

Tổng hợp và thử hoạt tính của một số dẫn chất benzothiazol-2-thiol hướng ức chế con đường quorum sensing

Trương Thanh Tùng^{1,2*}

¹Khoa Dược, Trường Đại học Phenikaa, phố Nguyễn Trác, phường Yên Nghĩa, quận Hà Đông, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Nghiên cứu tiên tiến Phenikaa, Trường Đại học Phenikaa, 167 Hoàng Ngân, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 14/1/2022; ngày chuyển phản biện 20/1/2022; ngày nhận phản biện 14/2/2022; ngày chấp nhận đăng 18/2/2022

Tóm tắt:

Quorum sensing (QS) là định nghĩa mô tả một quá trình trao đổi thông tin qua lại lẫn nhau của vi khuẩn. Bằng cách ức chế quá trình này, các chất hoá học có thể cắt đứt quá trình trao đổi “thông tin” giữa các vi khuẩn với nhau. Từ đó ngăn chặn các phản ứng quá mức của vi khuẩn, đặc biệt là vi khuẩn cộng sinh trên cơ thể người, như quá trình sản sinh các độc tố, hình thành cấu trúc biofilm hoặc các cơ chế gây bệnh khác. Trong nghiên cứu này, tác giả tiến hành tổng hợp, thử hoạt tính của một số dẫn chất benzothiazol-2-thiol hướng ức chế QS và đã tổng hợp thành công 5 dẫn chất bằng phương pháp vi sóng. Kết quả thử nghiệm hoạt tính cho thấy, chất 2 và 5 ức chế trung bình hoạt động của QS so với chất chuẩn 4-Nitropyridine-1-oxide (4NPO) với giá trị IC_{50} tương ứng là $212,03 \pm 2,17$ và $198,11 \pm 3,48$ $\mu\text{g/ml}$. Kết quả của nghiên cứu mở ra một khung chất mới cho phát triển thuốc trong tương lai.

Từ khóa: benzothiazol-2-thiol, kháng khuẩn, QS, trực khuẩn mủ xanh, vi sóng.

Chỉ số phân loại: 3.4

1. Đặt vấn đề

Lạm dụng kháng sinh và sự ra tăng của vi khuẩn kháng kháng sinh là một vấn đề nghiêm trọng trên lâm sàng tại Việt Nam và trên thế giới. Do đó, nghiên cứu tìm kiếm các thuốc thay thế kháng sinh, không kháng chéo với kháng sinh là rất cấp bách hiện nay [1].

Vi khuẩn sử dụng con đường QS để giao tiếp qua lại lẫn nhau. Thông qua quá trình này, vi khuẩn sản sinh ra các phân tử hoá học “thông tin” nhằm truyền đạt cho nhau những thay đổi về môi trường xung quanh như sự có mặt của các chất dinh dưỡng, sự yếu đi của vật chủ, hoặc các tác nhân gây hại [2]. Ngoài ra, thông qua cơ chế QS, các vi khuẩn có thể tập hợp lại với nhau hình thành các cấu trúc biofilm gây khó khăn cho việc điều trị [2, 3]. Khi hệ miễn dịch của con người yếu đi, các vi khuẩn sống cộng sinh trên cơ thể trao đổi “thông tin” này cho nhau thông qua cơ chế QS, từ đó tăng sinh và gây ra quá trình nhiễm khuẩn trên người. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng, việc ức chế con đường QS sẽ cắt đứt quá trình liên lạc của vi khuẩn, từ đó ức chế quá trình tăng sinh của vi khuẩn gây bệnh. Quan trọng hơn, các chất ức chế QS không gây độc tính trực tiếp lên vi khuẩn (không kháng khuẩn), do đó việc đề kháng của vi khuẩn với các chất sẽ khó hơn các kháng sinh truyền thống [4-6].

