



2, 4-Dihidro-1,2,4-Triazol Aminometil Türevlerinin *In Vitro*

Antioksidan ve Antimikrobiyal Aktivitelerinin Değerlendirilmesi

İrfan TİMUR¹, Taner DAŞTAN², Mehmet ATAŞ³, Sevgi DURNA DAŞTAN⁴, Mustafa KARATEPE⁵,
Mehmet ÇİFTÇİ¹

¹Bingöl Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Bingöl, Türkiye

²Cumhuriyet Üniversitesi, Yıldızeli Meslek Yüksek Okulu, Tıbbi Hizmetler ve Teknikler Bölümü, Sivas, Türkiye

³Cumhuriyet Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Sivas, Türkiye

⁴Cumhuriyet Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Sivas, Türkiye

⁵Fırat Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Elazığ, Türkiye

Geliş Tarihi / Received
15.03.2018

Kabul Tarihi / Accepted
22.04.2018

Yayın Tarihi / Published
31.0.2018

Özet: Günümüzde ilaç olarak kullanılan çoğu bileşiğin ana yapısında özellikle triazol, tiyadiazol ve oksadiazol gibi beş üyeli heterosiklik halka yapısı bulunmaktadır. Triazol bileşiklerinin büyük bir kısmının kullanımı, toksisite riski, uygulama zorluğu, yüksek oranda ilaç direncinin ortaya çıkması gibi sebeplerle ve istenmeyen yan etkilerin gözlenmesi, aktivitesindeki yetersizlik ve farmakokinetik eksiklikleri nedenleriyle sınırlı kalmıştır. Beş üyeli halka içeren bu bileşiklerin sağlık sektöründe, farmasötik kimyada, başta antikanser aktivite olmak üzere antifungal, anti-HIV, antitümör, antibakteriyel, antiviral, antidepresan, iltihap önleyici (antiinflatuvar), tüberküloza karşı etkili (antitüberküloz), ağrı kesici (analjezik), idrar söktürücü (diüretik) gibi çok kapsamlı aktif biyolojik spektrumları bulunmaktadır. Bu çalışma ile farklı triazol bileşiklerinin (M1-M10) bazı biyolojik aktiviteleri araştırılarak triazol konusunda yapılmış çalışmalara katkı sağlanması ve ilaç olabilme potansiyellerinin ortaya konulması planlanmıştır. Bu amaçla farklı triazol türevlerinin in vitro antioksidan aktiviteleri indirgeme-yükseltgeme potansiyelleri ile antimikrobiyal aktiviteleri araştırılmıştır. Bu çalışma kapsamında kullandığımız test bileşiklerinin bazılarının yüksek biyolojik aktivite özellikleriyle daha sonraki yapılacak çalışmalarda yol gösterici olacağını, başta ilaç sektörü olmak üzere yeni biyoyararlı malzemelerin üretimi konularında katkı sağlayacağına inanmaktayız. Ayrıca bu konunun literatüre kazandırılması ile de bu disiplinde çalışan bilim insanlarına yeni fikirler vereceğini düşünmekteyiz.

Anahtar Kelimeler: Triazol, antioksidan aktivite, antimikrobiyal aktivite, metal şelatlama

Evaluation of *In Vitro* Antioxidant and Antimicrobial Activities of 2, 4-Dihydro-1,2,4-Triazole Aminomethyl Derivatives

Abstract: The main structure of most compounds used today as drugs is in particular the five-membered heterocyclic ring structure such as triazole, thiadiazole and oxadiazole. The use of a large proportion of triazole compounds has been limited by reasons of toxicity, difficulty in application, observation of occasional and undesirable side effects such as high drug resistance, inadequacy of activity and pharmacokinetic deficiencies. These compounds containing five members of the ring can be used in the healthcare sector in pharmaceutical chemistry, especially antifungal, anti-HIV, antitumoral, antibacterial, antiviral, antiinflammatory, analgesic, and diuretics. In this study, it was planned to investigate some biological activities of different triazole compounds (M1-M10) and to contribute the triazoles to studies and to determine the drug potentials. For this purpose, the antioxidant activities of different triazole derivatives were investigated by their reduction-oxidation potentials and antimicrobial activities. We believe that some of the test compounds we use in this study will contribute to the future work with high biological activity properties and will contribute to the production of new bioactive materials, especially in the pharmaceutical sector. We also think that this will give new ideas to the scientists who work in this discipline with the introduction of the literature.

