

JOÃO PEDRO VIANNA BRAGA

**DERIVADOS DE INDANDIONAS: ATIVIDADE ANTIBIOFILME E
ENCAPSULAMENTO COM β -CICLODEXTRINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Andréa de Oliveira Barros Ribon

Coorientadores: Renata P. Lopes Moreira
Róbson Ricardo Teixeira

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2022**

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade Federal de Viçosa - Campus Viçosa

T

B813d
2022
Braga, João Pedro Vianna, 1996-
Derivados de indandionas: atividade antibiofilme e encapsulamento com β -ciclodextrina / João Pedro Vianna Braga. - Viçosa, MG, 2022.

1 dissertação eletrônica (59 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês

Orientador: Andréa de Oliveira Barros Ribon.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2022.598>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Agentes antiinfeciosos. 2. Cetonas. 3. Biofilmes. I. Ribon, Andréa de Oliveira Barros, 1971-. II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada. III. Título.

CDD 22. ed. 547.7

Bibliotecário(a) responsável: Euzébio Luiz Pinto CRB 6/3317

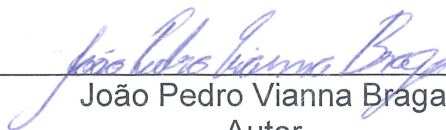
JOÃO PEDRO VIANNA BRAGA

**DERIVADOS DE INDANDIONAS: ATIVIDADE ANTIBIOFILME E
ENCAPSULAMENTO COM β -CICLODEXTRINA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 11 de agosto de 2022.

Assentimento:



João Pedro Vianna Braga
Autor



Andréa de Oliveira Barros Ribon
Orientadora

*Aos meus pais, irmã, avó, primos, tios, namorado,
amigos, professores e todos que contribuem e torcem por
meu sucesso e felicidade, com amor dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Viçosa, a qual me proporcionou todo conhecimento científico adquirido e todas as condições necessárias para que eu alcançasse meus objetivos.

À minha orientadora, Andréa de Oliveira Barros Ribon pela oportunidade, por ter me acolhido em seu laboratório e projetos. Obrigado pela excelente orientação, oportunidades, ensinamentos, apoio, conselhos, paciência por ser um exemplo de comprometimento e dedicação à profissão estando sempre presente.

Aos meus coorientadores, Renata Pereira Lopes Moreira e Róbson Ricardo Teixeira pela disposição e suporte para realização deste trabalho.

Ao laboratório LBM e todos seus integrantes pela contribuição na minha formação pessoal e profissional, sem vocês o laboratório não teria o alto astral que tem.

A todas as energias e Deuses, por terem me guiado, me dado sabedoria, força e calma para enfrentar todos os desafios durante esse período tão difícil.

Ao meu namorado Felipe pela paciência, apoio, carinho, companheirismo, risadas e amor.

Ao meu pai Elwath, à minha mãe Valdete e à minha irmã Maria Lúza agradeço por estarem sempre ao meu lado me apoiando desde o início desse sonho. Vocês se sacrificaram, se dedicaram, abdicaram de tempo e de muitos projetos pessoais para que eu tivesse a oportunidade de estudar e de ter uma boa formação profissional e pessoal. Eu devo tudo que sou a vocês. Eu dedico este título a vocês. Sem vocês, nada disso seria possível.

A todos os professores e amigos, carrego um pouquinho de cada um nessa conquista, muito obrigado!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

“Quando acordei hoje de manhã, eu sabia quem eu era,
mas acho que já mudei muitas vezes desde então.”

(Lewis Carroll)



BIOGRAFIA

João Pedro Vianna Braga, filho de Valdete Rezende Viana Braga e Elwath José Braga, nasceu em 7 de julho de 1996 em Barbacena, Minas Gerais. Iniciou sua profissionalização em 2012 no Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia – Sudeste Minas Gerais (Campus Barbacena) no curso Técnico em Química integrado ao Ensino Médio, em 2015 começou a graduação em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa, concluindo o curso em janeiro de 2020. Concluiu a pós-graduação *Lato Sensu* em Controle da Qualidade na Indústria Química pela Faculdade Unyleya em abril de 2022. Em março de 2020, ingressou no mestrado do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada da Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação em agosto de 2022.

RESUMO

BRAGA, João Pedro Vianna, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, agosto de 2022. **Derivados de Indandionas: Atividade Antibiofilme e Encapsulamento com β -Ciclodextrina**. Orientadora: Andrea de Oliveira Barros Ribon. Coorientadores: Renata Pereira Lopes Moreira e Róbson Ricardo Teixeira.

Biofilmes são uma comunidade bacteriana aderida a uma superfície inerte ou viva, e protegida por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares que permite o crescimento e sobrevivência das bactérias em ambientes hostis e confere maior resistência e tolerância a antimicrobianos e sanitizantes. Por se desenvolverem em uma variedade de superfícies, os biofilmes causam impactos significativos em diversas áreas, incluindo saúde e setor industrial. Visando o desenvolvimento de estratégias destinadas ao controle e remoção de biofilmes bacterianos este trabalho avaliou a capacidade de 19 derivados de indandionas, compostos que possuem um grupo metileno entre duas cetonas (β -dicetona), em afetar a formação de biofilmes e biofilmes pré-formados sobre diferentes bactérias. A concentração inibitória mínima dos compostos derivados da 2-(arilideno)-indan-1,3-diona foi superior a 160 $\mu\text{g/mL}$. Os ensaios antibiofilme foram realizados com os compostos na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. Os compostos que mais inibiram a formação de biofilme foram **Ap18** para *S. aureus* (66,2%), **Ap28** para *S. epidermidis* (82,2%), **Ap3** para *E. coli* (54,3%) e **Ap25** para *P. aeruginosa* (70,8%). Após 6 horas, o composto **Ap18** desfez em 53,5% o biofilme pré-formado de *E. coli*, mas tiveram fraca atividade sobre biofilmes pré-formados de *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. Ensaios de viabilidade celular, mostraram a baixa toxicidade dos compostos **Ap8**, **Ap24** e **Ap27**. Numa tentativa de aumentar a solubilidade dos compostos visando a um aumento de atividade, foi realizada a síntese de um complexo de inclusão (CI) entre o derivado de indandiona **Ap8** e a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD), sendo calculada em 78,27% a eficiência de complexação. O **CIAp8** reduziu a formação do biofilme de *P. fluorescens* 07A, isolado de leite cru refrigerado, em 53,6% e de *S. aureus* USA300, um clone pandêmico resistente à meticilina em 10,4%, diferentemente do composto puro **Ap8**, que não demonstrou atividade para essas bactérias. Para os demais biofilmes de modo geral a atividade do **CIAp8** não foi superior ao composto **Ap8** puro. O encapsulamento do composto **Ap8** não diminuiu a sua citotoxicidade nas

concentrações avaliadas. Em resumo, esse trabalho comprovou a atividade de derivados da 2-arilideno indan-1,3-diona sobre importantes patógenos bacterianos. Os resultados podem ser explorados para subsidiar a síntese de compostos mais eficazes e menos citotóxicos.

Palavras-chave: Atividade antibiofilme. 2-arilideno indan-1,3-dionas. Complexo de inclusão.

ABSTRACT

BRAGA, João Pedro Vianna, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, August 2022. **Indandiones Derivatives: Antibiofilm Activity and Encapsulation with β -Cyclodextrin**. Advisor: Andrea de Oliveira Barros Ribon. Co-advisors: Renata Pereira Lopes Moreira and Róbson Ricardo Teixeira.

Biofilms are a bacterial community attached to an inert or living surface and protected by a matrix of extracellular polymeric substances. This protection allows the growth and survival of bacteria in hostile environments and provides greater resistance and tolerance to antimicrobials and sanitizers. Because they develop on a variety of surfaces, biofilms have significant impacts in several areas, including healthcare and the industrial sector. Aiming at the development of strategies for the control and removal of bacterial biofilms, this work evaluated the ability of nineteen 2-arylidene indan-1,3-diones to affect the formation of biofilms and preformed biofilms on different bacteria. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the compounds was higher than 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and antibiofilm assays were performed at a concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The compounds that most inhibited biofilm formation were **Ap18** for *S. aureus* (66.2%), **Ap28** for *S. epidermidis* (82.2%), **Ap3** for *E. coli* (54.3%), and **Ap25** for *P. aeruginosa* (70.8%). After 6 hours, **Ap18** disrupted the preformed biofilm of *E. coli* by 53.5% but had weak activity on the preformed biofilms of the other bacteria. Cell viability assays showed the low toxicity of compounds **Ap8**, **Ap24** and **Ap27**. In an attempt to increase the solubility of the compounds, aiming at an increase in activity, the synthesis of an inclusion complex (CI) between the indandione derivative Ap8 and hydroxypropyl- β -cyclodextrin (HP β CD) was performed, being calculated at 78.3 % the complexation efficiency. **CIAp8** reduced the biofilm formation of *P. fluorescens* 07A, isolated from refrigerated raw milk, by 53.6% and of *S. aureus* USA300, a methicillin-resistant pandemic clone by 10.4%, unlike the pure compound **Ap8**, which showed no activity for these bacteria. For the other biofilms, in general, the **CIAp8** activity was not superior to the pure compound **Ap8**. The encapsulation of the compound **Ap8** did not decrease its cytotoxicity at the concentrations evaluated. In summary, this is the first work that demonstrated the antibiofilm activity of 2-arylidene indan-1,3-diones derivatives on important bacterial pathogens. The results can be explored to support the synthesis of more effective and less cytotoxic compounds.

Keywords: Antibiofilm activity. 2-arylidene indan-1,3-diones. Inclusion complex.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Biofilmes bacterianos	14
2.2 Resistência conferida pela presença de biofilmes	15
2.3 Biofilme e saúde humana.....	17
2.4 Impacto dos biofilmes bacterianos no setor industrial.....	18
2.5 Estratégias de controle para biofilmes	19
2.6 Nanotecnologia	22
2.7 Indandionas e derivados	24
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25
4.1. CAPÍTULO 1: 2-ARYLYDENE INDAN-1,3-DIONES PRESENT ANTI-BIOFILM ACTIVITY AGAINST BACTERIAL PATHOGENS	30
Abstract.....	30
Introduction	31
Material and Methods.....	32
Synthesis of 2-arylidene indan-1,3-diones	32
Microorganisms and cultivation conditions.....	32
Determination of MIC	33
Growth curve	33
Antibiofilm activity of compounds.....	33
Cytotoxicity	34
Statistical analysis	35
Results	35
Discussion.....	41
References.....	43

4.2. CAPÍTULO 2: ATIVIDADE ANTI-BIOFILME DO COMPLEXO DE INCLUSÃO FORMADO ENTRE DERIVADO DE INDANDIONA E HP- β -CICLODEXTRINA.....	49
Introdução	49
Material e Métodos.....	50
Microrganismos e condições de cultivo	50
Síntese do complexo de inclusão (CI)	50
Curva analítica e eficiência de complexação	51
Atividade antibiofilme do complexo de inclusão.....	51
Citotoxicidade	52
Análises estatísticas	52
Resultados	52
Discussão	55
Referências Bibliográficas.....	56
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	59

1. INTRODUÇÃO

Biofilmes bacterianos apresentam problemáticas significativas tanto para a saúde humana, quanto para o setor industrial. O desenvolvimento de estratégias destinadas ao controle e remoção de biofilmes bacterianos é algo de extrema importância e necessidade. Com intuito de potencializar a atividade de interesse de determinados compostos e redução de pontos negativos como, por exemplo, toxicidade, o uso da nanotecnologia é uma ferramenta interessante com um vasto espectro de possibilidades. Uma classe de moléculas muito utilizadas com este fim são as ciclodextrinas (CD), que formam complexos de inclusão (CI) com uma variedade de substâncias, alterando suas propriedades pela complexação.

Este trabalho teve por objetivos principais avaliar a atividade antibiofilme de derivados da 2-arilideno indan-1,3-diona, uma classe importante com muitas aplicações em potencial derivada das indandionas, selecionar o composto com maior potencial e produzir complexos de inclusão com a hidroxipropil- β -CD (HP β CD) visando intensificar a atividade sob biofilmes bacterianos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biofilmes bacterianos

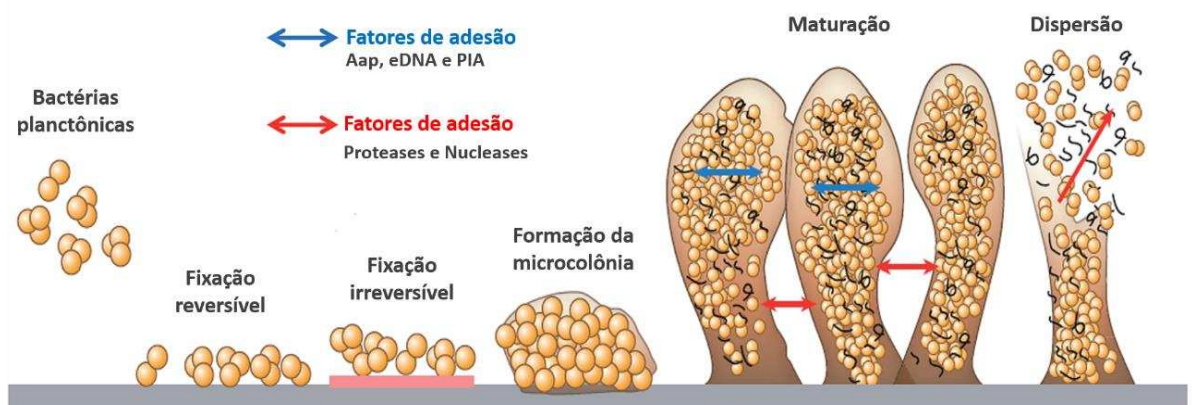
Biofilmes bacterianos são uma comunidade bacteriana aderida a superfície inerte ou viva, protegida por uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPSs), que podem ser compostas por polissacarídeos, proteínas, lipídeos e DNA extracelular (Zhao, 2017). A proteção criada pelo biofilme permite o crescimento e sobrevivência das bactérias em ambientes hostis, principalmente naqueles de alto cisalhamento (meio que flui rapidamente). Na natureza, 95% a 99% dos microrganismos são encontrados na forma de biofilmes, sendo a vida bacteriana planctônica (livre) um mecanismo de translocação entre superfícies (Oliveira et al., 2010).

A formação do biofilme ocorre em quatro estágios principais: adesão, formação da microcolônia, maturação e dispersão (Figura 1). A etapa inicial de adesão das bactérias a uma superfície ocorre por meio de fixação fraca, onde elas aderem casualmente à superfície por meio de interações de van der Waals com auxílio de algumas organelas, como flagelo, pili, uma pequena quantidade de EPS (substância polimérica extracelular) ou proteínas conhecidas como adesinas (Klausen et al., 2003). A adesão se torna forte quando o nível de EPSs secretado atinge um determinado grau em que a interação entre as bactérias e a superfície aumenta consideravelmente (Zhao, 2017).

