

# Dehydroabietic Acid vs. Azo Derivatives: Structural Integrity as a Key to Preserving Antimicrobial and Antibiofilm Potency

## Ácido Desidroabiético vs. Derivados Azo: Integridade Estrutural como Chave Para Preservar a Potência Antimicrobiana e Antibiofilme

Albert Ruiz-Soriano<sup>1</sup>, Festus Oladayo Ogungbemiro<sup>2</sup> , Vera Mónica Sousa Isca<sup>2</sup> , Xavier Just-Baringo<sup>1</sup> , & Patrícia Rijo<sup>2,3,4</sup> 

**Keywords:** Dehydroabietic acid, azo derivatives, photoisomerization, antimicrobial activity, biofilm inhibition

**Palavras-chave:** Ácido desidroabiético, derivados azo, fotoisomerização, atividade antimicrobiana, inibição de biofilme

### To Cite:

Ruiz-Soriano, A., et al. (2025) Dehydroabietic Acid vs. Azo Derivatives: Structural Integrity as a Key to Preserving Antimicrobial and Antibiofilm Potency. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 22(2), 1-17.

 <https://doi.org/10.19277/bbr.22.2.371>

1 - Laboratori de Química Orgànica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona Spain

2 - CBIOS – Universidade Lusófona's Research Center for Biosciences & Health Technologies, Lisbon, Portugal

3 - Centro de Química Estrutural, Institute of Molecular Sciences, Universidade de Lisboa, Portugal

4 - Faculdade de Farmácia, Instituto de Investigação do Medicamento (iMed.U.Lisboa), Universidade de Lisboa, Lisbon, Portugal

Correspondence to / Correspondência a: [xavier.just@ub.edu](mailto:xavier.just@ub.edu); [patricia.rijo@ulusofona.pt](mailto:patricia.rijo@ulusofona.pt)

Received / Recebido: 25/11/2025

Accepted / Aceite: 06/01/2026

### Abstract

The escalating threat of antimicrobial resistance necessitates novel therapeutic agents. This study investigated the antimicrobial and antibiofilm properties of dehydroabietic acid (**DHA**) and its azo-functionalized derivatives against clinically relevant microorganisms. **DHA** exhibited potent antimicrobial activity, particularly against *Staphylococcus aureus* (MIC as low as 0.49 µg/mL) and significant antibiofilm effects (MBIC down to 7.81 µg/mL). Conversely, azo-functionalized derivatives showed markedly reduced efficacy across all tested parameters. Comparative analysis revealed that structural modifications compromised both antimicrobial and antibiofilm potency. Light-induced isomerization under UV and blue light did not influence significantly the activity of the tested derivatives. These findings underscore the importance of the native **DHA** scaffold for biological activity and highlight its potential as a lead compound for developing novel antimicrobial agents. The specific azo-functionalization approach employed herein was detrimental to efficacy, emphasizing the need for alternative strategies in designing improved derivatives based on natural bioactive compound scaffolds.

### Resumo

A crescente ameaça da resistência antimicrobiana exige novos agentes terapêuticos. Este estudo investigou as propriedades antimicrobianas e antibiofilme do ácido desidroabiético (**DHA**) e seus derivados funcionalizados com azo contra microrganismos clinicamente relevantes. O **DHA** exibiu potente atividade antimicrobiana, particularmente contra *Staphylococcus aureus* (CMI tão baixa quanto 0,49 µg/mL) e efeitos antibiofilme significativos (CMBI reduzida para 7,81 µg/mL). Por outro lado, os derivados funcionalizados com azo mostraram eficácia significativamente reduzida em todos os parâmetros testados. A análise comparativa revelou que as modificações estruturais comprometeram tanto a potência antimicrobiana quanto a antibiofilme. A isomerização induzida quer pela luz UV, como pela luz azul, não influenciou significativamente a atividade dos derivados testados. Essas descobertas ressaltam a importância da estrutura nativa do **DHA** para a atividade biológica e destacam seu potencial como composto principal para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. A abordagem específica de funcionalização com grupos azo empregada aqui foi prejudicial à eficácia, enfatizando a necessidade de estratégias alternativas no projeto de derivados aprimorados com base em estruturas de compostos bioativos naturais.

## Introduction

Antimicrobial resistance (AMR) is a growing global health threat that undermines the effectiveness of modern medicine (1). The WHO ranks it among the top ten public health challenges (2). Overuse of antibiotics in healthcare, veterinary, and agriculture has led to multidrug-resistant pathogens like *Staphylococcus aureus* (MRSA), extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli*, and carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*, increasing hospital stays, costs, and mortality (3). Biofilm formation further complicates treatment by shielding bacteria from antibiotics and promoting persistence, making infections in wounds, catheters, and lungs especially hard to eliminate (4-6).

With few new antibiotics in development, innovative agents are urgently needed. Natural products, especially plant-derived secondary metabolites such as terpenoids, alkaloids, and phenolics, offer promising antimicrobial activity. Diterpenes stand out for their structural diversity and potential for chemical modification to enhance efficacy (7-9). Hybrid molecules combining diterpenes with synthetic groups such as azo (-N=N-) moieties can create light-responsive antimicrobials (10). This photochromic behaviour enables spatiotemporal control over drug activity, potentially reducing off-target effects and improving therapeutic precision (11). Such smart antimicrobial systems represent a frontier in the fight against resistant infections (11). Examples of photoswitchable compounds previously reported include various azobenzene derivatives and other light-responsive scaffolds with antimicrobial activity (12-20).

The genus *Plectranthus* (family *Lamiaceae*), commonly known as "spurflowers," comprises over 300 species distributed across tropical and subtropical regions of Africa, Asia, and Australia. Many *Plectranthus* species, used in traditional medicine for centuries, are important sources of abietane-type diterpenoids (21). These compounds have demonstrated a broad spectrum of biological activities, including antimicrobial, anti-inflammatory, antitumor, and antioxidant effects (22-26). Notably, several *Plectranthus*-derived diterpenes have shown

## Introdução

A resistência antimicrobiana (RAM) é uma ameaça crescente à saúde global que compromete a eficácia da medicina moderna (1). A OMS a classifica entre os dez principais desafios de saúde pública (2). O uso excessivo de antibióticos na área da saúde, veterinária e agricultura levou ao surgimento de patógenos multirresistentes, como *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Escherichia coli* produtora de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) e *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao carbapenem, aumentando as internações hospitalares, os custos e a mortalidade (3). A formação de biofilmes complica ainda mais o tratamento, protegendo as bactérias dos antibióticos e promovendo a persistência, tornando as infecções em feridas, cateteres e pulmões especialmente difíceis de eliminar (4-6).

Com um número limitado de novos antibióticos em desenvolvimento, há uma necessidade urgente de agentes inovadores. Os produtos naturais, especialmente os metabolitos secundários derivados de plantas, como terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos, oferecem uma atividade antimicrobiana promissora. Os diterpenos destacam-se pela sua diversidade estrutural e potencial de modificação química para aumentar a eficácia (7-9). Moléculas híbridas que combinam diterpenos com grupos sintéticos, como fragmentos azo (-N=N-), podem criar antimicrobianos sensíveis à luz (10). Esse comportamento fotocromático permite o controle espaço-temporal da atividade do medicamento, reduzindo potencialmente os efeitos fora do alvo e melhorando a precisão terapêutica (11). Esses sistemas antimicrobianos inteligentes representam uma fronteira na luta contra infecções resistentes (11). Exemplos de compostos fotocromáticos relatados anteriormente incluem vários derivados de azobenzeno e outras estruturas sensíveis à luz com atividade antimicrobiana (12-20)

O género *Plectranthus* (família *Lamiaceae*), comumente conhecido como "flores-espora", compreende mais de 300 espécies distribuídas pelas regiões tropicais e subtropicais da África, Ásia e Austrália. Muitas espécies de *Plectranthus*, utilizadas na medicina tradicional há séculos, são fontes importantes de diterpenóides do tipo abietano (21). Estes compostos demonstraram um amplo espectro de atividades biológicas, incluindo efeitos antimicrobianos, anti-inflamatórios, antitumorais e antioxidantes (22-26). Notavelmente, vários diterpenos derivados de *Plectranthus* mostraram

potent activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as pathogenic fungi such as *Candida albicans* (27). Their ability to disrupt microbial membranes, interfere with energy metabolism, and inhibit biofilm formation makes them particularly attractive for the development of new antimicrobial agents (28).

Dehydroabietic acid (**DHA**) is a naturally occurring tricyclic diterpenoid derived from abietic acid, a major component of pine resin (29,30). It is found in several *Plectranthus* species and exhibits a characteristic phenanthrene-like core with a carboxylic acid group at position C-4. **DHA** has attracted considerable scientific interest due to its diverse pharmacological profile, including anti-inflammatory, antioxidant, antitumor, and antimicrobial properties (31,32). Its amphiphilic nature—arising from a hydrophobic aromatic core and a polar carboxylic acid group—enables interaction with biological membranes, a key feature for antimicrobial activity (33). **DHA** has demonstrated consistent and potent antibacterial activity, particularly against Gram-positive bacteria (34), and can serve as a lead compound in the development of agents targeting drug-resistant pathogens and biofilm-forming microorganisms (35).

This study investigates the antimicrobial and antibiofilm properties of dehydroabietic acid (**DHA**) and its three azo-functionalized derivatives (**DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2**, and **DHA\_Azo0**) (Figure 1) against clinically relevant microorganisms encompassing Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), Gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*), and yeast species (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*), through the determination of minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum bactericidal concentrations (MBC). The compounds' ability to prevent biofilm formation was evaluated by measuring minimum biofilm inhibitory concentrations (MBIC) and percentage biofilm inhibition. The photoresponsive characteristics of the azo derivatives were utilised to investigate the influence of light-induced isomerization under UV, blue light, and sunlight exposure on antimicrobial activity.

atividade potente contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, bem como fungos patogênicos, como *Candida albicans* (27). A sua capacidade de perturbar as membranas microbianas, interferir no metabolismo energético e inibir a formação de biofilmes torna-os particularmente atraentes para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos (28).

