

Araştırma Makalesi - Research Article

Sentezlenen Yeni Ni (II) Komplekslerinin Spektroskopik ve antifungal özelliklerinin İncelenmesi

Tuncay Karakurt^{1*}, Seher Meral², Ayşen Alaman Ağar³, Abdurrahman Onaran⁴

Geliş / Received: 08/08/2019

Revize / Revised: 13/12/2019

Kabul / Accepted: 07/01/2020

ÖZ

Bu çalışmada, 6,6'-((1E,1'E)-(propan-1,3-diilbis(azanildien))bis(fenillmetanildien))bis(3-(oktiloks)fenol) (HL1) ve 6,6'-((1E,1'E)-(etan-1,2-diilbis(azanildien))bis(fenillmetanildien))bis(3-(oktiloks)fenol) (HL2) ligandları ile Ni metal atomunun iki farklı kompleksi (HL1Ni ve HL2Ni) sentezlendi ve NMR, FT-IR ve UV-Vis spektroskopik yöntemleri ile karakterize edildi. İki kompleks yapının *in vitro* koşullar altında *Rhizoctonia solani* ve *Fusarium oxysporum f.sp. radicle-lycopersici* (FORL) bitki patojenlerine karşı antifungal aktivite çalışmaları yapıldı. Etkinliği belirlenen bileşiklerin doz miktarına göre test edilen patojenlere karşı orta ve yüksek düzeyde aktivite sergilediği belirlendi. Ayrıca Kompleks yapıların moleküller arası etkileşimlerin daha iyi anlaşılabilmesi amacıyla da bileşiklerin HOMO-LUMO orbitalleri teoriksel olarak elde edildi. Son olarak da moleküler doking çalışması ile reseptör-kompleks etkileşimleri simüle edildi. Bu hesaplama sonucunda komplekslere ait afinite değerleri (Doking skoru) sırasıyla -6.9 ve -6.4 kcal/mol olarak hesaplandı. Kompleks yapıların doking skorları ile HOMO orbital enerjilerinin birbirleriyle ilişki olduğu gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler- NMR, FT-IR, UV-Vis, Antifungal, HOMO-LUMO, Moleküler Doking, Afinite

*Sorumlu yazar iletişim: tuncaykarakurt@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0001-6944-9883>)

Kimya ve Proses Mühendisliği, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi, Mühendislik-Mimarlık Fakültesi, 40100, Kırşehir

²İletişim: shrmeral@gmail.com (<https://orcid.org/0000-0002-6309-8936>)

Mülkiyet Koruma ve Güvenlik Bölümü, Sinop Üniversitesi, Boyabat Meslek Yüksekokulu, 57200, Sinop

³İletişim: aysena@omu.edu.tr (<https://orcid.org/0000-0002-1316-4835>)

Kimya Bölümü, Ondokuzmayıs Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, 55271, Samsun

⁴İletişim: abdonaran@hotmail.com (<https://orcid.org/0000-0003-0665-8535>)

Bitkisel ve Hayvansal Üretim Bölümü, Akdeniz Üniversitesi, Kumluca Meslek Yüksekokulu, 07350, Antalya

Investigation of Spectroscopic and Antifungal Properties of Synthesized New Ni (II) Complexes

ABSTRACT

In this study 6,6'-((1E,1'E)-(propane-1,3-diylbis(azanylylidene))bis(phenylmethanylylidene))bis(3-(octyloxy)phenol) (HL1) and 6,6'-((1E,1'E)-(ethane-1,2-diylbis(azanylylidene)) bis(phenylmethanylylidene)) bis(3-(octyloxy)phenol) (HL2) ligands were synthesized with two different complexes (HL1Ni and HL2Ni) of Ni metal atom and characterized using NMR, FT-IR and UV-Vis spectroscopic methods. Antifungal activity studies of two complex structures against *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum f.sp radices-lycopersici* (FORL) plant pathogens were performed under *in vitro* conditions. It was found that the compounds whose activity was determined showed moderate and high activity against the tested pathogens according to the dose amount. In addition, HOMO-LUMO orbitals were obtained theoretically in order to better understand the intermolecular interactions of complex structures. Finally, the molecular docking study simulated receptor-complex interactions. As a result of this calculation, affinity values (Doking score) of the complexes were calculated as -6.9 and -6.4 kcal/mol, respectively. It was seen that docking score and HOMO orbital energies of complex structures were correlated with each other.

Keywords- NMR, FT-IR, UV-Vis, Antifungal, HOMO-LUMO, Molecular Docking, Affinity

I. GİRİŞ

İlginç yapıları ve özellikleri olan bileşikler elde etmek için şelatlayıcı ligantlara sahip metal komplekslerin kullanılması son yıllarda büyük ilgi çekmektedir. Polidentat ligantlar arasındaki Schiff bazları, kataliz, ışık veren probalar, analitik kimya, manyeto-yapısal kimya, tarımsal ilaç kimya, biyolojik alanlar gibi çeşitli alanlarda potansiyel uygulamaları nedeniyle özellikle ilgi çekicidir [1–10]. Çok sayıda binükleer kompleks yapı sentezlenmiş ve bu yapılar içinde çeşitli köprülerin aracılık ettiği Ni (II) iyonları arasındaki değişimden kaynaklanan etkileşimlerin niteliğini ve gücünü yöneten faktörlerin araştırılması için model olarak literatürlerde belirtilmiştir; fenoksido [11–18], azido [19, 20], cyanato ve tiocyanato [19, 21], karboksilat [22] vb. Schiff bazlı komplekslerin, yapılarında mevcut olan hetero ve metal atomları nedeniyle önemli biyoaktivite [23] gösterdiği bildirilmiştir. Bu bileşiklerin antikanser özelliklerinin genellikle çinko, bakır, kobalt ve nikel gibi geçiş metalleriyle koordinasyonu ile artış gösterdiği belirtilmiştir [24]. Ayrıca Co (II), Ni (II) ve Cu (II) kompleksleri, CT-DNA bağlama kabiliyeti ve sitotoksik aktivite gibi biyoorganik araştırmalarda da kullanılmaktadır [25–27].

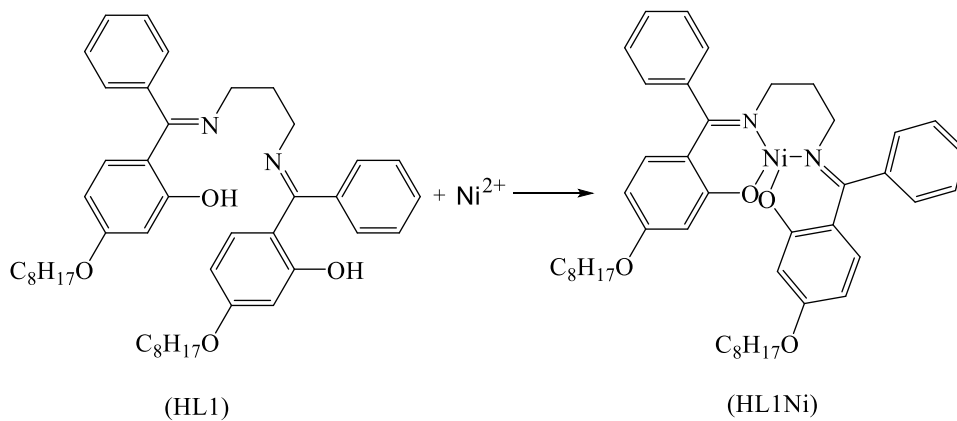
Bu çalışmada, Ni (II) metal atomu ile oluşturulan iki kompleks yapı sentezlendi ve ^{13}C - ^1H NMR, FT-IR ve UV-Vis spektroskopik yöntemleri ile karakterize edildi. Teorik çalışmalar ile kompleks yapılara ait sınır moleküler orbital (FMO) enerjileri de belirlendi. Son olarak da biyolojik aktivite çalışmaları deneysel ve teorik olarak yapıldı.

II. MATERYAL VE YÖNTEM

A. Kompleks Bileşiklerin Sentezi

6,6'-((1E,1'E)-(propan-1,3-diilbis(azanildien))bis(fenilmetanildien))bis(3-(oktiloks)fenol)Ni(II) sentezi

6,6'-((1E,1'E)-(propan-1,3-diilbis(azanildien))bis(fenilmetanildien))bis(3-(oktiloks)fenol) (HL1), 2-hidroksi-4-(oktiloksi)fenil(fenil)metanon (0.0090 mmol) ve 1,3-propandiamin (0.0090mmol) yaklaşık 18 saat reflaks altında tetrahidrofuran içinde yoğunlaştırılmasıyla sentezlendi. Sarı ürün soğuk etanol ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. 0.0080 mmol HL1, 20 mL etanol içerisinde çözündürüldü ve 0.0080 mmol $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20 mL etanol içerisinde çözündürüldü. Daha sonra, metal çözelti damla damla Schiff baz çözeltisine ilave edildi ve yaklaşık 6 saat reflaks edildi. Portakal renkli ürün toluen ile yıkandı ve oda sıcaklığında etanolden elde edildi (Şekil 1) (E.N: 398 K, verim: 80%).