O biofilme pode estar aderido a inúmeros tipos de superfícies, porém sua adesão é favorecida por alguns fatores como a rugosidade, composição química, hidrofobicidade da superfície e também por fatores ambientais, como temperatura e pH. Os biofilmes são encontrados em sua maioria em superfícies úmidas, como alimentos, equipamentos de processamento de alimentos, tubulações de água, tubulações industriais, dispositivos médicos, tecidos e órgãos (Toyofuku et al. 2016). Após a fixação forte, o acúmulo de bactérias e o aumento da secreção da EPS favorece gradualmente a formação de pequenas colônias. Nessa fase onde as microcolônias são formadas acontece um do fenômeno denominado *Quorum sensing*, onde a regulação da expressão gênica ocorre em resposta a densidade populacional de células, promovendo a liberação de moléculas sinalizadoras que regulam a expressão de determinados genes e a secreção de EPS (Machado et al, 2020).

Com o aumento da densidade populacional e das substâncias poliméricas, o biofilme se torna mais espesso e estável alcançando a etapa de maturação. Nessa etapa, o aumento populacional torna o ambiente no interior do biofilme anaeróbico, aumentando a concentração de ácidos e gases insolúveis, enfraquecendo a estrutura ocasionando o desprendimento de algumas células ou até mesmo fragmentos do biofilme (Oliveira et al., 2010). O desprendimento também pode ser causado por fatores ambientais, como limitação de nutrientes. A etapa de dispersão permite a colonização de novos locais e o início de um novo ciclo. O biofilme maduro proporciona maior resistência a bactericidas além de dificultar o contato e remoção dessas bactérias (Klančnik et al. 2021).

Figura 1: Principais estágios na formação de um biofilme bacteriano. Siglas: Aap (proteína de associação e acúmulo), eDNA (DNA extracelular), PIA (polissacarídeo de adesão intercelular).



Fonte: (Zhao (2017)).

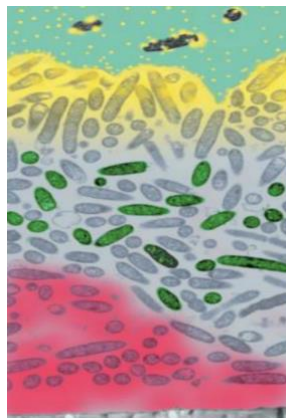
2.2 Resistência conferida pela presença de biofilmes

A maior resistência e tolerância a antimicrobianos e sanitizantes das bactérias presentes em um biofilme em comparação com bactérias de vida livre está associada a diversos fatores. A matriz de EPS presente no biofilme além de dificultar a difusão desses compostos pode diminuir ou até mesmo acabar com a atividade de antimicrobianos através de processos que podem envolver a formação de complexos através de quelação, degradação enzimática, sacrifício de uma porção da EPS para inibição da ação de desinfetantes e oxidantes (Flemming, et al. 2016). Todos esses processos podem reduzir a concentração efetiva de antimicrobianos para

concentrações subletais, selecionando e favorecendo o desenvolvimento e proliferação de bactérias mais resistentes (Oliveira et al., 2010).

Uma parcela significativa das células presentes no biofilme possui taxas metabólicas e de crescimento reduzidas, tornando-as fisiologicamente distintas e mais resistentes quando comparadas com as mesmas células em estado planctônico, visto que, muitos antimicrobianos dependem de células metabolicamente ativas para agirem (Chai et al., 2012). Todos esses fatores, combinados com a alta densidade celular e o ambiente fisicamente estável no interior do biofilme, criado pela matriz de EPS, favorecem a disseminação de genes de resistência por transferência horizontal. Estima-se que pelo menos 1% das células bacterianas presentes em biofilmes que estão com taxas metabólicas e de crescimento reduzidas tornam-se tolerantes a antibióticos (Flemming, et al. 2016). Stewart e Costerton (2001) ilustraram bem os mecanismos de resistência a antibióticos proporcionado pelos biofilmes bacterianos (Figura 2). Em amarelo está evidenciada a possibilidade de penetração lenta ou incompleta do antibiótico na matriz do biofilme. Em verde temos o surgimento de células resistentes no microambiente formado no interior do biofilme favorável para a transferência horizontal de genes. Esse microambiente também possui níveis de oxigênio reduzidos, variações de pH devido ao acúmulo de metabólitos residuais e ambiente osmótico alterado, induzindo respostas ao estresse osmótico interferindo a ação de antibióticos. Em vermelho, temos a região mais basal do biofilme, uma região com baixas concentrações de nutrientes e oxigênio, uma população bacteriana altamente protegida e pouco ativa metabolicamente ou até mesmo em estado de dormência. Essas condições dificultam a chegada de concentrações eficazes e a ação de antimicrobianos nessa região.

Figura 2: Mecanismos de resistência a antibióticos em biofilmes



Fonte: Stewart e Costerton (2001).

2.3 Biofilme e saúde humana

O aumento da incidência de doenças infecciosas está associado diretamente às altas taxas de morbimortalidade (Jones et al., 2008). Infecções hospitalares constituem um sério problema de saúde pública mundial e são consideradas uma das principais causas de morbidade e mortalidade, exigindo tratamentos invasivos com alta probabilidade de complicações e sequelas, além de prolongar a permanência dos pacientes na área hospitalar (Sena, 2016). As possíveis causas que levam à persistência e à disseminação de infecções agudas e crônicas, são o foco de diversos grupos de pesquisa em todo o mundo.

As infecções agudas são causadas, em sua maioria, por microrganismos em suas formas planctônicas. Porém, o biofilme bacteriano promove a formação de uma comunidade coesa e forte de células o que confere a cronicidade a muitas infecções bacterianas (Harrell et al. 2021). De acordo com o *National Institute of Health*, 80% das infecções crônicas a nível mundial estão associadas à formação de biofilme (Jamal et al., 2018). A dificuldade de determinar se uma infecção ocorre devido à presença do biofilme ou de microrganismos no estado planctônico é um fator agravante em muitas infecções. Mesmo após o tratamento com altas doses de antimicrobianos, a matriz do biofilme formado pode persistir protegendo microrganismos que se comportam fisiologicamente diferentes das suas formas planctônicas, alterando sua taxa de crescimento promovendo resistência aos antimicrobianos e a própria resposta imune do hospedeiro uma vez que o acesso dos agentes antimicrobianos ao interior da matriz é dificultado (Sena, 2016).

Os biofilmes podem se desenvolver em tecidos mortos, tecidos adjacentes a lesões, ou em superfícies abióticas (Caetano et al., 2018). As superfícies abióticas em sua maioria são dispositivos biomédicos, como catéteres, sondas, próteses, entre outros (Sena, 2016). O déficit imunológico que ocorre no local da interface implante-hospedeiro torna todos os implantes suscetíveis ao risco de colonização microbiana e infecção (Trentin et al., 2013). Diferentes espécies bacterianas podem causar infecções relacionadas a dispositivos biomédicos (Tabela 1), e estima-se que 95% das infecções do trato urinário estão associados ao cateter urinário, 80% das pneumonias estão associadas à ventilação mecânica e 87% das infecções da corrente sanguínea estão associadas com dispositivos intravasculares (Dufour et al. 2010).

Dentre todos os patógenos formadores de biofilme, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* são considerados importantes causadores de infecções associadas a implantes biomédicos podendo transformar uma infecção aguda em uma infecção crônica persistente, devido a alta virulência e a rápida aquisição de resistência a diversos antibióticos (Caetano et al., 2018). Ressalta-se que o desenvolvimento da resistência antimicrobiana (AMR) representa grave ameaça à humanidade, aos animais e ao meio ambiente, sendo um dos principais desafios de saúde global do século 21. A Organização Mundial da Saúde (OMS) destacou a AMR como uma das dez principais ameaças para a saúde global em 2019 (Goel et al., 2021).

Tabela 1. Biofilmes em dispositivos médicos.

Aparelho médico	Principais espécies bacterianas
Lentes de contato	<i>P. aeruginosa</i> , cocos Gram-positivos
Dentadura	<i>Candida</i> spp.
Cateter urinário	<i>E. coli</i> , <i>Candida</i> spp., <i>E. faecalis</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Cateter venoso central	CoNS*, <i>S. aureus</i>
Válvula cardíaca mecânica	CoNS, <i>S. aureus</i>
Próteses de vocais	<i>C. albicans</i> , CoNS
Tubos endotraqueais	Espécies Gram-negativas entéricas

*CoNS: estafilococos coagulase-negativos.

Adaptado de (Dufour et al. 2010)

2.4 Impacto dos biofilmes bacterianos no setor industrial

Biofilmes bacterianos impactam negativamente o setor industrial, uma vez que reduzem a vida útil dos equipamentos, diminuem a qualidade dos produtos, afetam diretamente processos nos quais envolvem troca de calor, além de no setor alimentício serem fonte de contaminação cruzada causando sérios problemas de saúde pública (Alvarez-Ordóñez et al., 2019). Segundo a OMS, doenças transmitidas por alimentos são consideradas um problema emergente de saúde pública em países desenvolvidos e países em desenvolvimento. Isso se deve ao fato de grande parte das espécies

bacterianas formadoras de biofilme na indústria de alimentos serem patógenos humanos que colonizam diferentes substratos como matéria orgânica, aço inoxidável, polietileno, madeira, vidro, polipropileno, borracha, etc. (Galié et al., 2018; Zhao, 2017).

Na indústria de produtos lácteos, por exemplo, os tanques de leite, oleodutos, centrífugas de manteiga, tanques de queijo, pasteurizadores, dentre outras estruturas, são ambientes favoráveis para a formação de biofilmes (Galié et al., 2018). Dependendo do tipo de alimento que a indústria processa, é comum a ocorrência de determinadas espécies bacterianas formadoras de biofilme (Tabela 2). Além disso, pela exposição a diversas condições ambientais, essas bactérias podem desenvolver variações genéticas adaptativas nos genes envolvidos na produção de biofilme, dando origem a biofilmes mais resistentes. Essa complexidade, junto a alta diversidade dos ambientes afetados e a variedade espécies bacterianas, dificulta a erradicação efetiva desses biofilmes (Galié et al., 2018).

Tabela 2: Principais bactérias formadoras de biofilme no setor industrial alimentício.

Setor	Espécie bacteriana
Laticínios	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i>
Linhas de pasteurização de leite	<i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i>
Indústria de sorvetes	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Shigella</i>
Planta processadora de caviar	<i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Listeria</i> , <i>Serratia liquefaciens</i>
Planta processadora de camarão	<i>Pseudomonas</i> , <i>P. fluorescens</i> , <i>P. putida</i>
Indústria de carnes	<i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Brochothrix thermosphacta</i>
Planta processadora de sucos e produtos de origem vegetal	<i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Erwinia</i> spp.

Adaptado de (Shi et al. 2009)

2.5 Estratégias de controle para biofilmes

O controle de biofilmes no setor industrial pode ser dividido em três etapas principais: prevenção da formação de biofilmes, remoção do biofilme formado e

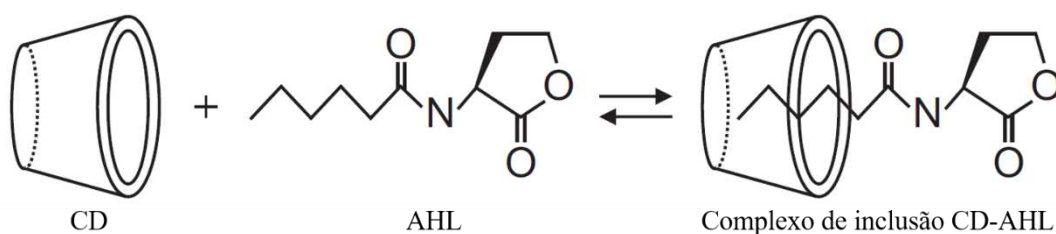
prevenção da dispersão do biofilme. A prevenção da formação de biofilmes é feita a partir da utilização de compostos e aditivos alimentares com atividade antibacteriana ou pela inibição da formação desse biofilme (Zhao, 2017). A limpeza e a desinfecção são os principais métodos utilizados para interromper a adesão inicial do biofilme. Essas metodologias variam desde o uso de nanopartículas, alterações em temperatura e pH, ao uso de técnicas *Cleaning-In-Place* (CIP) que permitem a limpeza de todo o sistema de processamento sem a necessidade de desmontá-lo ou proceder à limpeza manual, onde se pulveriza manualmente os compostos sanitizantes (Zhao, 2017).

A remoção do biofilme formado não é uma tarefa fácil. Em plantas industriais, os tratamentos são classificados em físicos, químicos e biológicos e são comumente combinados para aumentar a eficiência da remoção. Geralmente, os tratamentos físicos podem levar a desestabilização ou destruição da estrutura do biofilme. Choque térmico, ultrassom e tensão de cisalhamento são os mais utilizados por não deixarem resíduos. Uma ampla gama de compostos químicos inorgânicos e orgânicos são utilizados para enfraquecer a adesão do biofilme e degradar as substâncias presentes no EPS facilitando a penetração de antibióticos e sanitizantes (Zhao, 2017) enquanto que os tratamentos biológicos consistem basicamente na utilização de bacteriófagos (Topka-Bielecka et al., 2021).

Uma estratégia muito estudada visando a prevenção da dispersão de biofilme tem como foco o sistema *Quorum sensing*, onde são utilizados compostos que atrapalham ou reduzem a produção/transporte de moléculas regulatórias, peptídeos autoindutores (AIPs) nas bactérias gram-positivas e N-acil homoserina lactonas (AHLs) nas bactérias gram-negativas (Machado et al., 2020). Os inibidores de *Quorum sensing* (QSIs) possuem diferentes mecanismos de ação, como a inibição da síntese de moléculas sinalizadoras, degradação dessas moléculas por enzimas, competição com compostos pelos seus respectivos sítios receptores, e eliminação de AIPs e AHLs pelo uso de anticorpos ou macromoléculas como, por exemplo, as ciclodextrinas (CD) (Kalia et al., 2019). As ciclodextrinas (CDs) são capazes de formar complexos de inclusão com os sinalizadores de *Quorum sensing*, interceptando essas moléculas e, conseqüentemente, controlando a transcrição dos genes regulados pelo sistema. Estudos visando a aplicação dessas moléculas com este fim já foram relatados, onde as CDs foram imobilizadas em gel de éter de celulose apresentando a formação de complexos de inclusão com AHLs (Figura 3) controlando efetivamente a produção de

prodigiosina em *S. marcescens* (Kato et al., 2006), inibindo a transcrição de *rhIA*, diminuindo a síntese de piocianina, além de diminuir a produção da enzima β -galactosidase em *P. aeruginosa* (Kato et al., 2007). Derivados de CD também vêm sendo desenvolvidas, apresentando constantes de equilíbrio de ligação mais elevadas para a ligação com AHL do que as CDs sem modificações, tendo a inibição de QS melhorada evidenciada em *S. marcescens*, *C. violaceum* e *P. aeruginosa* (Morohoshi et al., 2013).

Figura 3: Diagrama esquemático de um possível mecanismo de formação dos complexos de inclusão entre AHLs e CDs.



