

**YENİ YÖNTEMLE SENTEZLENEN TETRAZOL TÜREVLERİNİN  
TİROZİNAZ ENZİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN  
İNCELENMESİ VE KREM FORMÜLASYONUNDA ETKEN  
MADDE OLARAK KULLANILMASI**

**ELİF AYDINLI**

**DOKTORA TEZİ  
DOĞAL, BİTKİSEL ve KOZMETİK ÜRÜNLER  
ANABİLİM DALI**

**DANIŞMAN  
PROF. DR. HAYDAR GÖKSU**

**DÜZCE, 2024**

**T.C.**  
**DÜZCE ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

**YENİ YÖNTEMLE SENTEZLENEN TETRAZOL TÜREVLERİNİN**  
**TİROZİNAZ ENZİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ VE**  
**KREM FORMÜLASYONUNDA ETKEN MADDE OLARAK KULLANILMASI**

Elif AYDINLI tarafından hazırlanan tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından Düzce Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

**Tez Danışmanı**

Prof. Dr. Haydar GÖKSU

Düzce Üniversitesi

**Eş Danışman**

Prof. Dr. Şevki ADEM

Çankırı Karatekin Üniversitesi

**Jüri Üyeleri**

Prof. Dr. Haydar GÖKSU

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ

İstanbul Gedik Üniversitesi

Doç. Dr. Meral KEKEÇOĞLU

Düzce Üniversitesi

Prof. Dr. Hüseyin ŞAHİN

Giresun Üniversitesi

Doç. Dr. Mustafa Zahritin KAZANCIOĞLU

Kilis 7 Aralık Üniversitesi

Tez Savunma Tarihi: 31/01/2024

## BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün aşamalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

31 Ocak 2024

Elif AYDINLI



## TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimimde, bu tezin hazırlanmasında ve yürütülmesinde gösterdiği her türlü destek ve yardımdan dolayı çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Haydar GÖKSU'ya en içten dileklerle teşekkür ederim. Tez izleme komitemde yer alan Prof. Dr. Halil İbrahim UĞRAŞ ve Doç. Dr. Meral KEKEÇOĞLU'na destekleri ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmam boyunca enzim çalışmalarında sağladığı değerli katkılarından dolayı Prof. Dr. Şevki ADEM'e, sentez maddelerinin aydınlatılmasında cihaz desteği sağlayan Prof. Dr. Hüsnü GERENGİ'ye, başta danışman hocam olmak üzere laboratuvar olanaklarını sunan Kaynaşlı MYO yönetimi ve çalışanlarına şükranlarımı sunarım.

Bu çalışma boyunca yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen sevgili aileme, sırasıyla babam Ayhan, annem Emine AYDINLI'ya, kardeşlerim Ebru ve E. Kısmet AYDINLI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora eğitimim boyunca 100/2000 Doktora Projesi bursu aldığım Yüksek Öğretim Kurumu Başkanlığı'na teşekkürlerimi sunarım.

Bu tez çalışması, Düzce Üniversitesi BAP-2022.26.07.1280 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

**31 Ocak 2024**

**Elif AYDINLI**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa No

ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	x
SİMGELER.....	xi
KISALTMALAR.....	xii
ÖZET.....	xiii
ABSTRACT.....	xiv
EXTENDED ABSTRACT.....	xv
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. 5-SÜBSTİTÜE-1H-TETRAZOL TÜREVLERİ.....</b>	<b>2</b>
<b>1.2. KOZMETİKTE TETRAZOL TÜREVLERİ.....</b>	<b>10</b>
<b>1.3. TİROZİN AZ ENZİM ETKİNLİĞİ.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4. MOLEKÜLER YERLEŞTİRME ÇALIŞMALARI.....</b>	<b>17</b>
<b>1.5. ADME ÖZELLİKLERİNİN TAHMİNİ.....</b>	<b>18</b>
<b>1.6. KOZMETİK ÜRÜNLERE UYGULANAN TESTLER.....</b>	<b>18</b>
<b>1.7. ÇALIŞMANIN AMACI.....</b>	<b>20</b>
<b>2. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>24</b>
<b>2.1. MATERYAL.....</b>	<b>24</b>
<b>2.2. YÖNTEM.....</b>	<b>26</b>
<b>2.2.1. Benzilidenmalononitril Türevlerin Sentezi.....</b>	<b>26</b>
2.2.1.1. 2-benzilidenmalononitril (5) Sentezi.....	26
2.2.1.2. 2-(4-hidroksibenziliden)malononitril (8) Sentezi.....	26
2.2.1.3. 2-(2,5-dimetoksibenziliden)malononitril (13) Sentezi.....	27
2.2.1.4. 2-(3,4-dimethoksibenziliden)malononitril (16) Sentezi.....	28
2.2.1.5. 2-(3,4,5-trimetoksibenziliden)malononitril (19) Sentezi.....	28
2.2.1.6. 2-(2-metilbenziliden)malononitril (22) Sentezi.....	29
2.2.1.7. 2-(4-metilbenziliden)malononitril (25) Sentezi.....	30
2.2.1.8. 2-(2-fluorobenziliden)malononitril (28) Sentezi.....	30
2.2.1.9. 2-(4-fluorobenziliden)malononitril (31) Sentezi.....	31
2.2.1.10. 2-(3,4-diklorobenziliden)malononitril (34) Sentezi.....	31
2.2.1.11. 2-(5-bromo-2-metoksibenziliden)malononitril (37) Sentezi.....	32
<b>2.2.2. 5-Süstitüe-1H-Tetrazol Türevlerin Sentezi.....</b>	<b>33</b>
2.2.2.1. 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6) Sentezi.....	33
2.2.2.2. 3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9) Sentezi.....	34
2.2.2.3. 3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11) Sentezi.....	35
2.2.2.4. 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (14) Sentezi.....	36
2.2.2.5. 3-(3,4-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (17) Sentezi.....	37
2.2.2.6. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)akrilonitril (20) Sentezi.....	38
2.2.2.7. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23) Sentezi.....	39
2.2.2.8. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26) Sentezi.....	40
2.2.2.9. 3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29) Sentezi.....	41

2.2.2.10. 3-(4-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (32) Sentezi.....	42
2.2.2.11. 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) Sentezi .....	43
2.2.2.12. 3-(5-bromo-2-metoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (38) Sentezi .....	44
<b>2.2.3. 5-Sübstitüe-1H-Tetrazol Türevlerin <i>İn Vitro</i> ve <i>İn Siliko</i> Yöntemlerle İncelenmesi.....</b>	<b>44</b>
2.2.3.1. Moleküler Yerleştirme Çalışmaları .....	44
2.2.3.2. ADME Özelliklerinin Tahmini .....	45
2.2.3.3. Tirozinaz İnhibitör Aktivitesi .....	45
<b>2.2.4. Kozmetik Ürün Formülasyonu ve Testleri .....</b>	<b>45</b>
2.2.4.1. Mikrobiyolojik Analiz Testi.....	48
2.2.4.2. Antimikrobiyal Koruyucu Etkinlik Testi .....	49
2.2.4.3. Fizikokimyasal Testler .....	50
2.2.4.4. Anti Pigmentasyon <i>İn Vitro</i> Ürün Testi .....	50
<b>3. BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	<b>52</b>
<b>3.1. BENZİLİDENMALONONİTRİL TÜREVLERİ .....</b>	<b>54</b>
3.1.1. Spektrumların Değerlendirilmesi.....	57
<b>3.2. 5-SÜBSTİTÜE-1H-TETRAZOL TÜREVLERİ .....</b>	<b>68</b>
3.2.1. 5-Sübstitüe-1H- Tetrazol Bileşiklerinin Sentezi İçin Optimizasyon Şartları .....	68
3.2.2. Yeni Yöntemle Sentezlenen Tetrazol Türevleri .....	69
3.2.1. Spektrumların Değerlendirilmesi.....	73
<b>3.3. FT-IR SPEKTRUMLARININ KARŞILAŞTIRILMASI.....</b>	<b>97</b>
<b>3.4. ENZİM-AKTİVİTE ÇALIŞMALARI.....</b>	<b>101</b>
3.4.1. Moleküler Yerleştirme Çalışması .....	101
3.4.2. <i>İn vitro</i> Tirozinaz Enzim Çalışmaları.....	102
3.4.3. Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Eliminasyon (ADME) Özellikleri .....	108
<b>3.5. KOZMETİK ÜRÜN ANALİZLERİ .....</b>	<b>111</b>
3.5.1. Mikrobiyolojik Analiz Testi .....	111
3.5.2. Antimikrobiyal Koruyucu Etkinlik Testi.....	112
3.5.3. Fizikokimyasal Testler .....	113
3.5.4. Anti Pigmentasyon <i>İn Vitro</i> Ürün Testi .....	114
<b>4. SONUÇ .....</b>	<b>117</b>
<b>5. KAYNAKLAR .....</b>	<b>120</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ .....</b>	<b>129</b>

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa No

Şekil 2.1. 5-süstitüe-1H-tetrazolün genel gösterimi. ....	2
Şekil 2.2. a) Karboksilik asitin ve Tetrazolün biyoizosterik gösterimi. b) Bir ilaç olan Tomelukast'ın bioizosterik ve farmakofor özelliklerin gösterimi. ....	3
Şekil 2.3. Tetrazol parçalarını içeren FDA onaylı ve bazı deneysel ilaçlar. ....	4
Şekil 2.4. Tetrazol parçaları içeren bazı inhibitörlerin molekül yapıları. ....	5
Şekil 2.5. Tetrazollerin diğer uygulamalarına dair molekül yapıları. ....	5
Şekil 2.6. 5-süstitüe-1H-tetrazol için genel reaksiyon. ....	7
Şekil 2.7. Dünya çapında güneş kremlerinde kullanılan azot katkılı kimyasal UV filtreler. ....	11
Şekil 2.8. Keratin liflerini boyamak ve/veya ağartmak için tercih edilen tetrazollerin genel gösterimi. ....	12
Şekil 2.9. Melanin biyosentezinin şematik gösterimi. ....	13
Şekil 2.10. Mantar ( <i>Agaricus bisporus</i> ) tirozinazın çift çekirdekli bakır bağlama bölgesinin geometrisi [60]. ....	14
Şekil 2.11. Melanin sentezinde tirozinaz enzimi ve inhibitörlerinin çalışma prensibi. ..	15
Şekil 2.12. Bazı tirozinaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları. ....	15
Şekil 2.13. Tirozinaz inhibitörü olan BMN ve tetrazol türevler. ....	17
Şekil 2.14. Çalışmada izlenen yol. ....	21
Şekil 2.1. Benzaldehit (4)'ten 2-benzilidenmalononitril (5) sentezi. ....	26
Şekil 2.2. 4-hidroksibenzaldehit (7)'den 2-(4-hidroksibenziliden)malononitril(8) sentezi. ....	26
Şekil 2.3. 2,5-dimetoksibenzaldehit (12)'den 2-(2,5-dimetoksibenziliden)malononitril (13) sentezi. ....	27
Şekil 2.4. 3,4-dimetoksibenzaldehit (15)'ten 2-(3,4-dimethoksibenziliden)malononitril (16) sentezi. ....	28
Şekil 2.5. 3,4,5-trimetoksibenzaldehit (18)'den ....	28
Şekil 2.6. 2-metilbenzaldehit (21)'den 2-(2-metilbenziliden)malononitril (22) sentezi. ....	29
Şekil 2.7. 4-metilbenzaldehit (24)'den 2-(4-metilbenziliden)malononitril (25) sentezi. ....	30
Şekil 2.8. 2-fluorobenzaldehit (27)'den 2-(2-fluorobenziliden)malononitril (28) sentezi. ....	30
Şekil 2.9. 4-fluorobenzaldehit (30)'dan 2-(4-fluorobenziliden)malononitril (31) sentezi. ....	31
Şekil 2.10. 3,4-diklorobenzaldehit (33)'den 2-(3,4-diklorobenziliden)malononitril (34) sentezi. ....	31
Şekil 2.11. 5-bromo-2-metoksibenzaldehit (36)'dan 2-(5-bromo-2-metoksibenziliden)malononitril (37) sentezi. ....	32
Şekil 2.12. Benzaldehit (4)'ten 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6) sentezi. ....	33
Şekil 2.13. 4-hidroksibenzaldehit (7)'den 3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9) sentezi. ....	34
Şekil 2.14. 2,5-dihidroksibenzaldehit (10)'dan 3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11) Sentezi. ....	35
Şekil 2.15. 2,5-dimetoksibenzaldehit (12)'den 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (14) Sentezi. ....	36
Şekil 2.16. 3,4-dimetoksibenzaldehit (15)'ten 3-(3,4-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-	

5-il)akrilonitril (17) sentezi. ....	37
Şekil 2.17. 2-metilbenzaldehit (21)'den 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23) sentezi. ....	39
Şekil 2.18. 4-metilbenzaldehit (24)'den 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26) sentezi. ....	40
Şekil 2.19. 2-fluorobenzaldehit (27)'den 3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29) sentezi. ....	41
Şekil 2.20. 4-fluorobenzaldehit (30)'dan 3-(4-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (32) sentezi. ....	42
Şekil 2.21. 3,4-diklorobenzaldehit (33)'den 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) sentezi. ....	43
Şekil 2.22. 5-bromo-2-metoksibenzaldehit (36)'dan 3-(5-bromo-2-metoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (38) sentezi. ....	44
Şekil 2.23. Krem bazının hazırlanması a) FAZ A, FAZ B ve Faz karışımı. (b) Nihai formülasyon. ....	48
Şekil 3.1. 5-süstitüe-1H-tetrazol türevlerinin farklı yöntemlerle sentezi (a)Benzaldehitten tek adımda tetrazol eldesi, (b) BMN'den tetrazol eldesi (c)Benzaldehitten iki adımda tetrazol eldesi. ....	52
Şekil 3.2. 2-benzilidenemalononitril (5)'in a) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) ve b) <sup>13</sup> C NMR (100 MHz) spektrumları. ....	57
Şekil 3.3. 2-(4-hidroksibenziliden)malononitrile (8)'in a) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) ve b) <sup>13</sup> C NMR (100 MHz) spektrumları. ....	58
Şekil 3.4. 2-(2,5-dimetoksibenzilidene)malononitril (13)'ün a) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) ve b) <sup>13</sup> C NMR (100 MHz) spektrumları. ....	59
Şekil 3.5. 2-(3,4-dimetoksibenziliden)malononitril (16)'nin a) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) ve b) <sup>13</sup> C NMR (100 MHz) spektrumları. ....	60
Şekil 3.6. 2-(3,4,5-trimetoksibenziliden)malononitril (19)'un a) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) ve b) <sup>13</sup> C NMR (100 MHz) spektrumları. ....	61
Şekil 3.7. 2-(2-metilbenziliden)malononitril (22)'nin a) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) ve b) <sup>13</sup> C NMR (100 MHz) spektrumu. ....	62
Şekil 3.8. 2-(4-metilbenziliden)malononitril (25)'in a) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) ve b) <sup>13</sup> C NMR (100 MHz) spektrumları. ....	63
Şekil 3.9. 2-(2-fluorobenziliden)malononitrile (28)'in a) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) ve b) <sup>13</sup> C NMR (100 MHz) spektrumu. ....	64
Şekil 3.10. 2-(4-fluorobenziliden)malononitrile (31)'in a) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) ve.....	65
Şekil 3.11. 2-(3,4-diklorobenziliden)malononitril (34)'ün a) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) ve b) <sup>13</sup> C NMR (100 MHz) spektrumu. ....	66
Şekil 3.12. 2-(5-bromo-2-metoksibenziliden)malononitril (37)'nin a) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz) ve b) <sup>13</sup> C NMR (100 MHz) spektrumları. ....	67
Şekil 3.13. 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6)'nin a) FT-IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu. ....	73
Şekil 3.14. 3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9)'un a) FT-IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu. ....	75
Şekil 3.15. 3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11)'in a) FT-IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu. ....	77
Şekil 3.16. 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (14)'ün a) FT-IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu. ....	79
Şekil 3.17. 3-(3,4-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (17)'nin a) FT-IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu. ....	81
Şekil 3.18. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)akrilonitril (20)'nin a) FT-	

IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu. ....	83
Şekil 3.19. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23)'ün a) FT-IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	85
Şekil 3.20. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26)'nin a) FT-IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu.....	87
Şekil 3.21. 3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29)'un a) FT-IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu. ....	89
Şekil 3.22. 3-(4-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (32)'nin a) FT-IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu. ....	91
Şekil 3.23. 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35)'in a) FT-IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu. ....	93
Şekil 3.24. 3-(5-bromo-2-metoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (38)'in a) FT-IR, b) <sup>1</sup> H NMR (400 MHz), c) <sup>13</sup> C NMR spektrumu. ....	95
Şekil 3.25. 2-benzilidenemalononitril (5) ve 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6)'nin FT-IR spektrumları.....	97
Şekil 3.26. 2-(4-hidroksibenziliden)malononitril (8) ve 3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9)'un FT-IR spektrumları. ....	98
Şekil 3.27. 2-(3,4,5-trimetoksibenziliden)malononitril (19) ve 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)akrilonitril (20)'nin FT-IR spektrumları.....	98
Şekil 3.28. 2-(2-metilbenziliden)malononitril (22) ve 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23)'ün FT-IR spektrumları. ....	99
Şekil 3.29. 2-(4-metilbenziliden)malononitril (25) ve 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26)'nin FT-IR spektrumları. ....	99
Şekil 3.30. 2-(2-fluorobenziliden)malononitril (28) ve 3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29)'un FT-IR spektrumları. ....	100
Şekil 3.31. Bileşik (11) ve (35)'in referans ligand (39) ile örtüşen durumları, a) Bileşiklerin tirozinaz aktif bölgesine yönelik bağlanma alanı, b) Docking bölgesi kırmızı renkle gösterilmiştir, c) Enzimin aktif boşluğundaki moleküller.....	105
Şekil 3.32. Enzimin aktif bölgesindeki hangi amino asitlerin referans molekül ve aktif moleküller ile etkileşime girdiğini gösteren diyagram. ....	106
Şekil 3.33. Bileşik (11) ve (35)'in tirozinaz ile protein-ligand etkileşim profillerinin ve pozlarının referans ligand ile karşılaştırılması.....	107
Şekil 3.34. BOILED-Egg modelleri ve SwissADME tahmini kullanılarak elde edilen (11), (35) bileşikleri ve tropolon (39) için biyoyararlanım radar grafikleri. ....	109

## ÇİZELGE LİSTESİ

### Sayfa No

Çizelge 1.1. Benzaldehitten 5-sübstitüe-1H-tetrazoller için model bir reaksiyon ve literatür çalışmaları.....	7
Çizelge 1.2. Kozmetik ürünlerdeki mikrobiyolojik limitler. ....	19
Çizelge 2.1. Krem formülasyon çalışması. ....	46
Çizelge 2.2. Mikrobiyolojik analizde kullanılan materyal ve metot.....	49
Çizelge 2.3. Koruyucu etkinlik testine ait deney ve inkübasyon koşulları.....	50
Çizelge 3.1. Sentezde kullanılan reaktantlar ve sentezlenen ürünler.....	53
Çizelge 3.2. Pd/AlO(OH) NPs (1) etkisinde sentezlenen BMN türevleri. ....	55
Çizelge 3.3. 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (14) sentezi için optimizasyon koşulları <sup>a</sup> .....	68
Çizelge 3.4. Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör ile 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerin <i>one-pot</i> sentezi <sup>a</sup> . ....	70
Çizelge 3.5. Tetrazol bileşiklerin docking çalışmalarına ait Moldock Skorları. ....	101
Çizelge 3.6. Tirozinaz enzim aktivitesine karşı test edilen 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerinin IC <sub>50</sub> değerleri. Değerler üç bağımsız denemenin ortalama SS (Standart Sapma)'nı temsil etmektedir.....	102
Çizelge 3.7. Bileşikler (35), (11) ve tropolon (39) ile en çok etkileşime giren amino asit kalıntıları.....	105
Çizelge 3.8. Bileşik (11), (35) ve tropolon (39)'un ADME özelliklerinin tahmini. ....	108
Çizelge 3.9. Krem için yapılan mikrobiyolojik test sonuçları. ....	111
Çizelge 3.10. Kozmetiklerin 1g ya da 1 mL'sinde toplam canlı aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı ve toplam küf-maya sayısı.....	112
Çizelge 3.11. Antimikrobiyal koruyucu etkinlik test sonuçları. ....	113
Çizelge 3.12. Fizikokimyasal test sonuçları. ....	113
Çizelge 3.13. Tirozinaz enzim inhibisyonunun, melanosit hücrelerinde 48 saat sonunda doza bağlı olarak gösterilmesi. Değerler beş bağımsız denemenin ortalama SS (Standart Sapma)'nı temsil etmektedir.....	115
Çizelge 3.14. Denemelere ait Multiple Comparisons verileri.....	115

## SİMGELER

%	Yüzde
°C	Santigrat derece
μM	Mikromolar
Å	Angstrom
cm	Santimetre
IC <sub>50</sub>	Yarım maksimal inhibitör konsantrasyon
mg	Milligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
μM	Mikromolar
mmol	Milimol
nm	Nanometre
-OCH <sub>3</sub>	Metoksi
-OH	Hidroksi
ppm	milyonda bir
v/v	Hacimce yüzde

## KISALTMALAR

<sup>13</sup> C-NMR	Karbon-13 nükleer magnetik rezonans spektroskopisi
<sup>1</sup> H-NMR	Proton nükleer magnetik rezonans spektroskopisi
3D	Üç boyutlu
AcOH	Asetik asit
ADME	Absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon
ATR	Attenuated Total Reflection
BBB	Kan-beyin bariyerini
BMN	Benziliden malononitril
CYP	Sitokrom
DMF	<i>N,N'</i> -dimetilformamit
DMSO	Dimetilsülfoksit
DMSO-d <sub>6</sub>	Döteryumlu DMSO
e.n.	Erime noktası
EDTA	Etilendiamin tetra asetik asit
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EtOAc	Etilasetat
EtOH	Etanol
FBS	Fetal bovine serum
FDA	(Food and drug administration) gıda ve ilaç dairesi
HCl	Hidroklorik asit
HIA	Bağırsak absorpsiyonu
HIV	Human immunodeficiency virus (İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü)
İTK	İnce tabaka kromatografisi
L-DOPA	3,4-dihidroksi-L-fenilalanin
LTD <sub>4</sub>	Leukotriene D <sub>4</sub>
MeOH	Metanol
MN	Malononitril
MOF	Metal-organic frameworks (metal organik kafes yapı)
NaN <sub>3</sub>	Sodyum azid
NPs	Nanopartikül
PEG	Polietilen glikol
RMSD	Root-mean-square deviation (Kök ortalama kare sapması)
SS	Standart sapma
THF	Tetrahidrofuran
TİTCK	Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu
TM	Test metaryali
TYRP	Tirozinaza bağlı protein
UV	Ultraviyole

## ÖZET

### YENİ YÖNTEMLE SENTEZLENEN TETRAZOL TÜREVLERİNİN TİROZİNAZ ENZİMİ ÜZERİNDEKİ ETKİNLİĞİNİN İNCELENMESİ VE KREM FORMÜLASYONUNDA ETKEN MADDE OLARAK KULLANILMASI

Elif AYDINLI

Düzce Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü, Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler Anabilim Dalı

Doktora Tezi

Danışman: Prof. Dr. Haydar GÖKSU

Ocak 2024, 128 sayfa

Bu çalışmada yeni bir sentez yöntemiyle sentetik cilt beyazlatıcı ve leke önleyici bir bileşiğin eldesi ve krem formülasyonunda kullanılması hedeflendi. Çalışma dört aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada moleküler yerleştirme çalışması yapıldı. Sentezi planlanan 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevleri için tirozinaz enzimini inhibe etme potansiyeli olan türevler tespit edildi. İkinci aşama sentez aşamasıdır. Aril aldehit türevleri kullanılarak alüminyum oksit-hidroksit-destekli Pd nanopartikül (Pd/AlO(OH) NPs) etkisinde yeni metodoloji geliştirilerek benzilidenmalononitril (BMN) ve 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevleri sentezlendi. Yapılan denemelerle 2-24 saat aralığında kantitatif verimlerle 11 adet BMN türevi ve 3-6 saat aralığında %60-95 verimlerle 12 adet 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevi sentezlendi. Bileşiklerin yapıları <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR ve FT-IR gibi spektroskopik yöntemlerle karakterize edildi. Üçüncü aşamada 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerin tirozinaz enzim etkinlikleri *in vitro* olarak incelendi. Enzim inhibisyon etkinliği en yüksek olan 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) (IC<sub>50</sub>: 45,00±3,28 µM) molekülü için *in siliko* (BOILED-Egg model ve biyoyararlanım radarı) testler gerçekleştirildi. Dördüncü aşamada 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) ile krem formülasyonu oluşturuldu. Elde edilen krem formülasyona kozmetik ürün testleri (mikrobiyolojik analiz, antimikrobiyal koruyucu etkinlik testi, fizikokimyasal testler ve antipigmentasyon *in vitro* ürün testi) yapıldı. Mikrobiyolojik analiz sonuçlarına göre formülasyon “Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyolojik Kontrolüne İlişkin Kılavuz” hükümlerine uygun olduğu belirlendi. Krem formülasyonunda *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* ve *C. Albicans* mikroorganizmalarına rastlanmadı. Toplam aerobik mezofilik mikroorganizma ve toplam küf-maya sayısının 10<sup>2</sup> cfu/g’yi aşmadığı tespit edildi. Antimikrobiyal koruyucu etkinlik testi ile krem formülasyon içeriğinin mikroorganizma (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* ve *A. brasiliensis*) üremesine karşı ISO 11930 kabul kriterlerine (kriter A) uygun olduğu tespit edildi. Anti pigmentasyon testi ile insan epidermal melanosit hücre hattına artan konsantrasyonlarda (25, 50, 100 ve 200 µg/mL) ilgili formülasyon uygulandı. Krem formülasyonunun kontrol grubuna göre melanin sentezini inhibe ettiği tespit edildi.

**Anahtar Sözcükler:** 5-sübstitüe-1H-tetrazol, Tirozinaz, Pd/AlO(OH) NPs, Krem formülasyon, *In vitro*

## ABSTRACT

### INVESTIGATION OF TETRAZOLE DERIVATIVES SYNTHESIZED BY THE NEW METHOD ACTIVITIES ON TYROSINASE ENZYME, AND ITS USE AS AN ACTIVE INGREDIENT IN CREAM FORMULATION

Elif AYDINLI

Düzce University

Graduate School, Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Haydar GÖKSU

January 2024, 128 pages

In this study, it was aimed to obtain a synthetic skin whitening and anti-blemish compound by a new synthesis method and to use it in cream formulation. The study was carried out in four stages. In the first stage, a molecular docking study was performed. Derivatives with potential to inhibit the tyrosinase enzyme were determined for the 5-substituted-1H-tetrazol derivatives planned to be synthesized. The second stage is the synthesis stage. Benzylidenemalononitrile (BMN) and 5-substituted-1H-tetrazol derivatives were synthesized by developing a new methodology under the influence of aluminum oxy-hydroxide-supported Pd nanoparticles (Pd/AIO(OH) NPs) using aryl aldehyde derivatives. 11 BMN derivatives were synthesized with quantitative yields in the range of 2-24 hours and 12 5-substituted-1H-tetrazol derivatives were synthesized with 60-95% yields in the range of 3-6 hours. The structures of the compounds were characterised by spectroscopic methods such as <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and FT-IR. In the third stage, the tyrosinase enzyme activities of 5-substituted-1H-tetrazol derivatives were examined *in vitro*. *In silico* tests (BOILED-Egg model and bioavailability radar) were performed for the molecule 3-(3,4-dichlorophenyl)-2-(1H-tetrazol-5-yl)acrylonitrile (35), which has the highest enzyme inhibition activity (IC<sub>50</sub>: 45,00±3,28 μM). In the fourth stage, the cream formulation was created with 3-(3,4-dichlorophenyl)-2-(1H-tetrazol-5-yl)acrylonitrile (35). Cosmetic product tests (microbiological, antimicrobial protective activity, physicochemical tests and antipigmentation *in vitro* product tests) were performed on the obtained cream formulation. According to the microbiological analysis results, the formulation was determined to comply with the provisions of the “Guide on Microbiological Control of Cosmetic Products”. *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *C. Albicans* microorganisms were not detected in the cream formulation. It was determined that the total number of aerobic mesophilic microorganisms and total mold and yeast did not exceed 10<sup>2</sup> cfu/g. With the antimicrobial protective effectiveness test, it was determined that the cream formulation content complies with the ISO 11930 acceptance criteria (criterion A) against the growth of microorganisms (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* ve *A. brasiliensis*). In the anti-pigmentation test, the relevant formulation was applied to the human epidermal melanocyte cell line at increasing concentrations (25, 50, 100 and 200 μg/mL). The cream formulation was found to inhibit melanin synthesis compared to the control group.

**Keywords:** 5-substituted-1H-tetrazole, Tyrosinase, Pd/AIO(OH) NPs, Cream formulation, *In vitro*.

## **EXTENDED ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF TETRAZOLE DERIVATIVES SYNTHESIZED BY THE NEW METHOD ACTIVITIES ON TYROSINASE ENZYME, AND ITS USE AS AN ACTIVE INGREDIENT IN CREAM FORMULATION**

Elif AYDINLI

Düzce University

Graduate School, Department of Department of Natural, Herbal and Cosmetic Products

Doctoral Thesis

Supervisor: Prof. Dr. Haydar GÖKSU

January 2024, 128 pages

#### **1. INTRODUCTION**

Tetrazoles are a class of heterocyclic compounds containing four nitrogen atoms in their structure. If there is a free N-H bond at the nitrogen adjacent to the substituted carbon in the heterocyclic ring, the compound is called a 5-substituted-1H-tetrazole derivative. Tetrazoles are of great interest in drug design in medicinal chemistry, especially due to their bioisosteres. It is possible to find tetrazole fragments in drugs approved by the FDA (Food and Drug Administration). Losartan, valsartan and cardesartan are examples of the best-known antihypertensive drugs. Molecules containing the tetrazole fragment are resistant to metabolic degradation in biotransformations. Therefore, tetrazoles tend to reduce side effects of drugs by increasing bioavailability and lipophilicity compared to carboxylic acids. Thus, the importance of designed drugs in chemistry, pharmacy and drug design has increased due to their physicochemical properties such as absorption, distribution, metabolism and excretion. Computer-aided structure-based design studies on the compatibility and interaction of tetrazole fragments with receptors in the design of new inhibitors have recently shed light on synthetic approaches. Additionally, the possibility of tetrazole derivatives as chelators of copper atoms was investigated by molecular docking. Cyclooxygenase and xanthine oxidoreductase inhibitors are inhibitors designed as drug candidates containing a tetrazole moiety.

Tetrazol and its derivatives have also been reported to be antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, antimalarial, anticancer, antitumor, analgesic, anti-proliferative agents, potential anti-HIV drug candidates, herbicidal and multifunctional drug delivery agents. Examples of tetrazole compounds also exist in material science. It

has important applications in the automobile industry as a gas generator for airbags, in the defense industry as propellant components for modern explosives and rockets, and in photography as a photostabilizer and anti-sludge.

## 2. MATERIAL AND METHODS

Chemicals and solvents used in the synthesis of the compounds were purchased from Aldrich and Merck.

### 2.1. General procedure for the synthesis of tetrazole compounds

1,0 mmol of aryl aldehyde derivatives; 1,1 mmol of malononitrile; 1,2 mmol of sodium azide (1,2 mmol) and Pd/AlO(OH) NPs (30 mg) catalyst were mixed in 10 mL of ethanol in a flask with a magnetic stirrer. Reactions were controlled by thin layer chromatography (TLC) (SiO<sub>2</sub>, hexane: ethyl acetate (EtOAc)=4:1 (v/v)) and continued for 3-6 hours under reflux. After the reaction was completed, the catalyst was removed by simple centrifugation. The remaining filtrate was added with 30 mL of 2 N HCl solution and mixed vigorously. The mixture was worked up twice with the help of ethyl acetate. The separated organic phase was dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. The solvent was removed with the help of evaporator. Melting point determinations were recorded. FT-IR (ATR), <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR spectra were taken and the corresponding tetrazole was obtained in high yield.

### 2.2 Molecular docking

In order to understand the possible binding positions of the synthesised compounds with the tyrosinase active site, a molecular docking study was carried out using Molegro Virtual Docker programme. The X-ray crystal structure of *Agaricus bisporus* tyrosinase crystallised with tropolone was obtained from the RCSB Protein Data Bank (2Y9X). Three-dimensional (3D) structures of tetrazole derivatives were created using MarvinSketch software. The compounds were transferred to Molegro Virtual Docker. To examine the interaction details of the molecules, ten docking trials were performed for each molecule in Discovery Studio 2021 Client. At the end of the study, the fits with the best scores were selected.

### 2.3. Prediction of ADME Properties

Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion (ADME) properties were evaluated using the Swis ADME online tool. Predictions were made for the physicochemical

properties, pharmacokinetics, drug similarities and medicinal chemistry compatibility of reference molecule tropolon and the two molecules with the highest mushroom tyrosinase inhibition. Furthermore, molecular docking, BOILED-Egg model and bioavailability radar for these compounds were analysed for drug similarity and evaluated as a whole.

#### *2.4. In vitro tyrosinase inhibitory activity*

Mushroom tyrosinase enzyme was used for tyrosinase inhibitory activity. For the enzyme activity assay, 250 mL of reaction medium containing 0,5 mM L-DOPA and 100 mL of different concentrations of compounds in 50 mM phosphate buffer (pH 6,8) was prepared. The reaction was carried out at 37 °C for a period of 7 min. Measurements were read on a microtiter reader at 492 nm. Compounds dissolved in 1 mg/mL DMSO were diluted to the appropriate concentration. Measurements were carried out with controls in reaction medium containing DMSO but not inhibitors. The inhibitory effects of the compounds on tyrosinase activity were expressed as concentrations inhibiting half of the enzyme activity (IC<sub>50</sub>).

#### *2.5. Cream Formulation Study*

In the formulation; Phase A; 80,3% (Pure water, sodium polyacrylate, dicaprylyl carbonate, polyglyceryl-3 caprate, sodium stearyl glutamate) and Phase B; 19,7% (3-(3,4-dichlorophenyl)-2-(1H-tetrazol-5-yl)acrylonitrile (35), glycerin, coco caprylate, sorbitan caprylate, propanediol, benzoic acid, chamomile oil and essential oil) were combined at room temperature and mixed until the mixture became homogeneous. The analyzes of the obtained product were made in accredited laboratories. Microbiological analysis, antimicrobial protective activity test, physicochemical analysis, and anti-pigmentation (whitening effect) test were performed in accredited laboratories. Suitable formulation for the final product was determined.

### **3. RESULTS AND DISCUSSIONS**

The thesis study consists of four stages. In the first step, a computer assisted in silico molecular docking study was carried out to guide the preliminary synthesis. Thus, both time and chemicals are saved. The experimental tyrosinase inhibitor tropolone (moldock score: -47.63) was determined to show a high level of ligand-protein interaction energy compared to that of 5-substituted-1H-tetrazole derivatives (moldock score: -106,74 to -77,35) 2-(1H-tetrazol-5-yl)-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)acrylonitrile (20) was calculated

as the compound showing the highest inhibition with a moldock score of -106,74. However, the moldock score of 3-(3,4-dichlorophenyl)-2-(1H-tetrazol-5-yl)acrylonitrile (35), which we used as active ingredient in our studies, was -99,78.

In the second step, 5-substituted-1H-tetrazole derivatives were synthesised by establishing a new methodology. Aluminium oxy-hydroxide-supported Pd nanoparticles (Pd/AIO(OH) NPs) was chosen as catalyst and used for the first time for 5-substituted-1H-tetrazole derivatives. In pre-experiments, optimisation studies were carried out to determine parameters such as solvent, catalyst amount, reaction temperature. The ideal amount for catalysis was 30 mg. Ethanol was good for synthesis and isolation. A one-pot reaction combining aryl aldehyde derivatives with malononitrile (2), sodium azide (3) and aluminium oxy-hydroxide supported Pd nanoparticles (Pd/AIO(OH) NPs) in the same vessel was determined as the ultimate method for 5-substituted-1H-tetrazole derivatives. The ease of construction without multi-step preparations is one of the main advantages of this protocol. Aluminium oxy-hydroxide-supported Pd nanoparticles (Pd/AIO(OH) NPs) have been used for the synthesis of 5-substituted-1H-tetrazole derivatives for the first time. In addition, BMN derivatives were used to elucidate the structures of tetrazoles. For this purpose, BMN derivatives were also synthesised under the influence of Pd/AIO(OH) NPs. While 11 synthesized BMN derivatives were purified by silica-gel column, 12 5-substituted-1H-tetrazol derivatives were purified by work up and crystallization processes. The structures of the compounds were characterised by FT-IR,  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR analysis. Melting points of each molecule were determined.

In the third step, the inhibition of 5-substituted-1H-tetrazole derivatives against mushroom tyrosinase was investigated *in vitro*. Compounds exhibiting inhibition in the range of  $\text{IC}_{50}$   $45,00 \pm 3,28 \mu\text{M}$  to  $693,14 \pm 40,02 \mu\text{M}$  were found to show inhibition at higher values than the reference molecule tropolone (39) with  $\text{IC}_{50}$   $40,00 \mu\text{M}$ . The molecule showing the strongest enzyme inhibition was 3-(3,4-dichlorophenyl)-2-(1H-tetrazol-5-yl)acrylonitrile (35) with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $45,00 \pm 3,28 \mu\text{M}$ . The second 3-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-(1H-tetrazol-5-yl)acrylonitrile (11) with an  $\text{IC}_{50}$  value of  $99,00 \pm 5,71 \mu\text{M}$ . *In silico* (molecular docking, BOILED-Egg model and bioavailability radar) tests were performed for molecules (11), (35) and (39). The parameters of the molecules such as lipophilicity, size, polarity, solubility, flexibility and saturation were compared with the reference molecule through bioavailability radar. absorption,

distribution, metabolism, and excretion (ADME) properties were interpreted to understand drug similarity. The molecules fulfil all other physicochemical parameters except saturation as in the reference molecule. The skin permeability of compound (5) (Log K<sub>p</sub>: -6.06 cm/s) was higher than the other two molecules. In this respect, compound (35) may provide more benefit in skin applications than other compounds. The molecules fulfil 'Lipinsky's Rule of Five'. When *in vitro* enzyme studies were compared with *in silico* studies, it was found that the inhibitory activity ranking of the molecules did not overlap.

In the last stage, the compound (35) showing the highest inhibition activity against fungal tyrosinase was determined as the active ingredient and the cream formulation was developed. In order to prove the effectiveness of the cream, microbiological, antimicrobial protective activity, physicochemical and anti-pigmentation *in vitro* activity tests were carried out in accredited laboratories. With the antimicrobial protective efficacy test, it was concluded that the product's ability to resist contamination from external or internal contamination during use was at the appropriate desired level. With the anti-pigmentation *in vitro* product test, a dose-dependent inhibition of melanin synthesis was observed in the human epidermal melanocyte cell line at the end of 48 hours. The cream proved to be anti-pigmentation.

#### **4. CONCLUSION AND OUTLOOK**

5-substituted-1H-tetrazole derivatives were synthesized with Pd/AlO(OH) nanoparticles. Twelve different tetrazole derivatives were obtained by this method under mild conditions. The effect of these derivatives against tyrosinase enzyme was investigated and the results obtained were compared with the reference compound (tropolone). In the studies, all the synthesized tetrazole derivatives were found to inhibit tyrosinase enzyme. Especially two compounds, (11) and (35), showed very strong inhibition of the enzyme. In addition, the cream formulation was prepared by selecting compound (35) as the active ingredient with the highest inhibition activity. Tests performed to determine the final cream formulation proved the anti-pigmentation activity of the formulation. This also supports the *in vitro* enzyme study.

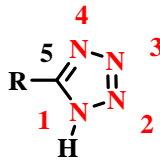
# 1. GİRİŞ

İklim koşullarındaki değişiklikler yer küreye ulaşan ultraviyole (UV) radyasyon miktarının son elli yılda önemli ölçüde artmasına neden olmuştur. Dolayısıyla cilt eskisinden daha çok çevresel ve kimyasal etkilere maruz kalmaktadır. Tüm bu etkiler cilt problemlerini, hatta cilt kanseri oluşumunu tetiklemektedir. Çoğu cilt sorunu ölümcül olmasa da estetik kaygılar nedeniyle kişileri psikolojik olarak etkilemektedir. Melanin cildin rengini belirler. Ayrıca melaninin, cildi ultraviyole (UV) radyasyonunun, oksidatif stresin, toksik ilaçların vb. yan etkilerinden bir kalkan gibi koruduğu bilinmektedir. Melanin üretimini katalize eden anahtar hız sınırlayıcı enzim tirozinaz enzimidir. Cilt uzun süre kontrolsüz bir şekilde UV gibi etkilere maruz kaldığında ciltte gerektiğinden fazla melanin birikir. Bu aşırı pigmentasyonu azaltmak tirozinaz seviyelerini düzenleyen moleküler yolaklardaki hedef alanlara etki eden molekülleri geliştirmek kozmetik sorunların ve hastalıkların tedavisinde kritik rol oynar [1]. Bu bağlamda melanin üretimini seçici ve etkili bir şekilde engelleyebilen tirozinaz inhibitörleri olarak tasarlanan maddeler umut verici bir hedef olarak, kozmetikte leke önleyici ve cilt beyazlatma maddeleri olarak kullanılabilir [2], [3]. Bu maddelerden en bilinenleri hidrokinon, kojik asit,  $\alpha$ -arbutindir. Bunlar hiperpigmentasyonu, tedavi etmek için tıbbi olarak kullanılmakla birlikte, ciltte lekeleri önlemek ve ton eşitlemek amacıyla kozmetik formüllerde sıkça tercih edilmektedir. Hidrokinon, tropolon, deoksiarbutin, resorsinol, vanilin ve bunların türevleri gibi basit fenoller tirozinazın olası inhibitörleri olarak bilimsel literatürde rapor edilmiştir [4]. Hidrokinon, kojik asit ve arbutin vb. gibi organik moleküller tirozinaz inhibitör etkisi göstermektedir. Bu moleküller cilt hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmalarına rağmen yapılan araştırmalarla özellikle hidrokinononun insan sağlığı için çeşitli tehlikeleri içerdiği tespit edilmiş ve birçok ülkede formülasyonlarda kullanılması yasaklanmıştır [2]. Ayrıca rhododenol gibi bazı tirozinaz inhibitörlerinin melanositlere sitotoksik olduğu ve vitiligoya yol açtığı rapor edilmiştir [5]. Bu nedenle melanojenez inhibisyonu için kozmetik endüstrisi toksik olmayan yeni reaktifler geliştirmeye isteklidir. Bu ve bunun gibi endişelerden dolayı melanojenez inhibisyonu için kozmetik endüstrisi alternatif moleküllerin sentezlenmesini oldukça önemsemektedir.

Deri pigmentasyonu (ten rengi) melaninler tarafından belirlenir. Melaninler, cildin ultraviyole ışınlar gibi güneş kaynaklı hasarına karşı doğal korumasıdır. Ancak ciltte aşırı melanin birikmesi, cilt problemleri olarak kabul edilen hiperpigmentasyona, çillere ve yaşlanma belirtilerine yol açar [1]. Melanin biyosentezi tirozinaz enzimi tarafından kontrol edilir. Melanin biyosentezi hem tirozinaz enzimini hem de tirozinaza bağlı proteinleri (TYRP-1 ve TYRP-2) içeren karmaşık enzimatik reaksiyonlar bütünüdür. Ayrıca tirozinaz enzimi bir metalloenzim olup, aktif merkezinde üç farklı amino aside koordine edilmiş iki farklı, tip 3 bakır merkezi vardır. Bu merkez antiferromagnetik olarak bağlanan bakır iyonlarından ibarettir. Tirozinaz enzimi çalışırken bakırı da kullanmakta ve bir ligand gibi davranabilen bileşiklerle etkileşime girebilmektedir. Yani tirozinaz aktif bölgedeki bakır iyonlarını şelatlama yaparak tirozinaz aktivitesini inhibe edebilir. Bunlardan biri de kojik asittir. Kojik asit bakır iyonlarını şelatlayarak tirozinazın inhibisyonuna neden olur [3], [6].

### 1.1. 5-SÜBSTİTÜE-1H-TETRAZOL TÜREVLERİ

Tetrazoller art arda bağlanmış dört azot atomunun beş üyeli heterosiklik halkayı bir karbon ve bir hidrojen atomuyla tamamlayarak oluşturduğu bir yapıdır. Nitrojen, karbon ve hidrojen atomundan oluşan beş üyeli heterosiklik halkada sübstitüe karbona komşu azotta serbest bir N-H bağı bulunuyorsa bileşik bir 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevi olarak adlandırılır (Şekil 2.1).

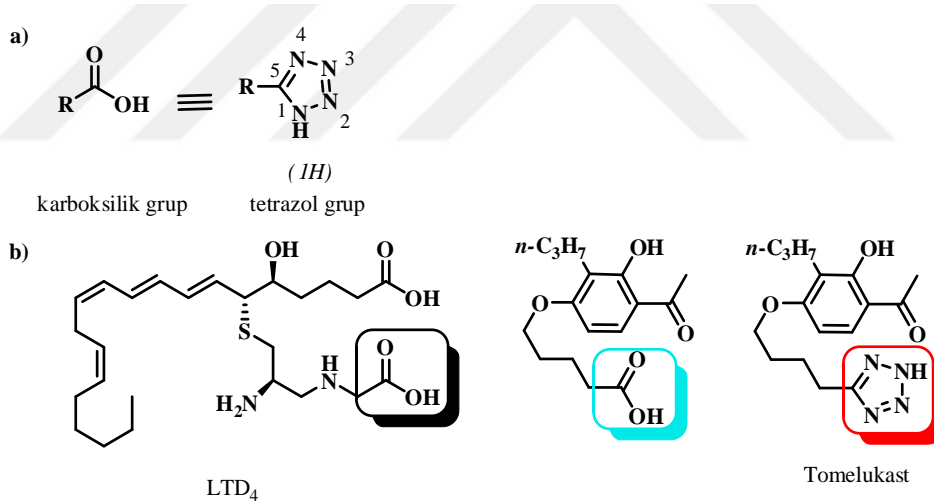


Şekil 2.1. 5-sübstitüe-1H-tetrazolün genel gösterimi.

Tetrazol türevleri, tarımda bitki büyüme düzenleyicileri olarak, bitki koruma için herbisitler ve mantar öldürücüler olarak kullanılır. Tetrazollerin diğer önemli uygulamaları, malzeme biliminde, koordinasyon kimyasında ve bir dizi sentetik dönüşümde ara ürün olarak bulunabilir [7], [8]. Heterosiklik halkada art arda bağlanmış dört elektronegatif nitrojen atomuna sayesinde yük halka etrafında yer değiştirerek (delokalizasyon) büyük bir kimyasal enerji stogunun birikmesine neden olur. Halkadaki bu enerji birikimi otomobil endüstrisinde hava yastıkları için gaz üreteci, patlayıcılar,

füzeler için itici bileşenlerin oluşmasını tetikler. Ayrıca tetrazoller fotografik emülsiyonlarda fotostabilizatör olarak malzeme bilimin önemli uygulamaları mevcuttur. Tetrazol halkasında koordinasyon bağlarını oluşturabilen dört nitrojen atomunun varlığı nedeniyle, tetrazollerin ligand olarak kullanılması, çeşitli metal komplekslerinin elde edilmesini sağlar. Bu yetenek, ağır metal iyonlarının sıvılardan uzaklaştırılması ve korozyona karşı metal koruması için formüle edilmiş kimyasal sistemlerde başarıyla kullanılmaktadır [4].

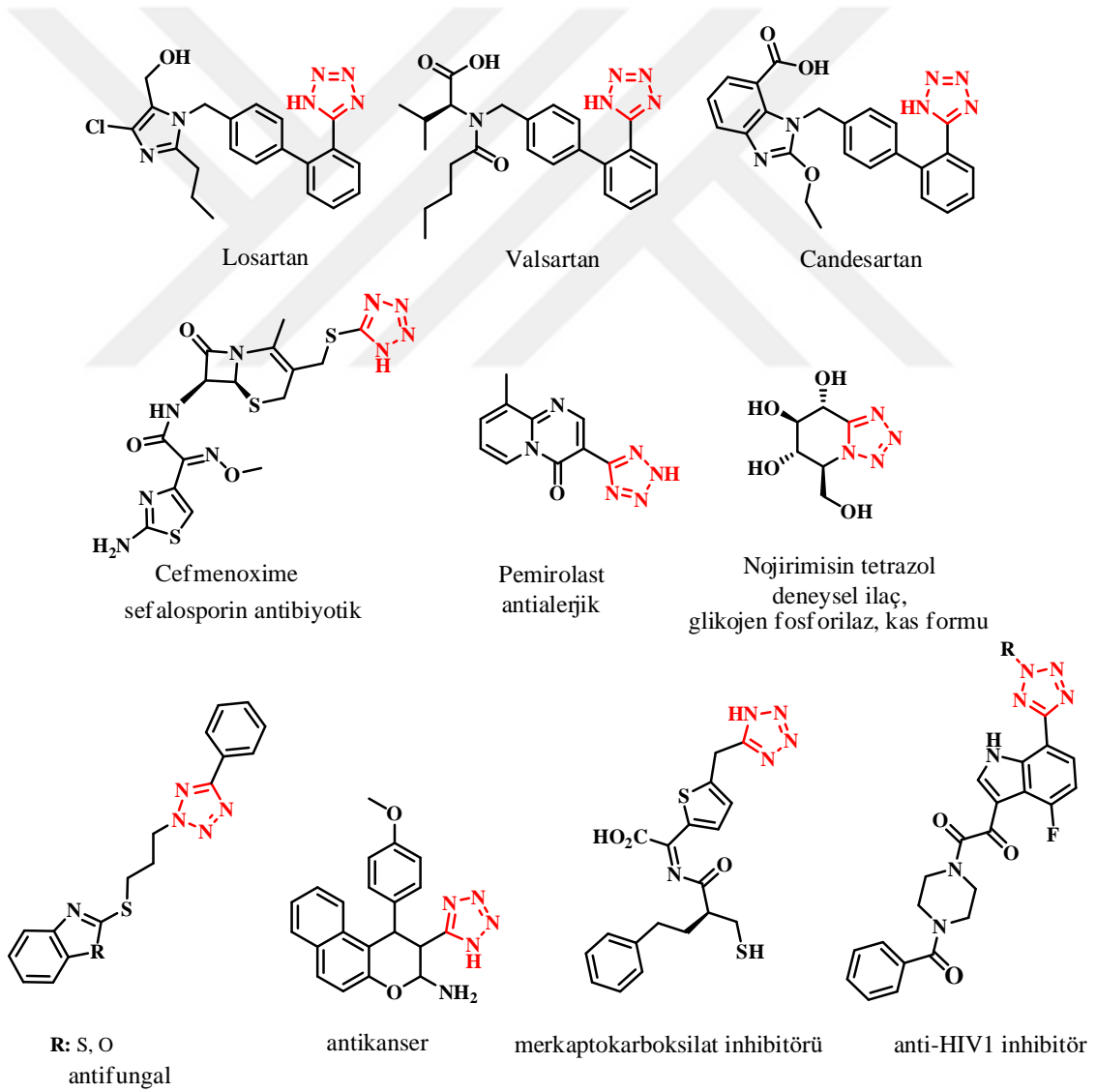
Tetrazol fragmanlarını içeren bileşiklerin önemli iki özelliği bilinmektedir. Bunlar biyoizosterik ve farmakoforlar özelliklerdir. Tetrazol fragmanları karboksilik grubunun işlevselliği ile karşılaştırıldığında biyoizosterik özellik göstermesi nedeniyle metabolik olarak kararlı bir alternatiftir (Şekil 2.2.a). Bir ilaç olan Tomelukast, karboksilik izosterisiden 30 kat daha aktiftir ve büyüme hormonu Leukotriene D4 (LTD4)'ün sisteinilglisin ucunu taklit ederek LTD4 aktif bölgesiyle daha kolay etkileşime girer. Bu da hem bioizosterik hem de farmakofor özelliklerin gösterildiği çalışmalardan biri olarak literatürde mevcuttur (Şekil 2.2.b) [9].



Şekil 2.2. a) Karboksilik asitin ve Tetrazolün biyoizosterik gösterimi. b) Bir ilaç olan Tomelukast'ın bioizosterik ve farmakofor özelliklerin gösterimi.