Hiện nay, các nhà khoa học trên thế giới đang tập trung nghiên cứu các hợp chất mới hướng ức chế con đường QS. Tiêu biểu như các chất có cấu trúc tương tự như chất dẫn truyền QS mang khung lacton [7], chất có nguồn gốc tự nhiên như acid fusaric [8], chất có nguồn gốc là thuốc như aspirin [9]. Việc

phát hiện và sử dụng các chất ức chế QS như một biện pháp điều trị độc lập, hoặc kết hợp với kháng sinh đang mở ra một con đường điều trị mới cho các bệnh nhân đa kháng thuốc [10].

Trực khuẩn mủ xanh (vi khuẩn gram âm *Pseudomonas aeruginosa*) là một trong những vi khuẩn gây bệnh phổ biến trên người như nhiễm khuẩn đường hô hấp dưới, nhiễm khuẩn tiết niệu, viêm màng não, viêm màng trong tim. Hiện nay, vi khuẩn này có khả năng kháng kháng sinh truyền thống mạnh và nằm trong danh mục ưu tiên nghiên cứu phương pháp điều trị mới của Tổ chức Y tế thế giới [11]. Do đó, phát triển các thuốc kháng khuẩn mới với cơ chế mới trên trực khuẩn mủ xanh sẽ đem lại lợi ích cho bệnh nhân. Trong nghiên cứu này, chúng tôi báo cáo quá trình tổng hợp và thử kết quả hoạt tính của một số dẫn chất benzothiazol-2-thiol hướng ức chế QS của vi khuẩn gram âm *P. aeruginosa*.

2. Nguyên liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Nguyên liệu

Hoá chất được mua từ các nhà cung cấp bao gồm Sigma Aldrich (Singapore), Alfa Aesar (Hàn Quốc), dung môi Deajung Hàn Quốc với độ tinh khiết trên 98% và được sử dụng trực tiếp không tinh chế thêm. Phản ứng được tiến hành trên thiết bị phản ứng vi sóng WBFY-205 (Keda Machinery and Instrument Equipment Co. Ltd.), được theo dõi bằng kỹ thuật sắc ký lớp mỏng (SKLM) sử dụng bản mỏng Merck Kieselgel 60F₂₅₄ (Singapore) và quan sát dưới đèn UV hoặc hiện màu bằng kỹ thuật dung dịch thuốc thử KMnO₄ (Trung Quốc), ninhydrin (Trung Quốc). Phổ cộng hưởng từ hạt nhân được ghi trên máy Bruker Avance 400/500 MHz với chất chuẩn nội

*Email: tung.truongthanh@phenikaa-uni.edu.vn

Synthesis and biological evaluation of some benzothiazole-2-thiol derivatives as potent quorum sensing inhibitors

Thanh Tung Truong^{1, 2*}

¹Faculty of Pharmacy, Phenikaa University,

Nguyen Trac Street, Yen Nghia Ward, Ha Dong District, Hanoi, Vietnam

²Phenikaa Institute for Advanced Study, Phenikaa University,

167 Hoang Ngan Street, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 14 January 2022; revised 14 February 2022; accepted 18 February 2022

Abstract:

QS is a well-known mechanism of bacteria cell-to-cell communication. By inhibiting the quorum sensing pathway, compounds can prevent the aggressive activity of bacteria, including virulence production, biofilm formation, and other pathogenesis. Herein, the authors reported the synthesis and biological evaluation of several benzothiazole-2-thiols toward quorum sensing activities. As a result, five compounds are successfully synthesised using microwave methodology in good yields. In terms of bioactivity, compounds 2, 5 showed moderated quorum sensing inhibitory activity with IC_{50} of 212.03 ± 2.17 and 198.11 ± 3.48 $\mu\text{g/ml}$, respectively, in comparison to that of reference compound 4NPO. This research provides a novel template for future drug discovery and development.

Keywords: antibacterial, benzothiazole-2-thiol, microwave, *Pseudomonas aeruginosa*, QS.

