

Đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm và nghiên cứu docking phân tử một số dẫn xuất *N*-benzyl 2-arylbenzimidazol

Phạm Cảnh Em

Trường Đại học Quốc tế Hồng Bàng

TÓM TẮT

Một nhóm các dẫn xuất *N*-benzyl 2-arylbenzimidazol đã được tổng hợp. Các hợp chất này được sàng lọc hoạt tính *in vitro* kháng khuẩn và kháng nấm bằng kỹ thuật vi pha loãng. Hợp chất 2c và 2f thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt trên chủng *MSSA* và *MRSA* (MIC 4 - 16 $\mu\text{g/mL}$). Hợp chất 2a thể hiện hoạt tính kháng khuẩn mạnh trên chủng *MSSA* và *MRSA* (MIC 4 $\mu\text{g/mL}$) và hoạt tính kháng nấm tốt trên chủng *Aspergillus niger* (MIC 64 $\mu\text{g/mL}$) khi so sánh với hoạt tính của thuốc ciprofloxacin và fluconazol. Các hợp chất tổng hợp cũng được nghiên cứu docking phân tử trên ba đích tác dụng bao gồm glucosamine-6-phosphat synthase, topoisomerase II và DNA gyrase. Nghiên cứu docking phân tử đã hỗ trợ giải thích hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm thông qua sự hình thành liên kết hydro và ái lực cao.

Từ khóa: Benzimidazol, kháng khuẩn, kháng nấm, docking phân tử

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiễm khuẩn và nhiễm nấm là mối nguy hại phổ biến đối với sức khỏe con người [1]. Ngày nay, một số loại kháng sinh có hiệu quả lâm sàng rất tốt đang được sử dụng. Tuy nhiên, tình trạng đề kháng kháng sinh đã làm cho kháng sinh ngày kém hiệu quả hơn, nhiều bệnh nhiễm trùng do vi sinh vật không thể điều trị được [1 - 4]. Do đó, trước tình hình nguy cấp của đề kháng kháng sinh đòi hỏi phải thiết kế, nghiên cứu các tác nhân kháng khuẩn và kháng nấm mới.

Nhân benzimidazol được tìm thấy rộng rãi trong các hợp chất tự nhiên. Nhiều công trình nghiên cứu trên thế giới đã công bố nhiều dẫn xuất benzimidazol có hoạt tính sinh học đa dạng như: kháng nấm, kháng khuẩn, kháng ung thư, trị giun sán, kháng viêm, chống co giật và kháng virus [5 - 8]. Hơn nữa, một số thuốc dùng trong y học là các dẫn xuất benzimidazol như

thuốc kháng nấm (carbendazim), thuốc trị giun sán (mebendazol và thiabendazol), thuốc trị loạn thần (pimozid) và thuốc chống loét dạ dày (omeprazol) [9].

Glucosamin-6-phosphat synthase (GlcN-6-P), DNA topoisomerase (Topo) và DNA gyrase (Gyr) là các mục tiêu đầy hứa hẹn cho nghiên cứu hợp chất có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm [10 - 15]. GlcN-6-P xúc tác và giới hạn tốc độ của quá trình chuyển hóa hexosamin (chuyển fructose-6-phosphat thành glucosamin-6-phosphat) [10, 11]. Topo xúc tác thay đổi cấu trúc liên kết của DNA và rất cần thiết cho sự tồn tại của tế bào [12, 13]. Gyr là một topoisomerase loại II có thể làm thay đổi số lượng siêu xoắn trong cấu trúc DNA thông qua quá trình tiêu thụ ATP [14, 15]. Sự khác biệt về cấu trúc giữa enzym của tế bào

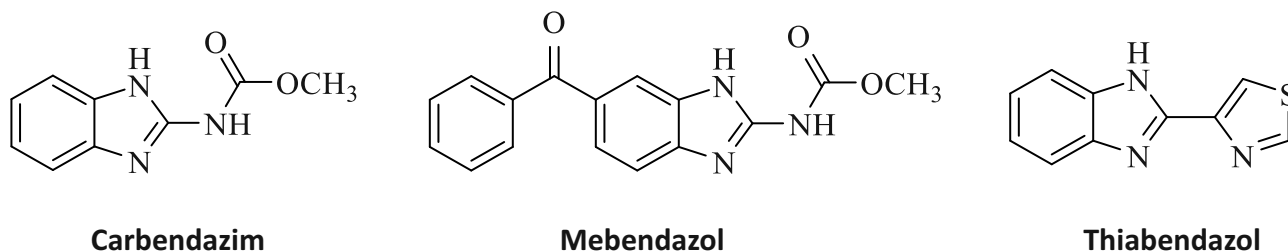
Tác giả liên hệ: ThS. Phạm Cảnh Em

Email: empc@hiu.vn

nhân sơ và con người có thể được khai thác để thiết kế các hợp chất có hoạt tính ức chế tốt nhằm phát triển thành thuốc kháng khuẩn và kháng nấm [10, 16].

Mục đích của nghiên cứu là đánh giá hoạt tính

kháng khuẩn và kháng nấm của một số dẫn xuất *N*-benzyl 2-arylbenzimidazol. Các dẫn xuất benzimidazol có hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm tiềm năng sẽ được nghiên cứu *in silico* để hiểu rõ khả năng tương tác thụ thể - thuốc.



Hình 1. Cấu trúc thuốc carbendazim, mebendazol và thiabendazol

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng

Dẫn xuất *N*-benzyl 2-arylbenzimidazol tiềm năng về hoạt tính kháng khuẩn và kháng nấm.