Fonte: Morohoshi et al. (2013)

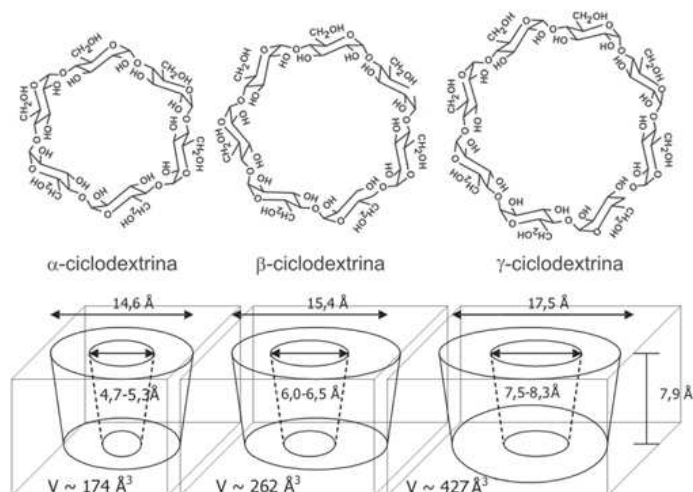
No setor clínico, o combate aos biofilmes se baseia na inibição da formação do biofilme e na erradicação/tratamento de biofilmes já formados. A formação do biofilme pode ser inibida através do bloqueio do crescimento bacteriano com o uso de compostos bactericidas e bacteriostáticos, inibição da adesão bacteriana a uma superfície ou por meio do bloqueio da comunicação celular após a adesão primária (Dufour et al., 2010). Para melhorar a eficiência dos tratamentos e antimicrobianos já existentes são desenvolvidas novas abordagens e compostos que podem atuar sinergicamente ou isoladamente sob os biofilmes. A gama de compostos utilizados é ampla, contemplando uma variedade de compostos inorgânicos e orgânicos, como iodo, prata, agentes quelantes de ferro, polímeros, enzimas, óleos essenciais, bacteriófagos e moléculas inibidoras do *Quorum sensing* (Zhao, 2017). Métodos físicos também podem ser empregados para aumentar a permeabilidade do biofilme, como o uso de ondas ultrassônicas (Caetano, 2018).

2.6 Nanotecnologia

Uma área em extenso desenvolvimento e de grande interesse científico atualmente é a nanotecnologia, que se baseia no desenvolvimento e uso de materiais e sistemas em nanoescala (1-1000 nm), possibilitando a manipulação de materiais em níveis atômico, molecular e macromolecular (Ramos et al., 2018). O uso dessa tecnologia vem ganhando cada vez mais destaque em diversas áreas devido a capacidade de alterar e conferir características a diversos tipos materiais, com vasto espectro de aplicação. As nanopartículas no campo biomédico ganham destaque com diversas aplicações e potenciais terapêuticos, a partir da combinação de materiais ou dispositivos com drogas e biomoléculas, agregando diversos benefícios como liberação lenta e controlada de drogas, maior eficiência de penetração em tecidos e até mesmo maior proteção contra a degradação de compostos (Lin et al., 2015). Recentemente, vários tipos de nanopartículas com propriedades antibacterianas e nanocarreadores usados na liberação e endereçamento de medicamentos têm mostrado potencial no tratamento de diversas doenças infecciosas (Ramos et al., 2018). Além disso o uso da nanotecnologia combinada com abordagens de terapia celular vem sendo estudadas e aplicadas para superar as limitações causadas pela terapêutica convencional (Ramos et al., 2018).

Dentre as diversas estratégias e compostos utilizados para produção de nanopartículas estão as ciclodextrinas (CD), uma família de oligossacarídeos cíclicos, descoberta por Villiers em 1891, a partir da digestão de amido com a bactéria *Bacillus amylobacter*. Elas possuem a capacidade de formar complexos de inclusão (CI) com uma variedade de substâncias que têm suas propriedades alteradas pela complexação. As CD são classificadas em alfa, beta ou gama de acordo com a quantidade de unidades de glicopiranosídeos presentes na sua estrutura, 6, 7 ou 8 unidades, respectivamente (Figura 4). Isso influencia no seu tamanho e conseqüentemente nas moléculas que elas suportam dentro de sua estrutura na formação dos complexos de inclusão (Venturini et al., 2008).

Figura 4: Estruturas das α - β - e γ - ciclodextrina.



Fonte: Venturini et al (2008)

Os derivados das ciclodextrinas são classificados nos grupos derivados hidrofílicos, hidrofóbicos ou ionizáveis, sendo essas modificações muito importantes para aumentar o espectro de aplicações. Isso possibilita seu uso no setor biomédico, em produtos industriais como ingredientes de fármacos, alimentos, cosméticos, em métodos analíticos, aplicações tecnológicas, ambientais, dentre diversas aplicações, contribuindo para uma produção anual de ciclodextrina superior a 10.000 toneladas métricas (De Oliveira-Filho et al., 2018; Matencio et al., 2020). Devido às suas interessantes e variadas aplicações, o número de publicações sobre ciclodextrinas vem aumentando a cada dia.

Estudos envolvendo CI formados entre a ciclodextrina e compostos com propriedades antioxidantes e antimicrobianas vêm ganhando destaque nas últimas décadas. O óleo essencial de folhas de goiaba (*Psidium guajava L.*) possui baixa estabilidade físico-química e baixa solubilidade em água. Para diminuir esses entraves que limitam a sua aplicação em formulações, o óleo essencial foi complexado com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD). A atividade antioxidante do óleo encapsulado foi mais estável à exposição à luz solar do que o óleo livre em 26-38% e a atividade antibacteriana do óleo teve um aumento de 4 vezes contra *Staphylococcus aureus* e 2 vezes contra *Escherichia coli* após a formação dos CI (Rakmai et al., 2018). Outro estudo envolvendo o CI entre a artemisinina (ART) e beta-ciclodextrina (β -CD) mostrou resultados antibacterianos satisfatórios contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA). O CI ART/ β -CDs apresentou 99,94% de taxa de inibição após 4 dias, a permeabilidade da membrana da MRSA foi aumentada pelos complexos e o metabolismo respiratório da bactéria foi inibido (Lin et al., 2018).

O potencial no tratamento de doenças infecciosas das CD também foi evidenciado em um estudo no qual complexos de inclusão foram usados no tratamento de pneumonia causada por *S. aureus*. O agente anti-inflamatório andrographolide (AG) extraído de uma erva tradicional chinesa (*Andrographis paniculata*) é ministrado via oral para o tratamento de infecções do trato respiratório, porém devido à sua baixa solubilidade e biodisponibilidade altas doses e terapia de longo prazo precisam ser aplicadas. O CI andrographolide- β -ciclodextrina (AG- β -CD) desenvolvido e utilizado no tratamento de pneumonia por inalação apresentou atividades antibacterianas e anti-inflamatórias muito superiores que o AG, por meio da regulação de respostas imunes, tornando-o um composto promissor no tratamento de pneumonia causada por *S. aureus* (Zhang et al., 2017). Outro estudo desenvolveu uma gaze funcionalizada utilizando HP- β -CD complexada com o antibiótico vancomicina e hamamelitanino (HAM), um inibidor de *Quorum sensing*, que inibiu a formação de biofilme de *S. aureus* com ou sem a presença de *Pseudomonas aeruginosa* (Brackman et al., 2016).

2.7 Indandionas e derivados

As indandionas são compostos que possuem um grupo metileno entre duas cetonas (β -dicetona), característica estrutural que favorece a síntese de compostos estruturalmente mais complexos (Souza, 2016). São sintetizados através da reação de condensação entre indan-1,3-diona e aldeídos aromáticos via condensação de Knoevenagel catalisada por zircônio (Oliveira et al., 2018). Suas propriedades antimicrobianas, antitumorais, anti-inflamatórias, antivirais, hepatoprotetora, herbicida, rodenticida, inseticida e antiparasitária já foram comprovadas (Jeyachandran e Ramesh, 2011; Meena et al., 2006). Derivados de indandionas foram inicialmente sintetizados em estudos focados na produção de anticoagulantes (Meena et al., 2006).

Uma classe importante com muitas aplicações em potencial derivada das indandionas são as 2-arilideno indan-1,3-dionas. Elas têm sido usadas como dispositivos eletroluminescentes, agentes de clarificação de lentes oculares, inibidores de urease e protease, agentes anticoagulantes, amenizam sintomas da diabetes, apresentam atividades antibacterianas (Alizadeh et al., 2020). Recentemente tiveram sua atividade antibiofilme identificada, inibindo até 65% a formação de biofilmes produzidos por *S. aureus* (Maia, 2019).

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alizadeh, A., Beiranvand, Z., Safaei, Z., Khodaei, M. M., & Repo, E. (2020). Green and fast synthesis of 2-arylidene-indan-1, 3-diones using a task-specific ionic liquid. *ACS Omega*, 5(44), 28632-28636. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03645>
- Alvarez-Ordóñez, A., Coughlan, L. M., Briandet, R., & Cotter, P. D. (2019). Biofilms in food processing environments: challenges and opportunities. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10, 173-195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>
- Ashelford, K. E., Day, M. J., & Fry, J. C. (2003). Elevated abundance of bacteriophage infecting bacteria in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 285–289. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.285-289.2003>
- Brackman, G., Garcia-Fernandez, M.J., Lenoir, J., De Meyer, L., Remon, J.P., De Beer, T., Concheiro, A., Alvarez-Lorenzo, C. and Coenye, T. (2016). Dressings loaded with cyclodextrin–hamamelitannin complexes increase *Staphylococcus aureus* susceptibility toward antibiotics both in single as well as in mixed biofilm communities. *Macromolecular Bioscience*, 16(6), 859-869. <https://doi.org/10.1002/mabi.201500437>
- Caetano A. C. L. (2018). Biofilmes e antimicrobianos. Dissertação de Doutorado, Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal.
- Chai, Y., Beauregard, P. B., Vlamakis, H., Losick, R., & Kolter, R. (2012). Galactose metabolism plays a crucial role in biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *MBio*, 3(4). <https://doi.org/10.1128/mBio.00184-12>
- CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement, M100-S22.
- de Oliveira-Filho, R. D., de Azevedo Moreira, R., & Nogueira, N. A. P. (2018). Biological activities and pharmacological applications of cyclodextrins complexed with essential oils and their volatile components: a systematic review. *Current Pharmaceutical Design*, 24(33), 3951-3963. <https://doi.org/10.2174/1381612824666181120093634>
- Dufour, D., Leung, V., & Lévesque, C. M. (2010). Bacterial biofilm: structure, function, and antimicrobial resistance. *Endodontic Topics*, 22(1), 2-16. <https://doi.org/10.1111/j.1601-1546.2012.00277.x>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Stoodley, P. (2005). Survival strategies of infectious biofilms. *Trends in Microbiology*, 13(1), 34-40. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2004.11.010>

- Galié, S., García-gutiérrez, C., Miguélez, E. M., Villar, C. J., Lombó, F., & Bonaventura, G. Di. (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. 9, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
- Goel, N., Fatima, S. W., Kumar, S., Sinha, R., & Khare, S. K. (2021). Antimicrobial resistance in biofilms: Exploring marine actinobacteria as a potential source of antibiotics and biofilm inhibitors. *Biotechnology Reports*, e00613. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2021.e00613>
- Hammer, B. K., & Bassler, B. L. (2003). Quorum sensing controls biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 50(1), 101–104. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03688.x>
- Harrell, J. E., Hahn, M. M., D'Souza, S. J., Vasicek, E. M., Sandala, J. L., Gunn, J. S., & McLachlan, J. B. (2021). *Salmonella* biofilm formation, chronic infection, and immunity within the intestine and hepatobiliary tract. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 910. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.624622>
- Jamal, M., Ahmad, W., Andleeb, S., Jalil, F., Imran, M., Nawaz, M. A., ... & Kamil, M. A. (2018). Bacterial biofilm and associated infections. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(1), 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>
- Jeyachandran, M., & Ramesh, P. (2011). Synthesis, antimicrobial, and anticoagulant activities of 2-(arylsulfonyl) indane-1, 3-diones. *Organic Chemistry International*. <https://doi.org/10.1155/2011/360810>
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451(7181), 990-993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Kalia, V. C., Patel, S. K., Kang, Y. C., & Lee, J. K. (2019). Quorum sensing inhibitors as antipathogens: biotechnological applications. *Biotechnology advances*, 37(1), 68-90. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.006>
- Kato, N., Morohoshi, T., Nozawa, T., Matsumoto, H., & Ikeda, T. (2006). Control of gram-negative bacterial quorum sensing with cyclodextrin immobilized cellulose ether gel. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 56(1-2), 55-59. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9060-y>
- Kato, N., Tanaka, T., Nakagawa, S., Morohoshi, T., Hiratani, K., & Ikeda, T. (2007). Control of virulence factor expression in opportunistic pathogens using cyclodextrin immobilized gel. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 57(1), 419-423. <https://doi.org/10.1007/s10847-006-9228-5>
- Klančnik, A., Šimunović, K., Sterniša, M., Ramić, D., Možina, S. S., & Bucar, F. (2021). Anti-adhesion activity of phytochemicals to prevent *Campylobacter jejuni* biofilm formation on abiotic surfaces. *Phytochemistry Reviews*, 20(1), 55-84. <https://doi.org/10.1007/s11101-020-09669-6>

- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1511–1524. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03525.x>
- Lin, L., Mao, X., Sun, Y., & Cui, H. (2018). Antibacterial mechanism of artemisinin/beta-cyclodextrins against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbial Pathogenesis*, 118, 66-73. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.03.014>
- Lin, T.C., Hung, K.H., Peng, C.H., Liu, J.H., Woung, L.C., Tsai, C.Y., Chen, S.J., Chen, Y.T. and Hsu, C.C. (2015). Nanotechnology-based drug delivery treatments and specific targeting therapy for age-related macular degeneration. *Journal of the Chinese Medical Association*, 78(11), 635-641. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2015.07.008>
- Machado, I., Silva, L. R., Giaouris, E. D., Melo, L. F., & Simões, M. (2020). Quorum sensing in food spoilage and natural-based strategies for its inhibition. *Food Research International*, 127, 108754. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108754>
- Maia, L. M. 2019. Potencial antimicrobiano e antivirulência de derivados de isobenzofuranonas, indandionas, ácido cinâmico e ácido de Meldrum. Monografia – Graduação em Biologia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, Brasil.
- Matencio, A., Navarro-Orcajada, S., García-Carmona, F., & López-Nicolás, J. M. (2020). Applications of cyclodextrins in food science. A review. *Trends in Food Science & Technology*. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.08.009>
- Meena, S.; Shankar, D.; Ramseshu, K. V.; Giles, D.; Prakash, M. S.; Venkataraman, S. (2006). Synthesis of 2-(aryl methylene)-(1H)-indane-1, 3-(2H)-diones as potential fungicidal and bactericidal agents. *Indian Journal of Chemistry*, 45, 1572-1575.
- Melchior, M. B., Vaarkamp, H., & Fink-Gremmels, J. (2006). Biofilms: A role in recurrent mastitis infections? *Veterinary Journal*, 171(3), 398–407. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2005.01.006>
- Morohoshi, T., Tokita, K., Ito, S., Saito, Y., Maeda, S., Kato, N., & Ikeda, T. (2013). Inhibition of quorum sensing in gram-negative bacteria by alkylamine-modified cyclodextrins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(2), 175-179. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.022>
- Moura, M. C., Napoleão, T. H., Paiva, P. M. G., & Coelho, L. C. B. B. (2017). Bacterial biofilms: the structure, development and potential of plant compounds for alternative control. *Advances in Medicine and Biology*, May, 1–34.
- Oliveira, A. L. A. 2016. Potencial antimicrobiano de isobenzofuranonas e indandionas. Monografia – Graduação em Bioquímica, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil