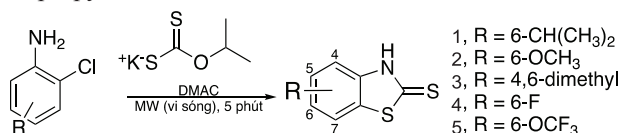
Classification number: 3.4

TMS. Phổ khối được đo trên máy LC-TOF/MS Agilent theo phương pháp ion hoá phun mù điện tử (ESI), tại Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Kết quả thử hoạt tính được tiến hành với sự hỗ trợ của Bệnh viện Đại học Copenhagen, Đan Mạch.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Tổng hợp các chất được thực hiện một bước bằng phản ứng đóng vòng của các dẫn chất 2-chloro-anilin và muối kali O-isopropylxanthic acid theo sơ đồ ở hình 1.



Hình 1. Sơ đồ tổng hợp các dẫn chất benzothiazol-2-thiol.

Thử hoạt tính kháng khuẩn: Vi khuẩn được sử dụng là *P. aeruginosa* ATCC27853 được mua từ ATCC, Manassas, Hoa Kỳ. Giá trị MIC được xác định bằng phương pháp Broth microdilution [12]. Các chất được thử nồng độ tới 512 $\mu\text{g/ml}$.

Hoạt tính ức chế QS: Thử nghiệm hoạt tính ức chế QS được tiến hành theo phương pháp đã được công bố trước đây [12, 13]. Đoạn gen mã hoá QS *lasB-gfp* của *P. aeruginosa* được sử dụng để nghiên cứu. Tế bào được nuôi ở nhiệt độ 37°C (tốc độ lắc 180 rpm) trong 20 giờ. Sau đó, môi trường nuôi cấy được pha loãng tới điểm OD450 là 0,1. Thí nghiệm được tiến hành trên đĩa 96 giếng. 4NPO được sử dụng làm chất chứng dương. Dung môi dimethylsulfoxid (DMSO) được sử dụng là chứng âm. Các chất tổng hợp được và chất chứng 4NPO được đưa vào các môi trường có chứa vi khuẩn trong đĩa 96 giếng. Giá trị về phát triển của vi khuẩn và tín hiệu huỳnh quang của protein tín hiệu được ghi lại (GFP - Green fluorescent protein). Thí nghiệm được tiến hành ở nhiệt độ 34°C và đo mỗi 15 phút. Giá trị đo quang được tiến hành ở bước sóng 485 và 535 nm.

Phương pháp tổng hợp chung: Cho vào 10 ml bình phản ứng một hỗn hợp bao gồm dẫn chất tương ứng của 2-chloro-anilin (100 mg), muối kali O-isopropylxanthic (PIX) với tỷ lệ mol 1:2. Sau đó, thêm vào hỗn hợp 8 ml dung môi dimethylacetamid (DMAC). Hỗn hợp phản ứng sau đó được đun nóng trong 5 phút ở 150°C bằng thiết bị vi sóng (750 W, hấp thụ cao). Tiếp đến làm lạnh hỗn hợp phản ứng tới nhiệt độ phòng và thêm vào 10 ml nước cất. Hỗn hợp phản ứng được điều chỉnh tới pH khoảng 3-4 bằng dung dịch acid HCl loãng (nồng độ 1 M). Cuối cùng, để yên hỗn hợp trong 30 phút tại nhiệt độ phòng cho kết tủa tạo thành. Tủa được lọc và rửa lại 3 lần với nước cất, làm khô ở 60°C trong tủ sấy thu được sản phẩm tinh khiết.

2.3. Xác định cấu trúc

Các chất được xác định cấu trúc bằng các phương pháp phổ cộng hưởng từ, phổ khối, kết quả cụ thể như sau:

Chất 1-6-isopropylbenzo[d]thiazol-2-thiol: Được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp chung, tủa sau phản ứng được kết tinh lại trong aceton nóng thu được bột tinh khiết mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất 76%. Nhiệt độ nóng chảy 256°C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 7,57 (br, 1H, H-benzothiazol), 7,27 (br, 2H, H- benzothiazol), 2,94 (m, 1H, CH), 1,23 (dd, J=8,6 Hz, J=1,6 Hz, 6H, CH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 189,6, 145,2, 140,4, 130,2, 126,1, 119,5, 112,8, 33,7 và 24,4. HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ tính toán: 210,0411, tìm thấy: 210,0413.