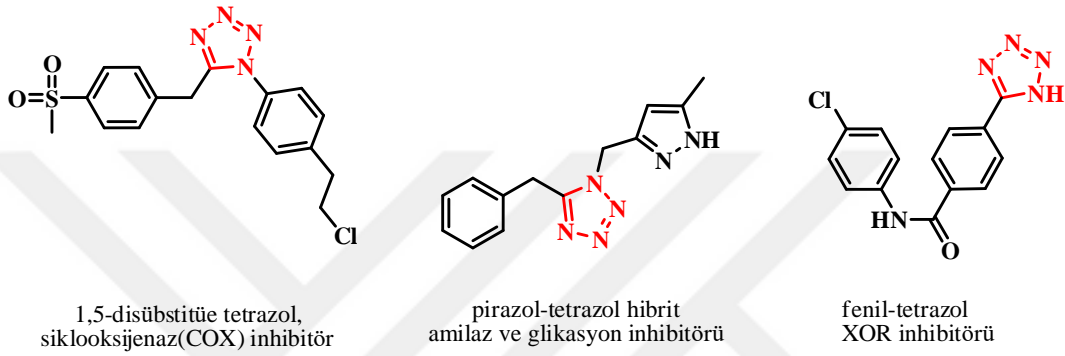
Tetrazol fragmanı ile modifiye edilmiş moleküller, biyolojik dönüşümlerde metabolik bozunmaya ve kimyasal oksidanlara karşı dirençlidir. Bu nedenle tetrazoller, karboksilik asitlere kıyasla biyoyararlılığı ve lipofilisiteyi artırarak ilaçların yan etkilerini azaltma eğilimindedir [10]. Bu doğrultuda tasarlanan ilaçların emilim, dağılım, metabolizma ve atılım gibi fizikokimyasal özelliklerinden dolayı kimya,

farmasötik ve ilaç tasarımı da önemi artmakta tıpta ilaç sentezinde kullanım alanı her geçen gün genişlemektedir. FDA (Food and Drug Administration) tarafından onaylanan birçok ilacın yapısında da tetrazol parçalarını bulunmaktadır [9], [11]-[13]. Bir anjiyotensin II reseptör antagonisti olan antihipertansif sartan ailesine ait Losartan ve onun yapısal türevleri (Valsartan, candesartan vb.) en bilinen ilaç örnekleridir (Şekil 2.3) [9]. Bunun yanı sıra deneysel ilaçlar, ilaç adayları ve ön ilaç örnekleri de literatürde mevcuttur. Ayrıca tetrazol ve türevlerinin antimikrobiyal, antialerjik, sitostatik, nootropik, analjezik, antifungal [14], [15], antiinflamatuvar [16], antibakteriyel [17], antiviral [18], potansiyel anti-HIV ilaç adayları [19], [20], anti-malarial [21], antikanser [22] antitumor [23] ve çok işlevli ilaç taşıyıcı ajanlar [24] ve diğer biyolojik aktivitelere sahip olduğu rapor edilmiştir (Şekil 2.3) [11], [25].



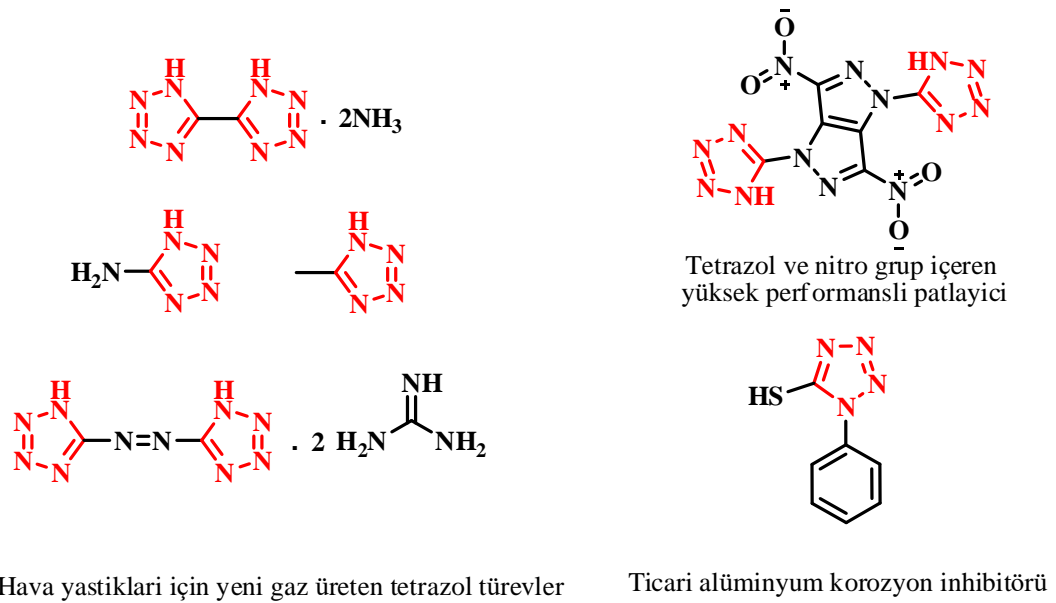
Şekil 2.3. Tetrazol parçalarını içeren FDA onaylı ve bazı deneysel ilaçlar.

Tetrazol grubunun reseptörlerle uyumluluğu ve etkileşimi üzerine yeni inhibitörlerin yapı bazlı tasarımına ilişkin çalışmalar son zamanlarda sentetik yaklaşımlara ışık tutmuştur. Tetrazol parçası içeren moleküller, siklooksijenaz inhibitörleri olarak anti-kanser ajanları olarak değerlendirilmiştir [26]. Bir ksantin oksidoredüktaz (XOR) inhibitörü olarak hiperüriseminin tedavisin için bildirilmiştir.  $\alpha$ -amilaz ve enzimatik olmayan glikasyonun inhibitörleri diyabetin tedavisine yönelik ilaç adayı olarak tasarlanmıştır (Şekil 2.4) [27], [28]. Korozyon inhibitörü olarak da ticari ürünlerde piyasada bulunmaktadır.



Şekil 2.4. Tetrazol parçaları içeren bazı inhibitörlerin molekül yapıları.

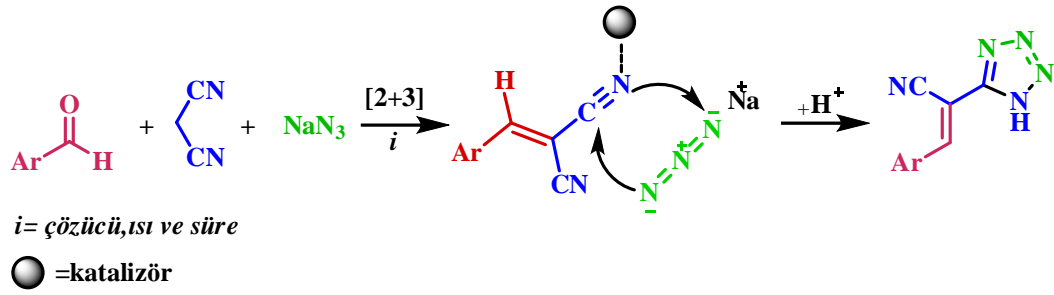
Malzeme biliminin, otomobil endüstrisindeki hava yastıkları için gaz jeneratörü [29], savunma endüstrisindeki modern patlayıcılar[30], roketler için itici bileşenler [31], fotoğrafçılıkta fotostabilizatör [32] ve gümüş halojenür fotografik emülsiyonlar için etkili ajanlar olarak çok çeşitli önemli uygulamaları vardır (Şekil 2.5) [33].



Şekil 2.5. Tetrazollerin diğer uygulamalarına dair molekül yapıları.

Tetrazol içeren türevlerin sentezi için çeşitli yöntemler önerilmiştir. İlk tetrazol 1885 yılında İsveçli Kimyager JA. Bladin tarafından disiyanofenilhidrazin ve nitroz asit reaksiyonundan sentezlendi [34], [35]. Daha sonra nitroz asitin yerini sodyum azit ( $\text{NaN}_3$ ) aldı. Sodyum azit kullanılarak yapılan ilk örnek Finnegan ve arkadaşları tarafından hazırlanmış olup 5-fenil-1-(açıl)-1,2,3,4-tetrazolleridir. Zaman içinde bu ve bunun gibi farklı protokoller denendi. Fakat bu yöntemler yavaş ve düşük verimle gerçekleşmektedir. Ayrıca, protokollerin birçoğunda toksik metallerin, güçlü lewis asitlerinin ve pahalı reaktiflerin kullanılması, düşük ürün verimi, uzun reaksiyon süreleri, sert reaksiyon koşulları, toksik ve patlayıcı olan hidrazoik asidin ( $\text{HN}_3$ ) varlığı gibi bazı dezavantajları vardı [36]. Genel olarak reaksiyon geri soğutucu altında yüksek sıcaklıkta gerçekleştirilmektedir, bu amaç için kullanılan çözücünün yüksek sıcaklığa dayanabilen yüksek kaynama noktasına sahip olması gerekir. Yöntemlerin çoğunda bulunan dezavantajların varlığı nedeniyle daha yararlı, güvenli tekniklerin geliştirilmesine hala ihtiyaç duyulmaktadır. Kısa sürelerde, çevreci bir yaklaşımla ekonomik proseslerin geliştirilmesi sentezlenen maddelerin ürüne dönüştürülmesi açısından oldukça önemlidir [36], [37]. Özellikle sentezlerde Dimetilformamid (DMF) ve Dimetil sülfoksit (DMSO) gibi dipolar aprotik organik çözücüler kullanılırken yeni yöntemlerle daha ılıman koşullarda sentezler gerçekleştirilmektedir. Mikrodalga sistemler kullanarak ya da çözücü olarak magnetize su kullanılarak reaksiyon süreleri kayde değer bir şekilde kısaltılmıştır [38], [39].

5-sübstitüe-1H-tetrazol türevleri için de literatürde çeşitli yöntemler önerilmiştir. 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerinin hazırlanmasına yönelik geleneksel yöntem, bir organonitril ve bir azit tuzunun [2+3] halka katılmasıdır (Şekil 2.6). İlk bileşen olan nitrilin iki atomuyla, ikinci bileşen olan azidin üç atomu reaksiyona girerek tetrazol halkası oluşmaktadır. Böylece 5-sübstitüe-1H-tetrazol doğrudan sentezlenebilir. Diğer bir yöntem de 2012'de Tisseh ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen, çok bileşenli (multi-component) bir domino Knoevenagel kondenzasyonu ve 1,3-dipolar halka katılması reaksiyonlarını içeren çok aşamalı sentezin *one-pot (tek-kap ya da tek adımlı)* prosesidir. Böylece bu proses reaksiyon süresini azaltır, çok adımlı reaksiyonları ve bunların saflaştırma adımlarını en aza indirir ve karmaşık ürün izolasyonu olmadan 5-substitute 1H-tetrazolleri elde edilir [36].

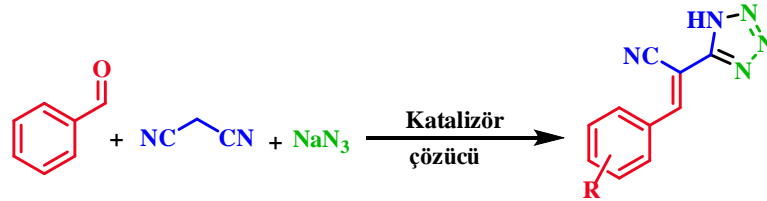


Şekil 2.6. 5-sübstitüe-1H-tetrazol için genel reaksiyon.

Ayrıca pek çok teknikte olduğu gibi siklizasyon reaksiyonlarında da katalizör önemli bir rol oynar. 5-sübstitüe-1H-tetrazollerin sentezi için kullanılan ilk katalizörler homojen katalizörlerdir. Homojen katalizörler sıkıcı ayırma prosedürleri, zayıf geri kazanım ve geri dönüştürülebilirlik gibi dezavantajlara sahiptir. Bu zorlukların üstesinden gelmek için heterojen katalizörler geliştirilmiştir. Buna rağmen reaksiyonların çoğunda sert koşullar gereği uzun reaksiyon süresine ihtiyaç duyulduğu görülmektedir.

Literatürde 5-substitute-1H-tetrazol türevlerinin sentezi için çeşitli yöntemler önerilmiştir. Çizelge 1.1’de ise malononitril (MN), sodyum azid ( $\text{NaN}_3$ ) ve çeşitli aromatik aldehitlerden türevlendirilen 5-substitute-1H-tetrazollerine ait bir model reaksiyon verileri gösterilmektedir.

Çizelge 1.1. Benzaldehitten 5-sübstitüe-1H-tetrazolleri için model bir reaksiyon ve literatür çalışmaları.



Giriş	Aldehit (mmol)	MN (mmol)	BMN (mmol)	$\text{NaN}_3$ (mmol)	Katalizör	Çözücü	Süre (dk)	Verim (%)	Sıcaklık °C	Ref.
1	-	-	1	1,5	Cu-MOF	PEG	20	90	110	[5]
2	1	1	-	1,5	$\text{Fe}_3\text{O}_4$ @BNPs- CPTMS -Chitosan-Pd(0)	Çözücüsüz	55	96	70	[34]
3	1	1	-	1,5	BNPs@ $\text{SiO}_2$ - TPPTSA	Çözücüsüz	55	96	70	[37]
4	1	1	-	1,0	Nano- $\text{Fe}_3\text{O}_4$	Çözücüsüz	35	92	250 W	[38]
5	1	1	-	1,0	Magnetize su	$\text{H}_2\text{O}$ - Magnetize	15	96	40	[39]

Çizelge 1.1. (Devamı)Benzaldehitten 5-süstitüe-1H-tetrazoller için model bir reaksiyon ve literatür çalışmaları.

Giriş	Aldehit (mmol)	MN (mmol)	BMN (mmol)	NaN <sub>3</sub> (mmol)	Katalizör	Çözücü	Süre (dk)	Verim (%)	Sıcaklık °C	Ref.
6	1	1	-	1,2	Nano-NiO	DMF	360	90	70	[40]
7	1	1,1	-	1,2	Nano-ZrP <sub>2</sub> O <sub>7</sub> NPs	DMF	40	93	70	[41]
8	1	1,1	-	1,2	Nano-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / Cu(II)@MNP	EtOH	300	92	80	[42]
9	1	1,1	-	1,2	-	EtOH	120		70	[43]
10	1	1	-	1,5	Nano-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> - CNT-SO <sub>3</sub> H	Çözücüsüz	150	90	80	[44]
11	1	1	-	2,0	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @fibroin- SO <sub>3</sub> H	Çözücüsüz	40	89	100	[45]
12	1	1	-	2,0	-	H <sub>2</sub> O	*	81	50	[46]
13	1	1	-	2,0	In metali	MeOH- THF	20	60	50	[47]
14	1	1	-	2,0	Mg metali	MeOH- THF	*	69	50	[47]
15	1	1	-	2,0	Zn metali	AcOH- THF	150	64	50	[47]
16	-	-	2	1,4	Ni- SMTU@bohmit	PEG-400	*	80	120	[48]

\*~24 saat

5-substitute 1H-tetrazollerin geleneksel sentezi, nitrillerin azidlere [2+3] halka katılması ile gerçekleştirilmektedir (Çizelge 1.1). Bunun yanı sıra çok bileşenli (multi-component) domino Knoevenagel kondenzasyonu ile 1,3-dipolar halka katılması tekniği de literatürdeki diğer sentez yöntemidir (Çizelge 1.1, Giriş 2-15).

Reaksiyonların geneline bakıldığında çoğu benzaldehit, MN ve NaN<sub>3</sub> üç bileşenli reaksiyonu *one pot* yöntemle sentezlenmiştir.

5-süstitüe-1H-tetrazollerin bu prosesleri için çeşitli katalizörler ve farklı çözücü sistemleri önerilmiştir. Bu tür sentezlerde homojen veya heterojen katalizörler kullanılmaktadır [34], [49], [50].

Heterojen katalizörler minimum miktarda bile yeterli performansı gösterir, santrifüjleme gibi basit yöntemlerle geri kazanılabilir, tekrar kullanılabilir olması nedeniyle geri dönüşümü destekleyen malzemelerdir. Ayrıca farklı çevresel koşullar altında kararlılıklarını korurlar. Ancak, yüzey alanları sınırlıdır ve katalitik aktiviteleri ve seçicilikleri düşüktür. Partikül boyutunu azaltarak aktif yüzey alanı genişletilerek bu sorunun üstesinden gelinmiştir.

Katalizörün yanı sıra sentezler, farklı çözücü sistemlerinde (magnetize su, su, metanol, etanol, DMF, PEG, İyonik sıvılar gibi) ya da çözücüsüz sistemlerde gerçekleştirilmiştir. Ayrıca sentezler ultrasonikasyon, mikrodalga gibi çeşitli çevre koşullarında da yürütülmüştür. Çizelge 1.1, Giriş 5'teki magnetik su örneği de reaksiyon sisteminde hem katalizör hem de çözücü görevi görmüş oldukça ilginç denemelerden biridir. Çizelge 1.1'de Giriş 1, 5-9, 12-16'da çözücülü ve Giriş 2-4, 10, 11'de çözücüsüz yöntemlerle yapılmış denemelerdir. Reaksiyon verimlerinin oldukça yüksek olduğu Çizelge 1.1'de görülmektedir.

Literatürden alınan ve Çizelge 1.1'de sunulan örneklerde reaksiyon sürelerini kısaltmak ve sıcaklığı düşürmek amacıyla çok çeşitli katalizörler kullanılmasının yanı sıra son zamanlarda özellikle nano bazlı katalizörler dikkat çekmektedir. Nano-Cu-MOF [5], nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> [38], nano-NiO [40], nano-ZrP<sub>2</sub>O<sub>7</sub> [41] gibi nanoparçacık temelli katalizörlere örneklerdir (Çizelge 1.1, Giriş 1, 4, 6, 7). Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BNPs-CPTMS-Chitosan-Pd(0) [34], BNPs@SiO<sub>2</sub>-TPPTSA [37], Ni-SMTU@boehmite [48] katalizörler böhmite nanoparçacıklar (BNP'ler) ile, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CNT-SO<sub>3</sub>H [44] katalizör manyetik karbon nanotüp ile Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ fibroin-SO<sub>3</sub>H [45] katalizör manyetik nano-biyokompozit ile modifiye edilmiş farklı malzeme içeriklerine sahip katalizörler de rapor edilmiştir (Çizelge 1.1, Giriş 2, 3, 16).

Tetrazollerin sentez yöntemlerine dair çalışmalar şöyle sıralanabilir:

Behrang Salahshournia ve arkadaşlarının çalışmasında çevre dostu olan nitelendirdikleri PEG ortamında çeşitli nitrillerin ve sodyum azidin [3+2] halka katılma reaksiyonu yoluyla 5-substitute-1H-tetrazollerin hazırlanması için geri dönüştürülebilir bir nano-katalizör olan Cu-MOF kullanarak %90'a varan verimlerle yaklaşık 20 dk'da elde edilmişlerdir (Çizelge 1.1, Giriş 1) [5].

Mino Khodamorady ve Kiumars Bahrami 2019'da ilk kez bir manyetik böhmite nanoparçacık (MBNPs) tabanlı (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@BNPs-CPTMSChitosan-Pd(0)) katalizörünü kullanarak 100°C'de çözücüsüz koşullar altında NaN<sub>3</sub>, malononitril ve çeşitli aromatik aldehitlerden karışımı ile % 97 verimle 5-substitute-1H-tetrazollerini sentezlenmişlerdir (Çizelge 1.1, Giriş 2) [34].

Mino Khodamorady ve arkadaşları yaptığı çalışmada ise bir nanokatalizör BNPs@SiO<sub>2</sub>-TPPTSA varlığında, benzaldehit, sodyum azit, malononitrilin *one pot* reaksiyonu sonucunda 5-süstitüe-1H-tetrazollerini (2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril

sentezi) % 96'ya varan verimle 100 °C'de 55dk'da solventsiz koşullarda homoselektif olarak sentezlemeyi başarmışlardır (Çizelge 1.1, Giriş 3) [37].

Mohammad Bakherad ve arkadaşlarının 5- sübstitue 1H- tetrazollerini sentezi için suyu manyetize ederek hem çözücü hem de katalizör olarak kullanmayı önerdikleri (*one pot*) üç bileşenli sentez literatürdeki diğer sentez yöntemlerine göre oldukça ilgi çekicidir. Bu yöntemle, benzaldehit, malononitril ve sodyum azidin üç bileşenli reaksiyonunu farklı sürelerde manyetize olmuş su kullanarak 40 °C'de 15 dakikada %96 verimlere kadar elde edilmiştir. Böylece yeni, verimli, katalizörsüz, çevreci ve uygun bir yöntem literatüre kazandırılmıştır. (Çizelge 1.1, Giriş 5) [39].

Xiaofeng Yuan ve arkadaşları Nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/Cu(II)@MNP aracılığı ile, çözücü olarak kullandıkları EtOH (10 mL) içerisine aldehit (1 mmol), malononitril (1,1 mmol), sodyum azit (1,2 mmol) ve optimizasyonunu 80 °C'de gerçekleştirdikleri sentez ile 5-substitute-1H-tetrazollerini elde etmişlerdir (Çizelge 1.1, Giriş 8) [42].

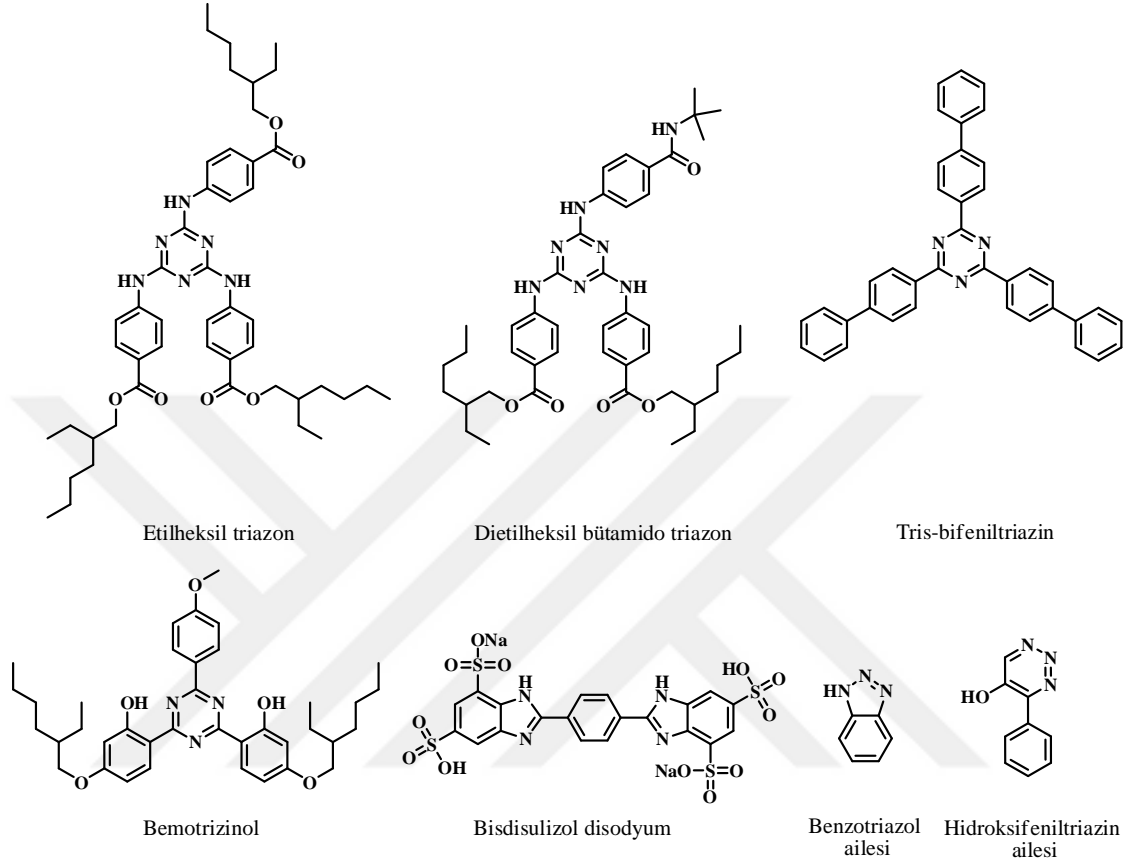
Ahmad Nouri Parouch ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada ise ilk kez fibroin tabanlı manyetik özellik gösteren ve reaksiyon sonrasında mıknatısla ayrılabilen bir biyo-nanokatalizör olarak elde edilen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> @fibroin-SO<sub>3</sub>H, aril aldehit, malononitril ve sodyum azit içeren solvent karışımına dahil edilip 100 °C'de 40 dk karıştırılarak tetrazol türevleri %89 verimle elde edilmiştir. Ayrıca çalışma grubu aril halkası üzerindeki elektron sağlayan ve çeken sübstitüent pozisyonlarının, reaksiyon verim ve sürelerine etki etmediği sonucuna varmışlardır (Çizelge 1.1, Giriş 11) [45].

Cherif Behlou ve arkadaşları In, Mg veya Zn metal iyonlarını kullanarak üç farklı metot ile 1H tetrazol türevlerini sentezlemeyi amaçladılar. Karbonil bileşiği, malononitril ve sodyum azit ve metal iyonlarının dahil edildiği reaksiyonları 50 °C'de su içinde %50-69 verimle gerçekleştirmişlerdir (Çizelge 1.1, Giriş 13-15) [47].

## 1.2. KOZMETİKTE TETRAZOL TÜREVLERİ

Günümüzde kozmetik sektöründe kullanılan birçok üründe azot bazlı bileşikler kullanılmaktadır. Azoller, çözünlüğü ve bimoleküler hedeflere bağlanma afinitesini artırabilen hidrojen bağı ve dipol etkileşimi gibi çeşitli kovalent olmayan etkileşimler uygulayabilir ve bu da onları yararlı farmakoforlar haline getirir [51]. Ayrıca imidazol, benzimidazol, diazol, triazol ve türevlerini içeren heterosiklik bileşikler güneş kremlerinde UV filtre olarak kozmetik amaçlı kullanılmaktadırlar. Bu bileşikler

fotostabildir (Şekil 2.7) [52]. Tetrazoller de azot bakımından zengin biyogüvenlik açısından klinik çalışmalara konu olmuş ve ilaç olarak da kullanılmaktadır.

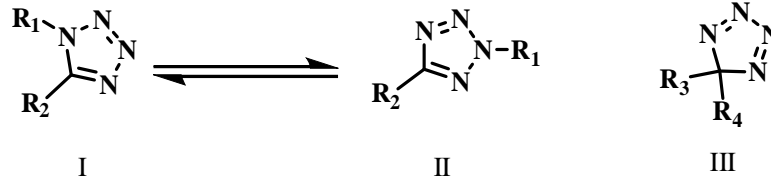


Şekil 2.7. Dünya çapında güneş kremlerinde kullanılan azot katkılı kimyasal UV filtreler.

Tetrazol bileşiklerinin keratin liflerinin özellikle insan saçı üzerinde kullanıma yönelik renklendirici ve ağartıcı maddelere dahil edilebileceği ve bu maddelerin performansında bir artışa yol açabileceği bulunmuş ve Alman Patent Ofisi tarafından patentlenmiştir. Tetrazol(ler) bu içerikler de kullanım amacına bağlı olarak ağırlıkça %0,1 ila 12,5 gibi dar kantitatif aralıklarda kullanılır.

Geleneksel saç boyaları genellikle en az bir geliştirici ve en az bir bağlayıcı maddeden oluşur ve ayrıca pigmentler de içerebilir. Bugün geleneksel saç boyalarında bulunan renklendirici ve/veya ağartma maddeleri optimal olarak kabul edilebilir durumda değildir. Ayrıca bu ürünlerin hem üretiminde hem de işlenmesinde hâlâ birtakım dezavantajlar ve problemler mevcuttur. Bu içerikler, temel bir bileşen olarak en az bir tetrazol ve/veya tetrazol türevi içerir. I nolu molekül ile II nolu molekül birbirinin

tautomeridir ve birbirlerine dönüşebilir. Ayrıca III nolu moleküldeki 5 numaralı karbondaki bulunan farklı fonksiyonel gruplar aracılığı ile farklı kimyasal özellik göstermektedirler.



Şekil 2.8. Keratin liflerini boyamak ve/veya ağartmak için tercih edilen tetrazollerin genel gösterimi.

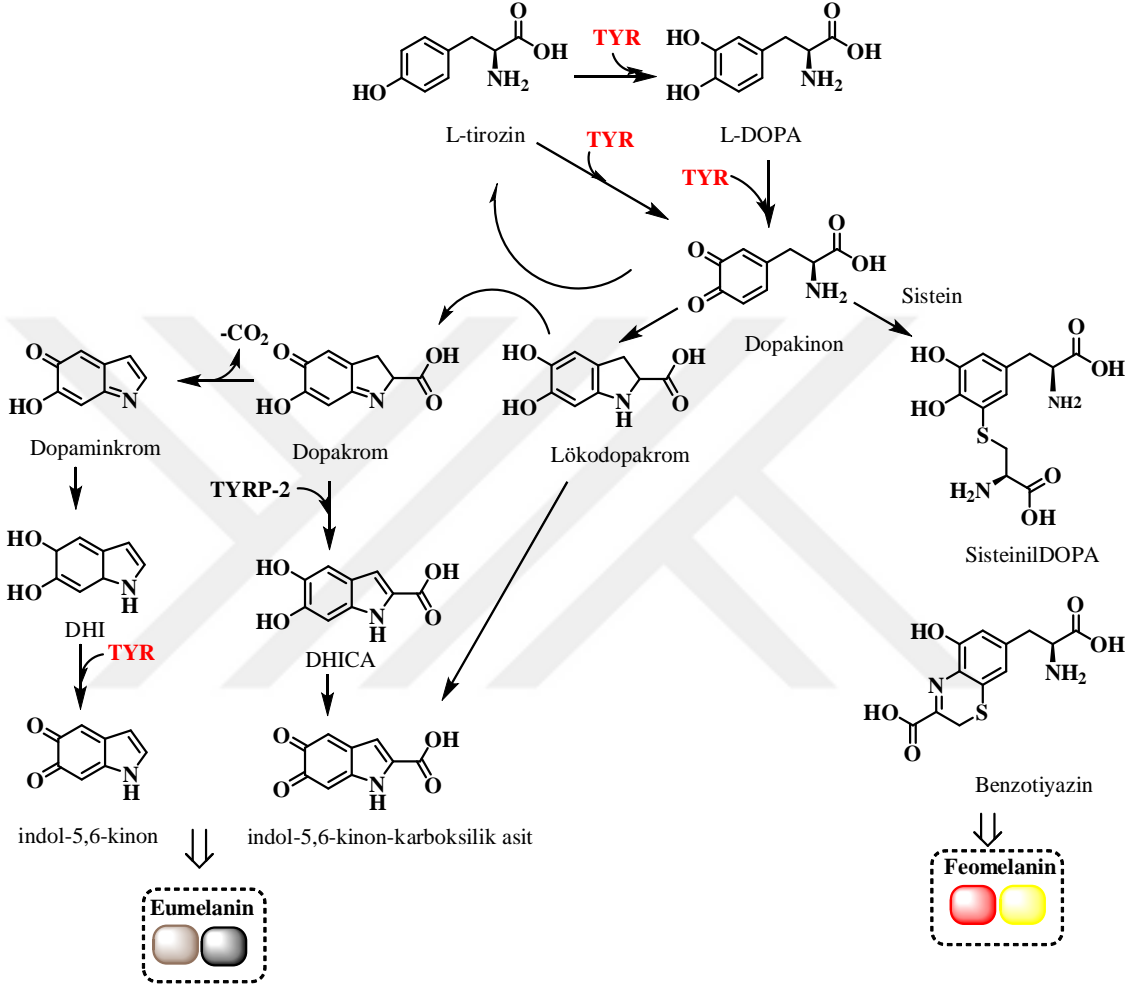
Tetrazol parçası içeren 2-(tetrazol-5-yl)-benzoksazol türevleri de ağırlıkça %0,01-10 (0,1-5) konsantrasyonda, kozmetik bileşenlerde, güneşten koruyucu (maksimum emilimi, 280 ila 320 nm ultraviyole aralığında) ve güneş yanığını önleyici bileşenlerde, sulu emülsiyonlar, macunlar ve cilt losyonlarında antiinflamatuvar maddeler olarak kullanılabilmesine dair bilgiler patent içeriklerinde mevcuttur [53], [54].

### 1.3. TİROZİN AZ ENZİM ETKİNLİĞİ

Değişen iklim, çevre koşulları, UV radyasyon, hormonal faktörler, kozmetikler ve ilaçlara bağlı yan etkiler, modern hayatın getirdiği estetik kaygılar gibi nedenlere bağlı olarak cilt sorunlarından muzdarip olan kişiler bu sorunları hafifletmek ya da ortadan kaldırmak amacıyla son yıllarda tıp ve kozmetik alanında cilt beyazlatıcı ve leke önleyici ajanlara ilgi göstermektedir. Öyle ki Global Industry Analysts, Inc. tarafından hazırlanan bir rapora göre, küresel cilt beyazlatma pazarının 2030 yılına kadar 15,7 milyar dolara ulaşacağı tahmin edilmektedir [55].

Melanin, memelilerde, deride, gözlerde, iç kulakta ve saçta bulunur. Pigmentasyonunda anahtar rol oynar. Melanin, UV radyasyon, oksidatif stres, toksik ilaçlar vb. yan etkilere karşı adeta doğal bir koruma kalkanı oluşturur. Melanin sentezi melanositlerin içindeki melanozom organellerinde gerçekleşir. Melanin biyosentezinin anahtar hız sınırlayıcı katalitik adımı Tirozinaz enzimi tarafından kontrol edilir. Tirozinaz (EC 1.14.18.1), L-tirozin ve 3,4-dihidroksi-L-fenilalanin (L-DOPA) dopakinona dönüştüren monofenolaz ve difenolaz reaksiyonlarını katalize eder. Monofenolaz fazında hTYR, L-tirozini dopakinona oksitlerken, L-tirozini da L-DOPA'ya hidroksile eder, difenolaz

fazında ise L-DOPA'nın dopakinona oksidasyonunu katalize eder [56]. Bundan sonra reaksiyon, farklı formlara dönüşen iki tür melanin sentezlerine doğru dallanır. Bunlar, kahverengimsi-siyah çözünmeyen pigment eumelanin; kırmızımsı-sarı çözünür polimer yapı pigment feomelanindir. Farklı türlerde karmaşık enzimatik reaksiyonları içeren bu süreç Şekil 2.9 ile görselleştirilmektedir [3].

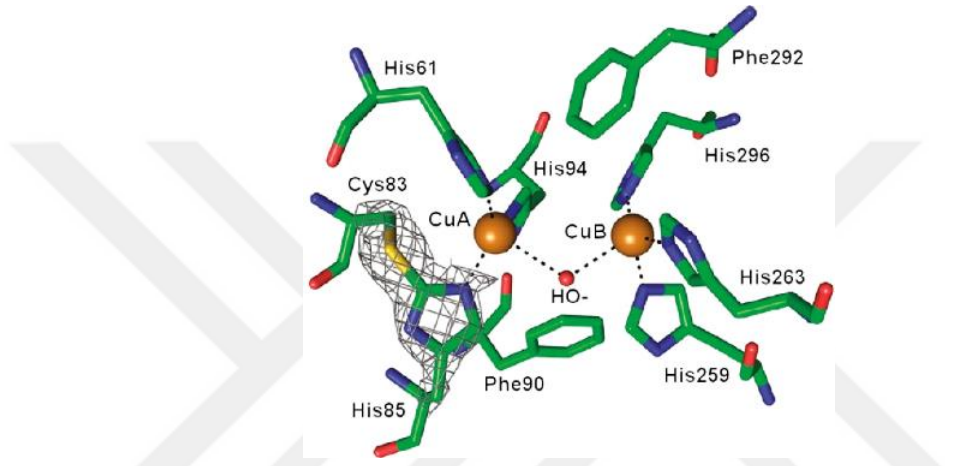


Şekil 2.9. Melanin biyosentezinin şematik gösterimi.

Bu sürecin düzenlenmesinde üç enzim kritik rol oynar. İnsan tirozinazı (hTYR), tirozinazla ilişkili protein-1 (TYRP-1) ve tirozinazla ilişkili protein-2 (TYRP-2). hTYR binükleer bakır merkezi içerirken, TYRP-1 ve TYRP-2 binükleer çinko merkezi taşır. Ayrıca melanogenez, melanositlerdeki MAPK, MC1R/a, PI3K/Akt, Wnt/b-katenin ve nitrik oksitinin dahil olduğu sinyal mekanizmaları tarafından düzenlenir [57]. Sinyal yollarının bozulmasıyla birlikte tirozinazın anormal ekspresyonu veya aktivasyonu söz konusu olabilir. Tirozinaz ve ilişkili enzimlerin ekspresyonunu azalırca albinizm, vitiligo, kloazama ve melazma hastalıklarıyla ilişkilendirilirken; tirozinaz ekspresyonu

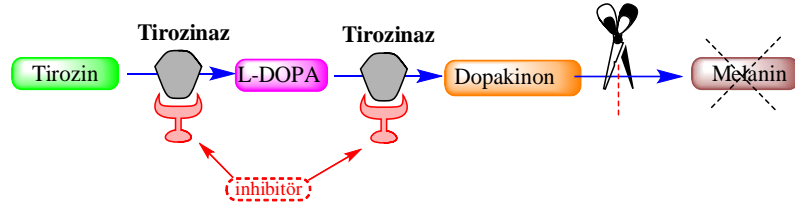
anormal derecede yükselirse malign melanomayla, çil, kahverengi lekeler, yaşlılık lekelerine neden olan hiperpigmentasyonla ilişkilendirilmektedir [2]. Hiperpigmentasyon ölümcül olmasa da yaşam kalitesini büyük ölçüde etkileyerek kişilerin psikolojisini olumsuz yönde etkileyebilmektedir [3]. Ayrıca literatürde, melanin birikiminin alzheimer ve parkinson hastalıklarıyla ilişkilendirildiği çalışmalar mevcuttur [4].

Tip 3 bakır içeren bir metalloenzim olan tirozinaz enzimi, aktivitesinde bakırı kofaktör olarak kullanır (Şekil 2.10) [13], [58]-[60].



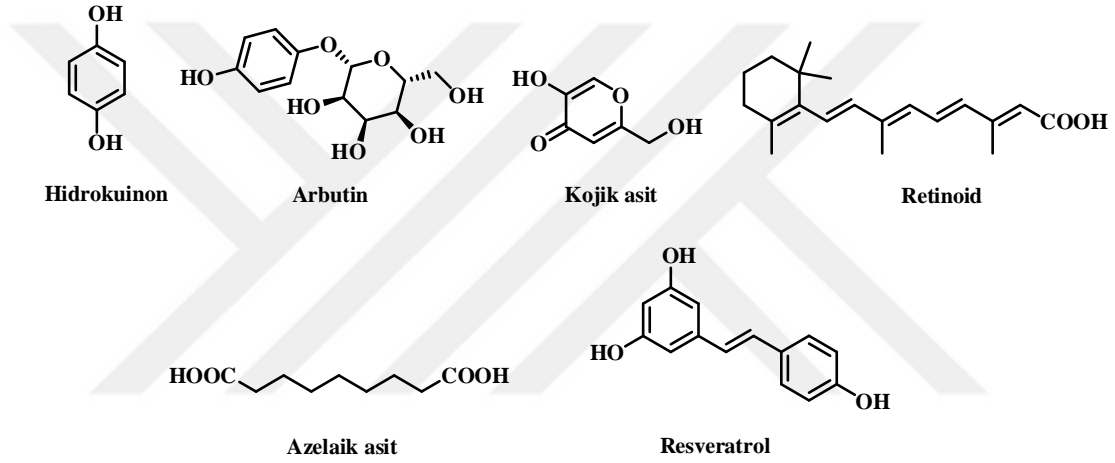
Şekil 2.10. Mantar (*Agaricus bisporus*) tirozinazın çift çekirdekli bakır bağlama bölgesinin geometrisi [60].

Melanin biyosentezinde tirozinin melanine iki aşamalı dönüşüme izin verir. Enzimin katalize ettiği reaksiyonlar ile tirozin L-DOPA ve dopakinona dönüşür. Dopakinon da melanin pigmentini üreterek polimerleşir. Bu süreçte hız belirleyen anahtar enzim tirozinaz ile inhibitör madde kenetlenerek melanin üretimini azaltır (Şekil 2.11). Tirozinaz inhibitörleri, enzim substrat etkileşimini inhibe eden tirozinaz enziminde bulunan bakır metal iyonu ile şelatlama yaparak veya melanin oluşumu sürecinde yer alan oksidasyon sürecini engelleyerek işlev görür [61]. Böylece tirozinaz inhibitörleri aşırı melanin oluşumunu etkili bir şekilde inhibe edebilir. Ayrıca tirozinaz inhibitörleri, meyve ve sebzelerin enzimatik esmerleşmesini önlemek amacıyla gıda koruyucu maddeler olarak ve kozmetikte beyazlatıcı maddeler olarak kullanılabilir [3].



Şekil 2.11. Melanin sentezinde tirozinaz enzimi ve inhibitörlerinin çalışma prensibi.

Çok sayıda tirozinaz inhibitörü doğal ve sentetik olarak bulunmuş ve rapor edilmiştir. Hidrokinon,  $\alpha$ -arbutin, kojik asit, retinoid, azelaik asit, resveratrol, kaftarik asit, krizosplenetin ve feniletıl resorsinol vb. maddeler tirozinaz inhibitörleri olarak tanımlanmıştır (Şekil 2.12).



Şekil 2.12. Bazı tirozinaz inhibitörlerinin kimyasal yapıları.

Hiperpigmentasyonu tedavi etmek için en sık kullanılan ilaç olan hidrokinon Amerika Birleşik Devletleri'nde, tirozinaz aktivitesini inhibe eden tirozinaz için bir psödosubstrattır [3]. Kozmetikte güneş kremlerinde ve bazı krem formülasyonlarda leke önleyici olarak kullanılmaktadır. Kojik asit ve arbutin gibi moleküller de tirozinaz inhibitör olarak bilinen, cilt hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılmış fakat son araştırmalara dayalı olarak insan sağlığı için çeşitli tehlikeler içerdiği bulunmuştur [2]. Resveratrol de iyi bilinen tirozinaz inhibitörlerindedir. Fakat kimyasal kararsızlığı ve düşük çözünürlüğü nedeniyle kozmetikte yaygın olarak kullanılamaz [3].

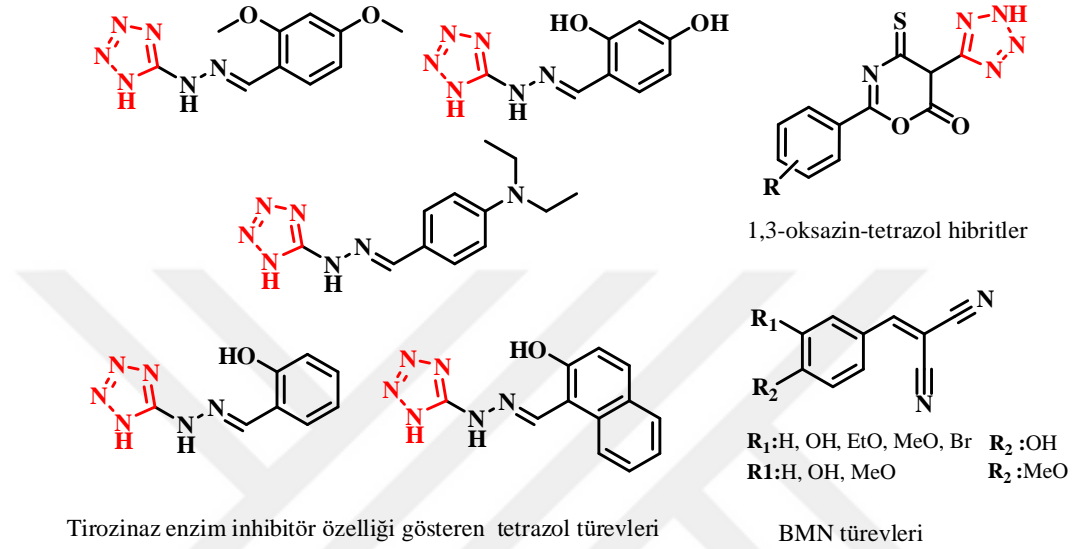
Literatürde doğal ve sentetik birçok maddenin anti-melanojenik ve anti-tirozinaz aktivite çalışmaları sınırlı sayıda *in vitro* nispeten fazla *in siliko* olarak olası yapıları moleküler modelleme çalışmaları ile tahmin edilmeye çalışılmıştır. Bunlardan biri de tetrazol türevi bileşiklerdir. Literatüre kazandırılmış pek çok tetrazol türevi mevcuttur

fakat olası tirozinaz aktivitesi nedeniyle bu çalışmada 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevler üzerine odaklandık. Tetrazol halkasında koordinasyon bağlarını oluşturabilen dört nitrojen atomunun varlığı ayrıca, tetrazollerin ligand olarak kullanılması, çeşitli metal komplekslerinin elde edilmesini sağlar. Şelatlama yeteneği onlara metalloenzimler ile koordine olarak enzimin etkinliğini azaltan yönde inhibisyona neden olabilen etkiler göstermesine neden olabilmektedir. Örneğin kozmetiklerde en bilinen leke önleyici ajan olarak kullanılan kojik asit, tirozinazın aktif bölgesinde bakır iyonları ile şelat oluşturarak melanin sentezini inhibe ederek azaltmıştır. Ayrıca kojik asit gibi yapılar tetrazollerde de olduğu gibi heterosiklik yapılardır. Bu bilgiden yola çıkılarak yeni bir yöntemle sentezlenen tetrazol fragmanlarını içeren bileşiklerle bir metalloenzim olan tirozinaz enzimin aktivasyonunu göstermek bu çalışmanın hedefleri arasındadır. Daha önce bu gibi bileşiklerin enzimin aktif bölgesindeki iki bakır atomuyla etkileşime girebileceği gösterilmiştir. Ayrıca FDA tarafından onaylanan birçok ilacın yapısında bulunan tetrazol parçalarının biyogüvenlik açısından güvenilir olduğu kanısına varılabilir. Bu bilgiler ışığında biyolojik aktif moleküller olan 5-sübstitüe-1H-tetrazollerinde de tirozinaz aktivitesi gösterebileceği düşünülmüştür. Literatürde tetrazollerin tirozinaz enzimini inhibe edebildiğine dair sınırlı sayıdaki çalışma mevcuttur. Tetrazol fragmanları içeren moleküllere yönelik çalışmalarda, tirozinaz inhibitörlerinin tasarım sürecinde çoğunlukla moleküler yerleştirme modelleme çalışmaları yapılmıştır.

Literatürde en bilinen inhibitör olan hidroksikinon gibi fenolik moleküllerin alternatif azol türevlerinin (diazol, triazol vb.) potansiyel tirozinaz inhibitör aktivite gösterebileceğine dair moleküler yerleştirme modellemelerin yapıldığı *in siliko* çalışmalar olası potansiyel inhibitörleri sentezlemek amacıyla yakın zamanda yapılmıştır [2], [62].

Literatürde tez kapsamında belirlediğimiz 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlere en yakın bileşikler tarandığında Joonhyeok Choi ve çalışma arkadaşlarının *in siliko* çalışması göze çarpmıştır. Joonhyeok Choi ve çalışma arkadaşların yapı tabanlı sanal tarama tahmini çalışmalarına göre; tetrazol ve triazol parçalarını içeren bileşikleri, dikopper katalitik merkezi ile etkileşime giren yeni bağlayıcı çekirdekler olarak tanımlamışlardır. Triazol ve tetrazol fonksiyonel parçaların potansiyel bir tirozinaz enzim inhibitörü olarak melanin oluşumunda yer alan oksidasyon sürecini inhibe edebileceği vurgulanmıştır (Şekil 2.13) [63].

Ancak çok az sayıda çalışma bir adım daha ileri giderek mantar tirozinazına karşı *in vitro* inhibitör potansiyellerini araştırdı. Rabia ve arkadaşları sentezledikleri 1,3-oksazin-tetrazol hibritlerin tirozinaz inhibisyon sergilediğini moleküler yerleştirme analizi ile gösterilmiştir ve bunların mantar tirozinazına karşı inhibitör potansiyelleri *in vitro* çalışmalarla doğrulanmıştır (Şekil 2.13) [64].



Şekil 2.13. Tirozinaz inhibitörü olan BMN ve tetrazol türevler.

B. Lee ve arkadaşları tarafından sentezlenen BMN türevler insan deri modeli B16F10 hücrelerinde alfa-melanosit uyarıcı hormon kaynaklı melanin birikimini toksisiteye neden olmadan azalttığını bildirmişlerdir. BMN türevleri tetrazol sentez aşamasında bir ara ürün olarak karşımıza çıkmaktadır (Şekil 2.13) [65].

Sonuç olarak literatürdeki çalışmalar gözden geçirildiğinde 5-süstitüe-1H-tetrazol türevlerinin anti-melanojenik ve anti-tirozinaz aktivite sergileme potansiyelinin oldukça yüksek olduğu görülmektedir. Daha çok moleküler modelleme çalışmalarına konu olan tetrazol türevleri yeni çalışmalar için umut vadeden potansiyel moleküllerdir.

#### 1.4. MOLEKÜLER YERLEŞTİRME ÇALIŞMALARI

Aktif bir bileşiğin hedef proteinine bağlanma mekanizması *in vitro* ve *in vivo* yaklaşımların yanı sıra moleküler yerleştirme simülasyonu gibi *in siliko* yaklaşımlar kullanılarak da incelenebilir. Moleküler yerleştirme bir protein-ligand kompleksinin olası bağlanma yapısını, bağlanma modunu ve bağlanma kalıntılarını tahmin etmeyi

sağlayan bilgisayar destekli hesaplama yöntemidir. Temel olarak, moleküler yerleştirme, ligandın protein bağlama bölgesine geometrik olarak uyan molekülü bulmamızı sağlar. İnhibitörlerin geliştirilmesindeki amaçta belirli bir hedef proteine güçlü bir şekilde bağlanabilen bir molekül bulmaktır. Böylece proteini inhibe etme potansiyeline sahip hedefe en yakın olası ligand bulunabilir. Ligandın bir protein molekülüne bağlanma gücü, bağlanma sürecindeki serbest enerji değişimi tarafından yönetilir [66]. MolDock puanlamada hidrojen bağı dikkate alınmaktadır [67].

### **1.5. ADME ÖZELLİKLERİNİN TAHMİNİ**

Absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon (ADME) özellikleri, bileşiklerin vücuda alındıktan hedef proteinine ulaşmasına sürecinde elimine edilme yeteneğini açıklamaya yönelik tahminde bulunur. İlaç tasarımı hesaplamalı yaklaşım, küçük molekülü ilaç adaylarının özelliklerini belirlemek amacıyla Lipinski ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Lipinski'ye göre bir molekülün ilaç adayı olabilmesi için beş kriteri karşılaması gerekir: Toplam hidrojen bağ vericisi sayısı 5'ten büyük olmamalı, toplam hidrojen bağ alıcısı 10'dan büyük olmamalı, moleküler ağırlık 500 g/mol altında olmalı ve log P değeri 5'ten küçük olmalıdır [68]. Oral ilaç olma olasılığı olan aktif bileşiklerin fizikokimyasal özelliklerin değerlendirilmesi ilaçların keşif ve geliştirmesi aşamasında numune erişimi sınırlı olan maddeler için önemli hale gelmiştir [69].

### **1.6. KOZMETİK ÜRÜNLERE UYGULANAN TESTLER**

Kozmetik ürünler, steril olmayan farmasötik ürünler grubuna dahil olduğundan kozmetik ürün içeriğinde bulunan maddeler, mineraller, su, sıcaklık, pH gibi parametreler kontamisyona neden olmaktadır. Koku, gaz oluşumu, renk ve ürün viskozitesinde değişiklik mikroorganizma üremesine bağlı olarak üründe kontaminasyonun göstergesi olabilir. Ürün güvenliği testleri ile kozmetik ürünlerin tüketici tarafından kullanılmasıyla ilgili bozulma veya enfekte olma gibi güvenlik sorunlarının üstesinden gelmeyi amaçlamaktadır. Bu doğrultuda mikrobiyolojik testler, kimyasal kirlenme testi, koruyucu etkinlik testi, ürün stabilite testi, ürün performans testleri yapılmaktadır.