- Oliveira, A. F. C. D. S., de Souza, A. P. M., de Oliveira, A. S., da Silva, M. L., de Oliveira, F. M., Santos, E. G., ... & Leal, D. H. (2018). Zirconium catalyzed synthesis of 2-arylidene Indan-1, 3-diones and evaluation of their inhibitory activity against NS2B-NS3 WNV protease. *European journal of medicinal chemistry*, 149, 98-109. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.02.037>
- Oliveira, M. M. M. de, Brugnera, D. F., & Piccoli, R. H. (2010). Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. *Revista Do Instituto Adolfo Lutz*, 69(3), 277–284.
- Otto, M. (2013). Staphylococcal Infections: Mechanisms of biofilm Maturation and Detachment as critical Determinants of Pathogenicity. *Annual Review of Medicine*, 64(1), 175–188. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-042711-140023>
- Radhakrishnan, K.; Mohandass, P.; Sankaralingam, S.; Chandra, M. S. (2016). Synthesis and antimicrobial activity of 2-Benzylidene-1, 3 Indandiones: A structure-reactivity study. *Der Chemica Sinica*, 7, 1-7.
- Rakmai, J., Cheirsilp, B., Mejuto, J. C., Simal-Gándara, J., & Torrado-Agrasar, A. (2018). Antioxidant and antimicrobial properties of encapsulated guava leaf oil in hydroxypropyl-beta-cyclodextrin. *Industrial Crops and Products*, 111, 219-225. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.027>
- Ramos, M.A.D.S., Da Silva, P.B., Spósito, L., De Toledo, L.G., Bonifacio, B.V., Rodero, C.F., Dos Santos, K.C., Chorilli, M. and Bauab, T.M. (2018). Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 1179. <https://doi.org/10.2147/IJN.S146195>
- Sauer, K., & Rickard, A. H. (2007). *Biofilms and Biocomplexity*. <https://doi.org/10.1128/microbe.2.347.1>
- Sena, T. L. de. (2016). Biofilmes bacterianos: um desafio no agravamento de infecções primárias na corrente sanguínea em cateter venoso central.
- Shi, X., & Zhu, X. (2009). Biofilm formation and food safety in food industries. *Trends in Food Science & Technology*, 20(9), 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.01.054>
- Singh, A., Fatima, K., Srivastava, A., Khwaja, S., Priya, D., Singh, A., Mahajan, G., Alam, S., Saxena, A.K., Mondhe, D.M. and Luqman, S. (2016). Anticancer activity of gallic acid template-based benzylidene indanone derivative as microtubule destabilizer. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12805>
- Topka-Bielecka, G., Dydecka, A., Necel, A., Bloch, S., Nejman-Faleńczyk, B., Węgrzyn, G., & Węgrzyn, A. (2021). Bacteriophage-derived depolymerases against bacterial biofilm. *Antibiotics*, 10(2), 175. <https://doi.org/10.3390/antibiotics10020175>

- Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. (2016). Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80(1), 7-12. <https://doi.org/10.1080/09168451.2015.1058701>
- Trentin, D. D. S., Giordani, R. B., Zimmer, K. R., Da Silva, A. G., Da Silva, M. V., Correia, M. T. D. S., Baumvol, I. J. R., & MacEdo, A. J. (2011). Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(1), 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.030>
- Trentin, D. S., Silva, D. B., Amaral, M. W., Zimmer, K. R., Silva, M. V., Lopes, N. P., Giordani, R. B., & Macedo, A. J. (2013). Tannins Possessing Bacteriostatic Effect Impair *Pseudomonas aeruginosa* Adhesion and Biofilm Formation. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066257>
- Venturini, C. D. G., Nicolini, J., Machado, C., & Machado, V. G. (2008). Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Química Nova*, 31(2), 360-368. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000200032>
- Zhang, T., Zhu, L., Li, M., Hu, Y., Zhang, E., Jiang, Q., Han, G. and Jin, Y. (2017). Inhalable andrographolide- β -cyclodextrin inclusion complexes for treatment of *Staphylococcus aureus* pneumonia by regulating immune responses. *Molecular Pharmaceutics*, 14(5), 1718-1725. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.6b01162>
- Zhao, X. (2017). Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Advances*, 7(iii), 36670–36683. <https://doi.org/10.1039/C7RA02497E>

4.1. CAPÍTULO 1: 2-ARYLYDENE INDAN-1,3-DIONES PRESENT ANTI-BIOFILM ACTIVITY AGAINST BACTERIAL PATHOGENS

João Pedro Vianna Braga¹, Lucas Moreira Maia¹, Ana Paula Martins de Souza², Samira Soares Santiago,² Ananda Pereira Aguiar¹, Nicole Almeida de Oliveira¹, Róbson Ricardo Teixeira², Andréa de Oliveira Barros Ribon¹

¹ – Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais

² - Departamento de Química, Universidade Federal de Viçosa, 36570-900, Viçosa, Minas Gerais

Manuscrito formatado segundo as normas do Brazilian Journal of Microbiology

Abstract

Biofilms are a bacterial community attached to an inert or living surface and protected by a matrix of extracellular polymeric substances. This protection allows the growth and survival of bacteria in hostile environments and provides greater resistance and tolerance to antimicrobials and sanitizers. Because they develop on a variety of surfaces, biofilms have significant impacts in several areas, including healthcare and the industrial sector. Aiming at the development of strategies for the control and removal of bacterial biofilms, this work evaluated the ability of nineteen 2-arylidene indan-1,3-diones to affect the formation of biofilms and preformed biofilms on different bacteria. The minimum inhibitory concentration (MIC) of the compounds was higher than 160 µg/mL and antibiofilm assays were performed at a concentration of 100 µg/mL. The compounds that most inhibited biofilm formation were **Ap18** (2-(3,4-dimethoxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione) for *S. aureus* (66.2%), **Ap28** (2-(3-hydroxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione) for *S. epidermidis* (82.2%), **Ap3** (2-(4-nitrobenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione) for *E. coli* (54.3%), and **Ap25** (2-(3-hydroxy-4-methoxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione) for *P. aeruginosa* (70.8%). After 6 hours, **Ap18** disrupted the preformed biofilm of *E. coli* by 53.5% but had weak activity on the preformed biofilms of the other bacteria. Cell viability assays showed low toxicity of compounds **Ap8**, **Ap24** (2-(4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione), and **Ap27** (2-(2-hydroxybenzylidene)-1*H*-indene-1,3(2*H*)-dione). This is the first work that demonstrated the antibiofilm activity of 2-arylidene

indan-1,3-diones. The results can be explored to support the synthesis of more effective and less cytotoxic compounds.

Keywords: antibiofilm activity, bacterial biofilms, indan-1,3-diones, 2-arylidene indan-1,3-diones.

Introduction

Bacterial biofilms are a bacterial community attached to an inert or living surface, protected by a matrix of extracellular polymeric substances (EPSs), which can be composed of polysaccharides, proteins, lipids, and extracellular DNA [1]. This protection allows the growth and survival of bacteria in hostile environments and confers greater resistance and tolerance to antimicrobials and sanitizers [2]. Because they develop on a variety of surfaces, biofilms have significant impacts in many areas. According to the National Institute of Health, 80% of chronic infections worldwide are associated with biofilm formation [3]. Although acute infections are mostly caused by microorganisms in their planktonic forms, the bacterial biofilm promotes the formation of a cohesive and strong community of cells that confers chronicity to many bacterial infections, since it acts as a mechanical barrier to the penetration of antibiotics [4,5]. In the industrial sector, biofilms impact not only machine lifespan but also public health [6] since many biofilm-forming bacterial species are also human pathogens [1,7].

Antivirulence therapy is a strong ally in the development of strategies capable of reducing biofilm production due to interference with the composition of the EPS matrix [8,9] or to disruption of the expression of genes related to cell communication, a key mechanism in biofilm formation [10]. *Galleria mellonella* larvae infected with *P. aeruginosa* had a 53% increase in survival rate when treated with 2-sulfonylpyrimidine derivatives, a compound effective in reducing pyocyanin and pyoverdine, important virulence factors that promote the biofilm of this bacterium [11]. The compound Maipomycin A isolated from metabolites of actinomycetes *Kibdelosporangium phytohabitans* XY-R10 inhibited the formation of biofilms of *Acinetobacter baumannii* and *P. aeruginosa* in a dose-dependent manner, and synergistically increased the action of the antibiotic colistin against *A. baumannii* [12]. These studies show the potential of the antivirulence strategy that must be improved for use in antimicrobial therapies or to increase the efficiency of industrial cleaning and disinfection processes.

The synthesis of chemical compounds generates a vast collection of molecules in combinatorial libraries, which provides access to several classes that are often found in nature. For this, processes are developed for the construction of molecules in a rationalized way, such as the combined or random synthesis of new molecules, the synthesis based on other pre-existing molecules and the evaluation of the activity-structure relationship [13,14]. With this approach, purification steps are not required to increase the range of reactions [15]. The indan-1,3-dione and its derivatives are useful building blocks in organic synthesis for the preparation of a variety of aromatic and heteroaromatic compounds [16]. In addition, these compounds present important biological activities, including antibacterial [17]. Our research group has been interested in the biological activities of indan-1,3-dione derivatives. Recently, we reported the preparation of 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives via zirconium catalyzed Knoevenagel condensation. It was demonstrated that these derivatives present important antiviral, cytotoxic, and leishmanicidal activities [18]. Here we report the results of our investigation regarding the evaluation of antibacterial and antibiofilm activities of 2-arylidene indan-1,3-diones.

Material and Methods

Synthesis of 2-arylidene indan-1,3-diones

The nineteen compounds biologically evaluated in the present investigation were synthesized and fully characterized as previously described [18].

Microorganisms and cultivation conditions

The Gram-positive strains *Staphylococcus aureus* NRS 155, *S. epidermidis* NRS 101, *S. aureus* 2878 isolated from cow suffering from bovine mastitis, and the methicillin-resistant pandemic clone *S. aureus* USA 300 (MRSA), and the Gram-negatives *Escherichia coli* ATCC 29214, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Pseudomonas fluorescens* 07A isolated from refrigerated raw milk were used in this study. Mueller-Hinton (MH) broth was used to determine minimal inhibitory concentration (MIC) of the compounds. The biological assays to evaluate the effect of 2-arylidene indan-1,3-diones on bacterial biofilms were conducted in Tryptic Soy broth

(TSB) for *E. coli* and Brain-Heart Infusion (BHI) broth supplemented with 0.25% m/v glucose for the other bacteria. Bacterial inocula were prepared from colonies previously grown on Luria-Bertani (LB) agar medium at 37 °C for 24 h. Culture stocks were maintained in 1 mL BHI broth containing 20% v/v glycerol at -20 °C.

Determination of MIC

The susceptibility of the bacterial strains to the compounds was determined according to the broth microdilution assay according to the Clinical & Laboratory Standard Institute [19]. A bacterial suspension was adjusted to 0.5 McFarland turbidity and compounds were tested at concentrations between 0.008 and 160 µg/mL. The negative control consisted of bacteria grown in MH containing dimethyl sulfoxide (DMSO, Synth) while gentamycin sulfate (Sigma-Aldrich, San Louis, Missouri, USA) was used as the positive control. Microplates were incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was defined as the lowest concentration of the compound that visually inhibited bacterial growth. To confirm bacterial growth, 5 µL of iodinitrotetrazolium (INT, Sigma-Aldrich) were added to the wells in which the compounds caused the turbidity of the medium. The tests were conducted in three biological replicates.

Growth curve

Growth curves were performed in 96-well microplates using inocula prepared at 0.5 on the McFarland scale. The wells consisted of bacterial suspension 1×10^4 CFU/mL, 100 µg/mL of 2-arylidene derivative under evaluation, and MH medium to a final volume of 200 µL. The microplate was incubated for 24 h at 37 °C and read at 600 nm in a spectrophotometer (VersaMax ELISA Microplate Reader) every 2 h. The experiment was carried out in triplicate.

Antibiofilm activity of compounds

The antibiofilm assay was performed in 96-well microplates by the crystal violet method according to Fabres-Klein [20], with modifications. Thus, 100 µL of bacterial suspension 1×10^6 CFU/mL, BHI broth with 0.25% m/v glucose (BHlg) or TSB, depending on the bacteria and the compound under evaluation, were added to each well, at a final concentration of 100, 75, or 50 µg/mL. After incubation at 37 °C for 24 h (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*) or 48 h with medium change

after 24 h (*E. coli*), all the supernatant was removed and the wells were gently washed three times with PBS (pH 7.6), followed by staining with 0.1% m/v crystal violet for 30 min and addition of 95% v/v ethanol for 30 min. The plate was read in a spectrophotometer at 560 nm (VersaMax ELISA Microplate Reader, California, USA). The wells incubated with BHIg/TSB and bacteria alone were used as positive controls. The experiments were carried out in triplicate.

Preformed biofilm assays were conducted by adding 1×10^6 CFU/mL of bacterial suspension, BHI broth with 0.25% m/v glucose (BHIg) or TSB to each well of the 96-well microplate, in a final volume of 100 μ L. After incubation at 37 °C for 24 h (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*) or 48 h (*E. coli*), all the supernatant was gently removed and 200 μ L of BHIg or TSB and 100 μ g/mL of compound. The microplates were incubated at 37 °C for 6 h before the supernatant was removed and the wells were washed and stained as described above. The experiments were carried out in triplicate. The percentage of biofilm inhibition was calculated according to the formula:

$$\% \text{ Inhibition} = 100 - \left(\frac{560 \text{ nm of Biofilm with Compound} \times 100}{560 \text{ nm of Biofilm without Compound}} \right)$$

Cytotoxicity

The cytotoxic effect of compounds **Ap8**, **Ap18**, **Ap24**, **Ap25**, **Ap27**, and **Ap28** on VERO cells was evaluated by the colorimetric assay with MTT (Mosmann, 1983). A suspension of VERO cells, containing approximately 2.5×10^4 cells/mL, was distributed into a 96-well microplate (100 μ L/well). The plate was incubated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After 24 h, with the cell monolayer confluent, 100 μ L of the concentrations of the compounds diluted in RPMI medium (400, 200, 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 μ g/mL) were added. The plate was incubated for 48 h at 37 °C and 5% CO₂. The medium was then removed and 10 μ L of MTT (5 mg/mL) was added, and incubated again for 4 h. The medium with MTT was removed and replaced with 100 μ L of DMSO, the plate was shaken for 10 min before reading of absorbance at 540 nm was performed in a spectrophotometer. Cell viability was calculated using the absorbances of the monolayers treated with the compounds, compared to the cell control (DMSO at the concentration of each dilution) using the following equation:

$$\% \text{ Cell viability} = \left(\left(\frac{\text{540 nm of the compound}}{\text{540 nm control with DMSO}} \right) \times 100 \right)$$

Statistical analysis

The means of the technical replicates in each biological replicate were compared in relation to the mean value of the controls, which represented 100% of the biofilm formation. Data from this difference were plotted in the GraphPad Prism software (v.6) and evaluated by *one-way* analysis of variance (ANOVA) between treatments and controls. Values of $p < 0.05$ were considered significant by Dunnett's test.

Results

The 2-arylidene indan-1,3-diones were prepared via zirconium catalyzed Knoevenagel condensation between indan-1,3-dione and different aldehydes as previously described [18]. Nineteen indan-1,3-dione derivatives (Fig. 1) were prepared and obtained with yields ranging from 53.0% - 95.0%. All compounds showed MIC higher than 160 $\mu\text{g/mL}$ on the bacteria tested in this work.