Keywords: Triazole, antioxidant activity, antimicrobial activity, metal chelating.

Sorumlu yazar: Mehmet ÇİFTÇİ

Bingöl Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

e-mail: mciftci@bingol.edu.tr

1. GİRİŞ

Biyolojik aktif etkiye sahip olan bileşiklerin son yıllarda sayısında kayda değer derecede artışlar olmuştur. Biyolojik potansiyeli olan mannich bazları, günümüzde özellikle tıp alanında uygulama imkânı bulmuştur. Anti-enfalamatuar, antitürbekiler, antikanser, antimalaryal ve analjezik ilaçların yapısında olduğu bilinmektedir. Yapılan bilimsel çalışmalarda, yoğun biyolojik aktivite göstermelerin dolayı azot içeren heterosiklik moleküller üzerine çalışmalar da gittikçe artmakta olup, biyolojik karakterleri

Tablo 1. Biyolojik aktiviteleri araştırılan triazol bileşiklerinin adlandırılması

M1	4-etil-2-(mofin-4-metil)-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M2	4-etil-5-(2-tiyenil)-2-{{4-[3-(triflorometil)fenil]piperazin-1-il}metil}-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M3	4-etil-2-[(4-metilpiperidin-1-il)metil]-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M4	2-[(4-benzilpiperazin-1-il)metil]-4-etil-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M5	4-etil-2-[(4-fenilpiperazin-1-il)metil]-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M6	2-(morfolin-4-ilmetil)-4-fenil-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M7	4-etil-2-(morfin-4-metil)-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M8	4-etil-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M9	4-Fenil-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon
M10	4-etil-5-(2-tiyenil)-2,4-dihidro-3H-1,2,4-triazol-3-tiyon

nedeniyle Triazol bileşiklerinin üzerine kayda değer pek çok araştırma grubu tarafından yoğun çalışmalar yapılmıştır. 1960'lı yıllarda tamamen sentetik bazlı ajanlar olan azoller keşfedilmiştir. En sade gösterimi beş üyeli azol halkasında 2 ya da 3 azot ihtiva etmesine göre triazoller ve imidazoller

olarak ikiye ayrılır [Kharb et al., 2011; Maccarrone et al. 2004]. Kapalı formülü $C_3H_4N_2$ olan imidazol organik bir bileşiktir. Bu bileşikler birçok ilaç içeren, nitroimidazol ve antifungal etkili moleküller olarak zayıf asidik ve bazik etki gösterebilirler [Xiang et al. 2016; Sirassu et al. 2014; Kelly 1998]. Mikonazol, klotrimazol, ketokonazol gibi ilaçların türevi imidazol ilaçlara örnek verilebilir. Azol grubu içeren bileşikler plazma membranının ana sterol bileşiği olan ergosterol biyosentezini durdurmada etkili olurlar. Bu yüzden triazoller ergosterol sentezini engelleyen bileşiklerdir. Yapılan birçok bilimsel çalışma sonucunda, azolün etki mekanizmasının benzer olduğu görülmüştür. Fakat triazollerin daha az metabolize olmaları sebebiyle ve imidazollerin özellikle insan sterol sentezine daha yavaş etki etmeleri sebebiyle azol bileşikler içerisinde daha fazla tercih edildikleri görülmektedir. [Georgopapadaku 1998]. Bu çalışmamızda, biyolojik etkisini araştırdığımız 10 adet farklı triazol bileşiklerinin, antioksidan özellikleri ve çeşitli patojenler üzerindeki antimikrobiyal aktiviteleri in vitro koşullarda araştırılmıştır.