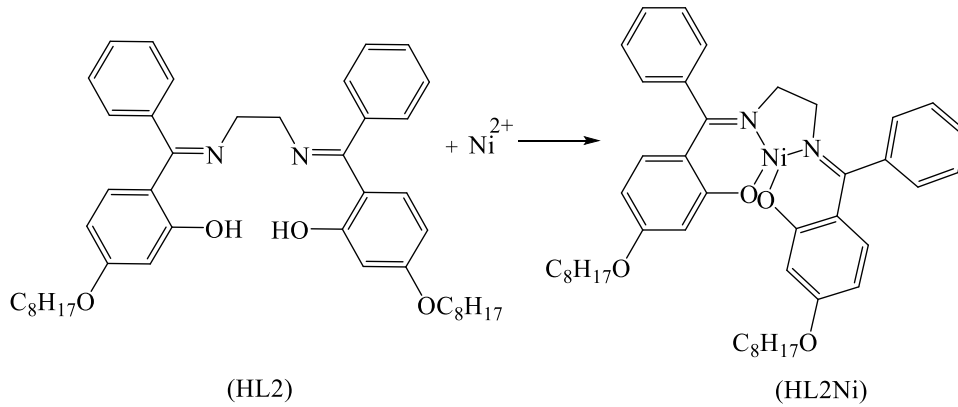


Şekil 1. HL1Ni kompleksinin sentez şeması

6,6'-((1E,1'E)-(etan-1,2-diilbis(azanildien))bis(fenilmetanildien))bis(3-(oktiloks)fenol)Ni(II) sentezi

6,6'-((1E,1'E)-(etan-1,2-diilbis(azanildien))bis(fenilmetanildien))bis(3-(oktiloks)fenol) (HL2), 2-hidroksi-4-(oktiloksi)fenil(fenil)metanon (0.0090 mmol) ve 1,2-etandiamin (0.0090mmol) yaklaşık 18 saat

reflaks altında tetrahidrofuran içinde yoğunlaştırılmasıyla sentezlendi. Sarı ürün soğuk etanol ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. 0.0080 mmol HL1, 20 mL etanol içerisinde çözündürüldü ve 0.0080 mmol $\text{Ni}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 20 mL etanol içerisinde çözündürüldü. Daha sonra, metal çözelti damla damla Schiff baz çözeltisine ilave edildi ve yaklaşık 6 saat reflaks edildi. Portakal renkli ürün toluen ile yıkandı ve oda sıcaklığında etanolden elde edildi (Şekil 2) (E.N: 463 K, verim: 80%).



Şekil 2. HL2Ni kompleksinin sentez şeması

B. Fiziksel Ölçümler

Komplekslerin FT-IR spektrumu, Schmadzu FT-IR 8900 spektrofotometresi kullanılarak 4000–400 cm^{-1} aralığında kaydedildi. Ultraviyole absorpsiyon spektrumları, Unicam UV-Vis spektrofotometresi kullanılarak 200–600 nm aralığında incelendi. NMR spektrumları, Bruker Ultra Shield Plus, Magnet system 500 MHz ve DMSO çözücüsü kullanılarak alındı.

C. Teorik Hesaplamalar

Komplekslerin moleküler modellemesi, C, N, O, H atomları için 6–31G(d, p) [28] ve Ni(II) atomu için de LanL2DZ [29–31] baz setli yoğunluk fonksiyonel teorisini DFT/B3LYP [32, 33] kullanan Gaussian 09 [34] programı ve moleküler doking çalışmaları ise PyRx [35] ve Discovery Studio 2017 [36] programları ile gerçekleştirildi.

D. Biyolojik Çalışmalar

Fungus Kültürleri

Antifungal aktivite çalışmalarında *Rhizoctonia solani* (patatesten izole edilmiş) ve *Fusarium oxysporum f.sp. radicle-lycopersici* (domatesden izole edilmiş) bitki patojenleri kullanıldı. Patojenlerin inokulumu PDA (potato dextrose agar) ortamı üzerinde 22 ± 2 °C'de 7 gün boyunca geliştirildi ve çalışma süresi boyunca kullanıldı.

Antifungal aktivite çalışmaları

Bileşiklerin antifungal aktivite çalışmalarında agar petri yöntemi kullanılarak denemeler yürütüldü [37]. Patates dextroz agar (PDA) otoklav edildikten sonra 40 °C dereceye soğutulmuş ve %10 Dimetil sülfoksit'de çözülen bileşikler (HL1Ni ve HL2Ni) son konsantrasyonları 5, 10, 15, 20 $\mu\text{l/ml}$ olacak şekilde PDA ortamına ilave edildi. Daha sonra, bileşik ilaveli PDA'lar (B-PDA) 10 ml olacak şekilde 60 mm petri kaplarına ilave edildi. Patojenlerin 5 mm çapında alınan miselyum diskleri B-PDA ortamının merkezine ekimi yapıldı. Bu fungus kültürleri 22 ± 2 °C'de kontroldeki gelişmeler dikkate alınarak uygulamalardaki miselyum gelişmeleri günlük

olarak ölçümleri yapıldı [38]. Pozitif kontrol olarak thriam %80 ticari firmanın önerdiği dozda kullanılmıştır. Negatif kontrol olarak %10 Dimetil sülfoksit kullanıldı. Denemeler 4 tekerrürlü 2 tekrarlı olarak kurulmuştur. Gelişimdeki engelleme kontroldeki gelişime kıyaslanarak yüzde miselyum hesaplanmıştır. Miselyum gelişim engellemesi aşağıdaki formüle göre hesaplandı [39].

$$MGE=100 \times (dc-dt)/dc$$

MGE; Miselyum Gelişim Engellemesi

dc; Kontroldeki miselyum Gelişmesi

dt; Davranışlardaki miselyum gelişmesi

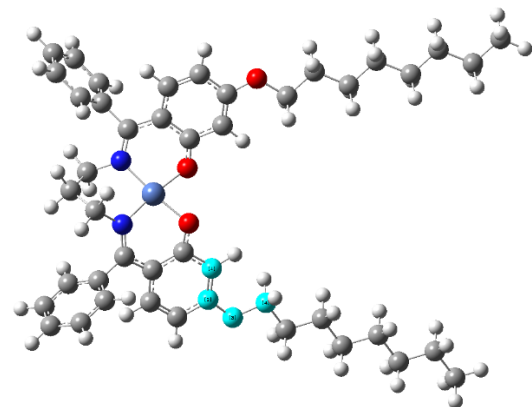
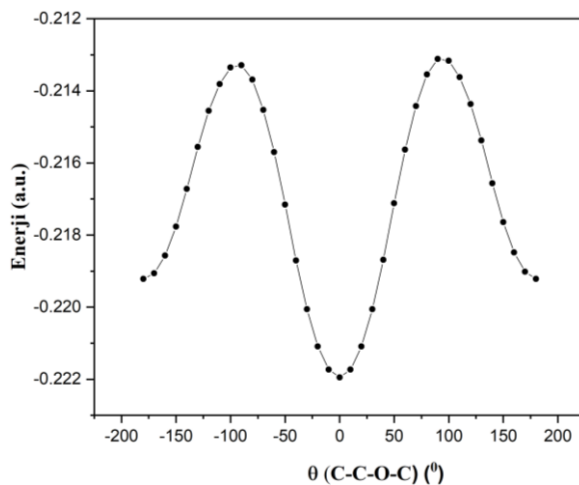
İstatistiksel analizler

Çalışma sonucunda elde edilen veriler, SPSS 16.00 programı kullanılarak varyans analizine tabi tutulmuş ve Duncan testi ile ortalamalar arasındaki farklar belirlendi. Ayrıca, bileşiklerin letal dozları Polo plus 1.0 paket programı kullanılarak belirlendi.

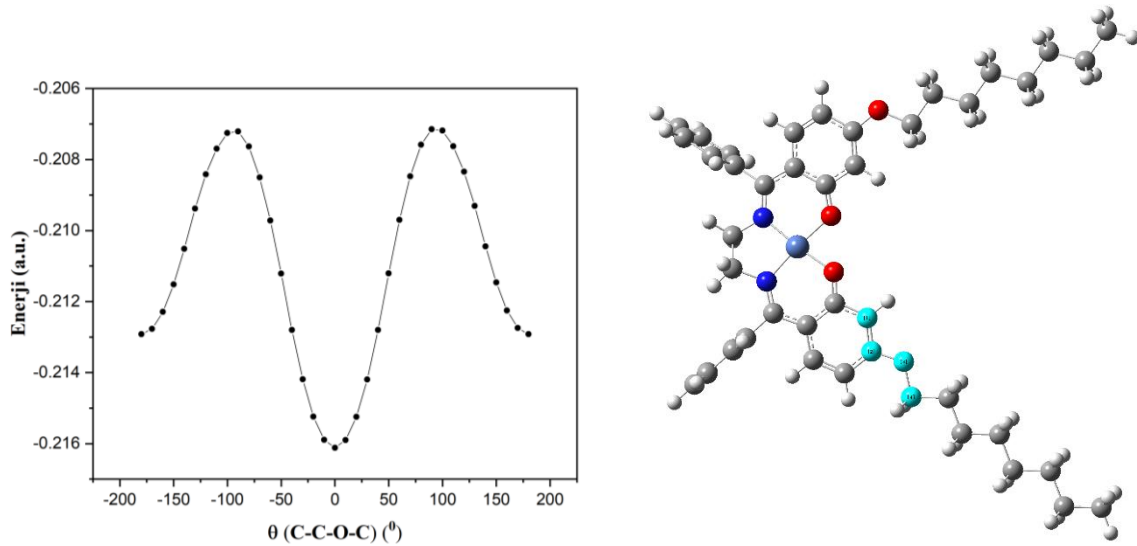
III. BULGULAR VE TARTIŞMA

A. Teoriksel Hesaplamalar

Yarı deneysel metot olan PM6 [40] yöntemi kullanılarak Potansiyel Enerji Yüzeyi analizi (PEY) ile her iki kompleksin konformasyon yapıları elde edildi (Şekil 3a-b). Şekil 3a-b'de yeşil renk ile belirtilen atomların $\theta(C-C-O-C)$ burulma açısına ait PEY hesaplamaları iki kompleks yapı için elde edildi (Şekil 3). HL1Ni ve HL2Ni komplekslerinin PEY analizi sonucu, 0° 'de Global minimumu ve bu açı değerinde birbirlerine simetrik olan iki lokal minimum ve maksimum potansiyel engelleri gözlenmiştir. Potansiyel enerji yüzeyi üzerinde $\pm 180^\circ$ değerlerinde iki lokal minimum noktaya karşılık gelen konformasyonlar gözlemlendi. Bileşiklerin Global enerji minimumları, 0° 'ye karşılık gelmektedir. Tüm minimum noktalara karşılık gelen konformasyonların, LanL2DZ ve 6-31G(d, p) temel setli DFT/B3LYP yöntemi kullanılarak optimizasyonu sonucu sistemlerin minimum yapılarına ait enerjileri HL1Ni ve HL2Ni için sırasıyla -2328.35630811 ve -2289.05392768 a.u. olarak elde edildi. Komplekslerin $\pm 90^\circ$ 'de gözlenmiş olan konformasyonların optimize işlemi sonucunda hesaplanan en yüksek enerjileri, HL1Ni için -2328.34845362 ve HL2Ni için ise -2289.04594303 a.u. olarak belirlendi.



