanwal, A., Froeyen, M., & Mirza, M. U. (2020). Discovery of novel Hepatitis C virus inhibitor targeting multiple allosteric sites of NS5B polymerase. *Infection, Genetics and Evolution*, 84, 104371. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104371>
- Li, S., Zhang, Y., Jiang, K., Wang, H., & Lin, F. (2021). Inhibitory effects of novel 1,4-disubstituted 1,2,3-triazole compounds on quorum-sensing of *P. aeruginosa* PAO1. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 40(2), 373-379. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03998-2>

- Li, Z., Liu, N., Tu, J., Ji, C., Han, G., & Sheng, C. (2019). Discovery of Simplified Sampangine Derivatives with Potent Antifungal Activities against Cryptococcal Meningitis. *ACS Infectious Diseases*, 5(8), 1376-1384. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.9b00086>
- Lin, Y., Lu, G., Wang, R., & Yi, W. (2016). Radical Route to 1,4-Benzothiazine Derivatives from 2-Aminobenzenethiols and Ketones under Transition-Metal-Free Conditions. *Organic Letters*, 18(24), 6424-6427. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.6b03324>
- Liu, D., Huang, Q., Gu, W., & Zeng, X.-A. (2022). A review of bacterial biofilm control by physical strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408398.2020.1865872>
- Mannan, M. A., & Kumar, G. (Ed.). (2023). *Current Trends in the Identification and Development of Antimicrobial Agents*. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS. <https://doi.org/10.2174/97898150800561230201>
- Meenakshi, M., Antojenifer, P., Karthikeyan, M., Prahalathan, C., & Srinivasan, K. (2022). Synthesis and biological evaluation of new 1, 4-BENZOTHAZINE derivatives as potential COX -2 inhibitors. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 59(2), 351-358. <https://doi.org/10.1002/jhet.4389>
- Mir, S., Dar, A. M., & Dar, B. A. (2020). Synthetic Strategies of Benzothiazines: A Mini Review. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*, 17(2), 148-157. <https://doi.org/10.2174/1570193X16666181206101439>
- Mitra, S., Mukherjee, S., & Hajra, A. (2016). Peroxide-free synthesis of benzo[b][1,4]thiazine 1,1-dioxides and their antimicrobial study. *RSC Advances*, 6(1), 201-207. <https://doi.org/10.1039/C5RA20541G>
- Morita, T., Yugandar, S., Fuse, S., & Nakamura, H. (2018). Recent progresses in the synthesis of functionalized isoxazoles. *Tetrahedron Letters*, 59(13), 1159-1171. <https://doi.org/10.1016/j.tetlet.2018.02.020>
- Muhammad, M. H., Idris, A. L., Fan, X., Guo, Y., Yu, Y., Jin, X., Qiu, J., Guan, X., & Huang, T. (2020). Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. *Frontiers in Microbiology*, 11, 928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928>

- Mulugeta, E., & Samuel, Y. (2022). Synthesis of Benzimidazole-Sulfonyl Derivatives and Their Biological Activities. *Biochemistry Research International*, 2022, 1-13. <https://doi.org/10.1155/2022/7255299>
- Nathwani, D., & Wood, M. J. (1993). Penicillins: A Current Review of their Clinical Pharmacology and Therapeutic Use. *Drugs*, 45(6), 866-894. <https://doi.org/10.2165/00003495-199345060-00002>
- Neeraja, P., Srinivas, S., Banothu, V., Sridhar, B., Mukkanti, K., Dubey, P. K., & Pal, S. (2020). Assembly of Benzothiazine and Triazole in a Single Molecular Entity: Synthesis of - Oxicam Derived Novel Molecules as Potential Antibacterial/ Anti-cancer Agents. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 20(10), 929-940. <https://doi.org/10.2174/1389557520666200124091315>
- Ni, T., Chi, X., Xie, F., Li, L., Wu, H., Hao, Y., Wang, X., Zhang, D., & Jiang, Y. (2023). Design, synthesis, and evaluation of novel tetrazoles featuring isoxazole moiety as highly selective antifungal agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 246, 115007. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.115007>
- Pandhurnekar, C. P., Pandhurnekar, H. C., Mungole, A. J., Butoliya, S. S., & Yadao, B. G. (2023). A review of recent synthetic strategies and biological activities of isoxazole. *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 60(4), 537-565. <https://doi.org/10.1002/jhet.4586>
- Panga, S. S., Tamatam, R., Adivireddy, P., Venkatapuram, P., Narra, S. K., & Paturu, K. (2019). Synthesis, cytotoxic and antioxidant activities of azolyl benzothiazine carboxamides. *Research on Chemical Intermediates*, 45(5), 3053-3075. <https://doi.org/10.1007/s11164-019-03778-4>
- Patel, C., Bassin, J., Scott, M., Flye, J., Hunter, A., Martin, L., & Goyal, M. (2016). Synthesis and Antimicrobial Activity of 1,2-Benzothiazine Derivatives. *Molecules*, 21(7), 861. <https://doi.org/10.3390/molecules21070861>
- Pérez, J. M., & Ramón, D. J. (2015). Synthesis of 3,5-Disubstituted Isoxazoles and Isoxazolines in Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 3(9), 2343-2349. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.5b00689>
- Pham, E. C., Le Thi, T. V., Ly Hong, H. H., Vo Thi, B. N., Vong, L. B., Vu, T. T., Vo, D. D., Tran Nguyen, N. V., Bao Le, K. N., & Truong, T. N. (2023). N ,2,6-Trisubstituted 1 H -

- benzimidazole derivatives as a new scaffold of antimicrobial and anticancer agents: Design, synthesis, *in vitro* evaluation, and *in silico* studies. *RSC Advances*, 13(1), 399-420. <https://doi.org/10.1039/D2RA06667J>
- Picconi, P., Hind, C., Jamshidi, S., Nahar, K., Clifford, M., Wand, M. E., Sutton, J. M., & Rahman, K. M. (2017). Triaryl Benzimidazoles as a New Class of Antibacterial Agents against Resistant Pathogenic Microorganisms. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60(14), 6045-6059. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.7b00108>
- Prasad, S. S., & Baskaran, S. (2018). Iminosugar C-Nitromethyl Glycoside: Stereoselective Synthesis of Isoxazoline and Isoxazole-Fused Bicyclic Iminosugars. *The Journal of Organic Chemistry*, 83(3), 1558-1564. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.7b02803>
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015a). Agents that Inhibit Bacterial Biofilm Formation. *Future Medicinal Chemistry*, 7(5), 647-671. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.7>
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015b). Biofilm Formation Mechanisms and Targets for Developing Antibiofilm Agents. *Future Medicinal Chemistry*, 7(4), 493-512. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.6>
- Rai, A., Kumar, U., Raj, V., Singh, A. K., Kumar, P., Keshari, A. K., Kumar, D., Maity, B., De, A., Samanta, A., Nath, S., Prakash, A., Gosipatala, S. B., Chand, G., & Saha, S. (2018). Novel 1,4-benzothiazines obliterate COX-2 mediated JAK-2/STAT-3 signals with potential regulation of oxidative and metabolic stress during colorectal cancer. *Pharmacological Research*, 132, 188-203. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.12.010>
- Rai, A., Singh, A. K., Raj, V., & Saha, S. (2018). 1,4-Benzothiazines-A Biologically Attractive Scaffold. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(1), 42-57. <https://doi.org/10.2174/1389557517666170529075556>
- Rai, V. R., & Bai, J. A. (Ed.). (2018). *Food safety and protection*. CRC Press, Taylor & Francis Group.
- Ramya Sucharitha, E., Krishna, T. M., Manchal, R., Ramesh, G., & Narsimha, S. (2021). Fused benzo[1,3]thiazine-1,2,3-triazole hybrids: Microwave-assisted one-pot synthesis, *in vitro* antibacterial, antibiofilm, and *in silico* ADME studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 47, 128201. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2021.128201>

- Rep, V., Štulić, R., Koštrun, S., Kuridža, B., Crnolatac, I., Radić Stojković, M., Paljetak, H. Č., Perić, M., Matijašić, M., & Raić-Malić, S. (2022). Novel tetrahydropyrimidinyl-substituted benzimidazoles and benzothiazoles: Synthesis, antibacterial activity, DNA interactions and ADME profiling. *RSC Medicinal Chemistry*, 13(12), 1504-1525. <https://doi.org/10.1039/D2MD00143H>
- Richter, K., & Kragh, K. N. (Ed.). (2022). *Antibiofilm Strategies: Current and Future Applications to Prevent, Control and Eradicate Biofilms* (C. 11). Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-031-10992-8>
- Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. (2018). Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*, 9(1), 522-554. <https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1313372>
- Rumbaugh, K. P., & Ahmad, I. (Ed.). (2014). *Antibiofilm Agents: From Diagnosis to Treatment and Prevention* (C. 8). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-53833-9>
- Sadekuzzaman, M., Yang, S., Mizan, M. F. R., & Ha, S. D. (2015). Current and Recent Advanced Strategies for Combating Biofilms. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(4), 491-509. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12144>
- Salahuddin, Shaharyar, M., & Mazumder, A. (2017). Benzimidazoles: A biologically active compounds. *Arabian Journal of Chemistry*, 10, S157-S173. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2012.07.017>
- Saleh, E. A. M., Kotian, S. Y., Al Dawsari, A. M., Hassan, I., Husain, K., Abishad, P. C., Byrappa, K., Sharabi, R. S. S. A., & Rai, K. M. L. (2022). Synthesis, Antioxidant, and Antibacterial Activities of Two Novel Series of 3,5-Disubstituted Isoxazole Ether-Linked Isoxazolines and 3,5-Disubstituted Pyrazole Ether-Linked Isoxazolines Mediated by Chloramine-T. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 48(5), 1043-1052. <https://doi.org/10.1134/S1068162022050181>
- Satpathy, S., Sen, S. K., Pattanaik, S., & Raut, S. (2016). Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 7, 56-66. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.05.002>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., & Bjarnsholt, T. (2022). The biofilm life cycle: Expanding the conceptual model of biofilm formation.

Nature Reviews Microbiology, 20(10), 608-620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>

- Sebbar, N. K., Mekhzoum, M. E. M., Essassi, E. M., Zerzouf, A., Talbaoui, A., Bakri, Y., Saadi, M., & Ammari, L. E. (2016). Novel 1,4-benzothiazine derivatives: Synthesis, crystal structure, and anti-bacterial properties. *Research on Chemical Intermediates*, 42(9), 6845-6862. <https://doi.org/10.1007/s11164-016-2499-6>
- Shaik, A., Bhandare, R. R., Palleapati, K., Nissankararao, S., Kancharlapalli, V., & Shaik, S. (2020). Antimicrobial, Antioxidant, and Anticancer Activities of Some Novel Isoxazole Ring Containing Chalcone and Dihydropyrazole Derivatives. *Molecules*, 25(5), 1047. <https://doi.org/10.3390/molecules25051047>
- Shaikh, A. R., Farooqui, M., Satpute, R. H., & Abed, S. (2018). Overview on Nitrogen containing compounds and their assessment based on 'International Regulatory Standards'. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 8(6-s), 424-428. <https://doi.org/10.22270/jddt.v8i6-s.2156>
- Sharahi, J. Y., Azimi, T., Shariati, A., Safari, H., Tehrani, M. K., & Hashemi, A. (2019). Advanced strategies for combating bacterial biofilms. *Journal of Cellular Physiology*, 234(9), 14689-14708. <https://doi.org/10.1002/jcp.28225>
- Sharma, Y., Pawar, G. P., & Chaudhari, V. D. (2023). One-Pot Domino Reaction: Direct Access to Polysubstituted 1,4-Benzothiazine 1,1-Dioxide via Water–Gas Shift Reaction Utilizing DMF/H₂O. *The Journal of Organic Chemistry*, 88(1), 701-710. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.2c02171>
- Song, D., & Ma, S. (2016). Recent Development of Benzimidazole-Containing Antibacterial Agents. *ChemMedChem*, 11(7), 646-659. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600041>
- Strauss, C. R., & Rooney, D. W. (2010). Accounting for clean, fast and high yielding reactions under microwave conditions. *Green Chemistry*, 12(8), 1340. <https://doi.org/10.1039/c0gc00024h>
- Sun, H., Ansari, M. F., Fang, B., & Zhou, C.-H. (2021). Natural Berberine-Hybridized Benzimidazoles as Novel Unique Bactericides against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(28), 7831-7840. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c02545>

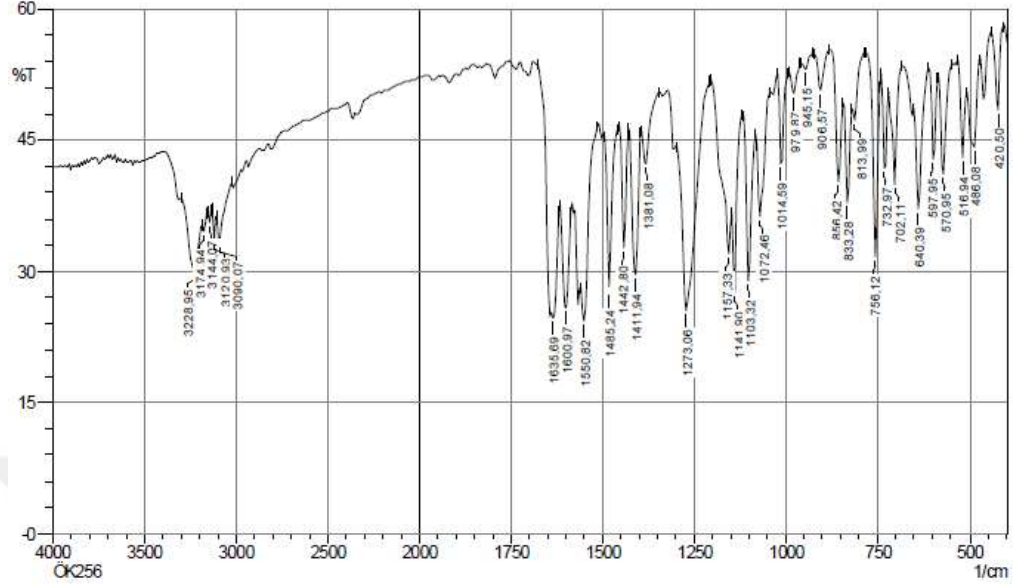
- Swapnaja, K. J. M., Yennam, S., Chavali, M., Poornachandra, Y., Kumar, C. G., Muthusamy, K., Jayaraman, V. B., Arumugam, P., Balasubramanian, S., & Sriram, K. K. (2016). Design, synthesis and biological evaluation of diaziridinyl quinone isoxazole hybrids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 117, 85-98. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.03.042>
- Tamatam, R., Panga, S. S., Grigory, Z., Gundala, S., Nemallapudi, B. R., Vasikarla, K. P., Adivireddy, P., & Venkatapuram, P. (2019). Synthesis, Antimicrobial and Antioxidant Activities of Pyrimidinyl Benzothiazine Carboxamides. *ChemistrySelect*, 4(22), 6813-6820. <https://doi.org/10.1002/slct.201900525>
- Thakur, A., Verma, M., Setia, P., Bharti, R., Sharma, R., Sharma, A., Negi, N. P., Anand, V., & Bansal, R. (2023). DFT analysis and in vitro studies of isoxazole derivatives as potent antioxidant and antibacterial agents synthesized via one-pot methodology. *Research on Chemical Intermediates*, 49(3), 859-883. <https://doi.org/10.1007/s11164-022-04910-7>
- Tiwari, G., Khanna, A., Mishra, V. K., & Sagar, R. (2023). Recent developments on microwave-assisted organic synthesis of nitrogen- and oxygen-containing preferred heterocyclic scaffolds. *RSC Advances*, 13(47), 32858-32892. <https://doi.org/10.1039/d3ra05986c>
- Tolker-Nielsen, T. (2015). Biofilm Development. *Microbiology Spectrum*, 3(2), 3.2.21. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014>
- Uruén, C., Chopo-Escuin, G., Tommassen, J., Mainar-Jaime, R. C., & Arenas, J. (2020). Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics*, 10(1), 3. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10010003>
- Vadivelu, M., Sampath, S., Muthu, K., Karthikeyan, K., & Praveen, C. (2019). Harnessing the TEMPO-Catalyzed Aerobic Oxidation for Machetti–De Sarlo Reaction toward Sustainable Synthesis of Isoxazole Libraries. *The Journal of Organic Chemistry*, 84(21), 13636-13645. <https://doi.org/10.1021/acs.joc.9b01896>
- Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. (2019). Bacterial Biofilm Eradication Agents: A Current Review. *Frontiers in Chemistry*, 7, 824. <https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00824>
- Vestby, L. K., Grønseth, T., Simm, R., & Nesse, L. L. (2020). Bacterial Biofilm and its Role in the Pathogenesis of Disease. *Antibiotics*, 9(2), 59. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9020059>

- Wang, X., Hu, Q., Tang, H., & Pan, X. (2023). Isoxazole/Isoxazoline Skeleton in the Structural Modification of Natural Products: A Review. *Pharmaceuticals*, 16(2), Article 2. <https://doi.org/10.3390/ph16020228>
- Xia, J., Yang, X., Li, Y., & Li, X. (2017). Iridium(III)-Catalyzed Synthesis of Benzimidazoles via C–H Activation and Amidation of Aniline Derivatives. *Organic Letters*, 19(12), 3243–3246. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b01356>
- Xie, F., Ni, T., Ding, Z., Hao, Y., Wang, R., Wang, R., Wang, T., Chai, X., Yu, S., Jin, Y., Jiang, Y., & Zhang, D. (2020). Design, synthesis, and *in vitro* evaluation of novel triazole analogues featuring isoxazole moieties as antifungal agents. *Bioorganic Chemistry*, 101, 103982. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103982>
- Yang, Z., Li, P., & Gan, X. (2018). Novel Pyrazole-Hydrazone Derivatives Containing an Isoxazole Moiety: Design, Synthesis, and Antiviral Activity. *Molecules*, 23(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/molecules23071798>
- Ye, F., Zhai, Y., Kang, T., Wu, S.-L., Li, J.-J., Gao, S., Zhao, L.-X., & Fu, Y. (2019). Rational design, synthesis and structure-activity relationship of novel substituted oxazole isoxazole carboxamides as herbicide safener. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 157, 60–68. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.03.003>
- Zhang, T. Y. (2017). The Evolving Landscape of Heterocycles in Drugs and Drug Candidates. İçinde *Advances in Heterocyclic Chemistry* (C. 121, ss. 1–12). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.aihch.2016.05.001>
- Zhang, X.-W., Hu, W.-L., Chen, S., & Hu, X.-G. (2018). Cu-Catalyzed Synthesis of Fluoroalkylated Isoxazoles from Commercially Available Amines and Alkynes. *Organic Letters*, 20(3), 860–863. <https://doi.org/10.1021/acs.orglett.7b04028>
- Zhou, J., Xu, W., You, Z., Wang, Z., Luo, Y., Gao, L., Yin, C., Peng, R., & Lan, L. (2016). A new type of power energy for accelerating chemical reactions: The nature of a microwave-driving force for accelerating chemical reactions. *Scientific Reports*, 6(1), 25149. <https://doi.org/10.1038/srep25149>
- Zhu, J., Mo, J., Lin, H., Chen, Y., & Sun, H. (2018). The recent progress of isoxazole in medicinal chemistry. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 26(12), 3065–3075. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.05.013>

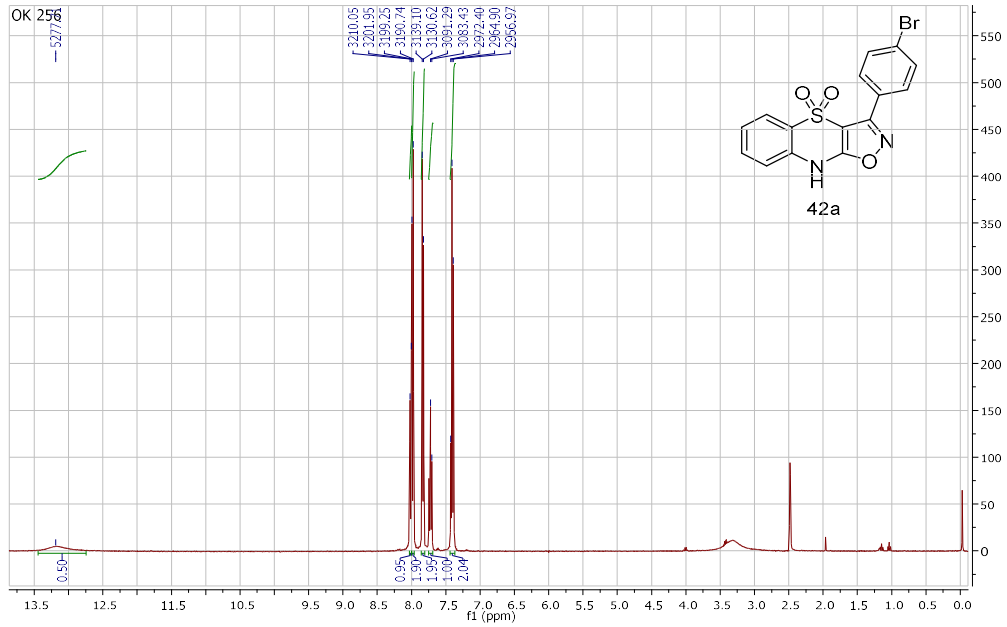


8. EKLER

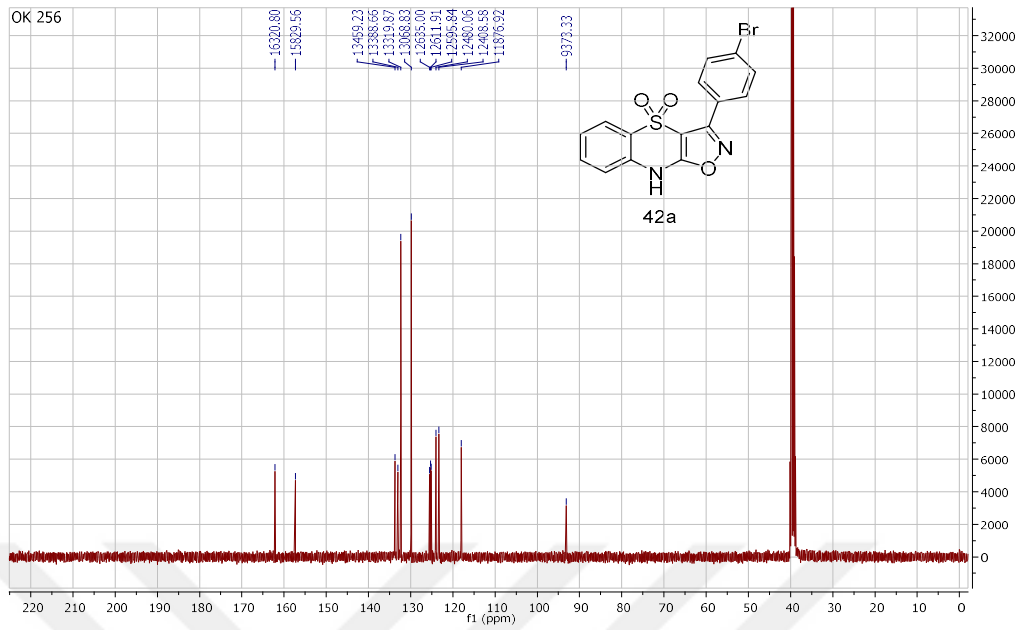
EK 1



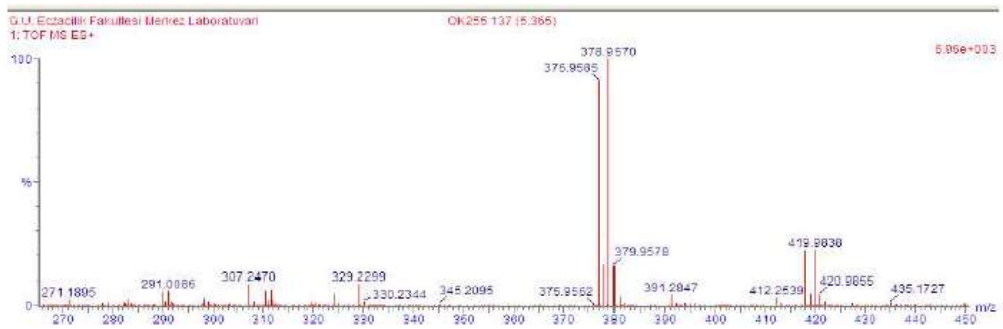
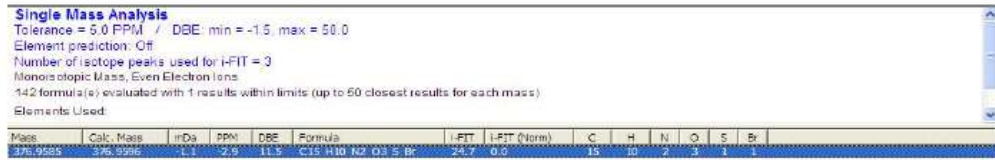
Şekil 8.1. 42a bileşiğinin IR spektrumu