2. MATERYAL VE METOT

Triazol Bileşiklerin yapısı ve adlandırılması

Biyolojik aktiviteleri araştırılacak olan triazol türevleri Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Organik Kimya Anabilim Dalında sentezlenmiştir. Çalışmadaki triazol bileşiklerinin şematik gösterimi ve UIPAC adları Tablo. 1' de verilmiştir.

İndirgeme Kuvveti Tayini

Oyaizu metodu ile test edilecek olan bileşiklerinin (M1-M10) indirgeme kuvveti Fe^{+3} ün Fe^{+2} ye değişim prensibine göre yapıldı [Oyaizu 1986]. Farklı konsantrasyonlarda DMSO' da çözülmüş bileşiklerden (50, 100, 250 μ g/ml) farklı tüplere 1'er mL konuldu. Her bir tüpe daha sonra 2,5 mL 0,2 M fosfat tamponu (pH=6,6) ve 2,5 mL % 1'lik potasyum ferrosiyaniür ($K_3[Fe(CN)_6]$) ilave edilerek

oluşan karışım 50 °C'de 20 dk inkübe edildi. Yapılan bu işlemlerden sonra reaksiyon karışımlarına 2,5 mL % 10'luk triklor asetik asit (TCA) ilave edildi. 2000 rpm'de 10 dk santrifüj yapıldı. Üst fazdan kalan çözeltinin 2,5 mL'si alınarak üzerine 2,5 mL distile su ve % 0,1'lik 0,5 mL FeCl₃ ilavesinden sonra 700 nm'de absorbands okundu. Kör olarak DMSO kullanıldı. Kontrolde ise sadece triazol bileşikleri içermeyen DMSO'lu karışım kullanıldı. Numune yerine ise standart antioksidanlar olan BHT, α-tokoferol ve askorbik asit kullanılarak indirgeme kuvvetinin karşılaştırılması yapıldı. Her bir ölçüm 3'er kez tekrarlanarak alınan sonuçların ortalamaları hesaplandı. Çalışılan bu metotta, yüksek indirgeme kuvveti, yüksek absorbands değeri olarak değerlendirildi.

2.3. Metal Şelatlama Aktivitesi

Metal şelatlama aktiviteleri için test bileşikleri (M1-M10), Dinis ve ark.'nın geliştirdiği yöntem [Dinis et al., 1994] göre çalışıldı. Bu yöntemde farklı konsantrasyondaki (50, 100, 250 µg/mL) örneklerden 0,4 mL alınarak üzerine 2 mM'lık 0,05 mL FeCl₂ çözeltisine ilave edildi. Reaksiyon 0,2 mL ve 5 mM'lık ferrozin çözeltisi ilavesiyle başlatıldı. Vortekste çözeltinin kuvvetli bir şekilde karıştırılması sağlandıktan sonra 25 °C sıcaklığında 10 dk bekletildi. İnkübasyondan sonra çözeltinin 562 nm'de absorbandsı ferrozin dışında kalan çözeltiden oluşan köre karşı kaydedildi. Kontrol olarak test numuneleri haricinde geriye kalan çözelti kullanıldı. Aynı derişimlerdeki standart antioksidan olarak kabul görülen α-tokoferol ve BHT metal şelatlama aktivitelerini karşılaştırmak için kullanıldı. Her bir ölçüm 3'er kez yapılarak alınan sonuçlar ortalamaları hesaplandı. Bu metotta, yüksek metal şelatlama aktivitesi, düşük absorbands değeri olarak değerlendirildi.