2.2. Nguyên liệu và thiết bị

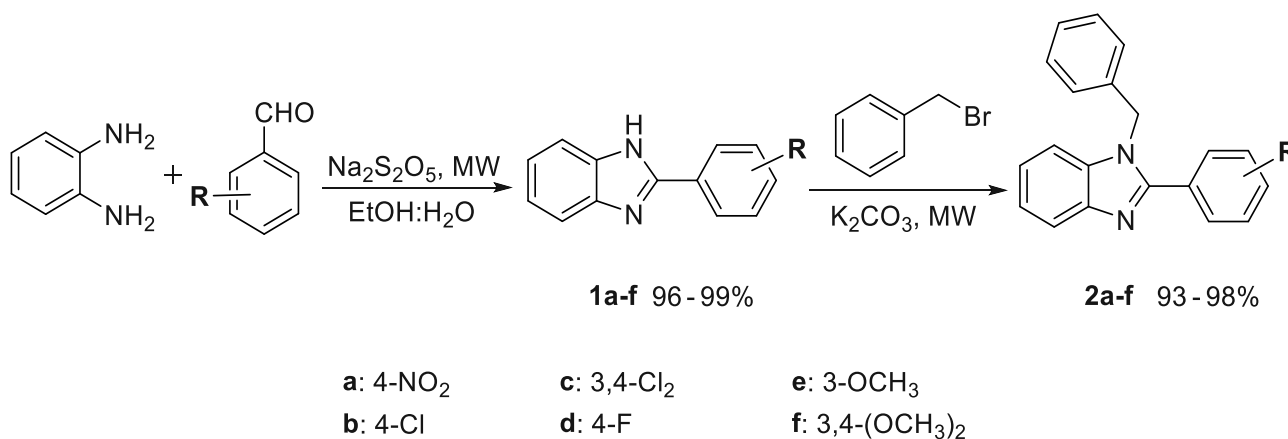
Các hóa chất và dung môi sử dụng có nguồn gốc từ Merck (Đức), AKSci (Mỹ), Acros (Bỉ), Xilong (Trung Quốc) và Chemsol (Việt Nam) được sử dụng trực tiếp không qua tinh chế. Sắc ký lớp mỏng (TLC) sử dụng bản nhôm silica gel 60 F254 trắng sẵn có độ dày 0.2 mm (Merck). Sắc ký cột sử dụng silica gel cỡ hạt 0.040 - 0.063 mm (Merck). Chiếu xạ vi sóng thực hiện trên máy CEM Discover.

Phổ IR đo trên máy Shimadzu IRAffinity. Các phổ

¹H-NMR và ¹³C-NMR được đo trên máy cộng hưởng từ hạt nhân Bruker Avance 500 NMR Spectrometer tại Viện Hóa học - Viện Hàn Lâm Khoa học Việt Nam. Phổ khối lượng MS được đo trên máy LC-MS Shimadzu. Bếp cách thủy, tủ sấy và tủ ấm Memmert (Đức) và máy đo quang GeneQuant 1300 (Mỹ).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu sử dụng phương pháp tổng hợp với sự hỗ trợ của vi sóng ở chế độ năng lượng cố định (fixed-power). Năng lượng được cung cấp tối đa 300W với tốc độ khuấy cao. Phương pháp vi sóng đã góp phần đáng kể trong tăng hiệu suất tổng hợp và rút ngắn thời gian phản ứng (Hình 2).



Hình 2. Tổng hợp một số dẫn xuất *N*-benzyl 2-arylbenzimidazol

2.3.1. Quy trình tổng hợp mono- thể của 1,3,5-triazin (1)

Cyanuric clorid (10 mmol) được hòa tan vào THF khan (40 mL) ở 0 - 5°C, dẫn chất anilin (10 mmol) và K₂CO₃ (10 mmol) được thêm vào từ từ và khuấy trong khoảng thời gian 2 - 4 giờ đến khi hết nguyên liệu (kiểm tra bằng TLC). Tinh chế sản phẩm 1 bằng phương pháp sắc ký cột [17].

2.3.2. Quy trình tổng hợp tri- thể của 1,3,5-triazin (2)

Cho hỗn hợp gồm hợp chất 1 (3 mmol), amin (tỷ lệ mol amin/hợp chất 1 là 2,57) và K₂CO₃ (6 mmol) và 1,4-dioxan (10 mL) vào ống vi sóng. Tiến hành chiếu xạ vi sóng trong thời gian 17.64 phút, ở nhiệt độ 107.44°C với năng lượng 300W và tốc độ khuấy cao. Chiết hỗn hợp phản ứng bằng ethyl acetat, làm khan với Na₂SO₄, gạn và cô đuổi dung môi. Tinh chế sản phẩm 2 bằng phương pháp sắc ký cột [17].

Phương pháp xác định cấu trúc các dẫn chất 1,3,5-triazin gồm: Quang phổ hồng ngoại IR, khối phổ MS và phổ cộng hưởng từ hạt nhân NMR (¹H-NMR và ¹³C-NMR) [17].

2.3.3. Tổng hợp 1,3,5-triazin (1a-c và 2a-f)

4,6-Dicloro-*N*-(4-clorophenyl)-1,3,5-triazin-2-amin (1a): Tinh thể trắng, hiệu suất 95%, mp 146 - 148°C. IR (ν cm⁻¹): 3254 (NH), 1383 (C=N), 2978 (ArCH), 806 (C-N, s-triazin), 791 (Ar-Cl). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 10,91 (1H, s, NH); 7,60 (2H, d, *J* = 9 Hz, H-Ar); 7,42 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-Ar). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 163,8; 154,1; 136,0; 135,9; 128,9; 128,8; 128,4; 123,1; 122,9. LC-MS (*m/z*) [M+H]⁺ tính toán C₉H₆Cl₃N₄ 274,9653, tìm thấy 274,9405.