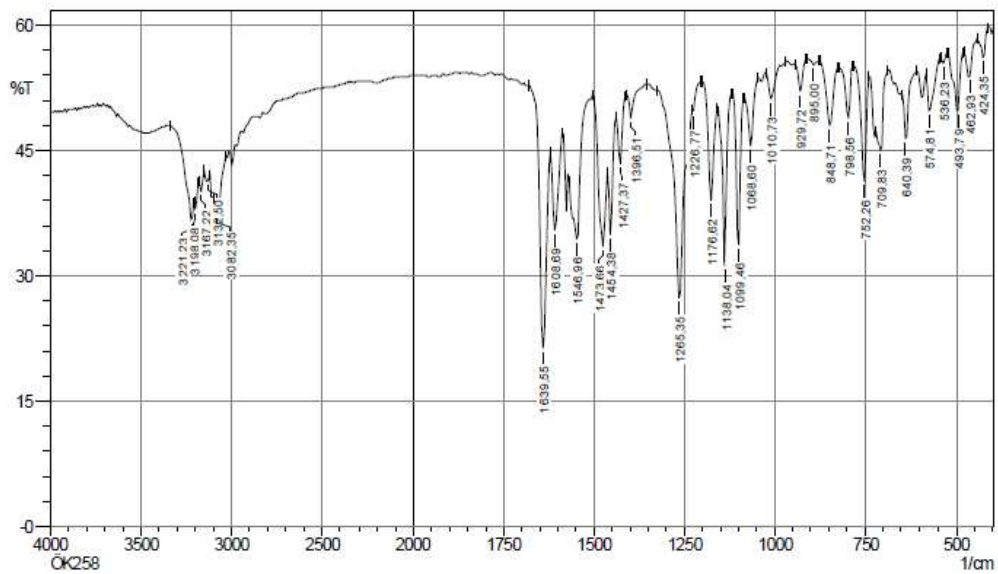
Şekil 8.2. 42a bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



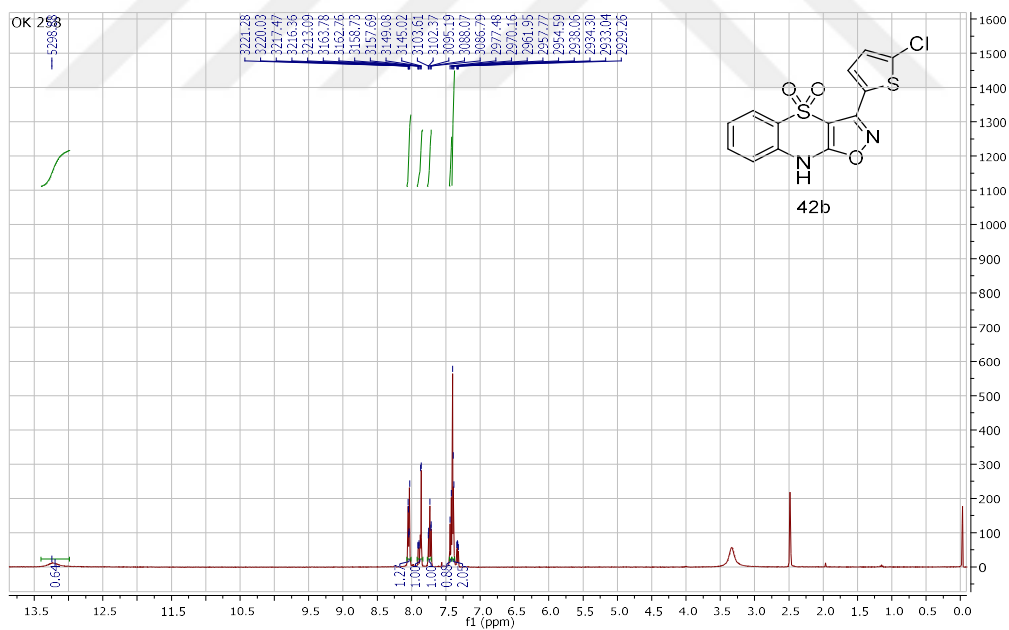
Şekil 8.3. 42a bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



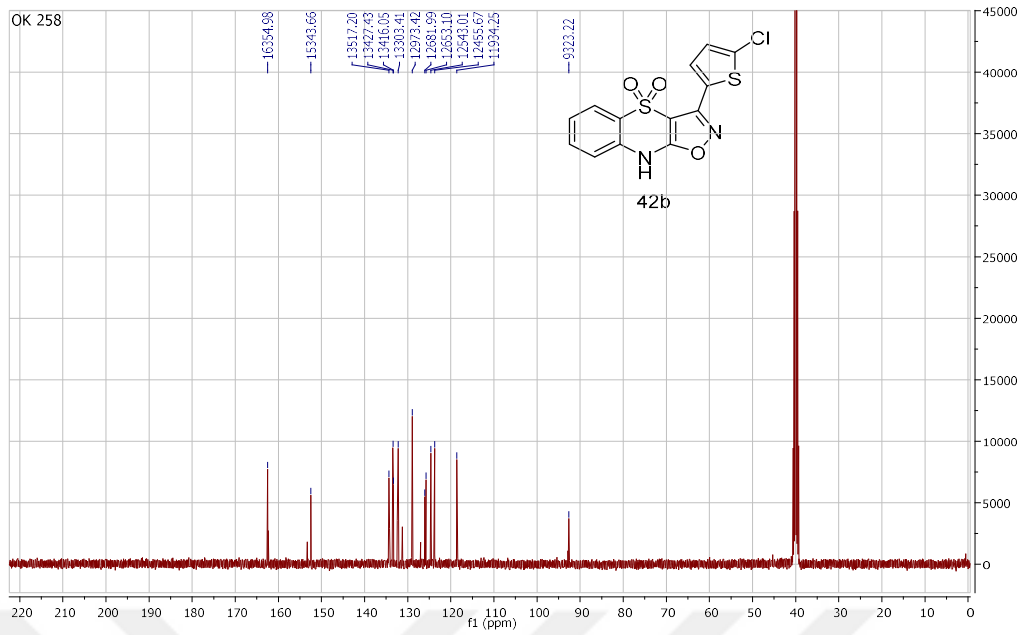
Şekil 8.4. 42a bileşiğinin HRMS spektrumu



Şekil 8.5. 42b bileşiğinin IR spektrumu



Şekil 8.6. 42b bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 8.7. 42b bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

267 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

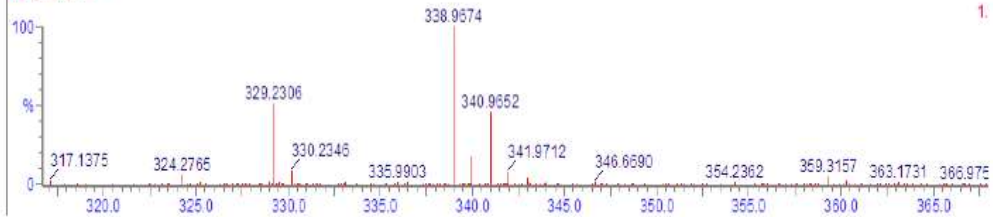
Elements Used:

Mass	Calc. Mass	mDe	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT (Norm)	C	H	N	O	S	Cl
338.9674	338.9665	0.9	2.7	10.5	C ₁₃ H ₈ N ₂ O ₃ S ₂ Cl	39.9	0.0	13	8	2	3	2	1

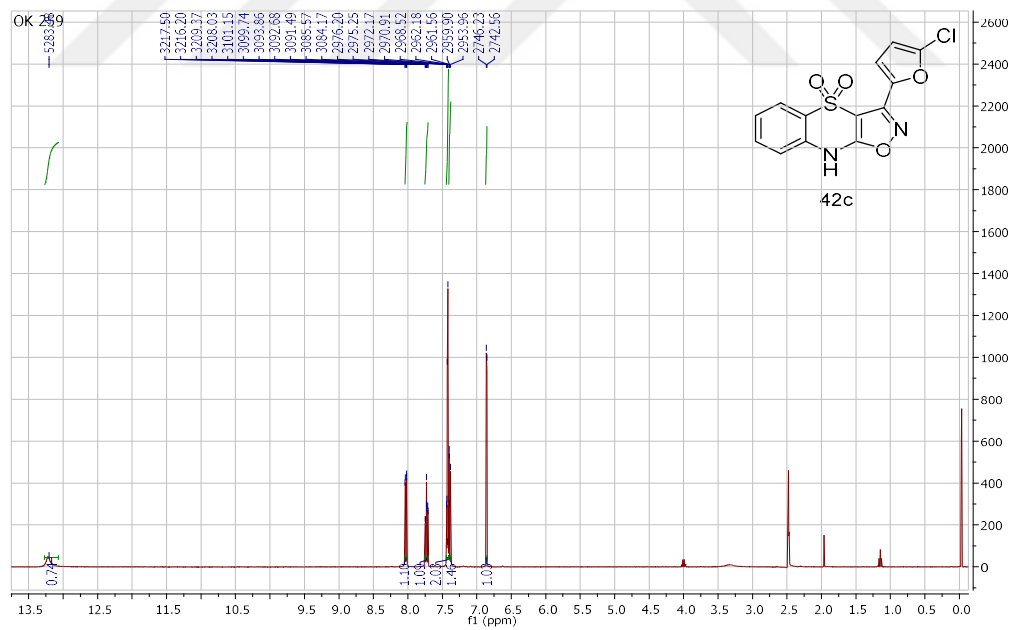
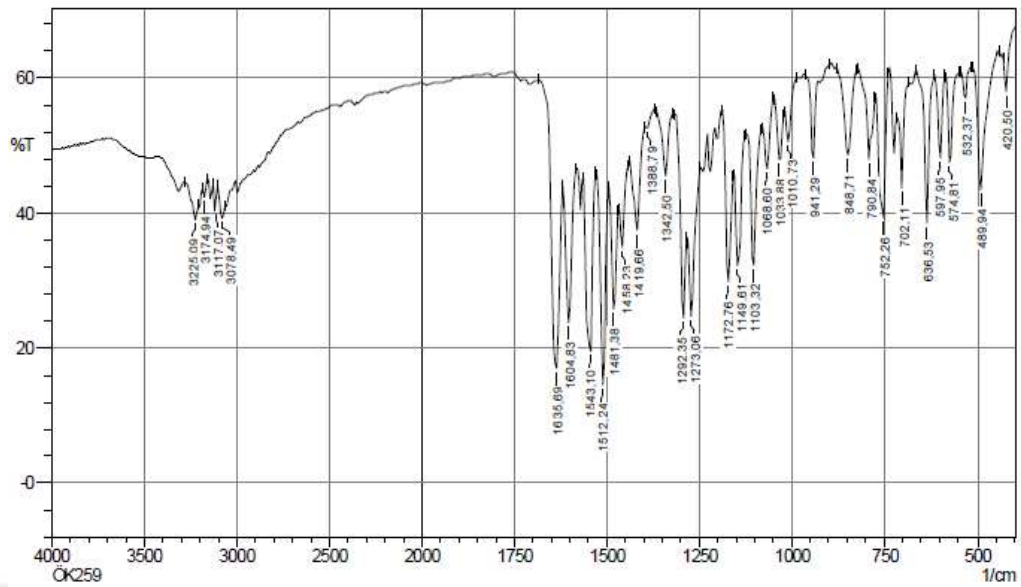
G.U. Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı

OK-258_01 139 (5.431) Cm (139-125:128)

1: TOF MS ES+



Şekil 8.8. 42b bileşiğinin HRMS spektrumu

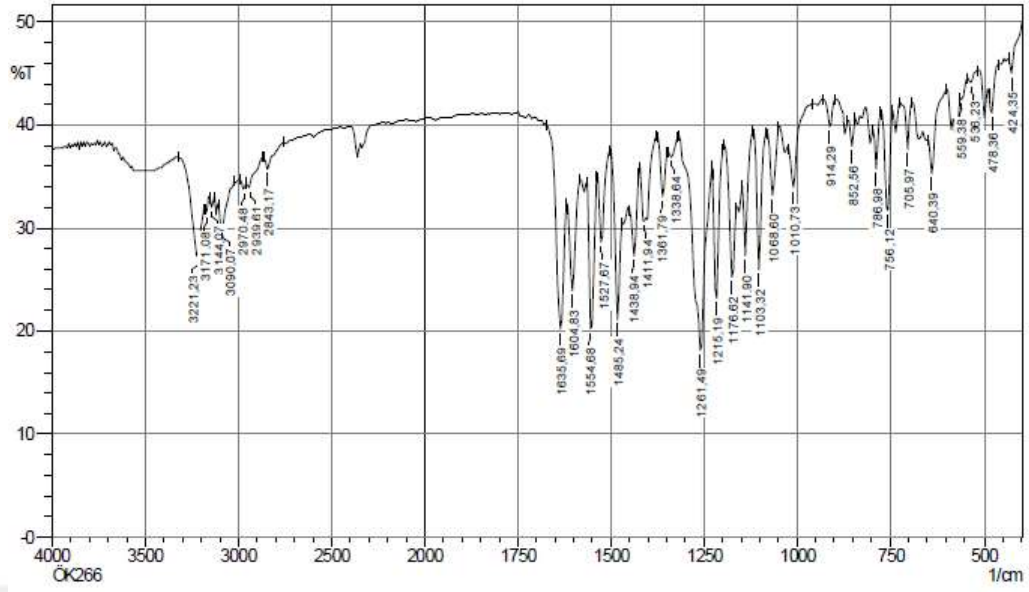




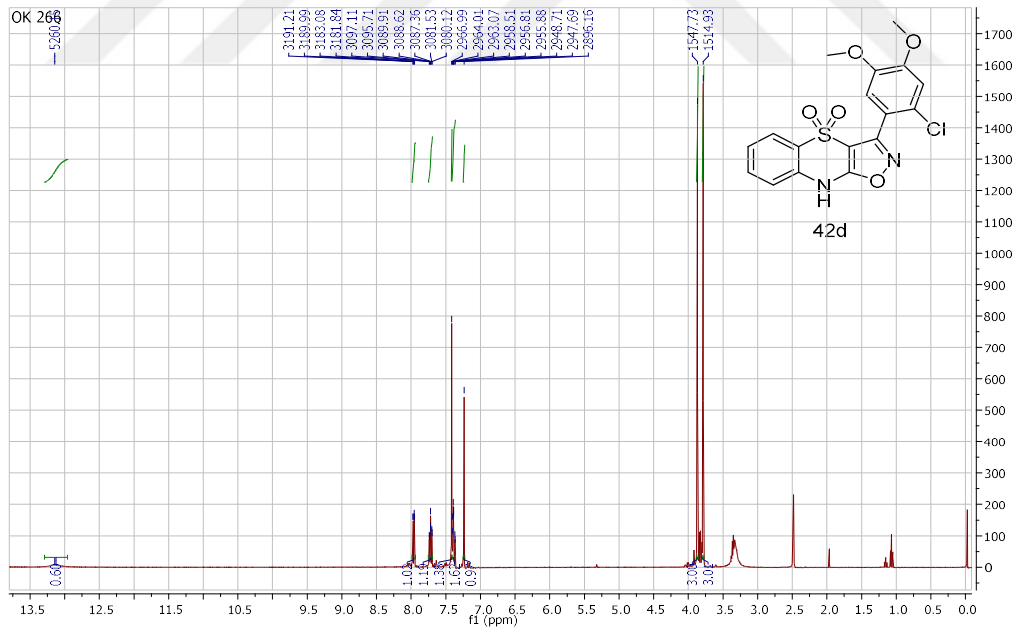
Elements Used:

1: TOF MS ES+

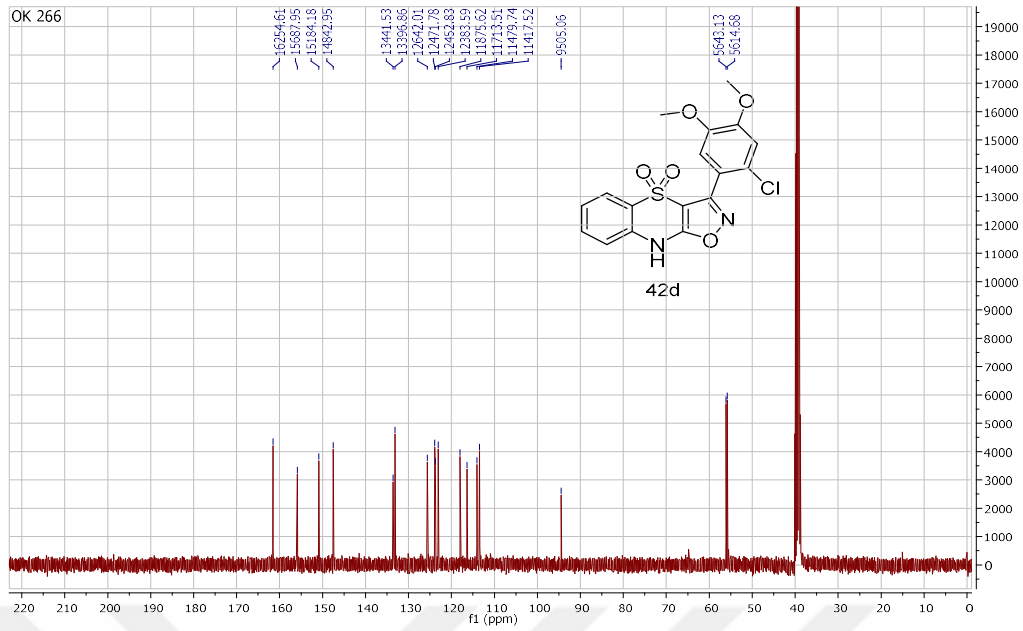




Şekil 8.13. 42d bileşiğinin IR spektrumu



Şekil 8.14. 42d bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 8.15. 42d bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

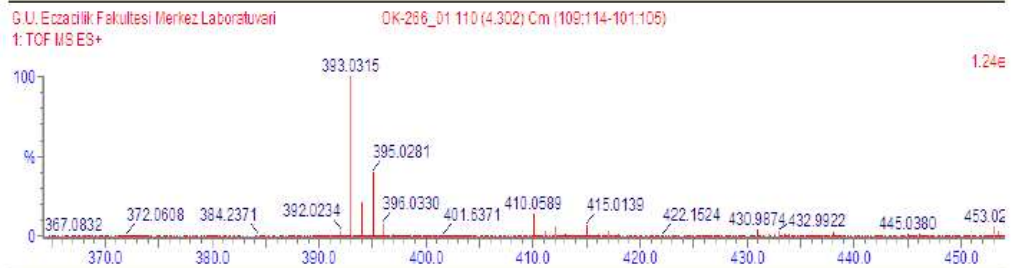
Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass: Even Electron Ions

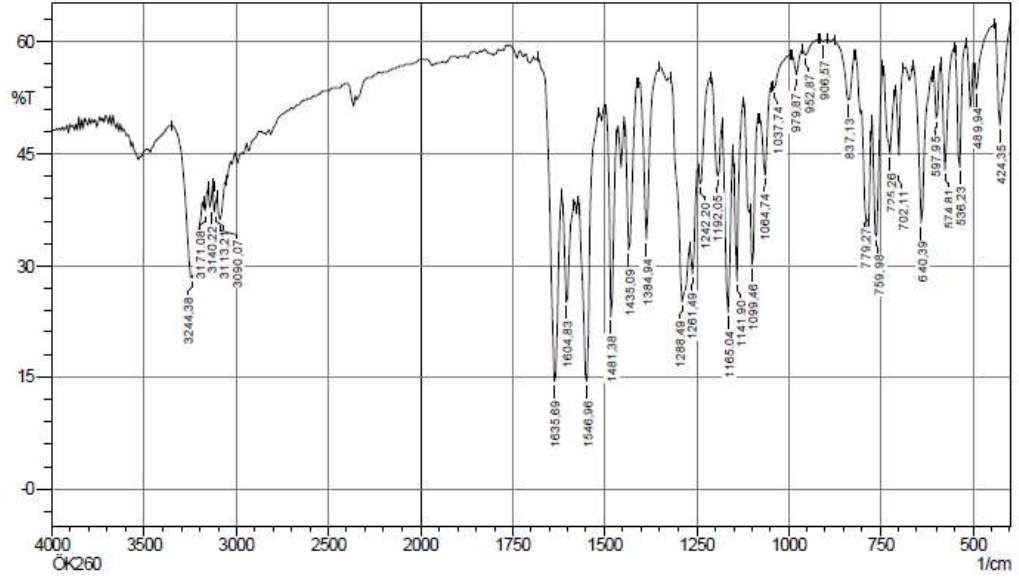
331 formula(e) evaluated with 2 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