(a)

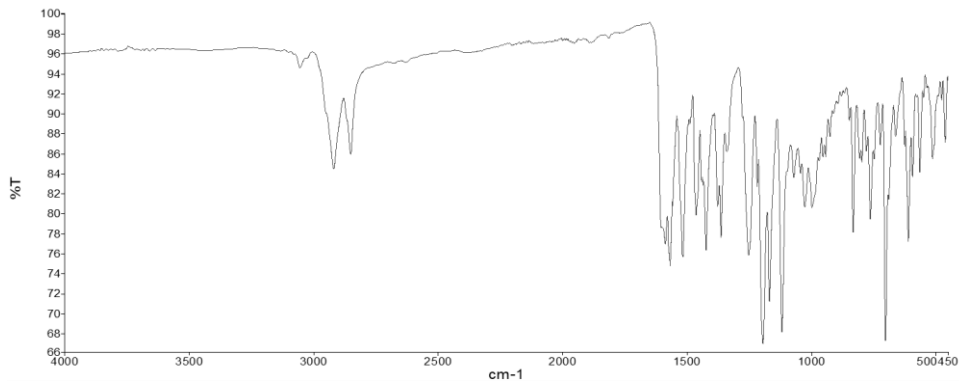


(b)

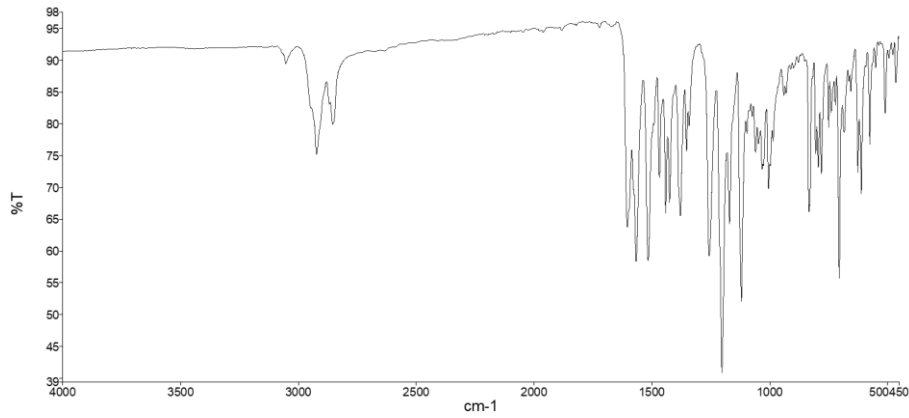
Şekil 3. (a) HL1Ni ve (b) HL2Ni komplekslerine ait optimize geometrileri

B. FT-IR ve NMR Çalışmaları

Kompleks yapıların FT-IR spektrumları Şekil 4a-b'de gösterilmiştir. HL1Ni ve HL2Ni komplekslerinin benzen halkalarına ait CH gerilme bantları deneysel olarak 3054 cm^{-1} iken teorik olarak sırasıyla $3112\text{--}3060$ ve $3117\text{--}3060\text{ cm}^{-1}$ aralıklarında hesaplanmıştır. CH_2 bandına ait simetrik ve asimetrik titreşim bantları HL1Ni ve HL2Ni kompleksleri için sırasıyla $2920\text{--}2850$ ve $2923\text{--}2855$ gözlenirken teorik olarak da $2975\text{--}2885$ ve $2974\text{--}2886\text{ cm}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. $\text{C}=\text{N}$ gerilme bandı ise deneysel olarak HL1Ni için 1587 cm^{-1} ve HL2Ni için ise 1604 cm^{-1} güçlü ve keskin olarak gözlenmiş olup bu bandın hesaplanan değerleri ise 1560 ve 1562 cm^{-1} 'dir. Önemli piklerden olan $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ve $\text{C}=\text{C}$ gerilme titreşim pikleri HL1Ni için sırasıyla 1194 ve 1516 cm^{-1} , HL2Ni için ise 1201 ve 1515 cm^{-1} değerlerinde güçlü ve keskin şiddette gözlemlenmiştir. Bu piklerin teoriksel değerleri ise HL1Ni için 1206 ve $1597\text{--}1569\text{ cm}^{-1}$, HL2Ni için ise 1200 ve $1592\text{--}1568\text{ cm}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Metal ile kompleks oluşumuna giren $-\text{OH}$ piki ise gözlenmemiştir.



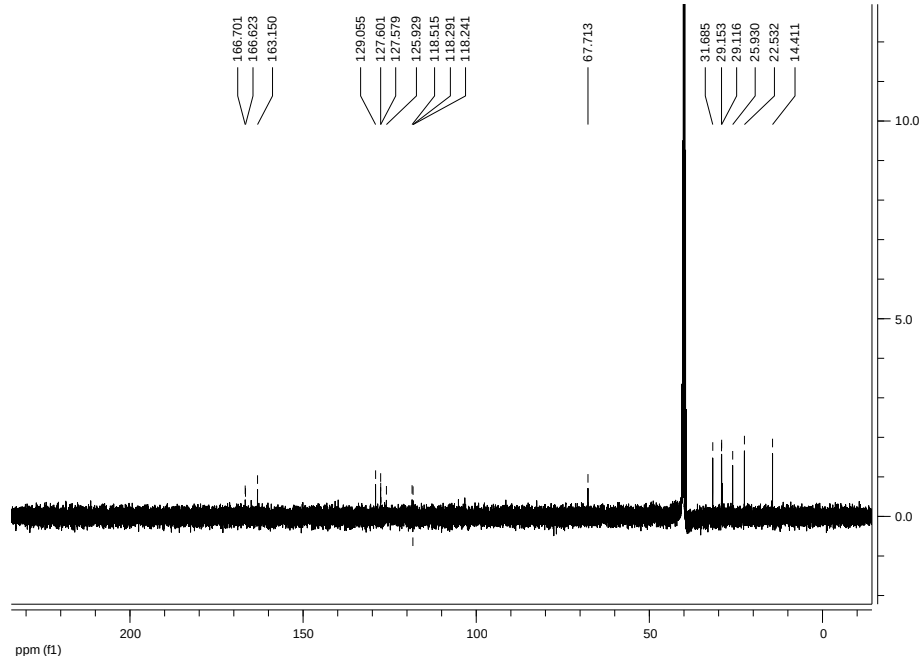
(a)



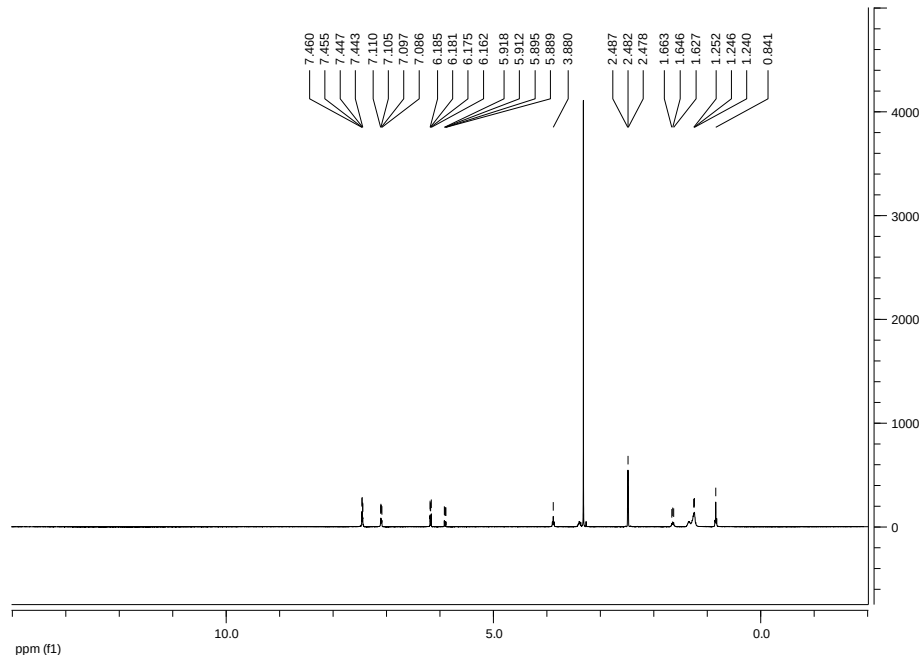
(b)

Şekil 4. (a) HL1Ni ve (b) HL2Ni komplekslerine ait IR spektrumları

Kompleks yapıları ait ^{13}C ve ^1H NMR spektrumları da Şekil 5a–b ve Şekil 6a–b’de verilmiştir. İki kompleks yapıya ait ^{13}C –NMR spektrumları incelendiğinde, fenil grubuna bağlı uzun zincirdeki $-\text{CH}_2$ ve $-\text{CH}_3$ gruplarına ait pikler HL1Ni için 14.41–31.68 ppm aralığında gözlenirken HL2Ni için de 12.52–32.48 ppm aralığında gözlenmiştir. İmin azotuna bağlı $-\text{CH}_2$ ve $-\text{OH}$ grubunun bağlı olduğu karbon atomuna ait pikler HL1Ni yapısı için sırasıyla 67.71 ppm ve 166.70 ppm civarında gözlenirken HL2Ni yapısı için de 68.53 ppm ve 170.90 ppm’de gözlenmiştir. HL1Ni ve HL2Ni yapılarına ait benzen halkalarındaki karbon atomlarına ait pikler sırasıyla 118.24–129.05 ppm ve 109.98–126.09 ppm aralıklarında gözlenmiş olup literatürdeki değerleri ile uyum içindedir [41, 42]. Komplekslerin ^1H –NMR spektrumları incelendiğinde HL1Ni yapısı için 0.84–1.66 ppm aralığında CH_3 ve $-\text{CH}_2$ gruplarına ait proton pikleri gözlenirken aromatik halkaya bağlı proton pikleri ise 5.88–7.46 ppm aralığında gözlenmiştir. HL2Ni yapısı için ise bu pikler 0.81–1.84 ppm ve 5.92–7.55 ppm aralıklarında gözlenmiştir. $-\text{OCH}_2$ ve $-\text{NCH}_2$ gruplarına ait proton pikleri HL1Ni ve HL2Ni yapıları için sırasıyla 2.48–3.80 ppm ve 3.35–3.83 ppm aralıklarında gözlenmiştir. Gözlenen piklerin literatürde verilen değerler ile uyumlu olduğu gözlenmiştir [43, 44]. HL1Ni yapısında, metallsiz Schiff bazında 3.30 ppm civarında belirlenen ve metal atomu ile kompleks oluşumuna katılan $-\text{OH}$ grubuna ait proton piki ise gözlenmemiştir.