Chất 2-6-methoxybenzo[d]thiazol-2-thiol: Được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp chung, tủa sau phản ứng được kết tinh lại trong aceton nóng thu được bột tinh khiết mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất 82%. Nhiệt độ nóng chảy 252°C. ¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 13,6 (s, 1H, NH), 7,32 (br, 1H, H-benzothiazol), 7,24 (br, 1H, H-benzothiazol), 6,98 (br, 1H, H-benzothiazol), 3,76 (br, 3H, OCH₃). ¹³C-NMR (101 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm): 188,8, 157,1, 135,7, 131,2, 115,2, 113,5, 106,3 và 56,2. HRMS (ESI) m/z [M+H]⁺ tính toán: 198,0047, tìm thấy 198,0048.

Chất 3-4,6-dimethylbenzo[d]thiazol-2-thiol: Được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp chung, tủa sau phản ứng được kết tinh lại trong aceton nóng thu được bột tinh khiết mà không

cần tinh chế thêm. Hiệu suất 90%. Nhiệt độ nóng chảy 259°C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 13,5 (s, 1H, NH), 7,27 (s, 1H, H-benzothiazol), 6,99 (s, 1H, H-benzothiazol), 2,39 (s, 3H, 4- CH_3), 2,29 (s, 3H, 6- CH_3). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 189,9, 138,6, 134,1, 129,7, 129,6, 122,7, 119,2, 21,0 và 17,9. HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ tính toán: 196,0253, tìm thấy: 196,0255.

Chất 4-6-Fluorobenzo[d]thiazol-2-thiol: Được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp chung, rửa sau phản ứng được kết tinh lại trong acetone nóng thu được bột tinh khiết mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất 90%. Nhiệt độ nóng chảy 275°C. $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 13,8 (s, 1H, NH), 7,61 (dd, $J=8,5$ Hz, $J=2,6$ Hz, H-benzothiazol), 7,27 (dd, $J=8,9$ Hz, $J=4,7$ Hz, H-benzothiazol), 7,21-7,24 (td, $J=2,6$ Hz, $J=2,6$ Hz, H-benzothiazol). $^{13}\text{C-NMR}$ (151 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 190,4, 159,6 (d, $J=242,0$ Hz), 138,4, 131,2 (d, $J=11,0$ Hz), 115,2 (d, $J=24,4$ Hz), 113,8 (d, $J=9,0$ Hz), 109,3 (d, $J=27,4$ Hz). HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ tính toán: 185,9847, tìm thấy: 185,9847.

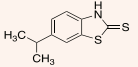
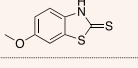
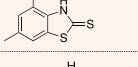
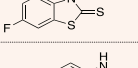
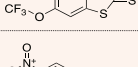
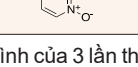
Chất 5-6-(trifluoromethoxy)benzo[d]thiazol-2-thiol (13): Được tổng hợp theo phương pháp tổng hợp chung, rửa sau phản ứng được kết tinh lại trong acetone nóng thu được bột tinh khiết mà không cần tinh chế thêm. Hiệu suất 67%. Nhiệt độ nóng chảy 273°C. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 7,85 (d, $J=2,2$ Hz, 1H, H-benzothiazol), 7,39 (q, $J=8,9$ Hz, $J=8,8$ Hz, 2H, H-benzothiazol). $^{13}\text{C-NMR}$ (101 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm): 191,2, 145,2, 140,9, 131,3, 121,8, 121,1, 115,6 và 113,8. HRMS (ESI) m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ tính toán: 251,9763, tìm thấy: 251,9764.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Kết quả

Kết quả các chất thử hoạt tính kháng khuẩn và ức chế QS được trình bày ở bảng 1.