T.C. Sağlık Bakanlığı Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu (TİTCK)'nin Kozmetik Yönetmeliği'nde 'bir kozmetik ürünün güvenli olduğunu göstermek amacıyla bir

güvenlilik değerlendirmesinin yapılmasını ve ürüne ilişkin güvenlik raporunun düzenlenmesi zorunlu kılınmıştır. Bitmiş kozmetik üründe insan sağlığı için güvenlik değerlendirme raporunda yapılması gereken testlere dair gerekli koşullar şöyle sıralanmaktadır: Kozmetik ürünün kantitatif ve kalitatif bileşimi, kozmetik ürünün fiziksel ve kimyasal özellikleri buna bağlı olarak makul öngörülebilir depolama koşulları altında kozmetik ürünlerin stabilitesi, kozmetik ürünün mikrobiyolojik spesifikasyonları ve kalitesini ortaya koyan koruyucu tarama-zorlama (challenge test) testleri, kozmetik ürün maruziyeti ve içeriğin toksikolojik profili dikkate alınarak kozmetik güvenlik raporu hazırlamak yönetmelik gereği zorunludur. Ayrıca testler İyi Laboratuvar Uygulamaları Prensiplerine göre uluslararası standartlara uygun olarak yapılması gerektiği yönetmelikte bildirilmiştir. Bitmiş ürüne yapılan testlerde, kozmetik ürünlerin 1 gr ya da 1 mL'sinde patojen olmayan mikroorganizma (Bakteri, küf, maya) oranları Avrupa standartlarında ISO 17516: 2014'e göre belirlenmiş limitler dahilinde yönetmelikte bildirildiği gibi kabul edilmiştir (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Kozmetik ürünlerdeki mikrobiyolojik limitler.

Mikroorganizma Tipi	Kategori 1	Kategori 2
Toplam aerobik mezofilik mikroorganizma (Bakteri+küf+maya)	$\leq 1 \times 10^2$ cfu/ g veya mL <sup>a</sup>	$\leq 1 \times 10^3$ cfu/ g veya mL <sup>b</sup>
<i>Escherichia coli</i>	1 g ve mL'de bulunmamalı	1 g ve mL'de bulunmamalı
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 g ve mL'de bulunmamalı	1 g ve mL'de bulunmamalı
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 g ve mL'de bulunmamalı	1 g ve mL'de bulunmamalı
<i>Candida albicans</i>	1 g ve mL'de bulunmamalı	1 g ve mL'de bulunmamalı
Plak sayım yönteminin doğal değişkenliği nedeniyle, USP-Amerikan Farmakopesi Bölüm 61 veya EP-Avrupa Farmakopesi Bölüm 2.6.12 ye göre, Sonuçların yorumlanması, a> 200 CFU / g veya ml, b> 2000 cfu/g veya ml ise sonuçlar sınır dışı kabul edilir. Not: Sabouraud Dekstroz agarında bakteri kolonileri tespit edildiğinde, antibiyotik içeren Sabouraud Dekstroz agar kullanılabilir.		

Kozmetik ürünlerin stabilitesine ve açıldıktan sonra kullanım süresine ilişkin kılavuzda ve Kozmetik Ürünlerde Güvenlilik Değerlendirmesine İlişkin kılavuzdaki bilgiler doğrultusunda yeni kozmetik ürün testlere tabi tutulur [70]. Yönetmelik gereği kozmetik ürünün özelliği veya etkisinin gerektirdiği durumlarda, kozmetik ürünün sahip olduğu iddia edilen etkiye ilişkin kanıt için ek testlere gerek duyulabilir. Örneğin anti pigmentasyon etki göstermesini beklediğimiz krem formülasyon için anti pigmentasyon *in vitro* ürün testi gerçekleştirilmiştir.

Mikrobiyolojik testler, yeni üretilen ürün içeriğinde kullanılan bileşenlerin kalitesini ve

üretim sürecinin sterilitesini doğrulamak amacıyla, bakteri ve mantarlar da dahil olmak üzere potansiyel olarak zararlı mikrobiyal kirletici maddelerin varlığını değerlendirir.

Tipik olarak gerçekleştirilen mikrobiyolojik testlerin amacı, üretimde kullanılan bileşenlerin kalitesinin yanı sıra üretim sürecinin sterilitesini doğrulamaktır. Tüketicilerin güvenliğinin sağlanması temel amaçtır. Kirletici madde sayımlarının sınırları, geçerlilik düzeyleri ve diğer gereklilikler TİTCK tarafından belirlenmiştir.

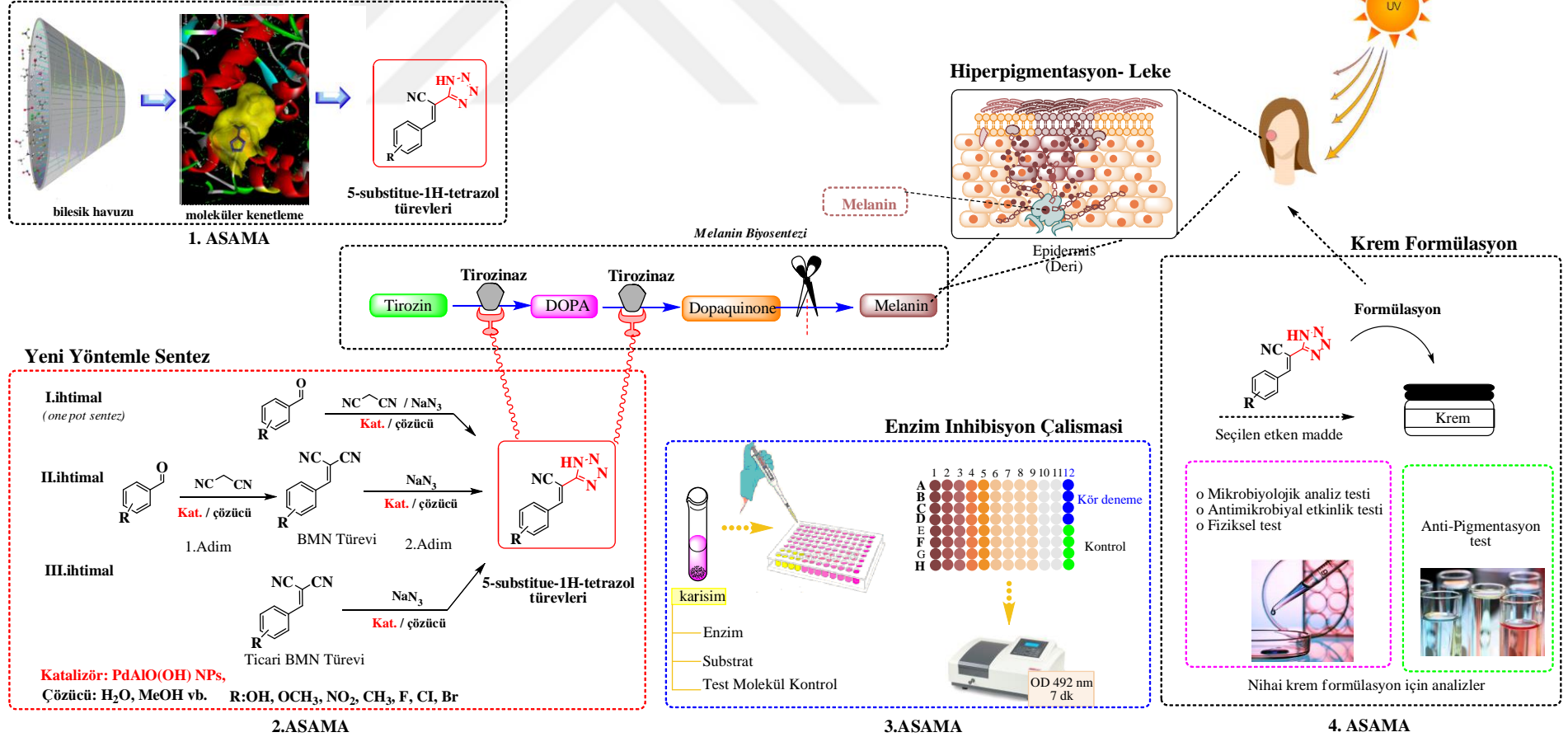
Koruyucu etkinlik testinde, kozmetik ürün numunelerine laboratuvar koşullarında oluşturulan çeşitli bakteri ve mantarlar enjekte edilir ve test süresi boyunca bu kontaminasyona seviyelerine ait sayısal veriler değerlendirilir. Test sonucu mikrobiyolojik kirleticilerin yeniden çoğaldığı tespit edilen kozmetik ürünler için ürün yeniden formüle edilir. Testte değerlendirilen patojenler *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* ve *Aspergillus brasiliensis* gibi mikroorganizmlardır.

Koruyucular genellikle kozmetik preparatlara, ürün tüketici tarafından ilk kez açıldıktan sonra mikrobiyolojik kirleticilerin büyümesini önlemek için eklenir. Kozmetik ürünlerin orijinal ambalajı açılmadan önce normal depolama ve son kullanıcı tarafından tüketimi süresince bozulma veya kontamine olma olasılığına karşı mikrobiyolojik olarak stabil kalması için formüle edilen koruyucu/ların etkinliğinin test edilmesi gerekmektedir.

## 1.7. ÇALIŞMANIN AMACI

Bu çalışmada sentezlenmesi planlanan benzilidenmalononitril (BMN) ve BMN bileşiklerinin türevlendirilmesi ile elde edilen 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevleri de bir ligand gibi davranarak metallerle etkileşime girebilen bileşiklerdir (Şekil 2.14. 2.Aşama). Dolayısıyla 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerinin tirozinaz enziminin aktif bölgesinde yer alan bakır iyonlarıyla etkileşime girebileceği düşünülerek çalışma planlanmıştır. Ayrıca literatürde benzer bileşiklere ait fonksiyonel grupların enzimin farklı bölgeleriyle etkileşime girdiği örnekler de mevcuttur (Şekil 2.14) [57].

## Doking ile tirozinaz enzimine uyumlu tetrazollerin belirlenmesi



Şekil 2.14. Çalışmada izlenen yol.

**1. Aşamada**, sentezlenmesi planlanan 5-sübstitüe-1H-tetrazoller belirlendi ve *in siliko* moleküller modelleme çalışması yapıldı (Şekil 2.14.1.Aşama).

**2. Aşamada**, teorik çalışma sonucu etkinliği yüksek olan bileşikler arasından seçilen 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevinin sentezine yönelik yöntem geliştirildi. Bu sentezlerde üç ihtimal belirlendi (Şekil 2.14.2.Aşama).

*I. İhtimal:* Aril aldehit türevleri kullanılarak tek adımda 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevleri sentezlemek,

*II. İhtimal:* Önce benziliden malononitril türevleri sentezlenip saflaştırıldıktan sonra 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerini elde etmek,

*III. İhtimal:* Ticari olarak temin edilecek benziliden malononitril türevleri kullanılarak 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevleri sentezlemek.

Öncelikli olarak *I.İhtimal* denendi. Bileşiklerin sentezleri başarılı bir şekilde gerçekleştirildi. Ayrıca *II. ihtimalin* ilk adımı olan BMN türevlerinin sentezleri de gerçekleştirildi.

Bu çalışmada, multi-component domino reaksiyonların (MDR) *one-pot* prosesi için bir heterojen katalizör alüminyum oksit-hidroksit-destekli Pd nanopartikülü Pd/AlO(OH) nanoparçacıkları (NP'ler) kullanıldı. Boehmit nanopartikül (alüminyum hidroksit) destekli bu katalizörler yüzeyinde yüksek yoğunluklu hidroksil grupları içeren stabil yapıya sahiptir. Ayrıca bu destekleri içeren katalizörler biyolojik olarak yüksek verimli aktif bileşikler üretmek için elverişlidir [49]. Ticari ölçekteki sentezler düşünüldüğünde kolayca erişilebilen bu ticari katalizör (Pd/AlO(OH) NPs) geri kazanılabilir ve yeniden kullanılabilir olduğu için tercih edilmiştir [71]. Pd nanopartiküllerinin oksit-hidroksit içerisine gömülmesi ile yüzey alanı büyümüş ve katalizör gücü artmıştır. Tez çalışmasında da kullanılan Pd/AlO(OH) nanopartiküller çözücü içermeyen koşullar altında bile oda sıcaklığında yüksek seçicilik ve reaktivite göstermiştir.

Sentezlerde Pd/AlO(OH) NPs katalizörü çalışmanın en önemli unsurudur ve sentezin özgünlüğünü ortaya koymaktadır. Literatürde, Pd/AlO(OH) nanopartiküller bu tez çalışmasının dışında da benzil alkollerin oksidasyonu [72], aril halojenürlerin dehalojenasyonu [73-75], çapraz kenetlenme reaksiyonu [76], aril aldehitlerden knoevenagel yoğunlaşması ile benzilidenmalononitril (BMN) türevlerinin sentezi [71], azidoarenlerin anilin türevlerine dönüştürülmesi [77], birincil aminlerin rasemizasyonu

[78], aromatik/alifatik nitro bileşiklerinin birincil aminlere indirgenmesi [79], anilinin *N*-arilasyonu [80], akrindion türevlerinin *one-pot* multi-component sentezi [81], olefinik hidrojenasyon ve aerobik alkol oksidasyonu [82] için başarıyla uygulanmıştır.

Bu tez çalışmasında ise ilgili katalizörün etkisinde oda şartlarında, düşük sıcaklıkta, kısa reaksiyon sürelerinde, MeOH ve/veya su vb. gibi çözücü ortamlarında denemeler yapıldı.

Sentezlenen yapılar  $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ -NMR analizi ile karakterize edildi.

**3. aşamada**, ikinci aşamada sentezlenen moleküllere *in vitro* testler yapıldı. Sonuçlardan elde edilen  $\text{IC}_{50}$  değerlerine göre kozmetik formülasyonda en etkin inhibitör etkinliği gösteren bileşik tespit edildi. Krem formülasyon için etken madde belirlendi. Ayrıca *in vitro* enzim çalışmasıyla tespit edilen en yüksek inhibisyon gösteren iki bileşik için moleküler docking çalışması ile enzim-ligand etkileşimleri moleküler seviyede daha ayrıntılı incelenerek BOILED-Egg model, biyoyararlanım radarı gibi diğer bilgisayarlı destekli *in silico* çalışmalarla birlikte yorumlandı ve moleküllerin ilaç benzerlik ve farmakokinetik göstergelerine dair ADME özellikleri için tahminlerde bulunuldu. (Şekil 2.14.3.Aşama).

**4. aşamada**, etkinliği yüksek olan 5-süstitüe-1H-tetrazol türevi için krem formülasyon çalışmaları yapıldı. Formülasyon çalışmaları sonucunda elde edilen ürünün akredite laboratuvarlarda mikrobiyolojik analiz, antimikrobiyal koruyucu etkinlik testi, fizikokimyasal analiz ve anti-pigmentasyon (beyazlatıcı etki) testi yapıldı ve nihai ürün için uygun formülasyon belirlendi (Şekil 2.14.4.Aşama).

## 2. MATERYAL VE YÖNTEM

### 2.1. MATERYAL

Bileşiklerin sentez çalışmalarında kullanılan kimyasal maddeler; Pd/AlO(OH) NPs (1), CH<sub>2</sub>(CN)<sub>2</sub> (2), NaN<sub>3</sub> (3), aldehitler, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HCl çözeltisi ve diğer çözücüler Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından satın alındı. Tüm çalışmalarda kullanılan n-hekzan (%96), etil asetat(%99,5), diklorometan(%99,9), etil alkol(%99,9), metil alkol(%99,8) gibi çözücüler herhangi bir işleme tabi tutulmadan doğrudan kullanıldı.

Sentezlerle ilgili tüm katı maddeler “RADWAG” marka Elektronik Terazide 0,0001 g’lık hassasiyet ile ölçüldü. Gerektiği taktirde katı maddeler “ISO LAB Laborgerate GmbH” marka ultrasonik banyo ile çözüldü. Reaksiyonlar 25 mL’lik balon jocularde “SCIOLOGEX” marka manyetik karıştırma ısıtıcıları kullanılarak geri soğutucu altında gerekli şartlar sağlanarak gerçekleştirildi. Reaksiyonların ilerlemesi, Silika jel 60 F254 kaplanmış alüminyum plakalar (merck) kullanılarak ince tabaka kromatografisi (İTK) ile kontrol edildi. Mobil faz olarak etil asetat-hekzan (1:4) karışımı kullanıldı. Ürünlerin oluşumu İTK plakalar üzerinde 254-366 nm dalga boyları aralığında bir UV lambası (CAMAG) ve kabin altında incelenerek gözlemlendi. Reaksiyon sonunda reaksiyon karışımını çöktürmek amacıyla “Elektro-mag M815M” marka santrifüj cihazı kullanıldı. 48 °C’de, 1300 W’de “Heidolph” marka evaporatör cihazı kullanılarak ürün izolasyon çözücülerinden ayrıştırıldı. Katı bileşikler için erime noktası tayinleri “STUART SMP40” marka erime noktası cihazı kullanılarak gerçekleştirildi. Proton ve karbon-13 NMR spektrumları, Giresun Üniversitesi GRÜMLAB’da “Bruker AVANCE III 400 MHz NMR” spektrometresi (proton için 400 MHz ve karbon için 100 MHz) kullanılarak oda sıcaklığında alındı. Kimyasal kaymalar ( $\delta$ ), TMS (Tetrametilsilan) dahili standardına göre milyon başına parça (ppm) cinsinden rapor edildi. Çözücü olarak DMSO-d<sub>6</sub> kullanıldı. Etkileşme sabitleri (J değerleri) hertz (Hz) cinsinden rapor edildi. Proton spektrumlarındaki bölünme modelleri tekli (s), geniş tekli (bs), ikili (d), ikililerin ikilisi (dd), dörtlülerin ikilisi (dq), üçlü (t), dörtlü (q) ve çoklu olarak sınıflandırıldı. FT-IR spektrumları, Attenuated Total Reflection (ATR) yöntemiyle bir “Agilent Technologies Cary 630 FTIR Attenuated Total Reflection” FT-IR

spektrometresi kullanılarak 400-3750 cm<sup>-1</sup> aralığında kaydedildi.

Tirozinaz enzimi (mantar tirozinaz enzimi), enzim substratı (L-DOPA), tampon çözeltisi için kullanılan disodyum hidrojen fosfat dodekahidrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.12H<sub>2</sub>O) ve sodyum fosfat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), NaCl, etanol, metanol, HCl, DMSO Sigma-Aldrich'ten temin edildi. Enzim çalışmaları için tüm maddeler "RADWAG AS220 R2" analitik hassas terazi ile ölçülmüştür. GLF saf su cihazı, pH Metre, VELP TX4 Digital Vortex Mixer, Biotek Epoch2 spektrofotometre-multiplate reader, otomatik pipet, 96 kuyucuklu plate ise enzim çalışmalarında kullanılan diğer ekipman veya cihazlardır.

*İn siliko* çalışmalarda moleküler yerleştirme (Moleküler Docking) çalışması Molegro Virtual Docker programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. RCSB Protein Data Bank'tan Tropolon ile kristalize edilen *Agaricus bisporus* tirozinazının X-ışını kristal yapısı, (2Y9X) elde edildi. Bileşiklerin üç boyutlu (3D) yapıları, MarvinSketch programı kullanılarak oluşturuldu. Protein, Molegro Virtual Docker programına aktarıldı. Discovery Studio 2021 İstemcisinde bileşiklerin enzimle etkileşim ayrıntılarını incelendi. *İn siliko* ADME özellikleri ise SwisADME çevrimiçi aracını kullanarak değerlendirildi.

Krem formülasyon çalışmalarında kullanılan Cosmedia® Ace, Eumulgin SG, Gliserin, Cetiol® C, Nipaguartd SCE, papatya yağı, esans gibi tüm kimyasal ve yardımcı maddeler Sigma-Aldrich ve BASF firmalarından temin edildi.

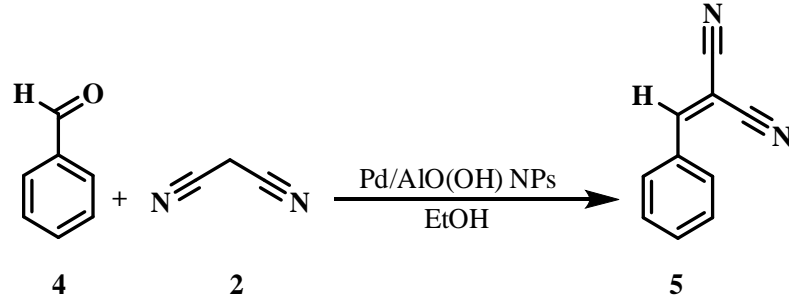
Krem formülasyon için yapılan anti-pigmentasyon testlerinde ATCCD'den temin edilen insan epidermal melanosit hücre hattı (Primary Epidermal Melanocytes; Normal, Human, Adult (HEMA) PCS-200-013™) ve %10 FBS ve %2 glutamin ile desteklenmiş DMEM (ATCC Kat No:30-2006) özel besiyeri kullanıldı. Örneklere ait absorbans değerleri Thermo Fisher, multiscan FC microplate reader Eliza kit okuyucuda 450 nm absorbansda alınarak değerlendirilme yapıldı.

Elde edilen nihai krem formülasyon testleri (mikrobiyolojik, antimikrobiyal koruyucu aktivite, fizikokimyasal) için hizmet alımı gerçekleştirilmiştir.

## 2.2. YÖNTEM

### 2.2.1. Benzilidenmalononitril Türevlerin Sentezi

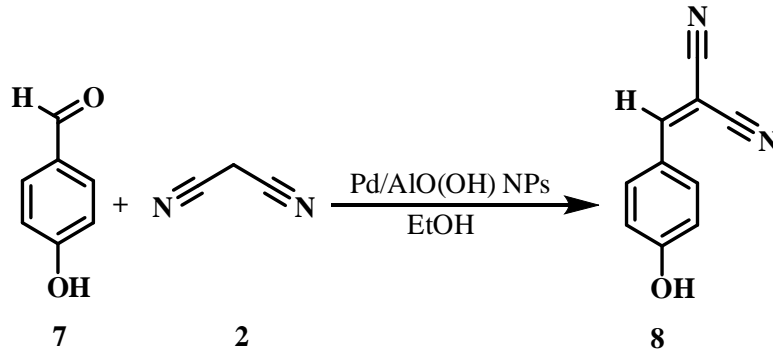
#### 2.2.1.1. 2-benzilidenmalononitril (5) Sentezi



Şekil 2.1. Benzaldehit (4)'ten 2-benzilidenmalononitril (5) sentezi.

Benzaldehit (4) (1 mmol; 0,1016 mL; 106,12 g/mol; 1,044g/mL), malononitril (2) (2 mmol; 0,1321g, 66,06 g/mol) ve 30 mg Pd/AIO(OH) NPs (1) katalizör 10 mL etanolde 78 °C'de kum banyosunda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (n-hekzan–EtOAc, 4:1) ile izlenen reaksiyon 2 saatte tamamlandı. Reaksiyon karışımı santrifüj edildi ve katalizör reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Ham ürün etil asetat-hekzan (1:4) çözücü karışımında silika-jel kolonda saflaştırıldı. Ürün %95 üzerinde verimle elde edildi. 2-benzilidenmalononitril(5)'in DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı.

#### 2.2.1.2. 2-(4-hidroksibenziliden)malononitril (8) Sentezi

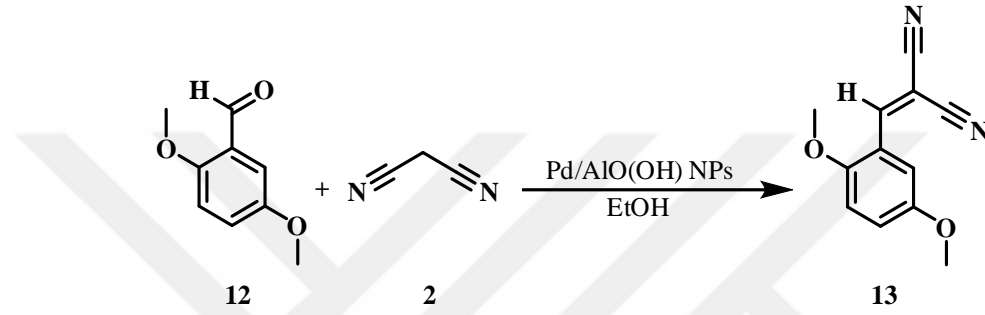


Şekil 2.2. 4-hidroksibenzaldehit (7)'den 2-(4-hidroksibenziliden)malononitril(8) sentezi.

4-hidroksibenzaldehit (7)(1 mmol; 0,1221 g; 122,12 g/mol), malononitril (2) (2 mmol, 0,1321g; 66,06 g/mol) ve 30 mg Pd/AIO(OH) NPs (1) katalizör 10 mL etanolde 78

°C’de kum banyosunda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (n-heksan–EtOAc, 4:1) ile izlenen reaksiyon 2 saatte tamamlandı. Reaksiyon karışımı santrifüj edildi ve katalizör reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Ham ürün etil asetat-hekzan (1:4) çözücü karışımında silika-jel kolonda saflaştırıldı. Ürün %95 üzerinde verimle elde edildi. 2-(4-hidroksibenziliden)malononitril (8)’in DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı.

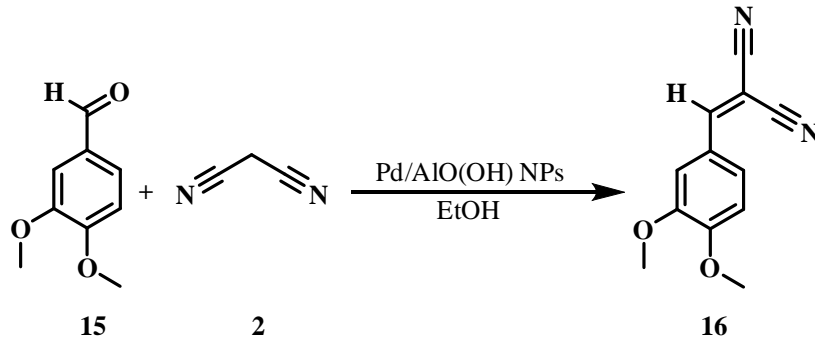
### 2.2.1.3. 2-(2,5-dimetoksibenziliden)malononitril (13) Sentezi



Şekil 2.3. 2,5-dimetoksibenzaldehyt (12)’den 2-(2,5-dimetoksibenziliden)malononitril (13) sentezi.

2,5-dimetoksibenzaldehyt (12) (1 mmol; 0,1661 g; 166,17g/mol), malononitril (2) (2 mmol; 0,1321g; 66,06 g/mol) ve 30 mg Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör 10 mL etanolde 78 °C’de kum banyosunda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (n-heksan–EtOAc, 4:1) ile izlenen reaksiyon 3 saatte tamamlandı. Reaksiyon karışımı santrifüj edildi ve katalizör reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Ham ürün etil asetat-hekzan (1:4) çözücü karışımında silika-jel kolonda saflaştırıldı. Ürün %95 üzerinde verimle elde edildi. 2-(2,5-dimetoksibenziliden)malononitril (13)’ün DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı.

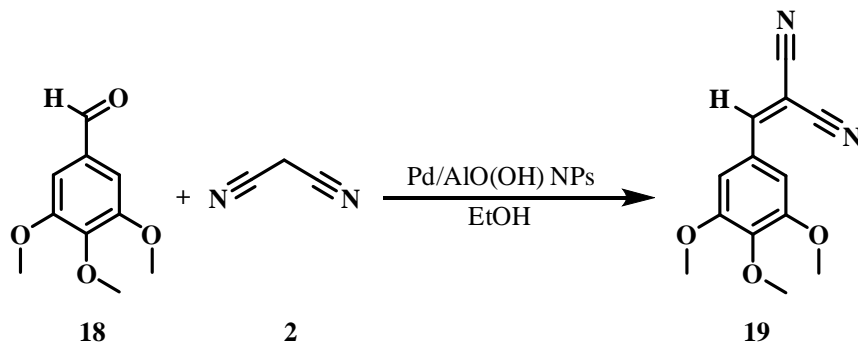
#### 2.2.1.4. 2-(3,4-dimethoksibenziliden)malononitril (16) Sentezi



Şekil 2.4. 3,4-dimetoksibenzaldehit (15)'ten 2-(3,4-dimethoksibenziliden)malononitril (16) sentezi.

3,4-dimetoksibenzaldehit (15) (1 mmol; 0,1661 g; 166,17g/mol), malononitril (2) (2 mmol; 0,1321g; 66,06 g/mol) ve 30 mg Pd/AIO(OH) NPs (1) katalizör 10 mL etanolde 78 °C'de kum banyosunda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (n-hekzan-EtOAc, 4:1) ile izlenen reaksiyon 2 saatte tamamlandı. Reaksiyon karışımı santrifüj edildi ve katalizör reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Ham ürün etil asetat-hekzan (1:4) çözücü karışımında silika-jel kolonda saflaştırıldı. Ürün %95 üzerinde verimle elde edildi. 2-(3,4-dimethoksibenziliden)malononitril (16)'nın DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı.

#### 2.2.1.5. 2-(3,4,5-trimetoksibenziliden)malononitril (19) Sentezi

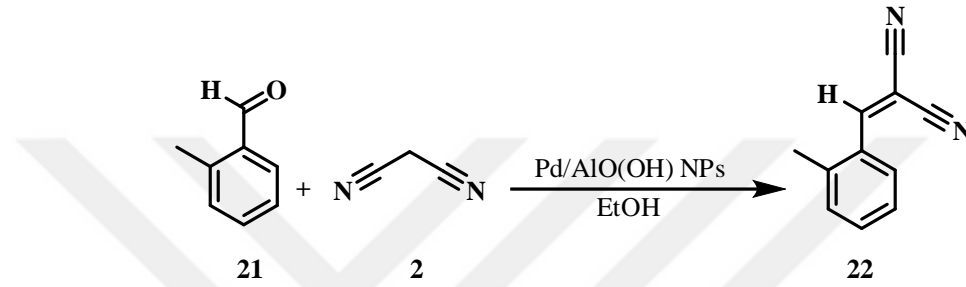


Şekil 2.5. 3,4,5-trimetoksibenzaldehit (18)'den 2-(3,4,5-trimetoksibenziliden)malononitril (19) sentezi.

3,4,5-trimetoksibenzaldehit (18) (1 mmol; 0,1962 g; 196,20g/mol), malononitril (2) (2 mmol, 0,1321g; 66,06 g/mol) ve 30 mg Pd/AIO(OH) NPs (1) katalizör 10 mL

etanolde 78 °C’de kum banyosunda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (n-heksan–EtOAc, 4:1) ile izlenen reaksiyon 3 saatte tamamlandı. Reaksiyon karışımı santrifüj edildi ve katalizör reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Ham ürün etil asetat-hekzan (1:4) çözücü karışımında silika-jel kolonda saflaştırıldı. Ürün %95 üzerinde verimle elde edildi. 2-(3,4,5-trimetoksibenziliden)malononitril (19)’un DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı.

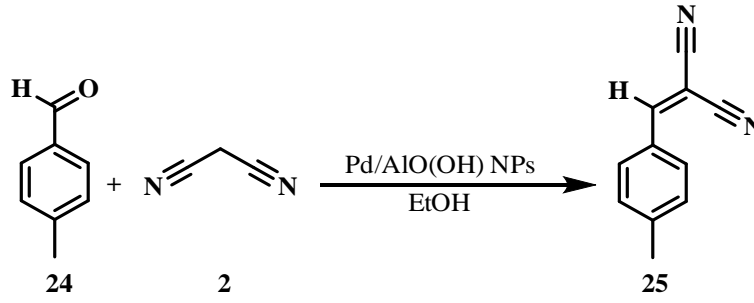
#### 2.2.1.6. 2-(2-metilbenziliden)malononitril (22) Sentezi



Şekil 2.6. 2-metilbenzaldehit (21)’den 2-(2-metilbenziliden)malononitril (22) sentezi.

2-metilbenzaldehit (21) (1 mmol; 0,1156 mL; 120,15 g/mol; 1,039 g/mL), malononitril (2) (2 mmol; 0,1321g; 66,06 g/mol) ve 30 mg Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör 10 mL etanolde 78 °C’de kum banyosunda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (n-heksan–EtOAc, 4:1) ile izlenen reaksiyon 3 saatte tamamlandı. Reaksiyon karışımı santrifüj edildi ve katalizör reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Ham ürün etil asetat-hekzan (1:4) çözücü karışımında silika-jel kolonda saflaştırıldı. Ürün %95 üzerinde verimle elde edildi. 2-(2-metilbenziliden)malononitril (22)’nin DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı.

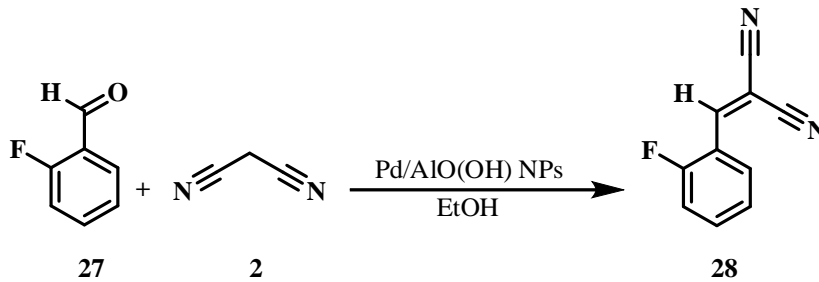
### 2.2.1.7. 2-(4-metilbenziliden)malononitril (25) Sentezi



Şekil 2.7. 4-metilbenzaldehyd (24)'den 2-(4-metilbenziliden)malononitril (25) sentezi.

4-metilbenzaldehyd (24) (1 mmol; 0,1101 g; 120,15 g/mol; 1,091 g/mL), malononitril (2) (2 mmol; 0,1321g; 66,06 g/mol) ve 30 mg Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör 10 mL 78 °C'de kum banyosunda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (n-heksan–EtOAc, 4:1) ile izlenen reaksiyon 2 saatte tamamlandı. Reaksiyon karışımı santrifüj edildi ve katalizör reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Ham ürün etil asetat-hekzan (1:4) çözücü karışımında silika-jel kolonda saflaştırıldı. Ürün %95 üzerinde verimle elde edildi. 2-(4-metilbenziliden)malononitril (25)'in DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı.

### 2.2.1.8. 2-(2-fluorobenziliden)malononitril (28) Sentezi

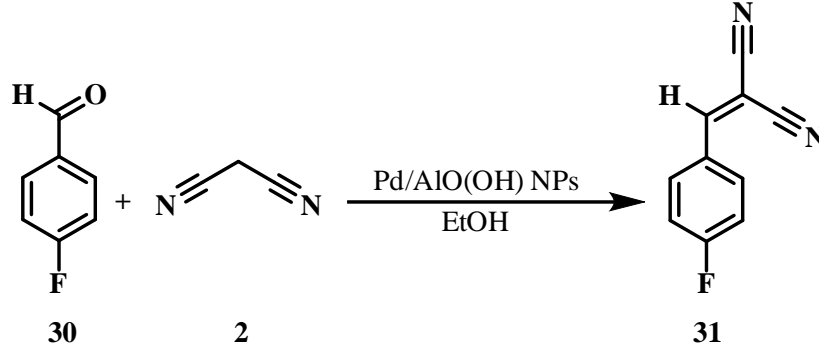


Şekil 2.8. 2-fluorobenzaldehyd (27)'den 2-(2-fluorobenziliden)malononitril (28) sentezi.

2-fluorobenzaldehyd (27) (1 mmol; 0,1054 mL; 124,11 g/mol; 1,178 g/mL), malononitril (2) CH<sub>2</sub>(CN)<sub>2</sub> (2 mmol; 0,1321g; 66,06 g/mol) ve 30 mg Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör 10 mL etanolde 78 °C'de kum banyosunda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (n-heksan–EtOAc, 4:1) ile izlenen reaksiyon 24 saatte tamamlandı. Reaksiyon karışımı santrifüj edildi ve katalizör reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Ürün %95 üzerinde verimle elde edildi. Ham ürün etil asetat-hekzan (1:4) çözücü karışımında

silika-jel kolonda saflaştırıldı. 2-(2-fluorobenziliden)malononitril (28)'in DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı.

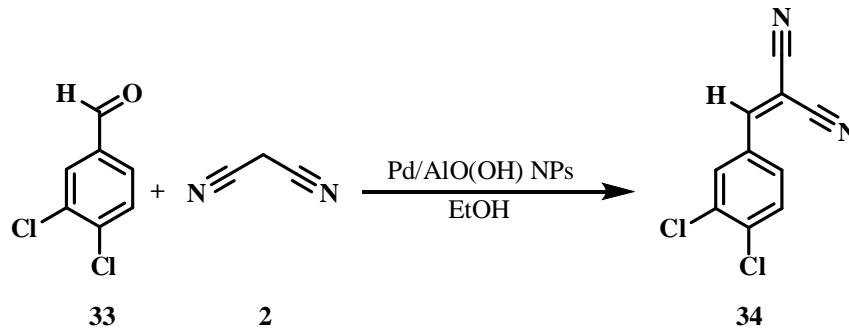
#### 2.2.1.9. 2-(4-fluorobenziliden)malononitril (31) Sentezi



Şekil 2.9. 4-fluorobenzaldehyt (30)'dan 2-(4-fluorobenziliden)malononitril (31) sentezi.

4-fluorobenzaldehyt (30) (1 mmol; 0,1073 mL; 124,11 g/mol; 1,157 g/mL), malononitril (2) CH<sub>2</sub>(CN)<sub>2</sub> (2 mmol; 0,1321g; 66,06 g/mol) ve 30 mg Pd/AIO(OH) NPs (1) katalizör 10 mL etanolde 78 °C'de kum banyosunda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (n-hekzan–EtOAc, 4:1) ile izlenen reaksiyon~ 24 saatte tamamlandı. Reaksiyon karışımı santrifüj edildi ve katalizör reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Ürün %95 üzerinde verimle elde edildi. Ham ürün etil asetat-hekzan (1:4) çözücü karışımında silika-jel kolonda saflaştırıldı. 2-(4-fluorobenziliden)malononitril (31)'in DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı.

#### 2.2.1.10. 2-(3,4-diklorobenziliden)malononitril (34) Sentezi

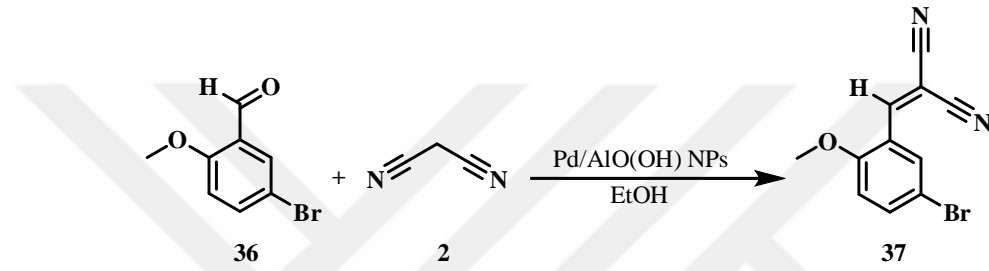


Şekil 2.10. 3,4-diklorobenzaldehyt (33)'den 2-(3,4-diklorobenziliden)malononitril (34) sentezi.

3,4-diklorobenzaldehyt (33) (1 mmol; 0,1750 g; 175,01g/mol), malononitril (2)

(2 mmol; 0,1321g; 66,06 g/mol) ve 30 mg Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör 10 mL etanolde 78 °C’de kum banyosunda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (n-heksan–EtOAc, 4:1) ile izlenen reaksiyon 4 saatte tamamlandı. Reaksiyon karışımı santrifüj edildi ve katalizör reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Ham ürün etil asetat-hekzan (1:4) çözücü karışımında silika-jel kolonda saflaştırıldı. Ürün %95 üzerinde verimle elde edildi. 2-(3,4-diklorobenziliden)malononitril (34)’ün DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı.

#### 2.2.1.11. 2-(5-bromo-2-metoksibenziliden)malononitril (37) Sentezi

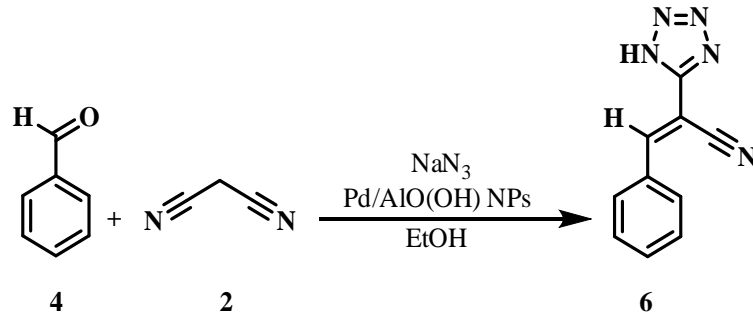


Şekil 2.11. 5-bromo-2-metoksibenzaldehyt (36)’dan 2-(5-bromo-2-metoksibenziliden)malononitril (37) sentezi.

5-bromo-2-metoksibenzaldehyt (36) (1 mmol; 0,2150 g; 215,04 g/mol), malononitril (2) (2 mmol; 0,1321g; 66,06 g/mol) ve 30 mg Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör 10 mL etanolde 78 °C’de kum banyosunda magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (n-heksan–EtOAc, 4:1) ile izlenen reaksiyon 2 saatte tamamlandı. Reaksiyon karışımı santrifüj edildi ve katalizör reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Ham ürün etil asetat-hekzan (1:4) çözücü karışımında silika-jel kolonda saflaştırıldı. Ürün %95 üzerinde verimle elde edildi. 2-(5-bromo-2-metoksibenziliden)malononitril (37)’nin DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı.

## 2.2.2. 5-Süstitüe-1H-Tetrazol Türevlerin Sentezi

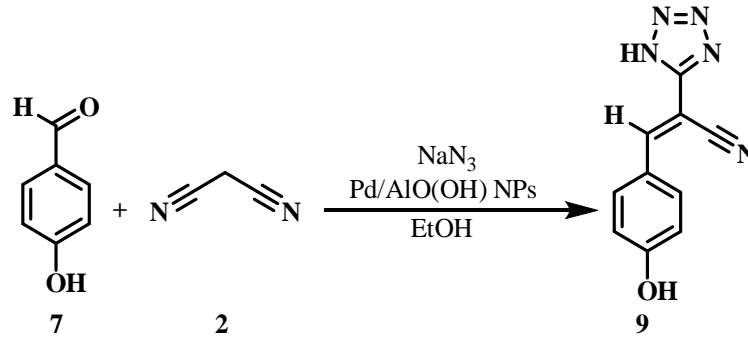
### 2.2.2.1. 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6) Sentezi



Şekil 2.12. Benzaldehit (4)'ten 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6) sentezi.

Benzaldehit (4) (1 mmol; 0,1016 mL; 106,12 g/mol; 1,044g/mL), malononitril (2) (1,1 mmol 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0,0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı ve çözücü uzaklaştırıldı. 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6)'nın DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı ve %95 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

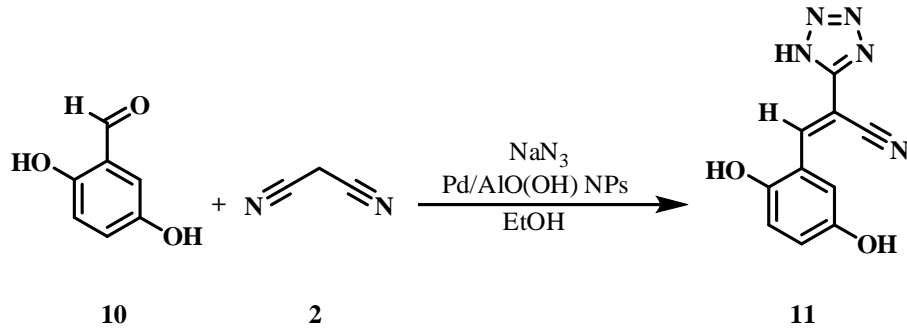
### 2.2.2.2. 3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9) Sentezi



Şekil 2.13. 4-hidroksibenzaldehit (7)'den 3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9) sentezi.

4-hidroksibenzaldehit (7) (1 mmol; 0,1221g; 122,12g/mol), malononitril (2) (1,1 mmol; 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0,0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı ve çözücü uzaklaştırıldı. 3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9)'un DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı ve %95 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

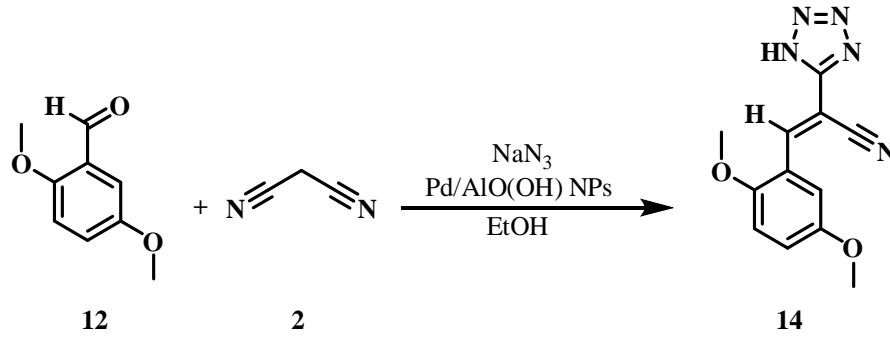
### 2.2.2.3. 3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11) Sentezi



Şekil 2.14. 2,5-dihidroksibenzaldehit (10)'dan 3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11) Sentezi.

2,5-dihidroksibenzaldehit (10) (1 mmol; 0,1382 g; 138,19 g/mol), malononitril (2) (1,1 mmol; 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0,0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı ve çözücü uzaklaştırıldı. 3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11)'in  $\text{DMSO-d}_6$  ile  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları alındı ve %79 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

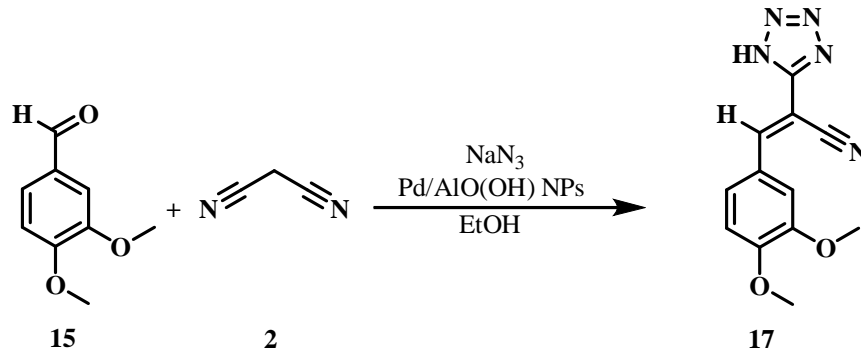
#### 2.2.2.4. 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (14) Sentezi



Şekil 2.15. 2,5-dimetoksibenzaldehit (12)'den 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (14) Sentezi.

2,5-dimetoksibenzaldehit (12) (1 mmol; 0,1662 g; 166,17 g/mol), malononitril (2) (1,1 mmol 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0.0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı ve çözücü uzaklaştırıldı. 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il) akrilonitril (14)'ün DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı ve %73 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

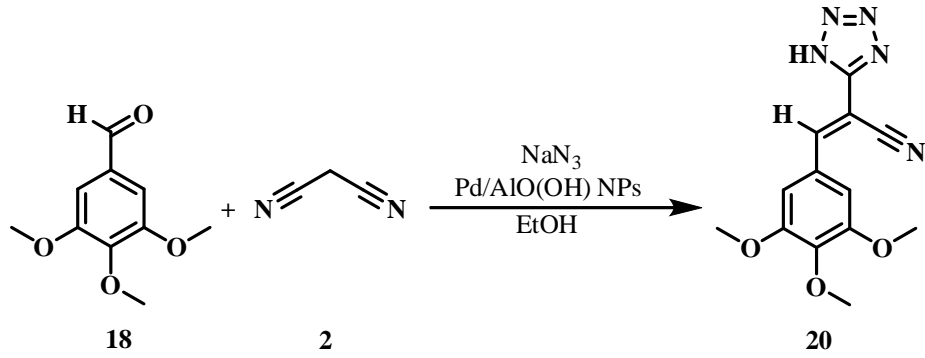
### 2.2.2.5. 3-(3,4-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (17) Sentezi



Şekil 2.16. 3,4-dimetoksibenzaldehit (15)'ten 3-(3,4-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (17) sentezi.

3,4-dimetoksibenzaldehit (15) (1 mmol; 0,1662 g; 166,17 g/mol), malononitril (2) (1,1 mmol; 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0,0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AIO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı ve çözücü uzaklaştırıldı. 3-(3,4-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (17)'nin  $\text{DMSO-d}_6$  ile  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları alındı ve %79 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

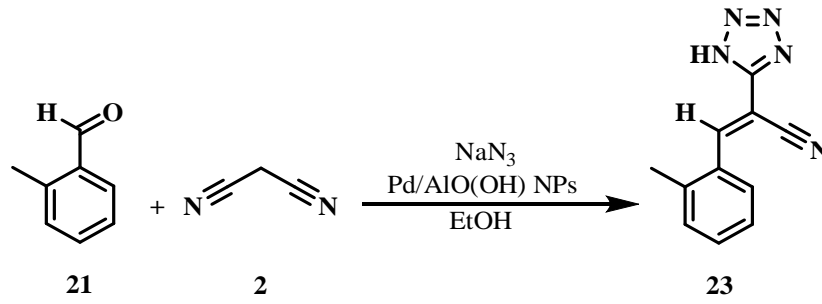
### 2.2.2.6. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)akrilonitril (20) Sentezi



Şekil 2.50. 3,4,5-trimetoksibenzaldehyt (18)'den 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)akrilonitril (20) sentezi.

3,4,5-trimetoksibenzaldehyt (18) (1 mmol; 0,1962 g; 196,20 g/mol), malononitril (2) (1,1 mmol; 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0,0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı ve çözücü uzaklaştırıldı. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)akrilonitril (20)'nin DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı ve %85 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

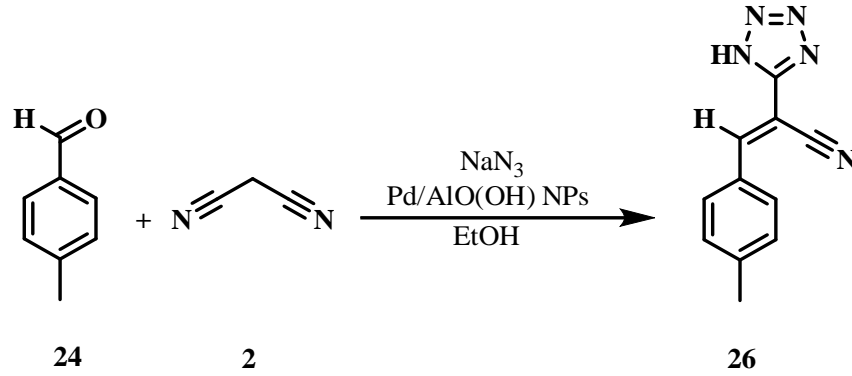
### 2.2.2.7. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23) Sentezi



Şekil 2.17. 2-metilbenzaldehit (21)'den 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23) sentezi.

2-metilbenzaldehit (21) (1 mmol; 0,1156 mL; 120,15 g/mol; 1,039 g/mL), malononitril (2) (1,1 mmol; 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0,0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı ve çözücü uzaklaştırıldı. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23)'ün DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı ve %85 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

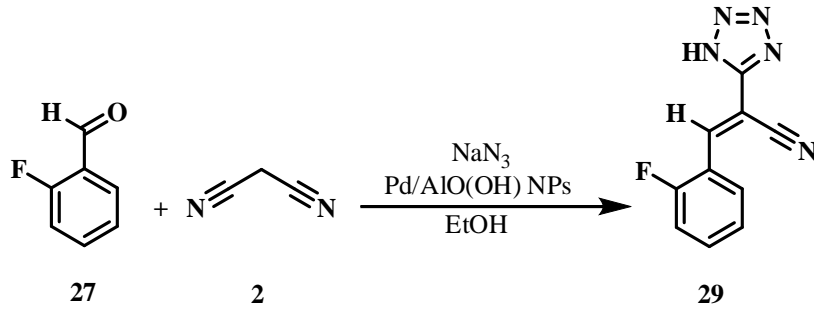
#### 2.2.2.8. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26) Sentezi



Şekil 2.18. 4-metilbenzaldehit (24)'den 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26) sentezi.

4-metilbenzaldehit (24) (1 mmol; 0,1101 mL; 120,15 g/mol; 1,091 g/mL), malononitril (2) (1,1 mmol; 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0,0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı ve çözücü uzaklaştırıldı. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26)'nın DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı ve %73 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

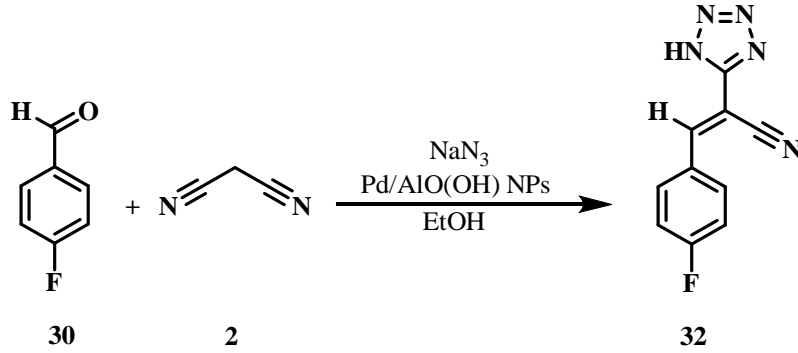
### 2.2.2.9. 3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29) Sentezi



Şekil 2.19. 2-fluorobenzaldehyt (27)'den 3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29) sentezi.