4,6-Dicloro-*N*-(4-methoxyphenyl)-1,3,5-triazin-2-amin (1b): Tinh thể trắng, hiệu suất 96%, mp 150 - 151°C. IR (ν cm⁻¹): 3247 (NH), 1389 (C=N), 2985 (ArCH), 802 (C-N, s-triazin), 790 (Ar-Cl). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 10,97 (1H, s, NH); 7,46 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-Ar); 7,39 (1H, d, *J* = 9,0 Hz, H-Ar); 6,95 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, H-Ar); 3,10 (3H, s, -OCH₃). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 157,8; 153,7; 127,8; 125,3; 123,6; 114,6; 114,2; 55,5. LC-MS (*m/z*) [M-H]⁻ tính toán

C₁₀H₇Cl₂N₄O 269,0002, tìm thấy 268,9938.

4,6-Dicloro-*N*-(*p*-tolyl)-1,3,5-triazin-2-amin (1c): Tinh thể trắng, hiệu suất 95%, mp 122 - 124°C. IR (ν cm⁻¹): 3248 (NH), 1392 (C=N), 2981 (ArCH), 805 (C-N, s-triazin), 794 (Ar-Cl). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 11,03 (1H, s, NH); 7,46 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-Ar); 7,17 (2H, d, *J* = 8,5 Hz, H-Ar); 2,27 (3H, s, -CH₃). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 163,8; 153,8; 135,9; 135,2; 130,4; 128,8; 121,8; 121,6; 20,6. LC-MS (*m/z*) [M-H]⁻ tính toán C₁₀H₇Cl₂N₄ 253,0053, tìm thấy 253,0039.

N-(4-Clorophenyl)-4,6-di(piperidin-1-yl)-1,3,5-triazin-2-amin (2a): Tinh thể trắng, hiệu suất 97%, mp 180 - 181°C. IR (ν cm⁻¹): 3255 (NH), 1389 (C=N), 2991 (ArCH), 808 (C-N, s-triazin), 797 (Ar-Cl). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 8,96 (1H, s, NH); 7,67-7,72 (2H, m, H-Ar); 7,27 (1H, d, *J* = 8,5 Hz, H-Ar); 7,07 (1H, t, *J* = 8,5 Hz, H-Ar); 3,69 (8H, t, *J* = 4,5 Hz, -CH₂-); 1,59 (4H, t, *J* = 4,5 Hz, -CH₂-); 1,48 (8H, s, -CH₂-). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 164,39; 164,35; 164,01; 163,99; 157,8; 155,9; 139,6; 136,96; 136,94; 128,0; 124,6; 120,8; 120,7; 120,6; 114,7; 114,5; 43,5; 25,3; 24,3. LC-MS (*m/z*) [M+H]⁺ tính toán C₁₉H₂₆ClN₆ 373,1902, tìm thấy 373,1898.

N-(4-Clorophenyl)-4,6-dimorpholino-1,3,5-triazin-2-amin (2b): Tinh thể trắng, hiệu suất 98%, mp 192 - 193°C. IR (ν cm⁻¹): 3258 (NH), 1389 (C=N), 2994 (ArCH), 802 (C-N, s-triazin), 793 (Ar-Cl). ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 8,82 (1H, s, NH); 7,65 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, H-Ar); 7,01 (2H, d, *J* = 9,0 Hz, H-Ar); 3,70 (8H, t, *J* = 5,5 Hz, -CH₂-); 3,63 (8H, t, *J* = 5,0 Hz, -CH₂-). ¹³C-NMR (125 MHz, DMSO-d₆, δ ppm): 164,7; 163,8; 158,0; 156,1; 136,3; 121,2; 121,1; 114,4; 114,2; 65,6; 43,2. LC-MS (*m/z*) [M+H]⁺ tính toán C₁₇H₂₂ClN₆O₂ 377,1487, tìm thấy 377,1477.

N-(4-Methoxyphenyl)-4,6-di(piperidin-1-yl)-1,3,5-triazin-2-amin (2c): Tinh thể trắng, hiệu suất 98%, mp 185 - 186°C. IR (ν cm⁻¹): 3249 (NH), 1396 (C=N), 2997 (ArCH), 801 (C-N, s-triazin),

790 (Ar-Cl). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 8,72 (1H, s, NH); 7,57 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-Ar); 6,83 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-Ar); 3,70 (3H, s, -OCH₃); 3,68 (8H, t, $J = 5,0$ Hz, -CH₂-); 1,59 (4H, t, $J = 4,5$ Hz, -CH₂-); 1,48 (8H, d, $J = 3,5$ Hz, -CH₂-). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 164,5; 164,0; 154,0; 133,8; 120,8; 113,5; 55,1; 43,5; 25,4; 24,4. LC-MS (m/z) [$\text{M}+\text{H}$]⁺ tính toán $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_6\text{O}$ 369,2397, tìm thấy 369,2299.

N-(4-Methoxyphenyl)-4,6-dimorpholino-1,3,5-triazin-2-amin (2d): Tinh thể trắng, hiệu suất 98%, mp 191 - 193 °C. IR ($\nu \text{ cm}^{-1}$): 3252 (NH), 1392 (C=N), 2995 (ArCH), 809 (C-N, s-triazin), 799 (Ar-Cl). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 8,90 (1H, s, NH); 7,55 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-Ar); 6,84 (2H, d, $J = 9,0$ Hz, H-Ar); 3,70 (3H, s, -OCH₃); 3,68 (8H, t, $J = 5,0$ Hz, -CH₂-); 3,61 (8H, t, $J = 4,5$ Hz, -CH₂-). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 164,7; 163,9; 154,2; 133,3; 121,1; 113,6; 66,3; 66,0; 55,1; 43,3. LC-MS (m/z) [$\text{M}+\text{H}$]⁺ tính toán $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_3$ 373,1983, tìm thấy 373,1981.