O ácido desidroabiético (**DHA**) é um diterpenóide tricíclico natural derivado do ácido abiético, um dos principais componentes da resina de pinheiro (29,30). É encontrado em várias espécies de *Plectranthus* e exibe um núcleo característico semelhante ao fenantreno com um grupo de ácido carboxílico na posição C-4. O **DHA** tem atraído considerável interesse científico devido ao seu perfil farmacológico diversificado, incluindo propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes, antitumorais e antimicrobianas (31,32). A sua natureza anfífila — resultante de um núcleo aromático hidrofóbico e um grupo de ácido carboxílico polar — permite a interação com membranas biológicas, uma característica fundamental para a atividade antimicrobiana (33). O **DHA** demonstrou atividade antibacteriana consistente e potente, particularmente contra bactérias Gram-positivas (34), e pode ser um composto líder no desenvolvimento de agentes direcionados a patógenos resistentes a medicamentos e microrganismos formadores de biofilme (35).

Este estudo investiga as propriedades antimicrobianas e antibiofilme do ácido desidroabiético (**DHA**) e seus três derivados funcionalizados com azo (**DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2** e **DHA\_Azo0**) (Figura 1) contra microrganismos clinicamente relevantes, incluindo bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) e espécies de leveduras (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*), através da determinação das concentrações inibitórias mínimas (MIC) e das concentrações bactericidas mínimas (MBC). A capacidade dos compostos para prevenir a formação de biofilme foi avaliada através da medição das concentrações inibitórias mínimas do biofilme (MBIC) e da percentagem de inibição do biofilme. As características fotossensíveis dos derivados azóicos foram exploradas para investigar a influência da isomerização induzida pela luz sob exposição a UV, luz azul e luz solar na atividade antimicrobiana.

## Materials and Methods

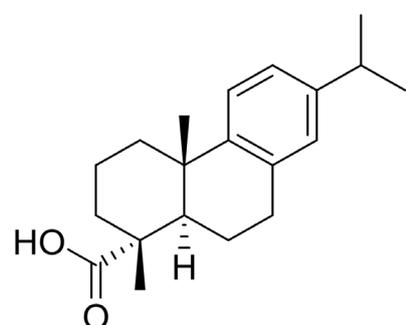
### Synthesis and characterisation

All solvents and reagents used were purchased from commercial suppliers and used without further purification. TLC analysis was carried out on aluminum sheets coated with silica gel and visualized using UV light.  $^1\text{H-NMR}$  spectra were obtained at room temperature on a Bruker 400 MHz spectrometer.  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra were obtained at 100 MHz. All NMR spectra were processed using MestReNova NMR software. Chemical shifts are reported in parts per million (ppm) and coupling constants ( $J$ ) are reported in Hz. Splitting patterns are reported as follows: singlet (s), doublet (d), triplet (t), quadruplet (q), quintuplet (quint), doublet of doublets (dd), doublet of doublets of doublets (ddd), multiplet (m), etc. NMR signals were assigned using the appropriate 2D NMR experiments (*i.e.* HSQC and HMBC when necessary).

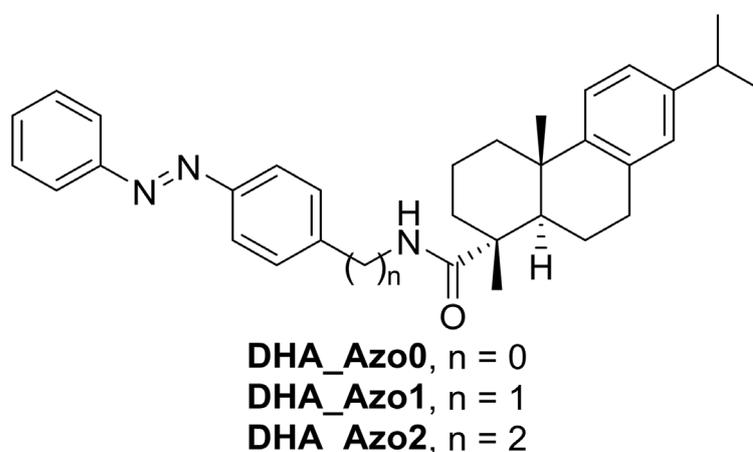
Detailed synthetic procedures and NMR spectra are available in the [Supporting Information](#). High-resolution mass spectrometry (HRMS) and EI-MS were performed by Unitat de Cromatografia de Gasos-Espectrometria de Masses Aplicada, Centres Científics i Tecnològics de la Univeristat de Barcelona (CCiTUB).

### Isomerisation and photocharacterisation

All manipulations between irradiation and UV-Vis analysis were carried out in a dark room. Irradiation with blue light was performed using a 4 W LED bulb.



**DHA**, dehydroabietic acid



**Figure 1** - Structure of dehydroabietic acid (**DHA**) and the azobenzene-containing analogues studied in this work.

**Figura 1**. Estrutura do ácido desidroabiético (**DHA**) e dos análogos contendo azobenzeno estudados neste trabalho.

## Materiais e métodos

### Síntese e caracterização

Todos os solventes e reagentes utilizados foram adquiridos de fornecedores comerciais e utilizados sem purificação adicional. A análise TLC foi realizada em folhas de alumínio revestidas com sílica gel e visualizada utilizando luz UV.  $^1\text{Os}$  espectros H-NMR foram obtidos à temperatura ambiente num espectrómetro Bruker de 400 MHz.  $^{13}\text{Os}$  espectros C-NMR foram obtidos a 100 MHz. Todos os espectros de RMN foram processados utilizando o software MestReNova NMR. As mudanças químicas são relatadas em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) são relatadas em Hz. Os padrões de divisão são relatados da seguinte forma: singlet (s), duplet (d), triplet (t), quadruplet (q), quintuplet (quint), duplet de duplet (dd), duplet de duplet de duplet (ddd), multiplet (m), etc. Os sinais de RMN foram atribuídos utilizando as experiências de RMN 2D apropriadas (*ou seja*, HSQC e HMBC, quando necessário).

Os procedimentos sintéticos detalhados e os espectros de RMN estão disponíveis nas [Informações Suplementares](#). A espectrometria de massa de alta resolução (HRMS) e a EI-MS foram realizadas pela Unitat de Cromatografia de Gases-Espectrometria de Massas Aplicada, Centres Científics i Tecnològics de la Univeristat de Barcelona (CCiTUB).

### Isomerização e foto-caracterização

Todas as manipulações entre a irradiação e a análise UV-Vis foram realizadas numa sala escura. A irradiação com luz azul foi realizada usando uma

Irradiation with UV light (365 nm) was performed with a TLC visualization lamp. Irradiation under sunlight was performed, exposing solutions of compounds to sunlight outdoors in Lisbon, Portugal, during morning hours across the month of September 2024. UV-Vis spectra were recorded after irradiation at different wavelengths (365, 380, 405, 420, 455, 470, 530 and 650 nm) of 50 mM solutions in DMSO in a 96-well plate using LED arrays.

#### *Bacterial Strains and Culture Media*

Preservation and culture of the test organisms were carried out according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (36). Bacterial strains studied were Gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43866, *E. faecalis* ATCC 51299), Gram-negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922), and yeast (*Candida albicans* ATCC 10231 and *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601). For the growth and maintenance of the microorganisms, MHB, MHA, SDB, and SDA were used, whereas for creating the bacterial biofilm, TSB supplemented by 1% glucose was employed. All microorganisms were cultured and incubated for 24 h at 37 °C in an aerobic workstation. In order to harvest overnight cultures, bacterial suspensions used for antibacterial assays and quantitative biofilm assays were prepared, suspending them in sterile water and adjusting the turbidity to 0.5 McFarland standard.

#### *Minimum Inhibitory Concentration Assay*

The antimicrobial properties of the compounds **DHA\_Azo0**, **DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2**, and **DHA** were assessed by the microdilution method (36). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) values were evaluated against reference strains. The assay was conducted in the dark, using the minimum light possible to minimize undesired isomerization. In aseptic conditions, 100 µL of the medium (MHB for bacteria or SDB for yeast) was distributed in each well of a 96-well plate. Next, 100 µL of sample (diluted in DMSO to 1 mg/mL), positive or negative control solutions were added to the first well of each row. Antibiotics of reference were used as positive controls, likewise at 1 mg/mL (Vancomycin (VAN) for Gram-positive, Norfloxacin (NOR) for Gram-negative bacteria, and Nystatin (NYS) for yeast strains). DMSO

lâmpada LED de 4 W. A irradiação com luz UV (365 nm) foi realizada com uma lâmpada de visualização TLC. A irradiação sob a luz solar foi realizada, expondo soluções de compostos à luz solar ao ar livre em Lisboa, Portugal, durante as horas da manhã ao longo do mês de setembro de 2024. Os espectros UV-Vis foram registados após irradiação em diferentes comprimentos de onda (365, 380, 405, 420, 455, 470, 530 e 650 nm) de soluções de 50 mM em DMSO numa placa de 96 poços utilizando matrizes LED.

#### *Estirpes bacterianas e meios de cultura*

A preservação e cultura dos organismos de teste foram realizadas de acordo com o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) (36). As estirpes bacterianas estudadas foram bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *S. aureus* ATCC 43866, *E. faecalis* ATCC 51299), bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Escherichia coli* ATCC 25922) e leveduras (*Candida albicans* ATCC 10231 e *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 2601). Para o crescimento e manutenção dos microrganismos, foram utilizados MHB, MHA, SDB e SDA, enquanto que para a criação do biofilme bacteriano, foi utilizado TSB suplementado com 1% de glicose. Todos os microrganismos foram cultivados e incubados durante 24 horas a 37 °C numa estação de trabalho aeróbica. Para colher as culturas durante a noite, foram preparadas suspensões bacterianas utilizadas para ensaios antibacterianos e ensaios quantitativos de biofilme, suspendendo-as em água esterilizada e ajustando a turbidez ao padrão de 0,5 McFarland.