Antimikrobiyal Aktivitenin Belirlenmesi

Sentezlenen kimyasalların mikroorganizmalara karşı Minimum inhibisyon konsantrasyonu'nu (MIC) belirlemek amacıyla mikrodilüsyon broth yöntemi kullanıldı [Eloff, 1998]. Çalışmada bir gram-pozitif bakteri olan *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) ve 1 adet mantar suşu olan *Candida albicans* (ATCC 10231) kullanıldı. Kimyasallar Dimethyl sulfoxide (DMSO; 5000 µM) içerisinde çözdürülerek stok çözeltiler hazırlandı ve steril distile su içerisinde 1/10 kat seyreltildi. 50 µL steril distile su 96 kuyucuklu plaka üzerinde her bir kuyucuğa ilave edildi. Daha sonra test bileşiklerinden 50 µl alınarak kuyucuklara ilave edildi ve seri seyreltmeler yapıldı. Bakteriler için Mueller Hinton Broth (Accumix® AM1072), *Candida albicans* için Sabraud Dekstroz Broth (Himedia ME033) besiyerleri kullanıldı. Kimyasal bileşiklerin kuyucuklardaki konsantrasyonları 125 µM ile 0.48 µM arasında ayarlandı. Bakteriler için 5x10⁵ CFU/mL, *Candida albicans* için 0.5-2.5x10³ CFU/mL olacak şekilde her kuyucuğa 50 µl mikroorganizma süspansiyonu eklendi [CLSI 2012, 2002]. Bakteri eklenen plaklar 37 °C'de, *Candida albicans* eklenen plaklar 35 °C'de 16-24 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda üremenin görünür hale gelmesi için her kuyucuğa 50 µl 2 mg/ml 2,3,5-Triphenyltetrazolium chloride (TTC) (Merck, Germany) eklendi ve 37 °C'de 2 saat inkübe edildi. Kuyucuklarda renk değişiminin olmadığı ilk kuyucuklar MIC değeri olarak kabul edildi. Test üç kez tekrarlandı.

2.5. İstatistiksel Analiz

Bu çalışmadaki bütün istatistiksel analizler IBM SPSS İstatistik, Version 22.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) paket programı kullanılarak yapıldı.

3. BULGULAR

3.1. İn Vitro Antioksidan Aktivite Ölçümleri

3.1.1. İndirgeme Kuvveti Tayini Bulguları

Bir bileşik veya ekstrenin indirgeme kapasitesi, o bileşik veya ekstrenin antioksidan aktivitesinin önemli bir indikatörü olarak bilinir [Niki 1991]. İndirgeme kuvveti her bir test bileşiği için 50, 100 ve 250 µg/mL'lerinin içinde bulunduğu çözeltilerinin 700 nm'de absorbanlarının ölçülmesiyle belirlenmiştir. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz bulgular Tablo 2 ve Şekil 2'de verilmiştir.

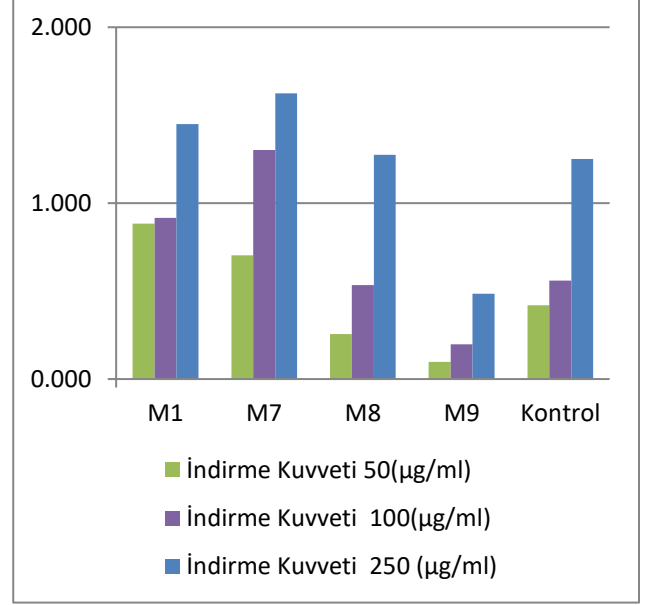
Tablo 2. Test bileşikleri ve standart antioksidanın indirgeme kuvveti sonuçları çizelgesi