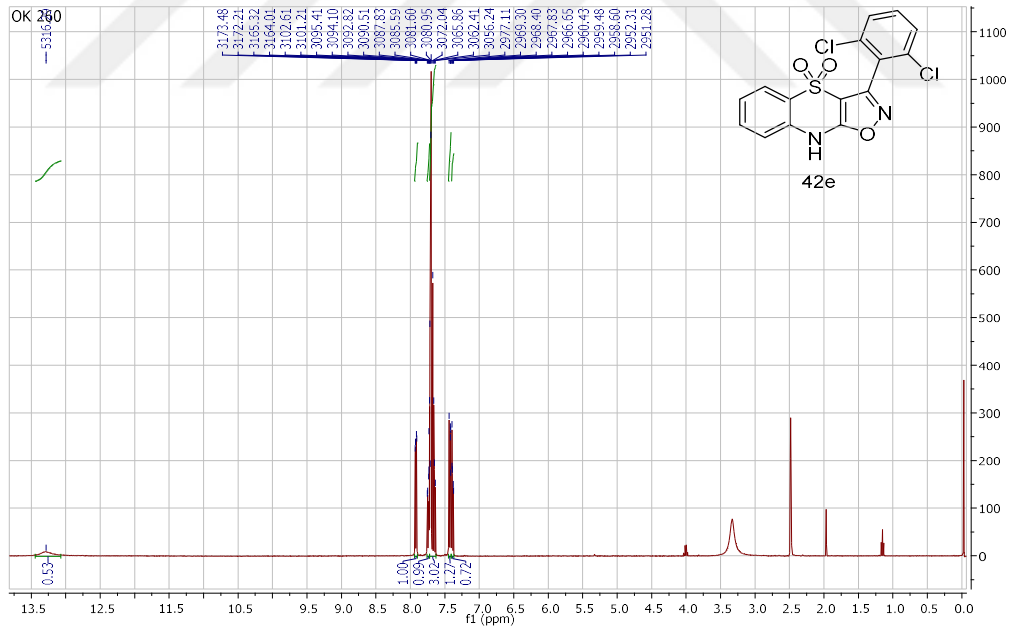
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT (norm)	C	H	N	O	S	Cl
393.0315	393.0312	0.3	0.8	11.5	C17 H14 N2 O5 S Cl	293.5	0.0	17	14	2	5	1	1
393.0299	393.0299	1.6	4.1	1.5	C12 H23 N2 O2 S3 Cl2	311.1	17.6	12	23	2	2	3	2



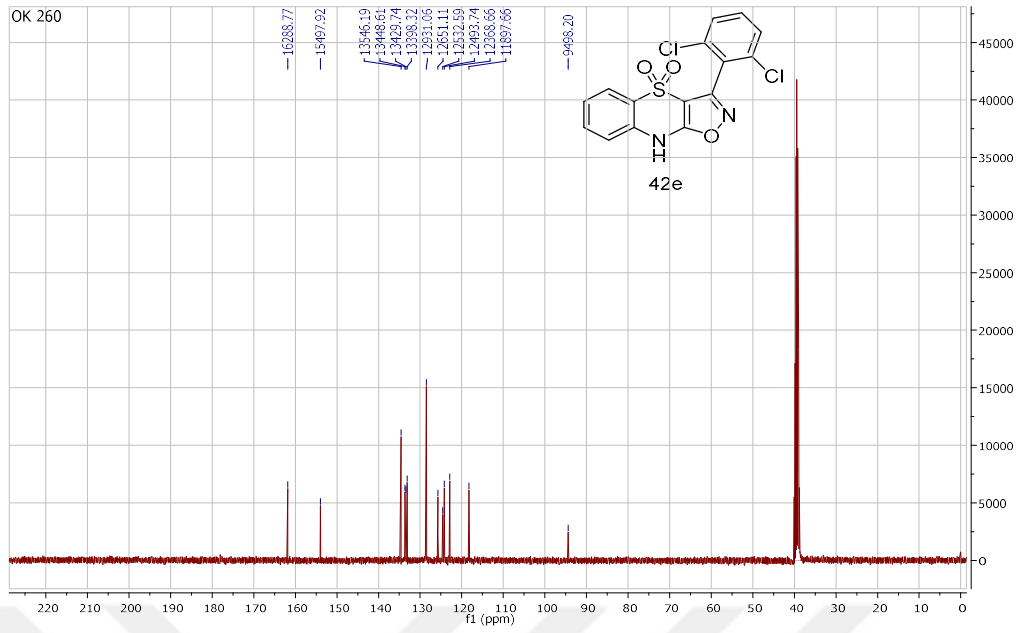
Şekil 8.16. 42d bileşiğinin HRMS spektrumu



Şekil 8.17. 42e bileşiğinin IR spektrumu



Şekil 8.18. 42e bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 8.19. 42e bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

287 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

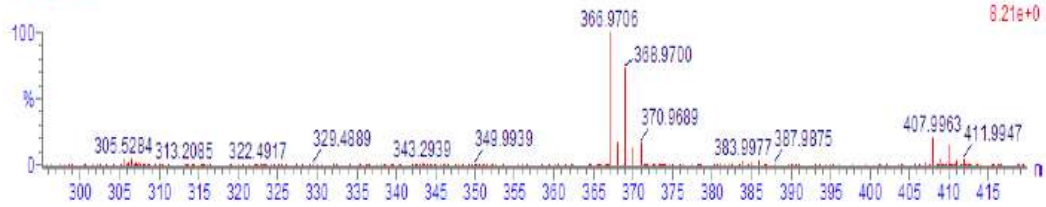
Elements Used:

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT (Norm)	C	H	N	O	S	Cl
366.9706	366.9711	-0.5	-1.4	11.5	C ₁₅ H ₉ N ₂ O ₃ S ₂ Cl ₂	38.6	0.0	15	9	2	3	1	2

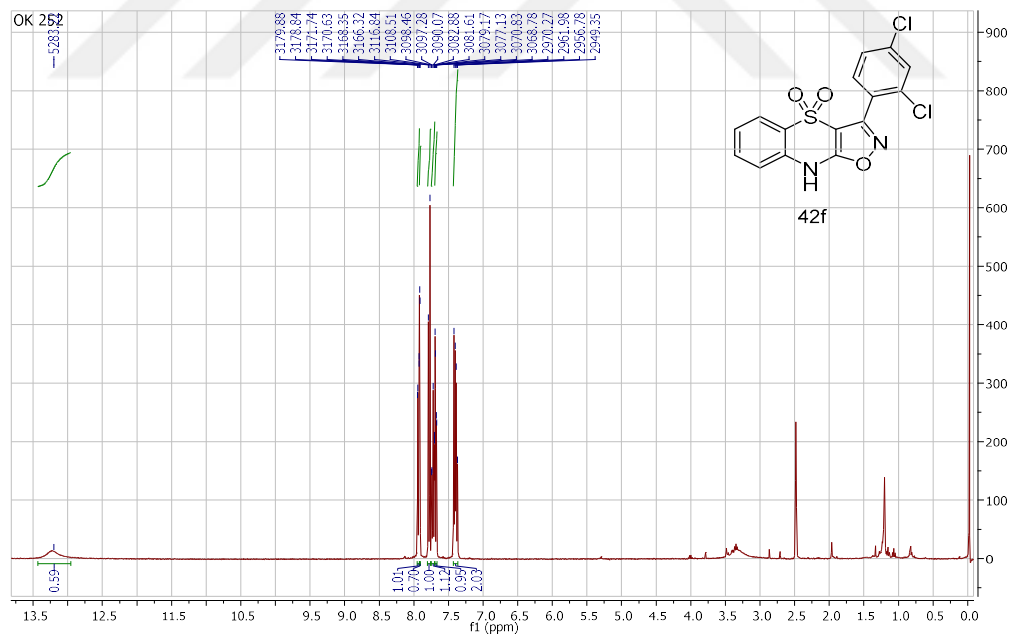
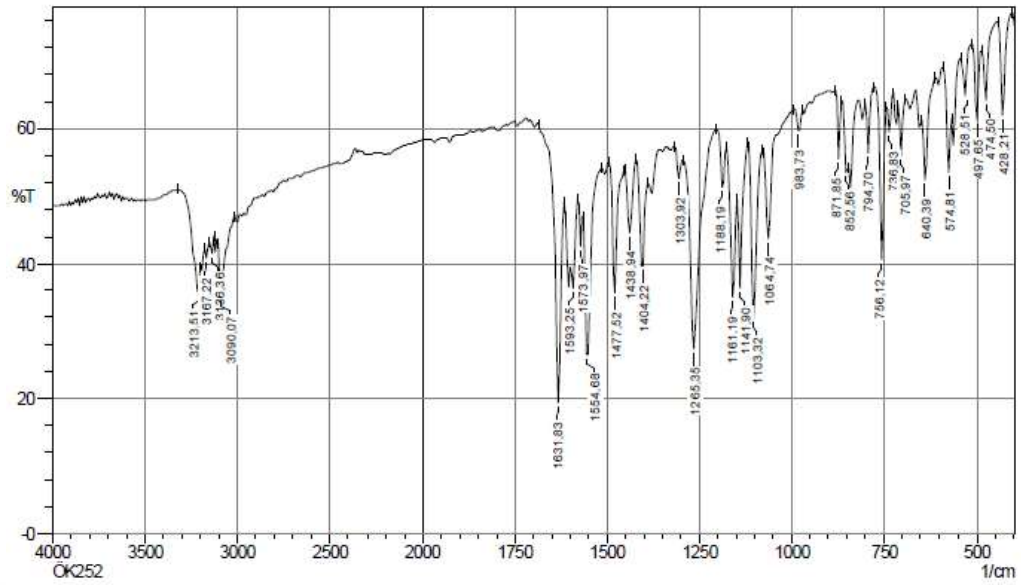
G.U. Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı

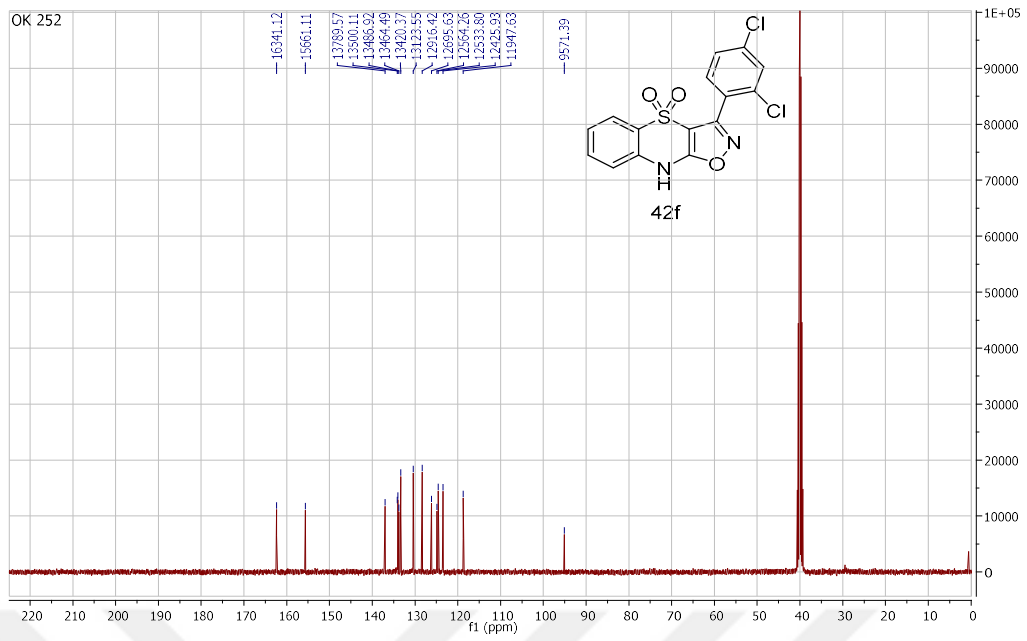
OK-260_01.118 (4.613) Cm (118-(37.42+168.171))

1. TOF MS ES+

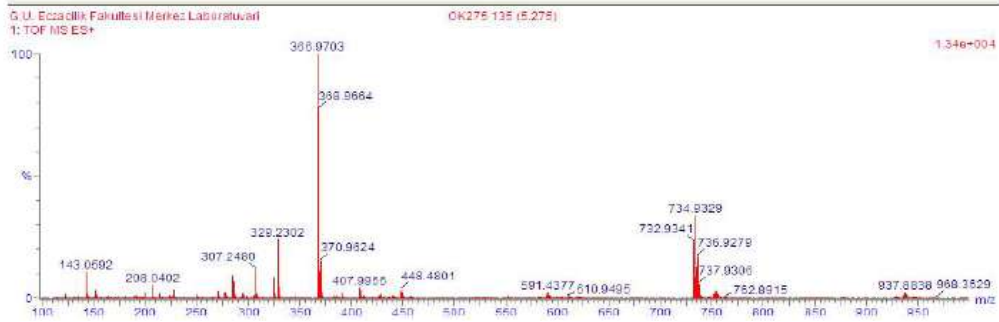
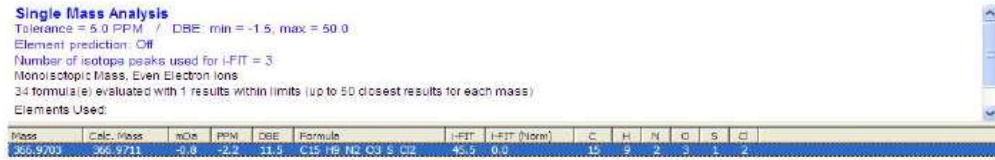


Şekil 8.20. 42e bileşiğinin HRMS spektrumu

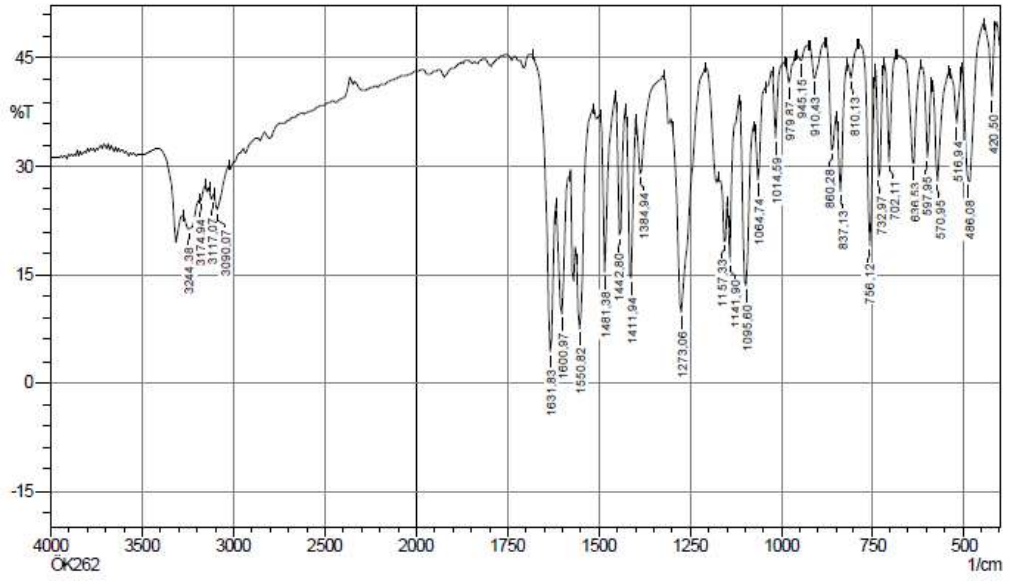




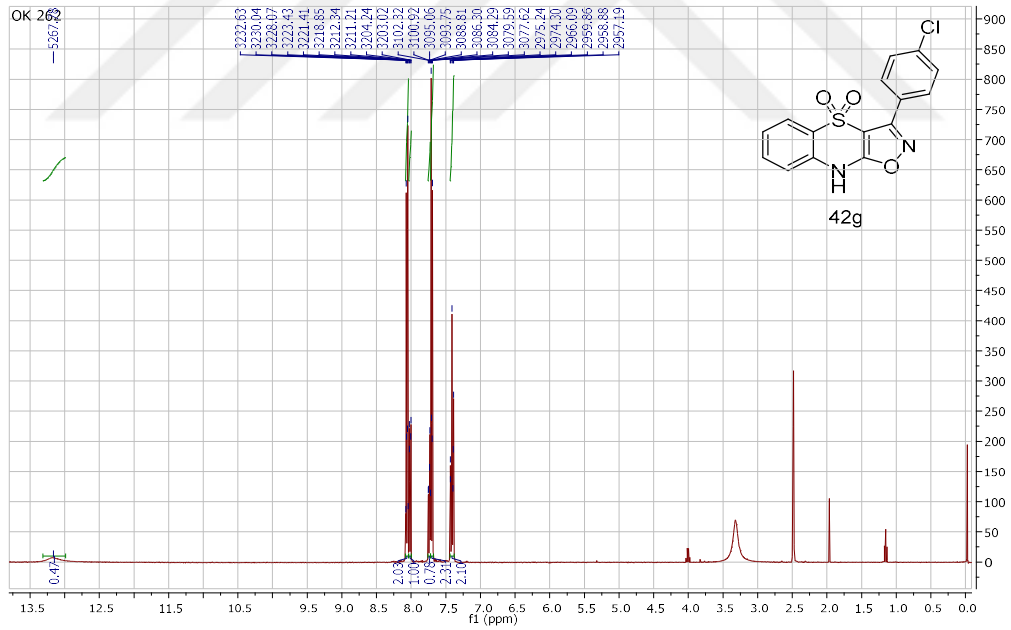
Şekil 8.23. 42f bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



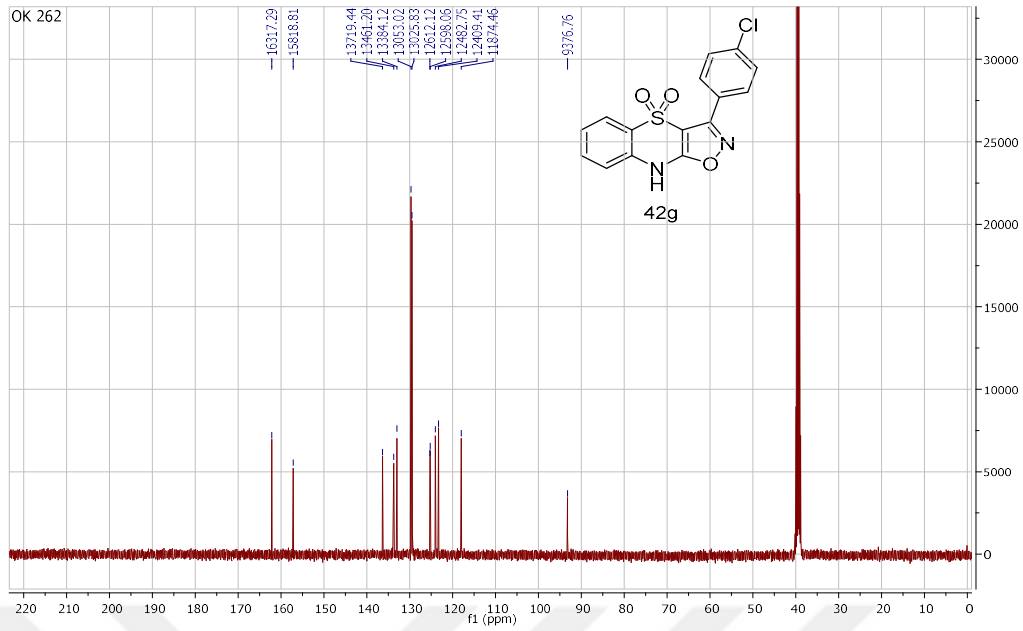
Şekil 8.24. 42f bileşiğinin HRMS spektrumu



Şekil 8.25. 42g bileşiğinin IR spektrumu



Şekil 8.26. 42g bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 8.27. 42g bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Cl

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass: Even Electron Ions

250 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

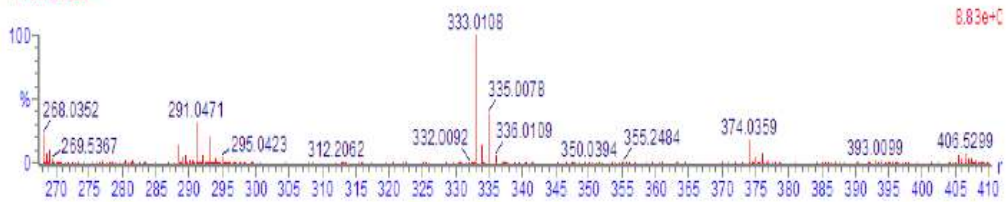
Elements Used:

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT (Norm)	C	H	N	O	S	Cl
333.0108	333.0101	0.7	2.1	11.5	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ S Cl	29.1	0.0	15	10	2	3	1	1

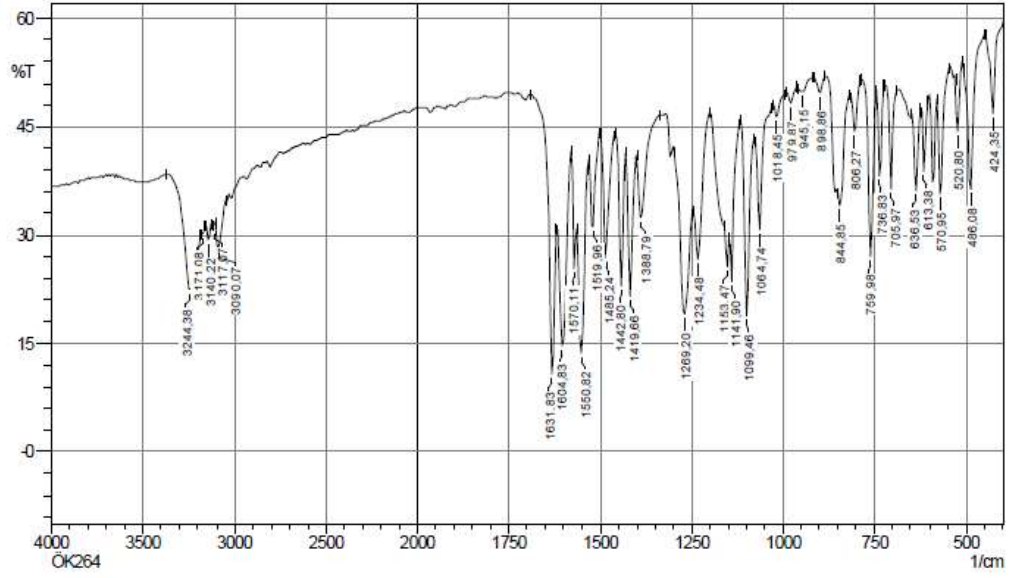
G.U. Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı

OK-262_01 133 (5.217) Cm (133-(37*44+169;172))

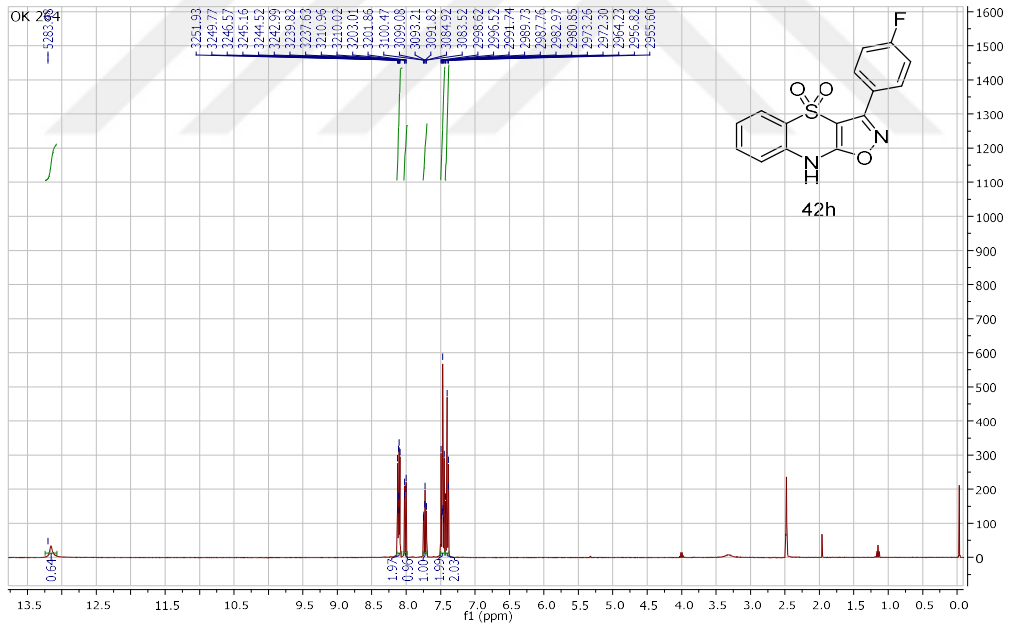
1: TOF MS ES+



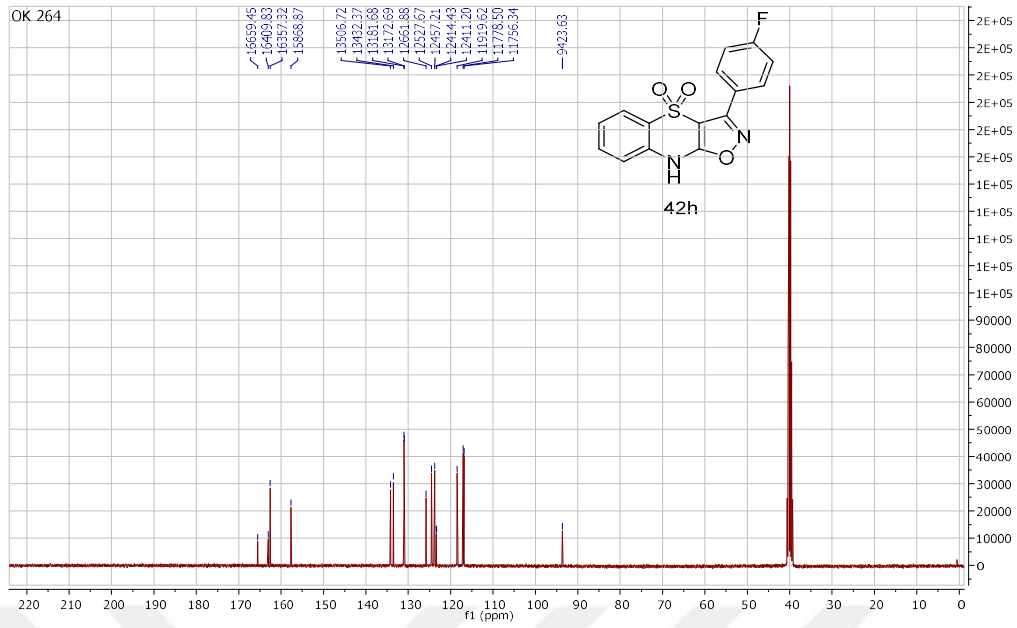
Şekil 8.28. 42g bileşiğinin HRMS spektrumu



Şekil 8.29. 42h bileşiğinin IR spektrumu



Şekil 8.30. 42h bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 8.31. 42h bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

117 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

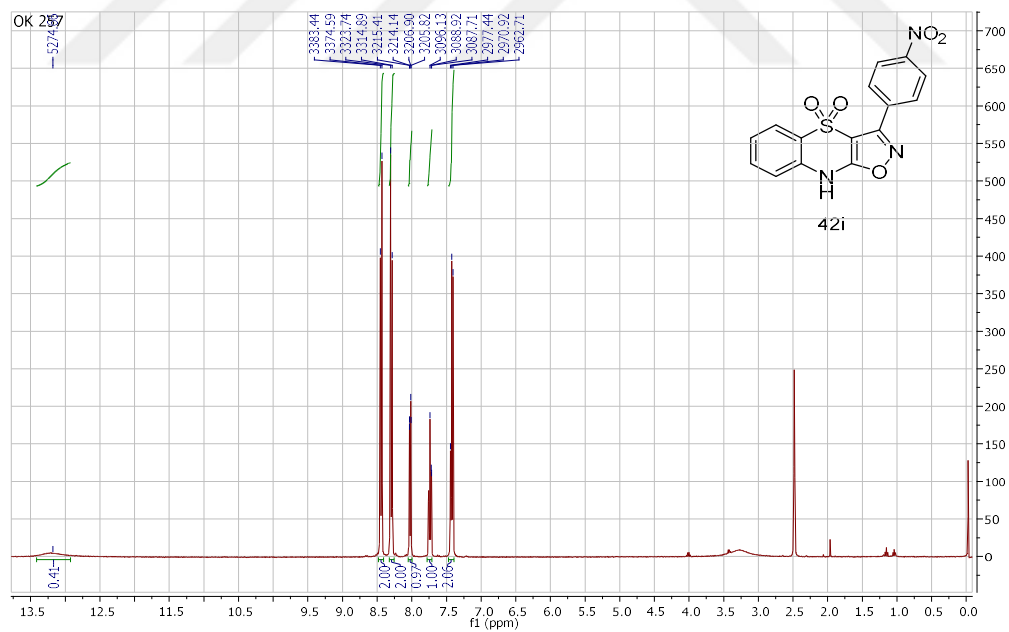
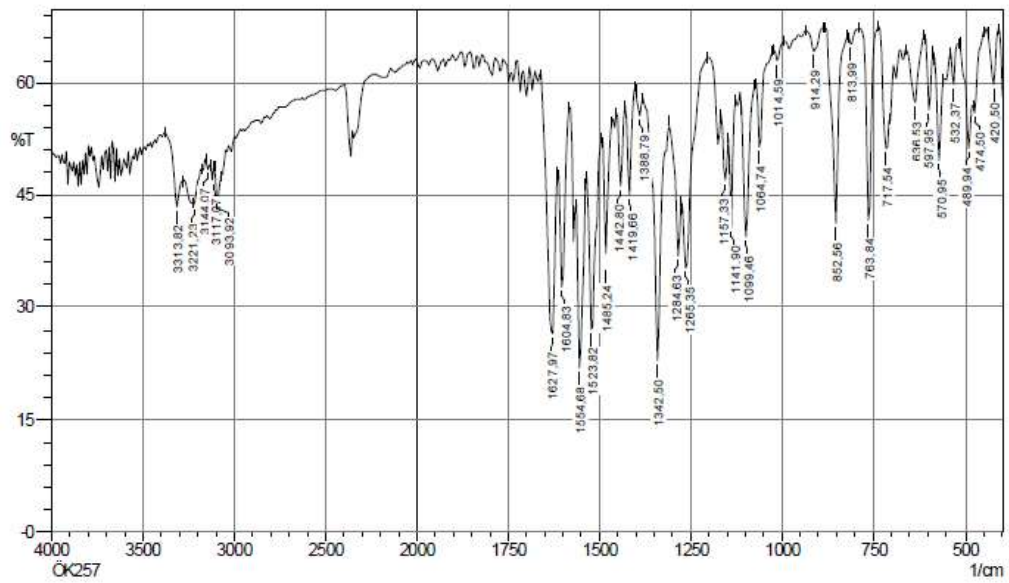
Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT (Norm)	C	H	N	O	S	F
317.0407	317.0396	1.1	3.5	11.5	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₃ S F	193.8	0.0	15	10	2	3	1	1

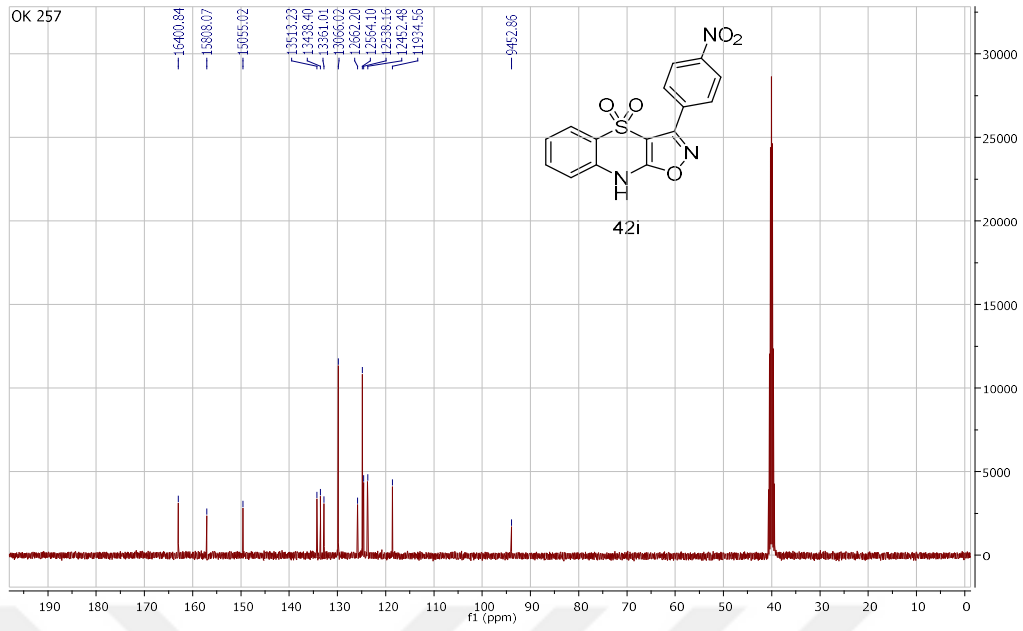
G.U. Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı OK-264_01 427 (4.327) Cm (421.432-372:389)

1: TOF MS ES+

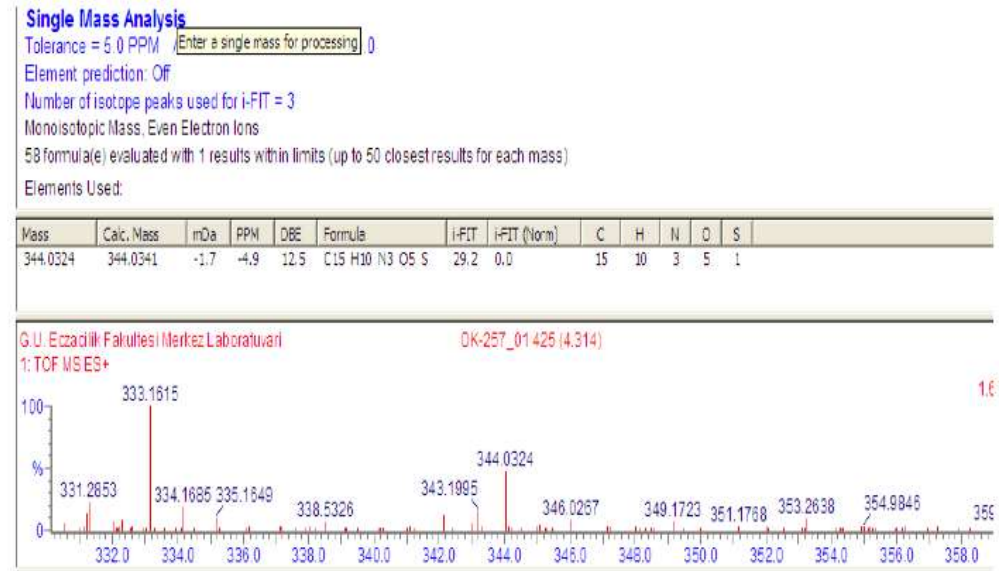


Şekil 8.32. 42h bileşiğinin HRMS spektrumu

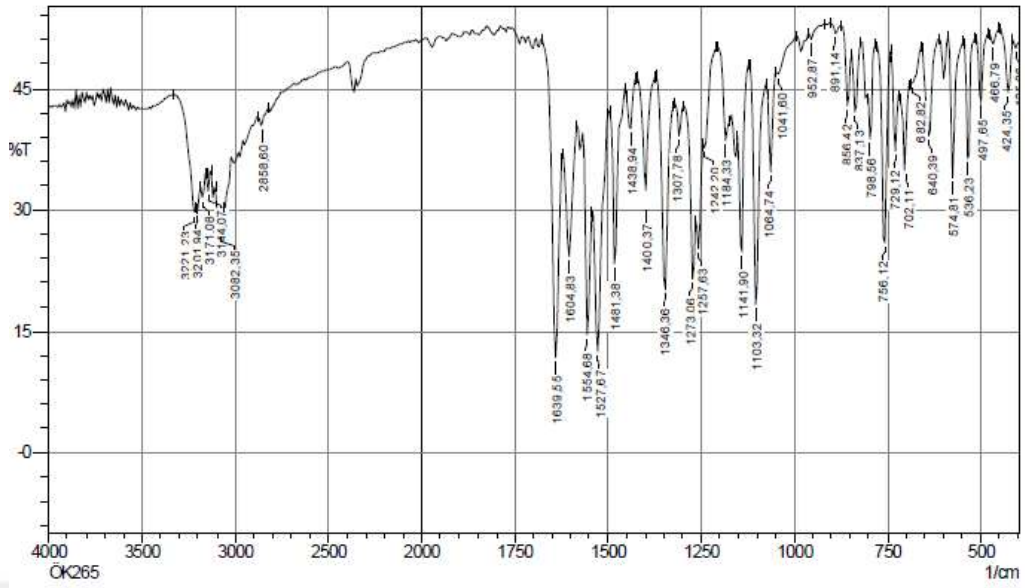




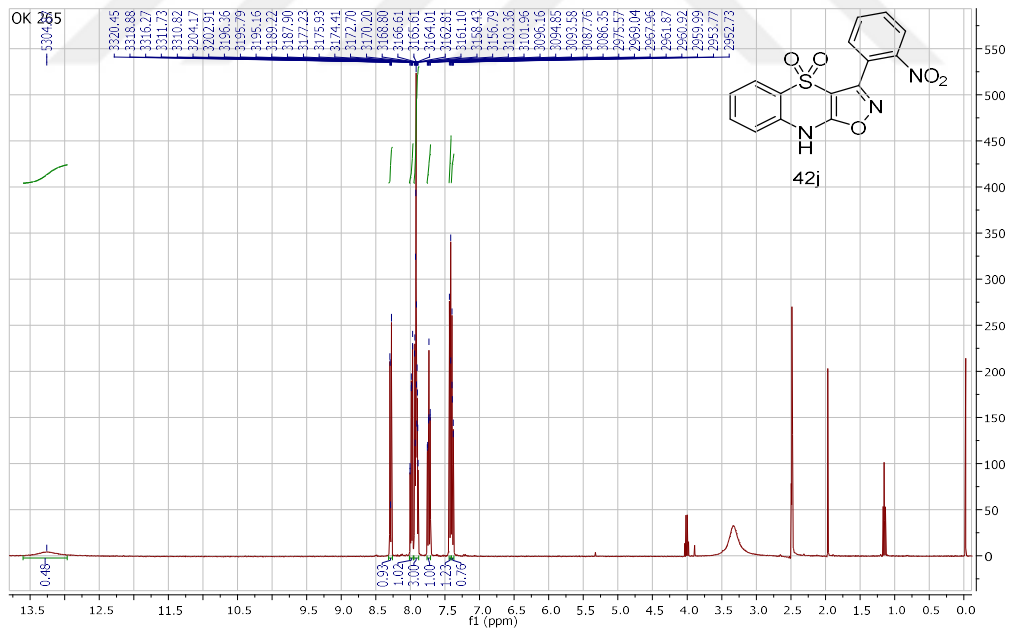
Şekil 8.35. 42i bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



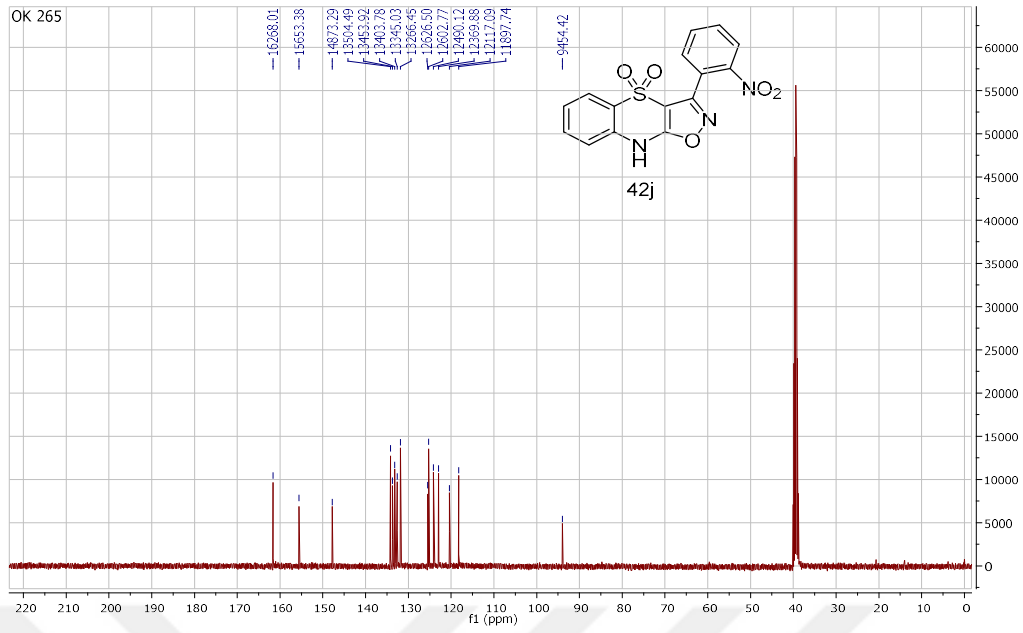
Şekil 8.36. 42i bileşiğinin HRMS spektrumu



Şekil 8.37. 42j bileşiğinin IR spektrumu



Şekil 8.38. 42j bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



Şekil 8.39. 42j bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

131 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

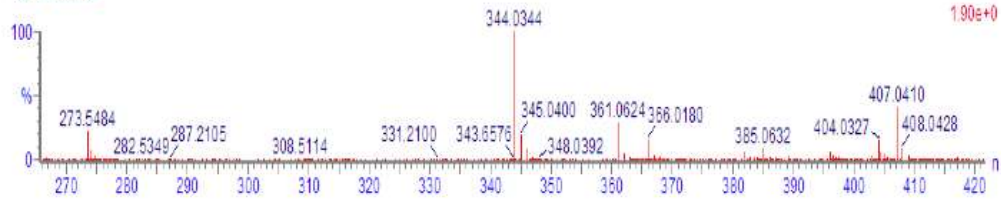
Elements Used:

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT (Norm)	C	H	N	O	S
344.0344	344.0341	0.3	0.9	12.5	C ₁₅ H ₁₀ N ₃ O ₅ S	57.2	0.0	15	10	3	5	1

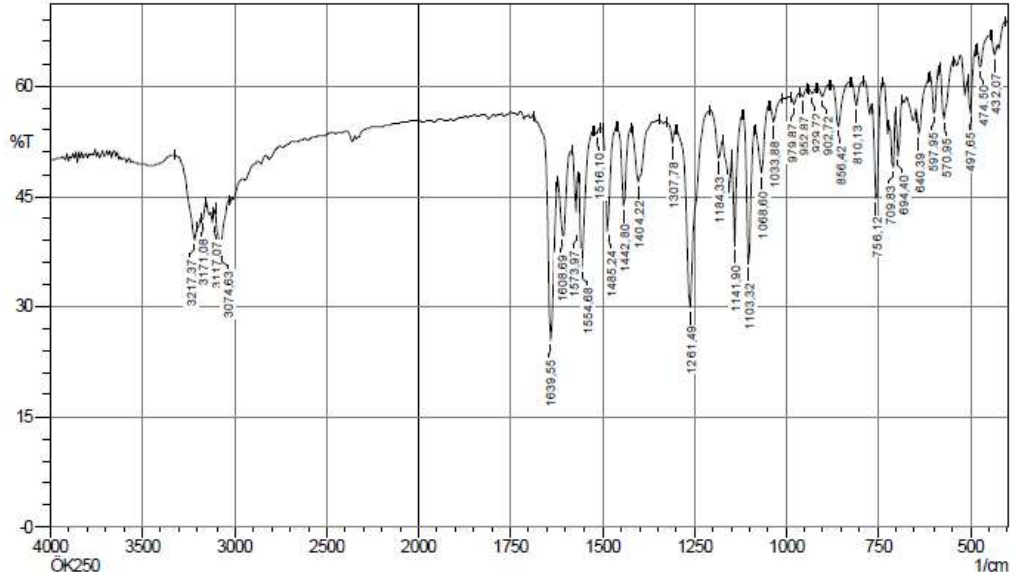
G.U. Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı

OK-265_01 101 (3.958) Cm (101-37.42)