#### *Ensaio de concentração inibitória mínima*

As propriedades antimicrobianas dos compostos **DHA\_Azo0**, **DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2** e **DHA** foram avaliadas pelo método de microdiluição (36). Os valores da concentração inibitória mínima (MIC) e da concentração bactericida mínima (MBC) foram avaliados em relação às estirpes de referência. O ensaio foi realizado no escuro, utilizando a mínima luz possível para minimizar a isomerização indesejada. Em condições assépticas, 100 µL do meio (MHB para bactérias ou SDB para leveduras) foram distribuídos em cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, 100 µL de amostra (diluída em DMSO a 1 mg/mL), soluções de controlo positivo ou negativo foram adicionadas ao primeiro poço de cada linha. Antibióticos de referência foram utilizados como controlos positivos, igualmente a 1 mg/mL (Vancomicina (VAN) para bactérias Gram-positivas, Norfloxacin (NOR) para bactérias Gram-negativas e Nistatina (NYS) para estirpes de leveduras). O DMSO

was used as a negative control. Using a multichannel micropipette, a serial dilution was made in a 1:2 proportion between each row of wells (500–0.49 µg/L range). Then the assay was irradiated under a UV lamp (365 nm), a 4 W blue LED bulb, or natural light for 5 minutes. Finally, 10 µL of bacterial suspension was added to every well, and plates were covered and incubated at 37 °C for 24 h. The bacterial growth was measured with an absorbance microplate reader set to 620 nm (BioTek Synergy HTX). Assays were carried out at least in triplicate for each tested microorganism.

#### *Minimum Bactericidal Concentration Assay*

The minimum bactericidal concentration (MBC) was determined according to the procedure recommended by the CLSI (36). MBC was defined as the lowest concentration of compound at which a complete absence of growth of bacterial colonies on the agar surface was observed compared with a non-treated control. Assays were carried out in triplicate for each tested microorganism.

#### *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*

The minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC) of the compounds **DHA\_Azo0**, **DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2**, and **DHA** was determined using the two-fold serial broth microdilution assay. The assay was conducted in the dark, using the minimum light possible to minimize undesired isomerization. In aseptic conditions, 100 µL of TSB containing 1% glucose medium was distributed in each well of a 96-well microplate. Next, 100 µL of sample (1 mg/mL), positive or negative control solutions were added to the first well of each row. Using a multichannel micropipette, a serial dilution was made in a 1:2 proportion between each row of wells (500–0.49 µg/L range). Then the assay was irradiated under a UV lamp (365 nm), blue lamp (LED bulb E14 spherical BLUE 15KH), or natural light for 5 minutes. Lastly, 20 µL of bacterial suspension was added to every well, and plates were covered and incubated at 37 °C for 24 h. After 24 h of static incubation at 37 °C, the plates were washed gently three times with PBS (pH 7.2) to remove unattached bacteria, fixed at 60 °C for 60 min in an incubator, and stained with 1% crystal violet (w/v) for 15 min at room temperature. Wells were then thoroughly washed with running tap water.

foi utilizado como controlo negativo. Utilizando uma micropipeta multicanal, foi feita uma diluição em série numa proporção de 1:2 entre cada fila de poços (intervalo de 500-0,49 µg/L). Em seguida, o ensaio foi irradiado sob uma lâmpada UV (365 nm), uma lâmpada LED azul de 4 W, ou luz natural durante 5 minutos. Por fim, foram adicionados 10 µL de suspensão bacteriana a cada poço, e as placas foram cobertas e incubadas a 37 °C por 24 h. O crescimento bacteriano foi medido com um leitor de microplacas de absorvância ajustado para 620 nm (BioTek Synergy HTX). Os ensaios foram realizados pelo menos em triplicata para cada microrganismo testado.

#### *Ensaio de concentração bactericida mínima*

A concentração bactericida mínima (MBC) foi determinada de acordo com o procedimento recomendado pelo CLSI (36). A MBC foi definida como a concentração mais baixa do composto na qual foi observada uma ausência completa de crescimento de colónias bacterianas na superfície do ágar em comparação com um controlo não tratado. Os ensaios foram realizados em triplicado para cada microrganismo testado.

#### *Concentração mínima inibidora de biofilme*

A concentração mínima inibidora de biofilme (MBIC) dos compostos **DHA\_Azo0**, **DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2** e **DHA** foi determinada utilizando o ensaio de microdiluição em caldo em série dupla. O ensaio foi realizado no escuro, utilizando a mínima luz possível para minimizar a isomerização indesejada. Em condições assépticas, 100 µL de TSB contendo meio com 1% de glicose foram distribuídos em cada poço de uma microplaca de 96 poços. Em seguida, ao primeiro poço de cada linha, foram adicionados 100 µL de solução do composto (1 mg/mL), as soluções de controlo positivo ou negativo. Utilizando uma micropipeta multicanal, foi feita uma diluição em série numa proporção de 1:2 entre cada fila de poços (intervalo de 500-0,49 µg/L). Em seguida, o ensaio foi irradiado sob lâmpada UV (365 nm), lâmpada azul (lâmpada LED E14 esférica BLUE 15KH) ou luz natural durante 5 minutos. Por fim, foram adicionados 20 µL de suspensão bacteriana a cada poço, e as placas foram cobertas e incubadas a 37 °C por 24 h. Após 24 horas de incubação estática a 37 °C, as placas foram lavadas suavemente três vezes com PBS (pH 7,2) para remover as bactérias não aderidas, fixadas a 60 °C por 60 minutos em uma incubadora e coradas com cristal violeta a 1% (m/v) por 15 minutos à temperatura ambiente. Os poços foram então lavados cuidadosamente com água corrente da torneira. A formação de biofilme foi quantificada

Biofilm formation was quantified by adding 150 µL of absolute ethanol into each well for 30 min. After the crystal violet staining method, the biofilm growth was measured with an absorbance microplate reader (BioTek Synergy HTX) set to 595 nm (OD<sub>595</sub>). The percentage of biofilm formation in the presence of different concentrations of the tested compounds was determined using the following equation:

Biofilm Formation (%) =

$$\frac{\text{OD}_{595} \text{ of the test well}}{\text{OD}_{595} \text{ of non - treated control well}} \times 100$$

Results are shown as mean ± SD.

## Results

The samples **DHA\_Azo0**, **DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2**, and **DHA** were screened as antimicrobial agents against three Gram-positive, two Gram-negative bacteria and two yeast strains through the microdilution method and the minimum inhibitory concentration (MIC, Figure 2) and minimum bactericidal concentration (MBC, Table S1, [Supporting Information](#)) were assessed (Figure 2).

The results confirmed that **DHA** was active against all the strains tested, as reported by Neto et al. (32), exhibiting potent antimicrobial activity, particularly

adicionando 150 µL de etanol absoluto em cada poço por 30 minutos. Após o método de coloração com cristal violeta, o crescimento do biofilme foi medido com um leitor de microplacas de absorvância (BioTek Synergy HTX) ajustado para 595 nm (OD<sub>595</sub>). A porcentagem de formação de biofilme na presença de diferentes concentrações dos compostos testados foi determinada usando a seguinte equação:

Formação de Biofilme (%) =

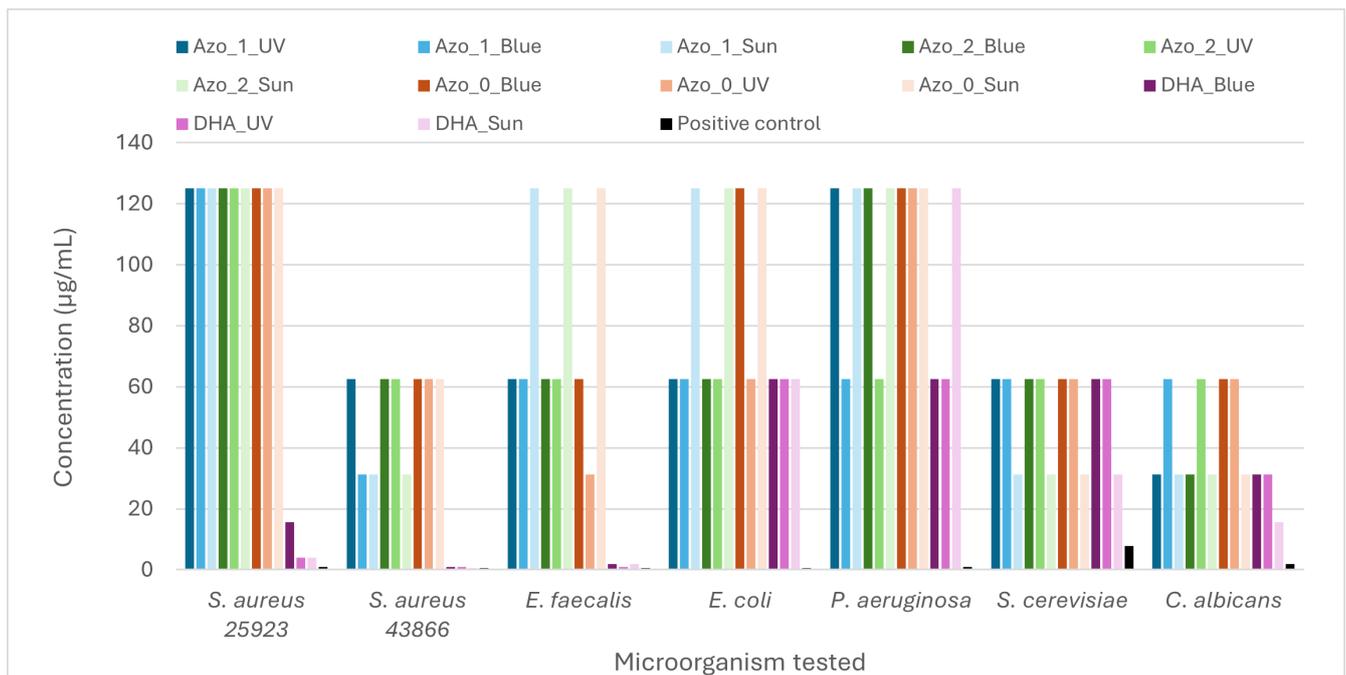
$$\frac{\text{OD}_{595} \text{ do poço de teste}}{\text{OD}_{595} \text{ do poço de controle não tratado}} \times 100$$

Os resultados são apresentados como média ± SD

## Resultados

As amostras **DHA\_Azo0**, **DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2** e **DHA** foram selecionadas como agentes antimicrobianos contra três bactérias Gram-positivas, duas bactérias Gram-negativas e duas estirpes de levedura através do método de microdiluição, e a concentração inibitória mínima (MIC, Figura 2) e a concentração bactericida mínima (MBC, Tabela S1, nas [Informações Suplementares](#)) foram avaliadas (Figura 2).