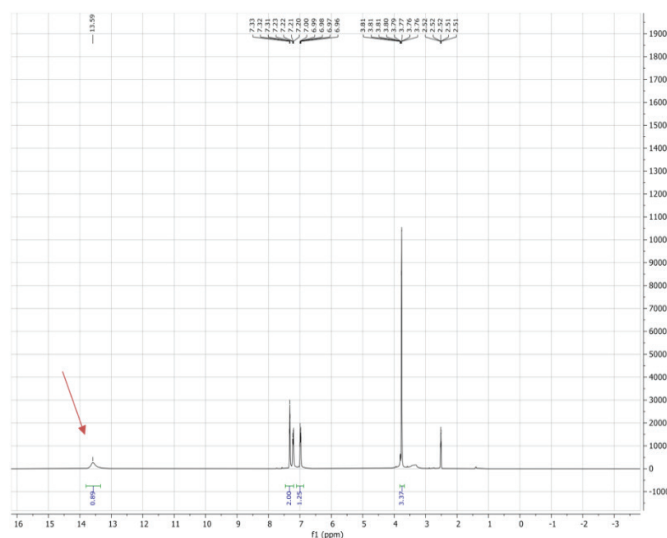
Bảng 1. Hoạt tính kháng khuẩn và ức chế QS của các chất 1-5.

Chất	Công thức hoá học	MW	Hoạt tính kháng khuẩn	Hoạt tính ức chế QS
			MIC* ($\mu\text{g/ml}$)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)*
1		209,3	212,31±2,98	>300
2		197,3	>512	212,03±2,17
3		195,3	>512	>300
4		185,2	146,10±3,41	150,04±4,79
5		251,2	>512	198,11±3,48
4-NPO**		140,1	***	18,20±1,22

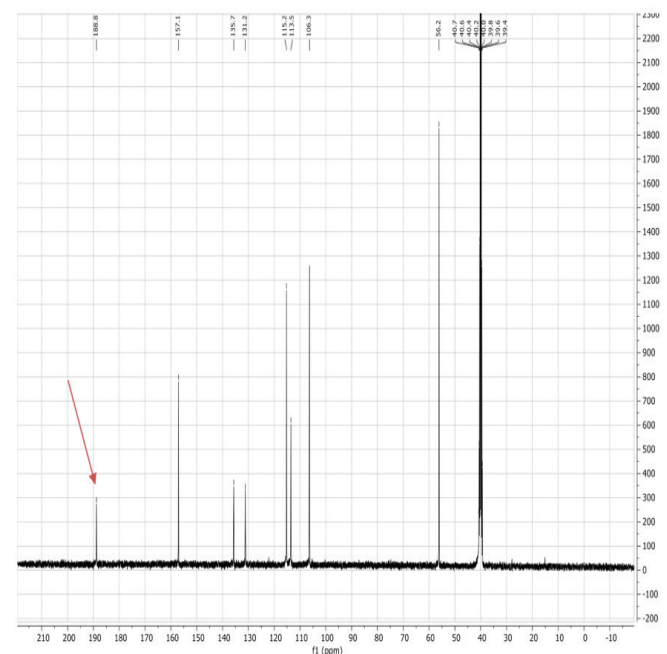
*: trung bình của 3 lần thử $p<0,05$; **: chất chứng dương; ***: không thử.

3.2. Bàn luận

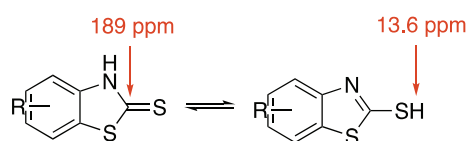
Các chất đã được tổng hợp thành công với hiệu suất tốt sử dụng hệ thống vi sóng. Trên phổ $^1\text{H-NMR}$ (đại diện chất 2) cho thấy giá trị peak đơn ở 13,6 ppm tương ứng với nhóm SH (hình 2). Tuy nhiên trên phổ $^{13}\text{C-NMR}$ (hình 3), chất 2 cho thấy peak giá trị 189 ppm tương ứng với carbon trong nhóm $\text{C}=\text{S}$. Điều này cho thấy tồn tại quá trình chuyển hoá qua lại giữa hai dạng enol-keton của vòng benzothiazol ở dạng hoà tan (hình 4).



Hình 2. Phổ $^1\text{H-NMR}$ của chất 2 với giá trị SH ở 13,6 ppm (mũi tên).



