

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Jéssica Araújo de Souza

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS EMODIN, CLOREXIDINA, ÁCIDO
PERACÉTICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE BIOFILMES DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE PELES HUMANAS**

Porto Alegre

2021

Jéssica Araújo de Souza

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS EMODIN, CLOREXIDINA, ÁCIDO
PERACÉTICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE BIOFILMES DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE PELES HUMANAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gertrudes Corção

Coorientadora: Dr^a. Karine Lena Meneghetti

Porto Alegre

2021

CIP - Catalogação na Publicação

Souza, Jéssica Araújo de
ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS EMODIN,
CLOREXIDINA, ÁCIDO PERACÉTICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO
SOBRE BIOFILMES DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PELES HUMANAS
/ Jéssica Araújo de Souza. -- 2021.
57 f.
Orientadora: Gertudes Corção.

Coorientadora: Karine Lena Meneghetti.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2021.

1. Aloenxerto . 2. Biofilme. 3. Antimicrobianos. I.
Corção, Gertudes, orient. II. Meneghetti, Karine
Lena, coorient. III. Título.

Jéssica Araújo de Souza

**ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS EMODIN, CLOREXIDINA, ÁCIDO
PERACÉTICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE BIOFILMES DE
BACTÉRIAS ISOLADAS DE PELES HUMANAS**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Aprovado em: 17 de maio de 2021.

BANCA EXAMINADORA

Mestre Fernando Pagnussato

Biomédico - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Mestre Diego Bertolini

Biomédico, Analista Clínico - Laboratório Weinmann

Prof^a. Dr^a. Gertrudes Corção

Orientadora - UFRGS

RESUMO

Aloenxerto ou enxerto homólogo é qualquer tipo de transplante entre indivíduos de uma mesma espécie, mas com características genéticas desiguais. Os aloenxertos de pele servem de barreira contra infecção, ajudam a controlar a dor, promovem a reepitelização e restauram importantes funções da pele, após lesões por queimaduras severas, perda extensa de pele, feridas cirúrgicas e úlceras nos membros. É função dos bancos de pele a coleta e todo o processamento de desinfecção e esterilização que precede a enxertia. Ainda assim, a contaminação microbiana representa um dos principais motivos de descarte de tecidos. Estudos observaram que os tratamentos antimicrobianos não conseguem eliminar os microrganismos aderidos à pele, mesmo estes sendo susceptíveis aos antimicrobianos utilizados, o que levou a hipótese de que estes microrganismos estão aderidos à pele na forma de biofilme. A partir da necessidade da incorporação nos bancos de pele de um tratamento antimicrobiano mais eficiente a ser realizado sobre peles alógenas e visando menores taxas de descartes por contaminação bacteriana, ressalta-se a importância de estudos da ação antimicrobiana de diferentes compostos sobre biofilmes bacterianos. Neste contexto, o presente trabalho teve o objetivo avaliar o potencial inibitório dos compostos emodin, clorexidina, ácido peracético e peróxido de hidrogênio sobre bactérias formadoras de biofilme, a fim de sugerir estes compostos como possíveis candidatos a serem aplicados na esterilização de tecidos para sua utilização como aloenxertos. Foram avaliadas nove bactérias, seis isoladas de amostras de peles alógenas já descartadas em um banco de pele por contaminação bacteriana e três isoladas de pele não alógenas. Em placa de 96 poços foram testados os compostos: emodin (nas concentrações de 1 µg/mL a 256 µg/mL); clorexidina (concentrações de 145 µg/mL a 9302 µg/mL); ácido peracético (0,1% e 0,2%); peróxido de hidrogênio (na concentração 3% e na concentração 1% juntamente com ácido peracético 0,1%) sobre o biofilme formado. A metodologia foi baseada na coloração com Resazurina, seguida da leitura visual da placa e leitura das absorbâncias nos comprimentos de onda 570nm e 600nm. A concentração inibitória mínima (CIM), que corresponde à inibição metabólica maior ou igual a 80%, foi determinada através da diferença percentual na redução do corante entre o poço tratado e o controle positivo não tratado. Foi observado que o emodin apesar de ter sofrido interferência com o corante, apresentou baixa inibição, tendo seus melhores resultados na concentração 256 µg/mL para isolados de *Bacillus* sp. Já a clorexidina mostrou inibição da atividade metabólica em torno de 85% nas bactérias Gram-negativas, com capacidade de aderência fraca e com perfil de resistência a beta-lactâmicos e macrolídeos. Avaliando o ácido peracético, foi possível identificar maior potencial inibitório na concentração 0,1% sobre as Gram-positivas fortemente e moderadamente aderentes. A única Gram-negativa fortemente aderente (*P. agglomerans*), foi melhor inibida pelo ácido peracético 0,2%. Quando tentou-se avaliar a potencialização deste composto, utilizando o peróxido de hidrogênio, houve uma redução de potencial inibitório de até 61%, em relação ao ácido peracético 0,1%. Contudo, quando avaliado separadamente, o peróxido de hidrogênio na concentração de 3% apresentou percentagem de inibição de 62% - 86% nos *Bacillus* sp. e bactérias Gram-negativas. Este composto apresentou o melhor desempenho inibitório sobre a única bactéria Gram-positiva fracamente aderente (*B. cereus*₁), com perfil de resistência a beta-lactâmicos e aminoglicosídeos. Concluiu-se que a clorexidina na concentração de 290 µg/mL e ácido peracético a 0,1% apresentaram os melhores resultados gerais sobre bactérias formadoras de biofilmes.