Os resultados confirmaram que o **DHA** era ativo contra todas as estirpes testadas, conforme relatado por Neto et al. (32), exibindo potente atividade



**Figure 2** - Graphic of the MIC values for each compound against a panel of microorganisms.

**Figura 2** - Gráfico dos valores MIC para cada composto em relação a um painel de microrganismos.

**Table 2** - MBIC values of the samples tested in  $\mu\text{g/mL}$ . Data represents the median values of at least three replicates.  
**Tabela 2** - Valores de MBIC das amostras testadas em  $\mu\text{g/mL}$ . Os dados representam os valores medianos de pelo menos três réplicas.

		<i>S. aureus</i> 25923		<i>S. aureus</i> 43866	
	sample	Conc. $\mu\text{g/mL}$	% Inhibition	Conc. $\mu\text{g/mL}$	% Inhibition
UV light	Azo_1	250	92.2 $\pm$ 0.25	125	81.9 $\pm$ 2.04
	Azo_2	250	93.2 $\pm$ 3.63	125	87.8 $\pm$ 1.54
	Azo_0	250	77.1 $\pm$ 4.86	125	85.8 $\pm$ 3.67
	DHA	7.81	71.5 $\pm$ 5.61	7.81	91.4 $\pm$ 1.05
	pos	7.81	92.5 $\pm$ 0.89	3.91	69.7 $\pm$ 5.21
	neg	250	84.4 $\pm$ 5.93	125	80.4 $\pm$ 2.62
Blue light	Azo_1	250	88.0 $\pm$ 3.58	125	80.5 $\pm$ 3.49
	Azo_2	250	90.7 $\pm$ 1.27	125	81.8 $\pm$ 0.55
	Azo_0	250	74.9 $\pm$ 0.09	125	69.2 $\pm$ 4.50
	DHA	7.81	81.6 $\pm$ 0.85	7.81	81.8 $\pm$ 4.68
	pos	1.95	76.6 $\pm$ 1.04	3.91	83.6 $\pm$ 5.30
	neg	250	84.5 $\pm$ 2.02	125	77.0 $\pm$ 2.09
Vancomycin					

		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. cerevisiae</i>	
	sample	Conc. $\mu\text{g/mL}$	% Inhibition	Conc. $\mu\text{g/mL}$	% Inhibition	Conc. $\mu\text{g/mL}$	% Inhibition
UV light	Azo_1	125	90.9 $\pm$ 2.82	125	60.1 $\pm$ 8.68	62.5	87.6 $\pm$ 0.77
	Azo_2	125	86.1 $\pm$ 1.38	125	85.9 $\pm$ 1.60	62.5	86.2 $\pm$ 0.65
	Azo_0	125	87.5 $\pm$ 3.27	125	66.7 $\pm$ 7.14	62.5	87.8 $\pm$ 2.62
	DHA	125	71.9 $\pm$ 6.28	125	42.9 $\pm$ 1.69	62.5	71.8 $\pm$ 2.33
	pos	1.95	71.6 $\pm$ 8.34	1.95	64.4 $\pm$ 8.99	0.98	84.3 $\pm$ 0.73
	neg	125	85.9 $\pm$ 5.21	125	52.8 $\pm$ 5.98	125	85.9 $\pm$ 1.78
Blue light	Azo_1	125	91.5 $\pm$ 2.95	125	80.2 $\pm$ 0.57	62.5	83.4 $\pm$ 6.40
	Azo_2	125	85.4 $\pm$ 9.61	250	59.7 $\pm$ 4.84	62.5	87.2 $\pm$ 2.78
	Azo_0	125	81.8 $\pm$ 9.87	125	66.4 $\pm$ 0.64	125	70.1 $\pm$ 0.78
	DHA	125	82.4 $\pm$ 12.67	125	78.7 $\pm$ 5.66	62.5	81.6 $\pm$ 2.25
	pos	1.95	81.5 $\pm$ 0.43	0.98	43.9 $\pm$ 4.00	0.98	67.4 $\pm$ 1.53
	neg	125	89.3 $\pm$ 4.90	250	68.2 $\pm$ 2.66	125	83.4 $\pm$ 3.32
Norfloxacin						Nystatin	

against Gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 and 43866) and *Enterococcus faecalis* strain, with very low MIC values (0.49–15.63  $\mu\text{g/mL}$ ). DHA also demonstrates activity against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae*, and *Candida albicans* at higher concentrations (15.63–62.5  $\mu\text{g/mL}$ ).

antimicrobiana, particularmente contra bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923 e 43866) e *Enterococcus faecalis*, com valores de CIM muito baixos (0,49–15,63  $\mu\text{g/mL}$ ). O **DHA** também demonstra atividade contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans* em concentrações mais elevadas (15,63–62,5  $\mu\text{g/mL}$ ).

On the other hand, the structural modifications of compounds **DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2**, and **DHA\_Azo0** resulted in a decrease in antimicrobial activity compared to the parent compound **DHA**, with MIC values ranging from 31.25–125 µg/mL for all derivatives against all strains. Additionally, light exposure conditions did not show significant differences on the MIC values for all tested compounds.

Considering the biofilm inhibition evaluation, MBIC and percentage biofilm inhibition (BI) values were evaluated against all the strains. However, *E. faecalis* and *C. albicans* did not exhibit significant biofilm formation through this assay. The results for the strains *S. aureus* (ATCC 25923 and 43866), *E. coli*, *P. aeruginosa* and *S. cerevisiae* are reported in Table 2.

**DHA** showed a strong ability to inhibit biofilm formation against all strains with low MBIC values (7.81–125 µg/mL). The azo-functionalized derivatives (**DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2**, **DHA\_Azo0**) exhibit markedly reduced antibiofilm activity, requiring much higher concentrations. Additionally, light-induced isomerization showed minimal effect on the MBIC values for all tested compounds.

## Discussion

This study investigated the antimicrobial and antibiofilm properties of dehydroabietic acid (**DHA**) and its azo-functionalized derivatives against clinically relevant pathogenic agents, addressing the urgent need for novel antimicrobial strategies to combat resistant infections. The present investigation aimed to evaluate antimicrobial potency (MIC and MBC), assess antibiofilm activity (MBIC), determine the impact of light-induced isomerization on azo derivatives, and establish structure-activity relationships. The significance lies in exploring how targeted chemical modifications and photoresponsive properties can modulate the biological activity of natural diterpenes, potentially leading to improved therapeutic agents, while understanding these relationships will greatly enhance the development of next-generation antimicrobials that can overcome both planktonic and biofilm-mediated resistance mechanisms.

Por outro lado, as modificações estruturais nos compostos **DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2** e **DHA\_Azo0** resultaram numa diminuição da atividade antimicrobiana em comparação com o composto original **DHA**, com valores de CIM variando de 31,25 a 125 µg/mL para todos os derivados contra todas as estirpes. Além disso, as condições de exposição à luz não mostram diferenças significativas nos valores de CIM para todos os compostos testados.

Considerando a avaliação da inibição do biofilme, os valores de MBIC e percentagem de inibição do biofilme (BI) foram avaliados contra todas as estirpes. No entanto, *E. faecalis* e *C. albicans* não exibiram formação significativa de biofilme através deste ensaio. Os resultados para as estirpes *S. aureus* (ATCC 25923 e 43866), *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae* são apresentados na Tabela 2.

O **DHA** mostrou forte capacidade de inibir a formação de biofilme contra todas as estirpes com baixos valores de MBIC (7,81–125 µg/mL). Os derivados azo-funcionalizados (**DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2**, **DHA\_Azo0**) apresentam atividade antibiofilme significativamente reduzida, exigindo concentrações muito mais elevadas. Além disso, a isomerização induzida pela luz mostrou efeito mínimo nos valores de MBIC para todos os compostos testados.

## Discussão

Este estudo investigou as propriedades antimicrobianas e antibiofilme do ácido desidroabético (**DHA**) e seus derivados azo-funcionalizados contra agentes patogênicos clinicamente relevantes, abordando a necessidade urgente de novas estratégias antimicrobianas para combater infecções resistentes. A presente investigação teve como objetivo avaliar a potência antimicrobiana (MIC e MBC), avaliar a atividade antibiofilme (MBIC), determinar o impacto da isomerização induzida pela luz nos derivados azo e estabelecer relações estrutura-atividade. A importância reside em explorar como modificações químicas direcionadas e propriedades fotorresponsivas podem modular a atividade biológica dos diterpenos naturais, levando potencialmente a agentes terapêuticos melhorados, enquanto a compreensão dessas relações irá melhorar significativamente o desenvolvimento de antimicrobianos de última geração que podem superar os mecanismos de resistência planctônicos e mediados por biofilme.

### Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) assessment revealed the potent antimicrobial activity of dehydroabietic acid (**DHA**) against Gram-positive bacteria, particularly *Staphylococcus aureus*. **DHA** demonstrated remarkable inhibitory effects against *S. aureus* ATCC 25923 and ATCC 43866, with MIC values as low as 0.98–3.91 µg/mL, confirming its strong efficacy against these clinically relevant pathogens. This activity extends to *Enterococcus faecalis*, another significant nosocomial pathogen, where **DHA** showed MIC values ranging from 0.98 to 1.95 µg/mL, highlighting its potential against hospital-acquired infections. Against Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*), **DHA** exhibited higher MIC values (62.5–125 µg/mL), which is consistent with the intrinsic resistance mechanisms of these organisms, particularly their outer membrane barrier that limits compound penetration. Nevertheless, these MIC values continue to be relevant considering the inherent resistance of Gram-negative bacteria. **DHA** also displayed notable antifungal activity against *Candida albicans* (MIC = 15.63–31.25 µg/mL) and *Saccharomyces cerevisiae* (MIC = 31.25–62.5 µg/mL), demonstrating its broad-spectrum potential.

The antimicrobial activity observed for **DHA** in our study is consistent with previous reports (32). Several mechanisms have been proposed to explain its action, with membrane disruption being the most widely accepted (37). **DHA**'s lipophilic structure allows it to insert into bacterial membranes, compromising their integrity. This leads to increased permeability, leakage of intracellular components, and ultimately, cell death through lysis (38).

However, recent studies suggest that **DHA**'s effects may extend beyond membrane damage. Guo et al. (39) reported that **DHA** can interfere with key cellular processes, including respiration and ATP synthesis, likely through disruption of the electron transport chain. Additionally, its carboxylic acid group may contribute to intracellular acidification via proton exchange, further impairing bacterial viability (39). There is also emerging evidence pointing to other possible targets. Qi et al. (40) proposed that **DHA** might interact with bacterial DNA or inhibit enzymes involved in cell wall biosynthesis, suggesting a more complex and multifactorial mode of action.

### Concentração inibitória mínima (MIC)

A avaliação da concentração inibitória mínima (MIC) revelou a potente atividade antimicrobiana do ácido desidroabiético (**DHA**) contra bactérias Gram-positivas, particularmente *Staphylococcus aureus*. O **DHA** demonstrou efeitos inibidores notáveis contra o *S. aureus* ATCC 25923 e ATCC 43866, com valores de CIM tão baixos quanto 0,98–3,91 µg/mL, confirmando a sua forte eficácia contra esses patógenos clinicamente relevantes. Esta atividade estende-se ao *Enterococcus faecalis*, outro patógeno nosocomial significativo, onde o **DHA** apresentou valores de CIM que variaram de 0,98 a 1,95 µg/mL, destacando o seu potencial contra infecções hospitalares. Contra bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*), o **DHA** apresentou valores de CIM mais elevados (62,5–125 µg/mL), o que é consistente com os mecanismos de resistência intrínsecos desses organismos, particularmente a sua barreira de membrana externa que limita a penetração do composto. No entanto, esses valores de CIM continuam a ser relevantes, considerando a resistência inerente das bactérias Gram-negativas. O **DHA** também apresentou notável atividade antifúngica contra *Candida albicans* (CIM = 15,63–31,25 µg/mL) e *Saccharomyces cerevisiae* (CIM = 31,25–62,5 µg/mL), demonstrando seu potencial de amplo espectro.

A atividade antimicrobiana observada para o **DHA** no nosso estudo é consistente com relatórios anteriores (32). Vários mecanismos foram propostos para explicar a sua ação, sendo a ruptura da membrana o mais amplamente aceito (37). A estrutura lipofílica do **DHA** permite que ele se insira nas membranas bacterianas, comprometendo a sua integridade. Isso leva ao aumento da permeabilidade, ao vazamento de componentes intracelulares e, por fim, à morte celular por lise (38).

No entanto, estudos recentes sugerem que os efeitos do **DHA** podem ir além dos danos à membrana. Guo et al. (39) relataram que o **DHA** pode interferir em processos celulares essenciais, incluindo a respiração e a síntese de ATP, provavelmente através da interrupção da cadeia de transporte de elétrons. Além disso, o seu grupo de ácido carboxílico pode contribuir para a acidificação intracelular através da troca de prótons, prejudicando ainda mais a viabilidade bacteriana (39). Também há evidências emergentes que apontam para outros alvos possíveis. Qi et al. (40) propuseram que o **DHA** pode interagir com o ADN bacteriano ou inibir enzimas envolvidas na biossíntese da parede celular, sugerindo um modo de ação mais complexo e multifatorial.

In stark contrast, all three azo-functionalized derivatives (**DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2**, and **DHA\_Azo0**) showed dramatically reduced antimicrobial potency across all tested microorganisms. Against *S. aureus* ATCC 25923, the MIC values represent a 64–128-fold increase compared to **DHA**'s lowest MIC. This substantial antibacterial reduction indicates that the azo-group modifications severely compromise the parent compound's biological activity. The consistent high MIC values across different light exposure conditions (Blue, UV, Sun) for each azo derivative suggest that photoisomerization did not significantly restore antimicrobial activity. This finding aligns with recent studies on azo compounds, where structural modifications can lead to diminished biological activity compared to parent molecules (5,39). The data demonstrates that while **DHA** maintains its membrane-targeted mechanism of action, the azo derivatives lose this efficacy, likely due to altered membrane interaction properties or steric hindrance introduced by the azo-linkers.

#### Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) determinations provided crucial insights into the killing potential of **DHA** and its derivatives, distinguishing bacteriostatic from bactericidal effects. Following the observation in Gram-positive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, **DHA** demonstrated potent bactericidal activity, with MBC values closely matching its MIC values (MIC=0.98 µg/mL, MBC=3.98 µg/mL), indicating direct killing capability consistent with its known membrane-disrupting mechanism (37). This close MBC/MIC ratio suggests that **DHA** can achieve complete cell death at concentrations near its growth-inhibitory threshold. Also, for *Enterococcus faecalis*, the MBC values (1.95–7.81 µg/mL) paralleled the MIC range, demonstrating effective killing activity. However, against Gram-negative bacteria (*E. coli* and *P. aeruginosa*), MBC determination often yielded values equal to the highest tested concentration (500 µg/mL), indicating either limited bactericidal activity or that concentrations required for killing exceed the tested range. This observation is consistent with the general challenge of achieving bactericidal effects against Gram-negative bacteria due to their robust outer membrane barrier (41). The

Em contraste, todos os três derivados funcionalizados com azo (**DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2** e **DHA\_Azo0**) mostraram uma redução dramática na potência antimicrobiana em todos os microrganismos testados. Contra o *S. aureus* ATCC 25923, os valores de CIM representam um aumento de 64 a 128 vezes em comparação com a CIM mais baixa do **DHA**. Esta redução antibacteriana substancial indica que as modificações do grupo azo comprometem gravemente a atividade biológica do composto original. Os valores consistentemente elevados de CIM em diferentes condições de exposição à luz (azul, UV, sol) para cada derivado azo sugerem que a fotoisomerização não restaurou significativamente a atividade antimicrobiana. Esta descoberta está em consonância com estudos recentes sobre compostos com grupos azo, nos quais modificações estruturais podem levar à diminuição da atividade biológica em comparação com as moléculas originais (5, 39). Os dados demonstram que, enquanto o **DHA** mantém o seu mecanismo de ação direcionado à membrana, os derivados azo perdem essa eficácia, provavelmente devido às propriedades alteradas de interação com a membrana ou ao impedimento estérico introduzido pelos ligantes azo.

#### Concentração bactericida mínima (MBC)

As determinações da concentração bactericida mínima (MBC) forneceram informações cruciais sobre o potencial letal do **DHA** e seus derivados, distinguindo os efeitos bacteriostáticos dos bactericidas. Seguindo a observação no *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 Gram-positivo, o **DHA** demonstrou potente atividade bactericida, com valores de MBC muito próximos dos seus valores de MIC (MIC = 0,98 µg/mL, MBC = 3,98 µg/mL), indicando capacidade de eliminação direta consistente com o seu mecanismo conhecido de ruptura da membrana (41). Esta relação MBC/MIC próxima sugere que o **DHA** pode alcançar a morte celular completa em concentrações próximas do seu limiar de inibição do crescimento. Além disso, para *Enterococcus faecalis*, os valores de MBC (1,95–7,81 µg/mL) foram paralelos à faixa de MIC, demonstrando atividade de destruição eficaz. No entanto, contra bactérias Gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), a determinação de MBC frequentemente produziu valores iguais à concentração mais alta testada (500 µg/mL), indicando atividade bactericida limitada ou que as concentrações necessárias para a destruição excedem a faixa testada. Esta observação é consistente com o desafio geral de alcançar efeitos bactericidas contra bactérias Gram-negativas devido à sua robusta barreira da membrana externa (41). Os

azo-functionalized derivatives exhibited severely compromised bactericidal activity, with MBC values consistently much higher than their MICs. This pattern indicates that even when these derivatives can inhibit growth, they struggle to achieve complete bacterial killing, suggesting a primarily bacteriostatic effect or reduced membrane-disrupting capability. The minimal variation in MBC values among different light conditions for the same azo derivative further supports that photoisomerization did not significantly enhance their killing potential (42). These findings highlight the importance of the parent **DHA** structure for effective bactericidal activity and demonstrate how structural modifications can shift the mode of action from bactericidal to bacteriostatic or render compounds ineffective at achievable concentrations (43).