4,6-Di(piperidin-1-yl)-*N*-(*p*-tolyl)-1,3,5-triazin-2-amin (2e): Tinh thể trắng, hiệu suất 97%, mp 179 - 180 °C. IR ($\nu \text{ cm}^{-1}$): 3258 (NH), 1384 (C=N), 2989 (ArCH), 802 (C-N, s-triazin), 795 (Ar-Cl). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 8,48 (1H, s, NH); 7,55 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-Ar); 7,04 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, H-Ar); 3,70 (8H, t, $J = 5,5$ Hz, -CH₂-); 2,24 (3H, s, -CH₃); 1,63 (4H, t, $J = 5,5$ Hz, -CH₂-); 1,49-153 (8H, m, -CH₂-). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 164,4; 163,9; 137,7; 129,6; 128,2; 119,3; 43,3; 24,9; 24,0; 19,8. LC-MS (m/z) [$\text{M}+\text{H}$]⁺ tính toán $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_6$ 353,2448, tìm thấy 353,2369.

4,6-Dimorpholino-*N*-(*p*-tolyl)-1,3,5-triazin-2-amin (2f): Tinh thể trắng, hiệu suất 97%, mp 187 - 188 °C. IR ($\nu \text{ cm}^{-1}$): 3256 (NH), 1394 (C=N), 2991 (ArCH), 807 (C-N, s-triazin), 793 (Ar-Cl). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 8,95 (1H, s, NH); 7,53 (2H, d, $J = 8,5$ Hz, H-Ar); 7,05 (2H, d, $J = 8,0$ Hz, H-Ar); 3,69 (8H, t, $J = 5,0$ Hz, -CH₂-); 3,61 (8H, t, $J = 4,5$ Hz, -CH₂-); 2,23 (3H, s, -CH₃). $^{13}\text{C-NMR}$ (125 MHz, DMSO-d_6 , δ ppm): 164,7; 163,9;

137,6; 130,2; 128,7; 119,7; 66,3; 66,0; 43,3; 20,3. LC-MS (m/z) [$\text{M}+\text{H}$]⁺ tính toán $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_6\text{O}_2$ 357,2304, tìm thấy 357,2304.

2.3.4. Quy trình đánh giá hoạt tính kháng khuẩn

Định tính: Pha chất thử với DMSO để có dung dịch với nồng độ là 10.24 mg/mL (kí hiệu: dung dịch S). Cấy vi khuẩn, vi nấm thử nghiệm trên môi trường thạch MHA. Đục lỗ đường kính 5 mm trong đĩa thạch bằng dụng cụ tiệt trùng. Dung dịch S được cho vào lỗ với thể tích khoảng 30 μL . Tiến hành song song với một mẫu đối chứng DMSO (không có chất thử). Ủ hộp thạch trong tủ ấm 35 - 37 °C trong 24 giờ đối với vi khuẩn và 48 giờ đối với vi nấm. Mẫu chứng chứa DMSO không ức chế sự phát triển của vi khuẩn, vi nấm. Dẫn xuất có khả năng kháng khuẩn, kháng nấm khi xung quanh lỗ có vòng kháng khuẩn, kháng nấm.

Định lượng: Mẫu đối chứng được chuẩn bị bằng cách cho 233.3 μL chất thử từ dung dịch S vào 2.1 mL môi trường MHA (pha loãng 10 lần) đã để nguội ở 55 °C, lắc đều rồi đổ hỗn hợp vào đĩa petri. Để nguội cho môi trường đông lại. Nếu có vết nước trên bề mặt, sấy đĩa thạch ở 50 - 70 °C trong 10 phút. Vi khuẩn, vi nấm được pha loãng với nước muối sinh lý để đạt nồng độ 10^8 CFU/mL. Mỗi chất thử pha loãng 8 lần (tính từ dung dịch S) thu được 8 dung dịch hòa tan với môi trường MHA và cho vào 8 đĩa petri. Cho huyền dịch có vi khuẩn, vi nấm vào đĩa thạch đã pha chất thử ở những nồng độ khác nhau. Ủ hộp thạch trong tủ ấm 35 - 37 °C trong 24 giờ. Nồng độ nhỏ nhất mà vi khuẩn, vi nấm không phát triển được là nồng độ ức chế tối thiểu của chất thử (MIC).

2.3.5. Nghiên cứu docking phân tử

Để dự đoán tương tác của các dẫn xuất benzimidazol với các đích tác động tiềm năng, nghiên cứu docking được thực hiện bằng phần mềm Autodock Vina trên hệ điều hành Window 10 của máy tính Dell Inspiron 14 5000 (RAM 16 GB, card đồ họa NVIDIA). Cấu trúc 3D của GlcN-6-P synthase (PDB id: 2vf5), DNA topoisomerase

II (PDB id: 1jjj) và DNA gyrase (PDB id: 1kzn) được tải từ ngân hàng dữ liệu protein (www.rcsb.org). Trước khi thực hiện docking, thụ thể protein được chuẩn bị bằng cách kết hợp tất cả hydrogen không phân cực và loại bỏ

nước kết tinh thông qua giao diện đồ họa Autodock và Discovery Studio. Thông số “grid box” được tùy chỉnh theo từng loại enzyme sao cho kích thước lưới bao phủ hoàn toàn vị trí tác động của enzyme (Bảng 1).