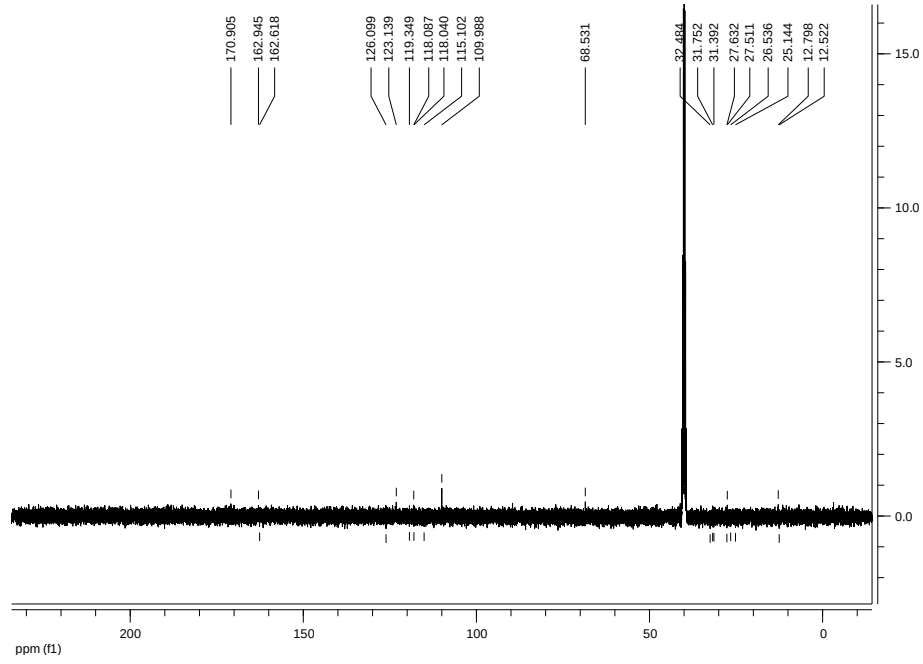


(a)

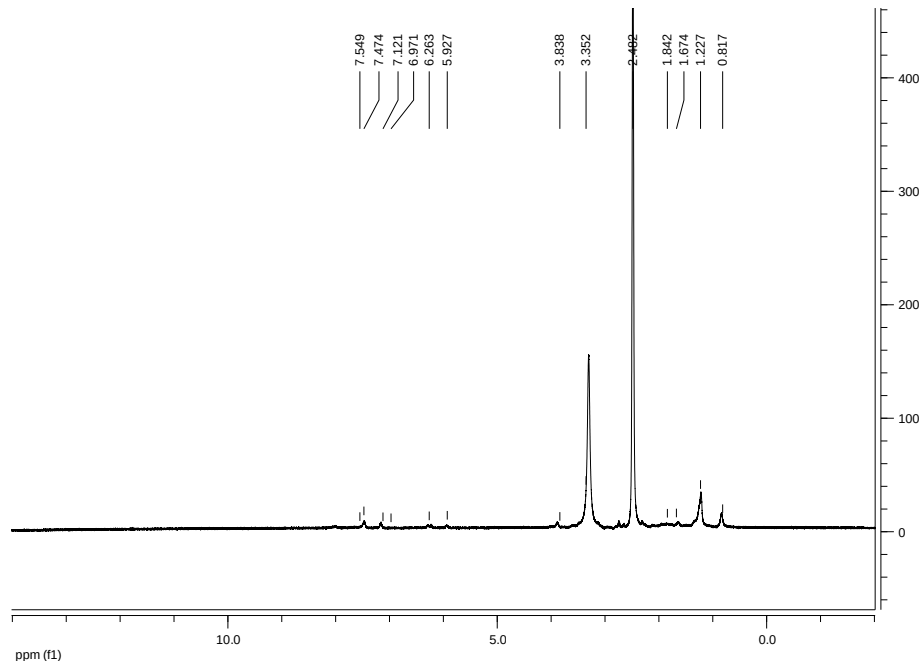


(b)

Şekil 5. HL1Ni kompleksine ait (a) ¹³C (b) ¹H NMR spektrumları



(a)

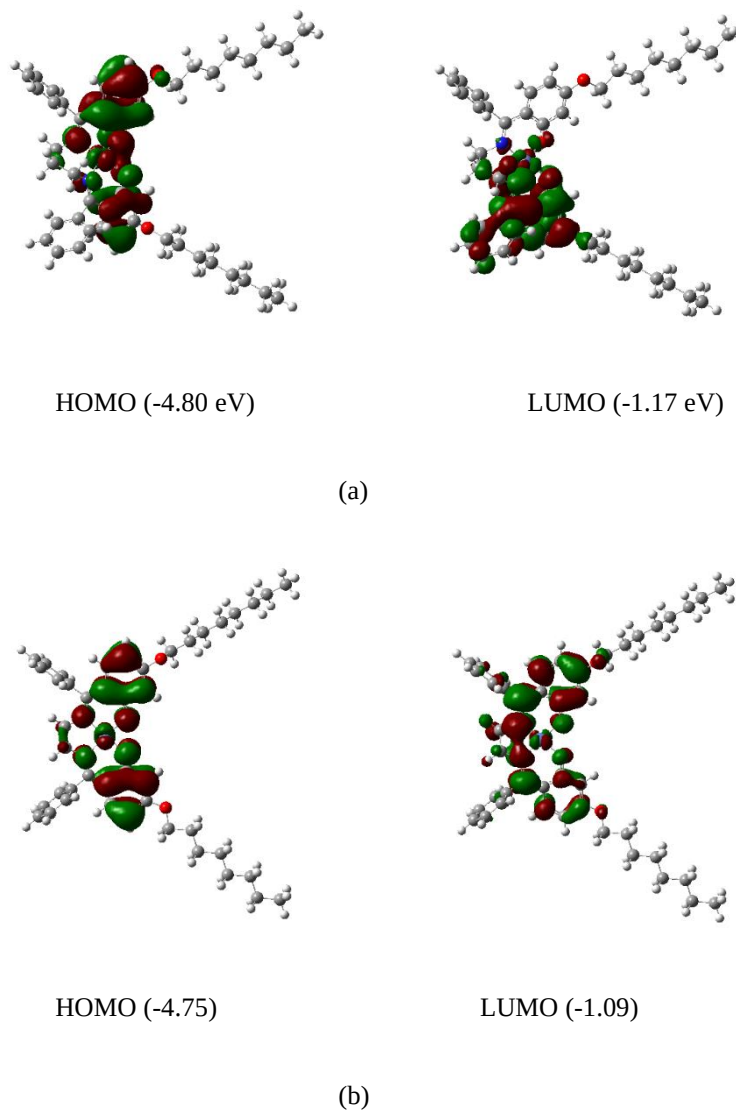


(b)

Şekil 6. HL2Ni kompleksine ait (a) ¹³C (b) ¹H NMR spektrumları

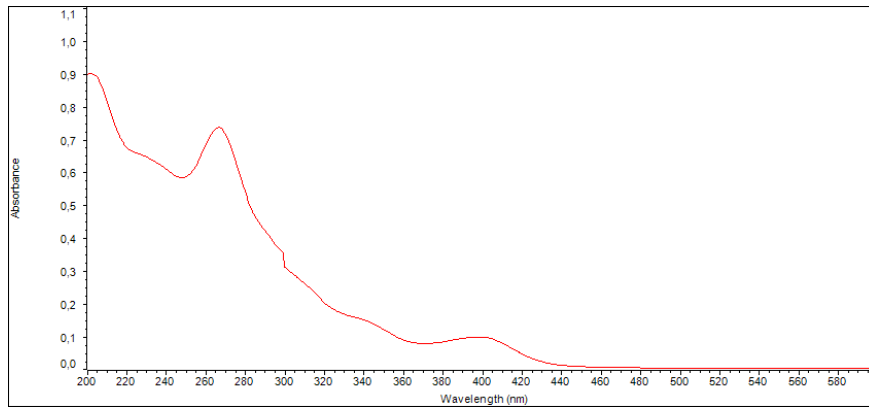
D. Elektronik Özellikleri

En yüksek enerjiye sahip elektronlarca işgal edilen moleküler orbital; HOMO ve en düşük enerjiye sahip işgal edilmemiş boş olan moleküler orbital; LUMO olarak isimlendirilir. Bu orbitaller sınır molekül orbital olarak isimlendirilir. Bir moleküle ait HOMO ve LUMO orbitalleri elektron verici ve alıcı gruplar olarak da bilinir [45, 46]. Moleküler arası yük transferlerinin belirlenmesinde kullanılabildikleri gibi, iyonlaşma potansiyeli, elektron afinitesi, kimyasal reaktivite, kinetik stabilite, polarizasyon, konjugasyon, kimyasal sertlik–yumuşaklık, kimyasal stabilite, aromatiklik, elektronegatiflik ve elektrofiliklik endeksi gibi moleküler özellikler, HOMO ve LUMO enerji değerleri dikkate alınarak hesaplanabilir [47–49]. HOMO ve LUMO dağılımlarının gösterimi Şekil 7a–b’de verilmiş olup bu orbitallerin en fazla Ni ve N atomları ile benzen halkaları üzerindeki bölgelerde yoğunlaştığı görülmektedir.