Hình 3. Phổ $^{13}\text{C-NMR}$ của chất 2 với giá trị carbon $\text{C}=\text{S}$ ở 189 ppm (mũi tên).



Hình 4. Hai dạng chuyển hoá qua lại keton-enol của sản phẩm trong dung dịch.

Về khả năng kháng khuẩn, các chất 1 và 4 có giá trị kháng khuẩn yếu với MIC tương ứng là $212,31 \pm 2,98$ và $146,10 \pm 3,41$ $\mu\text{g/ml}$. Trong khi đó các chất 2, 3 và 5 không cho thấy tác dụng kháng khuẩn trong khoảng nồng độ dưới 512 $\mu\text{g/ml}$. Để thể hiện hoạt tính ức chế QS, các chất cần không gây nên sự ức chế phát triển của vi khuẩn trong khoảng nồng độ thử. Nếu chất có tác dụng “kìm khuẩn” hoặc “diệt khuẩn” đều làm giảm số lượng vi khuẩn, kéo theo giảm nồng độ của tín hiệu QS được sản sinh ra trong môi trường. Trong trường hợp này chất có khả năng ức chế QS là do tác dụng diệt khuẩn gây ra và không có ý nghĩa khoa học [2-6]. Kết quả thử hoạt tính ức chế QS cho thấy chất 1 và 3 không thể hiện hoạt tính ở nồng độ dưới 300 $\mu\text{g/ml}$. Chất 4 cho giá trị ức chế QS là $150,04 \pm 4,79$ $\mu\text{g/ml}$, tuy nhiên giá trị này tương đương với nồng độ kháng khuẩn của chất 4 (MIC = $146,10 \pm 3,41$ $\mu\text{g/ml}$), do đó sự giảm hoạt động của QS gây ra là do khả năng ức chế phát triển vi khuẩn của chất 4. Tóm lại, chất 4 chỉ thể hiện khả năng kháng khuẩn mà không thể hiện khả năng ức chế QS.

Chất 2 và 5 không thể hiện khả năng ức chế sự phát triển của vi khuẩn và có giá trị IC_{50} ức chế hoạt động QS tương ứng là $212,03 \pm 2,17$ và $198,11 \pm 3,48$ $\mu\text{g/ml}$. Do đó, chất 2 và 5 thể hiện rõ ràng khả năng ức chế con đường giao tiếp QS của vi khuẩn mà không tác động trực tiếp lên hoạt động bình thường của chúng. Nhìn chung, chất 2 và 5 thể hiện hoạt tính yếu hơn so với chất chuẩn 4NPO (IC_{50} là $18,20 \pm 1,22$ $\mu\text{g/ml}$). Tuy nhiên về mặt nghiên cứu phát triển thuốc mới, chất 2 và 5 là hai khung chất tiềm năng cho việc nghiên cứu phát triển các thuốc hướng ức chế QS trong tương lai. Về mặt liên quan cấu trúc và tác dụng sinh học, hai chất hoạt tính 2, 5 có nhóm thế dạng ethe với nguyên tử oxy gắn trực tiếp với vòng benzothiazol. Điều này không có ở các chất còn lại. Do đó, nguyên tử oxy có thể đóng vai trò quan trọng cho hoạt tính của vòng. Các nghiên cứu chuyên sâu phát triển thuốc mới cần lưu ý phát triển theo hướng giữ nguyên nguyên tố oxy này.

4. Kết luận

Chúng tôi đã tổng hợp thành công 5 dẫn chất benzothiazol-2-thiol bằng phương pháp vi sóng với hiệu suất tốt. Các chất được xác định cấu trúc bằng phổ cộng hưởng từ. Kết quả cho thấy có sự chuyển dạng enol-keton ở dạng hoà tan của các chất. Trước khi thử nghiệm hoạt tính ức chế QS, các chất được tiến hành thử khả năng kháng trực khuẩn mủ xanh (*P. aeruginosa*). Kết quả cho thấy, chất 1 và 4 ức chế hoạt động của vi khuẩn với MIC tương ứng là $212,31 \pm 2,98$ và