Bảng 1. Thông số “grid box” của enzyme

Enzym	Kích thước			Trung tâm		
	x	y	z	x	y	z
GlcN-6-P	24	24	24	29,084	14,722	-2,804
Topo	16	16	16	-11,423	14,973	85,948
Gyr	30	30	30	19.150	30.393	34.745

GlcN-6-P: Glucosamin-6-phosphat synthase; Topo: DNA topoisomerase II; Gyr: DNA gyrase

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm

Nghiên cứu thử nghiệm hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm trên 5 chủng khuẩn với thuốc đối

chứng dương là ciprofloxacin và 2 chủng nấm với thuốc đối chứng dương là fluconazol. Kết quả MIC (nồng độ ức chế tối thiểu) của 6 dẫn xuất được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm của benzimidazol (MIC, µg/mL)

STT		Kháng khuẩn					Kháng nấm	
		EC	PA	SF	MSSA	MRSA	CA	AN
1	2a	64	128	64	4	4	16	64
2	2b	128	1024	1024	64	256	-	-
3	2c	64	256	128	8	16	64	-
4	2d	1024	128	128	1024	1024	-	-
5	2e	128	1024	64	256	256	-	-
6	2f	64	256	32	4	8	-	-
7	Cipro	16	8	8	8	16	NT	NT
8	Flu	NT	NT	NT	NT	NT	4	256

NT: not tested (không thử nghiệm); -: MIC > 1024 µg/mL. EC - *Escherichia coli* ATCC 25922, PA - *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, SF - *Streptococcus faecalis* ATCC 29212, MRSA - Methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, MSSA - Methicillin-susceptible strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, CA - *Candida albicans* ATCC 10231, AN - *Aspergillus niger* ATCC 16404. Cipro - Ciprofloxacin, Flu - Fluconazol. MIC (µg/mL) ± 0.5 µg/mL.

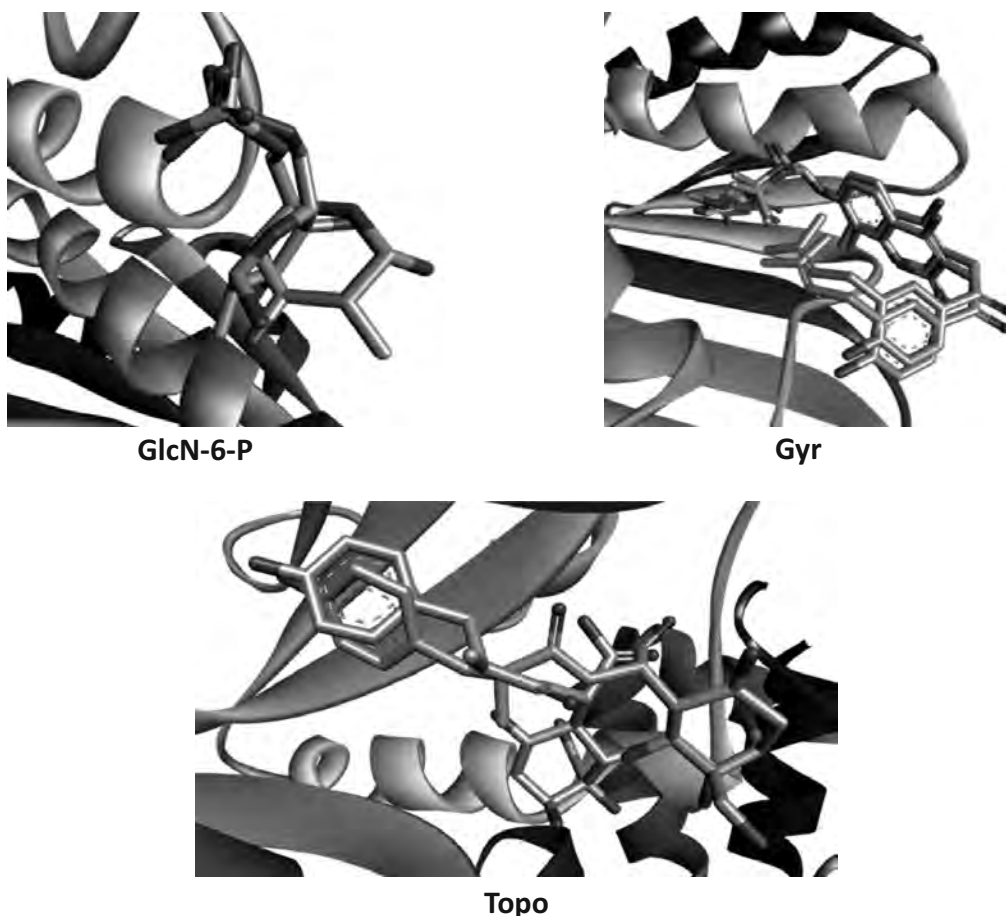
Dẫn xuất benzimidazol 2a-f thể hiện hoạt tính kháng khuẩn trung bình - yếu (MIC 32-1024 $\mu\text{g/mL}$) trên các chủng khuẩn *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* và *Streptococcus faecalis*. Dẫn xuất 2b và 2d-e thể hiện hoạt tính kháng khuẩn yếu (MIC 64-1024 $\mu\text{g/mL}$) trên các chủng khuẩn MSSA, MRSA và không thể hiện hoạt tính kháng nấm (MIC > 1024 $\mu\text{g/mL}$). Dẫn xuất 2a, 2c và 2f thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tốt trên chuẩn MSSA và MRSA (MIC 4 - 16 $\mu\text{g/mL}$) khi so sánh với thuốc ciprofloxacin (MIC: MSSA 8 $\mu\text{g/mL}$, MRSA 16 $\mu\text{g/mL}$). MIC của dẫn xuất 2c trên chủng MSSA, MRSA lần lượt là 8, 16 $\mu\text{g/mL}$. MIC của dẫn xuất 2f trên chủng MSSA, MRSA lần lượt là 4, 8 $\mu\text{g/mL}$. Đặc biệt, dẫn xuất 2a có MIC thấp nhất trong các dẫn xuất tổng hợp và thấp hơn ciprofloxacin trên chủng khuẩn MSSA (MIC 4 $\mu\text{g/mL}$) và MRSA (MIC 4 $\mu\text{g/mL}$). Ngoài ra, dẫn xuất 2a cũng thể hiện hoạt tính kháng nấm tốt trên chủng *Candida albicans* (MIC 16 $\mu\text{g/mL}$) và *Aspergillus niger* (MIC 64 $\mu\text{g/mL}$) khi so sánh với fluconazol (MIC: *Candida*

albicans 4 $\mu\text{g/mL}$, *Aspergillus niger* 256 $\mu\text{g/mL}$). Đây là dẫn xuất rất tiềm năng để tối ưu hóa cấu trúc và phát triển thành thuốc kháng sinh mới.