#### *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC)*

The Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) assessment demonstrated **DHA**'s exceptional ability to prevent biofilm formation, particularly against *Staphylococcus aureus* strains. **DHA** achieved significant biofilm inhibition (>70%) at concentrations as low as 7.81 µg/mL against *S. aureus* ATCC 25923, indicating its potent interference with early adhesion or quorum sensing pathways for biofilm development, as previously reported (44,45). This dual activity, effective against both planktonic cells and biofilms, reduces the likelihood of resistance development and enhances therapeutic potential against biofilm-mediated infections (46,47).

*E. faecalis* and *C. albicans* did not exhibit significant biofilm formation under the specific assay conditions used, preventing MBIC determination for these strains, a limitation also observed in other biofilm studies dependent on strain behavior and assay parameters (4). The azo-functionalized derivatives showed markedly reduced antibiofilm activity, with MBIC values significantly higher than **DHA**'s, hence, demonstrating minimal biofilm inhibition at the highest tested concentrations. The MBIC values for azo derivatives against *S. aureus* ATCC 25923 ranged from 125 µg/mL to 500 µg/mL, representing a 16-64 fold increase compared to **DHA**'s MBIC of 7.81 µg/mL. This substantial reduction indicates that the structural modifications introduced by azo-functionalization severely compromise the compound's ability to

derivados funcionalizados com azo exibiram atividade bactericida severamente comprometida, com valores de MBC consistentemente muito superiores aos seus MICs. Este padrão indica que, mesmo quando estes derivados podem inibir o crescimento, eles têm dificuldade em matar completamente as bactérias, sugerindo um efeito principalmente bacteriostático ou capacidade reduzida de romper a membrana. A variação mínima nos valores de MBC entre diferentes condições de luz para o mesmo derivado azo reforça ainda mais que a fotoisomerização não aumentou significativamente o seu potencial de eliminação (42). Essas descobertas destacam a importância da estrutura **DHA** original para uma atividade bactericida eficaz e demonstram como as modificações estruturais podem alterar o modo de ação de bactericida para bacteriostático ou tornar os compostos ineficazes em concentrações alcançáveis (43).

#### *Concentração mínima inibidora de biofilme (MBIC)*

A avaliação da concentração mínima inibidora de biofilme (MBIC) demonstrou a capacidade excepcional do **DHA** de prevenir a formação de biofilme, particularmente contra estirpes de *Staphylococcus aureus*. O **DHA** alcançou uma inibição significativa do biofilme (>70%) em concentrações tão baixas quanto 7,81 µg/mL contra o *S. aureus* ATCC 25923, indicando sua potente interferência nas vias de adesão precoce ou quorum sensing para o desenvolvimento do biofilme, conforme relatado anteriormente (44,45). Esta dupla atividade, eficaz contra células planctônicas e biofilmes, reduz a probabilidade de desenvolvimento de resistência e aumenta o potencial terapêutico contra infecções mediadas por biofilmes (46,47).

*E. faecalis* e *C. albicans* não exibiram formação significativa de biofilme nas condições específicas do ensaio utilizado, impedindo a determinação do MBIC para essas estirpes, uma limitação também observada em outros estudos de biofilme dependentes do comportamento da estirpe e dos parâmetros do ensaio (4). Os derivados funcionalizados com azo mostraram uma atividade antibiofilme significativamente reduzida, com valores de MBIC significativamente mais elevados do que os do **DHA**, demonstrando, portanto, uma inibição mínima do biofilme nas concentrações mais elevadas testadas. Os valores de MBIC para os derivados azo contra *S. aureus* ATCC 25923 variaram de 125 µg/mL a 500 µg/mL, representando um aumento de 16 a 64 vezes em comparação com o MBIC do **DHA** de 7,81 µg/mL. Esta redução substancial indica que as modificações estruturais introduzidas pela funcionalização azo comprometem gravemente a capacidade do

prevent biofilm formation, an imperative therapeutic property for combating persistent infections (48). The azo derivatives also showed poor activity against *E. coli*, *P. aeruginosa*, and *S. cerevisiae* biofilms, with MBIC values typically at the upper limit of the tested range (125-500 µg/mL) or no significant inhibition observed. These findings align with recent research emphasizing that structural modifications of natural antimicrobials can significantly impact their antibiofilm properties (35,40,49).

Importantly, the MBIC values for azo derivatives showed, once more, little variation across different light exposure conditions, reinforcing that photoisomerization under these experimental conditions did not significantly influence their compromised antibiofilm activity.

The investigation into the influence of light-induced isomerization on the antimicrobial activity of the photoresponsive azo derivatives under UV, blue light, and sunlight exposure yielded intriguing results. Based on observation and results obtained, the different light exposure conditions had minimal impact on the MIC, MBC, or MBIC values of the azo-functionalized derivatives. This suggests that the isomerization process, under the specific conditions and timeframes used in this study, did not significantly alter the antimicrobial or antibiofilm potency of these compounds. This observation varied with some studies on azo compounds where photoisomerization led to notable changes in biological activity, although the effects are highly compound- and context-dependent (5,50). The lack of effect might be due to the already compromised intrinsic activity of the azo derivatives, or the specific wavelengths and exposure times used, which may not have induced sufficient or functionally relevant conformational changes. The consistent activity across different light conditions implies that the primary factor influencing the reduced efficacy of the azo derivatives is the structural modification itself rather than the photochemical state of the azo bond under these experimental parameters.

composto de prevenir a formação de biofilme, uma propriedade terapêutica imperativa para combater infecções persistentes (48). Os derivados azo também mostraram pouca atividade contra biofilmes de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. cerevisiae*, com valores de MBIC tipicamente no limite superior da faixa testada (125-500 µg/mL) ou sem inibição significativa observada. Essas descobertas estão alinhadas com pesquisas recentes que enfatizam que modificações estruturais de antimicrobianos naturais podem impactar significativamente suas propriedades antibiofilme (35,40,49).

É importante ressaltar que os valores de MBIC para os derivados azo mostraram, mais uma vez, pouca variação entre as diferentes condições de exposição à luz, reforçando que a fotoisomerização nessas condições experimentais não influenciou significativamente a sua atividade antibiofilme comprometida.

A investigação sobre a influência da isomerização induzida pela luz na atividade antimicrobiana dos derivados azo fotossensíveis sob exposição à luz UV, luz azul e luz solar produziu resultados intrigantes. Com base na observação e nos resultados obtidos, as diferentes condições de exposição à luz tiveram um impacto mínimo nos valores de MIC, MBC ou MBIC dos derivados funcionalizados com azo. Isto sugere que o processo de isomerização, nas condições e prazos específicos utilizados neste estudo, não alterou significativamente a potência antimicrobiana ou antibiofilme destes compostos. Esta observação variou com alguns estudos sobre compostos azo, nos quais a fotoisomerização levou a mudanças notáveis na atividade biológica, embora os efeitos sejam altamente dependentes do composto e do contexto (5,50). A ausência de efeito pode ser devida à atividade intrínseca já comprometida dos derivados azo ou aos comprimentos de onda e tempos de exposição específicos utilizados, que podem não ter induzido alterações conformacionais suficientes ou funcionalmente relevantes. A atividade consistente em diferentes condições de luz implica que o principal fator que influencia a eficácia reduzida dos derivados azo é a própria modificação estrutural, e não o estado fotoquímico da ligação azo sob estes parâmetros experimentais.

## Conclusion

This study demonstrates that dehydroabiatic acid (**DHA**) possesses significant antimicrobial and antibiofilm activity, particularly against Gram-positive pathogens such as *Staphylococcus aureus*. The parent compound **DHA** exhibited potent inhibitory effects (low MIC values 0.49–125 µg/mL) and strong biofilm inhibition (MBIC as low as 7.81–125 µg/mL), confirming its potential as a promising lead scaffold for developing new antimicrobial agents. However, the introduction of azo-functionalized groups (**DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2**, **DHA\_Azo0**) significantly compromised both antimicrobial potency and antibiofilm efficacy, as evidenced by substantially higher MIC, MBC, and MBIC values across all tested microorganisms. While the photoresponsive nature of the azo derivatives was investigated, light-induced isomerization under UV, blue light, or sunlight exposure did not significantly enhance or restore their diminished biological activity compared to **DHA**. The structure-activity relationship analysis indicates that the azo modifications negatively impact the essential biological functions of the **DHA** core structure. These findings highlight the importance of the native **DHA** scaffold for antimicrobial and antibiofilm activity and suggest that the specific azo-functionalization approach used here is detrimental to biological efficacy. Therefore, while **DHA** itself represents a valuable natural product lead with dual activity against planktonic and biofilm-associated bacteria, alternative strategies for modifying this core structure would be necessary to develop improved derivatives with retained or enhanced therapeutic potential.

## Authors Contributions Statement

X.J.-B. and P.R. conceptualization and study design; A.R.-S. and V.M.S.I. experimental implementation; A.R.-S., V.M.S.I. and F.O.O. data analysis; A.R.-S., V.M.S.I. and F.O.O. drafting, editing and reviewing; A.R.-S., V.M.S.I. and F.O.O. figures and graphics; X.J.-B. and P.R., supervision and final writing.

## Conclusão

Este estudo demonstra que o ácido desidroabiético (**DHA**) possui atividade antimicrobiana e antibiofilme significativa, particularmente contra patógenos Gram-positivos, como o *Staphylococcus aureus*. O composto original **DHA** exibiu efeitos inibidores potentes (baixos valores de MIC 0,49–125 µg/mL) e forte inibição de biofilme (MBIC tão baixo quanto 7,81–125 µg/mL), confirmando o seu potencial como uma estrutura promissora para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. No entanto, a introdução de grupos funcionalizados com azo (**DHA\_Azo1**, **DHA\_Azo2**, **DHA\_Azo0**) comprometeu significativamente tanto a potência antimicrobiana quanto a eficácia antibiofilme, conforme evidenciado por valores substancialmente mais altos de MIC, MBC e MBIC em todos os microrganismos testados. Embora a natureza fotossensível dos derivados azo tenha sido investigada, a isomerização induzida pela exposição à luz UV, azul, ou solar não aumentou ou restaurou significativamente a sua biológica em comparação com o **DHA**. A análise da relação estrutura-atividade indica que as modificações azoicas afetam negativamente as funções biológicas essenciais da estrutura central do **DHA**. Essas descobertas destacam a importância da estrutura nativa do **DHA** para a atividade antimicrobiana e antibiofilme e sugerem que a abordagem específica de funcionalização azo usada aqui é prejudicial à eficácia biológica. Portanto, embora o **DHA** em si represente um valioso produto natural com dupla atividade contra bactérias planctônicas e associadas ao biofilme, estratégias alternativas para modificar essa estrutura central seriam necessárias para desenvolver derivados aprimorados com potencial terapêutico mantido ou aprimorado.