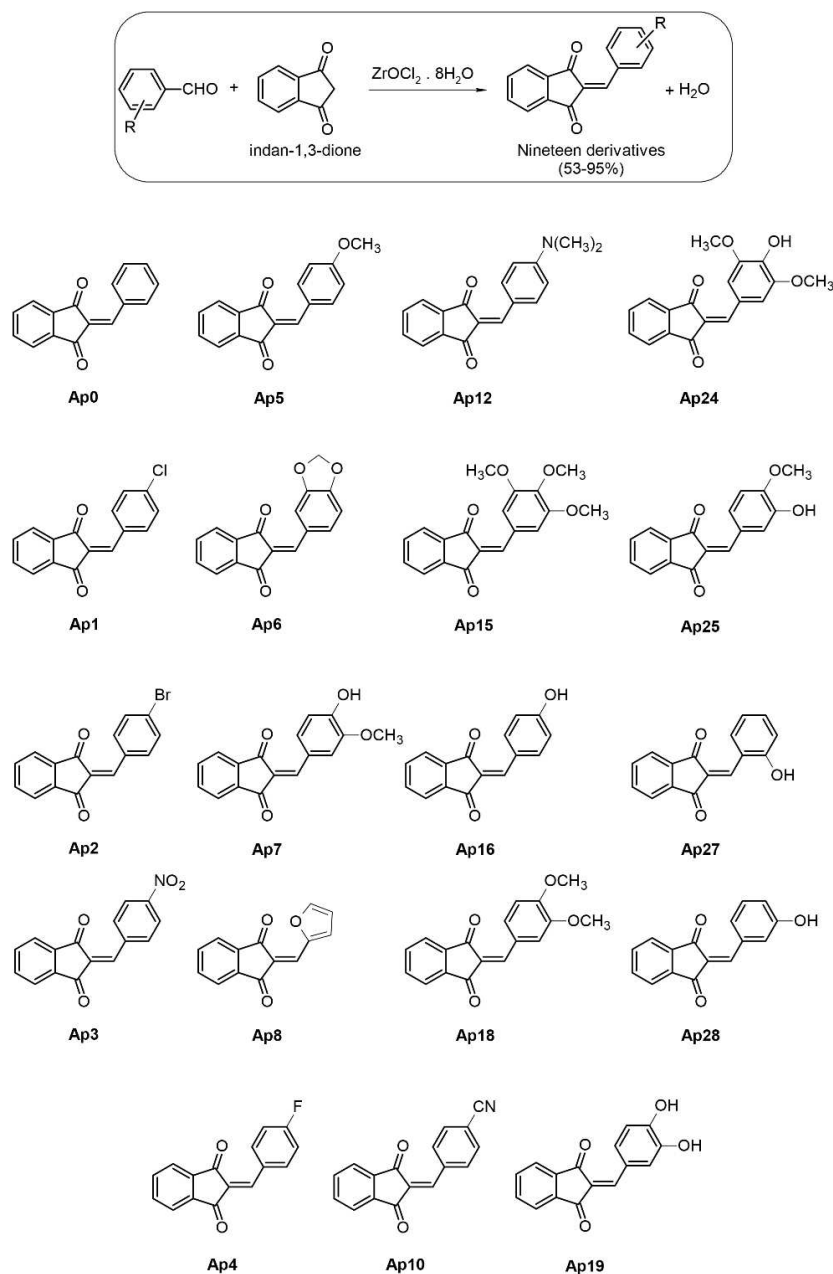


Fig. 1: Preparation of indan-1,3-dione derivatives evaluated in this study

Initially, the antibiofilm activity of the compounds was evaluated at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 2). The biofilm of *S. epidermidis* NRS101, a high biofilm producer, was the most impacted by the tested compounds and the biofilm was reduced by more than 50.0% by eleven compounds. It stands out **Ap25** and **Ap28** whose inhibition reached 81.0% and 82.2%, respectively. Nine compounds (**Ap4**, **Ap5**, **Ap8**, **Ap10**, **Ap16**, **Ap18**, **Ap24**, **Ap25**, and **Ap28**) inhibited the *P. aeruginosa* biofilm by more than 50%. The compounds **Ap0**, **Ap8**, **Ap18**, **Ap25**, and **Ap27** were the ones that showed the highest activity on the *S. aureus* biofilm, also a strong biofilm producer.

Most of the compounds did not show significant activity on the *E. coli* biofilm, and only **Ap3** displayed inhibition higher than 50.0%. The compounds **Ap8**, **Ap18**, **Ap24**, **Ap25**, **Ap27**, and **Ap28** were the derivatives with the best results of inhibition of biofilm formation, showing percentages greater than 50.0% on at least two bacteria. These compounds were tested on had *S. aureus* 2878, *S. aureus* USA300 and *P. fluorescens* 07A (Fig. 3). Compounds **Ap8** and **Ap18** reduced *S. aureus* 2878 biofilm formation by 47.1% and 32.4%, respectively. For the other bacteria, the compounds were not able to reduce biofilm formation in values greater than 21.0%.

The activity of the compounds was also evaluated on the preformed biofilm. After 6 h, compounds **Ap18** and **Ap12** disrupted the preformed biofilms of *E. coli* and *P. aeruginosa* by 53.5% and 23.4%, respectively. However, the 2-arylidene indan-1,3-diones had weak activity on preformed biofilms of *S. aureus* and *S. epidermidis* (Fig. 4, Fig. 5). Bacteria were also cultured in the presence of 100 µg/mL of the compounds that had better activity (**Ap8**, **Ap18**, **Ap24**, **Ap25**, **Ap27**, and **Ap28**) to assess their impact on bacterial growth. However, none of them significantly affected growth at the tested concentrations (Fig. 6).

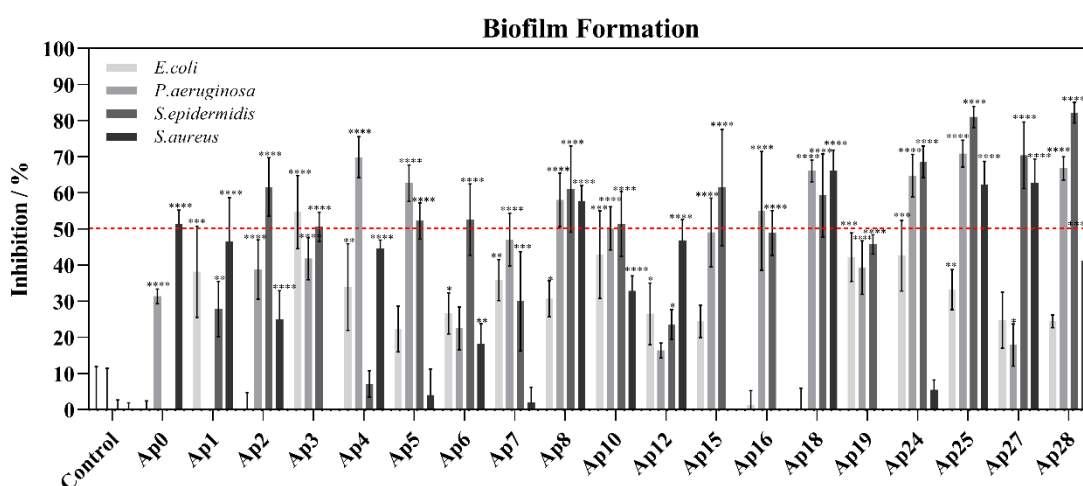


Fig. 2: Activity of 2-arylidene indan-1,3-diones on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* NRS 155, *Staphylococcus epidermidis* NRS 101, *Escherichia coli* ATCC 35218, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. The compounds were evaluated at 100 µg/mL and the inhibition of biofilm was verified by the crystal violet method. Differences between controls and compounds were considered significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) by Dunnett's Test.

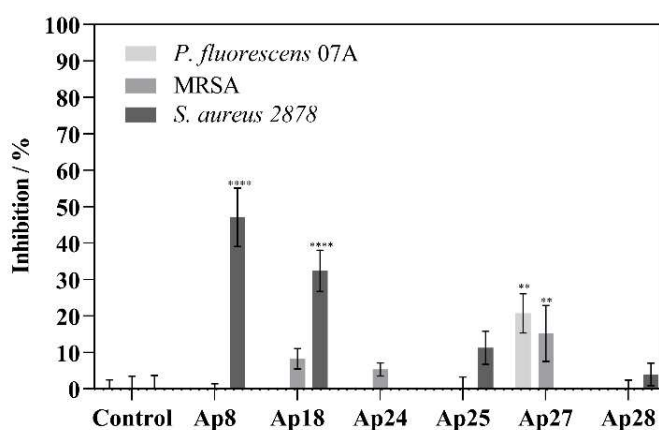


Fig. 3: Activity of six selected 2-arylidene indan-1,3-diones on biofilm formation by *S. aureus* 2878, *S. aureus* USA300 (MRSA) and *P. fluorescens* 07A. The compounds were evaluated at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the amount of biofilm was verified by the crystal violet method. Differences between controls and compounds were considered significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) by Dunnett's Test.

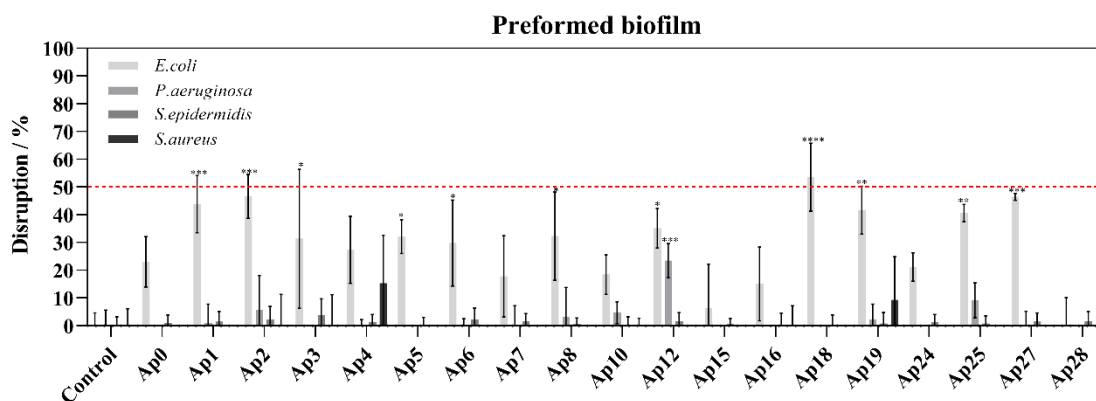


Fig. 4: Activity of 2-arylidene indan-1,3-diones after 6 hours of exposure to the preformed biofilms by *Staphylococcus aureus* NRS 155, *Staphylococcus epidermidis* NRS 101, *Escherichia coli* ATCC 35218, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. Compounds were evaluated at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and the biofilm disruption was verified by the crystal violet method. Differences between controls and compounds were considered significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) by Dunnett's Test.

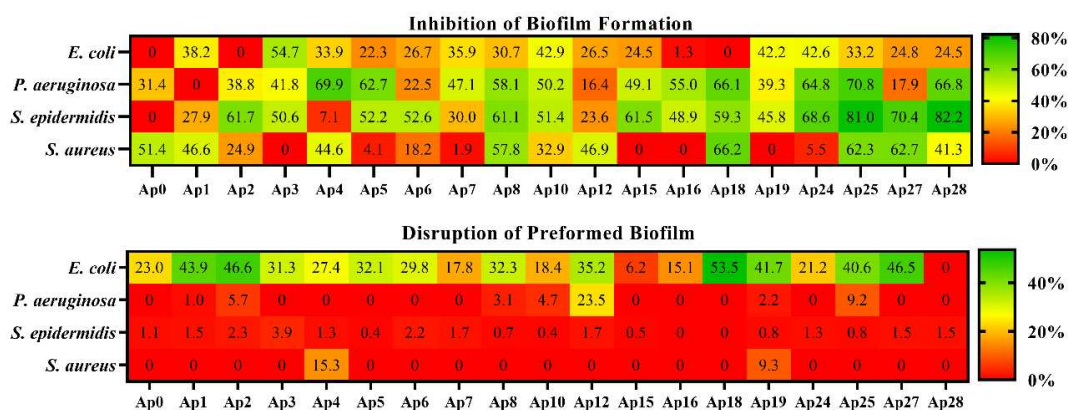


Fig. 5: Activity of 2-arylidene indan-1,3-diones on biofilm formation and disruption of preformed biofilms by *Staphylococcus aureus* NRS 155, *Staphylococcus epidermidis* NRS 101, *Escherichia coli* ATCC 35218, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

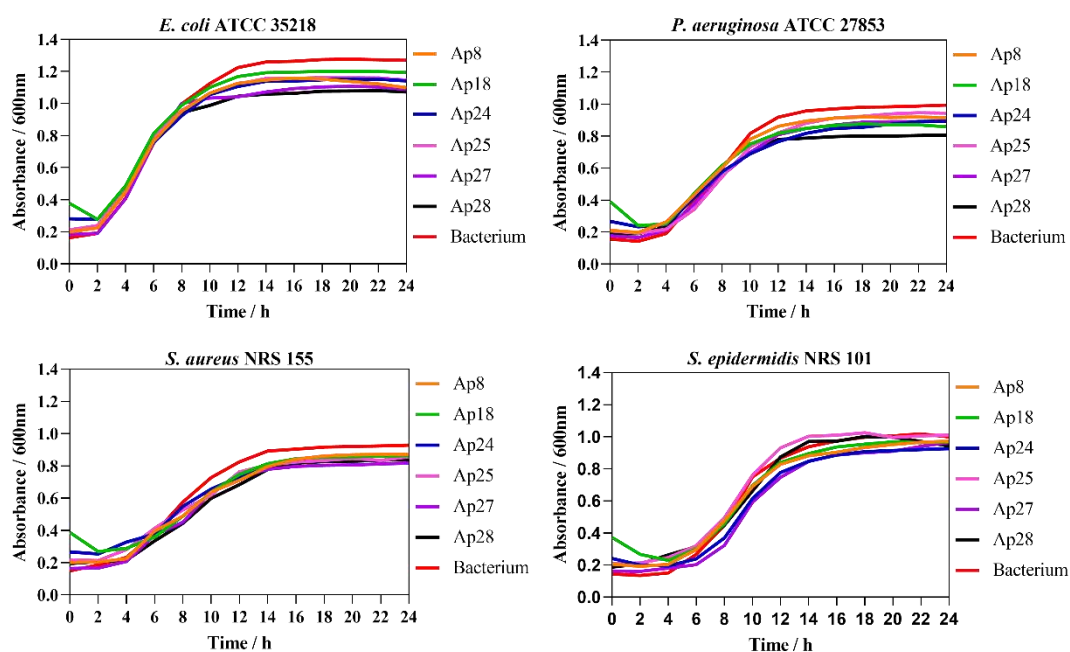


Fig. 6: Growth curves evaluating the effect of compounds **Ap8**, **Ap18**, **Ap24**, **Ap25**, **Ap27**, and **Ap28** at 100 $\mu\text{g/mL}$ on the growth of *Staphylococcus aureus* NRS 155, *Staphylococcus epidermidis* NRS 101, *Escherichia coli* ATCC 35218, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Considering the good activity of the compounds **Ap8**, **Ap18**, **Ap24**, **Ap25**, **Ap27**, and **Ap28** on the inhibition of bacterial biofilm, we decided to evaluate their cytotoxicity on VERO cells. Compounds **Ap8** and **Ap27** had little effect on cell growth even at high concentrations, while **Ap18** and **Ap28** decreased cell viability by approximately 80.0% at a concentration of 100 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 7). The derivative **Ap25** showed intermediate toxicity among the tested compounds. The **Ap24** showed no effect on viability when tested up to 50 $\mu\text{g/mL}$. However, the cytotoxicity of this compound could not be evaluated at higher concentrations values due to its red color. Considering the results of the cytotoxicity assay, the biofilm formation assays were repeated using these compounds at concentrations of 50 or 75 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 8). In general, the compounds at concentrations of 50 and 75 $\mu\text{g/mL}$ showed lower antibiofilm activities in relation to the activity of the derivatives at 100 $\mu\text{g/mL}$.