3.2. Kết quả docking phân tử

Sau khi đánh giá hoạt tính *in vitro*, nghiên cứu *in silico* được thực hiện trên receptor kháng khuẩn, kháng nấm GlcN-6-P synthase (GlcN-6-P), DNA topoisomerase II (Topo) và DNA gyrase (Gyr) bằng phần mềm Autodock Vina. Kết quả pre-docking của ligand đồng kết tinh cho thấy phương pháp tương thích tốt (Hình 3). Kết quả docking tương tác giữa receptor - ligand thể hiện trong bảng 3 và Hình 4.

Dẫn xuất benzimidazol 2a, 2c và 2f đều có ái lực tốt (-7.4 đến -9.6 Kcal/mol) và tạo được liên kết hydrogen với 3 receptor (GlcN-6-P, Topo và Gyr), trong đó ái lực tốt nhất (-9.1 đến -9.6 Kcal/mol) thể hiện trên receptor Topo (Topoisomerase II) và khả năng tạo liên kết hydrogen nhiều nhất thể hiện trên receptor GlcN-6-P.



Hình 3. Kết quả pre-docking của ligand

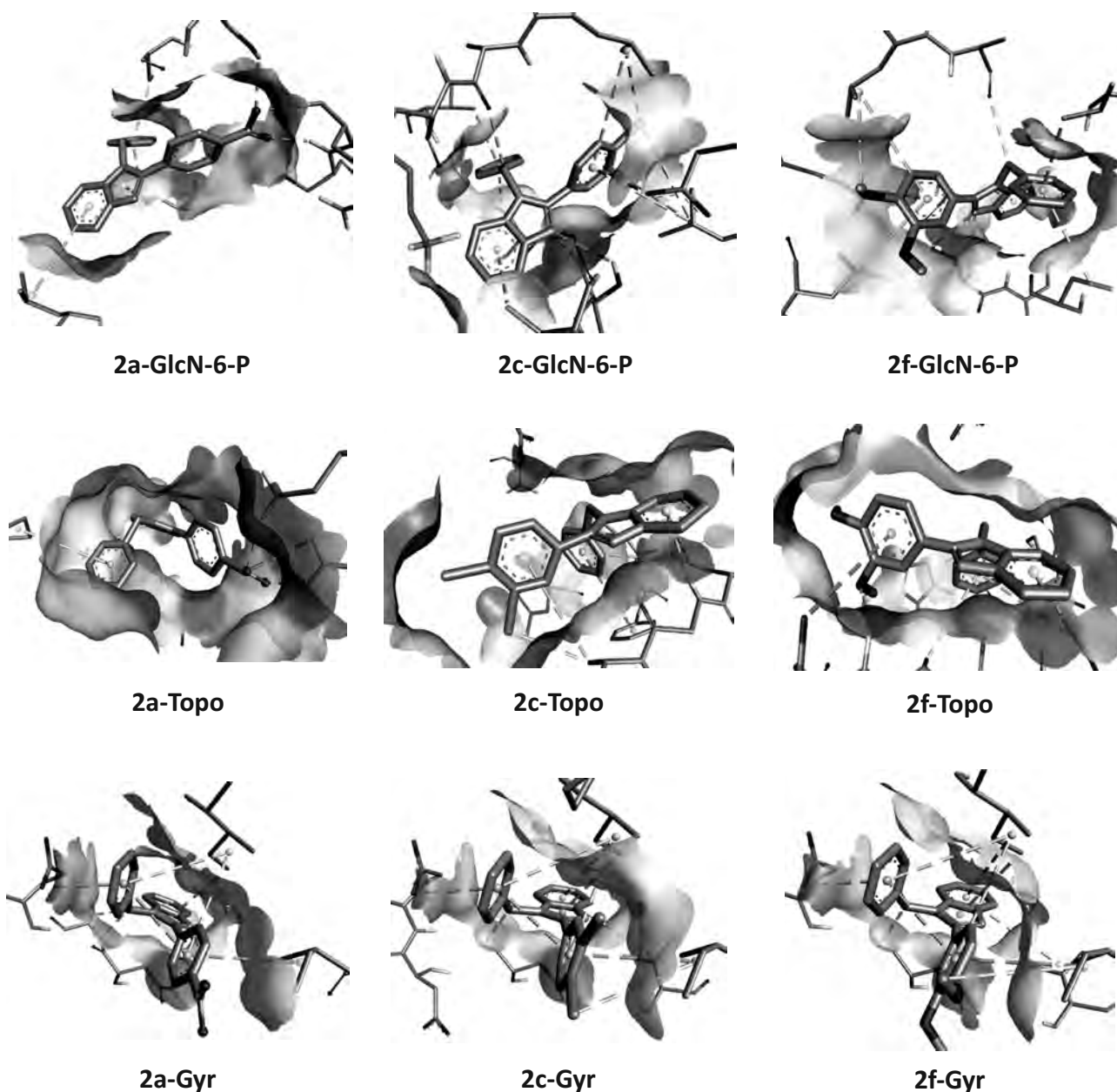
Bảng 3. Kết quả nghiên cứu *in silico* của một số dẫn xuất benzimidazol