Palavras-chave: Aloenxertos. Biofilme. Emodin. Clorexidina. Ácido peracético. Peróxido de Hidrogênio.

ABSTRACT

Allograft or homologous graft is any type of transplant between individuals of the same species, but with unequal genetic characteristics. Skin allografts serve as a barrier against infection, help control pain, promote re-epithelialization and restore important skin functions, after severe burn injuries, extensive skin loss, surgical wounds and ulcers in the limbs. The skin banks collect and disinfect and sterilize all the processing that precedes the grafting. Even so, microbial contamination represents one of the main reasons for tissue disposal. Studies have observed that antimicrobial treatments cannot eliminate the microorganisms attached to the skin, even though they are susceptible to the antimicrobials used, which led to the hypothesis that these microorganisms are attached to the skin in the form of biofilm. Based on the need to incorporate a more efficient antimicrobial treatment in skin banks to be carried out on allogeneic skin and aiming at lower rates of discharges due to bacterial contamination, the importance of studies on the antimicrobial action of different compounds on bacterial biofilms is emphasized. In this context, the present work aimed to evaluate the inhibitory potential of the compounds emodin, chlorhexidine, peracetic acid and hydrogen peroxide on biofilm-forming bacteria, in order to suggest these compounds as possible candidates to be applied in the sterilization of tissues for use as allografts. Six bacterial strains isolated from samples of allogeneic skins already discarded in the skin bank due to bacterial contamination, and three from samples of non allogeneic skin, were evaluated. In a 96-well plate, the following compounds were tested: emodin (in concentrations from 1 µg/mL to 256 µg/mL); chlorhexidine (concentrations from 145 µg/mL to 9302 µg/mL); peracetic acid (0.1% and 0.2%); hydrogen peroxide (in the 3% concentration and in the 1% concentration together with 0.1% peracetic acid) on the biofilm formed. The Resazurin staining method was performed, followed by visual reading of the plate and reading of absorbances at 570nm and 600nm wavelengths. The minimum inhibitory concentration (MIC), which corresponds to metabolic inhibition greater than or equal to 80%, was determined by the percentage difference in the dye reduction between the treated well and the untreated positive control. It was observed that emodin, despite having suffered interference with the dye, presented low inhibition, with its best results in the concentration 256 µg/mL for *Bacillus* sp. Chlorhexidine, on the other hand, showed inhibition of metabolic activity around 85% in Gram-negative bacteria, with poor adherence capacity and with a resistance profile to beta-lactams and macrolides. By evaluating peracetic acid, it was possible to identify a greater inhibitory potential in the concentration of 0.1% over gram-positives strongly and moderately adherent. The only gram-negative strongly adherent (*P. agglomerans*), was better inhibited by 0.2% peracetic acid. When trying to evaluate the potentiation of this compound, using hydrogen peroxide, there was a reduction in the inhibitory potential of up to 61%, in relation to 0.1% peracetic acid. However, when evaluated separately, hydrogen peroxide at a concentration of 3% showed a percentage of inhibition of 62% - 86% in *Bacillus* sp. and Gram-negative bacteria. This compound showed the best inhibitory performance on the only weakly adherent Gram-positive bacteria (*B. cereus*1), with a resistance profile to beta-lactams and aminoglycosides. It was concluded that chlorhexidine at a concentration of 290 µg/mL and 0.1% peracetic acid have the best overall results on biofilm-forming bacteria.