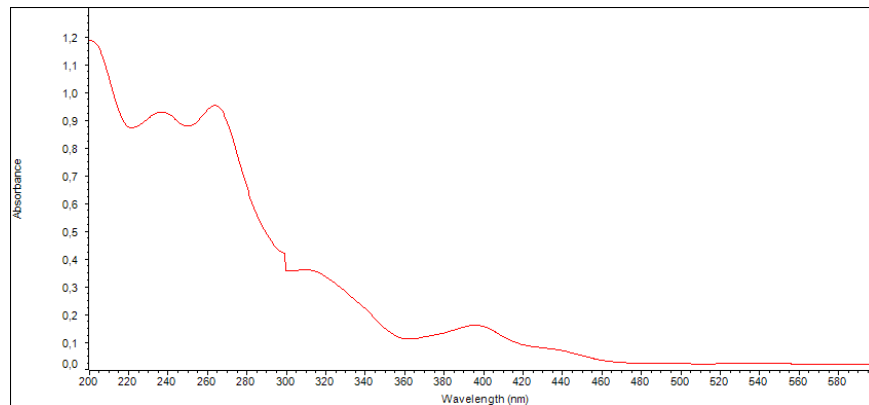


Şekil 7. (a) HL1Ni ve (b) HL2Ni komplekslerine ait Frontier orbitallerin gösterimi

Serbest ligand ve komplekslerinin UV-Vis spektrumlarında 200–300 nm bölgesine karşılık gelen pikler, aromatik halkalardaki $\pi-\pi^*$ (C=C) ve azometin gruplarının $\pi-\pi^*$ (C=N) geçişlerine ait olabileceği literatürde belirtilmiştir [50]. Çalışmamızdaki kompleks yapılara ait UV-Vis spektrumları Şekil 8a–b'de verilmiştir. Spektrumlarda, 200, 201, 237, 264 ve 267 nm'de kaydedilen absorpsiyon pikleri kompleks yapılarıdaki benzen ve azometin gruplarına ait $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişine bağlanabilir. 396 ve 398 nm'deki diğer pikler, metal–ligand veya ligand–metal elektron transferini içeren metal ve ligand arasındaki p elektron etkileşimlerinden kaynaklanan transfer geçişlerine ait olabilir [51].



(a)



(b)

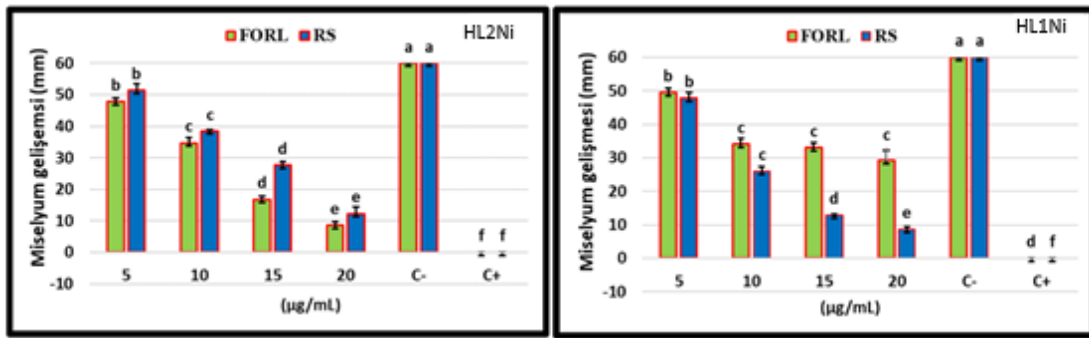
Şekil 8. (a) HL1Ni ve (b) HL2Ni komplekslerine ait UV-Vis spektrumları

E. Antifungal Çalışmalar

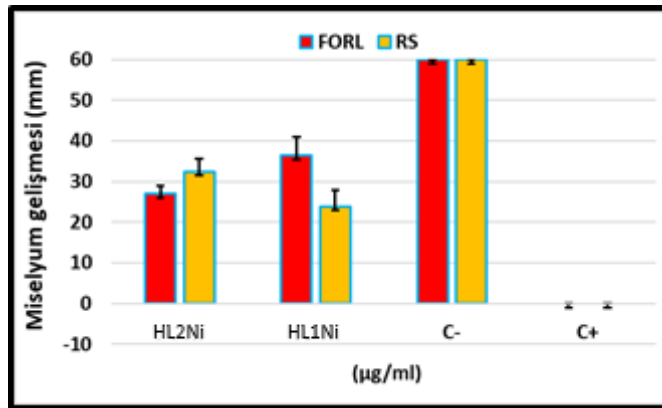
Günümüzde bitki patojenlerinin mücadelesinde kullanılan pestisitlerin tavsiye edilen doz miktarından üzerinde kullanılması sonucunda patojenler bu kimyasal bileşiklere karşı dayanıklılık oluşturmuştur. Bunun sonucunda pestisitlerin patojenler üzerindeki etkileri ya azalmış ya da kaybolmuştur. Bu nedenlerden dolayı bitki patojenlerine karşı insanlarla ve doğayla dost olabilecek alternatif yeni kimyasal bileşiklerin kazandırılması için bu ve buna benzer araştırmalar yürütülmektedir.

Bu çalışmada, sentezi yapılmış iki farklı (HL1Ni ve HL2Ni) kompleksin bitkilerde hastalığa neden olan *Fusarium oxysporum f.sp. radicle-lycopersici* (FORL) ve *Rhizoctonia solani* (RS) patojenlerine karşı antifungal aktivite değerleri belirlendi. Buna amaçla, patojenlerin bileşiklere karşı göstermiş olduğu Miselyum gelişmeleri (mm) (Şekil 9 ve Şekil 10), Miselyum gelişim engellemeleri (%) ve Letal doz değerleri (LD₁₀₋₅₀₋₉₀) (Tablo 1) verilmiştir.

Test edilen patojenlere karşı, kullanılan HL1Ni ve HL2Ni bileşiklerinin kullanılan bütün dozları patojenlerin miselyum gelişimini değişen oranlarda engellediği görüldü (Şekil 9). Doz miktarı arttıkça miselyum gelişimi üzerine etkisinde artış olduğu görülmüştür. Patojenlere karşı test edilen bileşiklerden HL2Ni bileşiği FORL patojenine karşı, HL1Ni bileşiği ise RS patojenine karşı daha fazla etkili olduğu belirlenmiştir (Şekil 10). Bu durum patojenlerin her bileşiğe karşı farklı duyarlılıkta olduğunu ortaya çıkarmıştır. Bu sonuçlar, kullanılan bileşiklerin bitki patojenlerinin miselyum gelişimi üzerine yüksek oranda etkili olduğunu ve patojenlerin kontrolünde kullanılabilecek bileşikler olabileceğini ortaya koymuştur.



Şekil 9. FORL ve RS patojenlerine karşı HL1Ni ve HL2Ni bileşiklerinin dozlara göre göstermiş olduğu antifungal aktivite değerleri. Gösterilen farklı harfler (a-e), Duncan testine göre patojenlere karşı uygulanan bileşiklerin miselyum gelişmesi arasındaki istatistiksel olarak anlamlı farkları temsil etmektedir (P < 0,05). Çubuklar üzerindeki çizgiler ise standart sapmaları ifade eder.



Şekil 10. Test edilen patojenlere karşı kullanılan HL1Ni ve HL2Ni bileşiklerinin aktivite değerleri. C-=Negatif kontrol ve C+=Pozitif kontrol

Tablo 1. HL1Ni ve HL2Ni Komplekslerinin patojenlere karşı göstermiş olduğu Letal doz ve Miselyum gelişim engellemeleri

Bileşikler		Bitki Patojenleri				
		Letal Dozlar (µg/ml)		Dozlar (µg/ml)	Miselyum Gelişim Engellemeleri (%)	
		FORL	RS		FORL	RS
HL2Ni	LD10	2.44	3.55	5	20	14
	LD50	17.51	7.91	10	42	36
	LD90	125.64	22.38	15	72	54
	Slope	1.50±0.22	3.20±0.24	20	86	80
	Heterojenite	0.91	0.14	C-	0	0
	Ki-kare	9.06	1.37	C+	100	100
HL1Ni	LD10	3.90	4.60	5	17	20
	LD50	10.01	12.40	10	43	57
	LD90	25.68	33.40	15	45	78
	Slope	3.13±0.24	2.97±0.24	20	51	85
	Heterojenite	0.81	1.08	C-	0	0
	Ki-kare	8.09	10.76	C+	100	100

Test edilen patojenlere karşı kullanılan bileşiklerin patojenin popülasyonundaki %10, %50 ve %90 oranında gelişimini engellediği doz değeri letal doz olarak hesaplanmaktadır. Bu değerler LD₁₀₋₅₀₋₉₀ olarak gösterilmektedir [52]. Buna göre, LD₅₀ değerleri HL1Ni ve HL2Ni bileşiklerine göre FORL patojeni için sırasıyla 17.51 µg/ml ve 10.01 µg/ml olarak bulunmuştur. Aynı şekilde, RS patojeni için ise, 7.91 µg/ml ve 12.40 µg/ml olarak bulunmuştur. Bu değerlere göre HL1Ni'nin FORL patojenine, HL2Ni'nin ise RS patojenine karşı daha fazla etki gösterdiği görülmektedir (Tablo 1). Bu farklılıklar, patojenlerin bileşiklere göre seçici etki göstermesinden kaynaklanmaktadır.