## Declaração de contribuições dos autores

X.J.-B. e P.R. conceituação e desenho do estudo; A.R.-S. e V.M.S.I. implementação experimental; A.R.-S., V.M.S.I. e F.O.O. análise de dados; A.R.-S., V.M.S.I. e F.O.O. redação, edição e revisão; A.R.-S., V.M.S.I. e F.O.O. figuras e gráficos; X.J.-B. e P.R., supervisão e redação final.

## **Funding**

This work was supported by Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) through the project UID/04567/2025 (DOI: 10.54499/UID/04567/2025) (CBIOS). The authors acknowledge financial support from MICIN (PID2022-139257NB-I00). The authors also acknowledge COST Action EURESTOP for the financial support provided through a Short-Term Scientific Mission (STSM) grant.

## **Conflict of Interest**

The authors declare there are no financial and/or personal relationships that could present a potential conflict of interests. The editor involved in this manuscript's authorship had no participation in the review or decision process.

## **Financiamento**

Este trabalho foi apoiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT) através do projeto UID/04567/2025 (DOI: 10.54499/UID/04567/2025) (CBIOS). Os autores agradecem o apoio financeiro do MICIN (PID2022-139257NB-I00). Os autores também agradecem à COST Action EURESTOP pelo apoio financeiro concedido através de uma bolsa de Missão Científica de Curta Duração (STSM).

## **Conflito de interesses**

Os autores declaram que não existem relações financeiras e/ou pessoais que possam representar um potencial conflito de interesses. A editora envolvida na autoria deste manuscrito não participou no processo de revisão ou decisão.

## References / Referências

- Puri, B., Vaishya, R., & Vaish, A. (2025). Antimicrobial resistance: Current challenges and future directions. *Medical Journal, Armed Forces India*, 81(3), 247–258. <https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2024.07.006>
- Salam, M. A., Al-Amin, M. Y., Salam, M. T., Pawar, J. S., Akhter, N., Rabaan, A. A., & Alqumber, M. A. A. (2023). Antimicrobial Resistance: A Growing Serious Threat for Global Public Health. *Healthcare (Basel, Switzerland)*, 11(13), 1946. <https://doi.org/10.3390/healthcare11131946>
- Alam, S., Dhar, A., Hasan, M., Richi, F. T., Emon, N. U., Aziz, M. A., Mamun, A. A., Chowdhury, M. N. R., Hossain, M. J., Kim, J. K., Kim, B., Hasib, M. S., Zihad, S. M. N. K., Haque, M. R., Mohamed, I. N., & Rashid, M. A. (2022). Antidiabetic Potential of Commonly Available Fruit Plants in Bangladesh: Updates on Prospective Phytochemicals and Their Reported MoAs. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(24), 8709. <https://doi.org/10.3390/molecules27248709>
- Soares, A., Alexandre, K., & Etienne, M. (2020). Tolerance and Persistence of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms Exposed to Antibiotics: Molecular Mechanisms, Antibiotic Strategies and Therapeutic Perspectives. *Frontiers in microbiology*, 11, 2057. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02057>
- Di Martino, M., Sessa, L., Di Matteo, M., Panunzi, B., Piotta, S., & Concilio, S. (2022). Azobenzene as Antimicrobial Molecules. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(17), 5643. <https://doi.org/10.3390/molecules27175643>
- Flemming, H. C., van Hullebusch, E. D., Little, B. J., Neu, T. R., Nielsen, P. H., Seviour, T., Stoodley, P., Wingender, J., & Wuertz, S. (2025). Microbial extracellular polymeric substances in the environment, technology and medicine. *Nature reviews. Microbiology*, 23(2), 87–105. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01098-y>
- Huang, W., Wang, Y., Tian, W., Cui, X., Tu, P., Li, J., Shi, S., & Liu, X. (2022). Biosynthesis Investigations of Terpenoid, Alkaloid, and Flavonoid Antimicrobial Agents Derived from Medicinal Plants. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 11(10), 1380. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11101380>
- Hashim, S.E., Basar, N., Abd Samad, A., Jamil, S., Bakar, M. B., Jamalis, J., Abd-Aziz, N., Wagiran, A., Mohd Abd Razak, M. R., Samad, A. F. A. (2025) Advancing alkaloid-based medicines: medical applications, scalable production and synthetic innovations. *Phytochemistry Reviews*, 24, 4653–4681 (2025). <https://doi.org/10.1007/s11101-024-10050-0>
- Karalija, E., Macanović, A., & Ibragić, S. (2025). Revisiting Traditional Medicinal Plants: Integrating Multiomics, In Vitro Culture, and Elicitation to Unlock Bioactive Potential. *Plants (Basel, Switzerland)*, 14(13), 2029. <https://doi.org/10.3390/plants14132029>
- De Filippis, B., Della Valle, A., Ammazalorso, A., Maccallini, C., Tesse, G., Amoroso, R., Mollica, A., & Giampietro, L. (2024). Azobenzene as Multi-Targeted Scaffold in Medicinal Chemistry. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 29(24), 5872. <https://doi.org/10.3390/molecules29245872>
- Wainwright, M., Maisch, T., Nonell, S., Plaetzer, K., Almeida, A., Tegos, G. P., & Hamblin, M. R. (2017). Photoantimicrobials-are we afraid of the light?. *The Lancet. Infectious diseases*, 17(2), e49–e55. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)30268-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30268-7)
- Velema, W. A., van der Berg, J. P., Hansen, M. J., Szymanski, W., Driessen, A. J., & Feringa, B. L. (2013). Optical control of antibacterial activity. *Nature chemistry*, 5(11), 924–928. <https://doi.org/10.1038/nchem.1750>
- Velema, W. A., Hansen, M. J., Lerch, M. M., Driessen, A. J., Szymanski, W., & Feringa, B. L. (2015). Ciprofloxacin-Photoswitch Conjugates: A Facile Strategy for Photopharmacology. *Bioconjugate chemistry*, 26(12), 2592–2597. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.5b00591>
- Hu, Y., Marlow, J. B., Ramanathan, R., Zou, W., Tiew, H. G., Pottage, M. J., Bansal, V., Tabor, R. F., Wilkinson, B. L. (2015) Synthesis and properties of photoswitchable carbohydrate fluorosurfactants. *Australian Journal of Chemistry*, 68,1880. <https://doi.org/10.1071/CH15434>
- Wegener, M., Hansen, M. J., Driessen, A. J. M., Szymanski, W., & Feringa, B. L. (2017). Photocontrol of Antibacterial Activity: Shifting from UV to Red Light Activation. *Journal of the American Chemical Society*, 139(49), 17979–17986. <https://doi.org/10.1021/jacs.7b09281>
- Yeoh, Y. Q., Yu, J., Polyak, S. W., Horsley, J. R., & Abell, A. D. (2018). Photopharmacological Control of Cyclic Antimicrobial Peptides. *ChemBiochem: a European journal of chemical biology*, 19(24), 2591–2597. <https://doi.org/10.1002/cbic.201800618>
- Cheng, H. B., Li, X., Kwon, N., Fang, Y., Baek, G., & Yoon, J. (2019). Photoswitchable phthalocyanine-assembled nanoparticles for controlled "double-lock" photodynamic therapy. *Chemical communications (Cambridge, England)*, 55(82), 12316–12319. <https://doi.org/10.1039/c9cc03960k>
- Yeoh, Y. Q., Horsley, J. R., Yu, J., Polyak, S. W., Jovcevski, B., & Abell, A. D. (2020). Short Photoswitchable Antibacterial Peptides. *ChemMedChem*, 15(16), 1505–1508. <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000280>
- Just-Baringo, X., Yeste-Vázquez, A., Moreno-Morales, J., Ballesté-Delpierre, C., Vila, J., & Giral, E. (2021). Controlling Antibacterial Activity Exclusively with Visible Light: Introducing a Tetra-ortho-Chloro-Azobenzene Amino Acid. *Chemistry (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, 27(51), 12987–12991. <https://doi.org/10.1002/chem.202102370>
- Fan, Y., El Rhaz, A., Maisonneuve, S., Gillon, E., Fatthalla, M., Le Bideau, F., Laurent, G., Messaoudi, S., Imbert, A., & Xie, J. (2024). Photoswitchable glycoligands targeting *Pseudomonas aeruginosa* LecA. *Beilstein journal of organic chemistry*, 20, 1486–1496. <https://doi.org/10.3762/bjoc.20.132>
- de Almeida Moreira, B. R., Cruz, V. H., Junior, M. R. B., Lopes, P. R. M., da Silva, R. P. (2023) Biomass off-gassing: A mini-review and meta-analysis aspiring to inspire future research and innovation in solid biofuels for safety-sensitive and environmentally responsible residential and industrial applications. *Industrial Crops and Products*, 205, 117508. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2023.117508>
- Pereira, M., Matias, D., Pereira, F., Reis, C. P., Simões, M. F., Rijo P. (2015) Antimicrobial screening of *Plectranthus madagascariensis* and *P. neochilus* extracts. *Biomedical and Biopharmaceutical Research*, 12 (1), 127. doi: 10.19277/BBR.12.1.111.
- Isca, V. M. S., Andrade, J., Fernandes, A. S., Paixão, P., Uriel, C., Gómez, A. M., Duarte, N., & Rijo, P. (2020). In Vitro Antimicrobial Activity of Isopimarane-Type Diterpenoids. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(18), 4250. <https://doi.org/10.3390/molecules25184250>
- Śliwiński, T., Sitarek, P., Skała, E., Isca, V. M. S., Synowiec, E., Kowalczyk, T., Bijak, M., & Rijo, P. (2020). Diterpenoids from *Plectranthus* spp. as Potential Chemotherapeutic Agents via Apoptosis. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(6), 123. <https://doi.org/10.3390/ph13060123>
- Filipe, M. S., Domínguez-Martín, E. M., Pires, T. C. S. P., Finimundy, T. C., Melgar, B., Mandim, F., Isca, V. M. S., Pereira, R., Teixidó-Trujillo, S., Capote, N. A., Nikolić, M., Filipović, N., Díaz-Lanza, A. M., Figueiredo, A. C., Barros, L., & Rijo, P. (2024). Biological Activity