2-fluorobenzaldehyt (27) (1 mmol; 0,1054 mL; 124,11 g/mol; 1,178 g/mL), malononitril (2) (1,1 mmol; 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0,0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı ve çözücü uzaklaştırıldı. 3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29)'un DMSO- $d_6$  ile  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları alındı ve %95 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

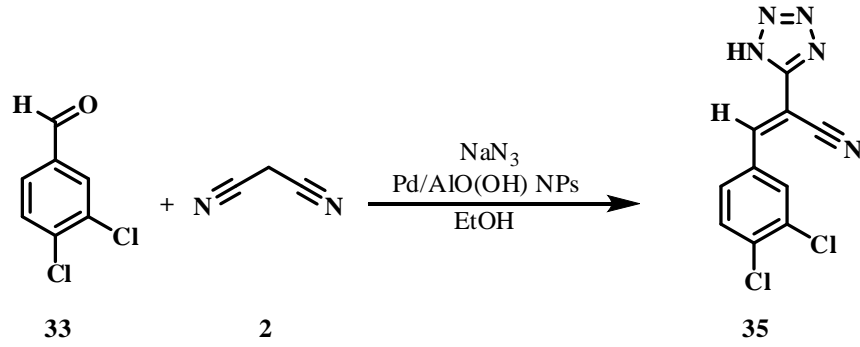
### 2.2.2.10. 3-(4-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (32) Sentezi



Şekil 2.20. 4-fluorobenzaldehit (30)'dan 3-(4-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (32) sentezi.

4-fluorobenzaldehit (30) (1 mmol; 0,1073 mL; 124,11 g/mol; 1,157 g/mL), malononitril (2) 1,1 mmol; 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0,0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı.ve çözücü uzaklaştırıldı. 3-(4-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (32)'nin DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı ve %95 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

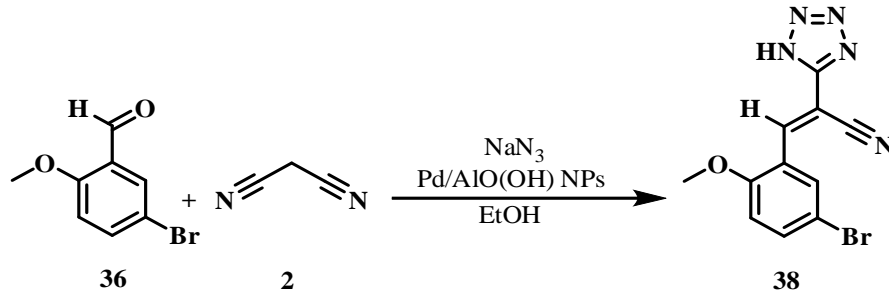
### 2.2.2.11. 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) Sentezi



Şekil 2.21. 3,4-diklorobenzaldehit (33)'den 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) sentezi.

3,4-diklorobenzaldehit (33) (1 mmol; 0,1750 g; 175,01 g/mol), malononitril (2) (1,1 mmol; 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0,0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı. Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı ve çözücü uzaklaştırıldı. 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35)'in DMSO- $d_6$  ile  $^1\text{H}$  NMR ve  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumları alındı ve %72 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

### 2.2.2.12. 3-(5-bromo-2-metoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (38) Sentezi



Şekil 2.22. 5-bromo-2-metoksibenzaldehit (36)'dan 3-(5-bromo-2-metoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (38) sentezi.

5-bromo-2-metoksibenzaldehit (36) (1 mmol; 0,2150 g; 215,04 g/mol), malononitril (2) (1,1 mmol; 0,0727g; 66,06g/mol), sodyum azid (3) (1,2 mmol; 0,0780g; 65,01 g/mol) ve 0,03 g Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör karışımına 10 mL etanol ilave edilerek geri soğutucu altında karıştırıldı. İnce tabaka kromatografisi (İTK) (etil asetat:hekzan, 1:4) ile takip edilen reaksiyon 5 saatte tamamlandı. Reaksiyon ortamından katalizörün uzaklaştırılması için santrifüj işlemi uygulandı. Organik fazlar birleştirildikten sonra üzerine 30 mL, 2 N HCl çözeltisi ilave edilerek şiddetli bir şekilde karıştırıldı. Çökelti oluşumu gözlemlendi. Daha sonra karışım 2 kez 20 mL etilasetat ile work up yapıldı. Ayrılan organik faz susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile kurutuldu. Çözücü evaporatör yardımı ile uzaklaştırıldı Oluşan ürün sırasıyla 10 mL diklorometan ve 10 mL aseton ile iki kez yıkandı. Filtre kağıdında kalan katı kısım 10 mL metanol ile kristallendirilerek saflaştırıldı ve çözücü uzaklaştırıldı. 3-(5-bromo-2-metoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (38)'in DMSO-d<sub>6</sub> ile <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları alındı ve %60 verimle ilgili tetrazolün elde edildiği tespit edildi.

### 2.2.3. 5-Süstitüe-1H-Tetrazol Türevlerin *İn Vitro* ve *İn Siliko* Yöntemlerle İncelenmesi

#### 2.2.3.1. Moleküler Yerleştirme Çalışmaları

Sentezlenen bileşiklerin tirozinaz aktif bölgesi ile olası bağlanma konumlarının anlaşılması amacıyla, Molegro Virtual Docker programı kullanılarak bir moleküler yerleştirme çalışması gerçekleştirildi [83]. Tropolon ile kristalize edilen *Agaricus bisporus* tirozinazının X-ışını kristal yapısı, RCSB Protein Data Bank'tan (2Y9X) elde edildi [84]. Bileşiklerin 3D yapıları, MarvinSketch program kullanılarak oluşturuldu. Protein, Molegro Virtual Docker'a aktarıldı. Kristal yapı, suyu uzaklaştırılarak ve eksik

amino asitleri optimize edilerek yerleştirme için hazırlandı. Küçük moleküller için bağlanma bölgesi, tüm koordinatların hesaplandığı bir referans ligand olarak tropolon (39) seçilerek tanımlandı. Discovery Studio 2021 İstemcisinde etkileşim ayrıntılarını incelemek için her molekül için on yerleştirme denemesi gerçekleştirildi ve en iyi puanlara sahip uyumlar seçildi.

Çalışmamızda insan tirozinazına benzerliğinden dolayı mantar tirozinazı (*Agaricus bisporus*) kullanıldı. Bu özellik onu gıda endüstrisi için enzimatik esmerleşme, kozmetik endüstrisi için hiperpigmentasyona yönelik tirozinaz inhibitörlerinin geliştirilmesi açısından uygun bir model haline getirmektedir.

#### 2.2.3.2. ADME Özelliklerinin Tahmini

Yeni bileşiklerin fizikokimyasal özelliklerinin, farmakokinetiklerinin, ilaca benzerliğinin ve tıbbi kimya uyumunun tahmini için, SwisADME çevrimiçi aracı kullanılarak ADME özellikleri değerlendirildi [85].

#### 2.2.3.3. Tirozinaz İnhibitör Aktivitesi

Tirozinaz inhibe edici aktivite, daha önce bildirilen yöntemlerde olduğu gibi bir mikropate okuyucu kullanılarak 492 nm'de mantar tirozinaz enzimi kullanılarak ölçüldü. Enzim aktivitesi için reaksiyon ortamı (250 mL), 50 mM fosfat tamponunda (pH 6.8) 0.5 mM L-DOPA ve 100 mL farklı konsantrasyonlarda bileşikler içermetedir [86]. Reaksiyon, 37 °C'de 7 dakikalık bir süre boyunca gerçekleştirildi. Bileşikler, 1 mg/mL DMSO içerisinde çözüldürüldü ve uygun konsantrasyona seyreltildi. İnhibitör içermeyen ancak reaksiyon ortamında DMSO içeren kontrollerle ölçümler gerçekleştirildi. Bileşiklerin tirozinaz aktivitesi üzerindeki inhibe edici etkileri, enzim aktivitesinin (IC<sub>50</sub>) %50'sini inhibe eden konsantrasyonlar olarak ifade edildi.

#### 2.2.4. Kozmetik Ürün Formülasyonu ve Testleri

Krem formül içeriği 5-süstitüe-1H-tetrazol türevi için *in vitro* mantar tirozinazına karşı yapılan test sonucu dikkate alınarak formülize edildi. Enzim inhibisyonu en güçlü (IC<sub>50</sub> 45 µM) olan 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) bileşiği krem formülasyonu için etken madde olarak kullanıldı.

Tüm hesaplamalar 100 mL krem için yapılmıştır. IC<sub>50</sub> değerine göre yapılan hesaplamalarla 100 mL kremde kullanılması gereken etken madde 1,2 mg olarak belirlendi (Denklem (2.1)-(2.3)).

$$M = 45 \mu\text{M} = 45.10^{-6} \text{ M} \quad (2.1)$$

$$n = M \cdot V, \quad n = 45.10^{-6} \text{ M} \cdot 0,1\text{L}, \quad n = 4,5.10^{-6} \text{ mol} \quad (2.2)$$

$$m = n \cdot MA \text{ ise } m = 4,5.10^{-6} \text{ mol} \cdot 266,09 \text{ g/mol} = 0,0012 \text{ g} = 1,2 \text{ mg} \quad (2.3)$$

Krem üretimi için 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevinin ve diğer maddelerin oranları tespit edildikten sonra krem formülasyonları oluşturuldu. 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevi haricindeki içerikler grubumuzun önceki çalışmalardaki deneysel tecrübeleri ve literatür destekleri ile hazırlandı. Krem formül içeriği iki faz halinde hazırlanarak etken madde içine dahil edildi.

Çizelge 2.1’de ve krem formülasyonunda etken madde olarak kullanılan 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35)’in ve diğer maddelerin yüzdeleri verilmiştir. IC<sub>50</sub> değerine göre 100 mL krem için tespit edilen etken madde oranı toksik özelliği de dikkate alınarak 10 ila 15 katına kadar kullanılabilir. Formülasyonda tespit edilen etken madde oranının on iki buçuk katı (15 mg) kullanıldı.

Çizelge 2.1. Krem formülasyon çalışması.

	Adı	İçerik	Fonksiyon	Yüzde oran (%)
<b>FAZA</b>	Saf Su	Su	Çözücü	78,00
	Cosmedia® Ace	Sodyum poliakrilat, Dikaprilil karbonat, Poligliseril-3 kaprat	Viskozite Kontrolü	2,00
	Eumulgin SG	Sodyum Stearoil Glutamat	Emülgatör	0,30
<b>FAZB</b>	3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35)	Tetrazol etken maddesi	Etken Madde	0,015
	Gliserin	Gliserin	Nemlendirici	3,00
	Cetiol® C 5	Koko kaprilat	Yumuşatıcı	8,00
	Nipaguard SCE	Sorbitan kaprilat, Propandiol, Benzoik asit	Koruyucu	1,00
	Papatya yağı	Yağ	Yumuşatıcı	5,685
	Esans(narçiçeği)	Esans	Koku	2,00

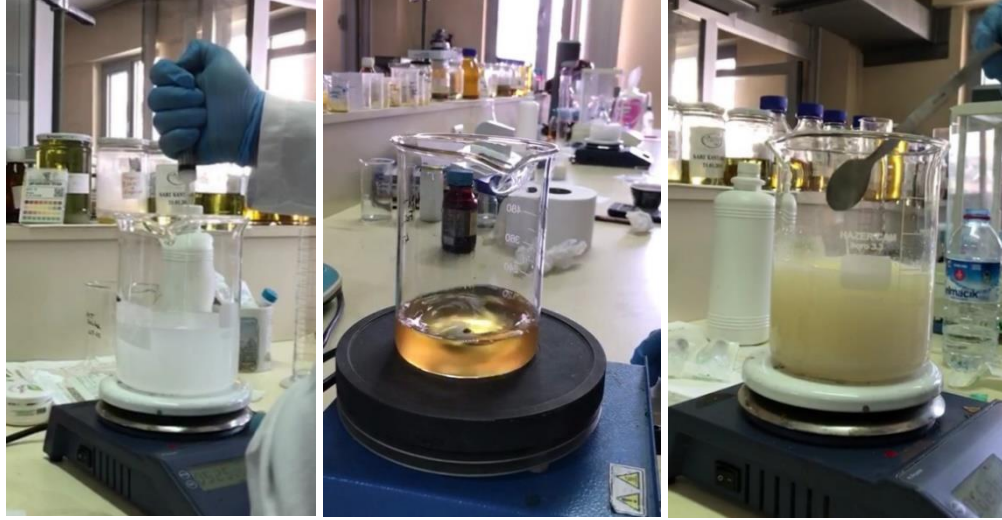
Krem formülasyonda tetrazol (35) etken maddesinin yanısıra, kıvamlaştırıcı, emülgatör, koruyucu gibi farklı doğal içerikler kullanıldı. Formülasyonda gliserin hem nemlendirici özellik gösterir hem de çözücü olarak etkin bir içeriktir. Sodyum poliakrilat, dikaprilil karbonat, poligliseril-3 kaprat bileşenlerinin olduğu karışım kıvamlaştırıcı özelliğinden dolayı kullanıldı. Koko kaprilat, gliserine destek alt katman bir nemlendirici özelliği

göstermesinin yanı sıra etken madde içeren yapının çözünmesinde katkısı vardır. Formülasyonda yağ ve su fazını birleştirmek adına sodyum stearoil glutamat bir emülgatör olarak kullanıldı. Sorbitan kaprilat, propandiol ve benzoik asit içerikli karışım ise koruyucu amacı ile formülasyona dahil edildi.

Formülasyon hazırlamada etken maddenin homojen olarak dağılımı ve çözünürlüğü önemli bir parametredir. Bu nedenle dağılım ve çözünürlüğün sorun olma olasılığı değerlendirildi. Bu amaçla etken maddenin öncelikli olarak gliserin, koko kaprilat, sorbitan kaprilat, propandiol, benzoik asit karışımı içerisinde çözünmesi sağlandı ve homojen bir karışım elde edildikten sonra krem formülasyonu oluşturuldu (Şekil 3.1).

Krem formülasyon için öncelikle Çizelge 2.1'de gösterildiği belirlenen oranlarda maddelerden alınarak FAZ A ve FAZ B hazırlandı. Her fazın malzemesi farklı beherlerde karıştırıldı. Her bir faz karışımı homojen hale getirildikten sonra FAZ A ve FAZ B bir araya getirildi. Karışım homojen, yoğun bir kıvama gelene kadar karıştırıldı (Şekil 2.23a). Analizler için karışım numune kaplarına alındı (Şekil 2.23a ve b).

a)



FAZ A

FAZ B

Faz karışımı

b)



Nihai formülasyon

Şekil 2.23. Krem bazının hazırlanması a) FAZ A, FAZ B ve Faz karışımı. (b) Nihai formülasyon.

Elde edilen kozmetik ürün için akredite laboratuvarlarda mikrobiyal analiz testi, antimikrobiyal koruyucu etkinlik testi, fizikokimyasal testler, anti pigmentasyon *in vitro* ürün testi yaptırıldı. Testlerden olumlu sonuçlar elde edildiği için formülasyonda revizeye gerek duyulmadan nihai ürün formülasyonu oluşturuldu.

#### 2.2.4.1. Mikrobiyolojik Analiz Testi

Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu ‘Kozmetik ürünlerin stabilitesine ve açıldıktan sonra kullanım süresine ilişkin kılavuzda belirtilen hususlar çerçevesinde kozmetik ürünlerde gerçekleştirilen mikrobiyolojik analizlerin temel amacı, ürünlerin raf ömrü ve açık ambalaj sürecinde meydana gelebilecek değişiklikleri tespit edebilmektir. Kozmetik ürünlerin içerisindeki bileşiklerin mikroorganizma kontaminasyonu açısından risklerini ortaya koyarak insan sağlığını korumak amaçlanmaktadır [87].

Mikrobiyolojik testler için patojenler ve onlara ait analitik yöntemler, TİTCK'nin "Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyolojik Kontrolüne İlişkin Kılavuz"da belirtildiği haliyle uygulandı (Çizelge 2.2).

Çizelge 2.2. Mikrobiyolojik analizde kullanılan materyal ve metot

<b>Analiz</b>	<b>Metot</b>	<b>Kullanılan Besiyeri</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	Zenginleştirme ve katı besiyerine çizgi ekim	Baird Parker Agar Medium
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	Zenginleştirme ve katı besiyerine çizgi ekim	Cetrimide Agar Medium
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	Zenginleştirme ve katı besiyerine çizgi ekim	MacConkey Agar Medium Levine eosin- Methylene Blue Agar Medium
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	Zenginleştirme ve katı besiyerine çizgi ekim	Sabouraud %4 Dextrose Agar + Supplement
Küf -Maya	Dökme plaka veya Yayma plaka	Sabouraud %4 Dextrose Agar + Supplement
Aerobik mezofilik bakteri	Dökme plaka veya Yayma plaka	Polisorbat 80 ve Lesitin İçeren Triptik Soy Agar

Analizler; *Staphylococcus aureus* (TSE EN ISO 22718), *Pseudomonas aeruginosa* (TSE EN ISO 22717), *Escherichia coli* (TSE EN ISO 21150) ve *Candida albicans* (TSE EN ISO 18416) mikroorganizmalarının tespitine yönelik olarak zenginleştirildi, katı besiyerine çizgi ekim yapılarak Çizelge 3.9'da belirtilen agar ortamında izolasyonu her mikroorganizma için bahsi geçen dört standart baz alınarak gerçekleştirildi. Maya ve küfün analizleri ise TSE EN ISO 16212 standardı çerçevesinde aerobik inkübasyon sonrasında seçici agar ortamında koloniler sayıldı [82].

#### 2.2.4.2. Antimikrobiyal Koruyucu Etkinlik Testi

Test edilen kozmetik ürün her mikroorganizma için uygun miktarlarda steril kaplara aktarıldı. İnokülasyon yapılan kaplara her suşun yoğunluk değerine uygun olarak transferi yapıldı. 1/10 ve 1/100 oranında nötralizatör hazırlanmış ve numunelere uygun seyreltmeler yapıldı. Her bir test mikroorganizması için gereken sürede (0., 7., 14. ve 28. gün) hesaplanan yoğunluk miktarına uygun olarak yapılan örnek dilüsyonları, logaritmik olarak değerlendirildi (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Koruyucu etkinlik testine ait deney ve inkübasyon koşulları.

Referans Suşlar	Metot	Kullanılan besiyeri	İnkübasyon Koşulları
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027/Lot 3270513	Dökme Plaka	Tryptic Soy Agar	30°C-35°C
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/Lot 220407	Dökme Plaka	Tryptic Soy Agar	30°C-35°C
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739/Lot 220403	Dökme Plaka	Tryptic Soy Agar	30°C-35°C
<i>Candida albicans</i> NCPF 3179/Lot 040920028	Dökme Plaka	Sabouraud %4 Dextrose Agar	20°C-25°C
<i>Aspergillus brasiliensis</i> NCPF 2275/Lot 020620065	Dökme Plaka	Potato Dextrose Agar	20°C-25°C

#### 2.2.4.3. Fizikokimyasal Testler

Ürünün renk ve görünümü fiziksel olarak, kokusu için organoleptik tekniği ile belirlendi. Yoğunluk için basit kütle ve hacim hesabı yapıldı. pH ise pH metre (Marka/Model:Milwaukee/ MW150 MAX) ile ölçüldü.

#### 2.2.4.4. Anti Pigmentasyon İn Vitro Ürün Testi

Çalışma kapsamında tüm deneylerde ATCCD'den temin edilen insan epidermal melanosit hücre hattı kullanıldı. Hücreler %10 FBS ve %2 glutamin ile desteklenmiş DMEM (ATCC Kat No:30-2006) ile melanosit hücre kültürü için hazırlanmış özel besiyerinde çoğaltılarak, %5 CO<sub>2</sub>'li etüvde 37 °C'de inkübe edildi. ATCC'nin önerdiği şekilde hücrelerin tripsinazyonu için %0,25 tripsin, %0,03 EDTA karışımı kullanıldı. Hücreler rutin olarak 2 günde bir beslenmiş ve %85 doluluğa ulaştıklarında pasajlandı. Son pasajlamada T25 flasklara 30.000 hücre/flask olacak şekilde ekim yapıldı ve iki gün sonunda %80 ve üzeri konfluent hale gelen hücreler gruplara ait örneklerle dozlanarak 48 saatlik inkübasyona bırakıldı. İki gün boyunca test materyali dozlarına (25µg/mL, 50 µg/mL, 100 µg/mL, 200 µg/mL) maruz bırakılan hücrelerden lizat hazırlanarak test zamanına kadar -20°C'de saklandı. Numune özütü ve kontrol grubu 5 tekrarlı olarak çalışıldı. Kontrol grubu olarak sadece besiyer kullanıldı. Numune özütlemesi ISO 10993-12 standartlarına uygun olarak (72 saat 37 °C'de) yapıldı. İnsan epidermal melanosit hücre lizatlarındaki tirozinaz enzim miktarı, 48 saatlik inkübasyon süreleri sonunda human tirozinaz ELİSA kit kullanılarak belirlendi. Kit, tirozinaz enzimine özel monoklonal antikor ile kaplanmış 96 kuyucuklu plakayı içermektedir. Deneye başlamadan önce her bir kuyucuk dört kez 300 µL 1x yıkama tamponu (Tween 20 ve PBS karışımı) ile yıkandı. Belirlenen dozlarda uygulaması yapılan test materyali

gruplarından ve kontrol grubundan 50'şer  $\mu\text{L}$  alınarak bu kuyucuklara eklendi. İki saat oda sıcaklığında 200 rpm'de çalkalayıcıda inkübe edildi. Her bir kuyucuk dört kez 300  $\mu\text{L}$  1x yıkama tamponu ile yıkandı. Daha sonra her kuyucuğa 100 $\mu\text{L}$  insan anti tirozinaz antikoru üzerlerine ilave edildi. Bir saat oda sıcaklığında çalkalayıcı ile inkübasyona bırakıldı. Her bir kuyucuk dört kez 300  $\mu\text{L}$  1x yıkama tamponu ile yıkandı. Her kuyucuğu 100  $\mu\text{L}$  Avidin-HRP A (Avidin Peroksidaz A) solüsyonu eklendi ve 30 dk oda sıcaklığında çalkalayıcı ile inkübe edildi. Her bir kuyucuk beş kez 300  $\mu\text{L}$  1x yıkama tamponu ile yıkandı. Her bir kuyucuğa 100 $\mu\text{L}$  substrat F (yüksek hassasiyetli TMB) solüsyonunun eklenerek 10 dk oda sıcaklığı ve karanlıkta inkübe edildi. Sonrasında kuyucuklara bağlanan tirozinaz miktarına bağlı olarak mavi renk oluşumu gözlemlendi. Her kuyucuğa 100  $\mu\text{L}$  durdurma solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve renk maviden sarıya döndü. Örnekler için absorbans değerleri Eliza kit okuyucuda (Thermo Fisher, multi scan fc microplate reader) 450 nm'de absorbans alınarak değerlendirilme yapıldı.

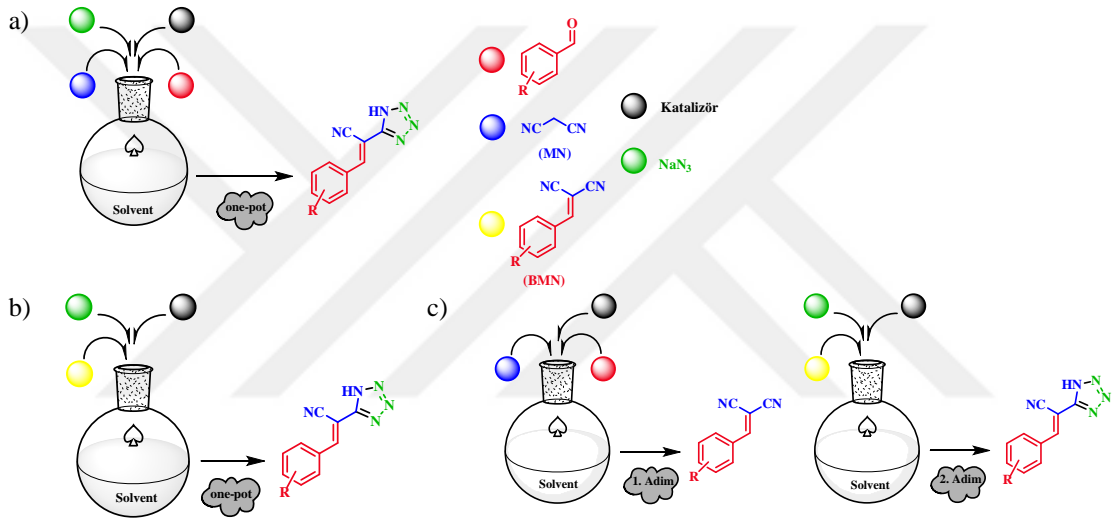
Negatif kontrol (NK): Ultra saf su

Test materyali uygulama dozları (w/v): 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$

Test materyali (TM) Özütleme: Test materyali 0,1 gr/mL olarak içerisinde %0,05 DMSO bulunan DMEM besiyerinde çözüldü. 24 saat sonra 37 °C'de çalkalamalı inkübatörde 120 rpm ile inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda 0,22  $\mu\text{m}$  membran filtreden geçirilerek test konsantrasyonlarında kullanıldı. ISO 10993-12 test standardına göre özütleme yapıldı.

### 3. BULGULAR VE TARTIŞMA

Tez çalışmasında, 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevinin sentezi birkaç aşamada planlandı. İlk aşamada aril aldehitlerden tek kademede tetrazol sentezi planlandı (Şekil 3.1. 5a). İkinci aşamada ise ticari olarak temin edilen BMN türevlerinden yola çıkılarak 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevi planlandı (Şekil 3.1. 5b). Son olarak ise aril aldehitlerden öncelikle BMN türevlerinin sentezi sonrasında ise 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerinin sentezi planlandı ( Şekil 3.1. 5c).

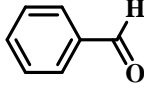
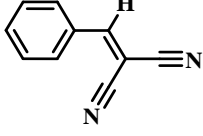
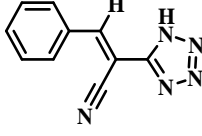
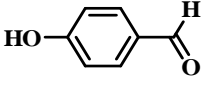
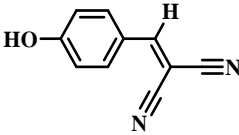
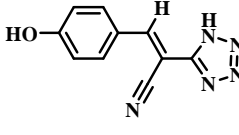
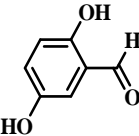
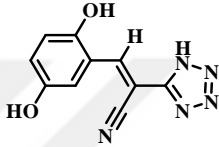
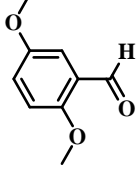
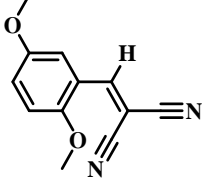
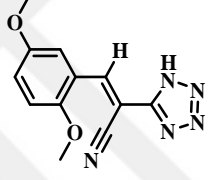
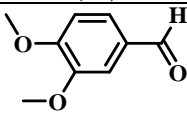
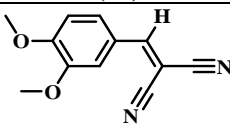
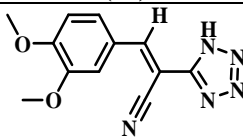
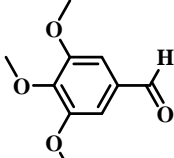
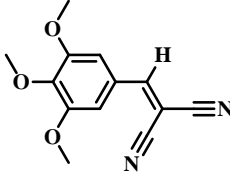
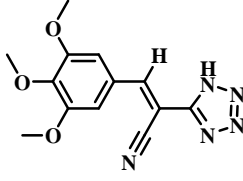
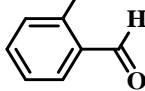
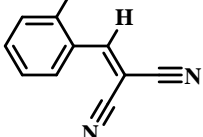
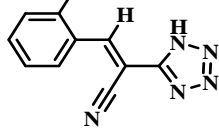
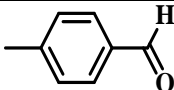
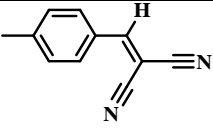
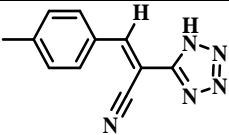


Şekil 3.1. 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerinin farklı yöntemlerle sentezi  
(a)Benzaldehitten tek adımda tetrazol eldesi, (b) BMN'den tetrazol eldesi  
(c)Benzaldehitten iki adımda tetrazol eldesi.

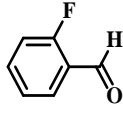
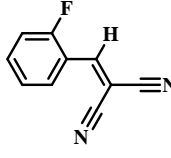
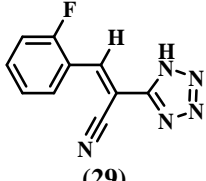
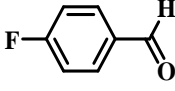
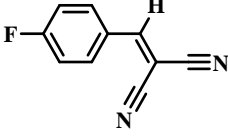
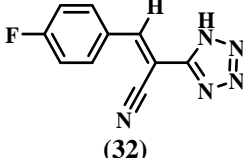
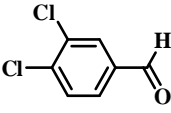
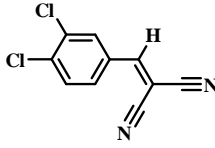
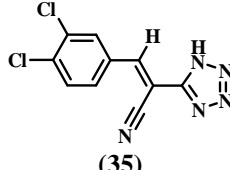
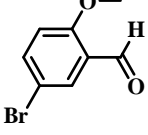
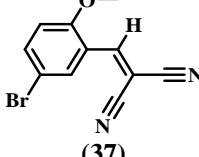
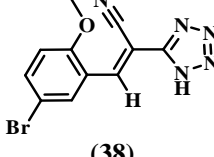
Yapılan denemelerde aril aldehit, malononitril ve sodyum azid ile tek kademede 12 adet 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevleri başarı ile sentezlendi. Geliştirilen bu yöntemde Pd/AlO(OH) nanopartikülleri kullanıldı. Bu nedenle diğer aşamaların çalışmaları gerçekleştirildi. Ancak tetrazol türevlerinin spektroskopik verileri ile karşılaştırılması amacı ile geliştirilen yöntemle 11 adet benziliden malononitril (BMN) türevleri sentezlendi.

Sentezlenen BMN türevlerinin her biri için <sup>1</sup>H NMR spektrumu, her bir 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevi için ise <sup>1</sup>H ve <sup>13</sup>C NMR ve FT-IR spektrumu alınarak bileşikler karakterize edildi. Sentezlenen BMN ve tetrazol türevleri Çizelge 3.1'de verildi.

Çizelge 3.1. Sentezde kullanılan reaktantlar ve sentezlenen ürünler.

Pd/AlO(OH) NPs (1)	CH <sub>2</sub> (CN) <sub>2</sub> (2)	NaN <sub>3</sub> (3)
Substrat (Aldehit)	BMN Türev	Tetrazol Türev
 (4)	 (5)	 (6)
 (7)	 (8)	 (9)
 (10)	- -	 (11)
 (12)	 (13)	 (14)
 (15)	 (16)	 (17)
 (18)	 (19)	 (20)
 (21)	 (22)	 (23)
 (24)	 (25)	 (26)

Çizelge 3.1 (Devamı). Sentezde kullanılan reaktantlar ve sentezlenen ürünler.

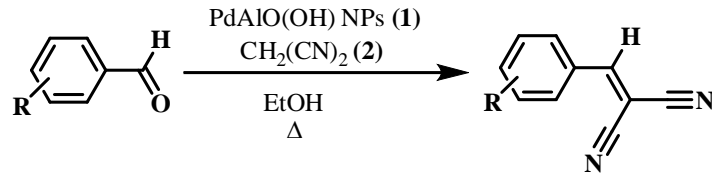
Substrat (Aldehit)	BMN Türev	Tetrazol Türev
 (27)	 (28)	 (29)
 (30)	 (31)	 (32)
 (33)	 (34)	 (35)
 (36)	 (37)	 (38)

### 3.1. BENZİLİDENMALONONİTRİL TÜREVLERİ

Tez çalışması kapsamında sentezlenen 5-süstitüe-1H-tetrazol türevlerinin spektrum sonuçları ile karşılaştırma yapılması amacı ile BMN türevlerinin sentezi gerçekleştirildi. Geliştirilen yöntemde aril aldehit türevlerinin malononitrille etanolde kaynama sıcaklığında reaksiyonları gerçekleştirildi ve 2-24 saat aralığında kantitatif verimlerle BMN türevleri elde edildi. Çalışmada ürün verimlerinden ziyade BMN türevlerinin yüksek saflıkta elde edilmesi önemli idi ve yapılan çalışmalarla istenilen sonuçlar elde edildi.

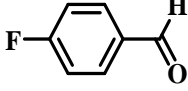
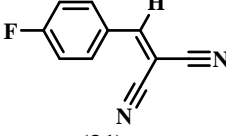
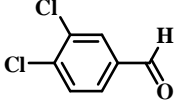
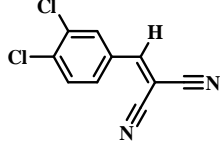
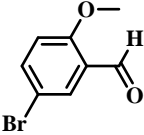
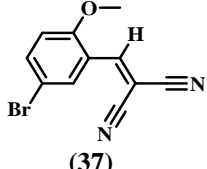
Elde edilen BMN türevlerine ait genel reaksiyon denklemi, reaksiyon süreleri ve erime noktaları (e.n.) Çizelge 3.2’de verildi.

Çizelge 3.2. Pd/AlO(OH) NPs (1) etkisinde sentezlenen BMN türevleri.



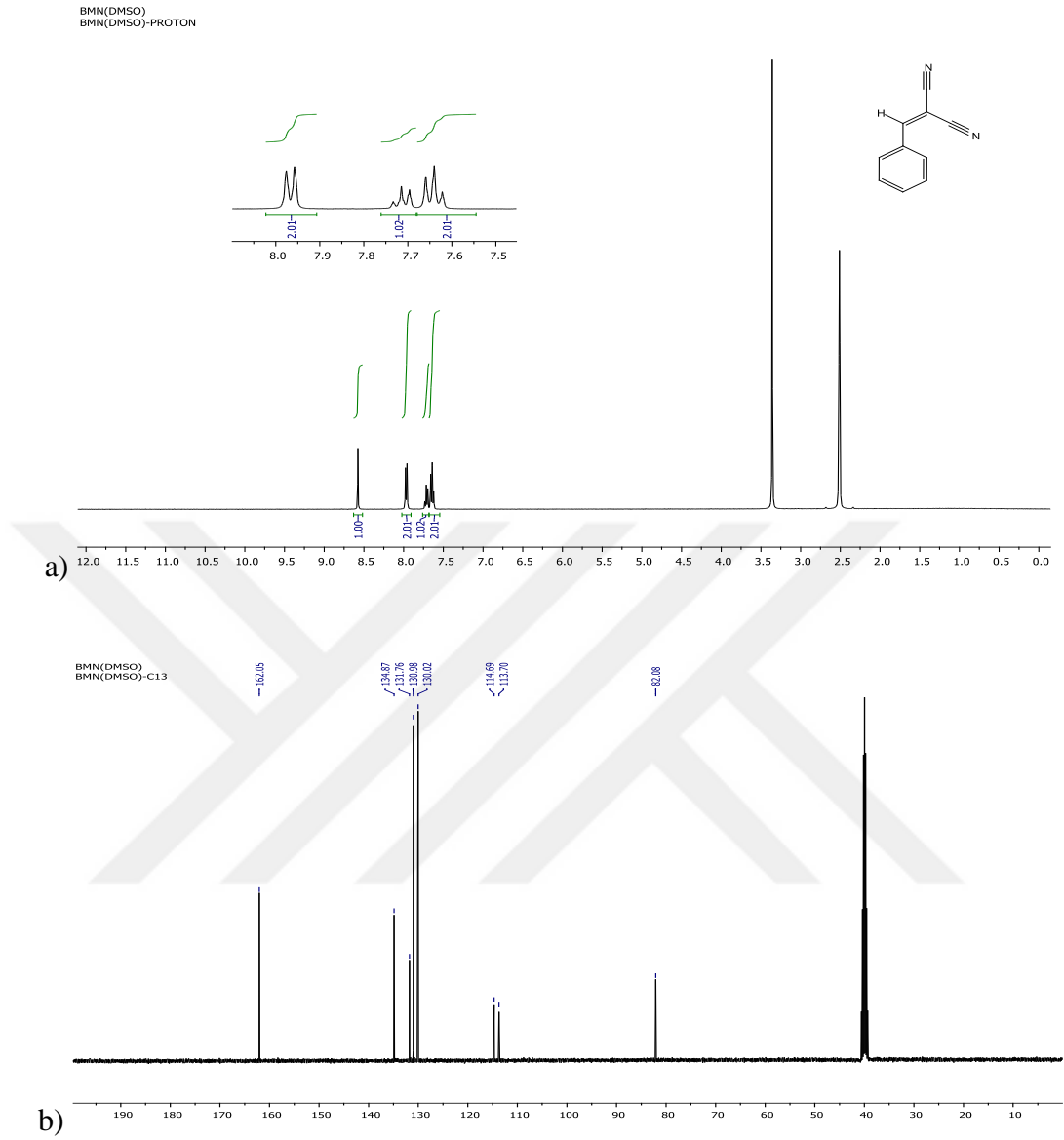
Giriş	Substrat	BMN Türev	Süre (Saat)	e.n. °C
1			2	83-85
2			2	165-168
3			3	98-100
4			2	145-147
5			3	133-135
6			3	104-106
7			2	134-136
8			24	116-118

Çizelge 3.2 (Devamı). Pd/AlO(OH) NPs (1) etkisinde sentezlenen BMN türevleri.

Giriş	Substrat	BMN Türev	Süre (Saat)	e.n. °C
9	 (30)	 (31)	24	118-120
10	 (33)	 (34)	4	130-132
11	 (36)	 (37)	2	139-141

Tüm BMN türevleri aynı reaksiyon şartlarında sentezlenmesine rağmen 2,5-dihidroksibenzaldehit (10) ile gerçekleştirilen reaksiyonda istenilen ürün elde edilemedi. NMR verilerine göre, planlanan BMN türevi yerine *orto* pozisyonundaki -OH grubu ile BMN türevindeki -CN grubu üzerinden halkalaşma olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle (10) nolu bileşik üzerinden BMN elde edilemedi fakat tek kademede tetrazol türevi elde edildi.

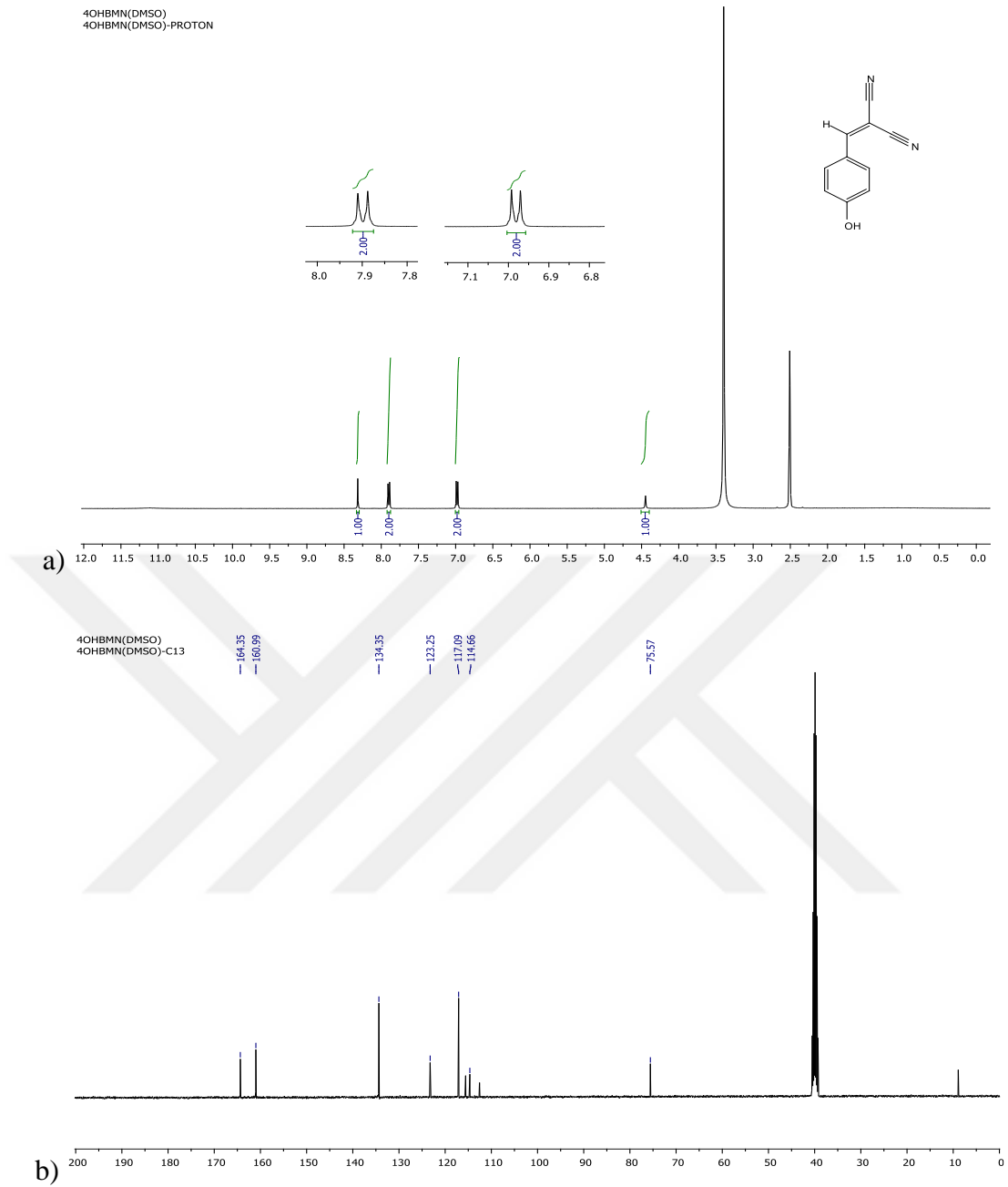
### 3.1.1. Spektrumların Değerlendirilmesi



Şekil 3.2. 2-benzilidenemalononitril (5)'in a)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve b)  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumları.

#### 2-benzilidenemalononitril (5):

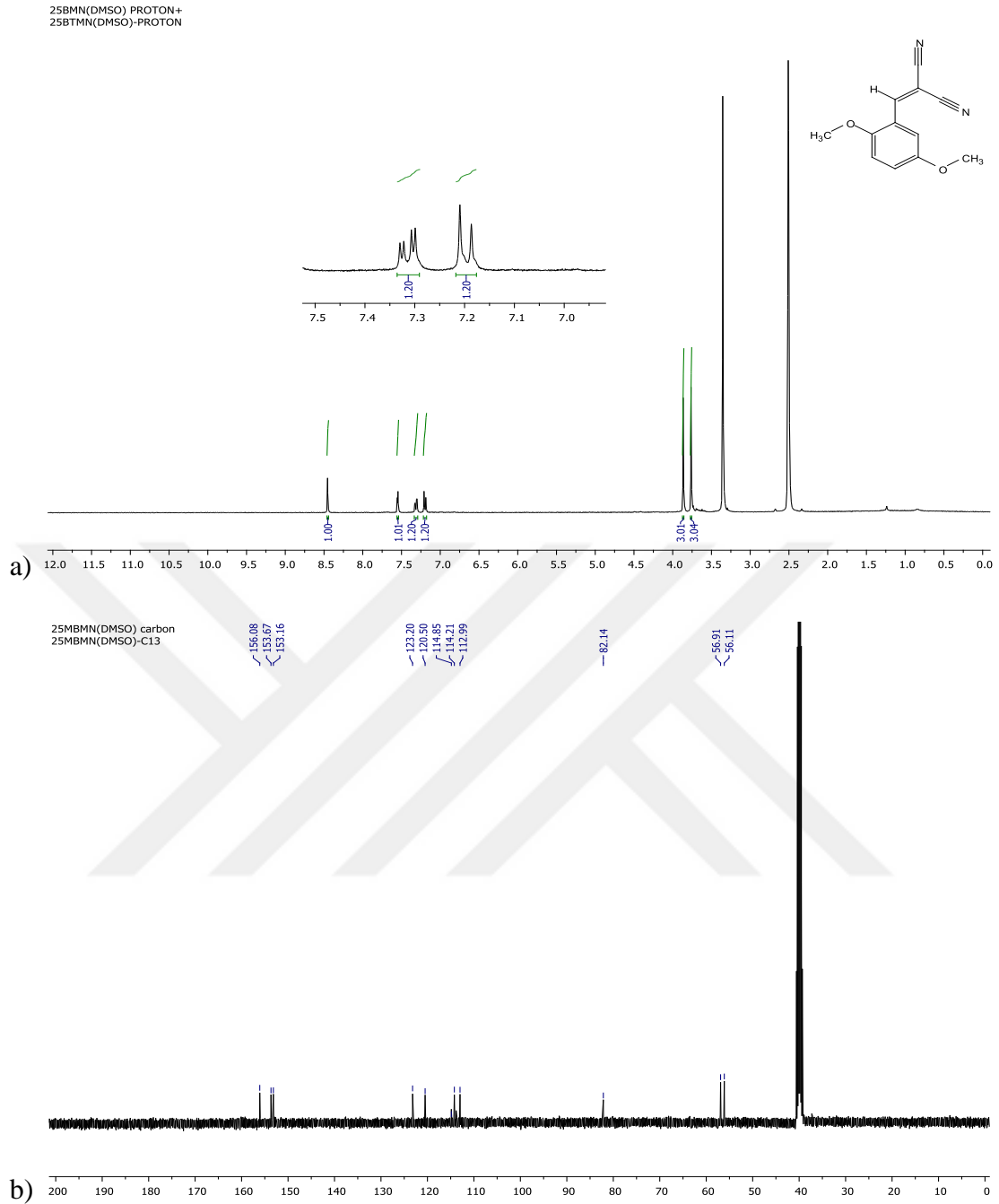
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.58 (s, 1H), 7.97 (d,  $J = 7.4$  Hz, 2H), 7.71 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H), 7.64 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 Hz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.05, 134.87, 131.76, 130.98, 130.02, 114.69, 113.70, 82.08.



Şekil 3.3. 2-(4-hidroksibenziliden)malononitrile (8)'in a) <sup>1</sup>H NMR (400 MHz) ve b) <sup>13</sup>C NMR (100 MHz) spektrumları.

**2-(4-hidroksibenziliden)malononitril (8):**

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8.32 (s, 1H), 7.90 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H), 6.98 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 164.35, 160.99, 134.35, 123.25, 117.09, 114.66, 75.57.

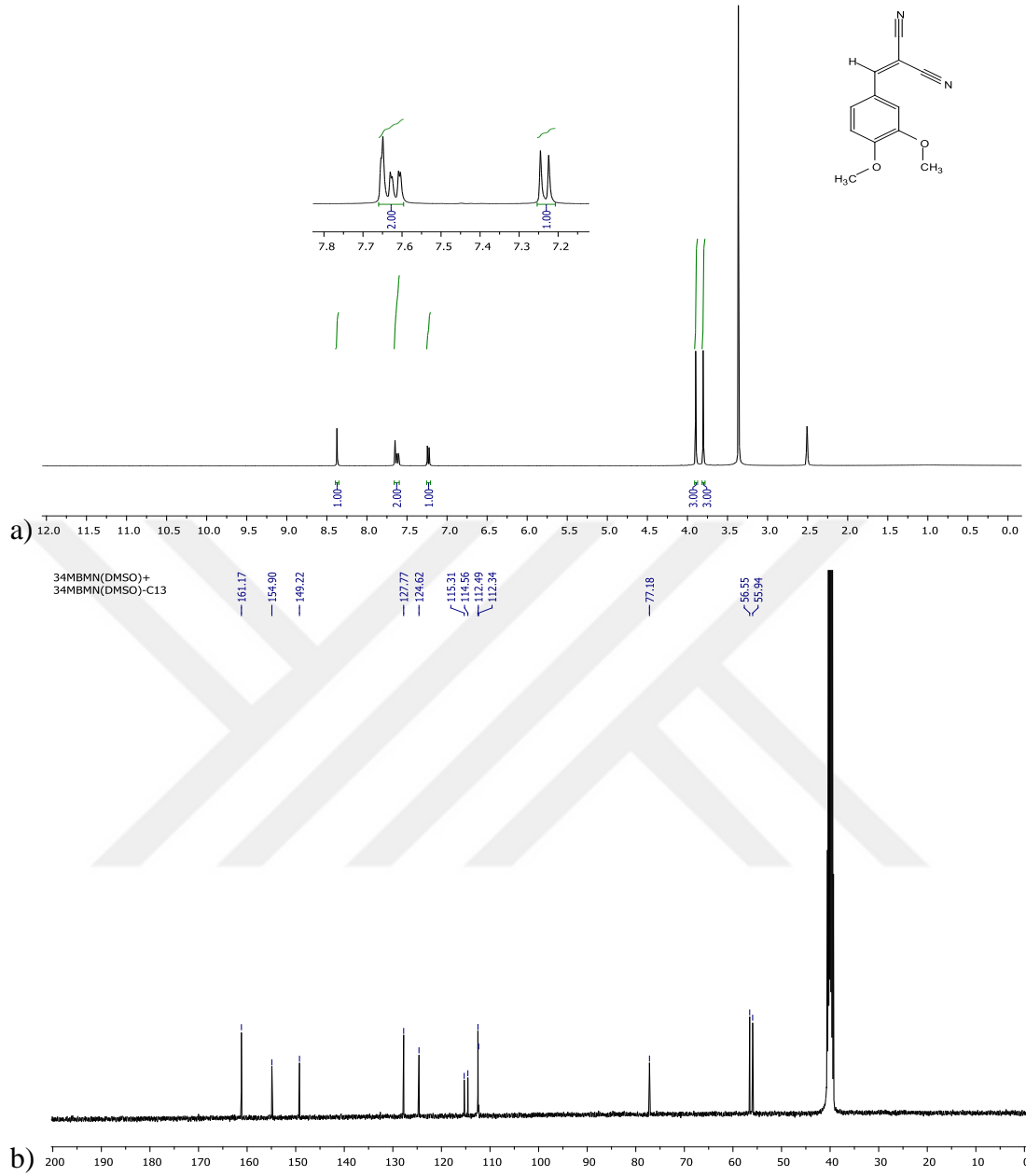


Şekil 3.4. 2-(2,5-dimetoksibenzilidene)malononitril (13)'ün a)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve b)  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumları.

### 2-(2,5-dimetoksibenziliden)malononitril (13):

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.45 (s, 1H), 7.55 (d,  $J = 3.1$  Hz, 1H), 7.31 (dd,  $J = 9.2, 3.0$  Hz, 1H), 7.20 (d,  $J = 9.3$  Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.76 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  156.08, 153.67, 153.16, 123.20, 120.50, 114.85, 114.21, 112.99, 82.14, 56.91, 56.11.