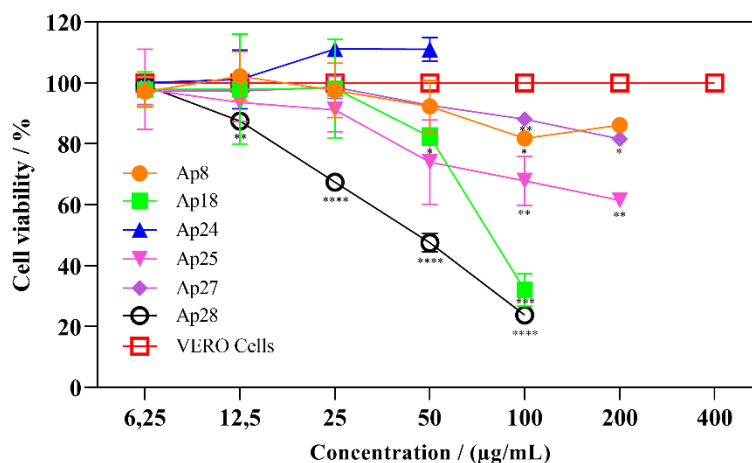


Fig. 7: Cytotoxicity of compounds **Ap8**, **Ap18**, **Ap24**, **Ap25**, **Ap27**, and **Ap28** on VERO cells expressed by the percentage of cell viability. The cells were cultured for 48 h in the presence of the different compounds and the cytotoxic effect was evaluated by the MTT colorimetric method. Differences between controls and compounds were considered significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) by Dunnett's Test.

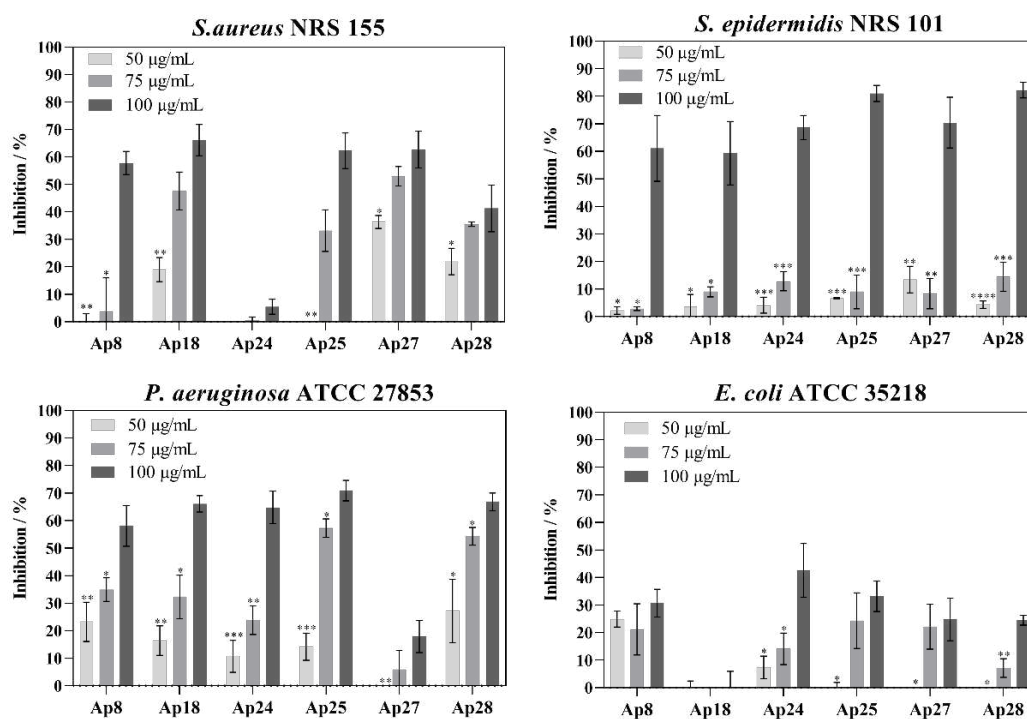


Fig. 8: Comparison of the activity of the six selected 2-arylidene indan-1,3-diones on biofilm formation by *S. aureus* NRS 155, *S. epidermidis* NRS 101, *E. coli* ATCC 35218 and *P. aeruginosa* ATCC 27853. The compounds were used at concentrations of 50, 75, and 100 µg/mL and the amount of biofilm was verified by the crystal violet method. The percentages of inhibition of compounds at concentrations of 50 and 75 µg/mL were compared with those at 100 µg/mL. The differences between controls (100 µg/mL) and compounds (50 and 75 µg/mL) were considered significant when $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) by Dunnett's Test.

Discussion

The 1,3-indandiones are bicyclic aromatic β -diketone compounds. This structure has advantages for organic synthesis, as it favors the preparation of structurally more complex compounds. Derivatives of indandiones were initially synthesized for the production of anticoagulants [20] and soon showed several applications in the field of medicinal chemistry, due to their antitumor, anti-inflammatory, anti-alzheimer, antiviral, antimicrobial, anticoagulant, rodenticide and antiparasitic activities [21,22]. In this work, the activity of indandiones on biofilms of important hospital and food pathogens was confirmed for the first time.

The compounds evaluated in this work showed weak antibacterial activity (MIC > 160 µg/mL) compared to those synthesized by Jeyachandran and Ramesh [23] which had strong activity (MIC 6-9 µg/mL) probably due to differences in nature, position, and volume of the substituents present in the compounds. These factors are known to be fundamental to the pharmacological potential of compounds, as they influence the binding to receptors or the lipophilicity of the substances [24,25]. Compounds with halogen substituents are generally described in the literature with greater antimicrobial potential due to their ability to withdraw electrons [26,27]. A correlation between halogen substituents and effect on Gram-positive bacteria such as *S. aureus* has already been demonstrated [27,28]. It is also known that the presence of halogen groups significantly increases activity against wild and resistant strains of *S. aureus* [29]. However, contrary to what was observed in the aforementioned studies, the compounds with halogen substituents (**Ap1**, **Ap2** and **Ap4**) tested in this work did not show antibacterial activity, which shows that other characteristics of the derivatives must be considered in the design of active compounds.

Among the 2-arylidene indan-1,3-diones herein evaluated, six of them presented a significant reduction in the biofilm formation of at least two bacteria. With the exception of **Ap8**, which has a furan group, the compounds **Ap18**, **Ap24**, **Ap25**, **Ap27** and **Ap28** have a methoxy group, a hydroxyl group, or both attached to the aromatic ring of the arylidene portion of the indan-1,3-dione derivatives, indicating a putative importance of these groups in these positions or their combination for antibiofilm activity. It is noteworthy that this happened without affecting bacterial growth, an advantage that is often associated with the non-development of resistance by the pathogen [30].

The compounds evaluated in this study had little or no activity on preformed biofilms of *S. aureus*, *S. epidermidis* and *P. aeruginosa*. However, for *E. coli*, the compounds dissolved the preformed biofilm by up to 53.5%. Studies evaluating the penetration of antibiotics into preformed biofilms have shown that the size of the compound affects the effectiveness of therapy. In general, smaller compounds have better penetration into the inner layers of the biofilm [31,32]. It is also known that neutral and anionic molecules are not able to penetrate biofilms, while cationic molecules have a greater ability to penetrate the biofilm structure [33]. Additionally, hydrophobic cationic molecules are more homogeneously distributed throughout the biofilm compared to hydrophilic cationic counterparts [33].

The activity of indan-1,3-diones on mammalian cells varies depending on the compound [34,35]. Compounds **Ap18** and **Ap28** displayed high toxicity at the concentration that best inhibited biofilm formation, while the other compounds affected less the metabolism of VERO cells. In particular, **Ap8** is a promising compound due to its high antibiofilm activity against *P. aeruginosa* and the Gram-positives tested and low toxicity on eukaryotic cells. Derivative **Ap27** also impacted the biofilm formation of *S. aureus* USA300, a highly pathogenic clone associated with intractable skin infections, although with lower activity compared to the reference strain *S. aureus* NRS155.

In summary, this was the first report to demonstrate the antibiofilm activity of 2-arylidene indan-1,3-dione derivatives. The results can be exploited to support the synthesis of more effective and less cytotoxic compounds. One possibility for increasing antibiofilm activity is through the association and/or production of cationic nanoparticles. Nanotechnology has shown promise in the development of antibiofilm strategies by associating natural or synthetic compounds with nanoparticles, either through nanoemulsions, encapsulation or surface functionalization. This can enhance the penetration of compounds in biofilms, make it difficult for bacteria to adhere to surfaces and reduce the toxicity of indandiones derivatives, contributing to their biotechnological application.

References

- [1] Zhao X, Zhao F, Wang J, Zhong N (2017). Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. RSC adv, 7(58), 36670-36683. <https://doi.org/10.1039/C7RA02497E>
- [2] Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice S A, Kjelleberg S (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. Nat Rev Microbiol, 14(9), 563. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- [3] Jamal M, Ahmad W, Andleeb S, Jalil F, Imran M, Nawaz M.A, Kamil MA (2018). Bacterial biofilm and associated infections. J Chin Med Assoc, 81: 7-11. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.07.012>

- [4] Penesyanyan A, Gillings M, Paulsen IT (2015). Antibiotic discovery: combatting bacterial resistance in cells and in biofilm communities. *Molecules*, 20: 5286-5298. <https://doi.org/10.3390/molecules20045286>
- [5] Harrell JE, Hahn MM, D'Souza SJ, Vasicek EM, Sandala JL, Gunn JS, McLachlan JB (2021). *Salmonella* biofilm formation, chronic infection, and immunity within the intestine and hepatobiliary tract. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 910. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.624622>
- [6] Alvarez-Ordóñez A, Coughlan LM, Briandet R, Cotter PD (2019). Biofilms in food processing environments: challenges and opportunities. *Annu Rev Food Sci Technol*, 10, 173-195. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032818-121805>
- [7] Galié S, García-gutiérrez C, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F, Bonaventura GD (2018). Biofilms in the Food Industry: Health Aspects and Control Methods. *Front Microbiol*, 9, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00898>
- [8] Dellalibera-Joviliano R, Melo SA, Ceni HD MR (2020). Alternativas terapêuticas e aplicação de bacteriófagos como estratégia no uso de antibióticos no tratamento de doenças bacterianas. *Rev Med*, 99(1), 88-95. <https://doi.org/10.11606/issn.1679-9836.v99i1p88-95>
- [9] Vidal FR (2020). Impacto da formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina na área da saúde humana. Completion of Specialization Course Work, Federal University of Rio Grande do Sul
- [10] El-Hamid A, Marwa I, El-Naenaeey ES, Hegazy WA, Mosbah RA, Nassar MS, Bendary MM (2020). Promising antibiofilm agents: Recent breakthrough against biofilm producing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antibiotics*, 9(10), 667. <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050210>

- [11] Thomann M, Reckermann K, Reusch D, Prasser J, Tejada ML (2016). Fc-galactosylation modulates antibody-dependent cellular cytotoxicity of therapeutic antibodies. *Mol Immunol*, 73, 69-75. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2016.03.002>
- [12] Zhang J, Liang X, Zhang S, Song Z, Wang C, Xu Y (2021). Maipomycin A, a novel natural compound with promising anti-biofilm activity against gram-negative pathogenic bacteria. *Front Microbiol*, 11, 3480. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.598024>
- [13] Fischbach MA, Walsh CT (2009). Antibiotics for emerging pathogens. *Science*, 325(5944), 1089-1093. <https://doi.org/10.1126/science.1176667>
- [14] Martelli G, Giacomini D (2018). Antibacterial and antioxidant activities for natural and synthetic dual-active compounds. *Eur J Med Chem*, 158, 91-105. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.09.009>
- [15] Bérdy J (2012). Thoughts and facts about antibiotics: where we are now and where we are heading. *J Antibiot*, 65(8), 385-395. <https://doi.org/10.1038/ja.2012.27>
- [16] Singh A, Fatima K, Srivastav, A, Khwaja S, Priya D, Singh A, Mahajan G, Alam S, Saxena AK, Mondhe DM, Luqman S (2016). Anticancer activity of gallic acid template-based benzylidene indanone derivative as microtubule destabilizer. *Chem Biol Drug Des*, 88(5), 625-634. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12805>
- [17] Sahu S, Saraf S, Kaur CD, Saraf S (2013). Biocompatible Nanoparticles for Sustained Topical Delivery of Anticancer Phytoconstituent Quercetin. *Pak J Biol Sci*, 16, 601-609. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2013.601.609>
- [18] Souza APM, Costa MCA, Aguiar AR, Bressan GC, De Almeida LGD, Lima WP, Borsodi MPG, Bergmann BR, Ferreira MMC, Teixeira RR (2021). Leishmanicidal and cytotoxic activities and 4D-QSAR of 2-arylidene indan-1,3-diones. *Arch Pharm (Weinheim)*, 354(10): e2100081. <https://doi: 10.1002/ardp.202100081>.

[19] CLSI—Clinical and Laboratory Standards Institute. (2012). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-Second Informational Supplement, M100-S22.

[20] Fabres-Klein MH; Santos MJC, Klein RC, De Souza GN, Ribon AOB (2015). An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. BMC Vet Res, 11: 3. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0319-7>

[21] Meena S, Shankar D, Ramseshu KV, Giles D, Prakash MS, Venkataraman S (2006). Synthesis of 2-(aryl methylene)-(1H)-indane-1, 3-(2H)-diones as potential fungicidal and bactericidal agents. Indian J Chem, 45B: 1572-1575. <https://doi.org/10.1002/chin.200640094>

[22] Alizadeh A, Beiranvand Z, Safaei Z, Khodaei MM, Repo E (2020). Green and fast synthesis of 2-arylidene-indan-1, 3-diones using a task-specific ionic liquid. ACS Omega, 5(44) 28632-28636. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03645>

[23] Jeyachandran M, Ramesh P (2011). Synthesis, antimicrobial, and anticoagulant activities of 2-(arylsulfonyl) indane-1, 3-diones. J Org Chem, 2011. <https://doi.org/10.1155/2011/360810>

[24] Plech, T, Wujec M, Kosikowska U, Malm A (2012). Halogen substituents as an effective modulators of antibacterial activity of substituted 1, 2, 4-triazole-3-thiones. Lett Drug Des Disco, 9(10), 947-952. <https://doi.org/10.2174/157018012804586987>

[25] Radhakrishnan K, Mohandass P, Sankaralingam S, Chandra MS (2016). Synthesis and antimicrobial activity of 2-Benzylidene-1, 3 Indandiones: A structure-reactivity study. https://www.researchgate.net/publication/312894255_Synthesis_and_Antimicr

obial_Activity_of_2-Benzylidene-13_Indandiones_A_Structure-Reactivity_Study.