Ayrıca, HL1Ni ve HL2Ni bileşiklerine karşı test edilen patojenlerin miselyum gelişim engelleme (MGE) değerleri Tablo 1'de verilmiştir. Buna göre, bileşiklerin kullanılan bütün dozlarında miselyum gelişim engellemeleri gözlenmiştir. Bileşiklerden HL2Ni'nin kullanılan 20 µg/ml dozunda sırasıyla FORL'ye karşı %86, RS'ye karşı ise %80 oranında, HL1Ni bileşiğinin 20 µg/ml dozunda ise FORL için %51 ve RS için %85 oranında MGE değerleri saptanmıştır. Belirlenen MGE değerleri ile etkinliği belirlenen bileşiklerin orta ve yüksek düzeyde test edilen patojenlere karşı antifungal aktivite sergilediği belirlenmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda [53] Cu metal atomu ile oluşturulan kompleks yapı beş farklı bitki patojeni *Botrytis cinerea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum melonis* ve *Rhizoctonia solani*'ye karşı antifungal aktivite çalışmaları yürütülmüştür. Bu bileşiğin patojenlere karşı 100 ve 200 mg/ml dozları kullanılmıştır. Kullanılan kompleksin 200 mg/ml dozu *S. sclerotiorum* patojenine karşı %89.57 ve diğer patojenlerin hepsinde %100 miselyum gelişim engellemesine neden olmuştur. Bizim araştırmamızda ise, Ni komplekslerinin FORL ve RS bitki patojenlerine karşı yüksek oranlarda etki gösterdiği belirlenmiştir. Bu çalışmaya benzer Ni metal atomu ile yapılan komplekslerin farklı bitki patojenleri *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum fragariae*, *Fusarium oxysporum* ve *Phoma betae*'ye karşı değişen oranlarda antifungal aktivite gösterdiklerini belirlemişlerdir [54]. Ayrıca, Ni atomu ile yapılan komplekslerin antibakteriyel [55], antiviral [56] ve sitotoksik [57] etkilere sahip olduğu farklı çalışmalarla da belirlenmiştir.

F. Moleküler Doking Çalışmaları

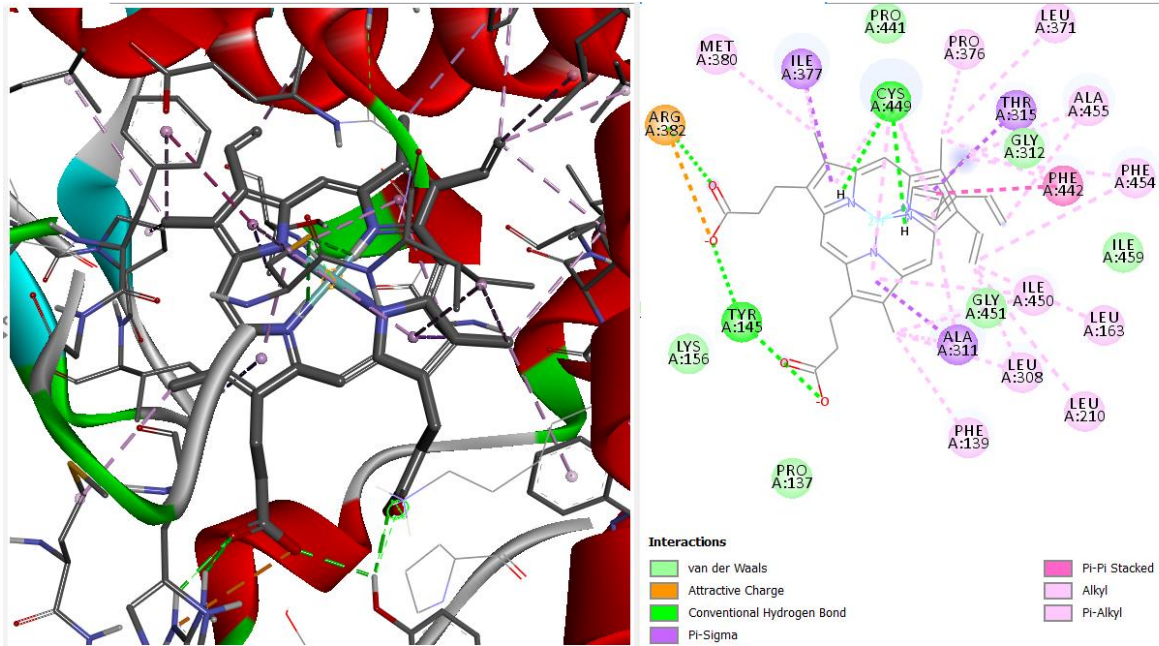
Kompleks yapıların moleküler doking çalışmaları PyRx programı kullanılarak yapıldı ve Reseptör-kompleks etkileşimleri göstermek için de Discovery Studio Visualizer 2017 yazılımı kullanıldı. Moleküler doking çalışmalarında mantarlarda sterol biyosentezinde önemli bir rol oynayan Lanosterol-14a-demetilaz (CYP51) enziminin (PDB ID: 3JUV) protein yapısı kullanıldı. Bu protein çok hayati antimikrobiyal ilaç hedefidir [58].

3JUV'nin kristal yapısı ve kompleksler, PyRx paketinde yer alan protein ve ligand hazırlama sihirbazları kullanılarak doking işlemi için hazır hale getirildikten sonra doking işlemleri gerçekleştirildi. Tüm komplekslerin doking skorları (afinite) ve HOMO enerji değerleri karşılaştırmalı olarak Tablo 2'de, hedef proteinin aktif bağlanma bölgeleriyle yapılan etkileşimlerin 2 ve 3 boyutlu gösterimleri Şekil 11-13'de verilmiştir.

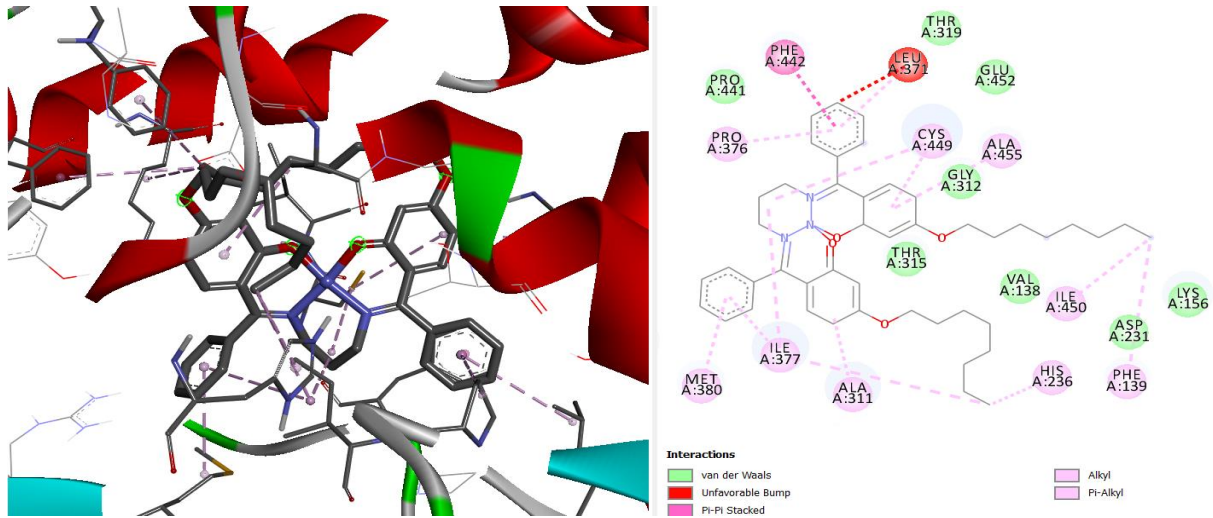
Tablo 2. 3JUV enziminin aktif bölgesine yerleşen komplekslerin moleküler modelleme verileri

Kompleksler	Bağlanma Afinitesi (kcal/mol)	HOMO (eV)	LUMO (eV)	$\Delta E(E_{LUMO}-E_{HOMO})$ (eV)
Doğal kompleks	-12.6	-4.96	-2.71	2.25
HL1Ni	-6.9	-4.80	-1.17	3.63
HL2Ni	-6.4	-4.75	-1.09	3.67

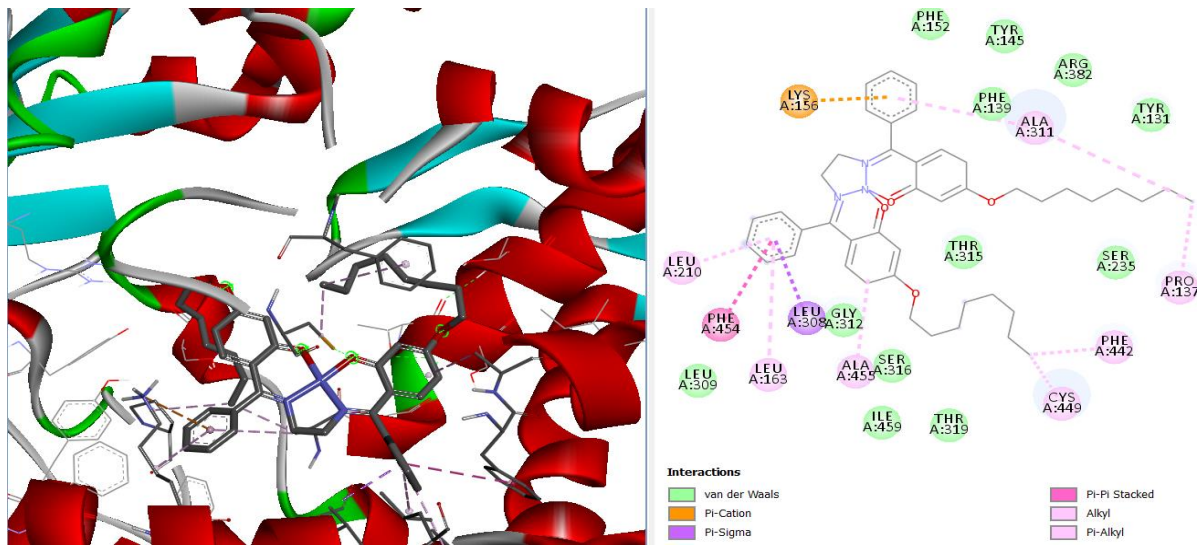
HL1Ni ve HL2Ni kompleksleri reseptörün aktif bağlanma bölgesine daha çok alkil ve hidrofobik etkileşimleriyle bağlandığı görüldü. HOMO enerjisi yüksek kompleks ile reseptör arasında daha iyi etkileşimlerin meydana geldiği ve *in vitro* çalışmaları ile de daha uyumlu olduğu bildirilmiştir [59]. Tablo 2'de afinite değerleri yüksek çıkan komplekslerin HOMO enerjilerinin (mutlak değerce) yüksek, ΔE değerlerinin ise düşük çıktığı görülmektedir. Bileşiklerin proteine bağlanma gücünü veren afinite değerinin yüksek çıkması, kullanılan bileşikler ile reseptör arasındaki moleküler arası bağ kuvvetlerin büyük olduğunu gösterir. HL1Ni ve HL2Ni kompleksleri, doğal komplekse göre daha küçük bağlanma afinitesine sahip olduğu için 3JUV enzimini inhibe etmede daha az etkiye sahip olacağı söylenebilir.