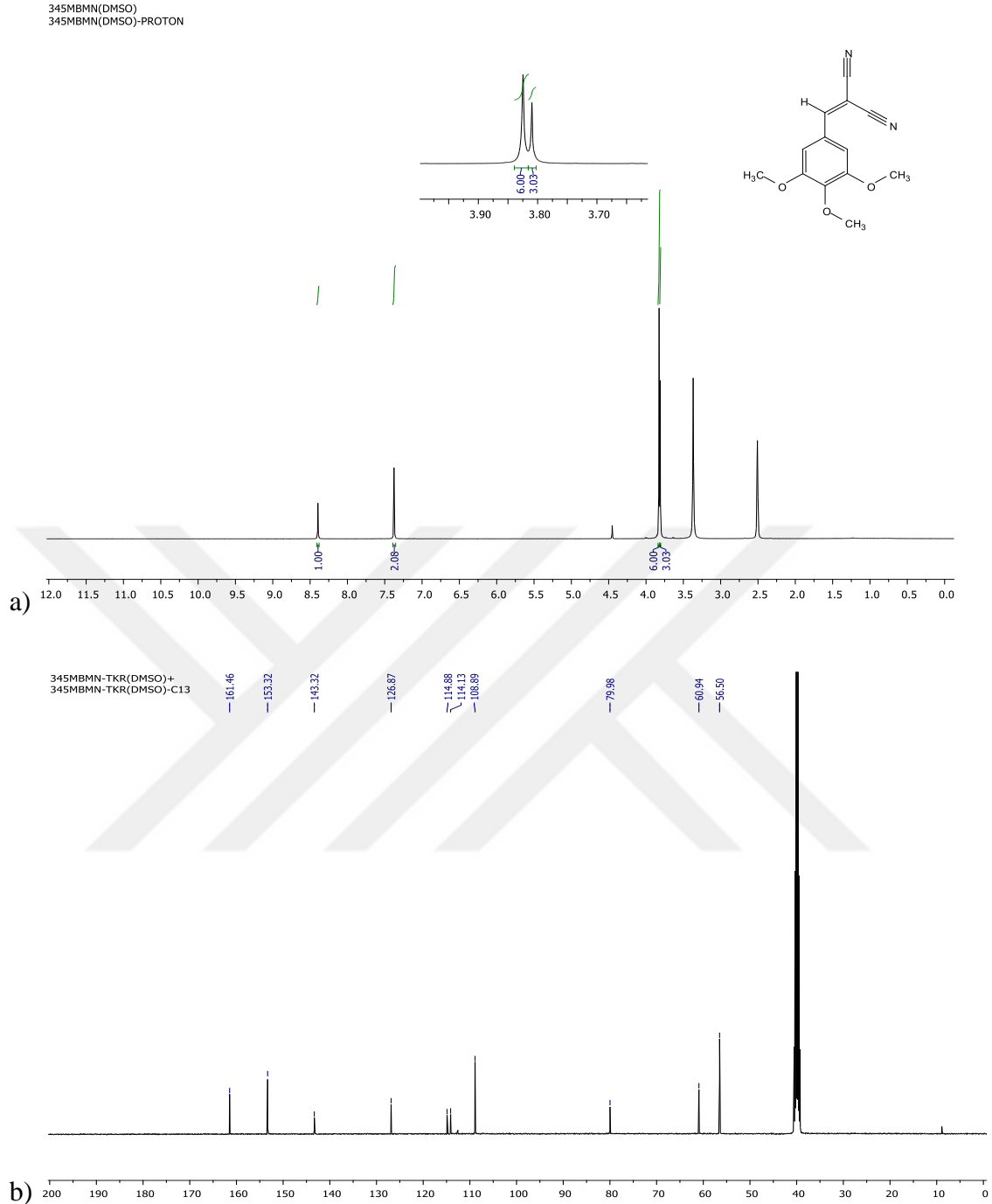
34MBMN(DMSO)+  
34MBMN(DMSO)-PROTON



Şekil 3.5. 2-(3,4-dimethoksibenziliden)malononitril (16)'nin a)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve b)  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumları.

### 2-(3,4-dimethoksibenziliden)malononitril (16):

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.37 (s, 1H), 7.66 – 7.60 (m, 2H), 7.23 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H), 3.90 (s, 3H), 3.80 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  161.17, 154.90, 149.22, 127.77, 124.62, 115.31, 114.56, 112.49, 112.34, 77.18, 56.55, 55.94.

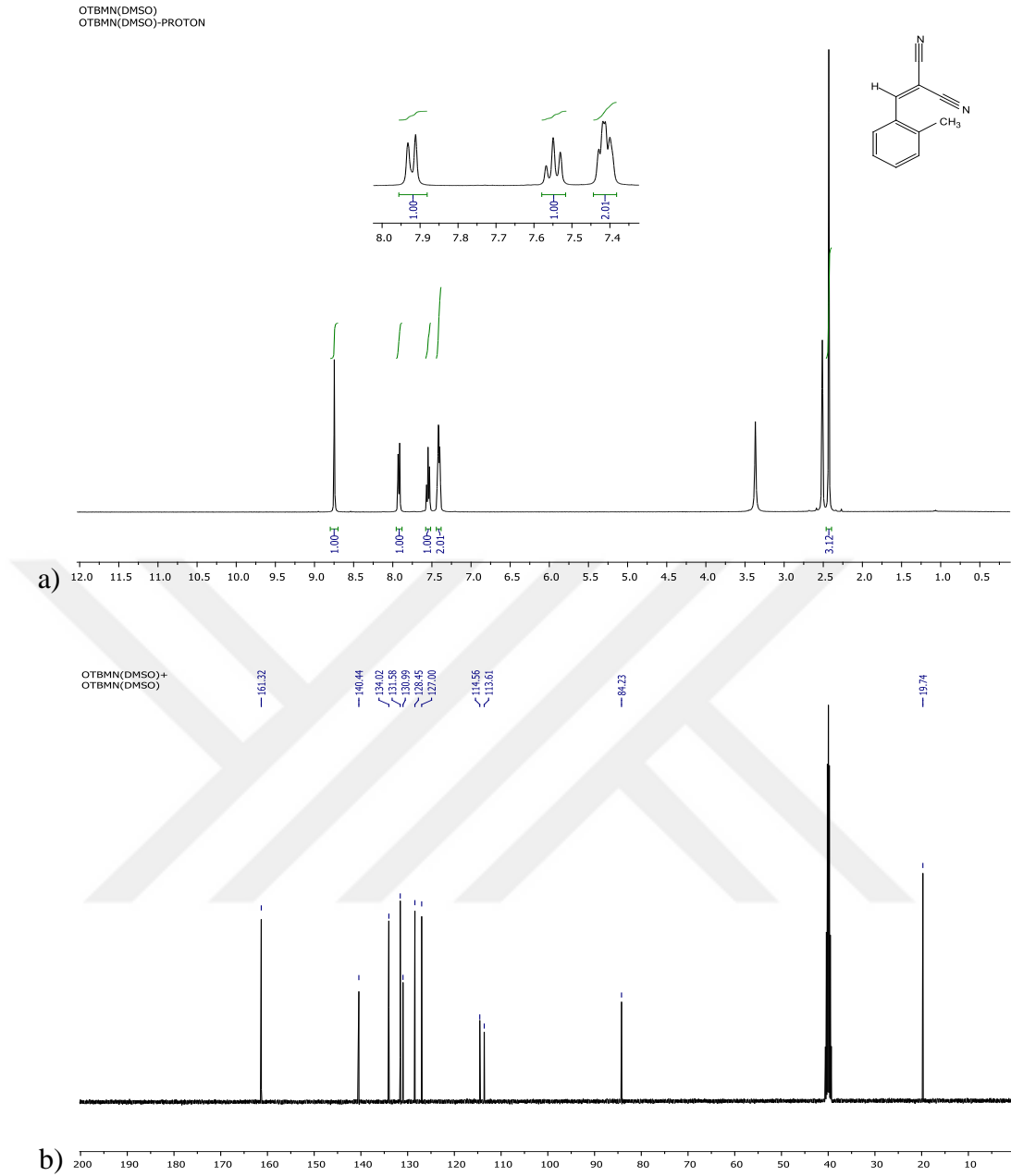


Şekil 3.6. 2-(3,4,5-trimetoksibenziliden)malononitril (19)'un a)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve b)  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumları.

**2-(3,4,5-trimetoksibenziliden)malononitril (19):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.40 (s, 1H), 7.38 (s, 2H), 3.82 (s, 6H), 3.81 (s, 3H).

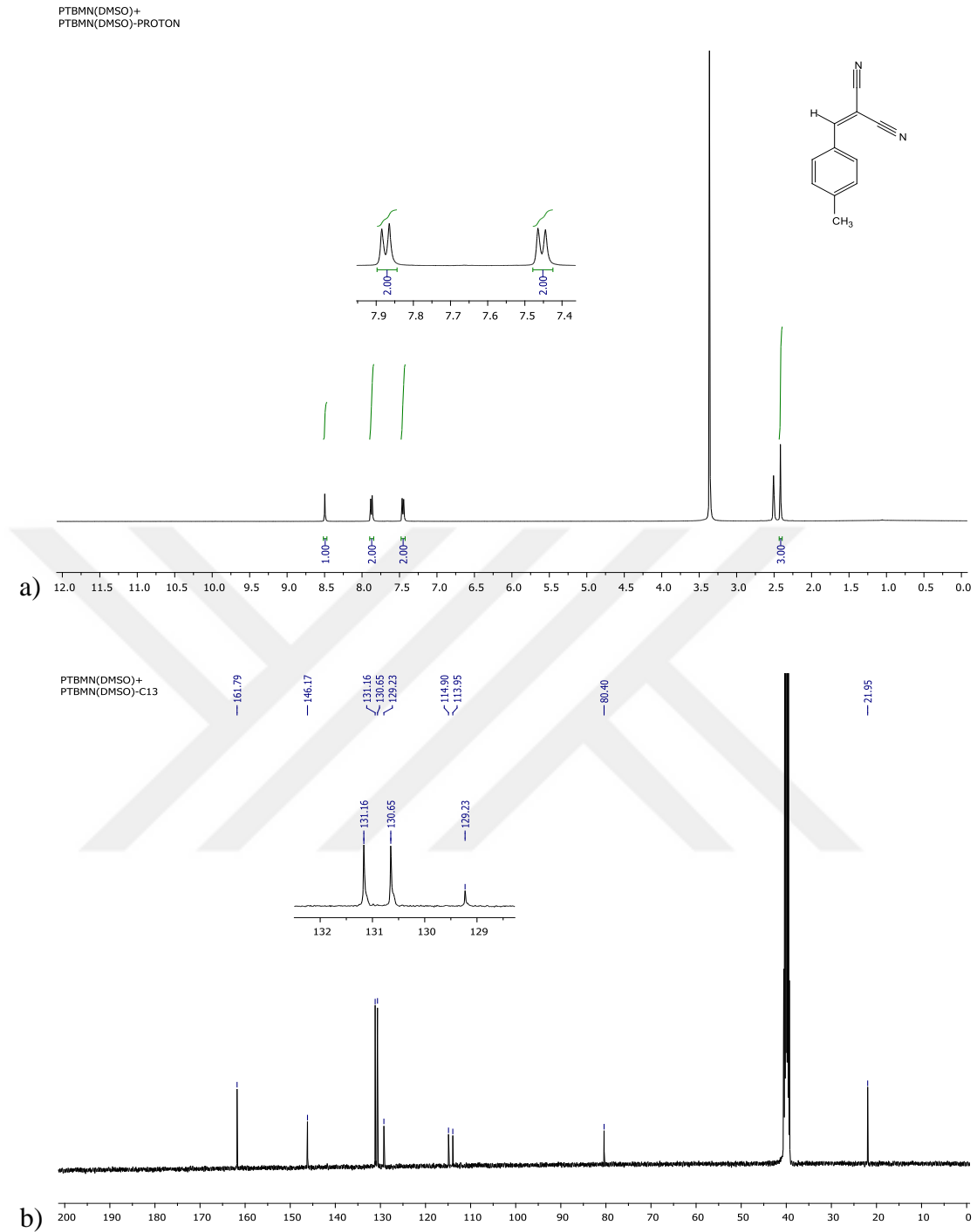
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  161.46, 153.32, 143.32, 126.87, 114.88, 114.13, 108.89, 79.98, 60.94, 56.50.



Şekil 3.7. 2-(2-metilbenziliden)malononitril (22)'nin a)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve b)  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumu.

**2-(2-metilbenziliden)malononitril (22):**

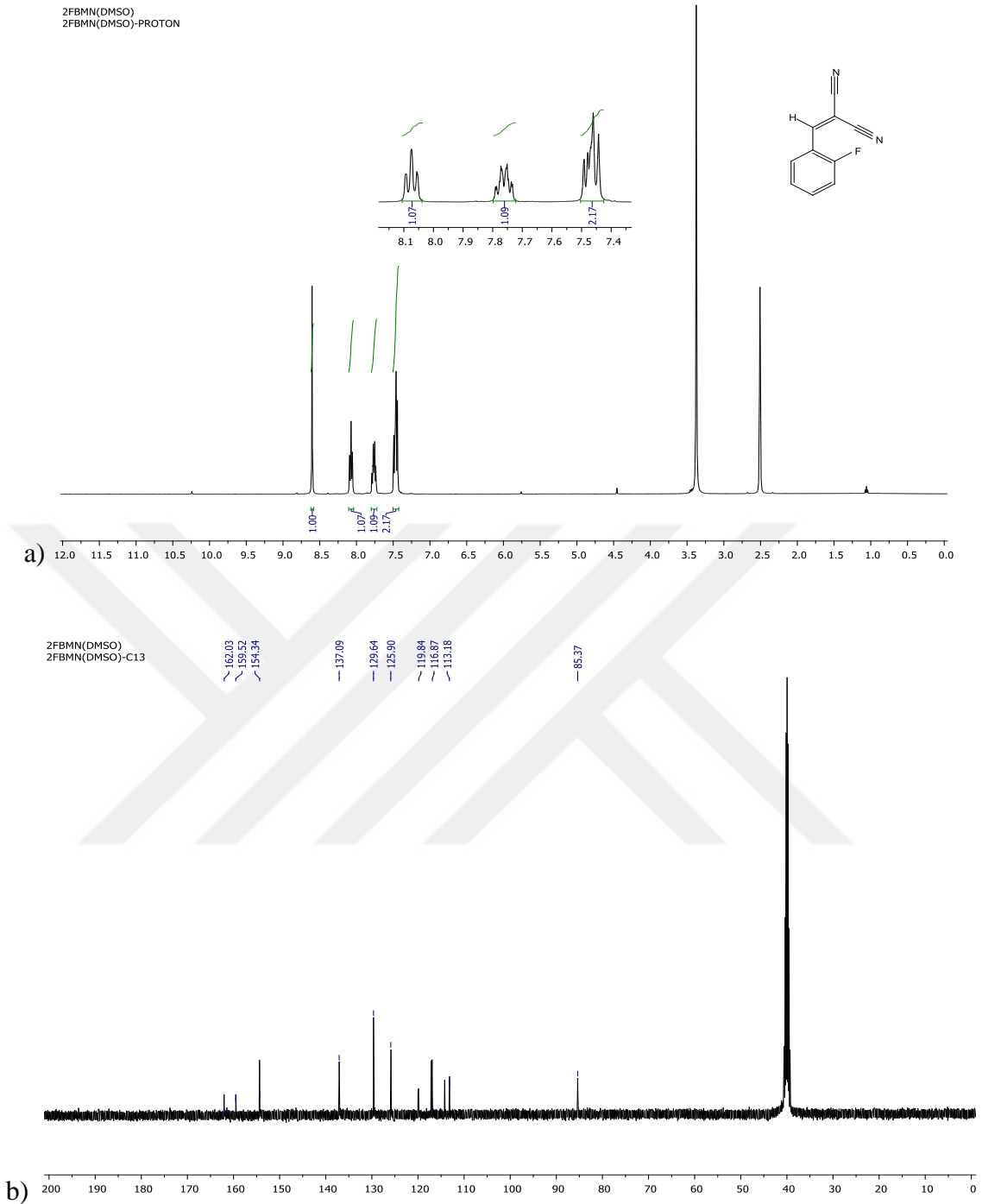
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.75 (s, 1H), 7.92 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H), 7.55 (m, 1H), 7.44-7.37 (m, 2H), 2.43 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  161.32, 140.44, 134.02, 131.58, 130.99, 128.45, 127.00, 114.56, 113.61, 84.23, 19.74.



Şekil 3.8. 2-(4-metilbenziliden)malononitril (25)'in a)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve b)  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumları.

### 2-(4-metilbenziliden)malononitril (25):

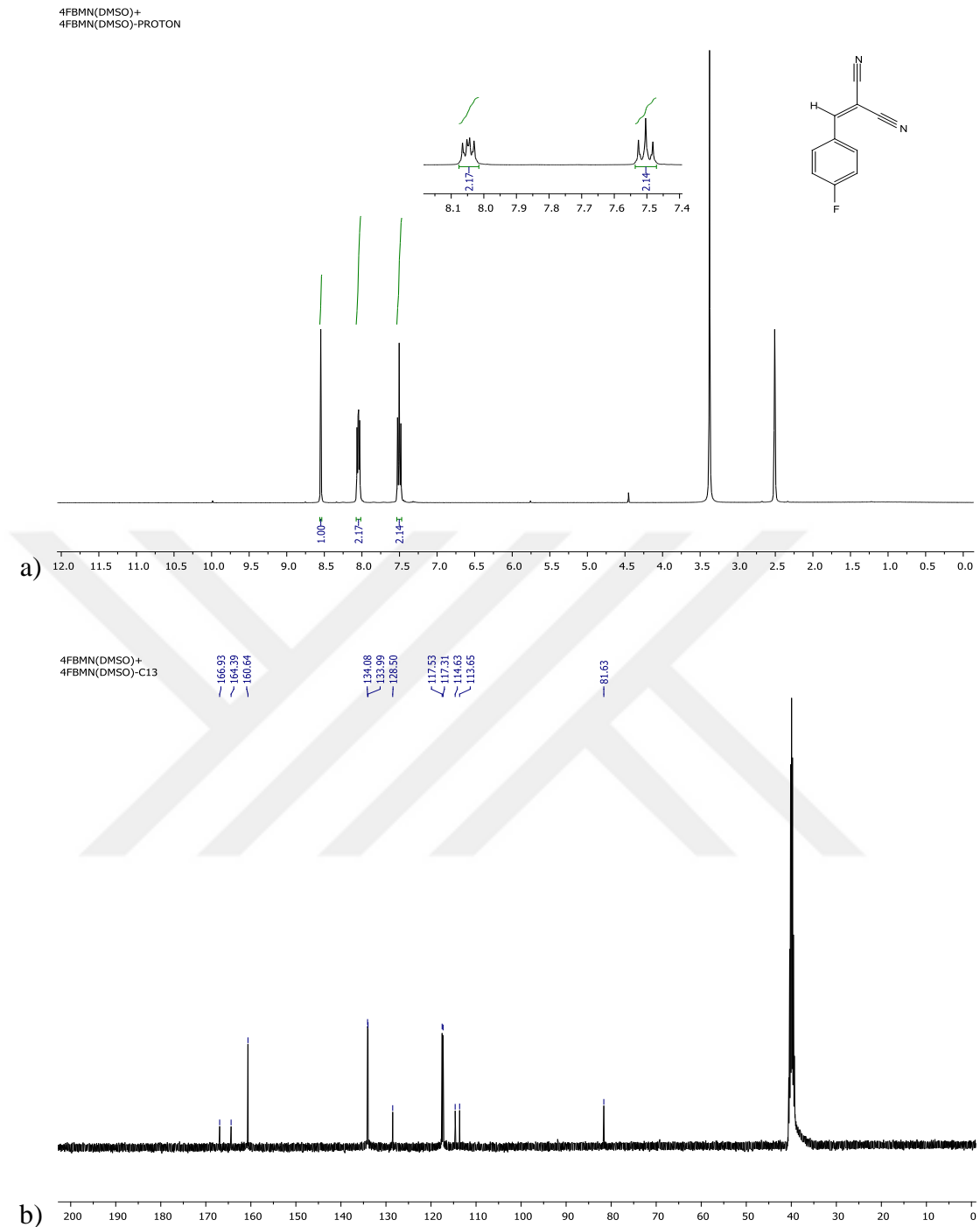
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.50 (s, 1H), 7.87 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H), 7.45 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 2.42 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.04, 139.42, 135.59, 131.76, 131.46, 129.90, 128.03, 114.70, 113.70, 81.75, 21.25.



Şekil 3.9. 2-(2-fluorobenziliden)malononitrile (28)'in a)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve b)  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumu.

### 2-(2-fluorobenziliden)malononitrile (28):

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.60 (s, 1H), 8.07 (m, 1H), 7.76 (m, 1H), 7.50 – 7.43 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  162.03, 159.52, 154.34, 137.09, 129.64, 125.90, 119.84, 116.87, 113.18, 85.37.

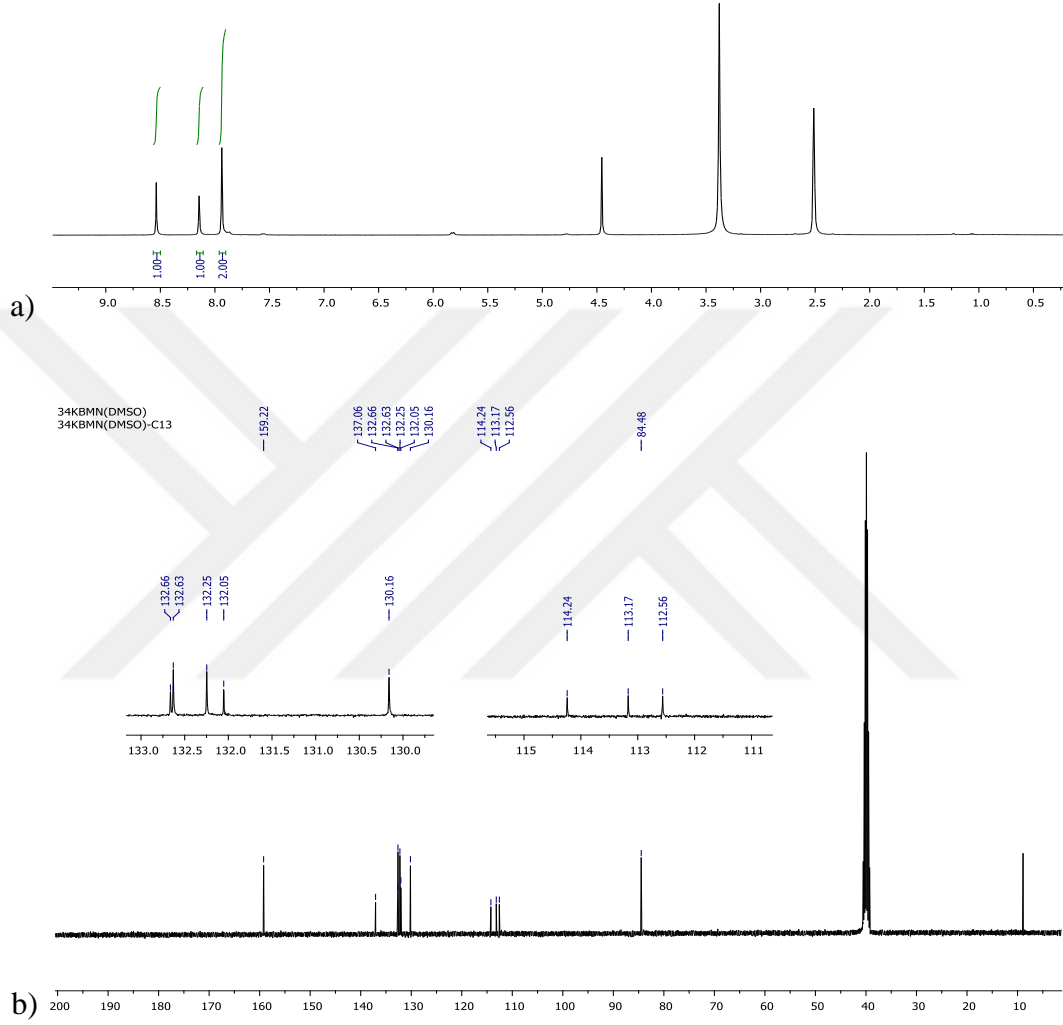
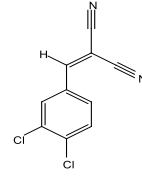


Şekil 3.10. 2-(4-fluorobenziliden)malononitrile (31)'in a)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve b)  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumu.

**2-(4-fluorobenziliden)malononitril (31) :**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.55 (s, 1H), 8.08 – 8.02 (m, 2H), 7.54 – 7.47 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  166.93, 164.39, 160.64, 134.08, 133.99, 128.50, 117.53, 117.31, 114.63, 113.65, 81.63.

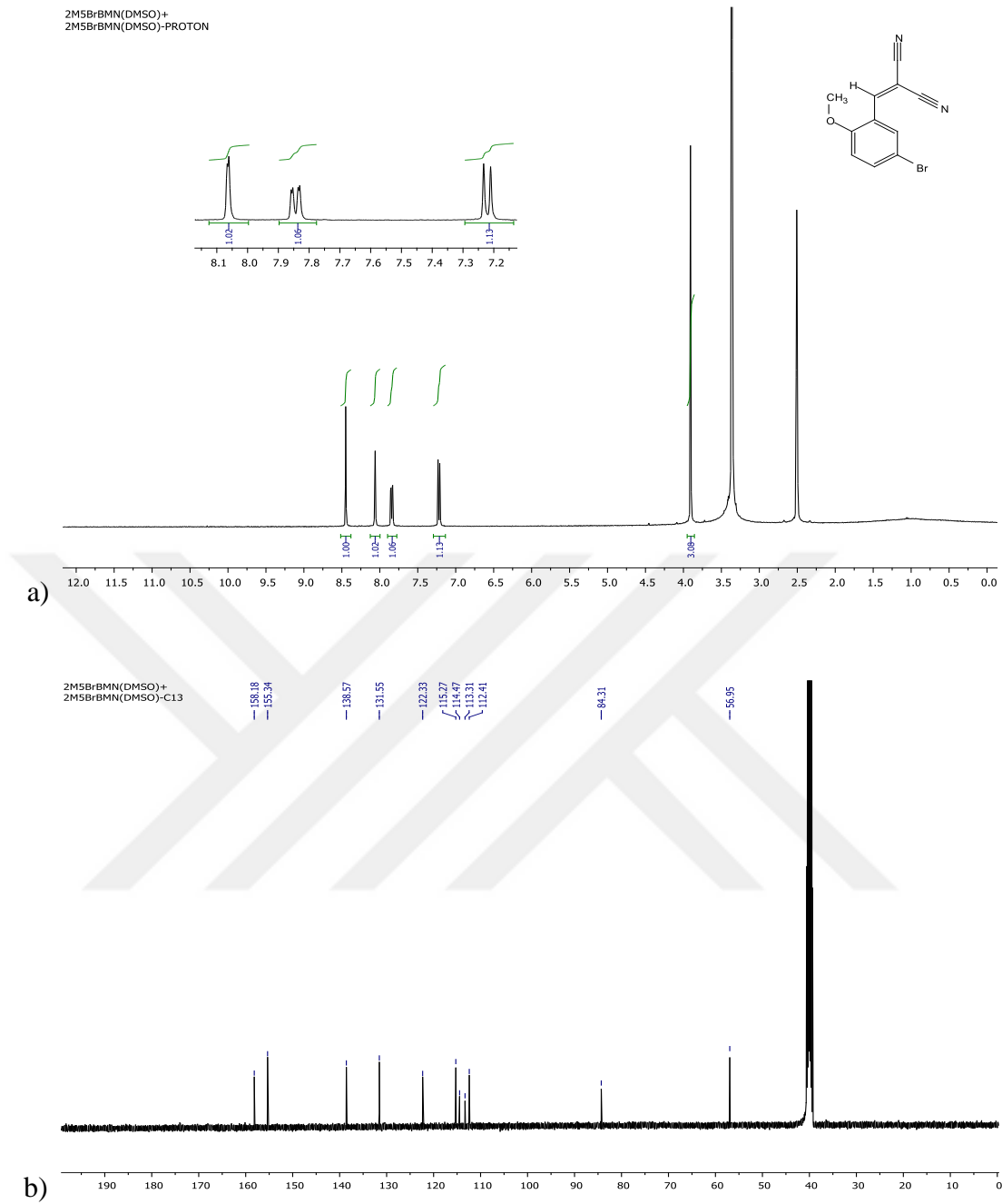
34KBMN(DMSO)  
34KBMN(DMSO)-PROTON



Şekil 3.11. 2-(3,4-diklorobenziliden)malonitril (34)'ün a)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve b)  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumu.

### 2-(3,4-diklorobenziliden)malonitril (34):

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.54 (s, 1H), 8.15 (s, 1H), 7.97-7.89 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  159.22, 137.06, 132.66, 132.63, 132.25, 132.05, 130.16, 114.26, 113.15, 112.56, 84.46.



Şekil 3.12. 2-(5-bromo-2-metoksibenziliden)malononitril (37)'nin a)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz) ve b)  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz) spektrumları.

**2-(5-bromo-2-metoksibenziliden)malononitril (37):**

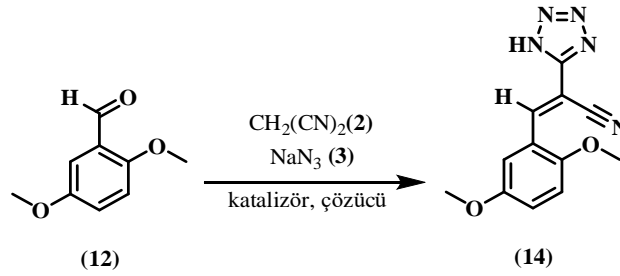
$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  8.45 (s, 1H), 8.06 (d,  $J = 2.0$  Hz, 1H), 7.84 (dd,  $J = 9.0, 2.2$  Hz, 1H), 7.22 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 3.91 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ )  $\delta$  158.18, 155.34, 138.57, 131.55, 122.33, 115.27, 114.47, 113.31, 112.41, 84.31, 56.95.

### 3.2. 5-SÜBSTİTÜE-1H-TETRAZOL TÜREVLERİ

#### 3.2.1. 5-Süstitüe-1H- Tetrazol Bileşiklerinin Sentezi İçin Optimizasyon Şartları

5-süstitüe-1H-tetrazol türevlerinin sentezinde optimizasyon çalışmaları için 2,5-dimetoksibenzaldehit (12) tercih edildi. Sentezde katalizör olarak kullanılan Pd/AIO(OH) nanopartikülünün (1) seçilen bileşik üzerindeki etkileri araştırıldı. Yöntemin standardizasyonu farklı sıcaklıklarda, çözücü ve katalizör miktarlarında gerçekleştirildi. Başlangıç denemeleri apolar bir çözücü ile gerçekleştirildi. Ancak reaksiyon sonucunda herhangi bir ürün oluşumu gözlenmedi (Şekil 3.3, giriş 1). Polar çözücüler olarak metilen klorür, su, metanol ve etanolün oda sıcaklığındaki reaksiyonları değerlendirildiğinde ürün oluşumu gözlenmedi (Çizelge 3.3, girişler 2, 3, 5, 6).

Çizelge 3.3. 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (14) sentezi için optimizasyon koşulları <sup>a</sup>.



Giriş	Çözücü	Katalizör (mg)	Sıcaklık (°C)	Süre (saat)	Verim <sup>b</sup> (%)
1	Toluen	30	110	6	Eser Miktar
2	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	30	25	6	Eser Miktar
3	H <sub>2</sub> O	30	25	6	Eser Miktar
4	H <sub>2</sub> O	30	100	6	12
5	MeOH	30	25	6	Eser Miktar
6	EtOH	30	25	6	Eser Miktar
7	EtOH	30	78	6	73
<b>8</b>	<b>EtOH</b>	<b>30</b>	<b>78</b>	<b>4</b>	<b>73</b>
9	EtOH	10	78	6	<50
10	EtOH	-	78	6	~40

<sup>a</sup>Reaksiyon koşulları: Substrat (0,1 mmol), malononitril (0,11 mmol), sodyum azid (0,12 mmol), <sup>b</sup>NMR verimi.

Sulu ortamda gerçekleştirilen reaksiyonun sıcaklığı arttırılmasına rağmen %12 verimle ürün oluşumu tespit edildi (Çizelge 3.3, giriş 4). Etanolün kaynama sıcaklığındaki reaksiyondan maksimum verim elde edildi (Çizelge 3.3, giriş 7). Katalizör miktarının azaltılmasıyla reaksiyon veriminde bir azalma gözlemlendi (Çizelge 3.3, giriş 9). Katalizörün olmadığı reaksiyon şartlarında reaksiyon gerçekleşti, ancak ürün çok düşük bir verimle elde edildi (Çizelge 3.3, giriş 10). Sonuç olarak, 0,1 mmol 2,5-dimetoksibenzaldehit (12), 30 mg katalizör (1), 5,0 mL etanol ile 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (14)'ün sentezi gerçekleştirildi (Çizelge 3.3, giriş 8).

Aril aldehit türevleri, 5-süstitüe-1H-tetrazol türevlerinin sentezi için başlangıç malzemesi olarak kullanıldı. Bu çalışmada aril aldehitlerden tek adımda tetrazol türevleri sentezlendi. Aril aldehit türevleri, benziliden malononitril bileşikleri aracılığıyla tetrazol türevlerine dönüştü. Bu amaçla reaksiyonun ara aşamada kalmaması için sıcaklığın önemli bir parametre olduğu belirlendi. Reaksiyonun düşük sıcaklıkta tetrazol türevlerine dönüşmediği ve benzilidenmalononitril aşamasında kaldığı gözlemlendi. Ayrıca çözücü ortamı da reaksiyonun seyrini etkiledi. Çözünürlüğün güçlü olduğu, metanol ve etanol gibi polaritesi yüksek çözücülerde reaksiyonlar daha iyi verimle tamamlandı. Ayrıca reaksiyonlarda su gibi polar bir çözücü kullanılmasına rağmen istenilen verim elde edilemedi. Katalizör kullanılmadığında oldukça düşük verimle ürün elde edilmesinin yanında reaksiyon süresi oldukça uzadı. Yapılan denemeler ile reaksiyon verimini etkileyen en önemli parametrenin katalizör olduğu ortaya konuldu.

Bazı bileşiklerin sentezi sonucunda yapılan İTK'larda çıkış ve yan ürünlerin gözlemlenmesi tetrazol bileşimini bu karışımdan ayırmak için ilave işlemler gerektirdi. Tetrazol bileşikleri work up ve kristallendirme işlemleri ile saflaştırıldı.

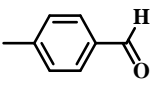
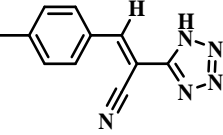
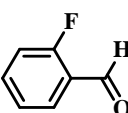
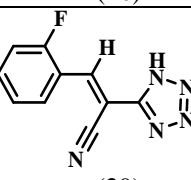
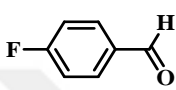
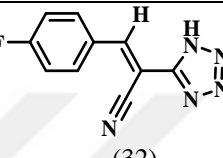
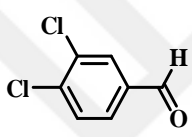
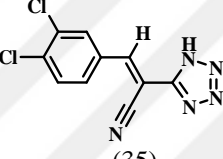
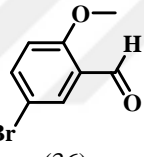
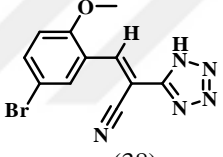
### **3.2.2. Yeni Yöntemle Sentezlenen Tetrazol Türevleri**

5-süstitüe-1H-tetrazol türevleri için gerçekleştirilen optimizasyon çalışmaları sonrasında 12 adet türev sentezlendi. Çizelge 3.4'da bileşiklere dair NMR verimleri, erime noktaları ve reaksiyon süreleri gösterilmiştir.

Çizelge 3.4. Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör ile 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerin *one-pot* sentezi<sup>a</sup>.

Giriş	Substrat	Ürün	Zaman (saat)	Verim <sup>b</sup> (%)	e.n. (°C)
1	 (4)	 (6)	5	95	168-170
2	 (7)	 (9)	5	95	175-179
3	 (10)	 (11)	3	79	*
4	 (12)	 (14)	4	73	177-179
5	 (15)	 (17)	5.5	79	220-222
6	 (18)	 (20)	4	85	212-214
7	 (21)	 (23)	4	85	127-129

Çizelge 3.4 (Devamı). Pd/AlO(OH) NPs (1) katalizör ile 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerin *one-pot* sentezi<sup>a</sup>.

Giriş	Substrat	Ürün	Zaman (saat)	Verim <sup>b</sup> (%)	e.n. (°C)
8	 (24)	 (26)	4	73	150-152
9	 (27)	 (29)	3	95	144-147
10	 (30)	 (32)	4	95	176-179
11	 (33)	 (35)	3	72	134-136
12	 (36)	 (38)	5	60	220-222

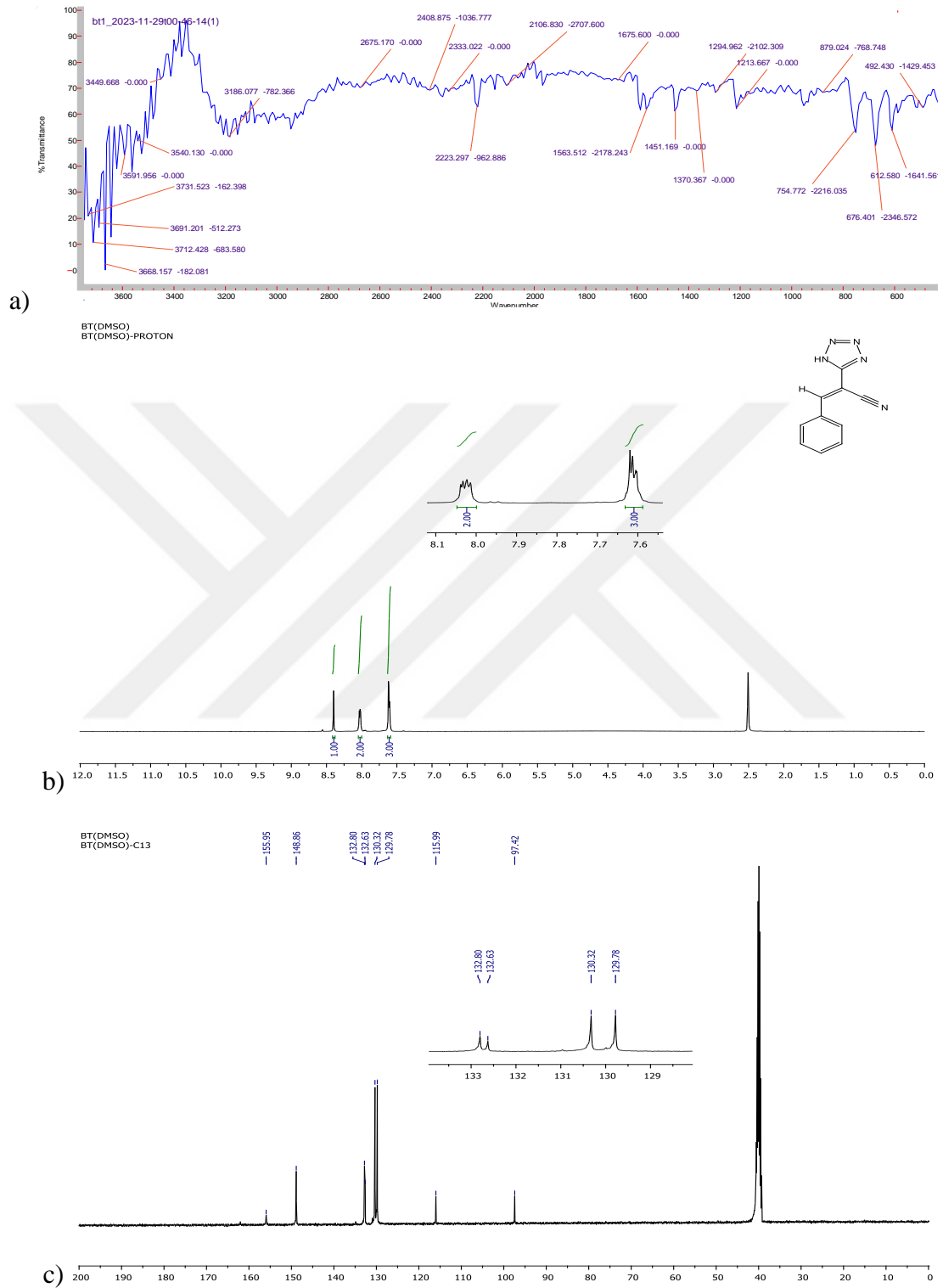
<sup>a</sup>Reaksiyon koşulları: aldehit (0.1 mmol), malononitril (0.11 mmol), sodyum azid (0.12), Pd/AlO(OH) NPs (küttelece %0,5 Pd) katalizör. <sup>b</sup>NMR verimi. \*Erime noktası tespit edilemedi.

5-sübstitüe-1H-tetrazol türevleri aynı şartlarda 3-6 saat aralığında %60 ila %95 verimlerle elde edildi. Bileşiklerin yapıları DMSO-d<sub>6</sub> çözücüsünde <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR spektrumları ile aydınlatıldı. Heterojen katalizör olarak Pd/AlO(OH) NPs kullanıldı. Pd/AlO(OH) NPs (1)'in yüksek verimlerle 5-sübstitüe-1H-tetrazollerin hazırlanması için etkili bir katalizör olduğu gösterildi (Çizelge 3.4). Benzaldehit (4) ve 4-hidroksi benzaldehit (7), 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6) ve 3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9)'a 5 saat içerisinde %95 verimle dönüştürüldü (Çizelge 3.4, giriş 1, 2). 2,5-dihidroksibenzaldehit (10), 3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11)'e 3 saat içinde %79 verimle dönüştürüldü (Çizelge 3.4, giriş 3). 2,5-dimetoksibenzaldehit (12), 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (14)'e 4 saat içinde %73 verimle dönüştürüldü (Çizelge 3.4, giriş 4). 3,4-dimetoksibenzaldehit (15), 3-(3,4-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-yl)akrilonitril (17)'ye 5,5 saatte %79 verimle

dönüştürüldü (Çizelge 3.4, giriş 5). 3,4,5-trimetoksibenzaldehit (18) ve 2-metilbenzaldehit (21), 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)akrilonitril (20) ve 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23)'e 4 saat içerisinde %85 verimle dönüştürüldü (Çizelge 3.4, giriş 6, 7). 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26) 4 saat içinde %73 verimle elde edildi (Çizelge 3.4, giriş 8). 3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29) ve 3-(4-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (32) %95 verimle elde edildi (Çizelge 3.4, giriş 9, 10). 3,4-diklorobenzaldehit (33), 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35)'e 3 saatte %72 verimle dönüştürüldü (Çizelge 3.4, giriş 11). 5-bromo-2-metoksibenzaldehit (36), 3-(5-bromo-2-metoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (38)'e 5 saatte %60 verimle dönüştürüldü (Çizelge 3.4, giriş 12).

Genel olarak aromatik halkaya bağlı olan metil, hidroksi ve metoksi gibi elektron sağlayıcı gruplar ve halojen gibi elektron çekici gruplar karbonil grubunun etkinliğini değitirmektedir. Çizelge 3.4'teki farklı reaksiyon verimleri ve süreleri bu özelliklerin sonucunda ortaya çıkmaktadır. Ancak reaksiyonlarda elektronik etkilerin yanı sıra çözücü sistemi, sıcaklık ve sterik etkiler de reaksiyon verim ve süresini etkilemektedir.

### 3.2.1. Spektrumların Değerlendirilmesi

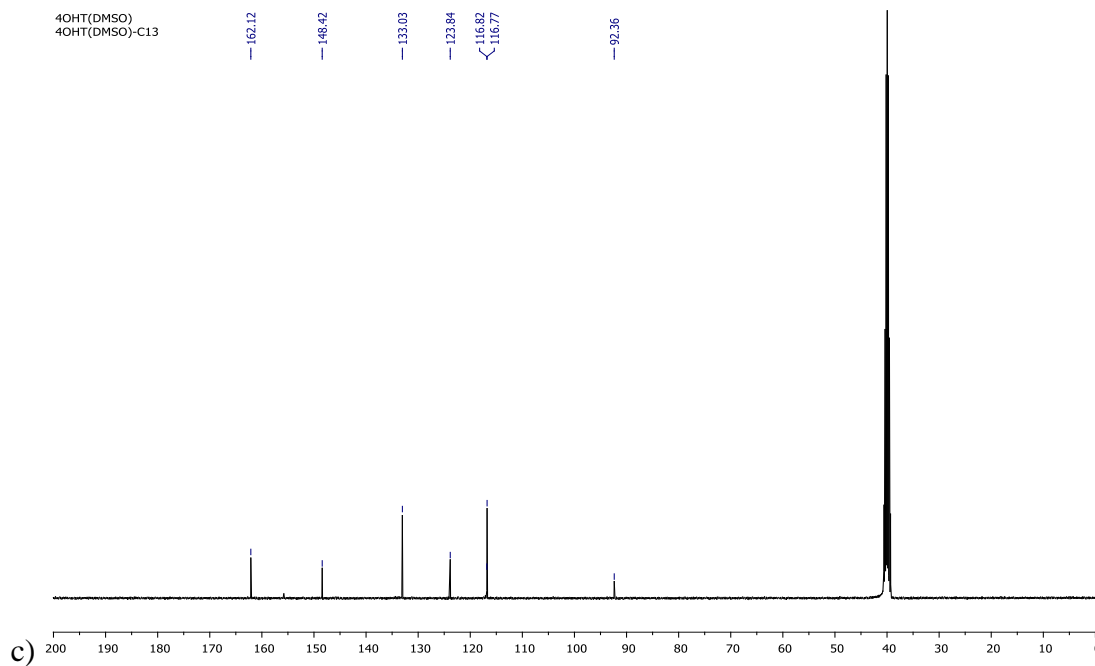
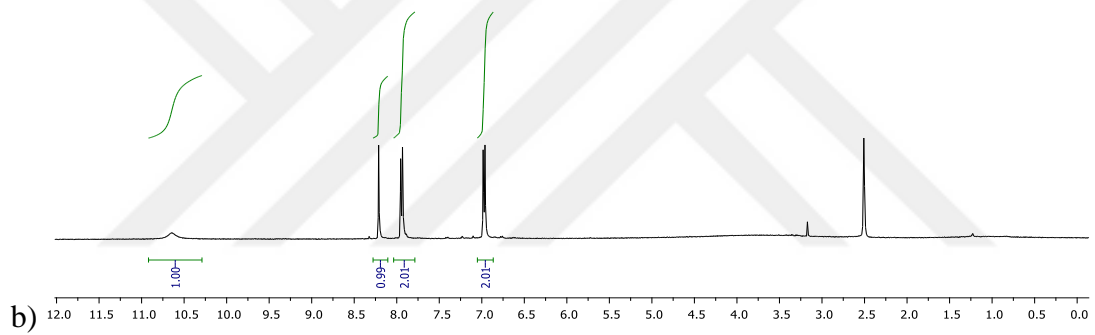
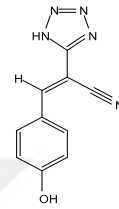
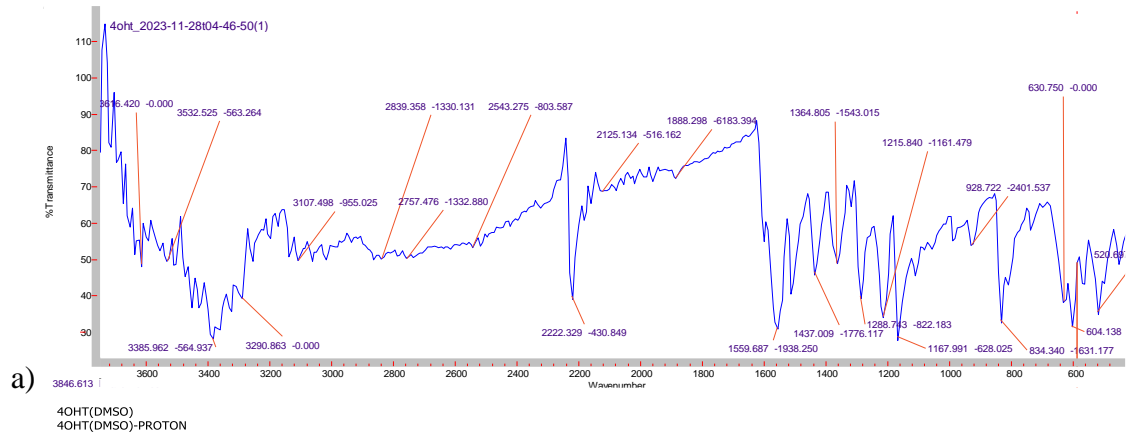


Şekil 3.13. 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6)'nın a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

**3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.40 (s, 1H, C=CH), 8.10 – 7.96 (m, 2H, ArH), 7.68 – 7.48 (m, 3H, ArH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155.95, 148.86, 132.80, 132.63, 130.32, 129.78, 115.99, 97.42. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3591.9, 3186.1, 2223.3, 1563.5, 1451.2, 1370.4, 1294.6, 1213.7



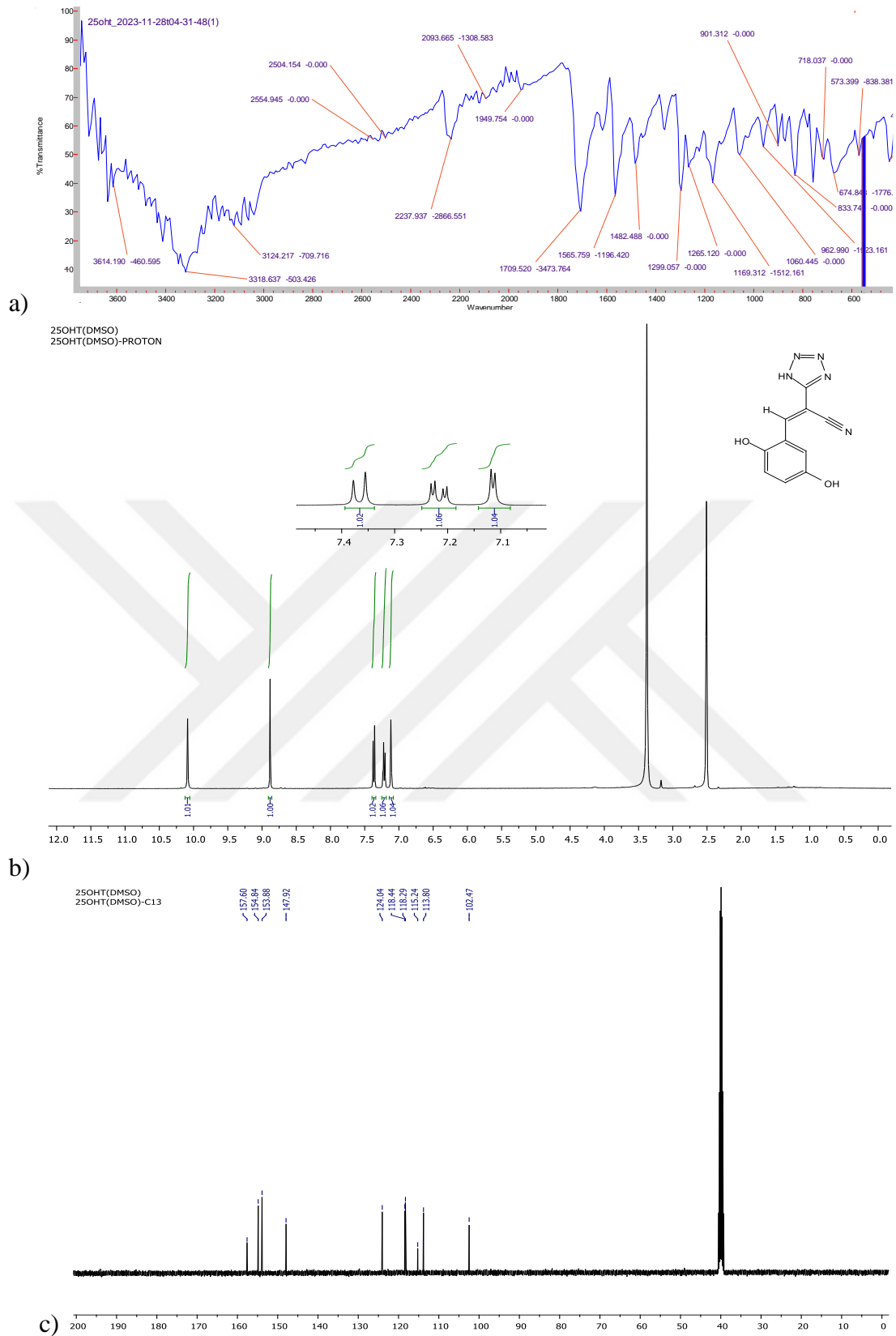


Şekil 3.14. 3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9)'un a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

**3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.64 (bs, 1H, OH), 8.21 (s, 1H, C=CH), 7.94 (d, J = 8.8 Hz, 2H, ArH), 6.97 (d, J = 8.7 Hz, 2H, ArH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.12, 148.42, 133.03, 123.84, 116.82, 116.77, 92.36. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3385.9, 3107.5, 2222.3, 1559.7, 1437.1, 1364.8, 1288.7





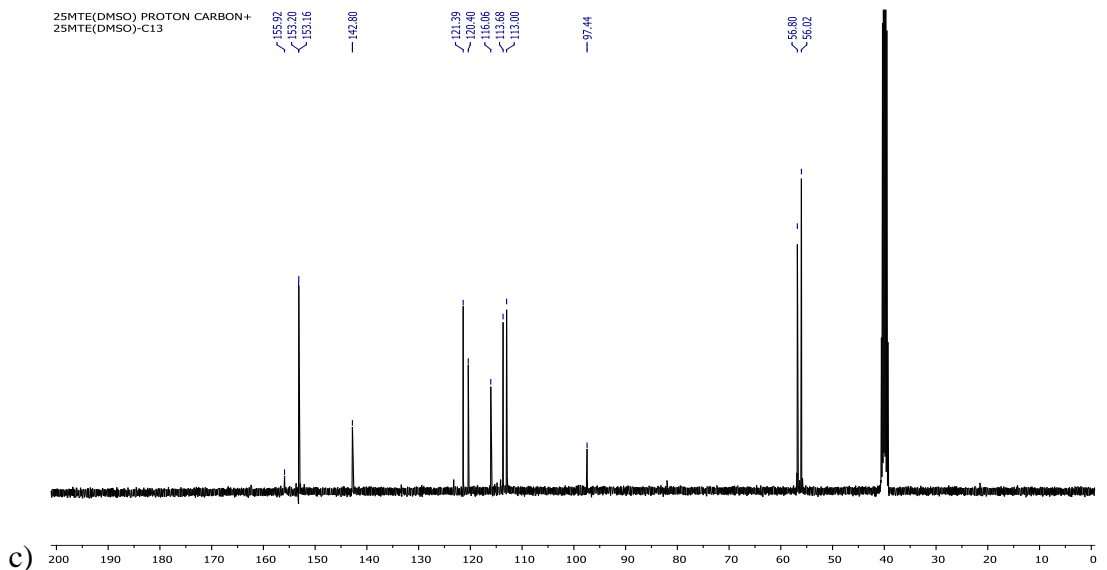
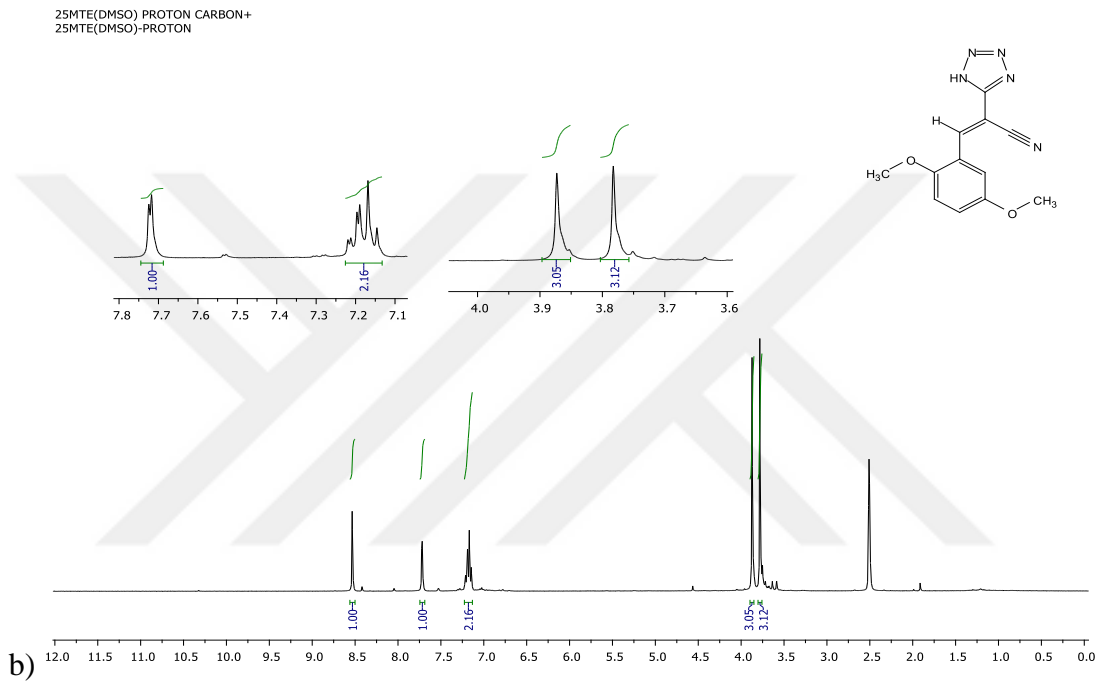
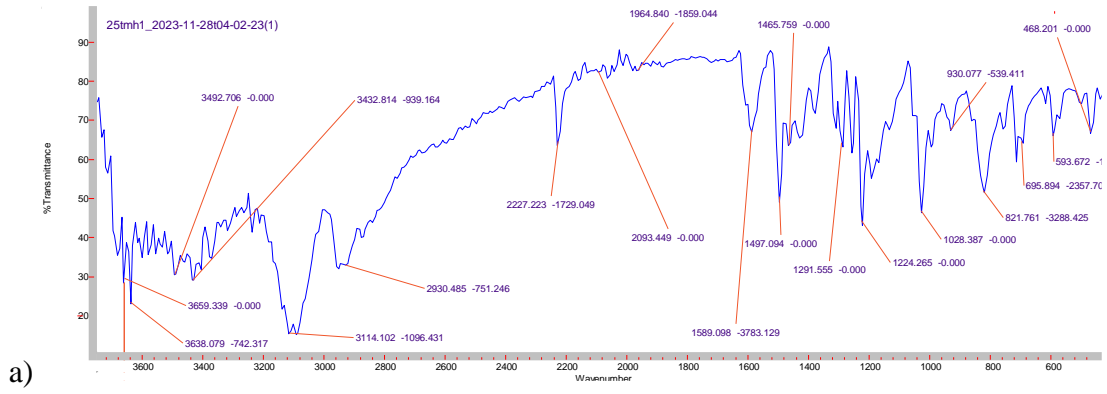
Şekil 3.15. 3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11)'in a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

**3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.09 (s, 1H, ArOH), 8.88 (s, 1H, C=CH), 7.37 (d,  $J$  = 9.0 Hz, 1H, ArH), 7.22 (dd,  $J$  = 9.0, 2.9 Hz, 1H, ArH), 7.11 (d,  $J$  = 2.9 Hz, 1H, ArH).