Test Bileşikleri	İndirgeme Kuvveti 50µg/mL	İndirgeme Kuvveti 100 µg/mL	İndirgeme Kuvveti 250 µg/mL
M1	0,884	0,917	1,450
M7	0,704	1,302	1,624
M8	0,255	0,535	1,275
M9	0,097	0,197	0,485
α-tokoferol (standart)	0,420	0,560	1,251

3.1.2. Metal Şelatlama Aktivitesi Tayini Bulguları

Bir maddenin metal şelatlama aktivitesi, lipit peroksidasyonuna sebep olan metalleri etkisiz hale getirme gücünü gösterdiği için önemlidir [Kandepu 1999]. Test bileşikleri veya standart antioksidanların varlığında ferrozin-Fe²⁺ kompleksi, tam meydana gelmez. Bu durum kullanılan bileşiklerin metal şelatlayıcı özelliklerini göstermektedir. Metal şelatlama aktivitesi her bir test bileşiği için 50, 100 ve 250 µg/ml miktarları ve onlarla aynı konsantrasyondaki standart antioksidan olarak kabul edilen BHT örneklerinin

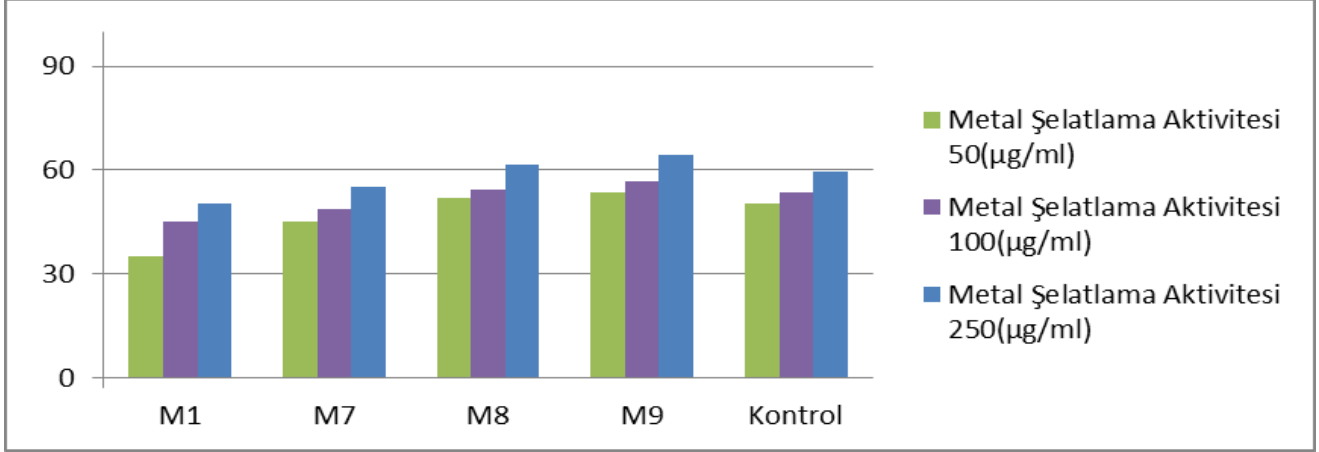
562 nm'de absorbanları alınmış ve tutuklanan metalin yüzdesi hesaplanmıştır. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar Tablo 3 ve Şekil 3'te sunulmuştur.



Şekil 2. Test bileşikleri ve standart antioksidanın karşılaştırmalı indirgeme kuvveti grafikleri

Tablo 3. Test bileşikleri ve standart antioksidanın metal şelatlama yüzdeleri

Test Bileşikleri	Metal Şelatlama Aktivitesi 50 µg/ml	Metal Şelatlama Aktivitesi 100 µg/ml	Metal Şelatlama Aktivitesi 250µg/ml
M1	35,13	45,29	50,3
M7	45,04	48,85	55,21
M8	52,05	54,35	61,63
M9	53,44	56,84	64,45
BHT (Standart)	50,45	53,48	59,5



Şekil 3. Test bileşikleri ve standart antioksidanın karşılaştırmalı metal şelatlama yüzdeleri