Receptor	Ligand	Ái lực (Kcal/mol)	Loại liên kết	Vị trí liên kết
GlcN-6-P	2a	-8.1	Liên kết hydrogen (2,31 Å)	O (nitro) - Ser303
			Liên kết hydrogen (1,87 Å)	O (nitro) - Gln348
			Liên kết hydrogen (2,18 Å)	O (nitro) - Ser349
			Liên kết H π -donor, π -Sulfur (3,98 Å)	Benzen (N-benzyl) - Cys300
	2c	-8.1	Liên kết hydrogen (2,30 Å)	N (benzimidazol) - Thr302
			Liên kết hydrogen (2,99 Å)	N (benzimidazol) - Thr302
			Liên kết hydrogen carbon (3,71 Å)	C (N-benzyl) - Ala602
			Liên kết π -Anion (3,59 Å)	Benzen - Glu488
			Liên kết hydrogen π -donor (4,15 Å)	Benzen (benzimidazol) - Ser401
	2f	-7.4	Liên kết hydrogen (2,33 Å)	N (benzimidazol) - Thr302
			Liên kết hydrogen (2,99 Å)	N (benzimidazol) - Thr302
			Liên kết hydrogen carbon (3,62 Å)	C (N-benzyl) - Ala602
			Liên kết π -Anion (3,62 Å)	Benzen - Glu488
			Liên kết hydrogen π -donor (4,15 Å)	Benzen (benzimidazol) - Ser401
Topo	2a	-9.6	Liên kết hydrogen (2,17 Å)	O (nitro) - Lys84
			Liên kết hydrogen (2,06 Å)	O (nitro) - Arg88
			Liên kết hydrogen (2,99 Å)	O (nitro) - Arg88
	2c	-9.1	Liên kết hydrogen π -donor (3,23 Å)	Benzen (benzimidazol) - Gly38
	2f	-9.2	Liên kết hydrogen (2,30 Å)	OCH ₃ - Asp40
			Liên kết π -Anion (4,44 Å)	Benzen - Asp40
Gyr	2a	-8.4	Liên kết hydrogen carbon (3,46 Å)	C (N-benzyl) - Asn46
			Liên kết π -Anion (3,64 Å)	Benzen (N-benzyl) - Glu50
	2c	-8.4	Liên kết hydrogen carbon (3,36 Å)	C (N-benzyl) - Asn46
			Liên kết π -Anion (3,70 Å)	Benzen (N-benzyl) - Glu50
			Liên kết hydrogen π -donor (3,01 Å)	Imidazol - Asn46
	2f	-7.9	Liên kết hydrogen carbon (3,32 Å)	C (N-benzyl) - Asn46
			Liên kết π -Anion (3,67 Å)	Benzen (N-benzyl) - Glu50

GlcN-6-P: Glucosamin-6-phosphat synthase; Topo: DNA topoisomerase II; Gyr: DNA gyrase

Dẫn xuất 2a, 2c và 2f có ái lực với receptor Topo lần lượt là -9.6; -9.1 và -9.2 Kcal/mol. Dẫn xuất 2c tạo được 2 liên kết hydrogen mạnh (2,30 - 2,99 Å) tại Thr302 với GlcN-6-P, trong khi đó trên receptor Topo và Gyr không tạo được liên kết hydrogen mạnh và chỉ tạo được liên kết hydrogen carbon, π -donor và liên kết π -Anion. Dẫn xuất 2f tạo được 2 liên kết hydrogen mạnh (2,33 - 2,99 Å) tại Thr302 nhưng có ái lực yếu nhất với GlcN-6-P (-7.4 Kcal/mol); đồng thời tạo được 1 liên kết hydrogen mạnh (2,30 Å) tại Asp40 với Topo và không tạo được liên kết hydrogen

mạnh với Gyr. Đặc biệt, dẫn xuất 2a tạo được 3 liên kết hydrogen mạnh (1,87 - 2,31 Å) tại Ser303, Gln348, Ser349 với GlcN-6-P; đồng thời cũng tạo được 3 liên kết hydrogen mạnh (2,06 - 2,99 Å) tại Lys84, Arg88 với ái lực cao nhất trên Topo (-9.6 Kcal/mol) và không tạo được liên kết hydrogen mạnh với Gyr giống dẫn xuất 2c và 2f. Trong 3 dẫn xuất, 2a thể hiện ái lực và khả năng tạo liên kết hydrogen với 3 receptor tốt nhất. Điều này một phần có thể giải thích lí do dẫn xuất 2a có hoạt tính tốt trên cả vi khuẩn và vi nấm khi so sánh với thuốc đối chiếu ciprofloxacin và fluconazol.



Hình 4. Mô hình 3D về sự tương tác trên receptor GlcN-6-P synthase (GlcN-6-P), DNA topoisomerase II (Topo) và DNA gyrase (Gyr)

4. KẾT LUẬN

Một số dẫn xuất *N*-benzyl 2-arylbenzimidazol đã được đánh giá hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm trên 5 chủng khuẩn và 2 chủng nấm. Kết quả cho thấy có 3 dẫn xuất (4-NO₂, 3,4-Cl₂, 3,4-(OCH₃)₂) thể hiện hoạt tính kháng khuẩn tiềm năng trên MSSA, MRSA và 1 dẫn xuất (4-NO₂) thể hiện hoạt tính kháng nấm triển vọng trên *Aspergillus niger*. Nghiên cứu docking phân tử cho thấy các dẫn xuất có hoạt tính *in vitro* tốt thể hiện ái lực trung bình đến mạnh với receptor GlcN-6-P