$146,10 \pm 3,41$ $\mu\text{g/ml}$. Các chất còn lại không ảnh hưởng tới sự phát triển của vi khuẩn. Kết quả thử hoạt tính ức chế QS cho thấy, chất 2 và 5 thể hiện rõ khả năng ức chế với IC_{50} là $212,03 \pm 2,17$ và $198,11 \pm 3,48$ $\mu\text{g/ml}$ mà không ảnh hưởng tới vi khuẩn. Mặc dù kết quả ức chế QS yếu hơn so với chất chuẩn dương 4NPO (IC_{50} là $18,20 \pm 1,22$ $\mu\text{g/ml}$), kết quả của nghiên cứu cho thấy vòng benzothiazol-2-thiol có tiềm năng cho phát triển các chất ức chế mạnh hơn trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ministry of Health (2021), “Drug resistance”, <https://amr.moh.gov.vn/category/khang-thuoc/>, accessed 9 February 2021 (in Vietnamese).
- [2] T.T. Tung, H.L. Xuan (2021), “‘Left-hand strategy’ for the design, synthesis and discovery of novel triazole-mercaptobenzothiazole hybrid compounds as potent quorum sensing inhibitors and anti-biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*”, *New Journal of Chemistry*, **45**(46), pp.21631-21637, DOI: 10.1039/D1NJ04436B.
- [3] T. Defoirdt, G. Brackman, T. Coenye (2013), “Quorum sensing inhibitors: How strong is the evidence?”, *Trends Microbiology*, **21**(12), pp.619-624, DOI: 10.1016/j.tim.2013.09.006.
- [4] P. Krzyzek (2019), “Challenges and limitations of anti-quorum sensing therapies”, *Front. Microbiol.*, **10**, DOI: 10.3389/fmicb.2019.02473.
- [5] C.D. Sifri (2008), “Quorum sensing: Bacteria talk sense”, *Clinical Infectious Diseases*, **47**(8), pp.1070-1076, DOI: 10.1086/592072.
- [6] S.T. Rutherford, B.L. Bassler (2012), “Bacterial quorum sensing: Its role in virulence and possibilities for its control”, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, **2**(11), DOI: 10.1101/cshperspect.a012427.
- [7] A. Muras, P. Otero-Casal, V. Blanc, et al. (2020), “Acyl homoserine lactone-mediated quorum sensing in the oral cavity: A paradigm revisited”, *Scientific Reports*, **10**, DOI: 10.1038/s41598-020-66704-4.
- [8] T.T. Tung, T.H. Jakobsen, T.T. Dao, et al. (2016), “Fusaric acid and analogues as Gram-negative bacterial quorum sensing inhibitors”, *European Journal of Medicinal Chemistry*, **126**, pp.1011-1020, DOI: 10.1016/j.ejmech.2016.11.044.
- [9] S.A. El-Mowafy, K.H.A.E. Galil, S.M. El-Messery, et al. (2014), “Aspirin is an efficient inhibitor of quorum sensing, virulence and toxins in *Pseudomonas aeruginosa*”, *Microbial Pathogenesis*, **74**, pp.25-32, DOI: 10.1016/j.micpath.2014.07.008.
- [10] Q. Jiang, J. Chen, C. Yang, et al. (2019), “Quorum sensing: A prospective therapeutic target for bacterial diseases”, *Biomed Res. Int.*, **2019**, DOI: 10.1155/2019/2015978.
- [11] World Health Organization (2021), “WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed”, <https://who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>, accessed 15 November 2021.
- [12] T. Bjarnsholt, M. van Gennip, T.H. Jakobsen, et al. (2010), “*In vitro* screens for quorum sensing inhibitors and *in vivo* confirmation of their effect”, *Nat. Protoc.*, **5**(2), pp.282-293, DOI: 10.1038/nprot.2009.205.
- [13] M. Hentzer, K. Riedel, T.B. Rasmussen, et al. (2002), “Inhibition of quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm bacteria by a halogenated furanone compound”, *Microbiology*, **148**(1), pp.87-102, DOI: 10.1099/00221287-148-1-87.