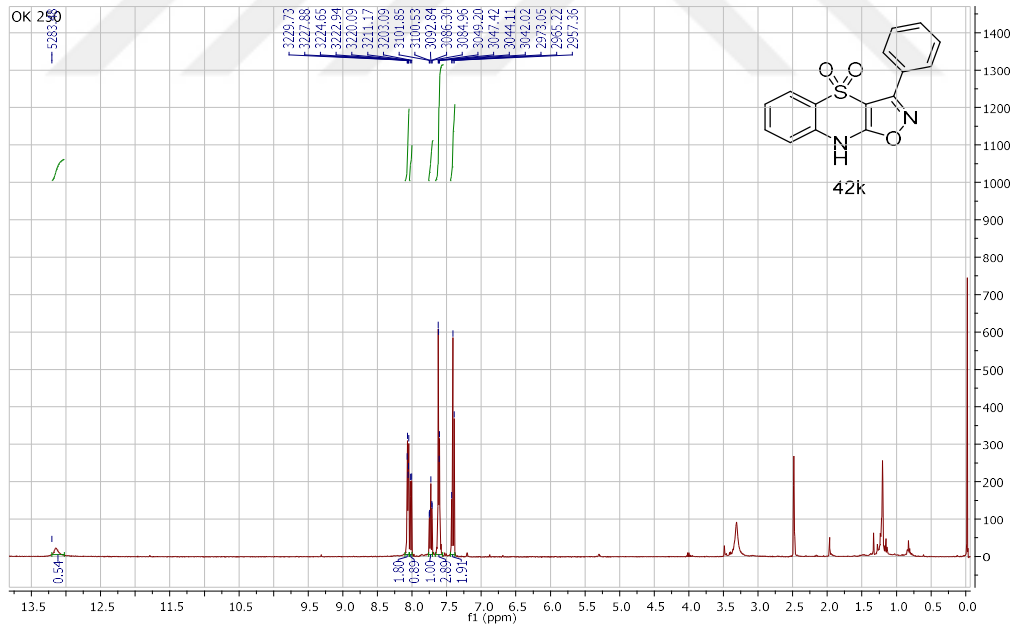
1: TOF MS ES+



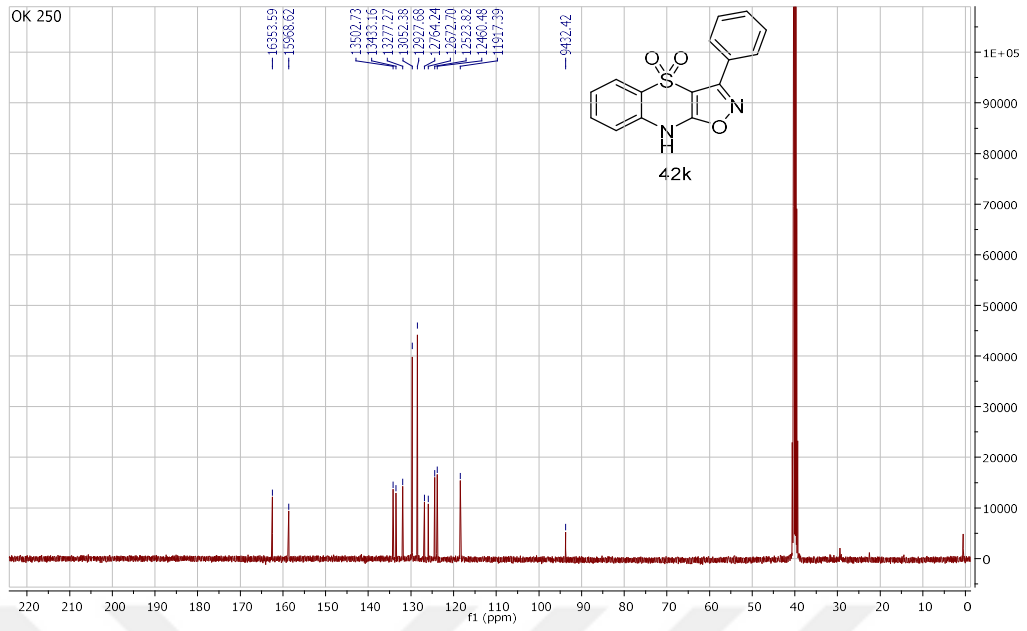
Şekil 8.40. 42j bileşiğinin HRMS spektrumu



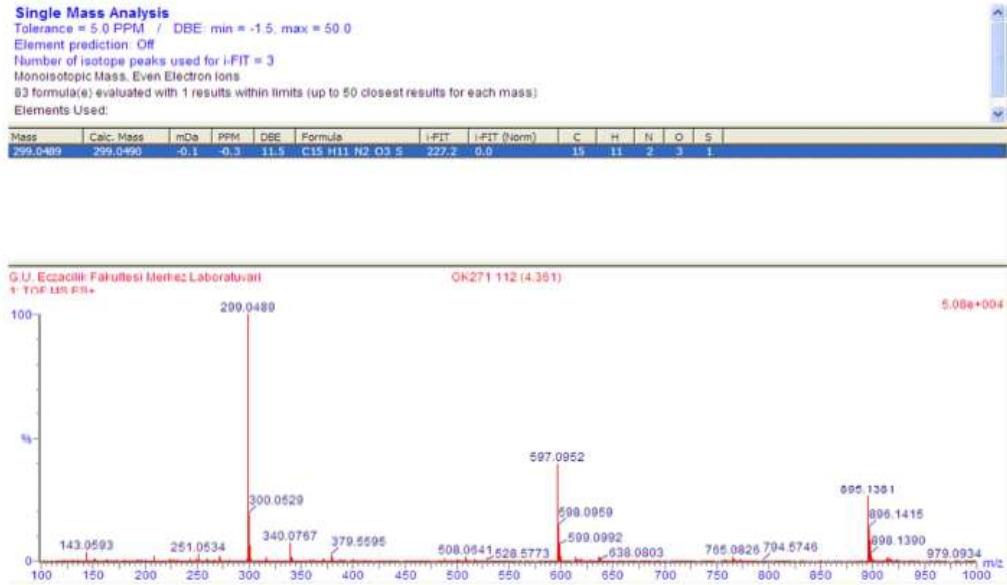
Şekil 8.41. 42k bileşiğinin IR spektrumu



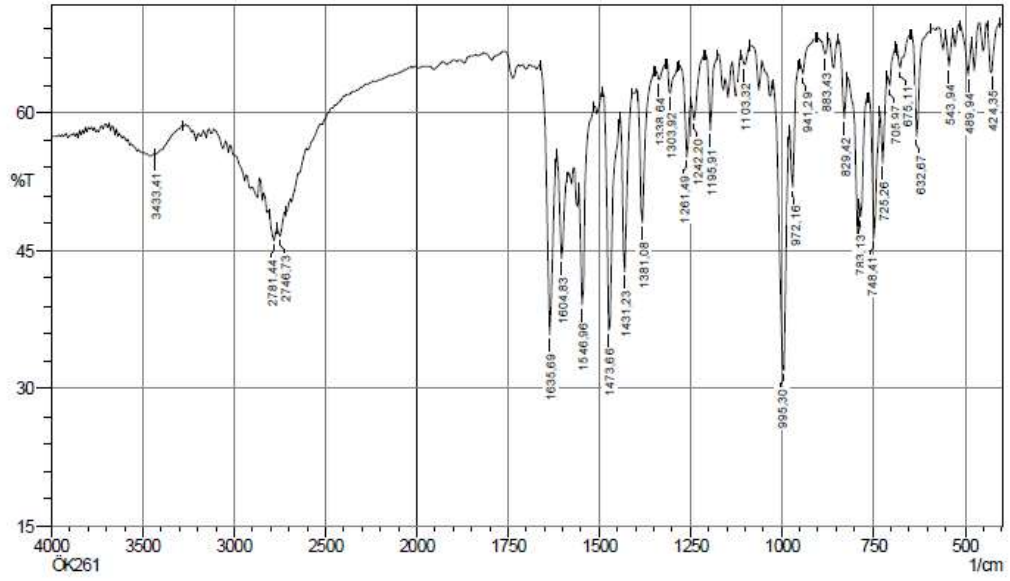
Şekil 8.42. 42k bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



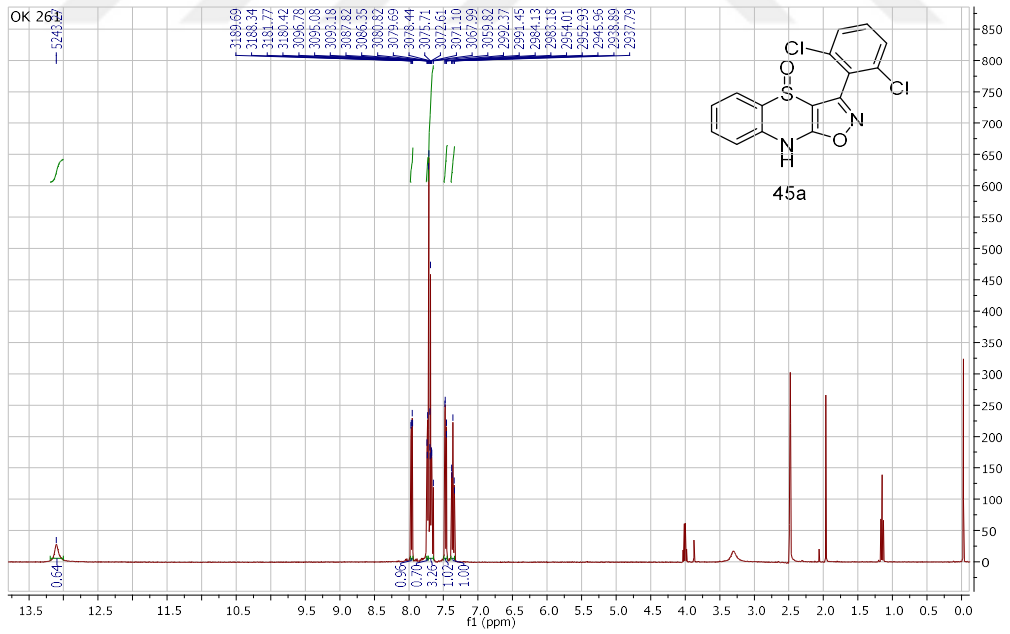
Şekil 8.43. 42k bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



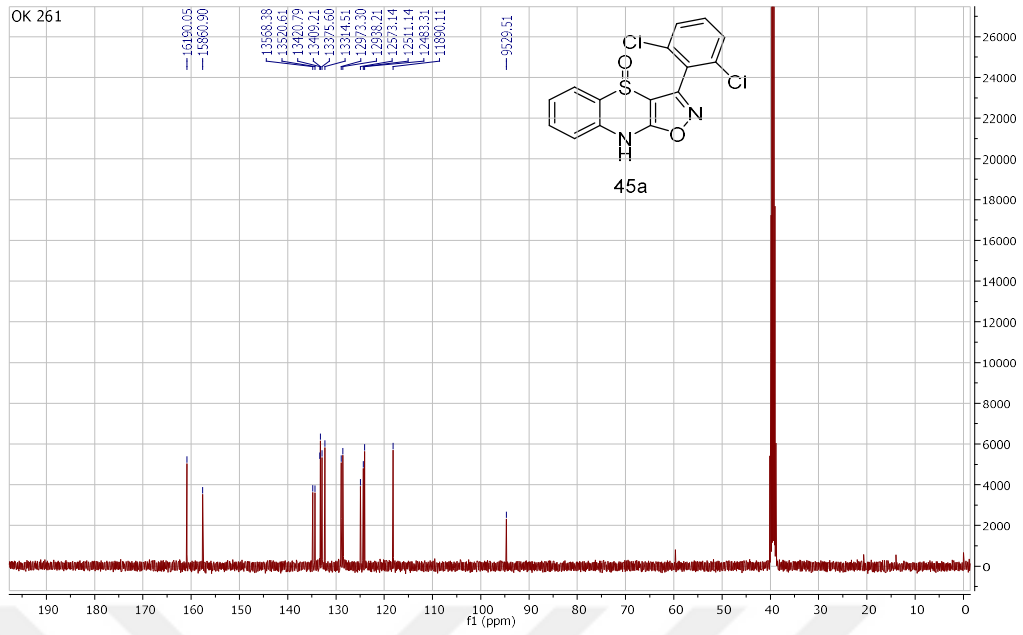
Şekil 8.44. 42k bileşiğinin HRMS spektrumu



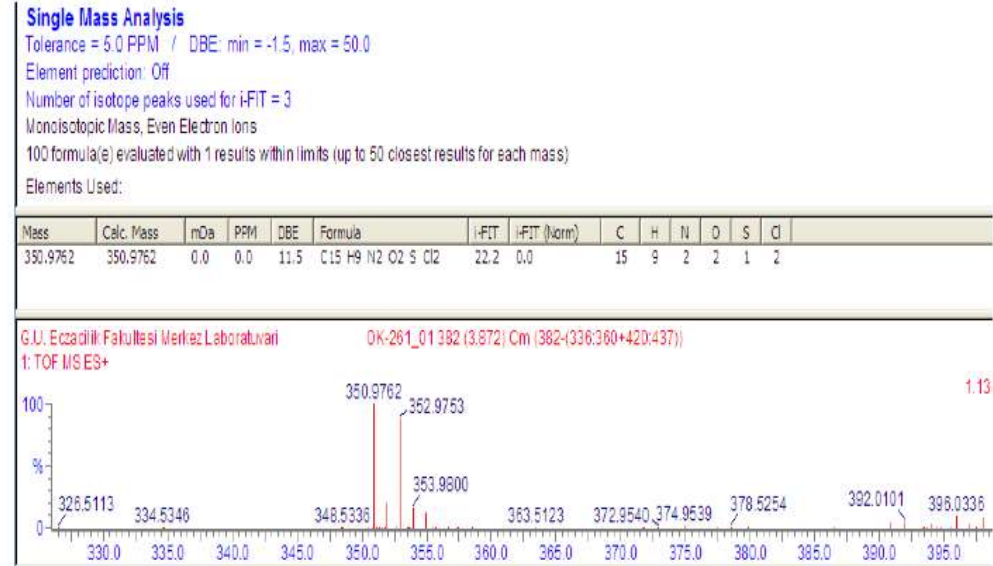
Şekil 8.45. 45a bileşiğinin IR spektrumu



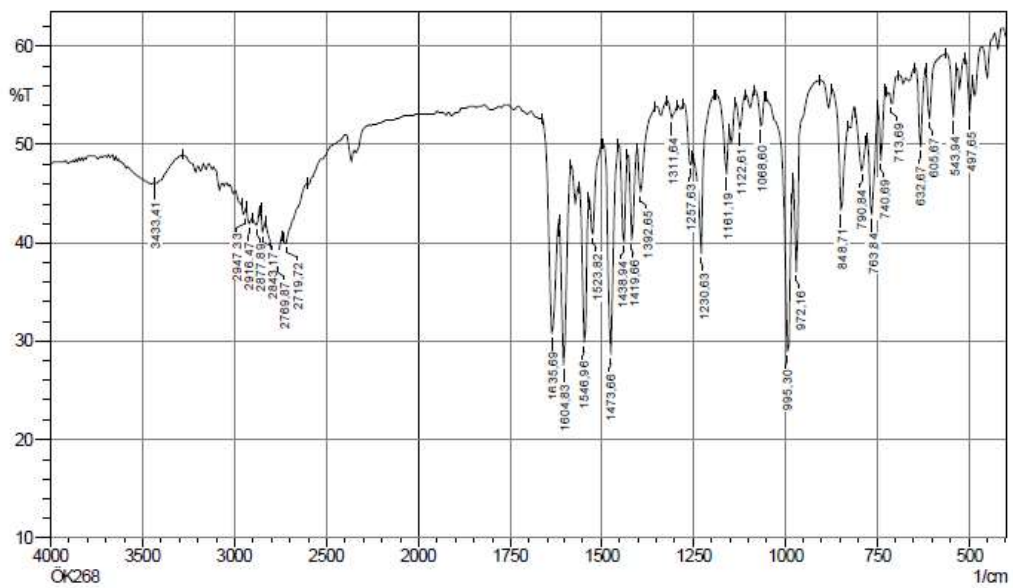
Şekil 8.46. 45a bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



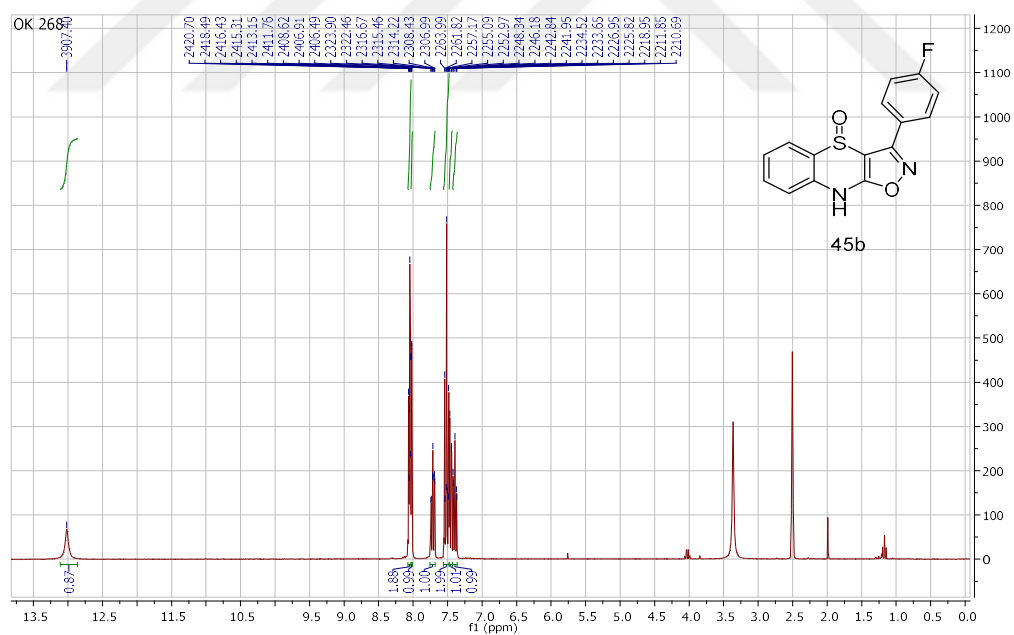
Şekil 8.47. 45a bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



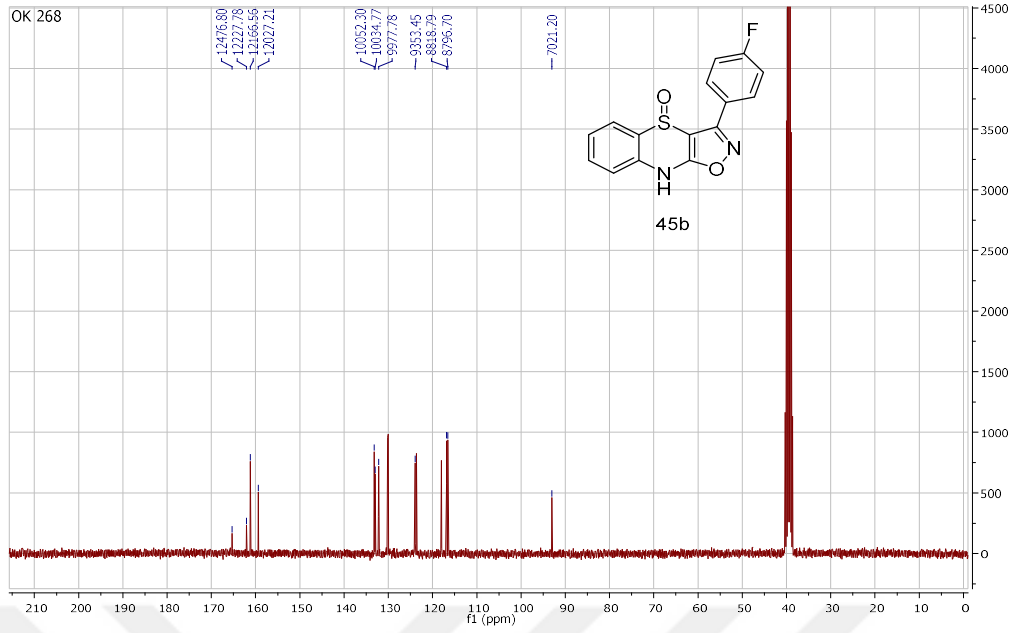
Şekil 8.48. 45a bileşiğinin HRMS spektrumu



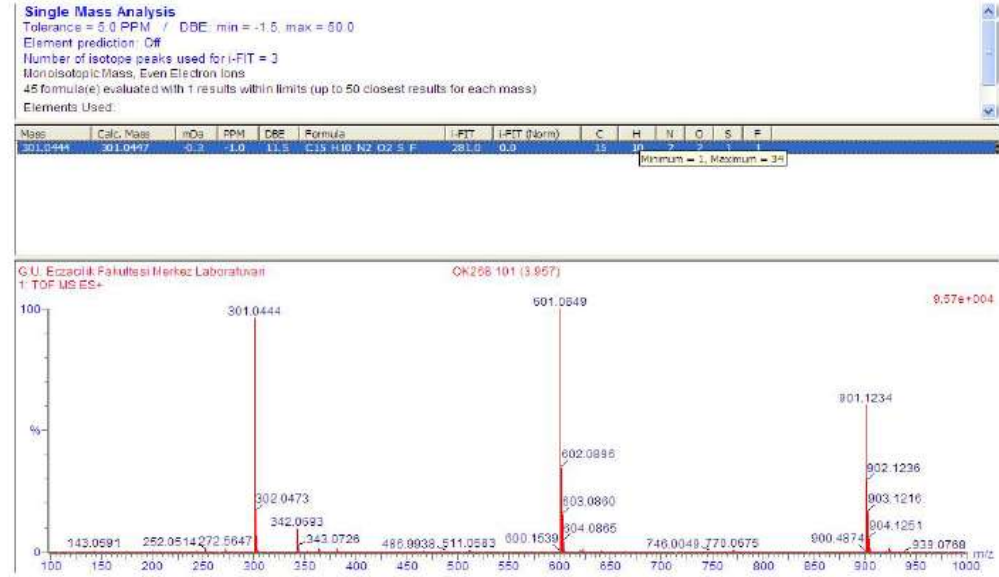
Şekil 8.49. 45b bileşiğinin IR spektrumu