Accessed 09 March 2022

[26] Paiva RK, Silva JF, Moreira HA, Pinto OG, Camargo LT, Naves PL, Camargo AJ, Ribeiro L, Ramos LM (2019). Synthesis, Antimicrobial Activity and Structure-Activity Relationship of Some 5-Arylidene-thiazolidine-2, 4-dione Derivatives. *J Braz Chem Soc*, 30(1), 164-172. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20180167>

[27] Sharshira EM, Hamada NMM, (2012). Synthesis, characterization and antimicrobial activities of some thiazole derivatives. *Am. J. Org. Chem*, 2(3), pp.69-73. <https://doi.org/10.5923/j.ajoc.20120203.06>

[28] Smart BE (2001). Fluorine substituent effects (on bioactivity). *J Fluor Chem*, 109(1), 3-11. [https://doi.org/10.1016/S0022-1139\(01\)00375-X](https://doi.org/10.1016/S0022-1139(01)00375-X)

[29] Molchanova N, Nielsen JE, Sørensen KB, Prabhala BK, Hansen PR, Lund R, Barron AE, Jenssen H (2020). Halogenation as a tool to tune antimicrobial activity of peptoids. *Sci Rep*, 10(1), 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71771-8>

[30] Dey P, Puppala ER, Naidu VGM, Das G, Ramesh A (2020). Multifunctional Synthetic Amphiphile for Niche Therapeutic Applications: Mitigation of MRSA Biofilms and Potential in Wound Healing. *ACS Appl Bio Mater*, 3(12), 8830-8840. <https://doi.org/10.1021/acsbm.0c01164>

[31] Monzón M, Oteiza C, Leiva J, Amorena B (2001). Synergy of different antibiotic combinations in biofilms of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother*, 48(6), 793-801. <https://doi.org/10.1093/jac/48.6.793>

[32] Monzón M, Oteiza C, Leiva J, Lamata M, Amorena B (2002). Biofilm testing of *Staphylococcus epidermidis* clinical isolates: low performance of vancomycin in relation to other antibiotics. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 44(4), 319-324. [https://doi.org/10.1016/S0732-8893\(02\)00464-9](https://doi.org/10.1016/S0732-8893(02)00464-9)

[33] Li X, Yeh YC, Giri K, Mout R, Landis RF, Prakash YS, Rotello VM (2015). Control of nanoparticle penetration into biofilms through surface design. *Chem Comm*, 51(2), 282-285. <https://doi.org/10.1039/c4cc07737g>

[34] Carlete, LC, (2017). Síntese de 2-arilideno indan-1,3-dionas Contendo Porções Triazólicas e Avaliação de suas Atividades Citotóxica e Fotoprotetora. Master's thesis, Federal University of Viçosa

[35] Oliveira AFCDS, (2017). Avaliação do Efeito Inibitório de Análogos da indan-1,3-diona Contra a Protease do Vírus West Nile e Antiviral Contra os Vírus Dengue e Zika. Doctoral thesis, Federal University of Viçosa

Acknowledgements

The authors are thankful to Federal University of Viçosa (UFV) for providing the laboratory facilities, CAPES, CNPq, and FAPEMIG for financial support during this research and Network of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus* (NARSA) for providing the bacteria *Staphylococcus aureus* NRS155 and *S. epidermidis* NRS101.

Funding

The research project was funded by CAPES, CNPq, and FAPEMIG. Braga JPV was supported by a scholarship from CAPES-Brazil.

4.2. CAPÍTULO 2: ATIVIDADE ANTI-BIOFILME DO COMPLEXO DE INCLUSÃO FORMADO ENTRE DERIVADO DE INDANDIONA E HP- β -CICLODEXTRINA

Introdução

Como estratégia para sobreviver em ambientes hostis, bactérias aderem a uma superfície e produzem uma barreira de proteção composta por diversas substâncias poliméricas extracelulares, denominada biofilme, que podem ser encontrados nos nossos dentes, dispositivos médicos, feridas, alimentos, até em tanques e tubulações nas indústrias. Muitos estudos são realizados no sentido de identificar compostos com atividade contra biofilmes de importantes patógenos bacterianos (Winkelströter *et al.*, 2022). Nos últimos anos, tem-se observado o interesse de associar esses compostos à nanotecnologia, possibilitando alterar e conferir características relevantes, promovendo potencialização a atividade, redução da toxicidade, liberação lenta e controlada de fármacos, maior eficiência de penetração em tecidos e até mesmo maior proteção contra a degradação (Ramos *et al.*, 2018). As nanopartículas no setor biomédico ganham destaque com uma variedade de aplicações, combinando materiais ou dispositivos com biomoléculas, contornando limitações das metodologias e tratamentos usualmente empregados (Lin *et al.*, 2015).

Um dos compostos que podem ser utilizados para produção de nanopartículas são as ciclodextrinas (CD), uma família de oligossacarídeos cíclicos capazes de formar complexos de inclusão (CI) com uma variedade de substâncias, alterando suas propriedades pela complexação como, por exemplo, solubilidade e termoestabilidade (Venturini *et al.*, 2008). Estudos envolvendo a complexação de óleos essenciais como o de manjerição e o de cravo com ciclodextrinas mostraram melhoria na estabilidade, biodisponibilidade e de suas propriedades antioxidante, antibacteriana e antitumoral (Miyoshi *et al.*, 2022). A atividade de antibióticos também pode ser potencializada quando complexados com CD, como relatado para a levofloxacina complexada com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). A levofloxacina livre apresentou concentração inibitória mínima (CIM) de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ para *Bacillus digest spp* e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ para *Escherichia coli*, já o complexo de inclusão apresentou CIM de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ para ambas as bactérias (Li *et al.*, 2022). O efeito antibacteriano *in vivo* do complexo de inclusão em camundongos infectados com *Staphylococcus aureus* também apresentou

atividade antibacteriana aumentada em comparação com levofloxacina livre (Li *et al.*, 2022).

Visando a potencialização da atividade antibiofilme e desenvolvimento de estratégias destinadas ao controle e remoção de biofilmes bacterianos, foi realizada a síntese de um CI entre um derivado de indandiona e a hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP β CD). O composto usado foi o **Ap8**, identificado no capítulo anterior como tendo atividade antibiofilme para as bactérias *S. aureus* 2878, *Staphylococcus aureus* NRS 155, *S. epidermidis* NRS 101, *E. coli* ATCC 35218 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Material e Métodos

Microrganismos e condições de cultivo

Para a realização dos ensaios envolvendo biofilme, foram utilizadas as cepas Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* NRS 155, *S. epidermidis* NRS 101, *S. aureus* 2878 e *S. aureus* USA 300 resistente à metilina (MRSA), e as Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *P. fluorescens* 07A. Os ensaios foram conduzidos utilizando caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI) suplementado com 0,25% m/v de glicose (BHlg). Todos os inóculos foram preparados a partir das colônias bacterianas cultivadas em meio ágar Luria-Bertani (LB) crescidas a 37 °C por 24 h. Estoques das culturas foram mantidos em 1 mL de caldo Infusão Cérebro-Coração (BHI) contendo 20% v/v de glicerol a -20 °C.

Síntese do complexo de inclusão (CI)

O composto **Ap8** foi selecionado para a síntese do CI com hidroxipropil- β -ciclodextrina (HP- β -CD) pelo método de “*kneading*”. O composto e o material complexante foram adicionados nas proporções molares de 1:1 (Ap8:HP β CD) e misturados manualmente por 5 min utilizando almofariz e pistilo. Foram adicionados 51 μ L de álcool etílico 95% v/v, mantendo a concentração de 2,0 mmol/mL (HP β CD:etanol), e posteriormente misturado por mais 15 min. O complexo de inclusão foi mantido em dessecador por 72 h a -20 °C, após esse tempo ele foi mantido a -20 °C até a realização dos demais experimentos.

Curva analítica e eficiência de complexação

Inicialmente foi preparada uma solução a 500 µg/mL do composto Ap8 em acetonitrila e diluída 100 vezes para encontrarmos o λ máx, encontrado esse valor (381,5 nm) foram preparadas soluções de 1 a 25 µg/mL para a construção da curva analítica. Para determinar a eficiência de complexação e a real concentração dos **CIAp8** formados, inicialmente foram dissolvidos 5 mg dos complexos de inclusão, foram adicionados 1 mL de acetonitrila 95% e mantido sob alta agitação em um vórtex por 48 horas, para garantir a completa extração e solubilização do composto que foi complexado. As amostras foram centrifugadas a 3000 g durante 15 min a 25 °C para decantar a HPβCD, deixando apenas o composto **Ap8** em solução. A solução do composto em acetonitrila foi diluída 100 vezes e realizada a leitura de absorvância no λ máx (381,5 nm) previamente determinado e com a equação da curva de analítica foi determinada a concentração do composto Ap8 (µg/mL) que foi complexado e calculada a eficiência de complexação.

Atividade antibiofilme do complexo de inclusão

O ensaio antibiofilme do complexo de inclusão foi realizado em microplacas de 96 poços conforme Fabres-Klein e colaboradores (2015), com modificações. A cada poço foram adicionados 100 µL da suspensão bacteriana 10⁶ UFC/mL, caldo BHI com 0,25% de glicose (BHIg) e o complexo de inclusão, na concentração 100 µg/mL de Ap8 no complexo. Após incubação em estufa a 37 °C por 24 h, todo o sobrenadante foi removido e os poços foram delicadamente lavados três vezes com PBS 1X (pH 7,6), seguido de coloração com cristal violeta 0,1% m/v por 30 min e adição de etanol 95% v/v por 45 min. A placa foi submetida a leitura em espectrofotômetro a 560 nanômetros (VersaMax ELISA Microplate Reader). Os poços incubados somente com BHIg e bactéria foram usados como controles positivos. Os experimentos foram conduzidos em triplicata.

A porcentagem de inibição de biofilme foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Inibição} = \left(\left(\frac{\text{Leitura a 560 nm do Biofilme com o complexo} \cdot 100}{\text{Leitura a 560 nm do Biofilme sem o complexo}} \right) - 100 \right) \cdot (-1)$$

Citotoxicidade

Foi avaliado o efeito citotóxico do complexo de inclusão **CIAp8** em células VERO, através do ensaio colorimétrico com MTT (MOSMANN 1983). Uma suspensão de células VERO, contendo aproximadamente $2,5 \times 10^4$ células/mL, foi distribuída em uma microplaca de 96 poços (100 μ L/poço). A placa foi incubada por 24 h, a 37 °C e 5% CO₂. Após 24 h, com a monocamada celular confluenta, foram adicionados 100 μ L das concentrações dos compostos diluídos em meio RPMI (400, 200, 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 μ g/mL). A placa foi incubada por 48 h a 37 °C e 5% CO₂. O meio foi, então, removido e adicionado 10 μ L de MTT (5mg/mL), e incubado novamente por 4 h. O meio com MTT foi removido e substituído por 100 μ L de DMSO, a placa foi agitada por 10 minutos e realizada a leitura em espectrofotômetro a 540 nm. A viabilidade celular foi calculada utilizando as absorbâncias das monocamadas tratadas com os compostos, comparados ao controle utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Viabilidade Celular} = \left(\left(\frac{\text{Leitura a 540 nm do composto}}{\text{Leitura a 540 nm de controle com DMSO}} \right) \times 100 \right)$$

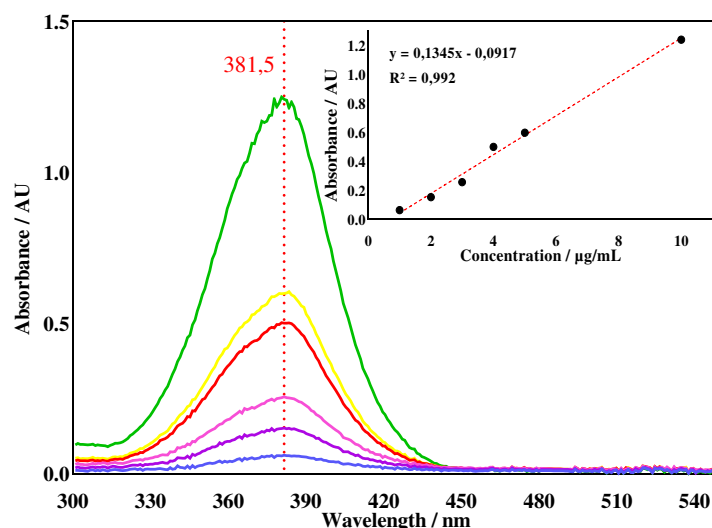
Análises estatísticas

As médias das replicatas técnicas em cada replicata biológica foram comparadas em relação ao valor da média dos controles, que representaram 100% da formação de biofilme. Os dados dessa diferença foram plotados no *software* GraphPad Prism (v.6) e avaliados por análise de variância *one-way* (ANOVA) entre os tratamentos e os controles. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos, pelo Teste de Dunnett.

Resultados

A construção da curva analítica, a síntese dos complexos de inclusão e o processo de descomplexação foram realizados para determinar a massa de **Ap8** complexado com a HP β CD usando a fórmula obtida da regressão linear dos valores de absorbância no comprimento de onda 381,5 nm (λ máx). Obteve-se uma eficiência de complexação de 78 % (+ - 5) (Figura 1).

Figura 1: Espectro gerado por soluções de **Ap8** nas concentrações de 1 a 10 µg/mL em acetonitrila. Regressão linear realizada para construção da curva analítica com os valores de comprimento de onda obtidos no λ máx (381,5 nm), obtendo valor de $R^2 = 0,992$ e fórmula da regressão $y = 0,1345x - 0,0917$.



Uma solução do complexo de inclusão solubilizada em água foi utilizada para a realização dos ensaios de atividade antibiofilme, usando o equivalente a 100 µg/mL de **Ap8** em cada poço. De maneira geral o complexo de inclusão apresentou atividade inferior ao composto **Ap8** puro, porém para *P. fluorescens* e MRSA onde **Ap8** não demonstrou atividade, o complexo de inclusão reduziu o biofilme em 53,6% e 10,4%, respectivamente (Figura 2). A citotoxicidade do complexo de inclusão sobre células VERO foi avaliada, apresentando uma leve diminuição da viabilidade celular em concentrações até 25 µg/mL e nas concentrações de 50 a 200 µg/mL apresentou citotoxicidade semelhante ao composto puro (Figura 3). Tanto o complexo de inclusão quanto o composto Ap8 apresentaram coloração vermelha tijolo intensa na concentração de 400 µg/mL, interferindo no ensaio colorimétrico com MTT, impossibilitando determinar a viabilidade celular nessa concentração.

Figura 2: Atividade do composto **Ap8** e do **CIAp8** sobre a formação do biofilme por *S. aureus* NRS 155, *S. epidermidis* NRS 101, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *S. aureus* 2878, *S. aureus* USA300 (MRSA) e *P. fluorescens* 07A. O composto foi utilizado na concentração de 100 µg/mL e o complexo de inclusão na concentração equivalente a

100 µg/mL de **Ap8**. A quantidade do biofilme foi verificada pelo método do cristal violeta. As diferenças entre **Ap8** e **CIAp8** foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) pelo Teste de t.