synthase, DNA topoisomerase II và DNA gyrase chủ yếu thông qua liên kết hydrogen mạnh, liên kết hydrogen carbon, liên kết hydrogen π -donor và liên kết π -Anion. Nhóm chức 4-nitro (4-NO₂), 3,4-dicloro (3,4-Cl₂), 3,4-dimethoxy (3,4-(OCH₃)₂) và gốc *N*-benzyl (*N*-CH₂C₆H₅) cho thấy khả năng làm tăng đáng kể tương tác với receptor thông qua liên kết hydrogen mạnh, π -donor và π -Anion. Điều này có thể góp phần tạo nên hoạt tính kháng khuẩn, kháng nấm tốt của dẫn xuất benzimidazol.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] K. L. Mason, J. R. Erb Downward, K. D. Mason, N. R. Falkowski, K. A. Eaton, J. Y. Kao, V. B. Young and G. B. Huffnagle, "Candida albicans and bacterial microbiota interactions in the cecum during recolonization following broad-spectrum antibiotic therapy," *Infection and immunity*, vol. 80, pp. 3371-3380, 2012.
- [2] H. Göker, M. Alp and S. Yıldız, "Synthesis and potent antimicrobial activity of some novel *N*-(alkyl)-2-phenyl-1*H*-benzimidazole-5-carboxamides," *Molecules*, vol. 10, pp. 1377-1386, 2005.
- [3] H. Sören, "Antibiotic resistance - why is the problem so difficult to solve?," *Infection ecology & epidemiology*, vol. 2, 2012.
- [4] K. Klobucar and E. D. Brown, "New potentiators of ineffective antibiotics: Targeting the Gram-negative outer membrane to overcome intrinsic resistance," *Current Opinion in Chemical Biology*, vol. 66, p. 102099, 2022.
- [5] D. Sharma, B. Narasimhan, P. Kumar and A. Jalbout, "Synthesis and QSAR evaluation of 2-(substituted phenyl)-1*H*-benzimidazoles and [2-(substituted phenyl)-benzimidazol-1-yl]-pyridin-3-yl-methanones," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 44, pp. 1119-1127, 2009.
- [6] A. A. Farahat, E. Paliakov and A. Kumaretal, "Exploration of larger central ring linkers in furamide analogues: synthesis and evaluation of their DNA binding, antiparasitic and fluorescence properties," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 19, pp. 2156-2167, 2011.
- [7] Y. F. Li, G. F. Wang, P. L. He, W. G. Huang, F. H. Zhu, H. Y. Gao, W. Tang, Y. Luo, C. L. Feng, L. P. Shi, Y. D. Ren, W. Lu and J. P. Zuo, "Synthesis and anti-hepatitis B virus activity of novel benzimidazole derivatives," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 49, pp. 4790-4794, 2006.
- [8] J. Chen, Z. Wang, C. M. Li, Y. Lu, P. K. Vaddady, B. Meibohm, J. T. Dalton, D. D. Miller and W. Li, "Discovery of novel 2-aryl-4-benzoyl-imidazoles targeting the colchicines binding site in tubulin as potential anticancer agents," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 53, pp. 7414-7427, 2010.
- [9] G. N. Vazquez, L. Yepez and A. H. Camposetal, "Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 11, pp. 4615-4622, 2003.
- [10] P. C. Em, T. N. Tuyen, D. H. Nguyen, V. D. Duy and D. T. Hong Tuoi, "Synthesis of a series of novel 2-amino-5-substituted 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazole derivatives as potential anticancer, antifungal and antibacterial agents," *Medicinal Chemistry*, vol. 18, pp. 558-573, 2022.
- [11] S. Milewski, "Glucosamine-6-phosphate

synthase - the multi-facets enzyme," *Biochim Biophys Acta*, vol. 1597, 173-192, 2002.

[12] D. Steverding, P. Evans, L. Msika, B. Riley, J. Wallington and S. Schelenz, "In vitro antifungal activity of DNA topoisomerase inhibitors," *Medical Mycology*, vol. 50, pp. 333-336, 2012.

[13] Y. C. Tse-Dinh, "Bacterial topoisomerase I as a target for discovery of antibacterial compounds," *Nucleic Acids Research*, vol. 37, pp. 731-737, 2009.

[14] S. N. Dighe and T. A. Collet, "Recent advances in DNA gyrase-targeted antimicrobial agents," *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 199, p. 112326, 2020.

[15] F. Collin, S. Karkare and A. Maxwell,

"Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 92, pp. 479-497, 2011.

[16] K. Gullapelli, G. Brahmeshwari, M. Ravichander and U. Kusuma, "Synthesis, antibacterial and molecular docking studies of new benzimidazole derivatives," *Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences*, vol. 4, pp. 303-309, 2017.

[17] Phạm Cảnh Em, Đỗ Thị Thúy và Trương Ngọc Tuyền, "Tổng hợp, hoạt tính ung thư và nghiên cứu docking một số dẫn chất N-benzyl 2-arylbenzimidazol", *Tạp chí Y Dược học Việt Nam*, vol. 17, pp. 33-41, 2021.

Evaluation of antibacterial and antifungal activities and molecular docking studies of some N-benzyl 2-arylbenzimidazol derivatives

Pham Canh Em

ABSTRACT

A novel series of N-benzyl 2-arylbenzimidazole derivatives were synthesized. These compounds were screened for in vitro antibacterial and antifungal activities by the micro-broth dilution technique using nutrient broth. Compounds 2c and 2f showed good antibacterial activity against MSSA and MRSA (MIC range: 4 - 16 µg/mL). Compound 2a showed excellent antifungal activity against MSSA and MRSA (MIC 4 µg/mL), and good antifungal activity against *Aspergillus niger* (MIC 64 µg/mL), which is comparable to the activity of ciprofloxacin and fluconazole. The synthesized compounds were subjected to molecular docking studies with three proteins, namely glucosamine-6-phosphate synthase, topoisomerase II, and DNA gyrase. The molecular docking studies have supported the explanation of antibacterial and antifungal activities through hydrogen bond formation and high affinity.

Keywords: Benzimidazole, antibacterial, antifungal, molecular docking

Received: 28/04/2022

Revised: 15/05/2022

Accepted for publication: 16/05/2022