Şekil 11. Doğal kompleks ile reseptörün aktif bölgesi arasındaki etkileşimlerin 3D ve 2D gösterimi



Şekil 12. HL1Ni kompleksi ile reseptörün aktif bölgesi arasındaki etkileşimlerin 3D ve 2D gösterimi



Şekil 13. HL2Ni kompleksi ile reseptörün aktif bölgesi arasındaki etkileşimlerin 3D ve 2D gösterimi

IV. SONUÇLAR

Yeni Ni (II) kompleks yapıları sentezlendi ve NMR, IR ve UV-Vis spektroskopik yöntemleri ile karakterize edildi. *İn vitro* antifungal çalışmaları, Ni (II) komplekslerinin iyi antifungal özellikler sergilediğini ortaya koymuş olup önemli fungal suşlara karşı etkin sonuçlar verdiğini göstermiştir. Sentezlenen kompleksler mikrobiyal ilaç hedefine karşı doğal kompleks yapıya göre daha az bir bağlanma afinitesine sahip olduğu belirlenmiştir. Kompleks yapıların FMO enerji sonuçları, biyolojik sistemler ile etkileşime giren kompleksler arasında bağlantı olabileceği hakkında bilgi vermiştir. Komplekslerin, FMO enerjileri arasında küçük farklılıklar meydana gelirken, moleküler doking sonuçlarında da etkili olduğu gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- [1] Wichmann, O., Sillanpää, R. & Lehtonen, A. (2012). Structural properties and applications of multidentate [O, N, O, X'] aminobisphenolate metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 371–92.
- [2] Vigato, P., Peruzzo, V. & Tamburini, S. (2012). Acyclic and cyclic compartmental ligands: Recent results and perspectives. *Coordination Chemistry Reviews*, 256, 953–1114.
- [3] Cox, A.R., Gibson, V.C., Marshall, E.L., White, A.J. & Yeldon, D. (2006). Coordination complexes bearing potentially tetradentate phenoxyamine ligands. *Dalton Transactions*, 5014–23.
- [4] Vigato, P.A. & Tamburini, S. (2004). The challenge of cyclic and acyclic Schiff bases and related derivatives. *Coordination Chemistry Reviews*, 248, 1717–2128.
- [5] Hung, W.-C. & Lin, C.-C. (2008). Preparation, characterization, and catalytic studies of magnesium complexes supported by NNO–tridentate Schiff–base ligands. *Inorganic chemistry*, 48, 728–34.
- [6] Gupta, K. & Sutar, A.K. (2008). Catalytic activities of Schiff base transition metal complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 252, 1420–50.
- [7] Chiang, L., Clarke, R.M., Herasymchuk, K., Sutherland, M., Prosser, K.E., Shimazaki, Y. & Storr, T. (2016). Electronic Structure Evaluation of an Oxidized Tris (methoxy)–Substituted Ni Salen Complex. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2016, 49–55.
- [8] Bartyzel, A. (2013). Synthesis, crystal structure and characterization of manganese (III) complex containing a tetradentate Schiff base. *Journal of Coordination Chemistry*, 66, 4292–303.
- [9] Wu, P., Ma, D.L., Leung, C.H., Yan, S.C., Zhu, N., Abagyan, R. & Che, C.M. (2009). Stabilization of G–Quadruplex DNA with Platinum (II) Schiff Base Complexes: Luminescent Probe and Down–Regulation of c–myc Oncogene Expression. *Chemistry–A European Journal*, 15, 13008–21.
- [10] Bartyzel, A. & Cukrowska, E.M. (2011). Solid phase extraction method for the separation and determination of chromium (III) in the presence of chromium (VI) using silica gel modified by N, N'-bis-(α -methylsalicylidene) -2, 2-dimethyl–1, 3-propanediimine. *Analytica chimica acta*, 707, 204–9.
- [11] Sakiyama, H., Chiba, Y., Tone, K., Yamasaki, M., Mikuriya, M., Krzystek, J. & Ozarowski, A. (2016). Magnetic Properties of a Dinuclear Nickel (II) Complex with 2, 6-Bis [(2-hydroxyethyl) methylaminomethyl]-4-methylphenolate. *Inorganic chemistry*, 56, 138–46.
- [12] Mondal, M., Giri, S., Guha, P.M. & Ghosh, A. (2017). Dependence of magnetic coupling on ligands at the axial positions of Ni II in phenoxido bridged dimers: experimental observations and DFT studies. *Dalton Transactions*, 46, 697–708.
- [13] Ghorai, P., Chakraborty, A., Panja, A., Mondal, T.K. & Saha, A. (2016). Mono–and di–nuclear nickel (ii) complexes derived from NNO donor ligands: syntheses, crystal structures and magnetic studies of dinuclear analogues. *RSC Advances*, 6, 36020–30.
- [14] Biswas, R., Giri, S., Saha, S.K. & Ghosh, A. (2012). One Ferromagnetic and Two Antiferromagnetic Dinuclear Nickel (II) Complexes Derived from a Tridentate N, N, O–Donor Schiff Base Ligand: A Density Functional Study of Magnetic Coupling. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2012, 2916–27.
- [15] Bu, X.-H., Du, M., Zhang, L., Liao, D.-Z., Tang, J.-K., Zhang, R.-H. & Shionoya, M. (2001). Novel nickel (II) complexes with diazamesocyclic ligands functionalized by additional phenol donor pendant (s): synthesis, characterization, crystal structures and magnetic properties. *Dalton Transactions*, 593–8.

- [16] Naiya, S., Drew, M.G., Estarellas, C., Frontera, A. & Ghosh, A. (2010). Hydrogen–bond assisted stabilization of the less favored conformation of a tridentate Schiff base ligand in dinuclear nickel (II) complex: An experimental and theoretical study. *Inorganica Chimica Acta*, 363, 3904–13.
- [17] Nanda, K.K., Thompson, L.K., Bridson, J.N. & Nag, K. (1994). Linear dependence of spin exchange coupling constant on bridge angle in phenoxy–bridged dinickel (II) complexes. *Chemical Communications*, 1337–8.
- [18] Nanda, K.K., Das, R., Thompson, L.K., Venkatsubramanian, K., Paul, P. & Nag, K. (1994). Magneto–structural correlations in macrocyclic dinickel (II) complexes: tuning of spin exchange by varying stereochemistry and auxiliary ligands. *Inorganic Chemistry*, 33, 1188–93.
- [19] Panja, A., Jana, N.C., Adak, S., Brandão, P., Dlhán, L., Titiš, J. & Boča, R. (2017). The structure and magnetism of mono– and di–nuclear Ni (ii) complexes derived from {N 3 O}–donor Schiff base ligands. *New Journal of Chemistry*, 41, 3143–53.
- [20] Romanović, M.Č., Čobeljić, B., Pevec, A., Turel, I., Spasojević, V., Tsaturyan, A.A., Shcherbakov, I.N., Anđelković, K.K., Milenković, M. & Radanović, D.D. (2017). Supplementary data for article: Romanović, MČ; Čobeljić, BR; Pevec, A.; Turel, I.; Spasojević, V.; Tsaturyan, AA; Shcherbakov, IN; Anđelković, KK; Milenković, M.; Radanović, D.; et al. Synthesis, Crystal Structure, Magnetic Properties and DFT Study of Dinuclear Ni (II) Complex with the Condensation Product of 2–Quinolinecarboxaldehyde and Girard's T Reagent. *Polyhedron*, 128, 30–37.
- [21] Das, A., Bhattacharya, K., Giri, S. & Ghosh, A. (2017). Synthesis, crystal structure and magnetic properties of a dinuclear and a trinuclear Ni (II) complexes derived from tetradentate ONNO donor Mannich base ligands. *Polyhedron*, 134, 295–301.
- [22] Rühlig, K., Abylaikhan, A., Aliabadi, A., Kataev, V., Liebing, S., Schwalbe, S., Trepte, K., Ludt, C., Kortus, J. & Büchner, B. (2017). Ni II formate complexes with bi– and tridentate nitrogen–donor ligands: synthesis, characterization, and magnetic and thermal properties. *Dalton Transactions*, 46, 3963–79.
- [23] Tarafder, M., Jin, K.T., Crouse, K.A., Ali, A., Yamin, B.M. & Fun, H.-K. (2002). Coordination chemistry and bioactivity of Ni²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺ and Zn²⁺ complexes containing bidentate Schiff bases derived from S-benzylthiocarbazate and the X-ray crystal structure of bis [S-benzyl-β-N-(5-methyl-2-furylmethylene) dithiocarbazato] cadmium (II). *Polyhedron*, 21, 2547–54.
- [24] Hosseini-Yazdi, S.A., Mirzaahmadi, A., Khandar, A.A., Eigner, V., Dušek, M., Mahdavi, M., Soltani, S., Lotfipour, F. & White, J. (2017). Reactions of copper (II), nickel (II), and zinc (II) acetates with a new water–soluble 4-phenylthiosemicarbazone Schiff base ligand: Synthesis, characterization, unexpected cyclization, antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities. *Polyhedron*, 124, 156–65.
- [25] Qiao, X., Ma, Z.-Y., Xie, C.-Z., Xue, F., Zhang, Y.-W., Xu, J.-Y., Qiang, Z.-Y., Lou, J.-S., Chen, G.-J. & Yan, S.-P. (2011). Study on potential antitumor mechanism of a novel Schiff Base copper (II) complex: synthesis, crystal structure, DNA binding, cytotoxicity and apoptosis induction activity. *Journal of inorganic biochemistry*, 105, 728–37.
- [26] de Hoog, P., Louwerse, M.J., Gamez, P., Pitić, M., Baerends, E.J., Meunier, B. & Reedijk, J. (2008). Influence of the Copper Coordination Geometry on the DNA Cleavage Activity of Clip–Phen Complexes Studied by DFT. *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2008, 612–9.
- [27] Roy, S., Maheswari, P.U., Lutz, M., Spek, A.L., den Dulk, H., Baerends, S., van Wezel, G.P., Hartl, F. & Reedijk, J. (2009). DNA cleavage and antitumor activity of platinum (II) and copper (II) compounds derived from 4-methyl-2-N-(2-pyridylmethyl) aminophenol: spectroscopic, electrochemical and biological investigation. *Dalton Transactions*, 10846–60.