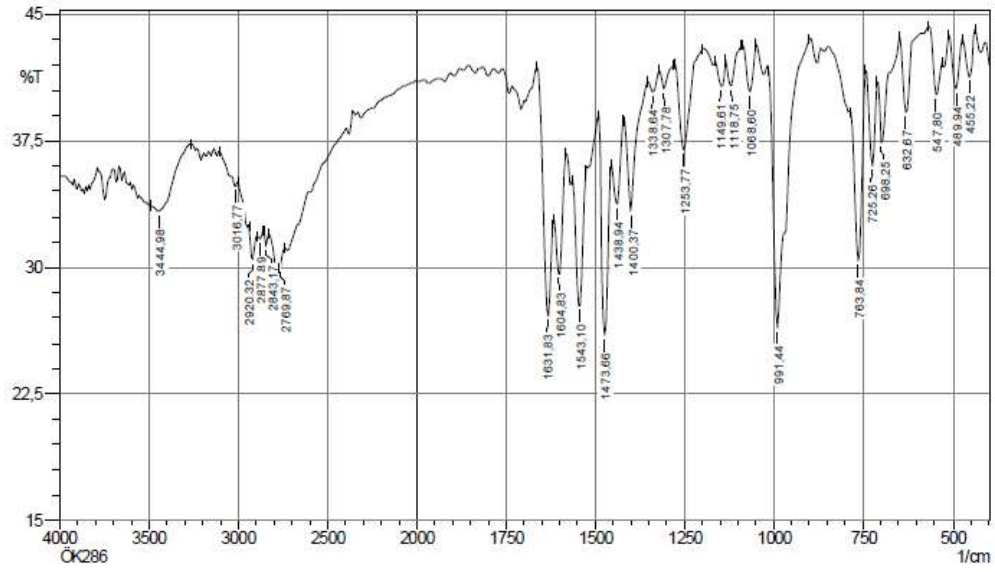
Şekil 8.50. 45b bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



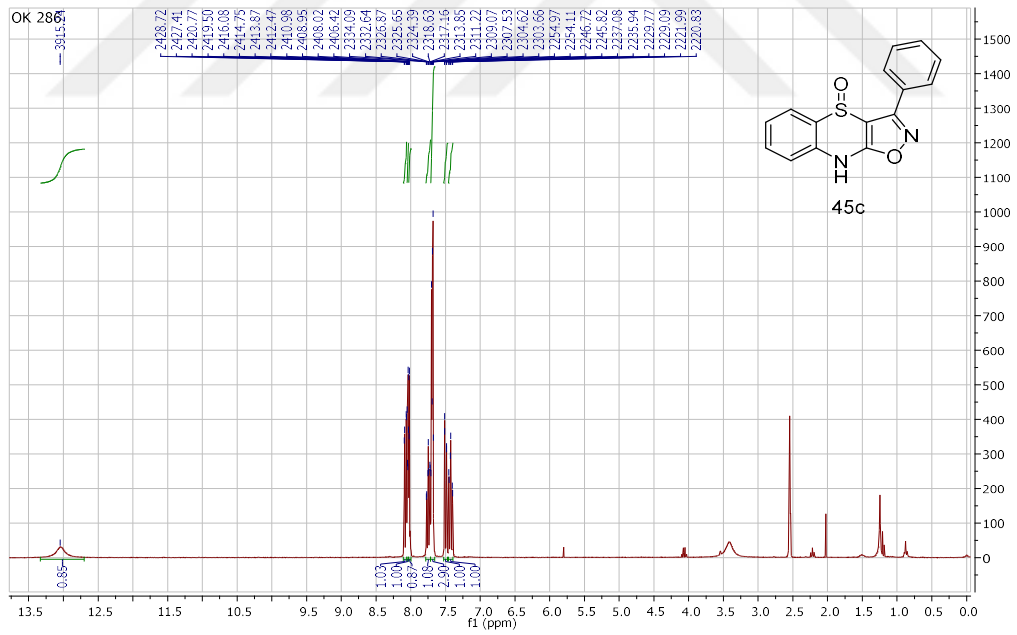
Şekil 8.51. 45b bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



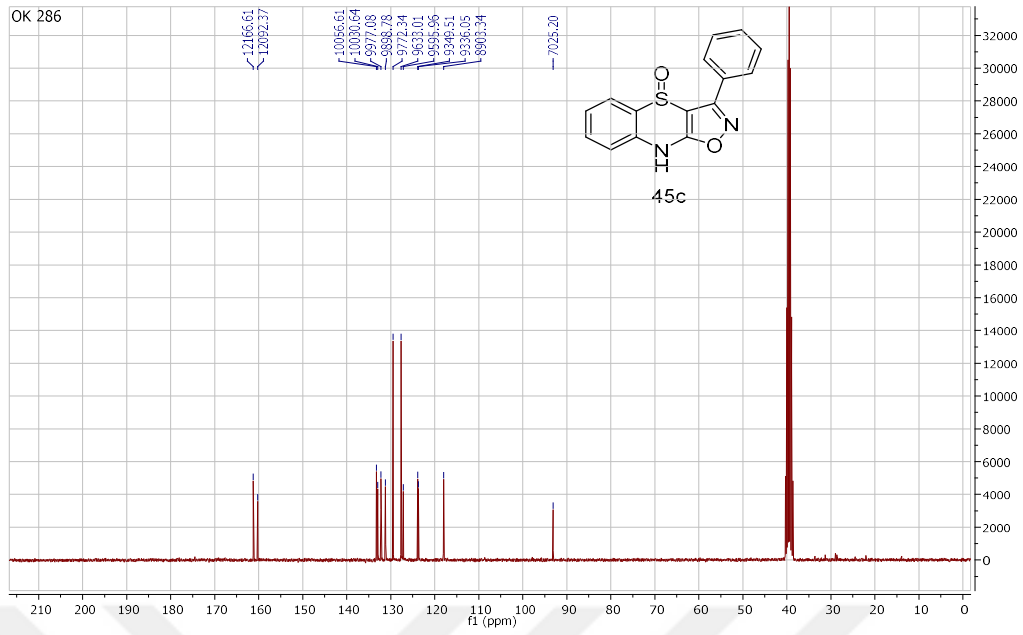
Şekil 8.52. 45b bileşiğinin HRMS spektrumu



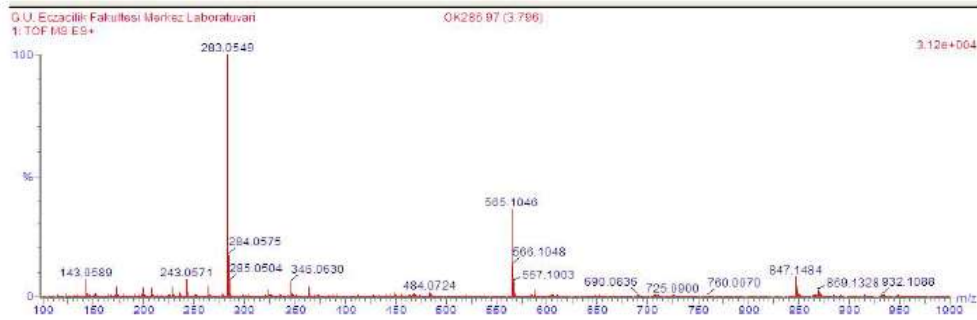
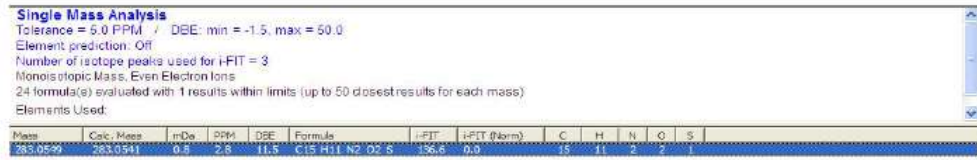
Şekil 8.53. 45c bileşiğinin IR spektrumu



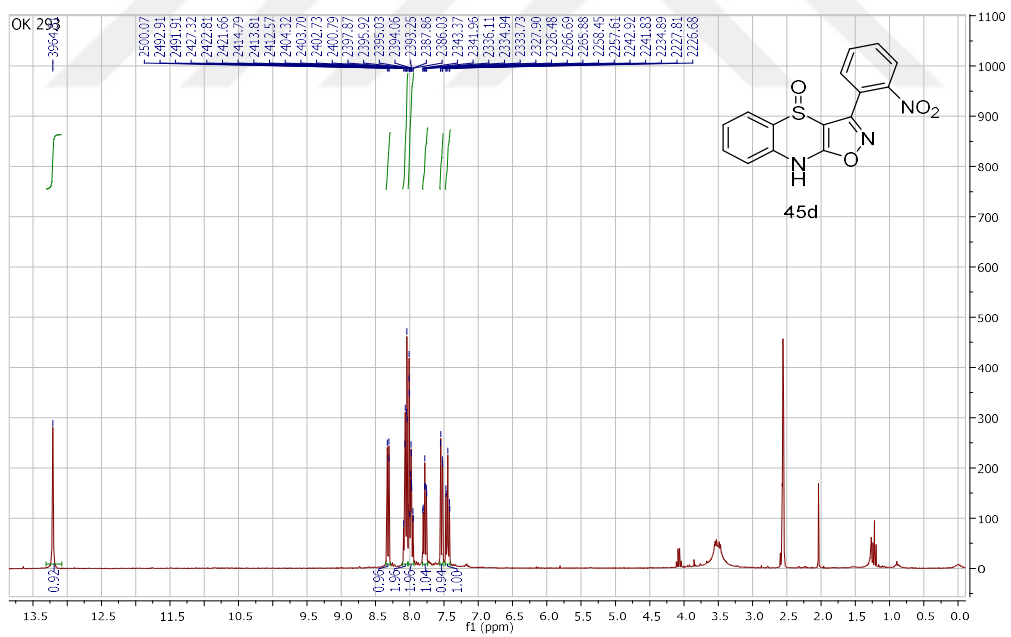
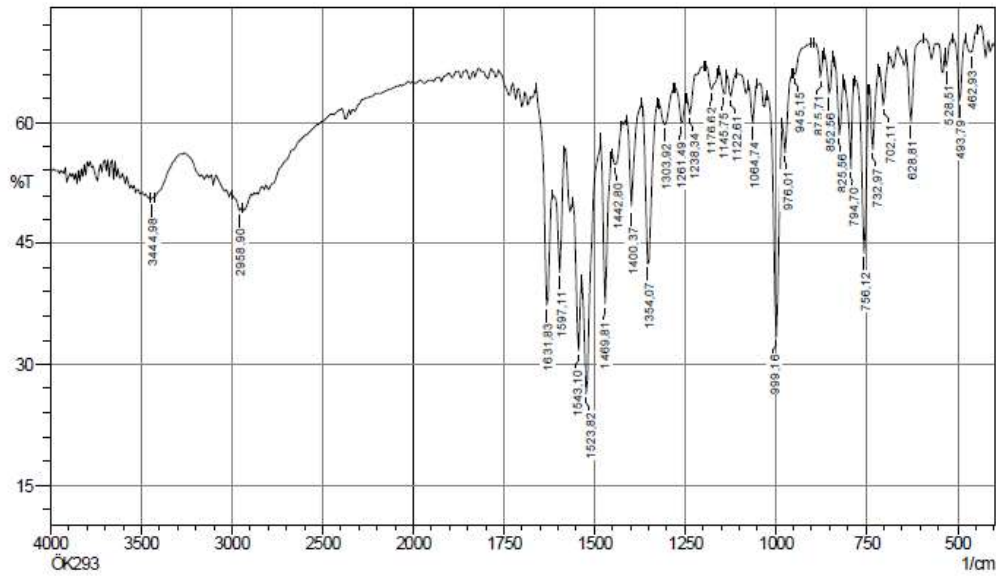
Şekil 8.54. 45c bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu

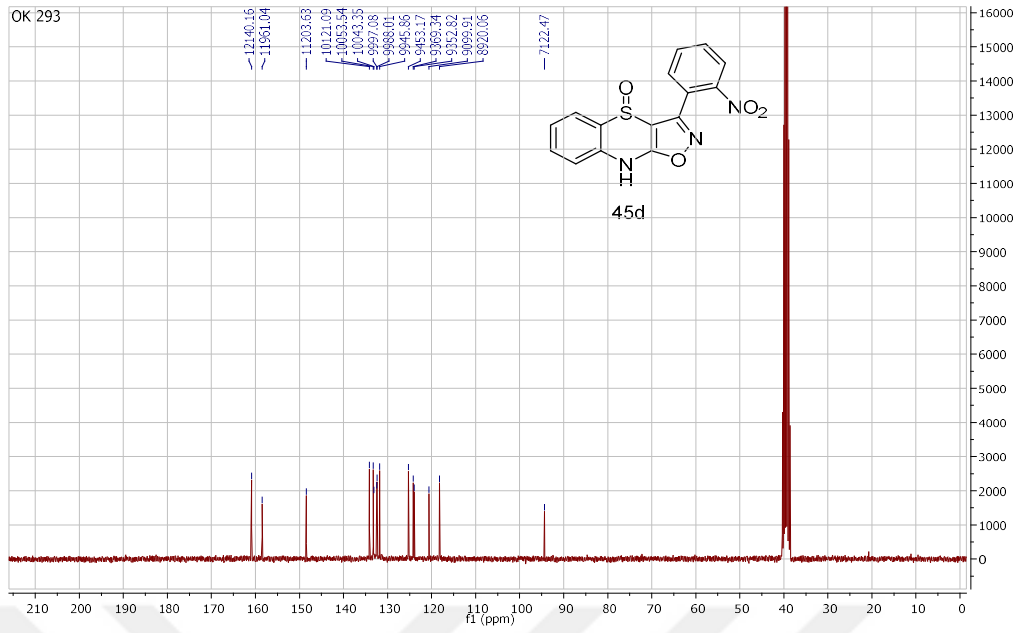


Şekil 8.55. 45c bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

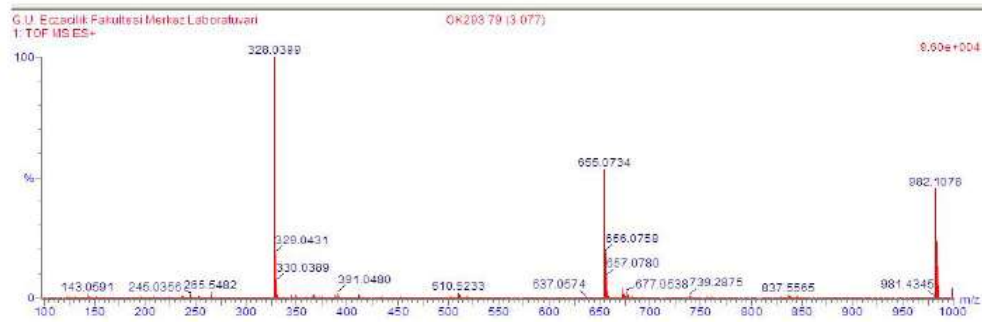
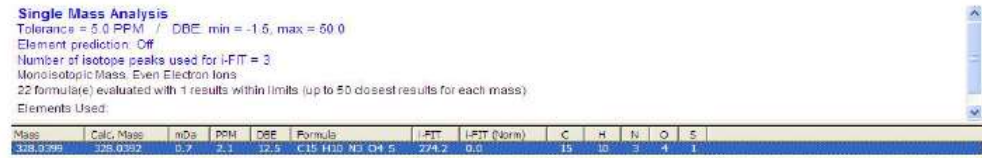


Şekil 8.56. 45c bileşiğinin HRMS spektrumu

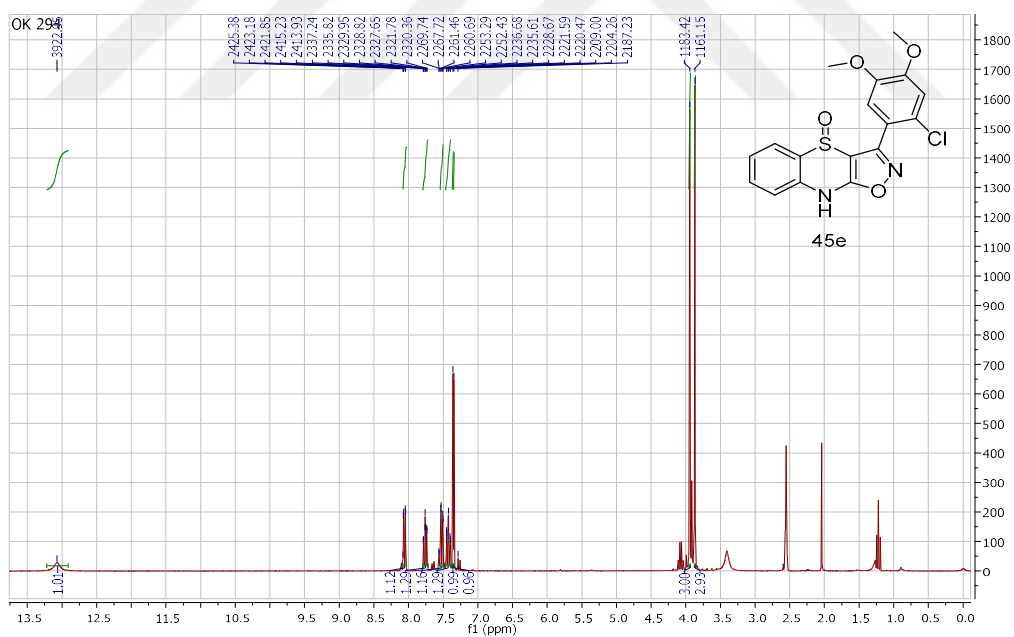
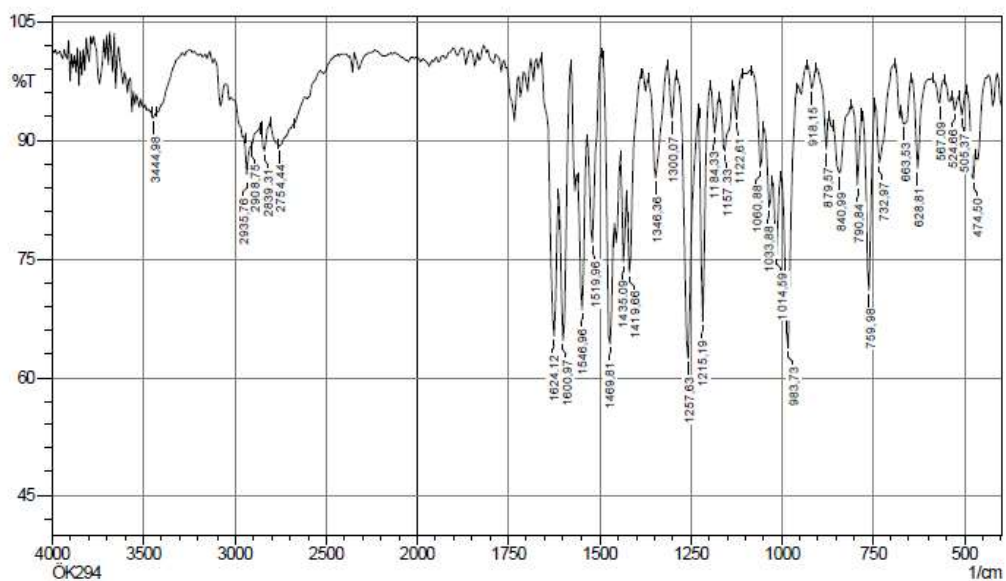