Keywords: Allografts. Biofilm. Emodin. Chlorhexidine. Peracetic acid. Hydrogen peroxide.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Relação de microrganismos aceitáveis e não aceitáveis em triagem inicial nos Bancos de Pele.....	11
Tabela 2 – Informações de identificação, origem e capacidade de aderência do biofilme formado por cada isolado.....	22

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Porcentagem de inibição do emodin em diferentes concentrações sobre atividade metabólica dos isolados de <i>Bacillus</i> e <i>Staphylococcus</i>	25
Figura 2 – Porcentagem de inibição da clorexidina em diferentes concentrações sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	25
Figura 3 – Relações de desempenho do potencial inibitório do ácido peracético em diferentes concentrações e atuando juntamente com o peróxido de hidrogênio sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	26
Figura 4 – Porcentagem de inibição do peróxido de hidrogênio 3% sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	27

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO COMPREENSIVA	9
1.1	JUSTIFICATIVA	17
1.2	OBJETIVOS	18
1.2.1	Objetivo geral.....	18
1.2.2	Objetivos específicos.....	18
2	ARTIGO CIENTÍFICO.....	19
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA	42

1 INTRODUÇÃO COMPREENSIVA

ALOENXERTOS E BANCO DE PELE

Aloenxerto define-se por qualquer transplante entre indivíduos de uma mesma espécie, mas geneticamente diferentes. São mundialmente utilizados para substituir temporariamente a pele que foi perdida ou danificada por injúria, sendo mais recorrente em queimaduras graves (MOHR et al., 2016). Contudo, existem muitas outras indicações para os aloenxertos, por exemplo, feridas cirúrgicas, perda extensa de tecido cutâneo, úlceras de membros inferiores, pioderma gangrenoso e doenças bolhosas (MATIOSKI et al., 2015). Como nestas situações há comprometimento da proteção física dos tecidos subjacentes, da homeostase eletrolítica e função sensorial (JAEGER, 2012; LEON-VILLAPALOS; ELDARDIRI; DZIEWULSKI, 2009), o aloenxerto tem função de servir de barreira contra infecções, atuando como um curativo biológico temporário para ajudar a controlar a dor, proteger estruturas profundas, induzir a epitelização, restaurar a regulação térmica e controlar a perda de líquidos (MATIOSKI et al., 2015).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, são estimadas cerca de 180mil mortes por ano ocasionadas por queimaduras, sendo 95% desses casos em países de baixa e média renda. Além disso, custos indiretos como salários perdidos, cuidados prolongados com deformidades, trauma emocional e comprometimento dos recursos familiares contribuem para o impacto socioeconômico (MOCK et al., 2008). Por esses motivos, o uso de aloenxerto além de gerar uma redução significativa no período de internação hospitalar e mortalidade, também pode resultar em grande economia de custos (SCHIOZER, 2012).

Em meados de 1870, Gidner descreveu o primeiro uso de aloenxerto para cobertura de uma ferida de queimadura, o qual foi sendo aperfeiçoado até o início do século XX, quando se teve relato do primeiro transplante de pele humana que havia sido refrigerada (KAGAN; ROBB; PLESSINGER, 2005). Mas só em 1949 foi criado o primeiro banco de pele, o Banco de Tecidos da Marinha dos Estados Unidos, que embora tenha cessado suas atividades em 1999, estabeleceu muitos dos padrões que são seguidos até hoje, como a criopreservação, a liofilização, a esterilização por irradiação do tecido, bem como os princípios imunológicos do transplante de tecidos (STRONG, 2000). Desde então, vários outros bancos de pele foram formados, principalmente nos EUA e na Europa e, muitas vezes, organizados como bancos de multi-tecidos.