3.2. Antimikrobiyal Aktivite Bulguları

Kimyasalların antimikrobiyal aktiviteleri Tablo 4'te görülmektedir. Çalışılan örneklerin antimikrobiyal aktivite değerleri 0.1 mg/ml veya daha düşük olduğunda önemli, $0.1 < MIC \leq 0.625$ mg/ml aralığında orta derecede etkili ve MIC değeri 0.625 mg/ml'den fazla olduğunda zayıf etkili olarak

Tablo 4. Test bileşiklerin antifungal ve antimikrobiyal aktivite sonuçları çizelgesi

Bileşik kodları	<i>E.faecalis</i>	<i>C.albicans</i>
M-1	>125 µM	>125 µM
M-2	>125 µM	>125 µM
M-3	>125 µM	>125 µM
M-4	>125 µM	>125 µM
M-5	>125 µM	>125 µM
M-6	>125 µM	>125 µM
M-7	>125 µM	>125 µM
M-8	>125 µM	>125 µM
M-9	>125 µM	>125 µM
M-10	>125 µM	>125 µM

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

İndirgeme kuvvetleri bakımından değerlendirildiklerinde, M1- M10 olarak kodladığımız triazol bileşiklerin 50 µg/ml konsantrasyona göre indirgeme kuvveti

bildirilmektedir [Kuete, 2010; Awouafack et al., 2013]. Bu çalışmada denediğimiz triazol bileşiklerinin MIC değerleri 15.625 mg/mL' dan daha büyük ve genel olarak >125 µM olarak elde edilmiştir. Bu durumda triazol bileşiklerimizin denediğimiz mikroorganizmalar üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadıkları görülmüştür.

kapasiteleri şu şekilde sıralanmıştır; M7 > M1 > BHT > M8 > M9. 100 µg/ml konsantrasyona göre ise; M7 > M1 > BHT > M8 > M9. 250 µg/ml konsantrasyona göre indirgeme kuvveti kapasiteleri sıralaması da M7 > M1 > BHT > M8 > M9 şeklinde değişebilen indirgeme kapasitesine sahip oldukları görülmektedir. M7 triazol bileşiğimizin tüm konsantrasyonlarda diğer bileşiklerden daha yüksek bir indirgeme kapasitesine sahip olduğu görülmektedir. Bileşikler kendi aralarında oranlandığında en düşük indirgeme aktivitesi gösteren bileşiğin M9 olduğu verilerden anlaşılmaktadır.

Metal şelatlama aktivitesi bakımından değerlendirildiklerinde, M1- M10 olarak kodladığımız triazol bileşiklerin 50 µg/ml konsantrasyona göre metal şelatlama aktivitesi şu şekilde sıralanmıştır; M9 > M8 > BHT > M7 > M1. 100µg/ml konsantrasyona göre ise; M9 > M8 > BHT > M7 > M1. En yüksek konsantrasyon olan 250

$\mu\text{g/ml}$ değerlerinde ise, metal şelatlama aktivitesi $M9 > M8 > \text{BHT} > M7 > M1$ şeklinde sıralanmıştır. Bileşiklerin metal şelatlama aktiviteleri artan konsantrasyonla değişkenlik göstermiştir. $250 \mu\text{g/ml}$ 'lik konsantrasyonda BHT standart antioksidanına göre $M9$ ve $M8$ test bileşikleri daha yüksek metal şelatlama aktiviteleri göstermiştir. $M7$ ve $M1$ maddelerinin metal şelatlama aktivitelerinin düşük olduğu belirlenmiştir. 10 adet triazol bileşiğimizin antimikrobiyal aktiviteleri bakımından değerlendirilmesinde, *Enterococcus faecalis* bakterisi ve bir fungal suş *Candida albicans* mikroorganizmaları kullanılmıştır. Kimyasalların MIC değerleri, $> 125 \mu\text{M}$ aralığında bulunmasından dolayı triazol bileşiklerimizin *E. faecalis* ve *C. albicans* üzerinde etkili olmadığını söyleyebiliriz. Nitekim denediğimiz triazol bileşiklerinin MIC değerleri 15.625 mg/mL ' dan daha büyük ve genel olarak $>125 \mu\text{M}$ olarak elde edilmiştir. Bu durumda triazol bileşiklerimizin denediğimiz mikroorganizmalar üzerinde belirgin bir etkiye sahip olmadıkları görülmüştür.