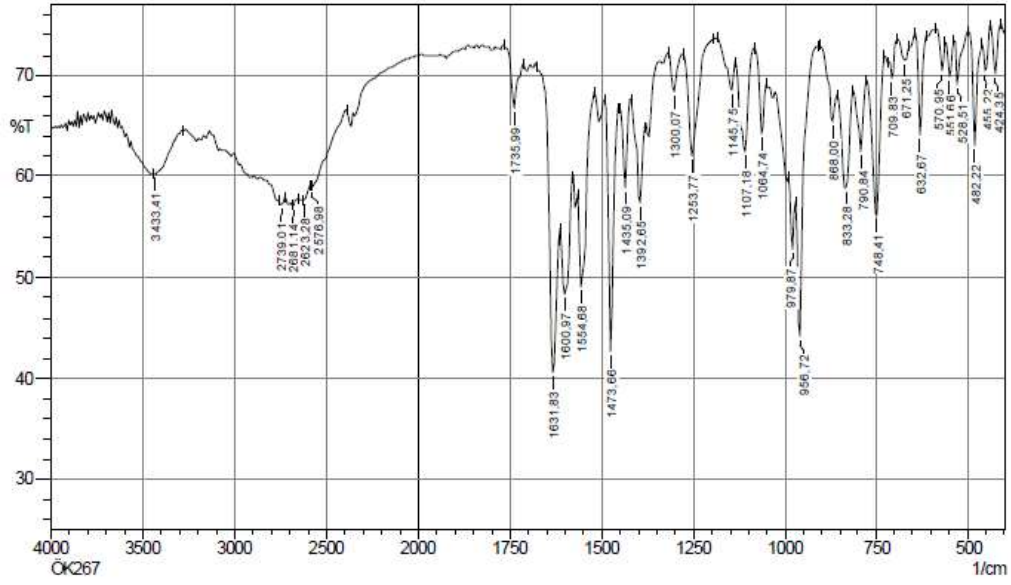


Şekil 8.59. 45d bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

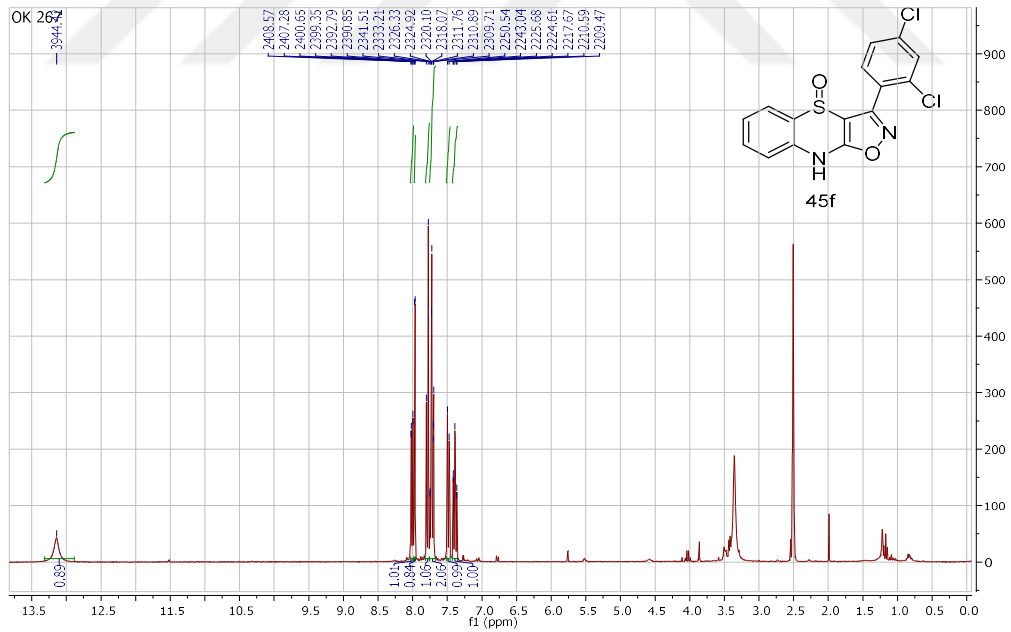


Şekil 8.60. 45d bileşiğinin HRMS spektrumu

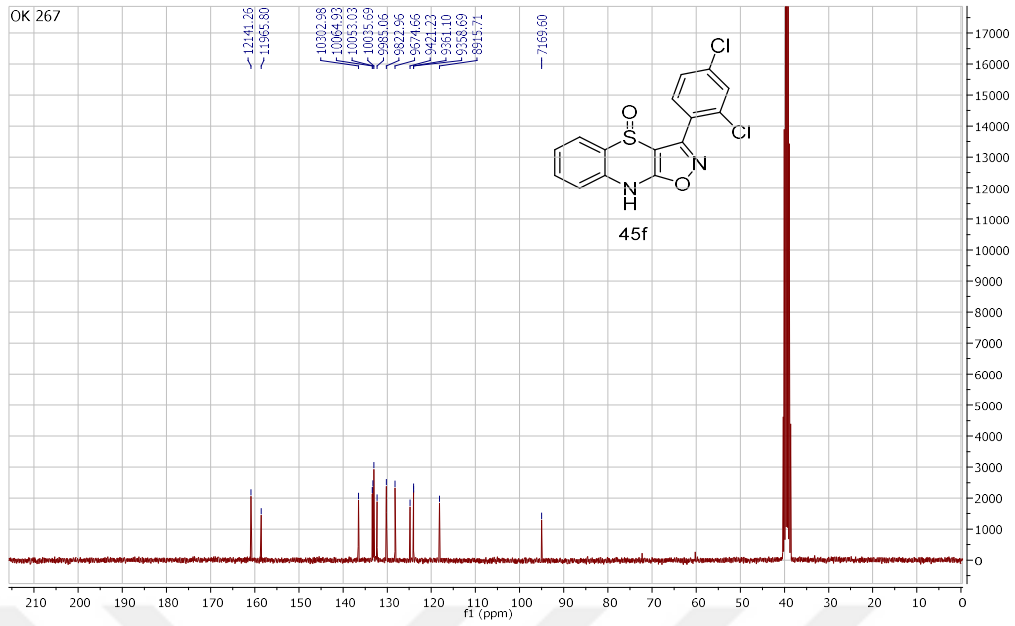




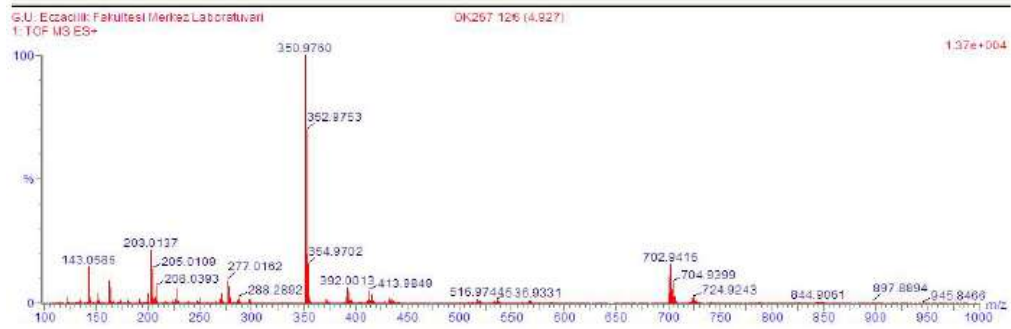
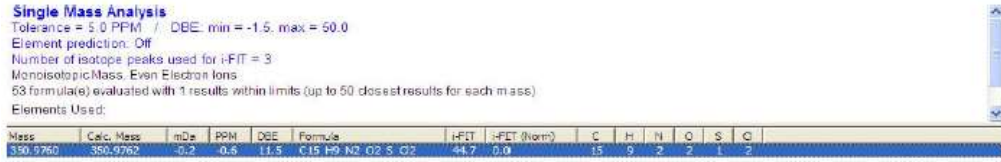
Şekil 8.65. 45f bileşiğinin IR spektrumu



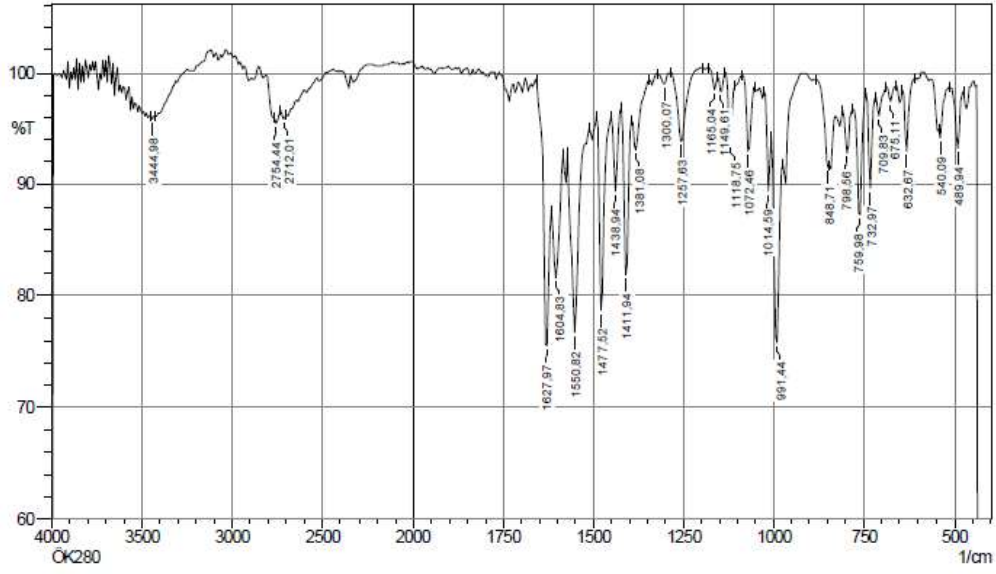
Şekil 8.66. 45f bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



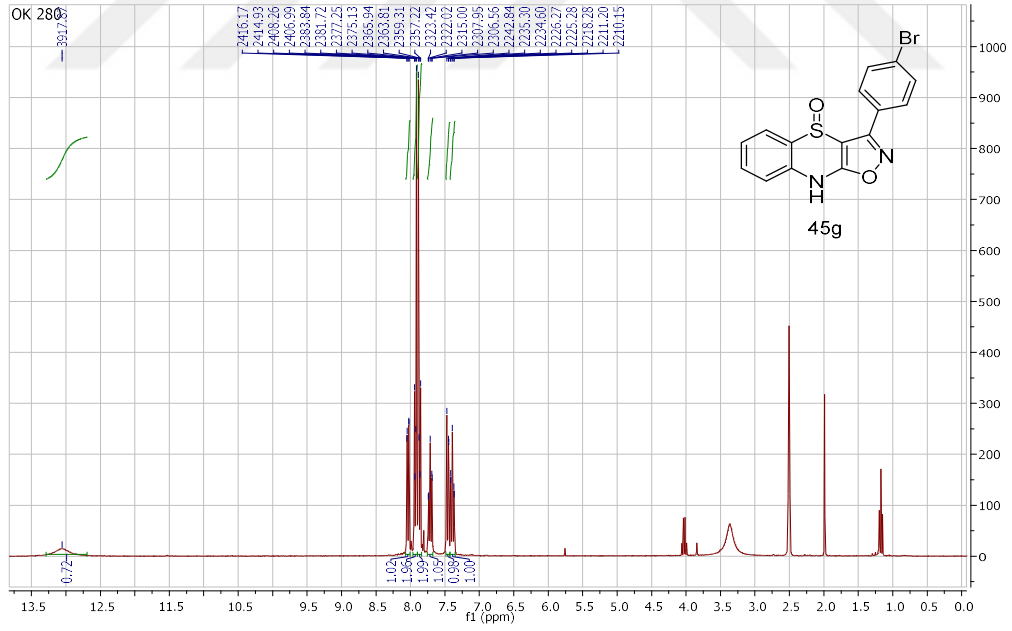
Şekil 8.67. 45f bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



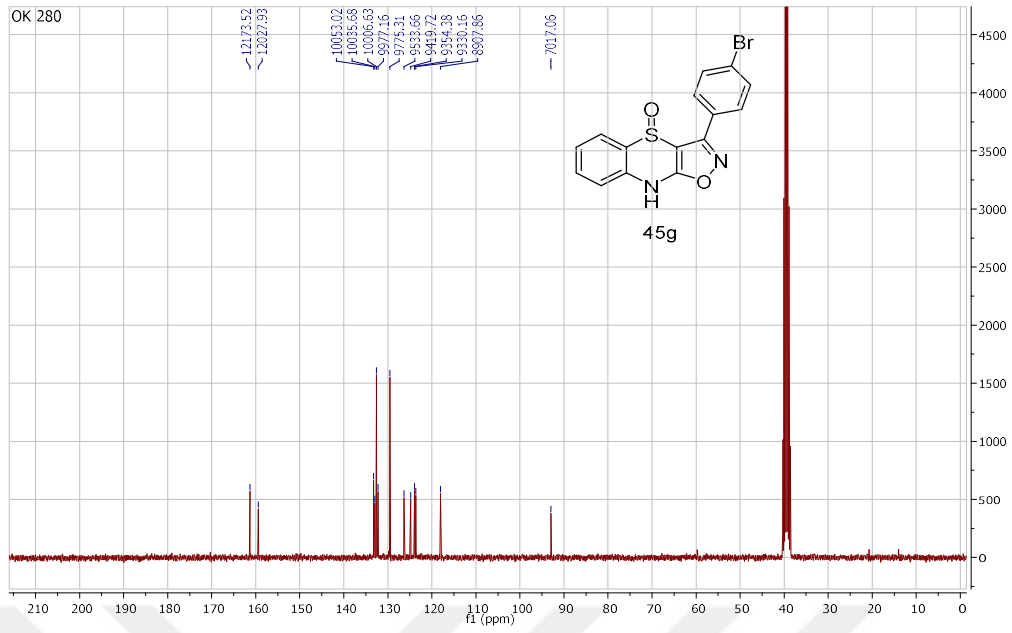
Şekil 8.68. 45f bileşiğinin HRMS spektrumu



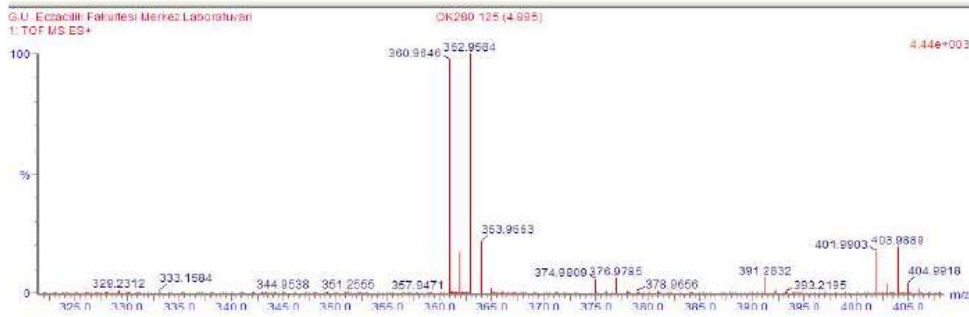
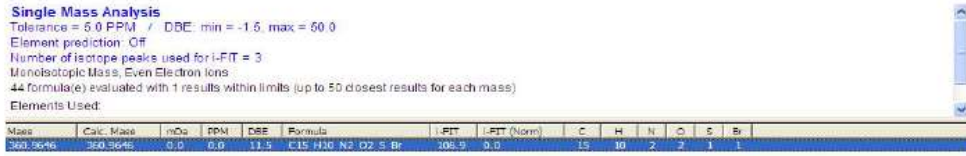
Şekil 8.69. 45g bileşiğinin IR spektrumu



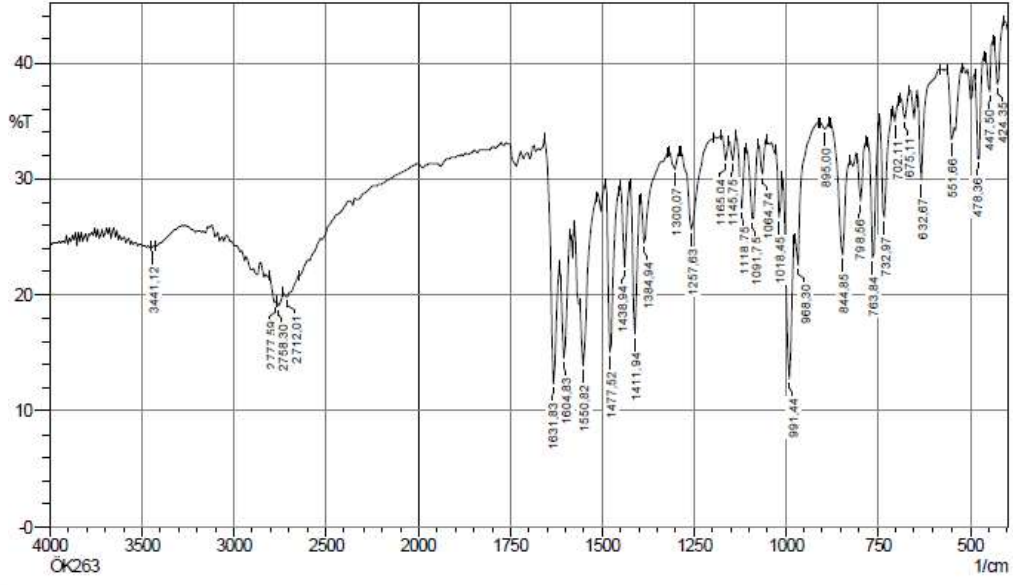
Şekil 8.70. 45g bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



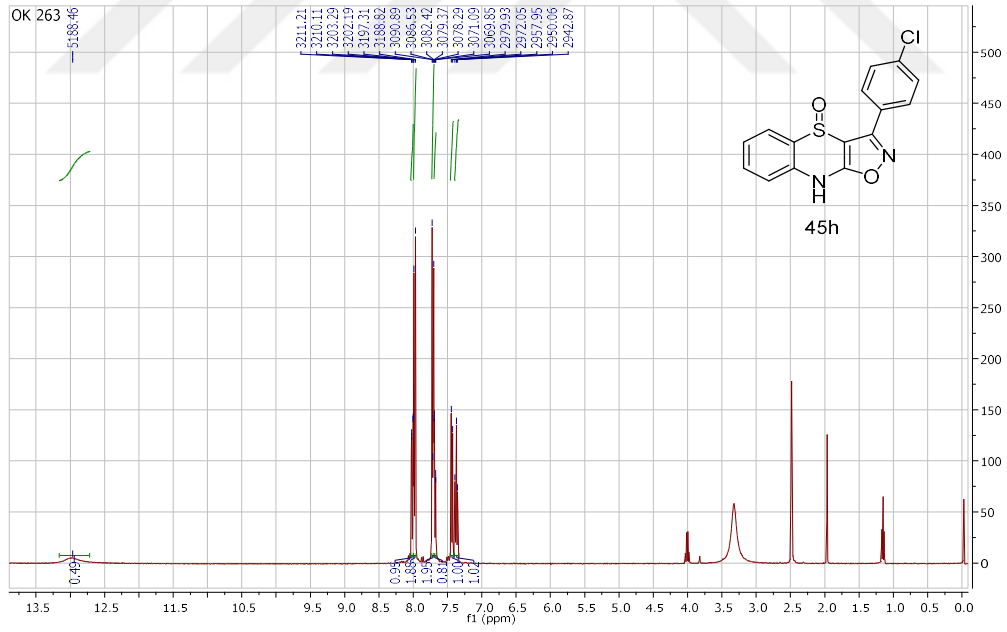
Şekil 8.71. 45g bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

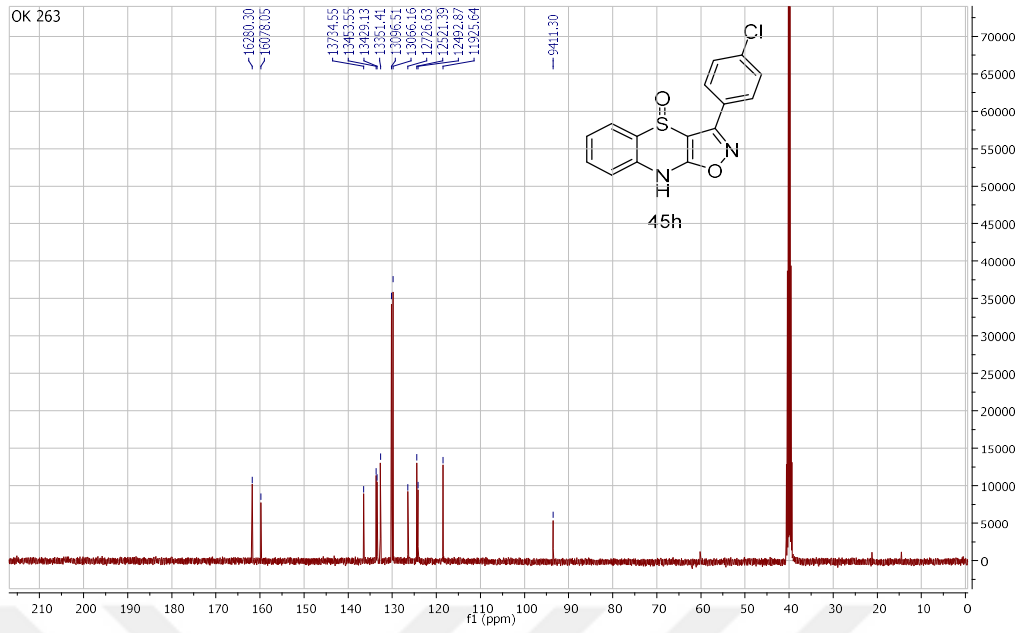


Şekil 8.72. 45g bileşiğinin HRMS spektrumu



Şekil 8.73. 45h bileşiğinin IR spektrumu





Şekil 8.75. 45h bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu

Single Mass Analysis

Tolerance = 5.0 PPM / DBE: min = -1.5, max = 50.0

Element prediction: Off

Number of isotope peaks used for i-FIT = 3

Monoisotopic Mass, Even Electron Ions

383 formula(e) evaluated with 1 results within limits (up to 50 closest results for each mass)

Elements Used:

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT (Norm)	C	H	N	O	S	Cl
317.0156	317.0152	0.4	1.3	11.5	C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₂ S Cl	18.4	0.0	15	10	2	2	1	1

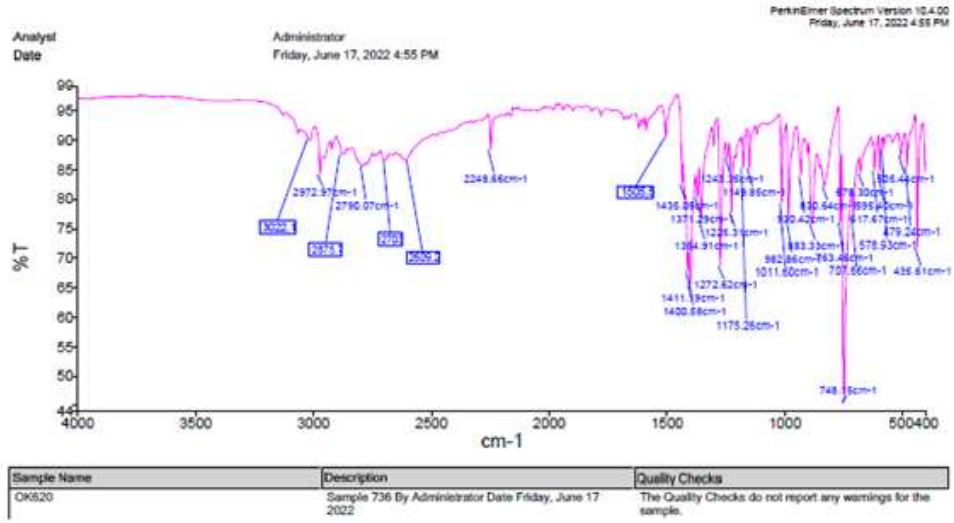
G.U. Eczacılık Fakültesi Merkez Laboratuvarı

OK-263_01 119 (4.644) Cm (119-39.43)