- [28] Foresman, J.B. & Frisch, A. (1996). Exploring chemistry with electronic structure methods: a guide to using Gaussian.
- [29] Hay, P.J. and Wadt, W.R. (1985). Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for the transition metal atoms Sc to Hg. *The Journal of chemical physics*, 82, 270–83.
- [30] Hay, P.J. & Wadt, W.R. (1985). Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for K to Au including the outermost core orbitals. *The Journal of Chemical Physics*, 82, 299–310.
- [31] Wadt, W.R. & Hay, P.J. (1985). Ab initio effective core potentials for molecular calculations. Potentials for main group elements Na to Bi. *The Journal of Chemical Physics*, 82, 284–98.
- [32] Becke, A.D. (1993). Density–functional thermochemistry. III. The role of exact exchange. *The Journal of chemical physics*, 98, 5648–52.
- [33] Lee, C., Yang, W. & Parr, R.G. (1988). Development of the Colle–Salvetti correlation–energy formula into a functional of the electron density. *Physical review B*, 37, 785.
- [34] Frisch, M., Trucks, G., Schlegel, H.B., Scuseria, G., Robb, M., Cheeseman, J., Scalmani, G., Barone, V., Mennucci, B. & Petersson, G. (2009). Gaussian 09, revision a. 02, gaussian. Inc., Wallingford, CT, 200.
- [35] Dallakyan, S. (2008). PyRx–python prescription v. 0.8. *The Scripps Research Institute*, 2010.
- [36] Biovia, D.S. (2017). Discovery studio visualizer. *San Diego, CA, USA*.
- [37] Nwosu, M.O. & Okafor, J.I. (1995). Preliminary studies of the antifungal activities of some medicinal plants against *Basidiobolus* and some other pathogenic fungi: Vorläufige Studien zur antimyzetischen Aktivität einiger offizineller Pflanzen auf *Basidiobolus* und andere pathogene Pilze. *Mycoses*, 38, 191–5.
- [38] Onaran, A. & Yılar, M. (2012). Antifungal activity of *Trachystemon orientalis* L. aqueous extracts against plant pathogens. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 10, 287–91.
- [39] Pandey, D., Tripathi, N., Tripathi, R. & Dixit, S. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of the essential oil of *Hyptis suaveolens*/Fungitoxische und phytotoxische Eigenschaften des ätherischen Öls von *Hyptis suaveolens*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz/Journal of Plant Diseases and Protection*, 344–9.
- [40] Stewart, J.J.P. (2009). Application of the PM6 method to modeling proteins, *Journal of Molecular Modeling*, 15, 765–805.
- [41] Salama, M. M., Ahmed, S. G. & Hassan, S.S. (2017). Synthesis, Characterizations, Biological, and Molecular Docking Studies of Some Amino Acid Schiff Bases with Their Cobalt(II) Complexes, *Advances in Biological Chemistry*, 7, 182–194.
- [42] Ossonicz, P., Janus, E., Schoerder, G. & Rozwadowski, Z. (2013). Spectroscopic Studies of Amino Acid Ionic Ligand–Supported Schiff Bases, *Molecules*, 18, 4986–5004.
- [43] Khedr, A. M., Gaberb, M., Issa, R. M. & Erten, H. (2005). Synthesis and spectral studies of 5-[3-(1, 2, 4-triazolyl-azo)-2,4-dihydroxybenzaldehyde (TA) and its Schiff bases with 1,3-diaminopropane (TAAP) and 1,6-diaminohexane (TAAH). Their analytical application for spectrophotometric microdetermination of cobalt(II). Application in some radiochemical studies, *Dyes and Pigments*, 67, 117–126.
- [44] Issa, R. M., Khedr, A. M. & Rizk, H. F. (2005). UV–vis, IR and ¹H NMR spectroscopic studies of some Schiff bases derivatives of 4-aminoantipyrine, *Spectrochimica Acta Part A*, 62, 621–629.
- [45] Fukui, K. (1982). Role of frontier orbitals in chemical reactions. *Science*, 218, 747–54.

- [46] Buyukuslu, H., Akdogan, M., Yildirim, G. & Parlak, C. (2010). Ab initio Hartree–Fock and density functional theory study on characterization of 3-(5-methylthiazol-2-ylidiazenyl)-2-phenyl-1H-indole. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75, 1362–9.
- [47] Parr, R.G. & Pearson, R.G. (1983). Absolute hardness: companion parameter to absolute electronegativity. *Journal of the American Chemical Society*, 105, 7512–6.
- [48] Parr, R.G., Donnelly, R.A., Levy, M. & Palke, W.E. (1978). Electronegativity: the density functional viewpoint. *The Journal of Chemical Physics*, 68, 3801–7.
- [49] Parr, R.G., Szentpály, L.v. & Liu, S. (1999). Electrophilicity index. *Journal of the American Chemical Society*, 121, 1922–4.
- [50] Bahron, H., Khaidir, S.S., Tajuddin, A.M., Ramasamy, K. & Yamin, B.M. (2019). Synthesis, characterization and anticancer activity of mono–and dinuclear Ni (II) and Co (II) complexes of a Schiff base derived from o–vanillin. *Polyhedron*, 161, 84–92.
- [51] Fraser, C. & Bosnich, B. (1994). Bimetallic reactivity. Investigation of metal–metal interaction in complexes of a chiral macrocyclic binucleating ligand bearing 6–and 4–coordinate sites. *Inorganic Chemistry*, 33, 338–46.
- [52] Meier, J. & Theakston, R. (1986). Approximate LD50 determinations of snake venoms using eight to ten experimental animals. *Toxicon*, 24, 395–401.
- [53] Afsin Kaya, A., C Kaya, E., Beyza Ozturk Sarikaya, S. & Onaran, A. (2015). Synthesis, Antifungal Activity and Carbonic Anhydrase Inhibitory Properties of Cu (II) Bis (3, 4 Dimethoxybenzoate) Bis (Nicotinamide) Dihydrate. *Current Enzyme Inhibition*, 11(1), 32–38.
- [54] del Campo, R., Criado, J.J., García, E., Hermosa, M.R., Jimenez-Sanchez, A., Manzano, J.L. & Sanz, F. (2002). Thiourea derivatives and their nickel (II) and platinum (II) complexes: antifungal activity. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 89(1–2), 74–82.
- [55] Chohan, Z.H., Arif, M., Akhtar, M.A. & Supuran, C.T. (2006). Metal–based antibacterial and antifungal agents: synthesis, characterization, and in vitro biological evaluation of Co (II), Cu (II), Ni (II), and Zn (II) complexes with amino acid–derived compounds. *Bioinorganic Chemistry and Applications*, 2006, 1–13.
- [56] Hunter, T.M., McNae, I.W., Simpson, D.P., Smith, A.M., Moggach, S., White, F. & Sadler, P. J. (2007). Configurations of Nickel–cyclam antiviral complexes and protein recognition. *Chemistry–A European Journal*, 13(1), 40–50.
- [57] Bagihalli, G.B., Avaji, P.G., Patil, S.A. & Badami, P.S. (2008). Synthesis, spectral characterization, in vitro antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of Co (II), Ni (II) and Cu (II) complexes with 1, 2, 4-triazole Schiff bases. *European journal of medicinal chemistry*, 43 (12), 2639–2649.
- [58] Chioma, F., Ekennia, A.C., Ibeji, C.U., Okafor, S.N., Onwudiwe, D.C., Osowole, A.A. & Ujam, O.T. (2018). Synthesis, characterization, antimicrobial activity and DFT studies of 2-(pyrimidin-2-ylamino) naphthalene-1, 4-dione and its Mn (II), Co (II), Ni (II) and Zn (II) complexes. *Journal of Molecular Structure*, 1163, 455–64.
- [59] Er M., Ergüven B., Tahtacı H., Onaran A., Karakurt T. & Ece A. (2017). Synthesis, characterization, preliminary SAR and molecular docking study of some novel substituted imidazo [2, 1-b][1, 3, 4] thiadiazole derivatives as antifungal agents, *Medicinal Chemistry Research*, 26, 615–30.