$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157.60, 154.84, 153.88, 147.92, 124.04, 118.44, 118.29, 115.24, 113.80, 102.47. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3318.6, 3124.2, 2237.9, 1565.7, 1482.5, 1299.0, 1265.1



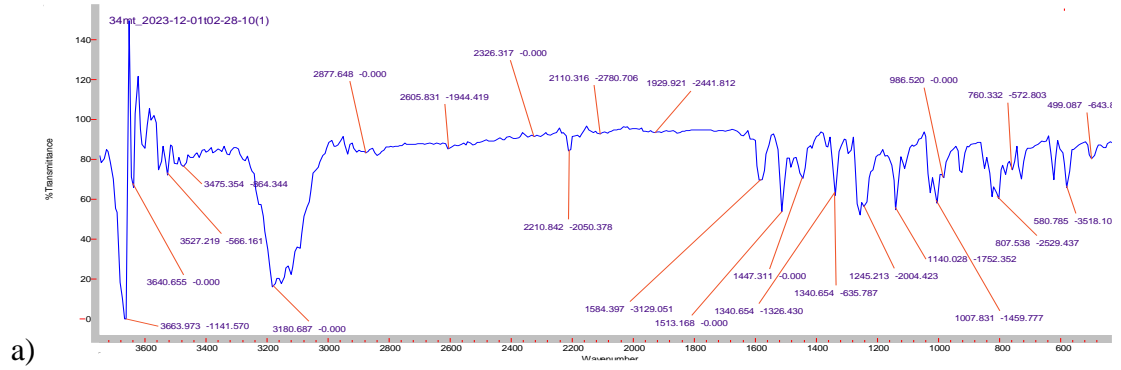


Şekil 3.16. 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (14)'ün a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

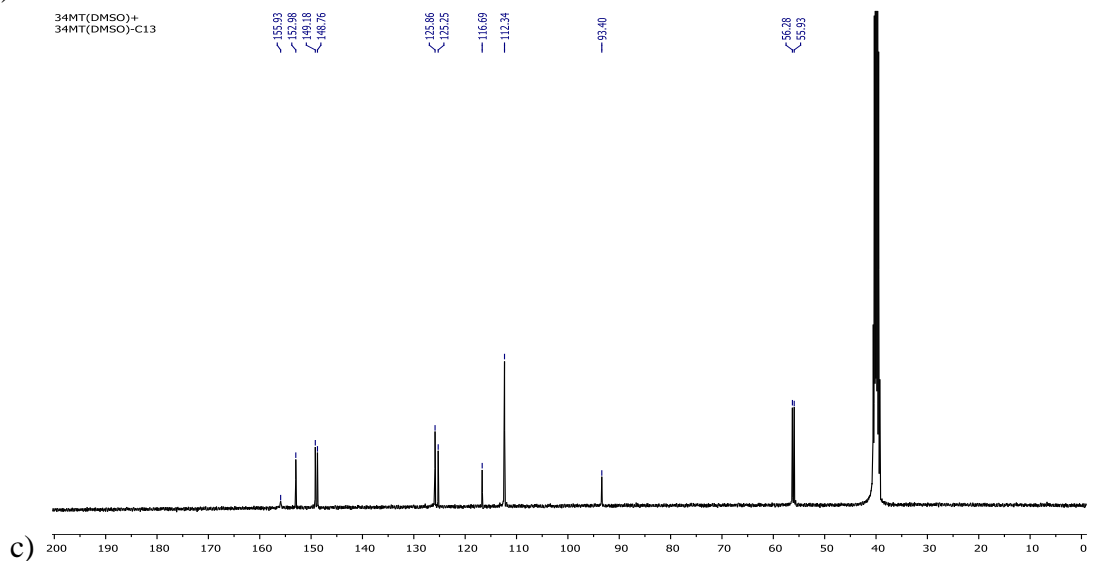
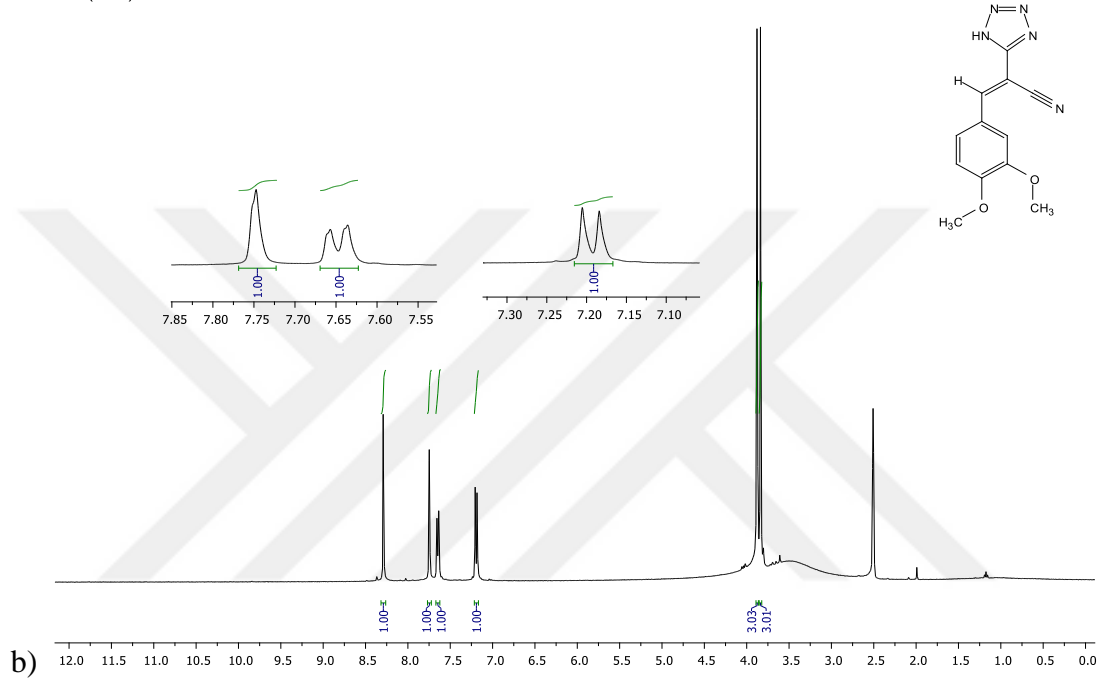
**(3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (14):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.53 (s, 1H, C=CH), 7.72 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H, ArH), 7.23-7.12 (m, 2H, ArH), 3.87 (s, 3H, OCH $_3$ ), 3.78 (s, 3H, OCH $_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155.92, 153.20, 153.16, 142.80, 121.39, 120.40, 116.06, 113.68, 113.00, 97.44, 56.80, 56.02. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3492.7, 3114.1, 2930.4, 2227.2, 1589.1, 1497.1, 1465.7, 1224.3, 1028.4





34MT(DMSO)+  
34MT(DMSO)-PROTON

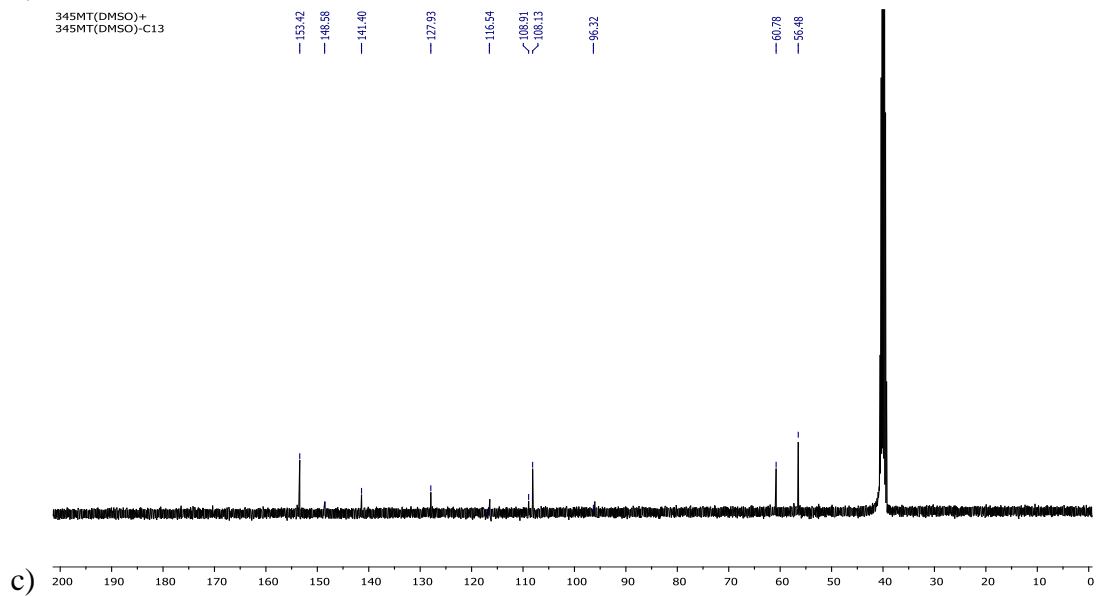
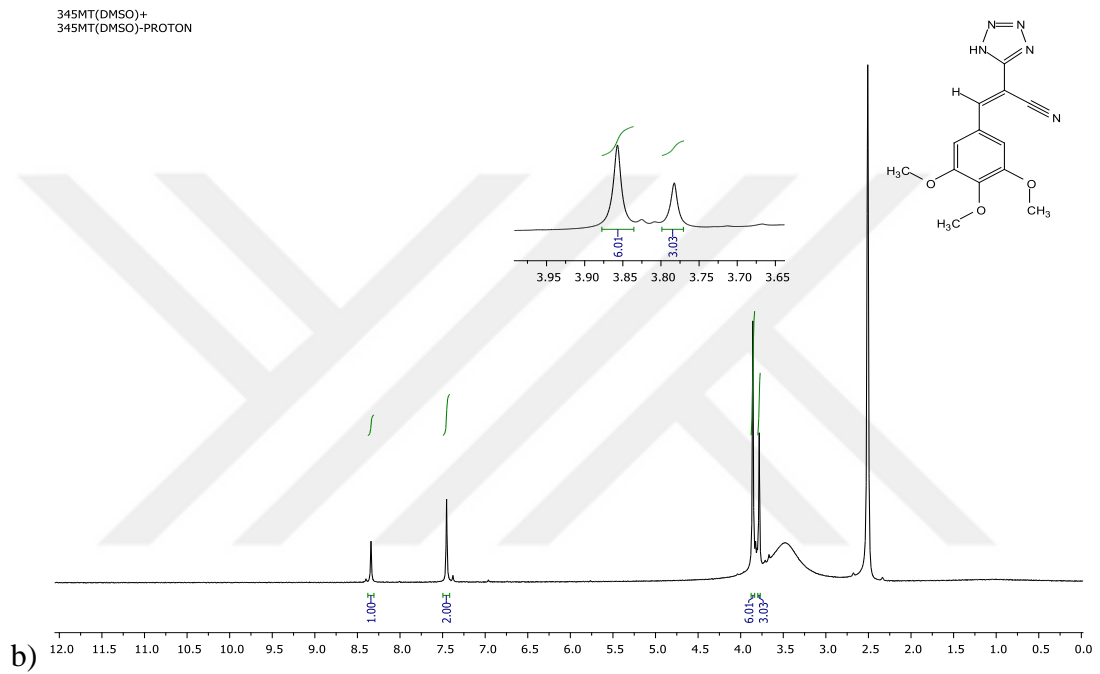
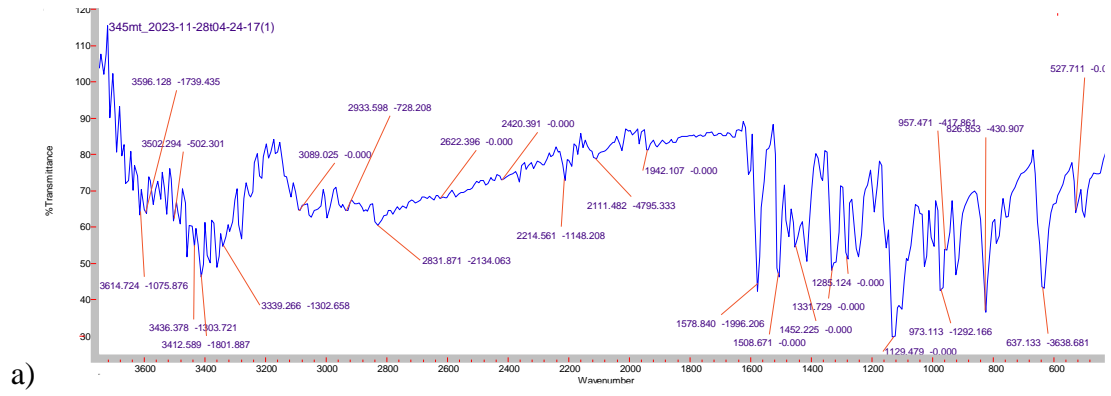


Şekil 3.17. 3-(3,4-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (17)'nin a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

**3-(3,4-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (17):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.29 (s, 1H, C=CH), 7.75 (s, 1H, ArH), 7.65 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H, ArH), 7.19 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, ArH), 3.88 (s, 3H, OCH $_3$ ), 3.84 (s, 3H, OCH $_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155.93, 152.98, 149.18, 148.76, 125.86, 125.25, 116.69, 112.34, 93.40, 56.28, 55.93. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3180.7, 2210.8, 1584.4, 1513.2, 1447.3, 1340.6, 1245.2, 1140.0



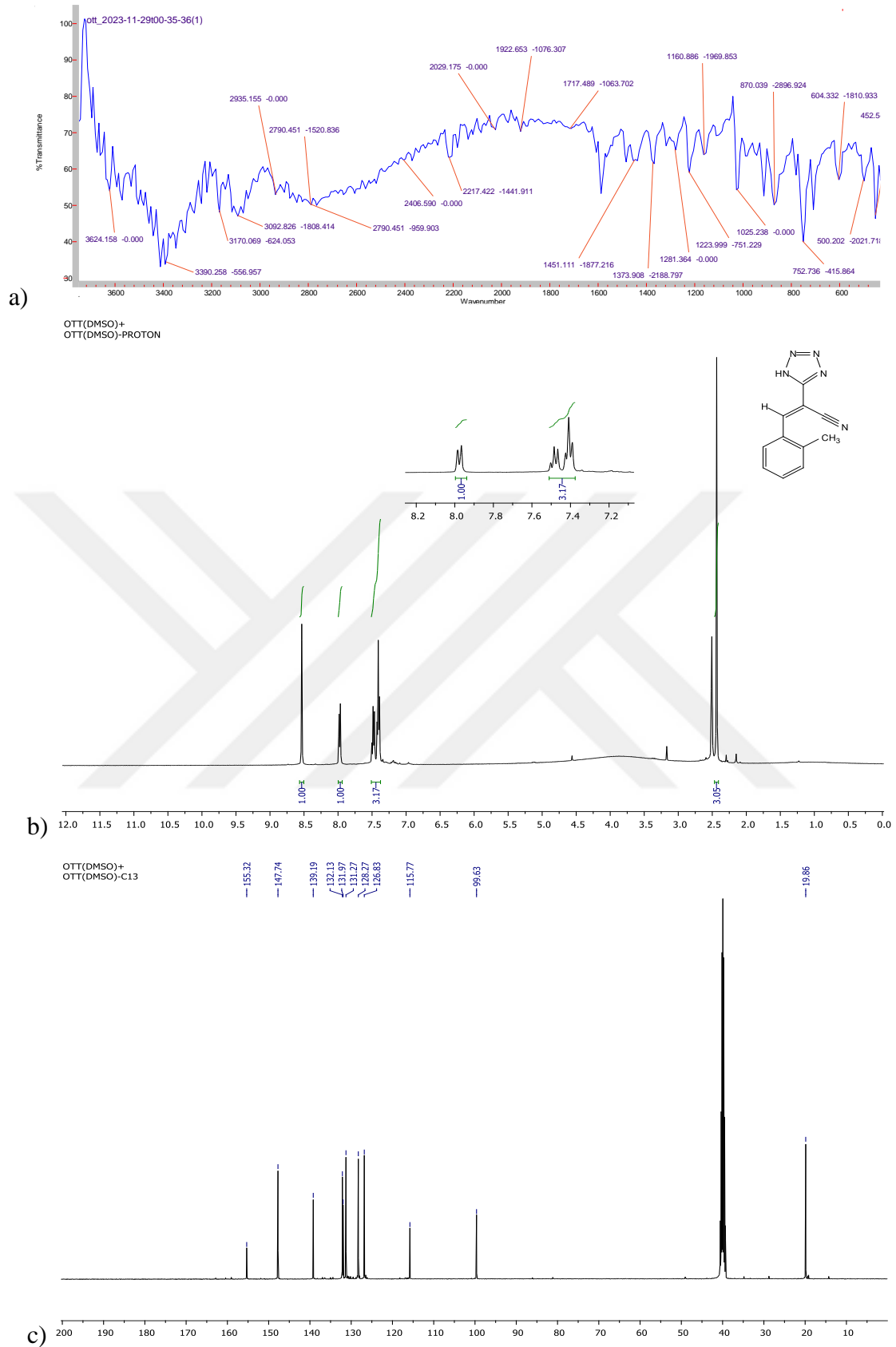


Şekil 3.18. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)akrilonitril (20)'nin a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

**2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)akrilonitril (20):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.34 (s, 1H, C=CH), 7.45 (s, 2H, ArH), 3.86 (s, 6H, OCH $_3$ ), 3.78 (s, 3H, OCH $_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  153.42, 148.58, 141.40, 127.93, 116.54, 108.91, 108.13, 96.32, 60.78, 56.48. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3412.6, 3089.0, 2933.6, 2214.6, 1578.8, 1508.7, 1452.2, 1331.7, 1129.5



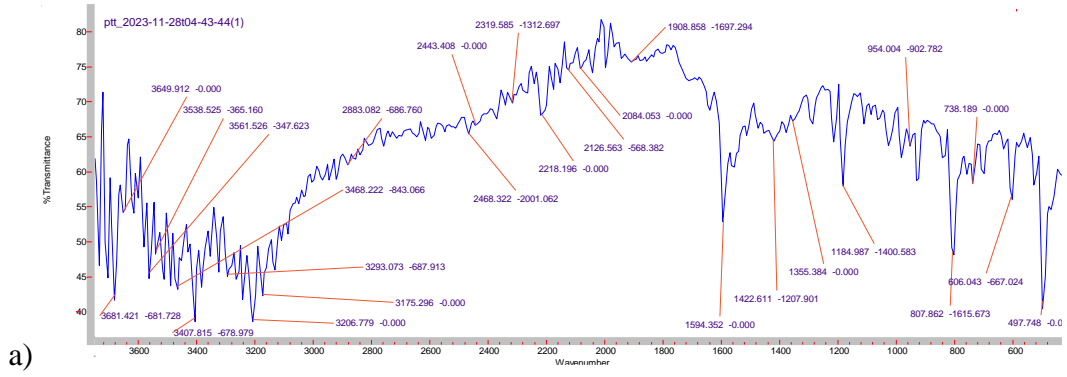


Şekil 3.19. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23)'ün a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

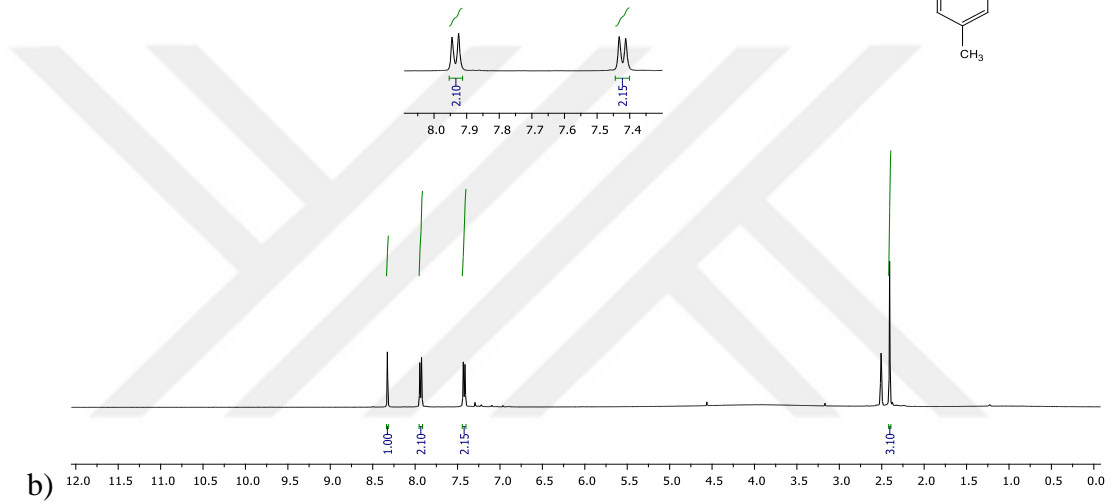
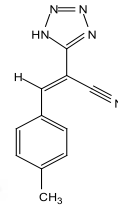
**2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.53 (s, 1H, C=CH), 7.97 (d,  $J = 7.4$  Hz, 1H, ArH), 7.52-7.36 (m, 3H, ArH), 2.43 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155.32, 147.74, 139.19, 132.13, 131.97, 131.27, 128.27, 126.83, 115.77, 99.63, 19.86. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3390.2, 3170.1, 3092.8, 2217.4, 1599.0, 1451.1, 1373.9, 1281.4, 1223.9, 1025.2.

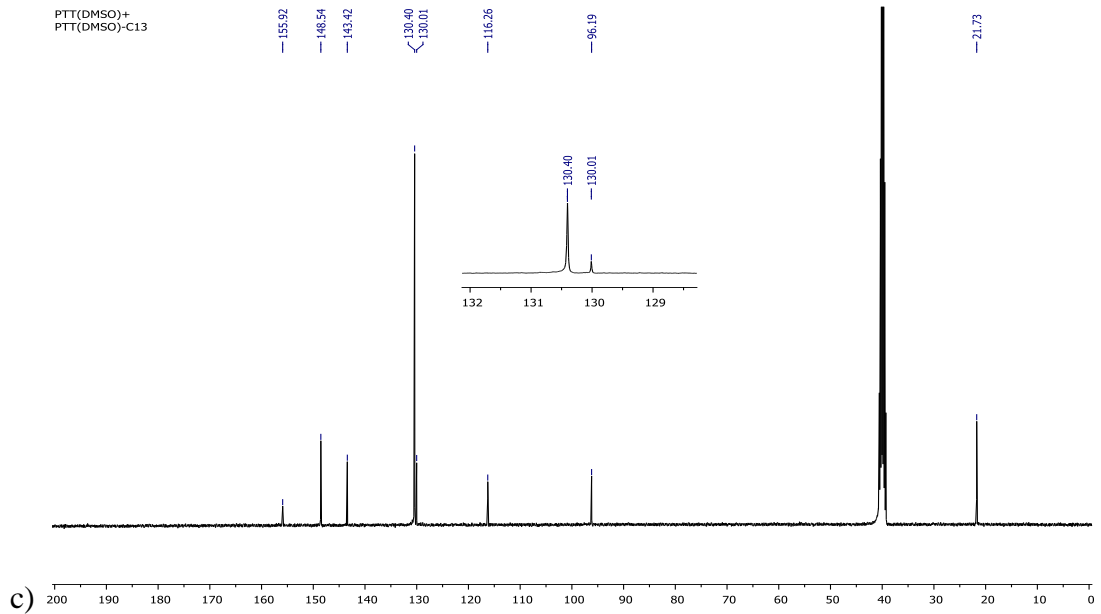




PTT(DMSO)+  
PTT(DMSO)-PROTON



PTT(DMSO)+  
PTT(DMSO)-C13

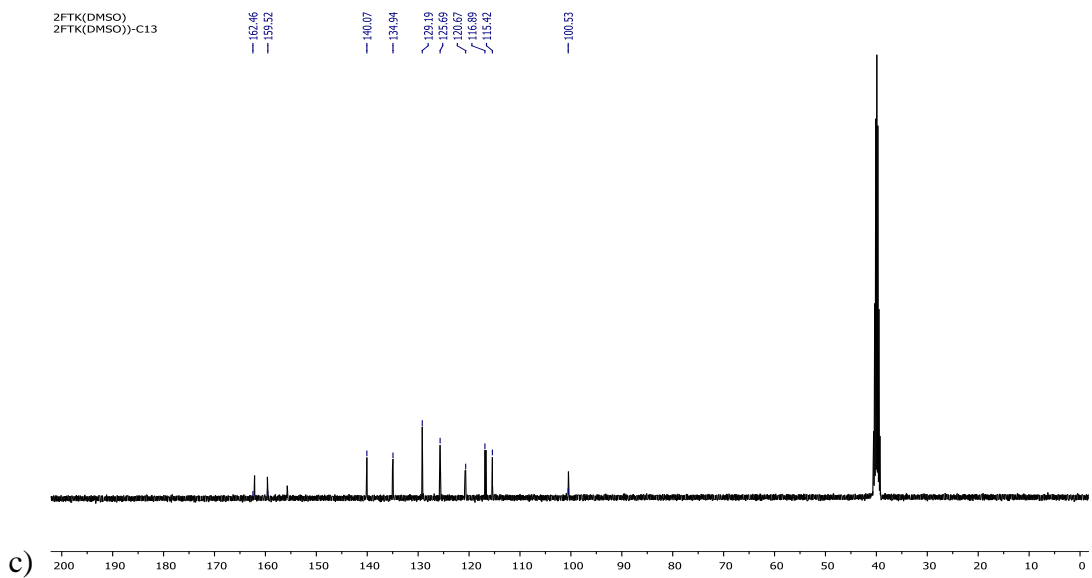
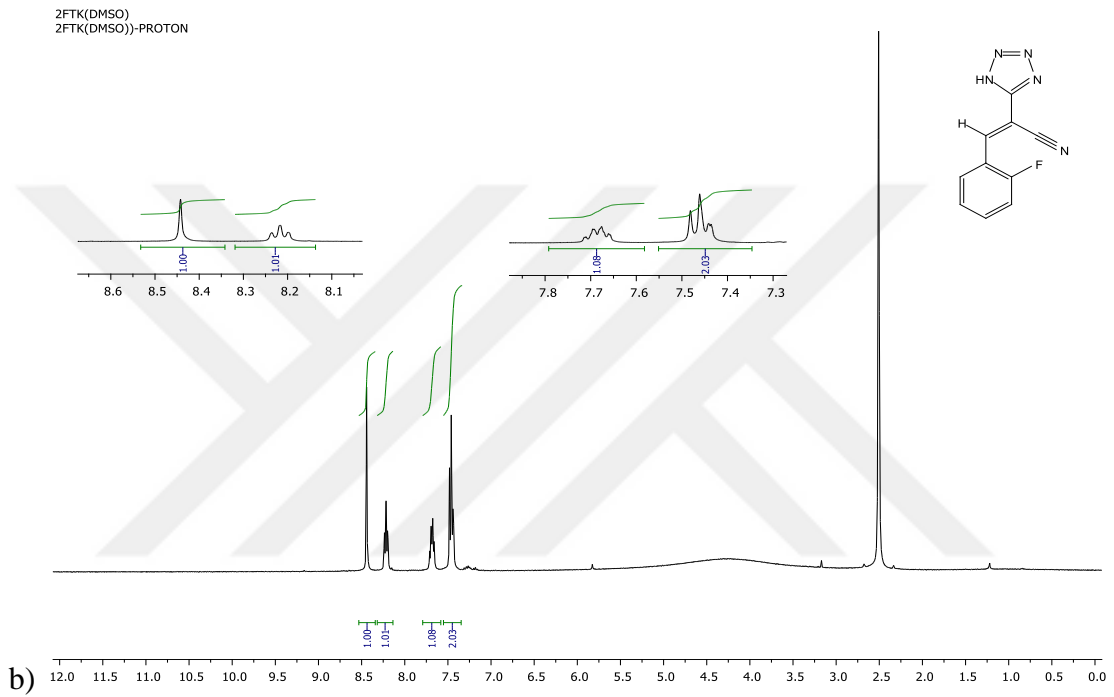
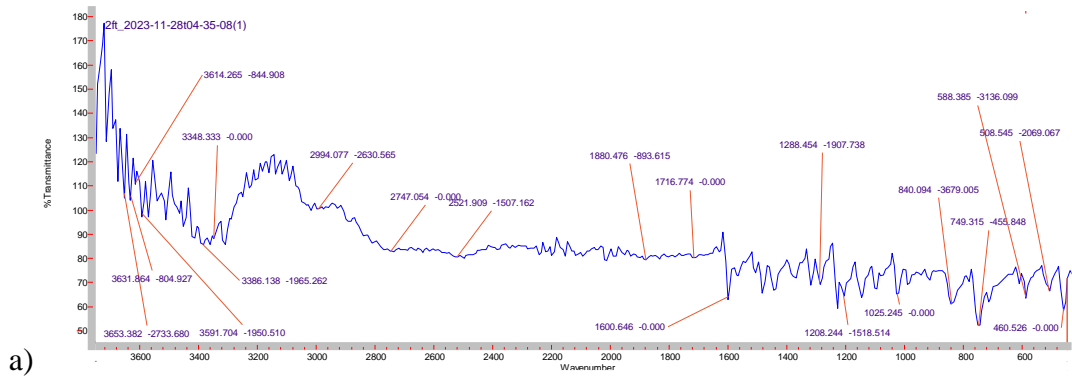


Şekil 3.20. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26)'nın a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

**2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.33 (s, 1H, C=CH), 7.93 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, ArH), 7.42 (d,  $J = 8.1$  Hz, 2H, ArH), 2.41 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  155.92, 148.54, 143.42, 130.40, 130.01, 116.26, 96.19, 21.73. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3407.8, 3206.8, 3175.3, 2218.2, 1594.3, 1422.6, 1184.9



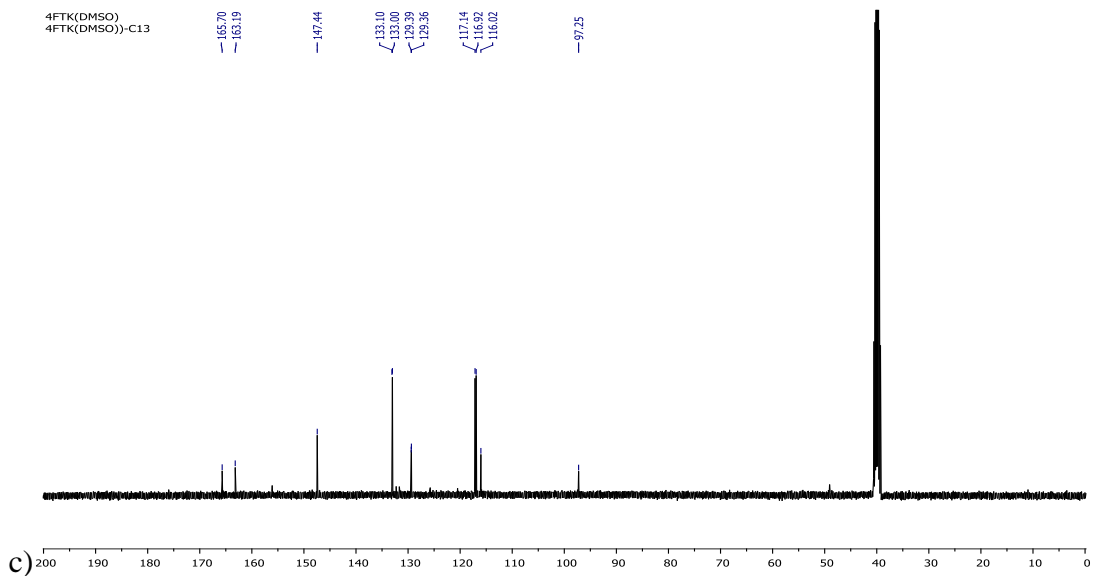
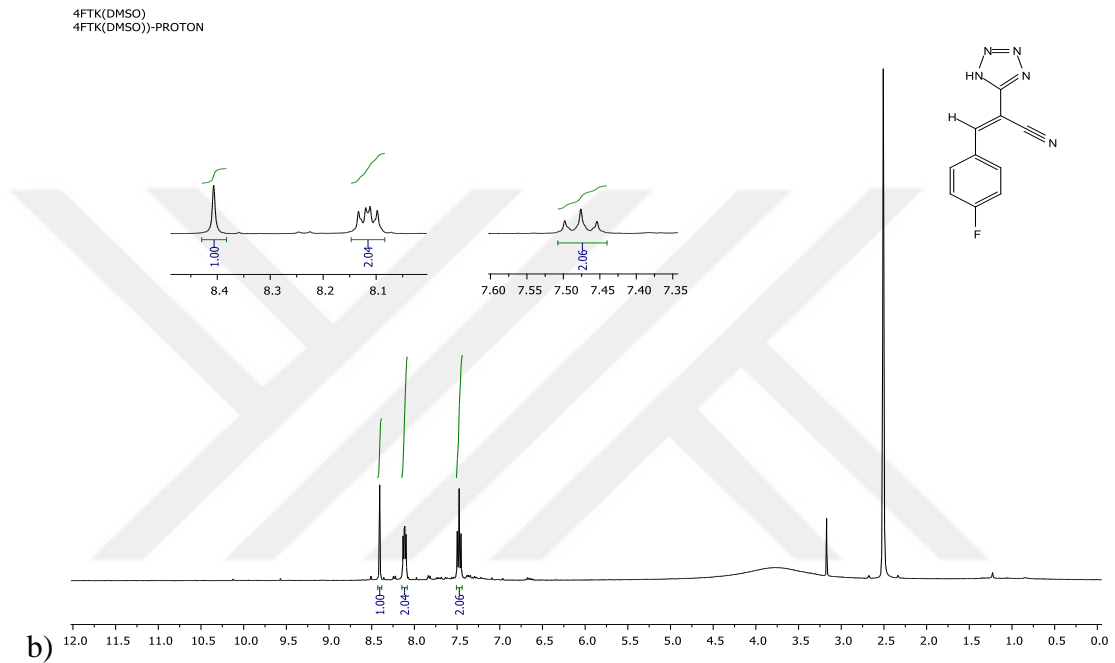
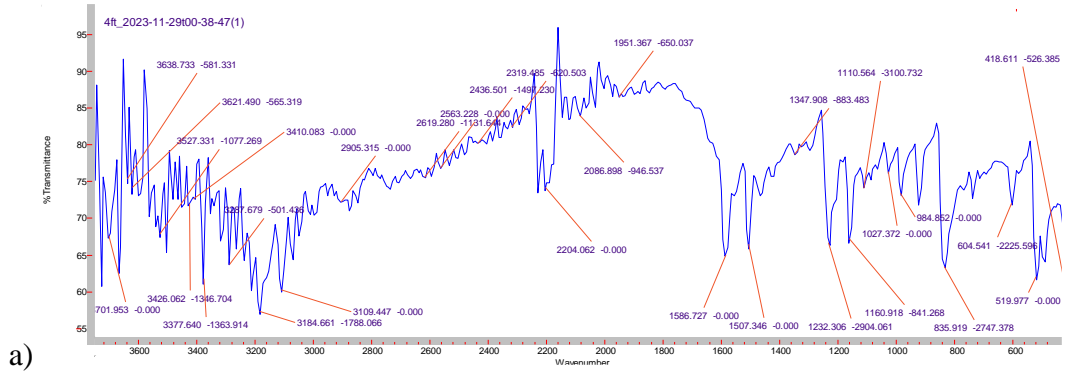


Şekil 3.21. 3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29)'un a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

**3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.44 (s, 1H, C=CH), 8.22 (m, 1H, ArH), 7.69 (m, 1H, ArH), 7.51-7.40 (m, 2H, ArH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.46, 159.52, 140.07, 134.94, 129.19, 125.69, 120.67, 116.89, 115.42, 100.53. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3386.1, 2994.1, 1600.6, 1288.4, 1025.2



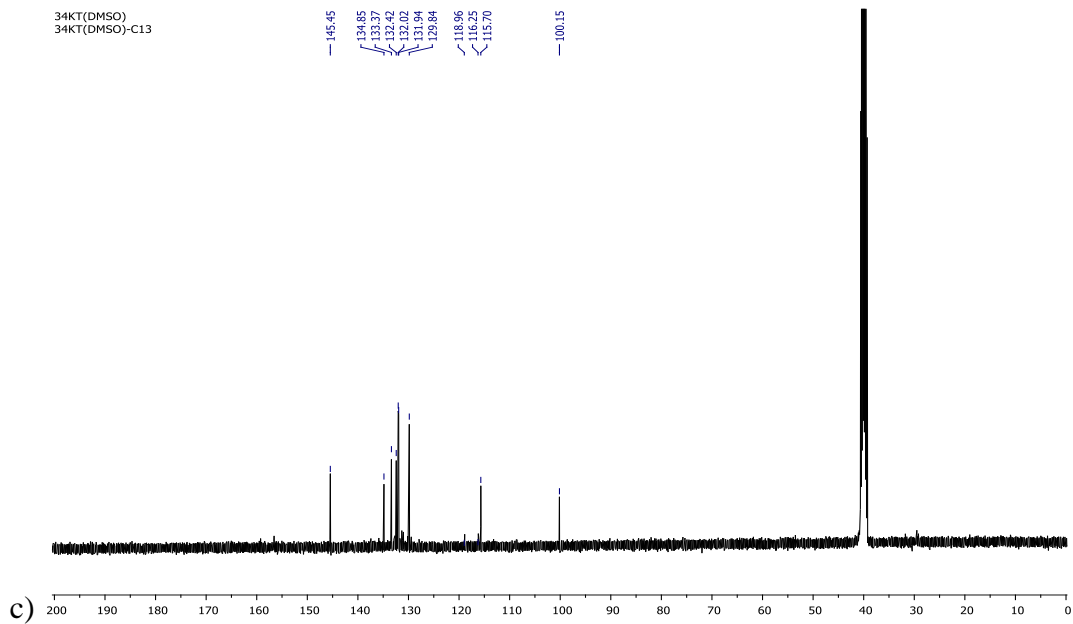
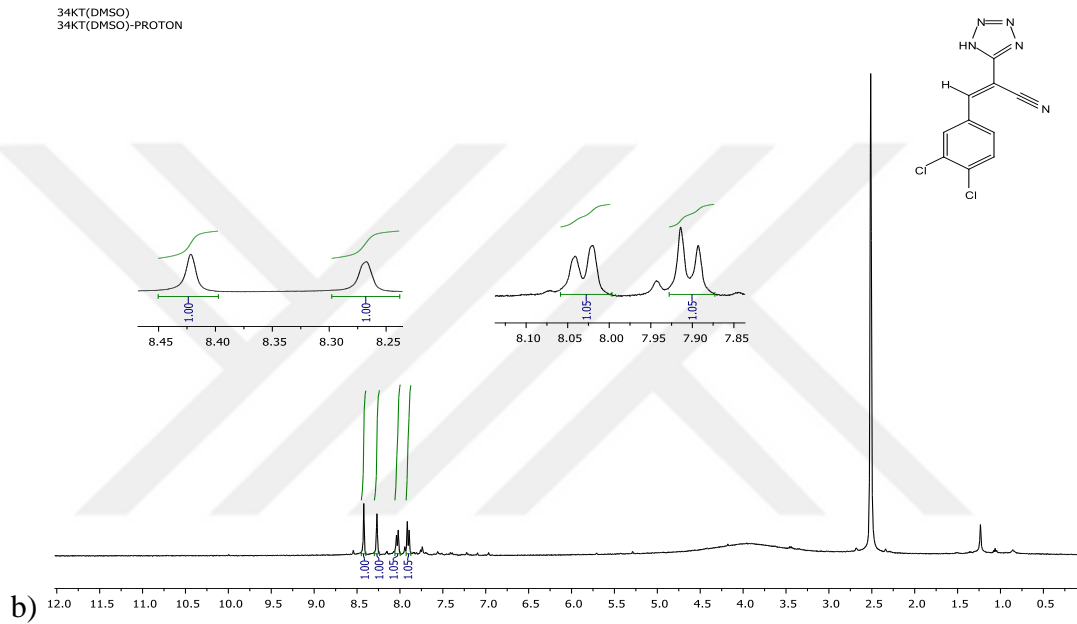
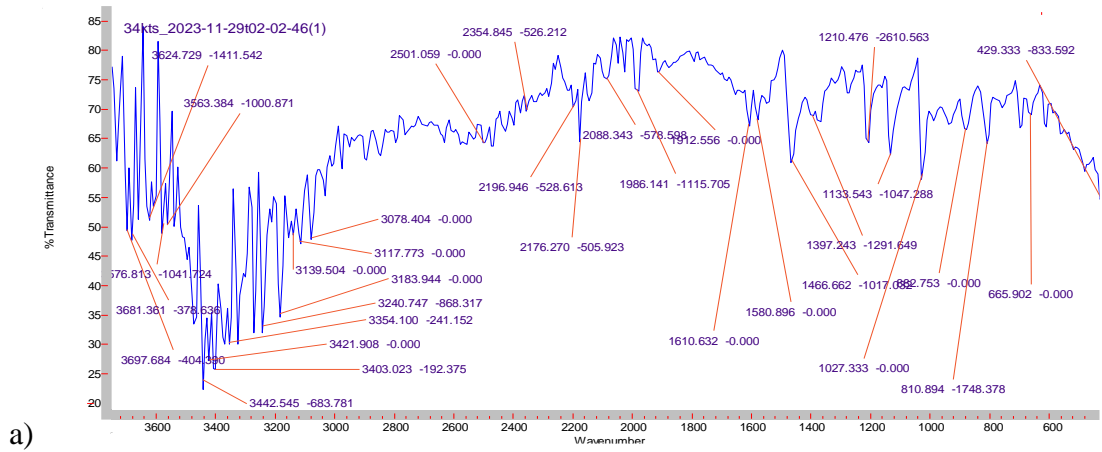


Şekil 3.22. 3-(4-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (32)'nin a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

**3-(4-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (32):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.41 (s, 1H, C=CH), 8.20-7.99 (m, 2H, ArH), 7.53-7.39 (m, 2H, ArH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  165.70, 163.19, 147.44, 133.10, 133.00, 129.39, 129.36, 117.14, 116.92, 116.02, 97.25. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3377.6, 3184.7, 3109.4, 2204.1, 1586.7, 1507.3, 1232.3, 1160.9



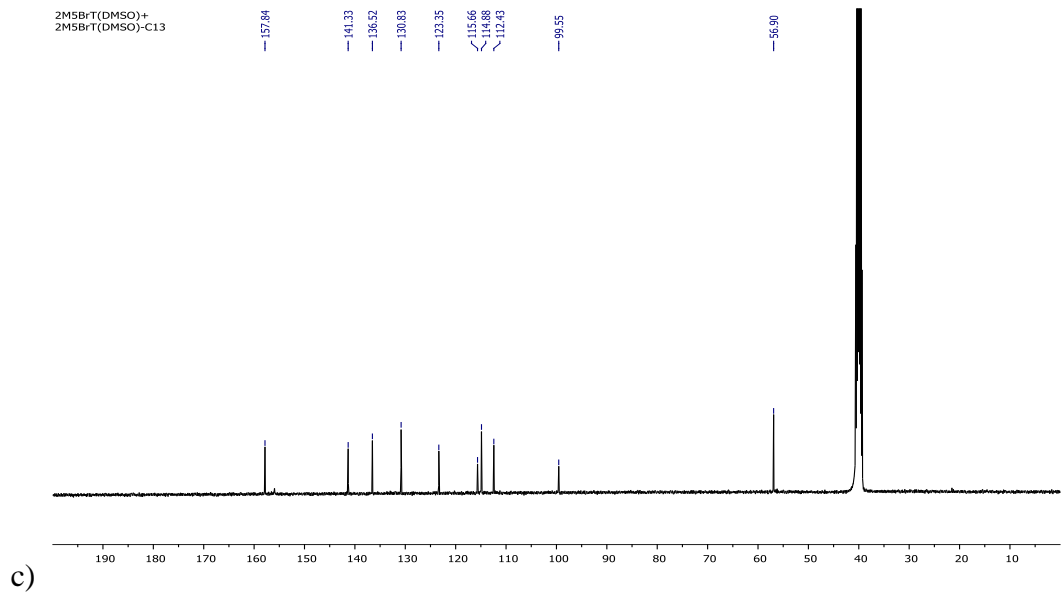
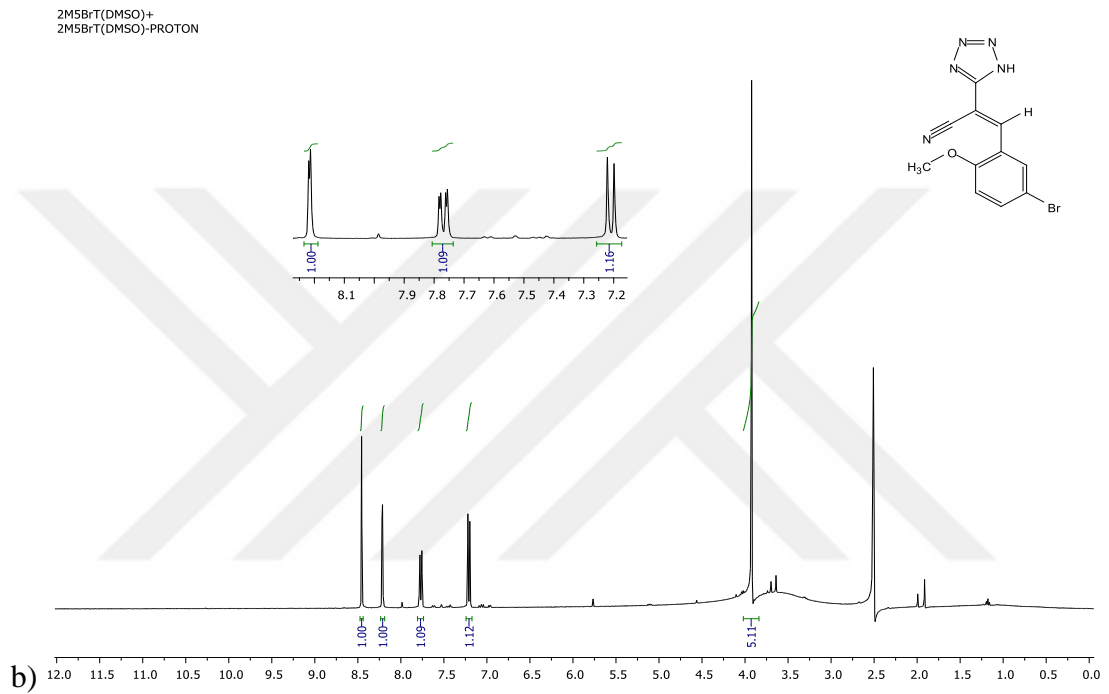
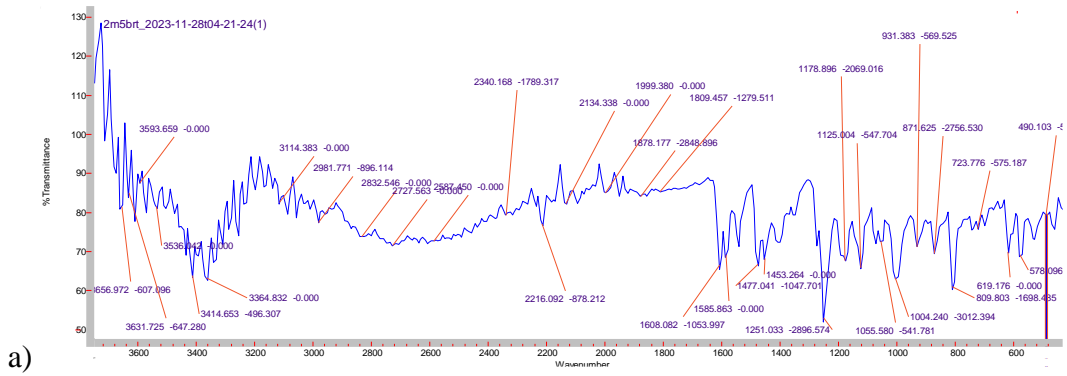


Şekil 3.23. 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35)'in a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

**3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.42 (s, 1H, C=CH), 8.27 (s, 1H, ArH), 8.03 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, ArH), 7.90 (d,  $J = 8.5$  Hz, 1H, ArH).  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  145.45, 134.85, 133.37, 132.42, 132.02, 131.94, 129.84, 118.96, 116.25, 115.70, 100.15. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3442.5, 3183.9, 3078.4, 2176.3, 1610.6, 1580.9, 1466.7, 1397.2, 1210.5, 1027.3





Şekil 3.24. 3-(5-bromo-2-metoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (38)'in a) FT-IR, b)  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz), c)  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumu.