- of 6,7-Dehydroxyroyleanone and Derivatives Obtained from *Plectranthus aliciae* (Codd) A.J.Paton. *ACS omega*, 9(16), 18113–18118. <https://doi.org/10.1021/acsomega.3c10071>
26. Isca, V. M. S., Sitarek, P., Merecz-Sadowska, A., Małecka, M., Owczarek, M., Wiecewicz, J., Zajdel, R., Nowak, P., Rijo, P., & Kowalczyk, T. (2024). Anticancer Effects of Abietane Diterpene 7 $\alpha$ -Acetoxy-6 $\beta$ -hydroxyroyleanone from *Plectranthus grandidentatus* and Its Semi-Synthetic Analogs: An In Silico Computational Approach. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 29(8), 1807. <https://doi.org/10.3390/molecules29081807>
  27. Antão, A. R., Bangay, G., Domínguez-Martín, E. M., Díaz-Lanza, A. M., & Rijo, P. (2021). *Plectranthus ecklonii* Benth: A Comprehensive Review Into its Phytochemistry and Exerted Biological Activities. *Frontiers in pharmacology*, 12, 768268. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.768268>
  28. Ntungwe, E. N., Tchana, A. N., & Abia, W. A. (2024). Mycotoxin management: exploring natural solutions for mycotoxin prevention and detoxification in food and feed. *Mycotoxin research*, 40(4), 519–534. <https://doi.org/10.1007/s12550-024-00562-1>
  29. Faustino, C., Neto, Í., Fonte, P., & Macedo, A. (2018). Cytotoxicity and Chemotherapeutic Potential of Natural Rosin Abietane Diterpenoids and their Synthetic Derivatives. *Current pharmaceutical design*, 24(36), 4362–4375. <https://doi.org/10.2174/1381612825666190112162817>
  30. Sousa, J. L. C., Ramos, P. A. B., Freire, C. S. R., Silva, A. M. S., & Silvestre, A. J. D. (2018). Chemical Composition of Lipophilic Bark Extracts from *Pinus pinaster* and *Pinus pinea* Cultivated in Portugal. *Applied Sciences*, 8(12), 2575. <https://doi.org/10.3390/app8122575>
  31. Brito, E., Gomes, E., Falé, P. L., Borges, C., Pacheco, R., Teixeira, V., Machuqueiro, M., Ascensão, L., & Serralheiro, M. L. M. (2018). Bioactivities of decoctions from *Plectranthus* species related to their traditional use on the treatment of digestive problems and alcohol intoxication. *Journal of ethnopharmacology*, 220, 147–154. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.006>
  32. Neto, Í., Domínguez-Martín, E. M., Ntungwe, E., Reis, C. P., Pesic, M., Faustino, C., & Rijo, P. (2021). Dehydroabietic Acid Microencapsulation Potential as Biofilm-Mediated Infections Treatment. *Pharmaceutics*, 13(6), 825. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060825>
  33. Shi, K., Liang, B., Cheng, H. Y., Wang, H. C., Liu, W. Z., Li, Z. L., Han, J. L., Gao, S. H., & Wang, A. J. (2024). Regulating microbial redox reactions towards enhanced removal of refractory organic nitrogen from wastewater. *Water research*, 258, 121778. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2024.121778>
  34. Xu, Z., Wu, B., Wu, C., Chen, Q., Xu, K., Shi, Z., Rao, X., Niu, Y. (2025) Antifungal properties and preservation applications of resin acid modified chitosan derivatives. *Food Bioscience*, 66,106204. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2025.106204>
  35. Grigoropoulou, S., Manou, D., Antoniou, A. I., Tsirogianni, A., Siciliano, C., Theocharis, A. D., & Athanassopoulos, C. M. (2022). Synthesis and Antiproliferative Activity of Novel Dehydroabietic Acid-Chalcone Hybrids. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(11), 3623. <https://doi.org/10.3390/molecules27113623>
  36. CLSI (2020) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th Edition, CLSI Supplement M100. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
  37. Chen, Y. Z., Zhang, Y. D., Chen, C., Sa, Q. E., Yang, J., & Zhang, G. C. (2025). The Antifungal Activity and Mechanism of Dehydroabietic Acid Against *Alternaria alternata* Causing Poplar Leaf Spot. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 11(4), 265. <https://doi.org/10.3390/jof11040265>
  38. Angelini P. (2024). Plant-Derived Antimicrobials and Their Crucial Role in Combating Antimicrobial Resistance. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, 13(8), 746. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13080746>
  39. Guo, J., Yang, W. T., Mai, F. Y., Liang, J. R., Luo, J., Zhou, M. C., Yu, D. D., Wang, Y. L., & Li, C. G. (2024). Unravelling oncosis: morphological and molecular insights into a unique cell death pathway. *Frontiers in immunology*, 15, 1450998. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1450998>
  40. Qi, P., Wang, N., Zhang, T., Feng, Y., Zhou, X., Zeng, D., Meng, J., Liu, L., Jin, L., & Yang, S. (2023). Anti-Virulence Strategy of Novel Dehydroabietic Acid Derivatives: Design, Synthesis, and Antibacterial Evaluation. *International journal of molecular sciences*, 24(3), 2897. <https://doi.org/10.3390/ijms24032897>
  41. Zai, M. J., Cock, I. E., & Cheesman, M. J. (2025). Plant Metabolites as Potential Agents That Potentiate or Block Resistance Mechanisms Involving  $\beta$ -Lactamases and Efflux Pumps. *International journal of molecular sciences*, 26(12), 5550. <https://doi.org/10.3390/ijms26125550>
  42. Yang, X., Zhou, X., Qin, X., Liang, D., Dong, X., Ji, H., Wen, S., Du, L., & Li, M. (2024). Deuteration-Driven Photopharmacology: Deuterium-Labeled AzoCholine for Controlling Alpha 7 Nicotinic Acetylcholine Receptors. *ACS pharmacology & translational science*, 7(6), 1839–1846. <https://doi.org/10.1021/acscptsci.4c00058>
  43. Hao, M., Xu, J., Wen, H., Du, J., Zhang, S., Lv, M., & Xu, H. (2022). Recent Advances on Biological Activities and Structural Modifications of Dehydroabietic Acid. *Toxins*, 14(9), 632. <https://doi.org/10.3390/toxins14090632>
  44. Fallarero, A., Skogman, M., Kujala, J., Rajaratnam, M., Moreira, V. M., Yli-Kauhaluoma, J., & Vuorela, P. (2013). (+)-Dehydroabietic acid, an abietane-type diterpene, inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *International journal of molecular sciences*, 14(6), 12054–12072. <https://doi.org/10.3390/ijms140612054>
  45. Dzięgielewska, M., Bartoszewicz, M., Książczyk, M., Dudek, B., Brożyna, M., Szymczyk-Ziółkowska, P., Gruber, P., Pawlak, J., Kozłowska, W., Zielińska, S., Fischer, J., Woytoń, A., & Junka, A. (2024). Abietic Acid as a Novel Agent against Ocular Biofilms: An In Vitro and Preliminary In Vivo Investigation. *International journal of molecular sciences*, 25(3), 1528. <https://doi.org/10.3390/ijms25031528>
  46. Carradori, S., Di Giacomo, N., Lobefalo, M., Luisi, G., Campestre, C., & Sisto, F. (2020). Biofilm and Quorum Sensing inhibitors: the road so far. *Expert opinion on therapeutic patents*, 30(12), 917–930. <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1830059>
  47. Hegazy, A. M., Shehat, M. G., Abouelfetouh, A., Teleb, M., Khattab, S. N., & Haiba, N. S. (2025). Unveiling the structural aspects of novel azo-dyes with promising anti-virulence activity against MRSA: a deep dive into the spectroscopy via integrated experimental and computational approaches. *RSC advances*, 15(3), 1665–1679. <https://doi.org/10.1039/d4ra06367h>
  48. Hegazy AM, Shehat MG, Abouelfetouh A, Teleb M, Khattab SN, Haiba NS. Unveiling the structural aspects of novel azo-dyes with promising anti-virulence activity against MRSA: a deep dive into the spectroscopy via integrated experimental and computational approaches. *RSC Adv*. 2025, 15:1665–1679. <https://doi.org/10.1039/d4ra06367h>
  49. Lu, L., Hu, W., Tian, Z., Yuan, D., Yi, G., Zhou, Y., Cheng, Q., Zhu, J., & Li, M. (2019). Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese medicine*, 14, 11. <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0232-2>
  50. Malik, H., Akhter, Z., Shahbaz, M., Yousuf, S., Munawar, K. S., Muhammad, S., Qamar, S., Abbas, A., Ashfaq, M., Ahmad, T. (2022) Synthesis, spectroscopic characterization, single crystal, theoretical investigation, and biological screenings of azo-based moieties. *Journal of Molecular Structure*, 1270,133867. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2022.133867>