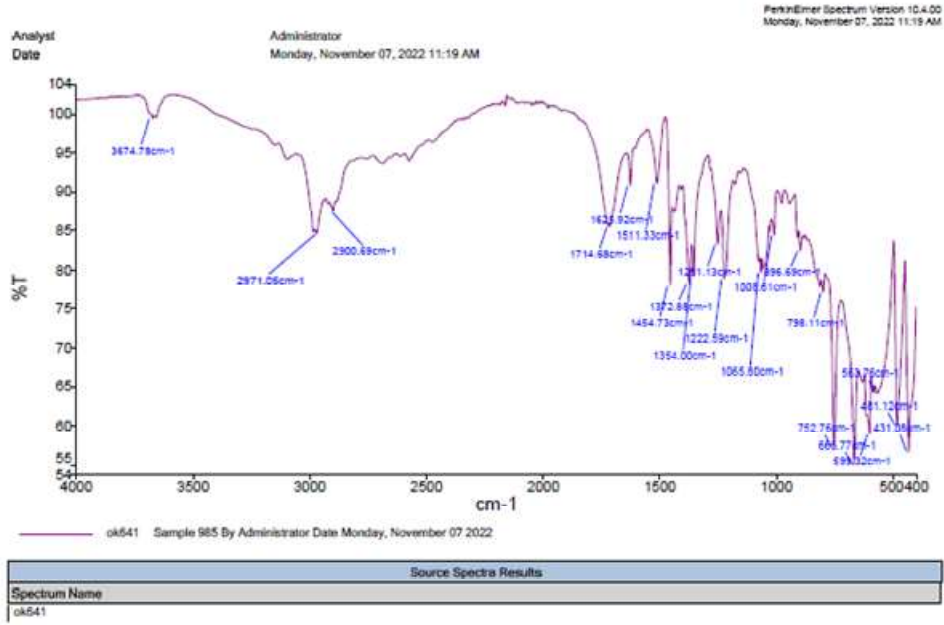
1: TOF MS ES+



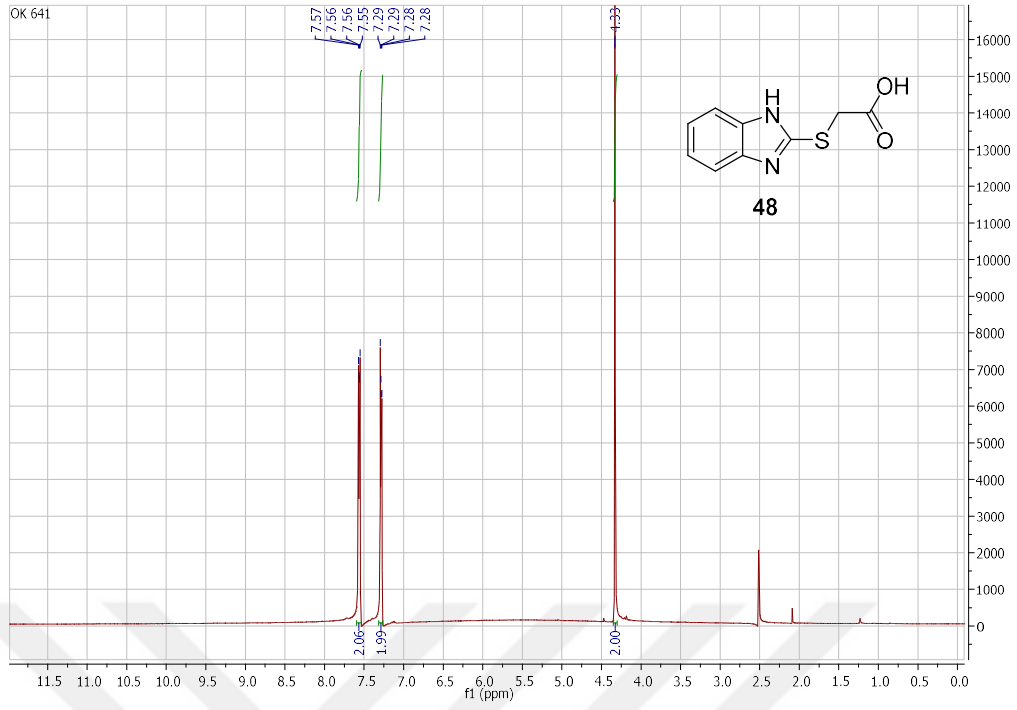
Şekil 8.76. 45h bileşiğinin HRMS spektrumu



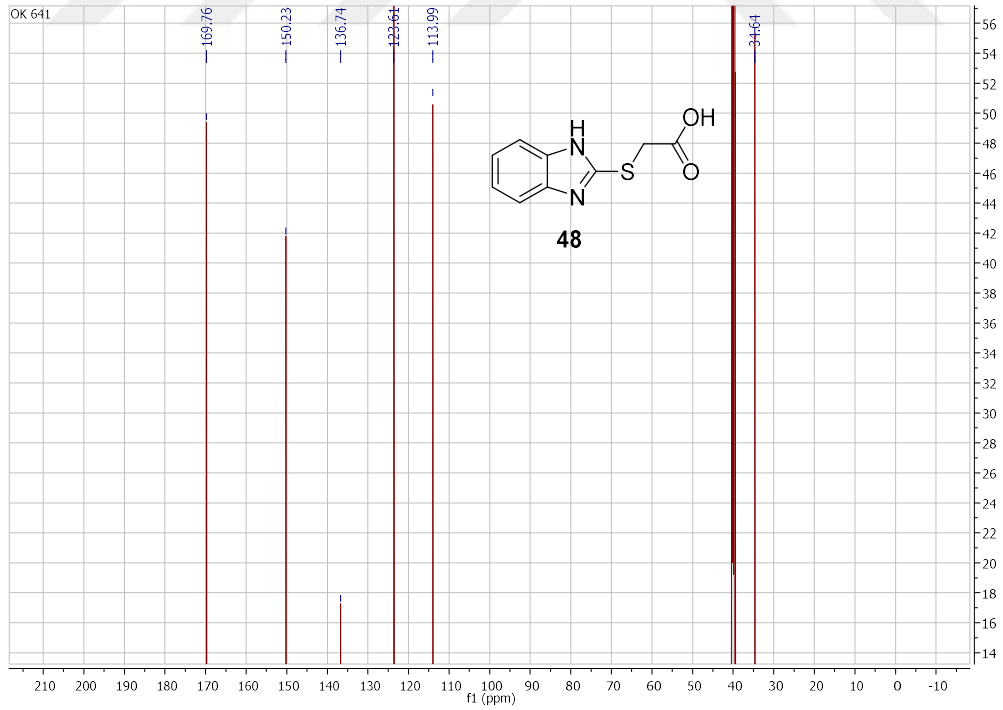
Şekil 8.77. 47 bileşiğinin IR spektrumu



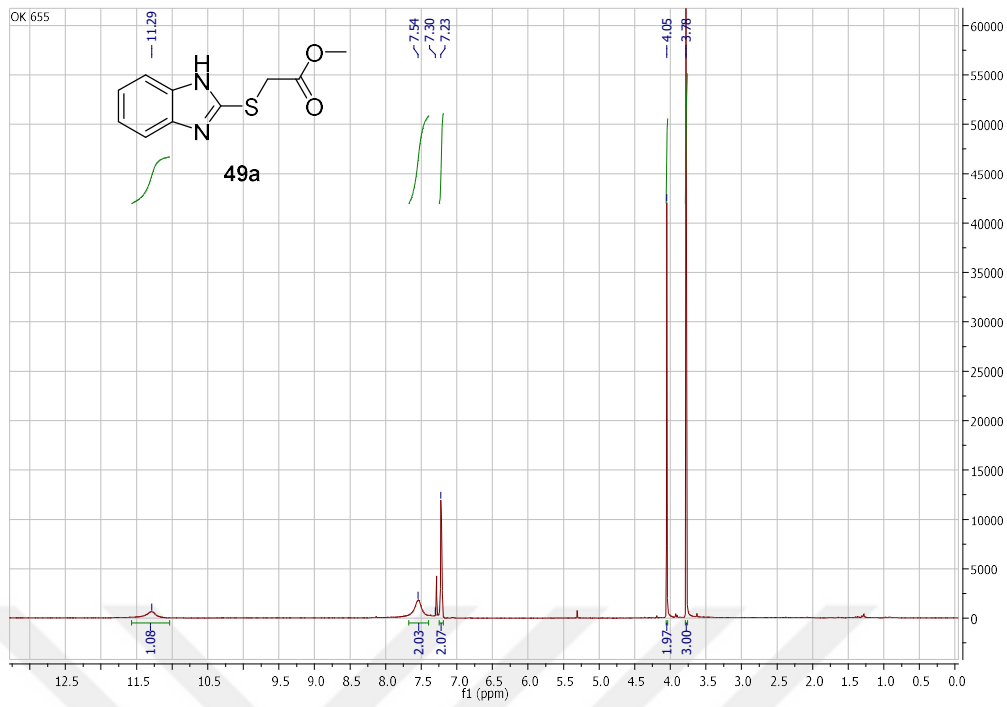
Şekil 8.78. 48 bileşiğinin IR spektrumu



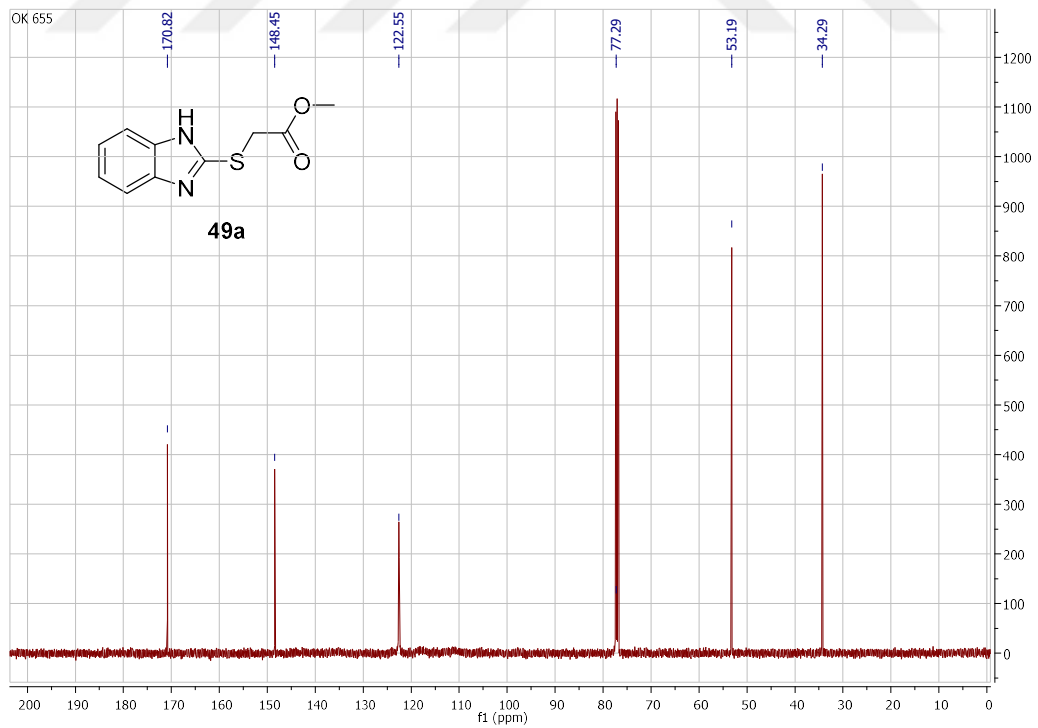
Şekil 8.79. 48 bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



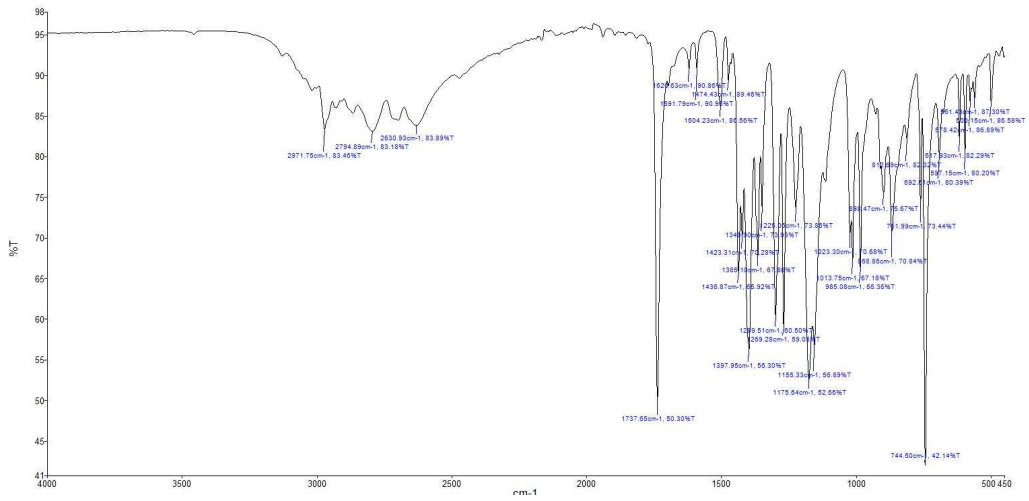
Şekil 8.80. 48 bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



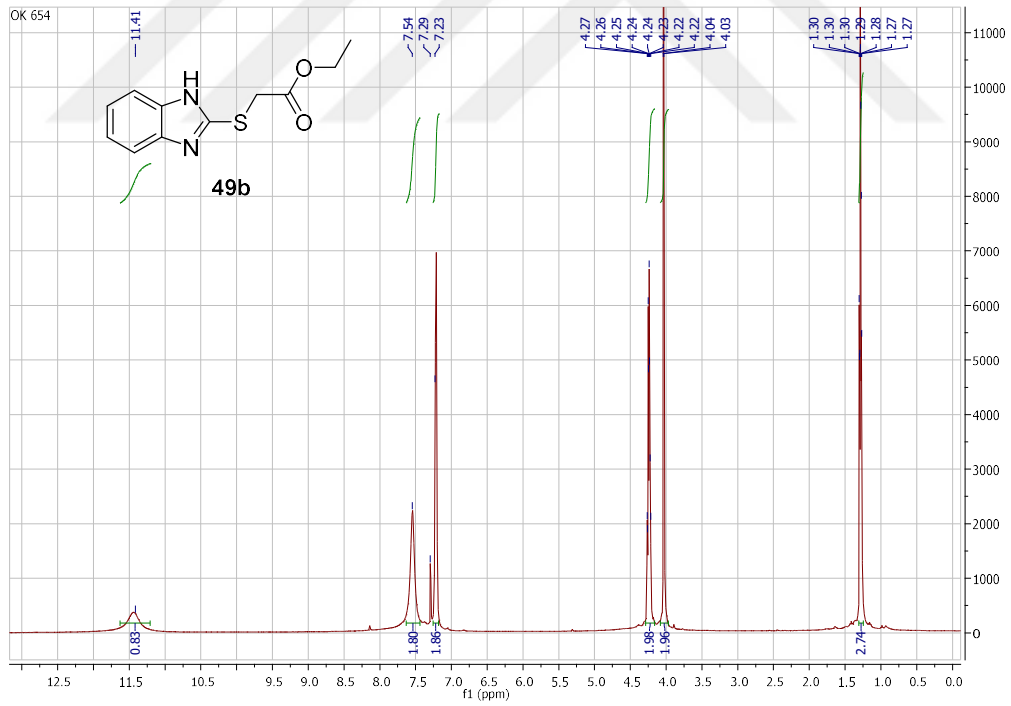
Şekil 8.81. 49a bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



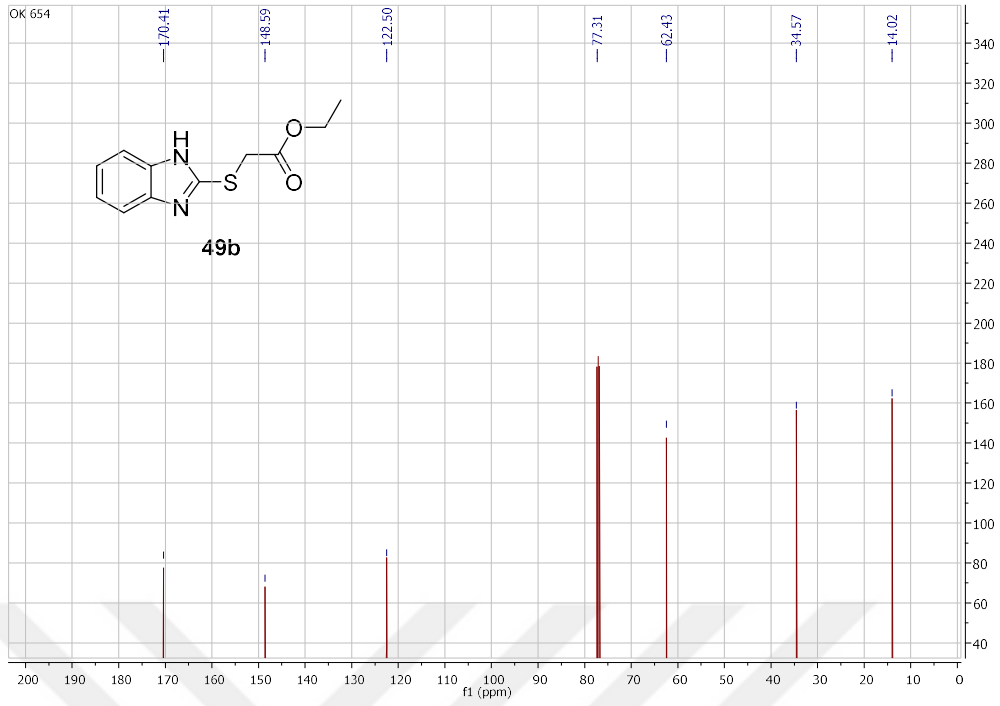
Şekil 8.82. 49a bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



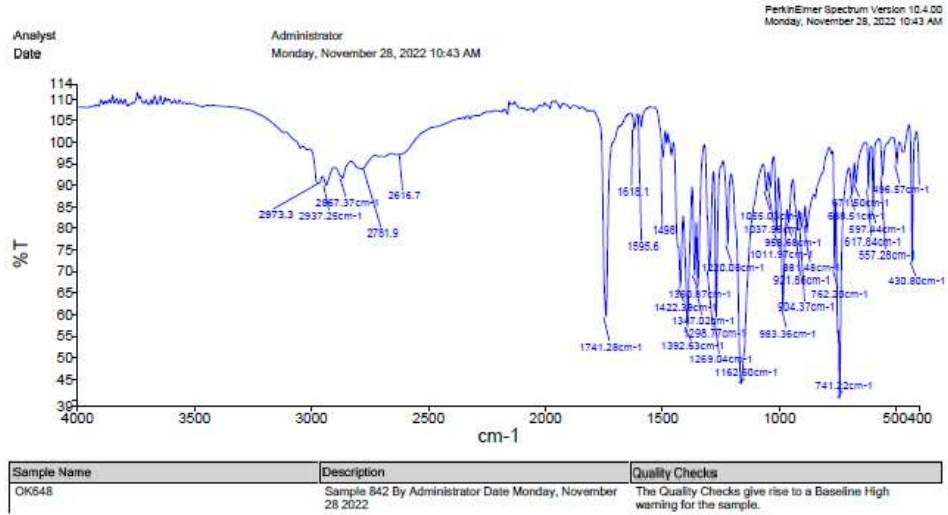
Şekil 8.83. 49b bileşiğinin IR spektrumu



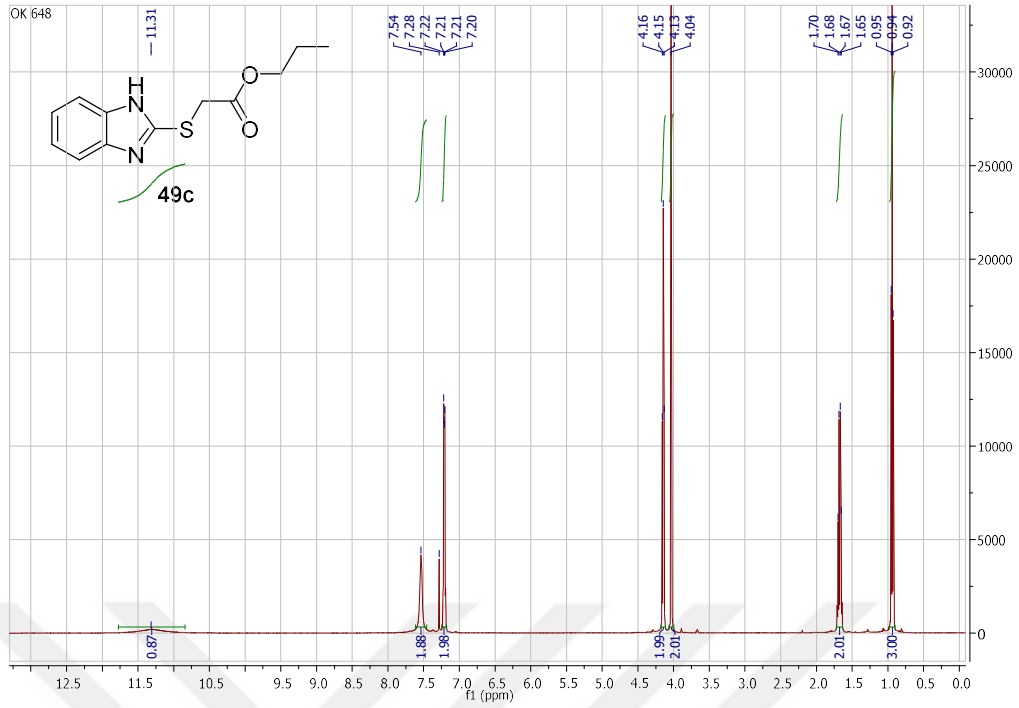
Şekil 8.84. 49b bileşiğinin ¹H-NMR spektrumu



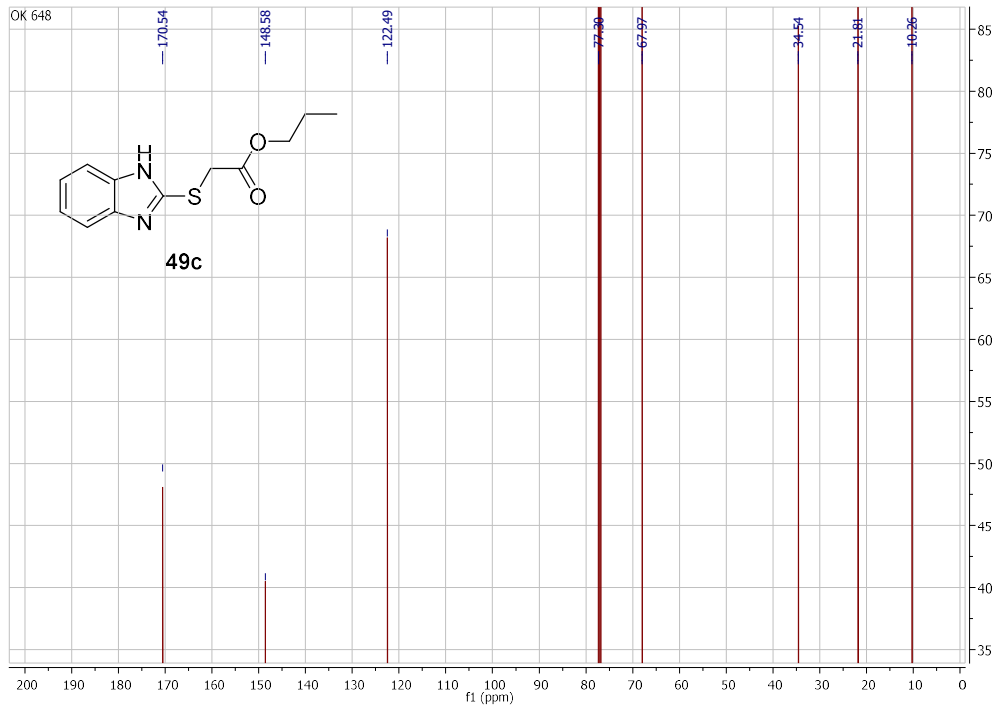
Şekil 8.85. 49b bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu



Şekil 8.86. 49c bileşiğinin IR spektrumu



Şekil 8.87. 49c bileşiğinin ^1H -NMR spektrumu



Şekil 8.88. 49c bileşiğinin ^{13}C -NMR spektrumu