**3-(5-bromo-2-metoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (38):**

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.46 (s, 1H, C=CH), 8.22 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H, ArH), 7.77 (dd,  $J = 8.9, 2.4$  Hz 1H, ArH), 7.21 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H, ArH), 3.92 (s, 3H, OCH $_3$ ).

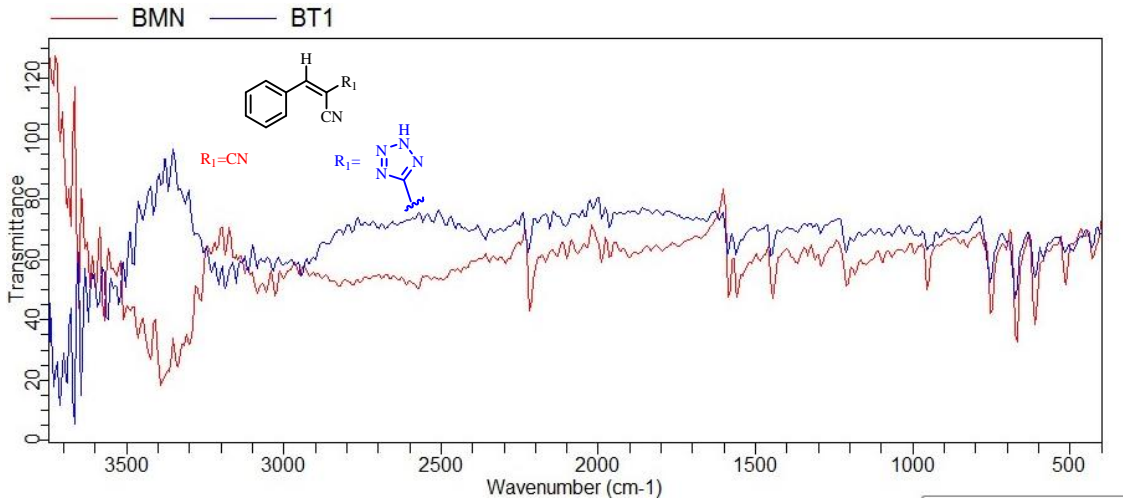
$^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  157.84, 141.33, 136.52, 130.83, 123.35, 115.66, 114.88, 112.43, 99.55, 56.90. FT-IR( $\text{cm}^{-1}$ ): 3414.6, 3114.4, 3114.4, 2981.8, 2216.1, 1608.1, 1585.9, 1477.0, 1251.0, 1178.9, 1004.2

### 3.3. FT-IR SPEKTRUMLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

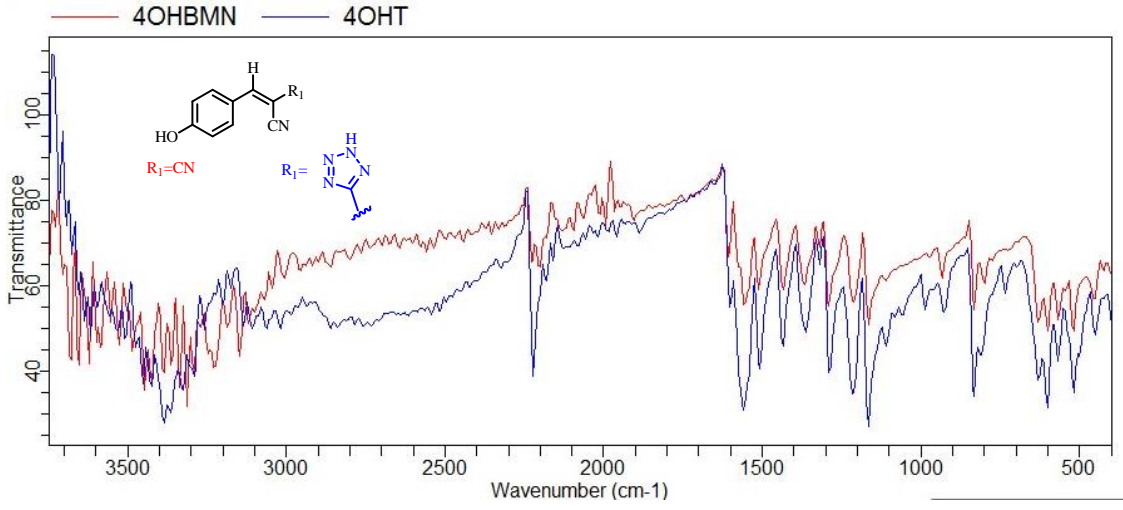
Çalışmada sentezlenen bazı BMN ve tetrazol türevlerinin FT-IR spektrumlarındaki karakteristik pikler karşılaştırılarak yapılar aydınlatıldı. Spektrumlarda BMN ve tetrazol türevlerinin fonksiyonel grupları R<sub>1</sub> ile ifade edildi.

BMN türevleri olarak 2-benzilidenemalononitril (5), 2-(4-hidroksibenziliden) malononitril (8), 2-(3,4,5-trimetoksibenziliden)malononitril (19), 2-(2-metilbenziliden) malononitril (22), 2-(4-metilbenziliden)malononitril (25) ve 2-(2-fluorobenziliden) malononitril (28); 5-süstitüe-1H-tetrazol türevi olarak 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6), 3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9), 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)akrilonitril (20), 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23), 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26) ve 3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29) tercih edildi (Şekil 3.25-Şekil 3.30).

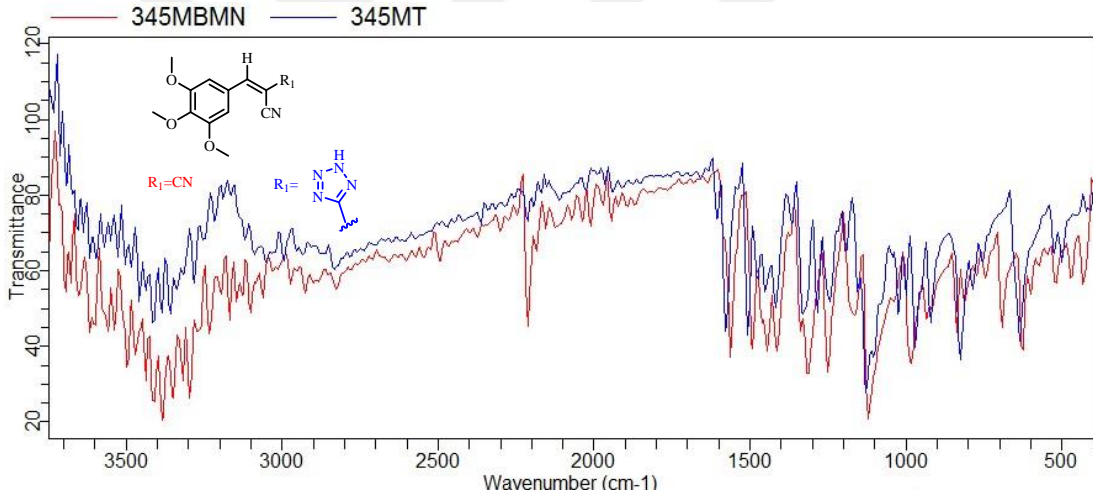
Tüm bu moleküllerdeki en belirleyici sinyal yaklaşık 2300 cm<sup>-1</sup>'dir. Bu dalga sayısı civarında sinyal veren fonksiyonel grup nitril (-CN) grubudur. Diğer taraftan yapısında hidroksi grubu barındıran moleküller için de 3500 cm<sup>-1</sup> civarında yayvan bir bant olarak görmek mümkündür. Nitril gruplarındaki sinyal kaymaları tetrazol bileşiklerinin oluşumuna dair önemli bir kanıt olarak gösterilebilir. BMN türevlerinde iki adet nitril grubu vardır. Reaksiyon sonrası tetrazol halkası oluştuğunda nitril grubu bir tane kalmaktadır. Spektrumlardaki 2300 cm<sup>-1</sup>'deki sinyaller karşılaştırıldığında tetrazol türevlerindeki sinyal şiddetlerinde azalma gözlemlendi. Bu da nitril grubunun reaksiyona girdiğinin göstergesidir.



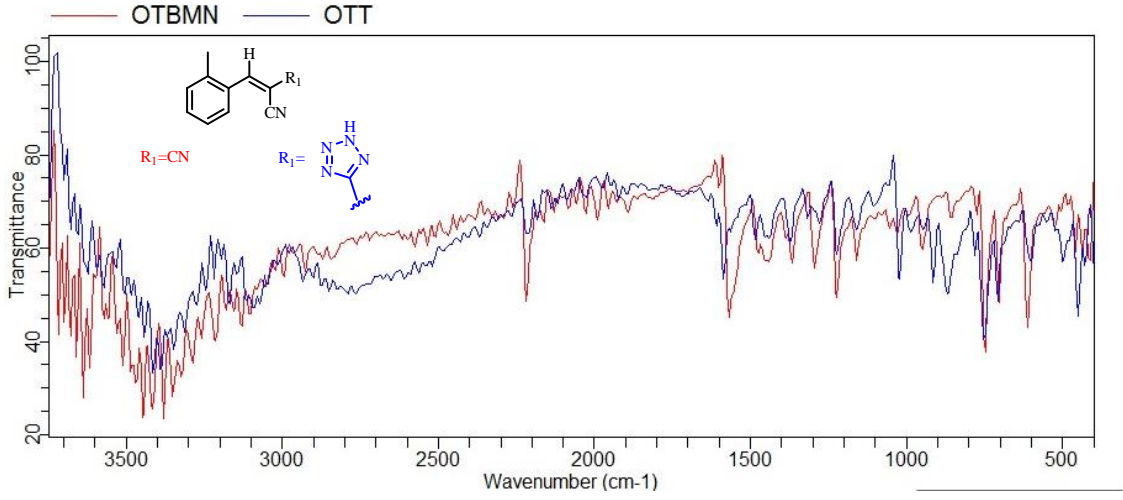
Şekil 3.25. 2-benzilidenemalononitril (5) ve 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6)'nın FT-IR spektrumları.



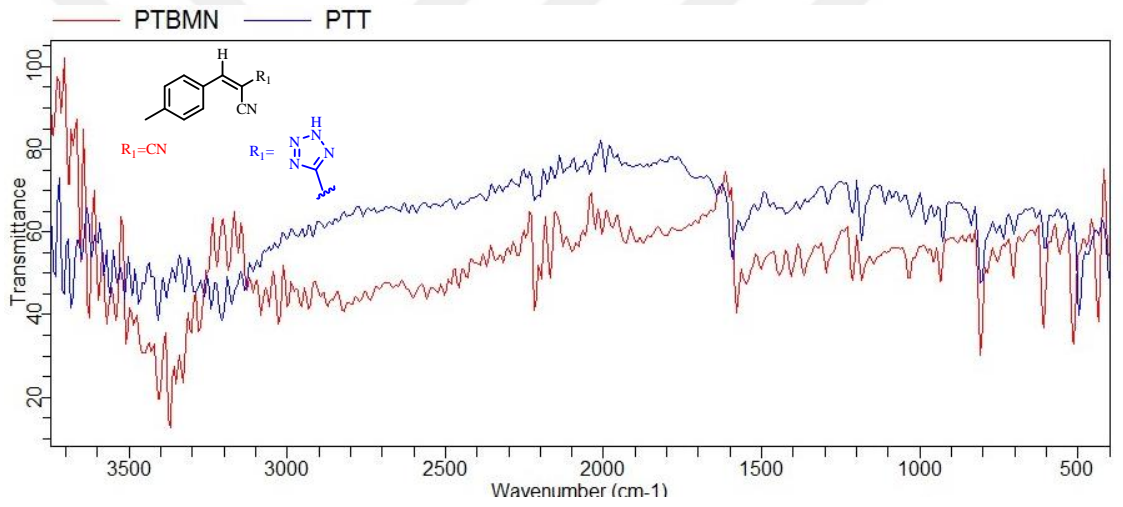
Şekil 3.26. 2-(4-hidroksibenziliden)malononitril (8) ve 3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (9)'un FT-IR spektrumları.



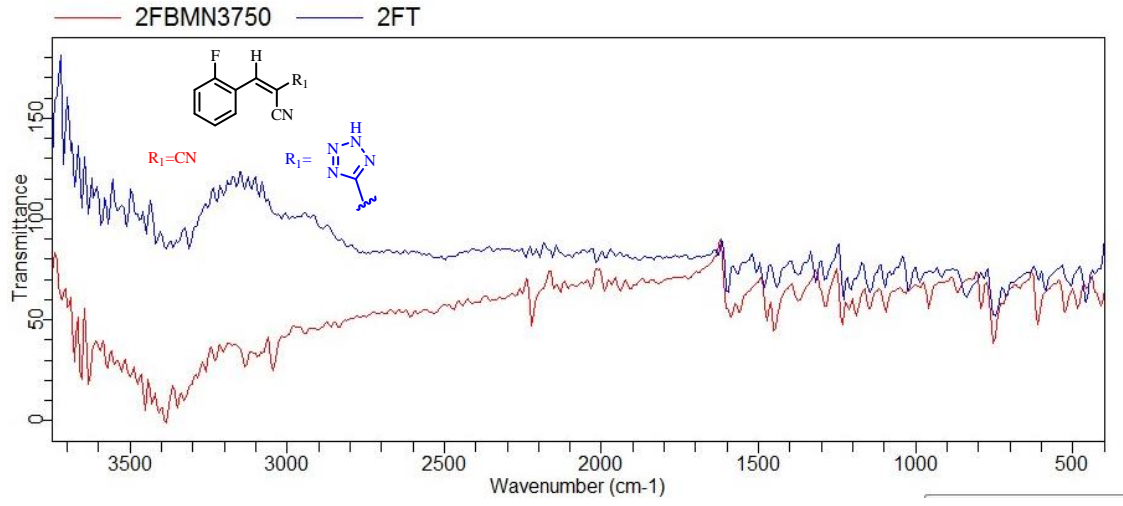
Şekil 3.27. 2-(3,4,5-trimetoksibenziliden)malononitril (19) ve 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil)akrilonitril (20)'nin FT-IR spektrumları.



Şekil 3.28. 2-(2-metilbenziliden)malononitril (22) ve 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-o-tolilakrilonitril (23)'ün FT-IR spektrumları.



Şekil 3.29. 2-(4-metilbenziliden)malononitril (25) ve 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-p-tolilakrilonitril (26)'nın FT-IR spektrumları.



Şekil 3.30. 2-(2-fluorobenziliden)malononitril (28) ve 3-(2-florofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (29)'un FT-IR spektrumları.

### 3.4. ENZİM-AKTİVİTE ÇALIŞMALARI

#### 3.4.1. Moleküler Yerleştirme Çalışması

Moleküler yerleştirme sonuçlarının tirozinaz inhibisyon çalışmaları ile uyumluluğunu değerlendirmek amacıyla 5-süstitüe-1H-tetrazol türevlerin ve referans molekülün enzimin aktif bölgesindeki protein-ligand etkileşimleri incelenerek Moldock Skorları hesaplandı. MolDock skor enerjisine göre Çizelge 3.5'te on iki bileşik sıralandı.

Çizelge 3.5. Tetrazol bileşiklerin docking çalışmalarına ait Moldock Skorları.

Giriş	İnhibitör	Moldock <sup>a</sup> Skor	H bağı <sup>b</sup>
1	(20)	-106,74	-4,51
2	(38)	-105,81	0
3	(35)	-99,78	-0,29
4	(23)	-97,55	0
5	(14)	-91,60	0
6	(17)	-89,45	-3,75
7	(11)	-86,58	-2,50
8	(9)	-80,72	-2,50
9	(6)	-78,40	0
10	(26)	-77,35	0
11	(29)	-	-
12	(32)	-	-
13	Tropolon	-47,63	-4,51

<sup>a</sup>En iyi bağlanma afinitesini temsil etmektedir. Protein-ligand arasındaki ve ligandın kendi iç enerjisinin toplamı şeklinde ifade edilmektedir. Protein-ligand etkileşim enerjisi; protein ve ligand arasındaki, H bağı, elektrostatik enerji (Coloum potansiyeli) ve Sterik etkileşimler (van der Waals)'in toplamı şeklinde ifade edilmektedir. Ligandın kendi iç enerjisi ise; ligand içi H bağı, sterik etkileşim (van der Waals) ve ligand atomik bağlarının torsion enerjilerinin toplamı şeklinde ifade edilmektedir.

<sup>b</sup> Hidrojen bağ enerjisi (kJ/mol).

MolDock skoru, hidrojen bağı, sterik ve elektrostatik etkileşimleri içeren ligand-reseptör arasındaki toplam afinite değerinin bir ifadesidir. MolDock skoru, dış ligand etkileşimi artı iç ligand etkileşiminden kaynaklanan toplam enerjidir. Dış ligand etkileşimi, protein-ligand etkileşimi ve kofaktör-ligand etkileşiminden oluşan enerjinin toplamıdır. İç enerji etkileşimi, burulma gerilmesi, burulma gerilmesi  $sp^2-sp^2$ , sterik ve elektrostatik gibi ligandın kimyasal yapısına bağlı enerjinin toplamıdır [88].

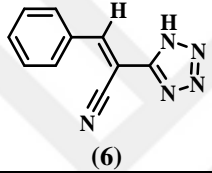
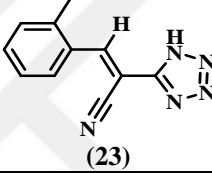
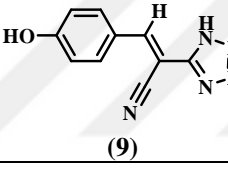
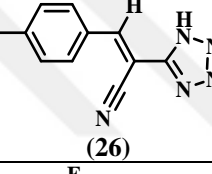
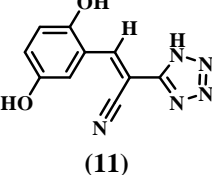
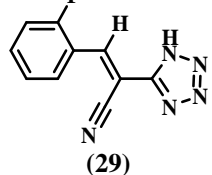
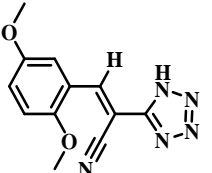
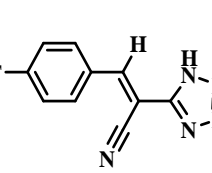
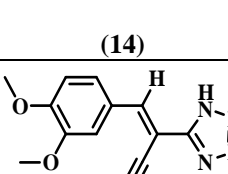
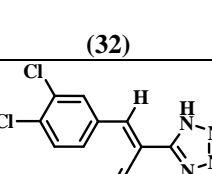
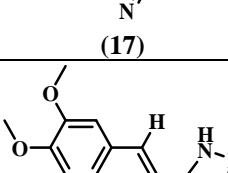
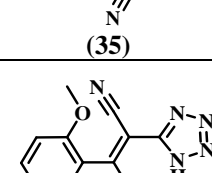
Elde edilen docking sonuçlarına göre bileşik (20), (38), (35), (23), (14), (17), (11), (9), (6), ve (26)'nın sırasıyla -106,74; -105,81; -99,78; -97,55; -91,6; -89,45; -86,58; -80,72 gibi yüksek moldock skorlara (kcal/mol-negatif enerji açısından) sahip olduğunu

görüldü. (29) ve (32) bileşikleri docking programı tarafından hesaplama dışına alındı ve puanlama yapmadı. Çizelge 3.5'te üst sıradaki tetrazol türevler, tropolon (moldock skor: -47.63) gibi deneysel tirozinaz inhibitörlerine kıyasla yüksek düzeyde ligand-protein etkileşim enerjisi sunduğu belirlendi.

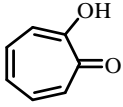
### 3.4.2. *In vitro* Tirozinaz Enzim Çalışmaları

Tirozinaz enzim aktivitesine karşı on iki bileşiğin inhibe edici potansiyeli Çizelge 3.6'daki gibi sonuçlandı ve referans molekül tropolon ile karşılaştırıldı.

Çizelge 3.6. Tirozinaz enzim aktivitesine karşı test edilen 5-süstitüe-1H-tetrazol türevlerinin IC<sub>50</sub> değerleri. Değerler üç bağımsız denemenin ortalama SS (Standart Sapma)'nı temsil etmektedir.

Giriş	Ürün	IC <sub>50</sub> (µM)	Giriş	Ürün	IC <sub>50</sub> (µM)
1	 (6)	433,22±34,85	7	 (23)	624,45±31,92
2	 (9)	288,81±17,61	8	 (26)	346,57±21,69
3	 (11)	99,00±5,71	9	 (29)	-
4	 (14)	577,62±30,27	10	 (32)	173,29±12,34
5	 (17)	693,14±40,02	11	 (35)	45,00±3,28
6	 (20)	653,52±45,60	12	 (38)	-

Çizelge 3.6 (Devamı). Tirozinaz enzim aktivitesine karşı test edilen 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerinin IC<sub>50</sub> değerleri.

Giriş	Ürün	IC <sub>50</sub> (µM)	Giriş	Ürün	IC <sub>50</sub> (µM)
			13	 Referans molekül (39)	40,00

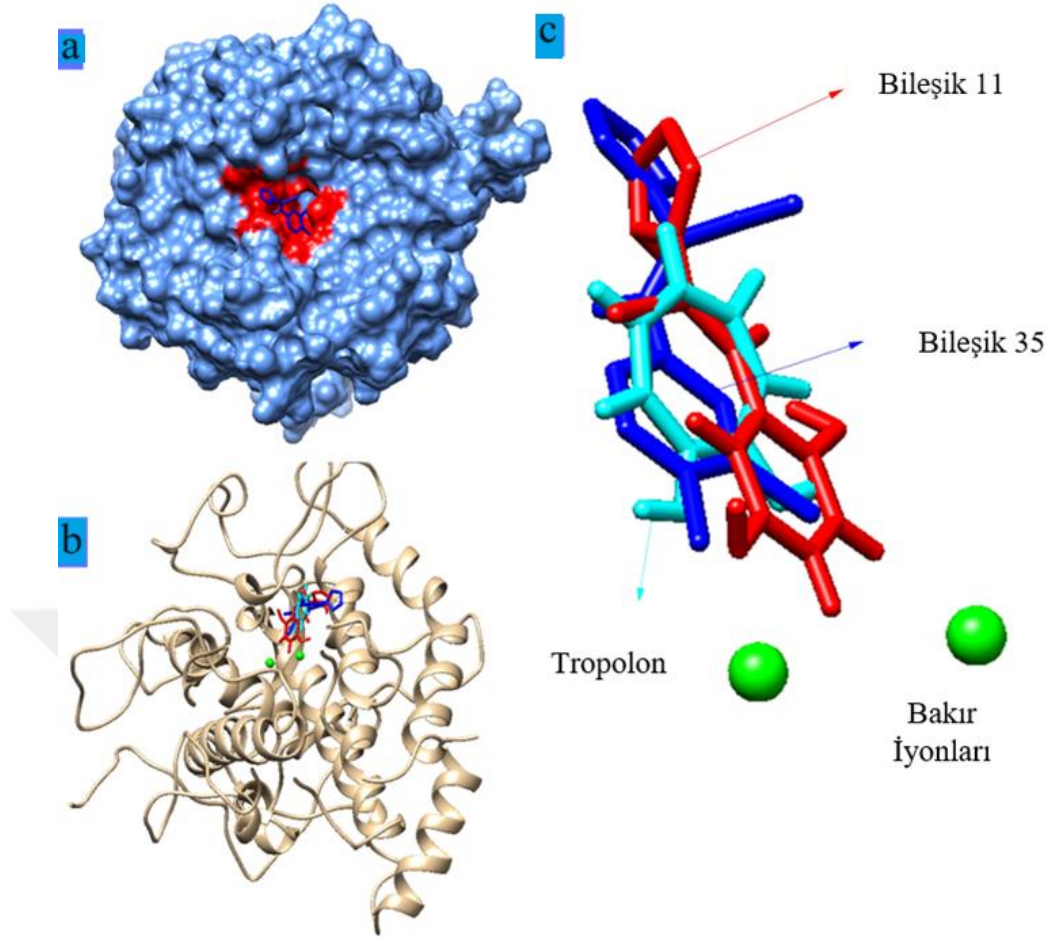
Tirozinaz enzim çalışmaları sonucunda artan inhibisyona göre (35), (11) (32), (9), (26), (6) ve (14), (17), (20) ve (23) bileşikleri için IC<sub>50</sub> sırasıyla sırasıyla 45,00±3,28; 99,00±5,71; 173,29±12,34; 288,81±17,61; 346,57±21,69; 433,22±34,85; 577,62±30,27; 693,14±40,02; 653,52±45,60 ve 624,45±31,92 µM'dır. Enzim aktivitesine göre en güçlü tirozinaz inhibitörü olarak 45,00±3,28 µM'lik bir IC<sub>50</sub> değeriyle 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) bileşiği tespit edildi. Daha sonra 99,00±5,71µM'lik IC<sub>50</sub> ile 3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11) ikinci sırada geldi. Kahn ve arkadaşlarının literatürdeki çalışmasından referans molekül tropolon (39)'un IC<sub>50</sub>'si 40,00 µM olarak bildirilmiştir [89]. Buna göre tez kapsamındaki *in vitro* çalışma sonuçları, bileşik 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35)'in referans moleküle eşdeğer inhibisyon potansiyeline sahip olduğunu gösterdi.

Fenil halkası üzerinde farklı konumlarda farklı sübstitüentler eklenerek yeni moleküller türetilmiş tetrazollerinin sonuçları herhangi bir grup eklenmemiş ilk molekül olan 3-fenil-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (6) ile karşılaştırdığımızda, moleküllerin enzime karşı inhibisyon etkisine para konumuna bağlı grupların önemli katkı sağladığı söylenebilir. Fenil halkasının meta ve para konumunda iki klorür grubu bulunduran bileşik 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) 45,00±3,28 µM'lik IC<sub>50</sub> değeri ile en güçlü tirozinaz inhibitör adayları gibi görünürken fenil halkasının 2- ve 5-konumlarında iki hidroksil ikameli 3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11) bileşiği (IC<sub>50</sub>= 99,00±5,71 µM) ise ardından gelir. Para pozisyonunda flor ve metil grupları ile (32) ve (26) molekülün inhibisyon potansiyeli artarken, orto pozisyonundaki metil grubu ile molekül (23)'ün inhibisyon potansiyeli azalmış, flor ile molekül (32) herhangi bir inhibisyon etki göstermediği görüldü. Bileşik (14), (17) ve (20)'de görüldüğü gibi metoksi sübstitüentleri, molekülün enzime karşı inhibisyon potansiyelini azalttı. Bunun nedeni, sterik engelleme sonucunda molekül etkileşime

girdiği bölgeye yeterince yaklaşamaması ya da  $-OCH_3$  grubunun kavitedeki amino asitler ile daha az etkileşime girmesi olabilir. Çünkü aynı pozisyonlarda hidroksi- ve metoksi- grupları bulunan molekül (11) ve (14)'ün aktiviteleri karşılaştırıldığında, hidroksi- grubu bulunduran molekül (11)'in inhibisyon potansiyeli artarken metoksi- bulunduran molekül (14)'ün inhibisyon potansiyelinin azaldığı görüldü. Bunun nedeni hidroksi (-OH) gruplarının hidrojen bağı yapabilme kapasitesi de olabilir. Benzer bir aktivite değişikliği molekül (17) ve (35)'de de gözlemlendi. Tirozinaz *in vitro* enzim çalışmasının sonuçları incelendiğinde 5-süstitüe-1H-tetrazol türevinde bulunan fenil grubu üzerindeki fonksiyonel grupların, molekülün inhibisyon etkisini etkilediği görüldü.

Ligandların Tirozinaz enzimi (2Y9X)'e karşı bağlanmasını ve yönelimlerini değerlendirmek amacıyla *in vitro* enzim çalışmasında en yüksek aktivite gösteren iki tetrazol türevi olan bileşik (11) ve (35) için moleküler yerleştirme çalışmaları gerçekleştirildi. Moleküler yerleştirme (Docking), Molegro Virtual Docker programı kullanılarak gerçekleştirildi ve yerleştirmenin doğrulanması, Kök-ortalama-kare sapması (Root Mean Square Deviation-RMSD) 2 Å'dan az olan kenetlenmiş ligand ile co-kristalize ligandın üst üste bindirilmesiyle gerçekleştirildi. Yazılım tarafından tahmin edilen bağlanma geometrilerinin referans ligand ile karşılaştırılması, ligandların aktif bölgedeki konumları ve enzim için yerleşme boşluğu Şekil 3.31'de görselleştirildi.

Katalitik bölgedeki bakır iyonları, tirozinaz enzim aktivitesine önemli bir katkı sağlar. Bakır iyonlarının kararlılığı His kalıntıları ile sağlanmaktadır. Şekil 3.31'de görüldüğü gibi, Bileşik (11) ve bileşik (35) binükleer bakır bölgesinin yakınına bağlanan referans ligandı ile enzimin aynı bölgesinde etkileşime girmiştir.



Şekil 3.31. Bileşik (11) ve (35)'in referans ligand (39) ile örtüşen durumları, a) Bileşiklerin tirozinaz aktif bölgesine yönelik bağlanma alanı, b) Docking bölgesi kırmızı renkle gösterilmiştir, c) Enzimin aktif boşluğundaki moleküller.

Moleküller yerleştirme sonuçlarına göre bileşik (11) ve (35)'in en çok etkileşime girdikleri amino asitler ve bunlara ait enerji skorları Çizelge 3.7'de verilmiştir.

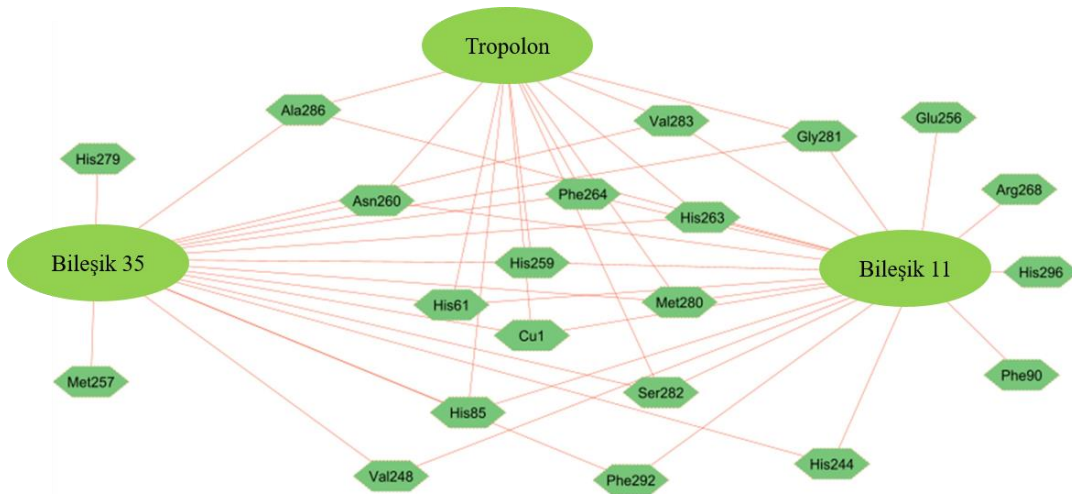
Çizelge 3.7. Bileşikler (35), (11) ve tropolon (39) ile en çok etkileşime giren amino asit kalıntıları.

Bileşik (35)			Bileşik (11)			Referans Ligand (Tropolon) (39)		
-86.5808 MolDock Skor			-99.7873 MolDock Skor			-47.639 MolDock Skor		
Kalıntı	ID	Toplam enerji	Kalıntı	ID	Total	Kalıntı	ID	Toplam enerji
Val	283	-17.80	Asn	260	-17.49	Val	283	-13.24
Asn	260	-15.84	His	263	-17.14	His	263	-10.45
His	263	-13.04	Val	283	-15.15	Asn	260	-5.87

Çizelge 3.7 (Devamı). Bileşikler (35), (11) ve tropolon (39) ile en çok etkileşime giren amino asit kalıntıları.

Kalıntı	ID	Toplam enerji	Kalıntı	ID	Total	Kalıntı	ID	Toplam enerji
Phe	264	-10.83	Phe	264	-13.67	Ser	282	-5.39
His	85	-6.89	Ser	282	-6.27	Phe	264	-5.34
His	259	-5.04	Gly	281	-4.70	Gly	281	-3.72
Ser	282	-5.02	Met	280	-3.45	His	259	-2.10
His	61	-3.95	His	244	-3.23	Met	280	-2.09
Phe	292	-2.13	Val	248	-3.23	His	85	-1.74
Gly	281	-2.03	His	259	-2.56	Cu	1	-1.38
Glu	256	-1.87	His	61	-2.40	Ala	286	-1.13
Val	248	-1.57	Met	257	-2.25	His	61	-0.90
Phe	90	-1.25	His	85	-2.08			
Met	280	-1.06	Cu	1	-1.56			
His	296	-0.84	His	279	-0.54			
His	244	-0.55	Phe	292	-0.50			
Cu	1	1.11	Ala	286	2.81			
Arg	268	2.00						
Ala	286	2.96						

Şekil 3.32’de seçilen (11), (35) ve tropolon (39) bileşiklerinin Cytoscape yazılımı kullanılarak en çok bağlandıkları aminoasit ağları görselleştirildi [90]. Her iki bileşik de (11), (35) kendisine benzer amino asitlere bağlanarak referans ligandının bağlandığı cebe yerleşmeyi başardı. Asn260, His263 ve Val283 amino asitlerin, tropolon ve test edilen iki molekülün en çok etkileşime girdiği ilk üç amino asit kalıntısı olduğu görüldü.

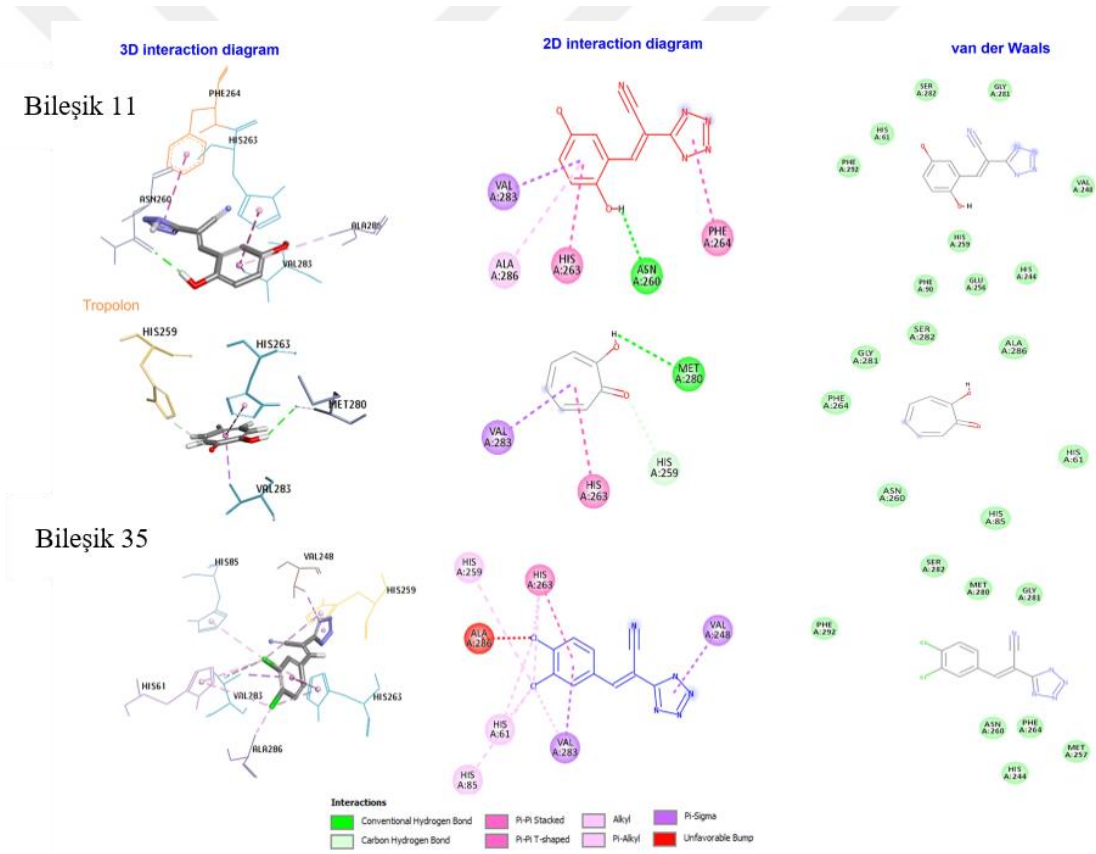


Şekil 3.32. Enzimin aktif bölgesindeki hangi amino asitlerin referans molekül ve aktif moleküller ile etkileşime girdiğini gösteren diyagram.

Bileşik (35) ve (11)’in tirozinazın aktif boşluğuna docking çalışması, bu türevlerin

dikkate değer afinitesinden birkaç moleküler etkileşimin sorumlu olduğunu varsayıldığını göstermiştir.

Sentezlenen bileşikler arasında hedefe en yakın bileşiğin (35) nolu bileşik olup, docking (yerleştirme) puanı -99,7873 MolDock Skoru olarak bulundu. Bu bileşik His259, His263, His61, His85, Val283 ve Val248 ile hidrofobik etkileşimler oluşturmuştur. Benzen halkasındaki klorlar, His259, His263, His61, His85 ve Val285 amino asitlerindeki alkil grupları ile olan etkileşimlerine katkıda bulunmuştur. Bu etkileşimi, tetrazol ve fenil halkalarının sırasıyla Val248 ve Val283'ün metil grubu ile iki  $\pi$ -sigma etkileşimi sergilediğini, fenil halkasının His263 ile Pi-Pi Stacked etkileşimini oluşturduğunu ortaya koymuştur. Phe292, Ser282, Met280, Gly281, Phe264, Asn260, His244 ve Met257 ile de van der Waals etkileşimini oluşturmuştur (Şekil 3.33).



Şekil 3.33. Bileşik (11) ve (35)'in tirozinaz ile protein-ligand etkileşim profillerinin ve pozlarının referans ligand ile karşılaştırılması.

Bileşik (11)'in tirozinaz bağlanma bölgesindeki bağlanma pozu, (-86,5808 MolDock Skoru), Asn260'm oksijeni ile fenil halkasının 2-pozisyonundaki sübstitüe olan hidroksil grubu arasında bir hidrojen bağı etkileşiminin gözlemlendiği ortaya konuldu. Ayrıca, fenil halkası Val283 ile  $\pi$ -sigma etkileşimine, His263 ile Pi-Pi Stacked

etkileşimine ve Ala286 ile pi-Alkil etkileşimine dahil oldu. Tetrazol halkası, Phe264'ün fenil grubu ile etkileşime girerek Pi-Pi Stacked etkileşimi oluşturdu. Aynı zamanda Phe292, His61, Ser282, Gly281, Val248, His259, Phe90, Glu256 ve His244 kalıntısı ile van der Waals etkileşimini de gösterdi (Şekil 3.33).

Bakır iyonu ve His263 arasındaki hidrofobik etkileşimin, substratın oryantasyonunda önemli bir rol oynadığı varsayılmaktadır [91]. Referans ligand Tropolon (39) gibi, her iki molekül de bu amino asitle farklı ve güçlü bir hidrofobik etkileşim sergileyebilir. Ayrıca bunun, enzim üzerindeki inhibitör etkileri için önemli bir parametre olabileceği düşünüldü.

### 3.4.3. Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Eliminasyon (ADME) Özellikleri

ADME özellikler, çalışılan bileşiklerin farmakokinetiğini, ilaca benzerliğini ve toksisitesini tahmin etmek için kullanılır ve ilaç keşiflerine yönelik tüm kritik etkileri ortaya çıkarmaya yardımcı olur. Bileşik (11) ve (35)'in *in siliko* emilim, dağılım, metabolizma ve atılım (ADME) özellikleri, SwissADME web aracı kullanılarak tahmin edildi. Karşılaştırma amacıyla referans molekül üzerinde (tropolon (39)) ADME özellikleri hesaplanarak Çizelge 3.8'da sunuldu. Bu bileşikler için ADME özelliklerinin yanında BOILED-Egg modeli ve biyoyararlanım radarı ilaç benzerliği açısından incelenerek Şekil 3.34'te gösterildi.

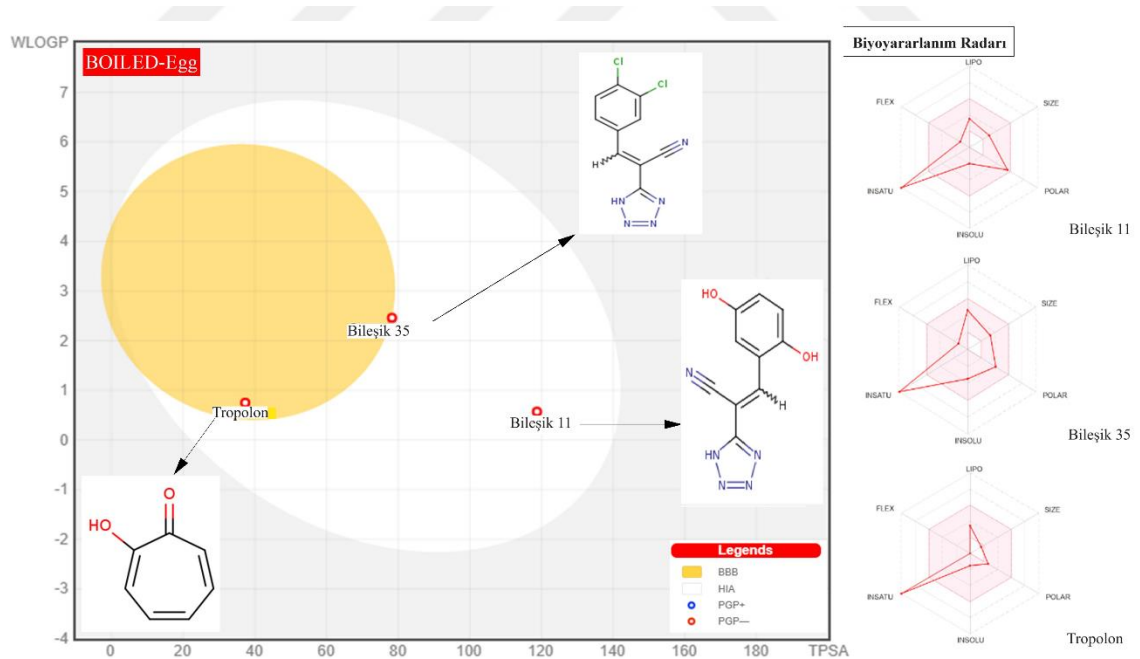
Çizelge 3.8. Bileşik (11), (35) ve tropolon (39)'un ADME özelliklerinin tahmini.

ADME özellikleri	Bileşik (11)	Bileşik (35)	Tropolon(39)
Moleküler ağırlık	229,19 g/mol	266,09 g/mol	122,12 g/mol
Hidrojen dışındaki atom sayısı	17	17	9
Aromatik halkadaki atom sayısı	11	11	7
Fraksiyon Csp3	0,00	0,00	0,00
Döndürülebilir bağ sayısı	2	2	0
H-bağı alıcı sayısı	6	4	2
H-bağı donör sayısı	3	1	1
Molar Refraktivite	58,15	64,12	34,74
TPSA (Å <sup>2</sup> )	118,71 Å <sup>2</sup>	78,25 Å <sup>2</sup>	37,30
Log P <sub>ow</sub> (XLOGP3)	0,65	2,62	0,53
Log S (ESOL)	-2,02	-3,49	-1,51
Çözünürlük	2,20e+00 mg/mL; 9,61e-03 mol/l	8,67e-02 mg/mL; 3,26e-04 mol/l	3,80e+00 mg/mL; 3,11e-02 mol/l
Klass	Çözünür	Çözünür	İyi çözünür
GI absorpsiyon	Yüksek	Yüksek	Yüksek
BBB geçirgenliği	Hayır	Hayır	Evet
P-gp substrat	Hayır	Hayır	Hayır
CYP1A2 inhibitör	Hayır	Evet	Hayır

Çizelge 3.8 (Devam). Bileşik (11), (35) ve tropolon (39)'un ADME özelliklerinin tahmini.

ADME özellikleri	Bileşik (11)	Bileşik (35)	Tropolon(39)
CYP2C19 inhibitör	Hayır	Hayır	Hayır
CYP2C9 inhibitör	Hayır	Hayır	Hayır
CYP2D6 inhibitör	Hayır	Hayır	Hayır
CYP3A4 inhibitör	Hayır	Hayır	Hayır
Log $K_p$ (Cilt geçirgenliği)	-7,24 cm/s	-6,06 cm/s	-6,67 cm/s
Lipinski	Uygun	Uygun	Uygun

BOILED-Egg, küçük moleküllerin polarite ve lipofiliklik özelliklerini hesaplayarak çalışan, beyin ve bağırsak emilimini gösteren bir grafiktir (Şekil 3.34) [85]. Beyaz bölge, gastrointestinal absorpsiyon yoluyla yüksek pasif taşıma olasılığını gösterirken sarı bölge, kan-beyin bariyeri penetrasyonunun yüksek olasılığını göstermektedir. Bu moleküllerin ince bağırsak absorpsiyonu (HIA) oldukça yüksek olmakla birlikte, referans molekül dışında kan-beyin bariyerini (BBB) pasif olarak geçemedikleri tahmin edilmektedir. Kan-beyin bariyeri (BBB), beyni fiziksel ve biyokimyasal akıştan koruyan fiziksel bir bariyer olarak kabul edilir [85]. Hedefi beyin olmayan moleküllerin bu engeli aşmamış olması toksisite açısından önemlidir [69].



Şekil 3.34. BOILED-Egg modelleri ve SwissADME tahmini kullanılarak elde edilen (11), (35) bileşikleri ve tropolon (39) için biyoyararlanım radar grafikleri.

Biyoyararlanım radarında, pembe alan altı özellik bakımından en uygun aralığı temsil etmektedir. Biyoyararlanım radarı; moleküllerin lipofiliklik, boyut, polarite, çözünürlük,

esneklik ve doyunluk gibi fizikokimyasal özelliklerini hesaplayarak ilaç benzerlik özelliklerini hızlı bir şekilde gösteren bir grafikdir (Şekil 3.34). Pembe alan, her parametre için en uygun aralığı gösterir. Bileşik (11) ve (35)'in moleküler ağırlıkları sırasıyla 229,19 g/mol ve 266,09 g/mol'dür (Çizelge 3.8). Dolayısıyla bir bileşiğin fizikokimyasal özellikler açısından değerlendirildiğinde moleküler ağırlığının 150 g/mol < MW < 500 g/mol aralığında olması gerektiği varsayıldığında bu iki bileşik ilaç olabilme sınırları içerisinde. Fakat referans molekülün 122,12 g/mol ile bu sınırların içerisinde yer almadığı görüldü. Bu üç bileşik için polarite (TPSA), suda çözünürlük (log S(ESOL)) ve lipofilite (XLOGP3) değerleri öngörülen aralıklarda olduğu tespit edildi. Topolojik polar yüzey alan (Topological polar surface area-TPSA) molekülün polaritesi hakkında bilgi vermektedir. TPSA, 20 Å ile 130 Å değeri arasında ise molekülün hücre membranlarından geçişi kolaylaşır [92]. Bileşik (11), (35) ve referans molekül için TPSA değeri bu değerler arasında sırasıyla 118,71 Å<sup>2</sup>, 78,25 Å<sup>2</sup> ve 37,3 Å<sup>2</sup> olarak hesaplandı. Bileşikler için sudaki çözünürlüğünü tahmin eden log S(ESOL-Tahmini Çözünürlük) olması gerektiği gibidir, 6'yı aşmadı ve bileşiklerin lipofilikliğini tahmin eden XLOGP3 ise -0,7 ila +6,0 aralığında hesaplandı (Çizelge 3.8) [69]. Molekülde diğer bir biyoyararlanım göstergesi ise doyunluk (saturation-Csp<sup>3</sup> Fraksiyon)'tur. Doyunluk sp<sup>3</sup> hibritleşmesi gösteren karbonların moleküldeki toplam karbon sayısına oranı ile hesaplanır ve değeri (Csp<sup>3</sup> Fraksiyonu) en az 0,25 olmalıdır. Yeni moleküller, referans molekülde olduğu gibi doyunluk dışındaki diğer fizikokimyasal parametreleri karşılamaktadır. Bir bileşiğin memeli epidermisi yoluyla taşınmasına ilişkin geçirgenlik, ondalık logaritması olarak belirlenmiş ve Log Kp (cm/s cinsinden) olarak ifade edilmiştir. Log Kp, deri geçirgenliğinin tahmin edilmesinde kullanılır. Log Kp ne kadar negatif olursa molekülün deriden geçirgenliği o kadar az olur. Bileşik (11), (35) ve referans molekül için sırasıyla -7,24 cm/s; -6,06 cm/s; -6,67 cm/s nisbeten daha az cilt geçirgenliği gösterebilir [69]. Bileşik (35)'in cilt geçirgenliği diğer iki molekülden daha yüksek olduğu çıkarımına varılabilir. Bu açıdan cilt uygulamalarında bileşik (35) etken madde olarak daha yarar sağlayabilir. Çizelge 3.7'de gösterildiği gibi, moleküller 'Lipinski'nin Beş Kuralı'na uygundur. Sitokromlar P450 (CYP), metabolizmada ilaçların dönüştürülmesinde ve zararsız hale getirilmesinde görev alan önemli bir enzim grubunu gösterir. İlaçların çoğunun biyotransformasyonu Sitokromun beş ana izoformu (CYP1A2, CYP3A4, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6) tarafından gerçekleştirilir. İnhibisyonları, diğer ilaçların ortadan kaldırılmasını etkileyerek ya toksik etkilere ya da istenmeyen yan etkilere neden olabilir [93]. Yeni

sentezlenen bileşiklerin bu izoformlara karşı inhibisyon potansiyeli Çizelge 3.8’de gösterildi. Bileşikler, CYP izoformlarının inhibitörü olmayanlar olarak puanlandı ve sadece bileşik (11), CYP1A2’ye karşı inhibisyon gösterdi [68], [94].

### 3.5. KOZMETİK ÜRÜN ANALİZLERİ

#### 3.5.1. Mikrobiyolojik Analiz Testi

Mikrobiyolojik analiz sonuçlarına göre formülasyon, ‘Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyolojik Kontrolüne ilişkin Kılavuz’ hükümlerine uygundur (Çizelge 3.9).

Çizelge 3.9. Krem için yapılan mikrobiyolojik test sonuçları.

Parametre	Sonuçlar	Limit	Analiz	
			Metot	**Uygunluk Durumu
*Aerobik Mezofilik Mikroorganizmalar-Bakteriler kob/g-cfu/g	<10	<100	TS EN ISO 21149	U
* <i>Staphylococcus aureus</i> /g	-	-	TS EN ISO 22718	U
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i> /g	-	-	TS EN ISO 22717	U
* <i>Escherichia coli</i> /g	-	-	TS EN ISO 21150	U
* <i>Candida albicans</i> /g	-	-	TS EN ISO 18416	U
*küf ve maya kob/g-cfu/g	<10	<100	TS EN ISO 16212	U

\* Akreditasyon kapsamında. \*\*Uygunluk Durumu; U: Uygundur. - : Tespit edilmedi.

*Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans*, kozmetiklerde temel potansiyel patojenlerdir. Kılavuzda belirtilen kategori 1’de veya kategori 2’de bu mikroorganizmalar, herhangi bir kozmetik üründe 1g ya da 1mL’inde bulunmamalıdır. Ayrıca kılavuzda farklı cilt bölgeleri, farklı hassasiyete sahip olabileceğinden kozmetik ürünler için iki ayrı kategori tanımlanmıştır: Kategori 1: 3 yaş altı çocuklara yönelik ürünler, göz bölgesine uygulanan ürünler, mukoz membranlara uygulanan ürünler, durulanmayan ürünler olmak üzere sınıflanmıştır. Kategori 2: Diğer ürünler, durulanan ürünler olarak ayrılmıştır.