Çalışmamız kapsamında, zgn olarak yeni sentezlenen bileşiklerinin in vitro antioksidan aktivitelerinin olup olmadığı ve karşılaştırılması gerçekleştirilmiştir. Bir maddenin antioksidan kapasitesinin değerlendirilmesinin daha sağlıklı ve etkili olabilmesi için bir veya birkaç değişik analiz yöntem tekniği kullanılmaktadır. Çalışmamızda 2 farklı antioksidan yöntem tekniği kullanılarak hem yöntemleri birbirleriyle kıyaslama mümkün olmuştur hem de bileşiklerin daha açık olarak antioksidan kapasitelerinin ortaya konulmasına çalışılmıştır. Yapılan çalışmada in vitro antioksidan aktivite sonuçları bakıldığın da 10 bileşikte farklı oranlarda aktif bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. Kharb, R., Sharma, P.C., Yar, M.S., 2011. Pharmacological significance of triazole scaffold, J. Enzyme Inhib. Med. Chem., 26(1), 1-21.
2. Maccarrone, M., Ullrich, V., 2004, "Redox regulation in disease and ageing", Cell Death and Differentiation, 11: 949-951.
3. Xiang, L., Chao, Li., Sheng, T., Qiuye, W., Honggang, H., Qingjie, Z. ve Yan, Z., 2016. Synthesis, In Vitro Biological Evaluation, and Molecular Docking of New Triazoles as Potent Antifungal Agents, Pharm. Chem. Life Sci., 349: 42 - 49.
4. Sirassu, N., Ranjith, T. K., Nukala, S. K., Shaik, Y. ve Nagavelli, V. N., 2014. Synthesis and antibacterial activity of (1-aryl-1, 2, 3-triazol-4-yl) methyl esters of morpholine-3- carboxylic acid, Med. Chem. Res., 23: 5321-5327.
5. Kelly, F. J., 1998, "Use of antioxidants in the prevention and treatment of disease", J Int Fed Clin Chem., 10(1):21-3
6. Georgopapadakou N. H., 1998. "Antifungals: mechanism of action and resistance, established and novel drugs", Current Opinion in Microbiology, 1, 547- 548.
7. Oyaizu, M., 1986. "Studies on products of browning reaction prepared from glucosamine.," Jpn. Nutr. 44, 307-316.
8. T.C.P. Dinis, V.M.C. Madeira, L.M. Almeida, 1994. "Action of phenolic derivatives (acetaminophen, salicylate, and 5-aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxy radical scavengers" Arch. Biochem. Biophys., 315: 161-169.
9. Eloff JN, 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory

concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med*, 64:711–713.

10. CLSI, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically, Approved Standard, 9th ed., CLSI document M07-A9. Clinical and Laboratory Standards Institute, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087, USA, 2012.

11. CLSI, Reference Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard, 2nd ed., NCCLS document M27-A2. CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898, USA, 2002.

12. Niki, E., 1991, "Vitamin C as an Antioxidant," *World Rev.Nutr.Diet.*, 64:3- 30.

13. Kandepu, NM., 1999, "Mannich bases of chalcones and cyclohexanones as candidate cytotoxic agents," Ottawa: University of Saskatchewan.

14. Kuete V. (2010). Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. *Planta Med.* 76 1479–1491. 10.1055/s-0030-1250027

15. Awouafack, M.D., McGaw, L.J., Gottfried, S., Mbouangouere R., Tane, P., Spiteller, M. and Eloff, J.N. (2013) Antimicrobial Activity and Cytotoxicity of the Ethanol Extract, Fractions and Eight Compounds Isolated from *Eriosema robustum* (Faba-ceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 289. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-289>