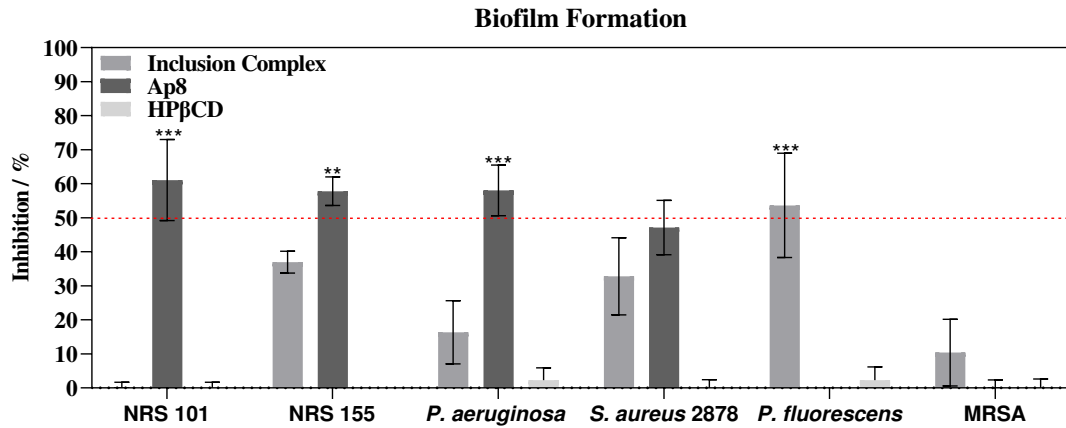
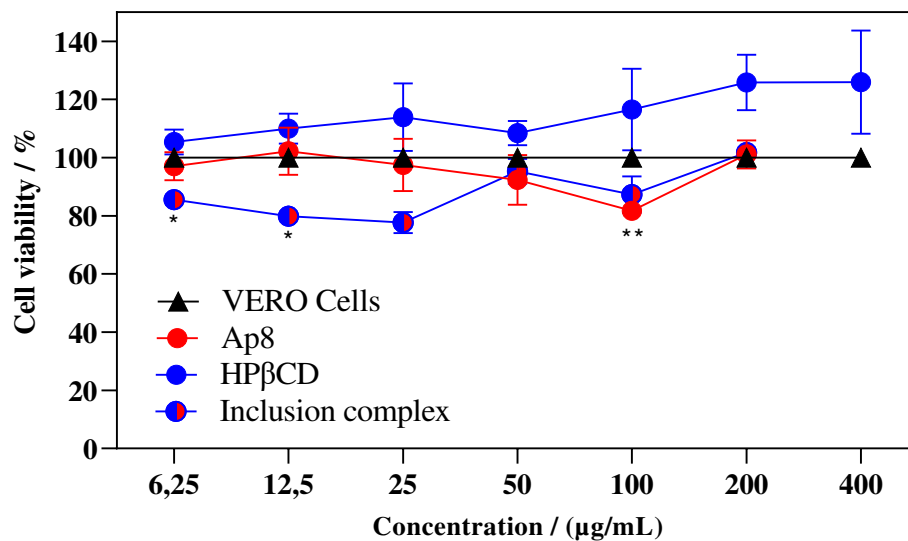


Figura 3: Citotoxicidade do composto **Ap8** e do **CIAp8** em células VERO expresso por porcentagem de viabilidade celular. As células foram cultivadas por 48 horas na presença dos diferentes compostos e o efeito citotóxico foi avaliado pelo método colorimétrico usando MTT. Diferenças entre os controles e os compostos foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****) pelo Teste de Dunnett.



Discussão

As 1,3-indandionas são β -dicetonas aromáticas bicíclicas, essa estrutura proporciona o preparo de compostos estruturalmente mais complexos, sendo uma característica muito vantajosa para a síntese orgânica. Os derivados de indandionas apresentam diversas aplicações no campo da química medicinal, com propriedades antitumoral, anti-inflamatória, anti-alzheimer, antiviral, antimicrobiana, anticoagulante, raticida e antiparasitária (Meena *et al.*, 2006; Fabres-Klein *et al.*, 2015; Alizadeh *et al.*, 2020). Neste trabalho, a atividade de derivados de indandionas sobre biofilmes mistos e produção de complexos de inclusão com HP- β -CD foi avaliada pela primeira vez.

Visando o aumento da solubilidade do composto e consequente aumento da atividade antibiofilme, uma alternativa encontrada foi a formação de CI entre derivados da 2-arilideno-indan-1,3-diona e CDs. Além de proporcionar solubilidade em água do composto, trabalhos mostraram que as CDs são capazes de formar complexos de inclusão com moléculas sinalizadoras de *Quorum sensing* (Berkl *et al.*, 2022; Morohoshi *et al.*, 2013), afetando a dinâmica de formação, maturação e dispersão do biofilme. O composto **Ap8** foi selecionado para síntese dos complexos de inclusão com a HP β CD, obtendo 78,27% de eficiência de complexação. O **CIAp8** reduziu a formação do biofilme de *P. fluorescens* 07A, isolado de leite cru refrigerado, em 53,6% e de *S. aureus* USA300, um clone pandêmico resistente à meticilina (MRSA), em 10,4%, diferentemente do composto puro **Ap8**, que não demonstrou atividade para essas bactérias. Para os demais biofilmes de modo geral a atividade do **CIAp8** não foi superior ao composto **Ap8** puro. Apesar da elevada eficiência de complexação obtida, é possível que o **Ap8** esteja parcialmente incluído com a CD, realizando interações diferentes das de inclusão com a CD, superestimando a eficiência de complexação e afetando negativamente no potencial antibiofilme. A caracterização do **CIAp8** será fundamental para compreender e buscar alternativas visando aprimorar os resultados obtidos.

Trabalhos envolvendo complexos de inclusão vêm demonstrando resultados relevantes como estratégias antibiofilme. O complexo de inclusão formado entre o composto natural resveratrol e hidroxipropil- γ -ciclodextrina apresentou maior solubilidade quando comparado com o resveratrol puro (Duarte *et al.*, 2015). Esses CIs mostraram atividade anti-*Campylobacter* e anti-*Arcobacter*, além de inibir a formação de biofilmes e promover enfraquecimento de biofilmes pré-formados em

concentrações sub-MIC. A toxicidade das indandionas sob células de mamíferos varia dependendo do composto, os compostos Ap16 e Ap19 reduziram em 50% o metabolismo celular nas concentrações de 89,72 μM a e 267,60 μM , respectivamente (Carlete 2017; Oliveira 2017). Tanto o composto **Ap8** puro quanto o **CIAp8** não apresentaram citotoxicidade significativa nas concentrações avaliadas. Trabalhos relatam a redução da toxicidade de compostos quando complexados com ciclodextrinas, o antibiótico cloranfenicol em um complexo multicomponente com β -ciclodextrina e N-acetilcisteína apresentou toxicidade reduzida contra leucócitos, maior solubilidade e atividade antibiofilme sob biofilmes de bactérias do gênero *Staphylococcus* (Aiassa *et al.*, 2016).

Vários derivados de indandionas possuem atividade antibacteriana, em especial o **Ap8**, que mostrou significativa atividade sobre bactérias Gram-positivas e negativas. Uma limitação desses compostos é a sua baixa solubilidade em água, o que pode ser visto por meio da formação de cristais em alguns compostos. Os resultados obtidos neste estudo mostraram o potencial do **CIAp8** para o desenvolvimento de estratégias destinadas ao controle de biofilmes bacterianos. Porém existe ainda uma necessidade de melhor caracterizar o CI formado para se entender como é possível aprimorar suas propriedades para que ele tenha uma aplicação biotecnológica. Deve-se ressaltar também que o domínio dos métodos para a síntese dos CI será fundamental para viabilizar a síntese de novos produtos que tenham atividade sobre bactérias.

Referências Bibliográficas

- Aiassa, V., Zoppi, A., Becerra, M. C., Albasa, I., & Longhi, M. R. (2016). Enhanced inhibition of bacterial biofilm formation and reduced leukocyte toxicity by chloramphenicol: β -cyclodextrin: N-acetylcysteine complex. *Carbohydrate polymers*, 152, 672-678. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.013>
- Alizadeh, A., Beiranvand, Z., Safaei, Z., Khodaei, M. M., & Repo, E. (2020). Green and Fast Synthesis of 2-Arylidene-indan-1, 3-diones Using a Task-Specific Ionic Liquid. *ACS omega*, 5(44), 28632-28636. <https://doi:10.1021/acsomega.0c03645>
- Arruda, T. R., Bernardes, P. C., e Moraes, A. R. F., & Soares, N. D. F. F. (2022). Natural bioactives in perspective: The future of active packaging based on essential oils

- and plant extracts themselves and those complexed by cyclodextrins. *Food Research International*, 111160. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111160>
- Berkl, Z., Fekete-Kertész, I., Vaszita, E., Fenyvesi, É., Szente, L., & Molnár, M. (2022). Effect of Cyclodextrins on the Biofilm Formation Capacity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Molecules*, 27(11), 3603. <https://doi.org/10.3390/molecules27113603>
- Carlete, L. C., (2017). Síntese de 2-arilideno indan-1,3-dionas Contendo Porções Triazólicas e Avaliação de suas Atividades Citotóxica e Fotoprotetora. Tese de Mestrado – Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil
- Duarte, A., Alves, A. C., Ferreira, S., Silva, F., & Domingues, F. C. (2015). Resveratrol inclusion complexes: antibacterial and anti-biofilm activity against *Campylobacter* spp. and *Arcobacter butzleri*. *Food Research International*, 77, 244-250. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.047>
- Fabres-Klein, M. H., Caizer Santos, M. J., Contelli Klein, R., Nunes de Souza, G., & de Oliveira Barros Ribon, A. (2015). An association between milk and slime increases biofilm production by bovine *Staphylococcus aureus*. *BMC veterinary research*, 11(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0319-7>
- Flemming, H. C., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. A., & Kjelleberg, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 563. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Hotterbeekx, A., Kumar-Singh, S., Goossens, H., & Malhotra-Kumar, S. (2017). In vivo and In vitro Interactions between *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus* spp. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 106. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00106>
- Li, Y., Zhou, J., Gu, J., Shao, Q., & Chen, Y. (2022). Enhanced antibacterial activity of levofloxacin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex: In vitro and in vivo evaluation. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 215, 112514. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112514>
- Lin, T.C., Hung, K.H., Peng, C.H., Liu, J.H., Woung, L.C., Tsai, C.Y., Chen, S.J., Chen, Y.T. and Hsu, C.C. (2015). Nanotechnology-based drug delivery treatments and specific targeting therapy for age-related macular degeneration. *Journal of the Chinese Medical Association*, 78(11), 635-641. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2015.07.008>

- Meena, S., Shankar, D., Ramseshu, K. V., Giles, D., Prakash, M. S., & Venkataraman, S. (2006). Synthesis of 2-(aryl methylene)-(1H)-indane-1, 3-(2H)-diones as potential fungicidal and bactericidal agents. [https:// doi:10.1002/chin.200640094](https://doi.org/10.1002/chin.200640094)
- Miyoshi, J. H., Castro, J. C., Fenelon, V. C., Garcia, F. P., Nakamura, C. V., Nogueira, A. C., ... & Matioli, G. (2022). Essential oil characterization of *Ocimum basilicum* and *Syzygium aromaticum* free and complexed with β -cyclodextrin. Determination of its antioxidant, antimicrobial, and antitumoral activities. *Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry*, 102(1), 117-132. <https://doi.org/10.1007/s10847-021-01107-0>
- Morohoshi, T., Tokita, K., Ito, S., Saito, Y., Maeda, S., Kato, N., & Ikeda, T. (2013). Inhibition of quorum sensing in gram-negative bacteria by alkylamine-modified cyclodextrins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 116(2), 175-179. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.01.022>
- Oliveira, A. F. C. D. S., (2017). Avaliação do Efeito Inibitório de Análogos da indan-1,3-diona Contra a Protease do Vírus West Nile e Antiviral Contra os Vírus Dengue e Zika. Tese de Doutorado – Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, MG, Brasil
- Ramos, M.A.D.S., Da Silva, P.B., Spósito, L., De Toledo, L.G., Bonifacio, B.V., Rodero, C.F., Dos Santos, K.C., Chorilli, M. and Bauab, T.M. (2018). Nanotechnology-based drug delivery systems for control of microbial biofilms: a review. *International Journal of Nanomedicine*, 13, 1179. <https://doi.org/10.2147/IJN.S146195>
- Souza, A. P., Costa, M. C., de Aguiar, A. R., Bressan, G. C., de Almeida Lima, G. D., Lima, W. P., Borsodi, M.P., Bergmann, B.R., Ferreira, M.M. and Teixeira, R.R., (2021). Leishmanicidal and cytotoxic activities and 4D-QSAR of 2-arylidene indan-1, 3-diones. *Archiv der Pharmazie*, 354(10), 2100081. <https://doi.org/10.1002/ardp.202100081>
- Venturini, C. D. G., Nicolini, J., Machado, C., & Machado, V. G. (2008). Propriedades e aplicações recentes das ciclodextrinas. *Química Nova*, 31(2), 360-368. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000200032>
- Winkelströter, L. K., Bezirtzoglou, E., & Tulini, F. L. (2022). Natural Compounds and Novel Sources of Antimicrobial Agents for Food Preservation and Biofilm Control. *Frontiers in Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.856858>
- Zhao, X. (2017). Biofilm formation and control strategies of foodborne pathogens: food safety perspectives. *RSC Advances*, 7(iii), 36670–36683. <https://doi.org/10.1039/C7RA02497E>

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Inicialmente 19 derivados da 2-arilideno indan-1,3-diona tiveram suas atividades antimicrobianas e antibiofilme avaliadas. Não apresentaram atividade antimicrobiana, porém demonstraram grande potencial antibiofilme, característica muito promissora, uma vez que evita o surgimento de resistência. Posteriormente seis derivados foram selecionados e avaliada a citotoxicidade sob células VERO e então o composto **Ap8** foi selecionado para a etapa de formação do complexo de inclusão com a HP β CD. O **CIAp8** apresenta potencial para o desenvolvimento de estratégias destinadas ao controle de biofilmes bacterianos, principalmente pela redução de 53,6% do biofilme de *P. fluorescens* 07A, uma bactéria causadora de impactos negativos significantes no setor industrial de lácteos. Porém mais estudos necessitam ser realizados para avaliarmos a termoestabilidade, solubilidade, carga superficial do complexo, se outros métodos de síntese dos complexos são mais eficazes além o mecanismo de ação para a redução dos biofilmes.

Em resumo, esse foi o primeiro trabalho a comprovar a atividade antibiofilme de derivados da 2-arilideno indan-1,3-diona e síntese de **CIAp8**. Os resultados podem ser explorados para subsidiar a síntese de compostos mais eficazes e menos citotóxicos. Uma possibilidade para potencializar a atividade antibiofilme é por meio da associação e/ou produção de nanopartículas catiônicas. A nanotecnologia vem se mostrando promissora no desenvolvimento de estratégias antibiofilme ao associar compostos naturais ou sintéticos com nanopartículas, seja através de nanoemulsões, encapsulamento ou funcionalização de superfícies. Isso pode potencializar a penetração dos compostos em biofilmes, dificultar a adesão de bactérias em superfícies e diminuir a toxicidade dos derivados de indandionas, contribuindo para sua aplicação biotecnológica.