Kategori 1’de sınıflandırılan kozmetiklerin 1g ya da 1 mL’inde, Toplam Aerobik Mezofilik mikroorganizma ve Toplam Küf-Maya sayısının,  $10^2$  cfu/g veya  $10^2$  cfu/mL’yi aşmaması gerektiği bildirilirken Kategori 2’de sınıflandırılan kozmetiklerin ise 1g ya da 1 mL’inde, Toplam Aerobik Mezofilik mikroorganizma ve Toplam Küf-Maya sayısının,  $10^2$  cfu/g veya  $10^2$  cfu/mL’yi aşmaması gerektiği bildirilmiştir (Çizelge 3.10) [70].

Çizelge 3.10. Kozmetiklerin 1g ya da 1 mL 'sinde toplam canlı aerobik mezofilik mikroorganizma sayısı ve toplam küf-maya sayısı.

Sınıflandırma Kriteri	Kantitatif/nicel limitler:
<b>Kategori 1*</b>	(bakteri, maya ve küf)
3 yaş altı çocuklara yönelik ürünler	
Göz bölgesine uygulanan ürünler	10 <sup>2</sup> cfu/g ya da 10 <sup>2</sup> cfu/ml'den fazla
Mukoz membranlara uygulanan ürünler	olmamalıdır.
Durulanmayan ürünler	
<b>Kategori 2*</b>	10 <sup>3</sup> cfu/g ya da 10 <sup>3</sup> cfu/ml'den fazla
Diğer ürünler, durulanan ürünler	olmamalıdır.

\**Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ve *Candida albicans* bulunmamalıdır.

Tasarlanan krem formülasyon durulanmayan ürün kategorisine dahil edilerek değerlendirilme yapılmış ve mikrobiyolojik testleri başarıyla geçmiştir.

### 3.5.2. Antimikrobiyal Koruyucu Etkinlik Testi

Koruyucu etkinliğinin incelendiği bu test ile ürünün, iç ya da dış faktörlere karşı maruz kalacağı herhangi bir mikrobiyolojik kirlenme ve bozulma durumuna karşı, üründe kullanılan koruyucu/lar tarafından korunup korunmadığı tespit edilir.

Challenge test (Koruyucu Etkinlik Testi) ile numuneler üzerinde laboratuvar koşullarında oluşturulan yapay bir kontaminasyon ve bu kontaminasyona ait alınan sayısal verilere göre ürünü kontamine etme riski bulunan *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* ve *Aspergillus brasiliensis* gibi mikroorganizmalara karşı uygunluğu değerlendirildi.

Testin sonucu, yapay olarak kontamine edilen mikroorganizma sayılarının 0., 7., 14. ve 28. gün gibi belirlenen zamana bağlı olarak içeriğindeki mikroorganizmanın logaritmik değişimi Çizelge 3.11'de gösterildi.

Çizelge 3.11. Antimikrobiyal koruyucu etkinlik test sonuçları.

Mikroorganizma	0. Gün	7. Gün		14. Gün		28. Gün	
	*N0 (Log)	*N7 (Log)	Log azalma	*N14 (Log)	Log azalma	*N28 (Log)	Log azalma
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538/Lot 220407	6.85	1.00	5.85	1.00	5.85	1.00	5.85
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027/Lot 3270513	6.92	1.00	5.92	1.00	5.92	1.00	5.92
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739/Lot 220403	6.88	1.00	5.88	1.00	5.88	1.00	5.88
<i>Candida albicans</i> NCPF 3179/Lot 040920028	3.78	1.00	2.78	1.00	2.78	1.00	2.78
<i>Aspergillus brasiliensis</i> NCPF 2275/Lot 020620065	3.30	Uygulanmadı		1.00	2.48	1.00	2.48

Koruyucu etkinlik testi sonucu; bu kozmetik formülasyonun *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* ve *Aspergillus brasiliensis* mikroorganizmaları için ISO 11930:2012’de tanımlanan “Kriter A” kabul kriterlerine göre uygun olduğunu gösterdi.

ISO 11930 Kabul Kriterleri (Kriter A) uyarınca bakteriler için ürün, 7. günde ilk sayıma göre en az 3 log azalma göstermeli ve 14. ve 28. günlerde 7 günlük sayıma göre artış göstermemelidir. *Candida albicans* 7 günde en az 1 log azalmalı ve 14. ve 28. günlerde 7 günlük sayıma göre artış göstermemelidir. *Aspergillus brasiliensis*, 14. günde ilk sayıdan itibaren artış göstermemeli ve 28. günde en az 1 log azalma göstermelidir.

Sonuç olarak, Çizelge 3.11’deki verilere göre ürün, yukarıdaki tanımlanan bakterileri için mikrobiyal üremeye karşı korunaklıdır.

### 3.5.3. Fizikokimyasal Testler

Ürünün pH, renk, koku, görünüş, yoğunluk gibi karakteristik özellikleri belirlendi (Çizelge 3.12). Kozmetik ürünlerde mikroorganizmaların üremesine bağlı olarak meydana gelen kontaminasyonlarda üründe bu parametrelerde (renk, koku ve ürünün etkinliğinin azalması vb.) değişiklikler görülebilir.

Çizelge 3.12. Fizikokimyasal test sonuçları.

Parametreler	Analiz Sonuçları	Metot
pH (25 °C)	5.77	pH Metre
Renk	Beyaz	Fiziksel
Koku	Karakteristik	Organoleptik
Görünüş	Krem	Fiziksel
Yoğunluk	0.953	Ağırlık/Hacim-W/V

Kozmetik ve dermatolojik alanında cilt yüzeyinin doğal pH'sı, uygun ürünlerin geliştirilmesinde önemli rol oynamaktadır. Sağlıklı bir cilt, mikrobiyom bariyeri, kimyasal bariyer, fiziksel bariyer ve bağışıklık bariyerinin uyum içinde yürütülen fonksiyonlarıyla dengelenmiştir. Aksi takdirde pH'ya katkıda bulunan bu faktörlerin cilt bozuklukları ve hastalıkları ile ilişkili olduğu görülmektedir.

Sağlıklı bir cildin pH'sı 5 ila 5,5 arasında kabul edilen değerlerde asidiktir. Alkali pH'da mikroorganizmaların artışı söz konusudur. Genelde kozmetik ürünlerin pH'sı 5,5 civarında üretilse de son çalışmalarla vücut kısmına bağlı olarak pH 4,1 ile 5,8 arasındaki değerlerde ölçüldüğünü ayrıca cinsiyete, yaşa, vb. faktörlere göre değiştiği bildirilmiştir [95].

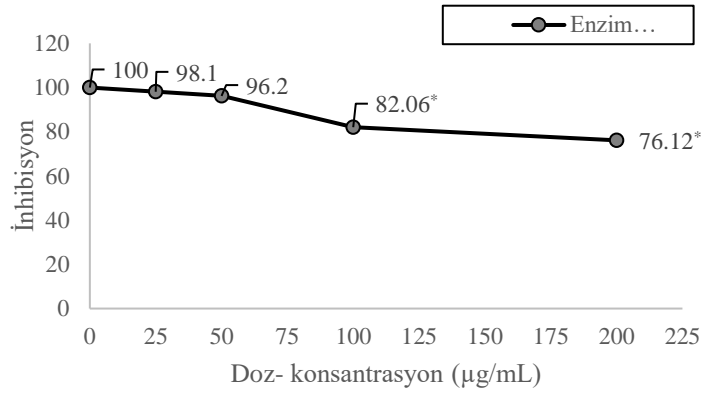
Kozmetik ürünlerde üreyen mikroorganizmalar nedeniyle pH değişimi oluşabilir. Ayrıca zaman içinde içeriğin bozunması yağ ve su fazın birbirinden ayrılmasına ve viskosite değişimine neden olabilir [96].

#### **3.5.4. Anti Pigmentasyon *In Vitro* Ürün Testi**

Tirozinaz memelilerde melanin pigmentinin biyosentezinde L-tirozin, L-DOPA'nın da yer aldığı bir dizi reaksiyonun sonucu melanine dönüşmesini katalize eden tip-3 bakır içerikli bir enzimdir. Cilt ve kıl rengini belirleyen melanin pigmentleri, melanositlerde gerçekleşen biyokimyasal sürece tirozinaz enzimin katılmasıyla oluşur. Burada tirozinaz yapımı bloke edildiğinde melanin yapımı gerçekleşmez. Pigment oluşumu azaldığı için cildin rengi açılır. Dolayısıyla anti pigmentasyon testlerinin amacı test materyalinin tirozinaz enzimi inhibisyonu ölçümlenerek anti pigmentasyon etkisi belirlenmektir.

Deneyler beş tekrar olarak yapılmış olup sonuç, ortalama  $\pm$  standart sapma şeklinde verildi (Çizelge 3.13). Testte negatif kontrol (NK) olarak saf su kullanılmış ve test materyalleri uygulama dozları 25  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$ , 200  $\mu\text{g/mL}$  konsantrasyonlarında insan epidermal melanosit hücre hattı inhibisyonları test edildi.

Çizelge 3.13. Tirozinaz enzim inhibisyonunun, melanosit hücrelerinde 48 saat sonunda doza bağlı olarak gösterilmesi. Değerler beş bağımsız denemenin ortalama SS (Standart Sapma)'nı temsil etmektedir.



Tirozinaz Enzim İnhibisyonu (%) ± SS				
NK	TM 25 µg/mL	TM 50 µg/mL	TM 100 µg/mL	TM 200 µg/mL
100,00± 0,00	98,10± 0,60	96,20± 1,24	82,06± 4,08*	76,12± 2,57*

NK: Negatif kontrol, TM: Test materyali, \* : p<0,05

Denemeler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığının belirlenmesi amacıyla Anova testi uygulandı. Bu testte Significant değerine bakıldığında bu değer 0,05'ten küçük olduğu görüldü. Bu sonuç, testler arasında %5 anlamlılık düzeyinde anlamlı bir fark olduğunu göstermektedir. Bu anlamlılığın hangi gruplardan kaynaklandığının incelenmesi için post-hoc testlerinden Tukey HSD testi uygulandı. Ayrıca Denemelere ait Multiple Comparisons verileri Çizelge 3.14'te sunuldu.

Çizelge 3.14. Denemelere ait Multiple Comparisons verileri

Bağımlı Değişken: Konsantrasyonlar

(I) Gruplar (µg/mL)	(J) Gruplar (µg/mL)	Ortalama Fark (I-J)	Standart Hata	Anlamlı (Significant)	% 95'lik Güven Aralığı	
					Alt Sınır	Üst Sınır
Tukey HSD 25	50	1,88600	1,58695	,642	-2,6543	6,4263
	100	16,02800*	1,58695	,000	11,4877	20,5683
	200	21,97600*	1,58695	,000	17,4357	26,5163
50	25	-1,88600	1,58695	,642	-6,4263	2,6543
	100	14,14200*	1,58695	,000	9,6017	18,6823
	200	20,09000*	1,58695	,000	15,5497	24,6303
100	25	-16,02800*	1,58695	,000	-20,5683	-11,4877
	50	-14,14200*	1,58695	,000	-18,6823	-9,6017
	200	5,94800*	1,58695	,009	1,4077	10,4883
200	25	-21,97600*	1,58695	,000	-26,5163	-17,4357
	50	-20,09000*	1,58695	,000	-24,6303	-15,5497
	100	-5,94800*	1,58695	,009	-10,4883	-1,4077

Çizelge 3.14 (Devamı). Denemelere ait Multiple Comparisons verileri.

Dunnett t (2-sided)**	50	25	-1,88600	1,58695	,512	-5,9999	2,2279
	100	25	-16,0280*	1,58695	,000	-20,1419	-11,9141
	200	25	-21,9760*	1,58695	,000	-26,0899	-17,8621

\* Ortalama fark 0.05 düzeyinde anlamlıdır.

\*\* Dunnett t-testleri bir grubu kontrol olarak ele alır ve diğer tüm grupları bununla karşılaştırır.

Ortalama Fark (I-J) “\*\*” işareti olan test grupları arasında anlamlılık olduğu şeklinde yorumlandı. Burada 100 µg/mL ve 200 µg/mL’lik deneme grupları arasında anlamlılık vardır. Significant değerinin %5’ten küçük hesaplanması da bu durumun göstergesidir.

Testte uygulanan konsantrasyonlar kontrollü olarak artırıldı. Konsantrasyon artışına bağlı olarak negatif kontrole göre ürünün inhibisyon etkisi artış gösterdi. Ancak bu artış konsantrasyonla doğru orantılı değildir. Bu sonuçlara göre nihai ürün tirozinaz enzimi üzerinde inhibisyon etkisi gösterdi. Ayrıca en üst düzeyde uygulanan konsantrasyon için (200 µg/mL) değerlendirme yapıldığında görülmektedir ki etkili bir inhibisyon miktarı krem formülasyonu içeriğinde kullandığımız etken madde oranının üzerinde kaldı. Çünkü kullanılan konsantrasyon krem ürünü için verilen değerdir. Formülasyonda kullanılan miktar ise bu değer oldukça altındadır. Formülasyonda etken madde oranı antipigmentasyon etkinin ortaya konulması açısından yeterli olmuştur. Formülasyon revize edildiğinde etki değeri daha yüksek bir ürün elde etmek de mümkündür.

## 4. SONUÇ

Tez kapsamında yeni geliştirilen bir yöntemle 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevleri sentezlendi ve hiperpigmentasyona karşı etkili olabilecek bir ürün ortaya konuldu.

Çalışma dört aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada sentez ön denemelerine yön vermesi için *in siliko* moleküler yerleştirme çalışması ile tirozinaz enzimine uyumlu bileşiklerin moldock skorları hesaplanarak tahmin edildi. *In siliko* moleküler yerleştirme çalışması Molegro Virtual Docker programı kullanılarak gerçekleştirildi. Moldock Skor değerleri -106,74 ile -77,35 aralığında on tetrazol molekülü program tarafından puanlandı. Tetrazol türevleri ile deneysel tirozinaz inhibitörü tropolon'un (-47.63) moldock skorları kıyaslandığında tetrazol türevlerinin yüksek düzeyde ligand-protein etkileşim enerjisi gösterdiği belirlendi. 2-(1H-tetrazol-5-il)-3-(3,4,5-trimetoksifenil) akrilonitril (20), -106,74 moldock puanı ile en yüksek inhibisyon gösteren bileşik olarak hesaplandı. Ancak çalışmalarımızda etken madde olarak kullandığımız 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35)'in moldock puanı ise -99,78'dir.

İkinci adım 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerinin sentezlendiği ve yeni bir metodolojinin oluşturulduğu adımdır. Yeni bir sentez metodolojinin geliştirilmesinde çözücü, katalizör miktarı, reaksiyon sıcaklığı gibi parametrelerin tespiti için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bir dizi aril aldehit türevleri ile malononitril (2), sodyum azid (3) ve alüminyum oksit-hidroksit-destekli Pd nanopartikülün (Pd/AIO(OH) NPs) etanol gibi polar bir çözücü eşliğinde aynı kapta bir araya getirildiği tek adımlı (*one pot*) reaksiyon, 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevleri için nihai yöntem olarak belirlendi. Sentezin özgünlüğünü ortaya çıkartan unsur ise katalizördü. Alüminyum oksit-hidroksit-destekli Pd nanopartikülü (Pd/AIO(OH) NPs), 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevlerinin sentezi için ilk kez kullanıldı. Tetrazollerin yapılarının aydınlatılmasında BMN türevleri de kullanıldı. Bu amaçla Pd/AIO(OH) NPs etkisinde BMN türevleri sentezlendi. Sentezlenen 11 adet BMN türev silika-jel kolon ile saflaştırılırken 12 adet 5-sübstitüe-1H-tetrazol türev work up ve kristallendirme işlemleri ile saflaştırıldı. Bileşiklerin yapıları FT-IR, <sup>1</sup>H/<sup>13</sup>C-NMR analizi ile karakterize edildi. Her bir molekülün erime noktaları belirlendi.

Çalışmanın üçüncü aşamasında, 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevleri ve referans molekül (tropolon) mantar tirozinazına karşı *in vitro* enzim çalışmaları ile incelendi. Sentezlenen 12 adet 5-sübstitüe-1H-tetrazol türevi için tirozinaz enzim aktivitesini yarıya düşüren inhibitör konsantrasyonları (IC<sub>50</sub>) tespit edildi. (35), (11) (32), (9), (26), (6) ve (14), (17), (20) ve (23) bileşikleri için IC<sub>50</sub> sırasıyla 45,00±3,28; 99,00±5,71; 173,29±12,34; 288,81±17,61; 346,57±21,69; 433,22±34,85; 577,62±30,27; 693,14±40,02; 653,52±45,60 ve 624,45±31,92 µM'dır. Referans molekül olarak kullanılan tropolon (39)'un IC<sub>50</sub> değeri 40,00 µM'dır. En güçlü enzim inhibisyonu gösteren molekül ise 45,00±3,28 µM IC<sub>50</sub> değeri ile 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) oldu. Ayrıca ikinci olarak en yüksek inhibisyon etkinliği gösteren molekül 99,00±5,71 µM IC<sub>50</sub> değeri ile 3-(2,5-dihidroksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11)'dir. (11), (35) ve (39) molekülleri için *in siliko* (moleküler yerleştirme, BOILED-Egg model ve biyoyararlanım radarı) testler gerçekleştirildi. Ayrıca moleküler yerleştirme ile belirlenen en uyumlu iki molekül 3-(2,5-dimetoksifenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (11) ve 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) ile ilgili olarak farmakokinetik ve ilaç benzeri tahminler için emilim, dağılım, metabolizma ve atılım (ADME) modellemesi ile bazı fizikokimyasal özellikler tespit edildi. Ayrıca biyoyararlanım radarı aracılığıyla moleküllerin lipofiliklik, boyut, polarite, çözünürlük, esneklik, doygunluk gibi parametreler referans molekülle karşılaştırıldı. Gastrointestinal emilim ve beyin penetrasyonu olasılığı BOILED-Egg modeli kullanılarak analiz edildi. Analiz sonuçlarına göre ilgili moleküller Lipinskinin 'Beş Kuralı'na uygundu. *In vitro* enzim çalışmaları, *in siliko* moleküler docking modellemeleri ile karşılaştırıldı. Moleküllerin inhibitör etkinlik sıralamalarının örtüşmediği tespit edildi.

Teorik sonuçlardaki farklılıklar beklenen bir süreçtir. Bu nedenle çalışmalara uygulamada elde edilen sonuçlarla devam edilmiştir. Sonuç olarak *in vitro* enzim çalışması doğrultusunda krem formülasyon için etken madde olarak 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) seçildi. Bileşik (35)'in haricen bir krem formülasyonda kullanılacağı düşünüldüğünde *in vitro* çalışmaların biyogüvenlik açısından *in siliko* çalışmalardan daha güvenli olduğu düşünülmektedir. Ayrıca çalışmanın son aşamasında nihai krem formülasyonu belirlemek için anti pigmentasyon hücre kültürü (insan epidermal melanosit hücre hattı) çalışmaları gerçekleştirildi. Sonuçların *in vitro* enzim çalışmasını destekler nitelikte olduğu görüldü.

Son aşamada mantar tirozinazına karşı en yüksek inhibisyon etkinliği gösteren bileşik

(35) etken madde olarak belirlenerek krem formülasyonu geliştirildi. Formülasyonun etkinliğini kanıtlamak adına akredite laboratuvarlarda mikrobiyolojik, antimikrobiyal koruyucu aktivite, fizikokimyasal ve anti-pigmentasyon *in vitro* aktivite testleri gerçekleştirildi. Mikrobiyoloji analiz testi ile ürünlerin raf ömrü ve açık ambalaj sürecinde meydana gelebilecek mikrobiyolojik değişiklikler “Kozmetik Ürünlerin Mikrobiyolojik Kontrolüne İlişkin Kılavuz” hükümlerine uygun bulundu. Antimikrobiyal koruyucu etkinlik testi ile ürünün kullanım esnasında dışardan ya da içerikten gelebilecek kontaminasyona karşı koyma özelliğinin uygun ve istenilen düzeyde olduğu sonucuna varıldı. Anti pigmentasyon *in vitro* ürün testi ile ürünün, insan epidermal melanosit hücre hattında 48 saat sonunda doza bağlı olarak melanin sentezini inhibe ettiği belirlendi ve kremin cilt lekelerine karşı hücresel etkinliği ortaya konuldu.

Sonuç olarak bileşik (35)'in mantar tirozinazına karşı yapılan test sonucu ile krem formülasyonunun insan epidermal melanosit hücre hattı üzerinde uygulanan *in vitro* test sonucunun birbiri ile uyumlu olması çalışmanın hedeflerine uygun olarak sonuçlandırılmasına yardımcı olmuştur. Elde edilen sonuçlara göre 3-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-tetrazol-5-il)akrilonitril (35) molekülünün sentezi için pratik, ekonomik ve çevre dostu bir yöntem geliştirilmiş ve (35)'in tirozinaz enzim inhibisyonu için etkili bir bileşik olduğu ve krem formülasyonunda kullanılması durumunda da anti pigmentasyon etkinliği olan bir ürün elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında oluşturulan krem formülasyonunun kozmetik sektörü için yeni ve katma değeri yüksek bir ürün olarak katkı sağlayacağı öngörülmektedir. Bu çalışmalar toksisite ve dermatolojik testlerle desteklenmesi durumunda ürünün ticarileşmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

## 5. KAYNAKLAR

- [1] Y.-S. C. Bae-Harboe ve H.-Y. Park, "Tyrosinase: a central regulatory protein for cutaneous pigmentation," *Journal of Investigative Dermatology*, c. 132, no. 12, ss. 2678-2680, 2012.
- [2] B. De, I. Adhikari, A. Nandy, A. Saha, ve B. B. Goswami, "In silico modelling of azole derivatives with tyrosinase inhibition ability: Application of the models for activity prediction of new compounds," *Computational biology and chemistry*, c. 74, ss. 105-114, 2018.
- [3] M. He, M. Fan, W. Liu, Y. Li, ve G. Wang, "Design, synthesis, molecular modeling, and biological evaluation of novel kojic acid derivatives containing bioactive heterocycle moiety as inhibitors of tyrosinase and antibrowning agents," *Food Chemistry*, c. 362, s. 130241, 2021.
- [4] S. Zolghadri, A. Bahrami, M. T. Hassan Khan, J. Munoz-Munoz, F. Garcia-Molina, F. Garcia-Canovas, ve A. A. Saboury, "A comprehensive review on tyrosinase inhibitors," *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, c. 34, no. 1, ss. 279-309, 2019.
- [5] B. Salahshournia, H. Hamadi, ve V. Nobakht, "Engineering a Cu-MOF Nano-Catalyst by using Post-Synthetic Modification for the Preparation of 5-Substituted 1H-Tetrazoles," *Applied Organometallic Chemistry*, c. 32, no. 8, s. e4416, 2018.
- [6] Y.-M. Chen, C. Li, W.-J. Zhang, Y. Shi, Z.-J. Wen, Q.-X. Chen, ve Q. Wang, "Kinetic and computational molecular docking simulation study of novel kojic acid derivatives as anti-tyrosinase and antioxidant agents," *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, c. 34, no. 1, ss. 990-998, 2019.
- [7] P. Movaheditabar, M. Javaherian, ve V. Nobakht, "Steelmaking Slag as a Valuable Industrial Waste in the Preparation of 5-Substituted-1 H-Tetrazoles on Water," *Journal of Sustainable Metallurgy*, c. 8, no. 2, ss. 882-892, 2022.
- [8] Y. Geng, W. Zhang, J.-C. Liang, R.-S. Zhou, S.-M. Gong, J.-R. Wang, ve J.-F. Song, "Two new 5-mercapto-1-phenyl-1H-tetrazole-based Cu (I) coordination polymers with double layer structures: Crystal structures, substituent effects and sensing responses to NACs," *Journal of Solid State Chemistry*, c. 315, s. 123479, 2022.
- [9] R. J. Herr, "5-Substituted-1H-tetrazoles as carboxylic acid isosteres: medicinal chemistry and synthetic methods," *Bioorganic & medicinal chemistry*, c. 10, no. 11, ss. 3379-3393, 2002.

- [10] Y. Zou, L. Liu, J. Liu, ve G. Liu, "Bioisosteres in drug discovery: focus on tetrazole," vol. 12, ed: Future Science, 2020, pp. 91-93.
- [11] C. G. Neochoritis, T. Zhao, ve A. Dömling, "Tetrazoles via multicomponent reactions," *Chemical reviews*, c. 119, no. 3, ss. 1970-2042, 2019.
- [12] B. Tahmasbi ve A. Ghorbani-Choghamarani, "First report of the direct supporting of palladium–arginine complex on boehmite nanoparticles and application in the synthesis of 5-substituted tetrazoles," *Applied Organometallic Chemistry*, c. 31, no. 7, s. e3644, 2017.
- [13] R. Sribalan, G. Banupriya, M. Kirubavathi, ve V. Padmini, "Synthesis, biological evaluation and in silico studies of tetrazole-heterocycle hybrids," *Journal of Molecular Structure*, c. 1175, ss. 577-586, 2019.
- [14] T. Ni, X. Chi, F. Xie, L. Li, H. Wu, Y. Hao, X. Wang, D. Zhang, ve Y. Jiang, "Design, synthesis, and evaluation of novel tetrazoles featuring isoxazole moiety as highly selective antifungal agents," *European Journal of Medicinal Chemistry*, s. 115007, 2022.
- [15] E. Łukowska-Chojnacka, J. Mierzejewska, M. Milner-Krawczyk, M. Bondaryk, ve M. Staniszevska, "Synthesis of novel tetrazole derivatives and evaluation of their antifungal activity," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, c. 24, no. 22, ss. 6058-6065, 2016.
- [16] M. B. Labib, A. M. Fayez, E.-N. EL-Shaymaa, M. Awadallah, ve P. A. Halim, "Novel tetrazole-based selective COX-2 inhibitors: Design, synthesis, anti-inflammatory activity, evaluation of PGE2, TNF- $\alpha$ , IL-6 and histopathological study," *Bioorganic Chemistry*, c. 104, s. 104308, 2020.
- [17] Z. Hajizadeh, F. Hassanzadeh-Afruzi, D. F. Jelodar, M. R. Ahghari, ve A. Maleki, "Cu (II) immobilized on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ HNTs–tetrazole (CFHT) nanocomposite: Synthesis, characterization, investigation of its catalytic role for the 1, 3 dipolar cycloaddition reaction, and antibacterial activity," *RSC advances*, c. 10, no. 44, ss. 26467-26478, 2020.
- [18] J. Cardoso-Ortiz, S. Leyva-Ramos, K. M. Baines, C. F. A. Gómez-Durán, H. Hernández-López, F. J. Palacios-Can, J. A. Valcarcel-Gamiño, M. A. Leyva-Peralta, ve R. S. Razo-Hernández, "Novel ciprofloxacin and norfloxacin-tetrazole hybrids as potential antibacterial and antiviral agents: Targeting *S. aureus* topoisomerase and SARS-CoV-2-MPro," *Journal of Molecular Structure*, c. 1274, s. 134507, 2023.
- [19] P. Zhan, H. Liu, X. Liu, Y. Wang, C. Pannecouque, M. Witvrouw, ve E. De Clercq, "Synthesis and anti-HIV activity evaluation of novel N'-arylidene-2-[1-(naphthalen-1-yl)-1H-tetrazol-5-ylthio] acetohydrazides," *Medicinal chemistry research*, c. 19, no. 7, ss. 652-663, 2010.
- [20] K.-S. Yeung, Z. Qiu, Z. Yang, L. Zadjura, C. J. D'Arienzo, M. R. Browning, S. Hansel, X. S. Huang, B. J. Eggers, ve K. Riccardi, "Inhibitors of HIV-1

attachment. Part 9: an assessment of oral prodrug approaches to improve the plasma exposure of a tetrazole-containing derivative," *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, c. 23, no. 1, ss. 209-212, 2013.

- [21] C. Gao, L. Chang, Z. Xu, X.-F. Yan, C. Ding, F. Zhao, X. Wu, ve L.-S. Feng, "Recent advances of tetrazole derivatives as potential anti-tubercular and anti-malarial agents," *European journal of medicinal chemistry*, c. 163, ss. 404-412, 2019.
- [22] J. Zhang, S. Wang, Y. Ba, ve Z. Xu, "Tetrazole hybrids with potential anticancer activity," *European journal of medicinal chemistry*, c. 178, ss. 341-351, 2019.
- [23] S. Maddila, K. Naicker, M. I. Momin, S. Rana, S. Gorle, S. Maddila, K. Yalagala, M. Singh, N. A. Koorbanally, ve S. B. Jonnalagadda, "Novel 2-(1-(substitutedbenzyl)-1H-tetrazol-5-yl)-3-phenylacrylonitrile derivatives: synthesis, in vitro antitumor activity and computational studies," *Medicinal Chemistry Research*, c. 25, no. 2, ss. 283-291, 2016.
- [24] E. Zakerzadeh, R. Salehi, ve M. Mahkam, "Smart tetrazole-based antibacterial nanoparticles as multifunctional drug carriers for cancer combination therapy," *Drug development and industrial pharmacy*, c. 43, no. 12, ss. 1963-1977, 2017.
- [25] S. Swami, S. N. Sahu, ve R. Shrivastava, "Nanomaterial catalyzed green synthesis of tetrazoles and its derivatives: A review on recent advancements," *RSC advances*, c. 11, no. 62, ss. 39058-39086, 2021.
- [26] M. I. El-Barghouthi, A. S. Hasan, W. Al-Awaida, H. J. Al-Ameer, J. Kaur, K. J. Hayashibara, J. Fleming, J. Waknin, S. Hayashibara, ve M. Slewa, "Novel therapeutic heterocycles as selective cyclooxygenase-2 inhibitors and anti-cancer agents: Synthesis, in vitro bioassay screenings, and molecular docking studies," *Journal of Molecular Structure*, c. 1263, s. 133141, 2022.
- [27] A. Oulous, N. E. Daoudi, T. Harit, M. Cherfi, M. Bnouham, ve F. Malek, "New pyrazole-tetrazole hybrid compounds as potent  $\alpha$ -amylase and non-enzymatic glycation inhibitors," *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, s. 128785, 2022.
- [28] W. Peng, F. Liu, L. Zhang, L. Zhang, ve J. Li, "Design, synthesis, and evaluation of tricyclic compounds containing phenyl-tetrazole as XOR inhibitors," *European Journal of Medicinal Chemistry*, c. 246, s. 114947, 2023.
- [29] K. Hasue ve M. Matsukawa, "Mixtures of phase-stabilized ammonium nitrate containing 10 wt% potassium nitrate and tetrazoles as gas-generating agents," *Sci. Technol. Energ. Mater*, c. 77, ss. 98-104, 2016.
- [30] S. Manzoor, X. Yin, ve J.-G. Zhang, "Nitro-tetrazole based high performing explosives: Recent overview of synthesis and energetic properties," *Defence Technology*, c. 17, no. 6, ss. 1995-2010, 2021.
- [31] X. Fan, F. Bi, M. Zhang, J. Li, W. Pang, B. Wang, ve Z. Ge, "Introducing

- Tetrazole Salts as Energetic Ingredients for Rocket Propulsion," in *Chemical Rocket Propulsion*: Springer, 2017, pp. 165-177.
- [32] J.-M. O. Dewanckele ve E. A. Hofman, "Anti-sludging compounds in photographic material," ed: Google Patents, 1993.
- [33] A. Baldassarri ve L. Cellone, "Azotriazole and azotetrazole antifog, antistain and selective desensitizers for silver halide emulsions," ed: Google Patents, 1975.
- [34] M. Khodamorady ve K. Bahrami, "Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ BNPs-CPTMS-Chitosan-Pd (0) as an efficient and stable heterogeneous magnetic nanocatalyst for the chemoselective oxidation of alcohols and homoselective synthesis of 5-substituted 1H-tetrazoles," *ChemistrySelect*, c. 4, no. 28, ss. 8183-8194, 2019.
- [35] D. G. Neilson, R. Roger, J. Heatlie, ve L. Newlands, "Chemistry of amidrazones," *Chemical Reviews*, c. 70, no. 1, ss. 151-170, 1970.
- [36] N. Dhiman, K. Kaur, ve V. Jaitak, "Tetrazoles as anticancer agents: A review on synthetic strategies, mechanism of action and SAR studies," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, c. 28, no. 15, s. 115599, 2020.
- [37] M. Khodamorady, N. Ghobadi, ve K. Bahrami, "Homoselective synthesis of 5-substituted 1H-tetrazoles and one-pot synthesis of 2, 4, 5-trisubstituted imidazole compounds using BNPs@ SiO<sub>2</sub>-TPPTSA as a stable and new reusable nanocatalyst," *Applied Organometallic Chemistry*, c. 35, no. 4, s. e6144, 2021.
- [38] P. Akbarzadeh, N. Koukabi, ve E. Kolvari, "Three-component solvent-free synthesis of 5-substituted-1 H-tetrazoles catalyzed by unmodified nanomagnetite with microwave irradiation or conventional heating," *Research on Chemical Intermediates*, c. 45, ss. 1009-1024, 2019.
- [39] M. Bakherad, R. Doosti, A. Keivanloo, M. Gholizadeh, ve K. Jadidi, "Rapid, green, and catalyst-free one-pot three-component syntheses of 5-substituted 1 H-tetrazoles in magnetized water," *Journal of the Iranian Chemical Society*, c. 14, ss. 2591-2597, 2017.
- [40] J. Safaei-Ghomi ve S. Paymard-Samani, "Facile and Rapid Synthesis of 5-Substituted 1H-Tetrazoles VIA a Multicomponent Domino Reaction Using Nickel(II) Oxide Nanoparticles as Catalyst," *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, c. 50, no. 11, ss. 1567-1574, 2015.
- [41] J. Safaei-Ghomi, S. Paymard-Samani, S. Zahedi, ve H. Shahbazi-Alavi, "Sonochemical synthesis of 5-substituted 1H-tetrazoles catalyzed by ZrP<sub>2</sub>O<sub>7</sub> nanoparticles and regioselective conversion into new 2,5-disubstituted tetrazoles," *Zeitschrift für Naturforschung B*, c. 70, no. 11, ss. 819-828, 2015.
- [42] X. Yuan, Z. Wang, Q. Zhang, ve J. Luo, "An intramolecular relay catalysis strategy for Knoevenagel condensation and 1, 3-dipolar cycloaddition domino reactions," *RSC advances*, c. 9, no. 41, ss. 23614-23621, 2019.

- [43] S. Maddila, K. Naicker, M. I. Momin, S. Rana, S. Gorle, S. Maddila, K. Yalagala, M. Singh, N. A. Koorbanally, ve S. B. Jonnalagadda, "Novel 2-(1-(substitutedbenzyl)-1H-tetrazol-5-yl)-3-phenylacrylonitrile derivatives: synthesis, in vitro antitumor activity and computational studies," *Medicinal Chemistry Research*, c. 25, ss. 283-291, 2016.
- [44] P. Akbarzadeh, N. Koukabi, ve M. M. Hosseini, "Magnetic carbon nanotube as a highly stable and retrievable support for the heterogenization of sulfonic acid and its application in the synthesis of 2-(1H-tetrazole-5-yl) acrylonitrile derivatives," *Journal of Heterocyclic Chemistry*, c. 57, no. 6, ss. 2455-2465, 2020.
- [45] A. Nouri Parouch, N. Koukabi, ve E. Abdous, "Tetrazole derivatives synthesis using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@ fibroin-SO<sub>3</sub>H as a magnetically separable green solid acid nanocatalyst under solvent-free conditions," *Research on Chemical Intermediates*, c. 46, ss. 3295-3310, 2020.
- [46] Z. N. Tisseh, M. Dabiri, M. Nobahar, H. R. Khavasi, ve A. Bazgir, "Catalyst-free, aqueous and highly diastereoselective synthesis of new 5-substituted 1H-tetrazoles via a multi-component domino Knoevenagel condensation/1, 3 dipolar cycloaddition reaction," *Tetrahedron*, c. 68, no. 6, ss. 1769-1773, 2012.
- [47] C. Behloul, M. Benlahrech, F. Foubelo, C. Najera, ve M. Yus, "Indium-, magnesium-, and zinc-mediated debenzoylation of protected 1H-tetrazoles: A comparative study," *Synthesis*, c. 50, no. 17, ss. 3430-3435, 2018.
- [48] A. Ghorbani-Choghamarani, P. Moradi, ve B. Tahmasbi, "Ni-S-methylisothiourea complexes supported on boehmite nanoparticles and their application in the synthesis of 5-substituted tetrazoles," *RSC advances*, c. 6, no. 61, ss. 56638-56646, 2016.
- [49] M. Mohammadi, M. Khodamorady, B. Tahmasbi, K. Bahrami, ve A. Ghorbani-Choghamarani, "Boehmite nanoparticles as versatile support for organic-inorganic hybrid materials: Synthesis, functionalization, and applications in eco-friendly catalysis," *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, c. 97, ss. 1-78, 2021.
- [50] J. M. Chrétien, G. Kerric, F. Zammattio, N. Galland, M. Paris, J. P. Quintard, ve E. Le Grogne, "Tin-catalyzed synthesis of 5-substituted 1H-tetrazoles from nitriles: homogeneous and heterogeneous procedures," *Advanced Synthesis & Catalysis*, c. 361, no. 4, ss. 747-757, 2019.
- [51] Z. Xu, C. Gao, Q. C. Ren, X. F. Song, L. S. Feng, ve Z. S. Lv, "Recent advances of pyrazole-containing derivatives as anti-tubercular agents," *Eur J Med Chem*, c. 139, ss. 429-440, Oct 20 2017.
- [52] N. Sabzevari, S. Qiblawi, S. A. Norton, ve D. Fivenson, "Sunscreens: UV filters to protect us: Part 1: Changing regulations and choices for optimal sun protection," *Int J Womens Dermatol*, c. 7, no. 1, ss. 28-44, Jan 2021.

- [53] H. D.-C. D. M. Christian Dr Med Gloxhuber, "Anti-inflammatory 2-(tetrazol-5'-yl)-benzoxazoles - prepd. from 2-cyano-benzoazoles and used in cosmetics," Germany, 1973.
- [54] H. F. Höffkes, Denise; Groß, Wibke; Knübel, Georg; Oberkobusch, Doris, "Aufhell- und/oder Färbemittel mit Tetrazolen," Germany, 2007.
- [55] E. Aydinli, B. Demir, ve H. Göksu, "Preparation of Centella asiatica (L). and Hypericum perforatum (St. John's Wort) Plant Extracts and Development of Anti-Aging Herbal Cream Formulations," *International Journal of Traditional and Complementary Medicine Research*, c. 4, no. 2, ss. 68-78, 2023.
- [56] X. Lai, H. J. Wichers, M. Soler-Lopez, ve B. W. Dijkstra, "Structure and function of human tyrosinase and tyrosinase-related proteins," *Chemistry–A European Journal*, c. 24, no. 1, ss. 47-55, 2018.
- [57] U. Ghani, "Azole inhibitors of mushroom and human tyrosinases: Current advances and prospects of drug development for melanogenic dermatological disorders," *European Journal of Medicinal Chemistry*, c. 239, s. 114525, 2022.
- [58] H. Göksu, E. Demir, ve N. Zengin, "Synthesis of N-Arylimidazole Derivatives From Imidazole and Arylhalides in the Presence of Recoverable Pd/AIO (OH) NPs," *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, c. 27, no. 4, ss. 20948-20954, 2020.
- [59] M. Pretzler ve A. Rompel, "What causes the different functionality in type-III-copper enzymes? A state of the art perspective," *Inorganica Chimica Acta*, c. 481, ss. 25-31, 2018.
- [60] C. A. Ramsden ve P. A. Riley, "Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation," *Bioorganic & medicinal chemistry*, c. 22, no. 8, ss. 2388-2395, 2014.
- [61] B. De, I. Adhikari, A. Nandy, A. Saha, ve B. B. Goswami, "In silico modelling of azole derivatives with tyrosinase inhibition ability: Application of the models for activity prediction of new compounds," *Comput Biol Chem*, c. 74, ss. 105-114, Jun 2018.
- [62] Y. Qu, Q. Zhan, S. Du, Y. Ding, B. Fang, W. Du, Q. Wu, H. Yu, L. Li, ve W. Huang, "Catalysis-based specific detection and inhibition of tyrosinase and their application," *Journal of Pharmaceutical Analysis*, c. 10, no. 5, ss. 414-425, 2020.
- [63] J. Choi, K. E. Choi, S. J. Park, S. Y. Kim, ve J. G. Jee, "Ensemble-Based Virtual Screening Led to the Discovery of New Classes of Potent Tyrosinase Inhibitors," *J Chem Inf Model*, c. 56, no. 2, ss. 354-367, Feb 22 2016.
- [64] R. Qamar, A. Saeed, F. A. Larik, Q. Abbas, M. Hassan, H. Raza, ve S. Y. Seo, "Novel 1,3-oxazine-tetrazole hybrids as mushroom tyrosinase inhibitors and free

radical scavengers: Synthesis, kinetic mechanism, and molecular docking studies," *Chem Biol Drug Des*, c. 93, no. 2, ss. 123-131, Feb 2019.

- [65] B. Lee, K. M. Moon, J. S. Lim, Y. Park, S. Son, H. O. Jeong, D. H. Kim, E. K. Lee, K. W. Chung, ve H. J. An, "2-(3, 4-dihydroxybenzylidene) malononitrile as a novel anti-melanogenic compound," *Oncotarget*, c. 8, no. 53, s. 91481, 2017.
- [66] M. A. Roselan, N. Zakaria, N. H. Faujan, M. A. M. Latif, S. M. M. Faudzi, H. Ab Hadi, ve S. E. Ashari, "In vitro cytotoxicity assay, mushroom tyrosinase inhibitory activity and release analysis of kojic monooleate nanodelivery system and in silico molecular docking study against 2Y9X target enzyme," *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, c. 66, s. 102764, 2021.
- [67] I. Torktaz, F. Mohamadhashem, A. Esmaili, M. Behjati, ve S. Sharifzadeh, "Virtual screening and pharmacophore design for a novel theoretical inhibitor of macrophage stimulating factor as a metastatic agent," *BioImpacts: BI*, c. 3, no. 3, s. 141, 2013.
- [68] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, ve P. J. Feeney, "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings," *Advanced drug delivery reviews*, c. 64, ss. 4-17, 2012.
- [69] A. Daina, O. Michielin, ve V. Zoete, "SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules," *Scientific reports*, c. 7, no. 1, s. 42717, 2017.
- [70] *Kozmetik Ürünler Yönetmeliği*, T. İ. v. T. C. Kurumu 2023.
- [71] H. Göksu ve E. Gültekin, "Pd nanoparticles Incarcerated in Aluminium Oxy-Hydroxide: An Efficient and Recyclable Heterogeneous Catalyst for Selective Knoevenagel Condensation," *ChemistrySelect*, c. 2, no. 1, ss. 458-463, 2017.
- [72] H. Goksu ve F. Sen, "Handy and highly efficient oxidation of benzylic alcohols to the benzaldehyde derivatives using heterogeneous Pd/AlO (OH) nanoparticles in solvent-free conditions," *Scientific Reports*, c. 10, no. 1, s. 5731, 2020.
- [73] B. Y. Kara, M. Yazici, B. Kilbas, ve H. Goksu, "A practical and highly efficient reductive dehalogenation of aryl halides using heterogeneous Pd/AlO (OH) nanoparticles and sodium borohydride," *Tetrahedron*, c. 72, no. 39, ss. 5898-5902, 2016.
- [74] Y. Uozumi ve S. Hirata, "Pd Nanoparticle Catalyzed Reductive Dehalogenation of Aryl Halides with NaBH<sub>4</sub>," *Synfacts*, c. 12, no. 12, ss. 1320-1320, 2016.
- [75] F. Chang, H. Kim, B. Lee, S. Park, ve J. Park, "Highly efficient solvent-free catalytic hydrogenation of solid alkenes and nitro-aromatics using Pd nanoparticles entrapped in aluminum oxy-hydroxide," *Tetrahedron Letters*, c. 51, no. 32, ss. 4250-4252, 2010.

- [76] H. Goksu, N. Zengin, A. Karaosman, ve F. Sen, "Highly active and reusable Pd/AlO (OH) nanoparticles for the Suzuki cross-coupling reaction," *Current Organocatalysis*, c. 5, no. 1, ss. 34-41, 2018.
- [77] B. Y. Kara, B. Kılbaş, ve H. Göksu, "Selectivity and activity in catalytic hydrogenation of azido groups over Pd nanoparticles on aluminum oxyhydroxide," *New Journal of Chemistry*, c. 40, no. 11, ss. 9550-9555, 2016.
- [78] M.-J. Kim, W.-H. Kim, K. Han, Y. K. Choi, ve J. Park, "Dynamic kinetic resolution of primary amines with a recyclable Pd nanocatalyst for racemization," *Organic letters*, c. 9, no. 6, ss. 1157-1159, 2007.
- [79] H. Göksu, "Recyclable aluminium oxy-hydroxide supported Pd nanoparticles for selective hydrogenation of nitro compounds via sodium borohydride hydrolysis," *New Journal of Chemistry*, c. 39, no. 11, ss. 8498-8504, 2015.
- [80] S. Ganesh Babu, B. Emayavaramban, P. Jerome, ve R. Karvembu, "Pd/AlO (OH): a heterogeneous, stable and recyclable catalyst for N-arylation of aniline under ligand-free aerobic condition," *Catalysis Letters*, c. 147, ss. 2619-2629, 2017.
- [81] B. Kilbas, S. Ergen, ve D. Cakici, "Highly efficient and reusable pd/alO (oh) catalyzed synthesis of acridinedione derivatives," *Current Organocatalysis*, c. 6, no. 3, ss. 257-265, 2019.
- [82] M. S. Kwon, N. Kim, C. M. Park, J. S. Lee, K. Y. Kang, ve J. Park, "Palladium nanoparticles entrapped in aluminum hydroxide: Dual catalyst for alkene hydrogenation and aerobic alcohol oxidation," *Organic letters*, c. 7, no. 6, ss. 1077-1079, 2005.
- [83] R. Thomsen ve M. H. Christensen, "MolDock: a new technique for high-accuracy molecular docking," *Journal of medicinal chemistry*, c. 49, no. 11, ss. 3315-3321, 2006.
- [84] W. T. Ismaya, H. J. Rozeboom, A. Weijn, J. J. Mes, F. Fusetti, H. J. Wichers, ve B. W. Dijkstra, "Crystal structure of Agaricus bisporus mushroom tyrosinase: identity of the tetramer subunits and interaction with tropolone," *Biochemistry*, c. 50, no. 24, ss. 5477-5486, 2011.
- [85] A. Daina ve V. Zoete, "A boiled-egg to predict gastrointestinal absorption and brain penetration of small molecules," *ChemMedChem*, c. 11, no. 11, ss. 1117-1121, 2016.
- [86] Ü. Yırtıcı, A. Ergene, M. N. Atalar, ve Ş. Adem, "Phytochemical composition, antioxidant, enzyme inhibition, antimicrobial effects, and molecular docking studies of Centaurea sivasica," *South African Journal of Botany*, c. 144, ss. 58-71, 2022.
- [87] *Kozmetik Ürünlerin Stabilitesine Ve Açıldıktan Sonra Kullanım Süresine İlişkin Kılavuz Sürüm 1.0*, T. İ. V. T. C. Kurumu, 2014.

- [88] M. E. Gondokesumo ve I. M. Kurniawan, "Molecular docking study of sappan wood extract to inhibit PBP2A enzyme on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)," *Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology*, c. 30, no. 6, s. 20190282, 2020.
- [89] V. Kahn ve A. Andrawis, "Inhibition of mushroom tyrosinase by tropolone," *Phytochemistry*, c. 24, no. 5, ss. 905-908, 1985.
- [90] D. Otasek, J. H. Morris, J. Bouças, A. R. Pico, ve B. Demchak, "Cytoscape automation: empowering workflow-based network analysis," *Genome biology*, c. 20, ss. 1-15, 2019.
- [91] H. Decker, T. Schweikardt, ve F. Tucek, "The first crystal structure of tyrosinase: all questions answered?," *Angewandte Chemie International Edition*, c. 45, no. 28, ss. 4546-4550, 2006.
- [92] C. Orhan, "Biyolojik Aktiviteye Sahip Sülfat Bileşiklerinin Yapılarının Dft Metoduyla Aydınlatılması, Adme Özelliklerinin İncelenmesi," Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Çankırı Karatekin Üniversitesi Çankırı, 2022.
- [93] J. Kirchmair, A. H. Göller, D. Lang, J. Kunze, B. Testa, I. D. Wilson, R. C. Glen, ve G. Schneider, "Predicting drug metabolism: experiment and/or computation?," *Nature reviews Drug discovery*, c. 14, no. 6, ss. 387-404, 2015.
- [94] A. ONAY, "Veri madenciliği teknikleri kullanarak bir ilaç sınıflandırma çatısı gerçekleştirimi," Doktora Tezi Bilgisayar Mühendisliği Tobb Ekonomi Ve Teknoloji Üniversitesi, 2017.
- [95] M. Lukić, I. Pantelić, ve S. D. Savić, "Towards Optimal pH of the Skin and Topical Formulations: From the Current State of the Art to Tailored Products," *Cosmetics*, c. 8, no. 3, s. 69, 2021.
- [96] A. Ayşe ve M. Eryılmaz, "Kozmetik Ürünlerde Görülen Mikrobiyolojik Kontaminasyonlar," *Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University*, c. 46, no. 1, ss. 262-276, 2022.

# ÖZGEÇMİŞ

## KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı :Elif AYDINLI

Yabancı Dili :İngilizce

## ÖĞRENİM DURUMU

Derece	Alan	Okul/Üniversite	Mezuniyet Yılı
Doktora	Doğal, Bitkisel ve Kozmetik Ürünler	Düzce Üniversitesi	2024
Y. Lisans	Kimya	Düzce Üniversitesi	2017
Lisans	Kimya	Karadeniz Teknik Üniversitesi	2011
Lise	Fen Bilimleri	Düzce Lisesi (Y. D. A. L)	2005

## YAYINLAR

### Tezden Çıkan Yayınlar

#### Makale:

**E. Aydınli**, A. Z Hameed, H. Göksu, ve S. Adem "Investigation of efficacy on tyrosinase enzyme of 5-substituted-1H-tetrazole derivatives synthesized with Pd-containing nanoparticle," yayımlanmak üzere gönderildi, 2024.

#### Diğer Yayınlar

#### Makaleler:

**E. Aydınli**, B. Demir, ve H. Göksu, "Preparation of *Centella asiatica* (L). and *Hypericum perforatum* (St. John's Wort) Plant Extracts and Development of Anti-Aging Herbal Cream Formulations," *International Journal of Traditional and Complementary Medicine Research*, c. 4, no. 2, ss. 68-78, 2023.

H. Göksu, **E. Aydınli**, G. Hekimoğlu, A. Sarı, O. Gencel, S. Subaşı, ve A. Tozluoğlu,

"Activated carbon nanotube/polyacrylic acid/stearyl alcohol nanocomposites as thermal energy storage effective shape-stabilized phase change materials," *Surfaces and Interfaces*, c. 31, s. 102088, 2022.

E. Cantopcu, **E. Aydinli**, ve H. Goksu, "Homogeneous catalyst containing Pd in the reduction of aryl azides to primary amines," *Journal of Chemical Sciences*, c. 134, no. 2, s. 41, 2022.

**E. Aydinli** ve H. Göksu, "Use in the Healthcare Industry of the Hydrogen Energy Produced by Solid Hydrogen Sources Used in Fuel Cells," *Sağlık Bilimlerinde Değer*, c. 12, no. 1, ss. 171-174, 2022.

### **Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitabında Basılan Bildiriler**

**Aydinli E.**, Adem Ş., Göksu H., "Using of 5-Substitued-1H-Tetrazol Derivative Compound, Active On Tyrosinase Enzyme, Synthesized By A New Method, As The Active Ingredient In Cream Formulation". *1st International Congress of Apitherapy*'nda sunuldu, Düzce, Türkiye, 02-04 October 2023.

**Aydinli E.**, Adem Ş., Göksu H., "Yeni Yöntemle Sentezlenen 5-Substitue-1H-Tetrazol Türevlerinin Tirozinaz Enzimi Üzerindeki Etkinliğinin İncelenmesi ve Krem Formülasyonunda Etken Madde Olarak Kullanılması". *13th International Congress of Cosmetics Chemistry, Production and Standardization*'nda sunuldu, Antalya Türkiye, 2023.

**Aydinli E.**, Bayram D., Göksu H., "Gotu Kola (*Centella asiatica*) ve Sarı Kantaron (*St. John's Wort*) Bitki Ekstreleri Kullanılarak Anti-Aging Bitkisel Krem Formülasyonlarının Geliştirilmesi". *13th International Congress of Cosmetics Chemistry, Production and Standardization*'nda sunuldu, Antalya Türkiye, 2023.