No Brasil, o primeiro banco de pele foi criado na cidade de São Paulo em 1965 na Unidade de Queimadura do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina. Contudo, apesar da clara importância do uso de enxertos, nem sempre o tecido era armazenado e refrigerado de forma adequada, visto que, não havia nenhum tipo de normatização brasileira que os protocolasse. Foi em 1997, que a partir da Lei nº 9434, o transplante de órgãos e tecidos foi regulamentado no Brasil. Mas, apenas recentemente foram definidas normas específicas para o funcionamento dos bancos de pele, através da Portaria 2600 do Ministério da Saúde, na qual padrões e critérios técnicos são estabelecidos (SCHIOZER, 2012).

Dessa forma, os bancos de pele têm a responsabilidade de, a partir da coleta do doador, realizar todo processamento seguindo legislações nacionais (Agência Nacional de Vigilância Sanitária- ANVISA) e internacionais (Food and Drug Administration- FDA e American Association of Tissue Banks- AATB), prezando a segurança e qualidade dos tecidos para torná-los adequados para enxertia (KEARNEY, 2005). O processamento adequado de tecidos é imprescindível, pois, grande parte das vítimas de queimaduras está imunologicamente comprometida, aumentando, assim, as chances de desenvolvimento de infecções, sejam elas virais, bacterianas ou fúngicas (OBENG et al., 2000).

A contaminação microbiana representa um dos principais motivos de descartes de tecidos (GAUCHER et al., 2015), pois apesar de serem aplicados protocolos de descontaminação, nenhum é completamente efetivo na desinfecção dos tecidos. Podendo ocorrer a partir da microbiota do doador, durante a coleta dos tecidos dos doadores e/ou durante o processamento destes (SINGH et al, 2016). Além disso, o ambiente hospitalar possui microrganismos próprios, característicos deste ambiente, e que podem acabar colonizando a pele de doadores que permaneceram hospitalizados por longos períodos (KEARNEY, 2005; MATHUR; DE; GORE, 2008).

Na tentativa de reduzir o risco de contaminação, os bancos de pele tem adotado práticas como reduzir o período de armazenamento da pele, já que isso reduz a probabilidade de contaminação, minimizar a quantidade de organismos e eliminar os organismos virulentos, mas sempre mantendo a viabilidade celular do tecido (GALA et al., 1997; MOHR et al., 2016). Tendo em vista um bom aproveitamento das peles, para que haja uma diminuição dos descartes, mas mantendo a segurança do enxerto, foi desenvolvido um processo de triagem inicial, no qual ocorre uma análise microbiológica discriminando organismos aceitáveis dos não aceitáveis (Tabela 1). A partir dessa

seleção, peles com organismos classificados como não aceitáveis serão descartadas, já aquelas com organismos classificados como aceitáveis serão submetidas a um tratamento com antimicrobianos, com intuito de eliminar todos microrganismos e, assim, a enxertia possa ser realizada (VICENTINO et al., 2009).

Tabela 1: Relação de microrganismos aceitáveis e não aceitáveis em triagem inicial nos Bancos de Pele.

Microrganismos Aceitáveis	Microrganismos Não Aceitáveis
<i>Staphylococcus</i> coagulase-negativa	Bacilos Gram-negativos aeróbicos ou anaeróbicos
<i>Propionibacterium</i> sp.	Cocos Gram-negativos
<i>Micrococcus</i> sp.	<i>Clostridium</i> sp.
<i>Corynebacterium</i> sp.	<i>Bacillus anthracis</i>
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>Streptococcus pyogenes</i> beta hemolítico
<i>Streptococcus</i> alfa hemolíticos	<i>Staphylococcus aureus</i>
Cocos Gram-positivos anaeróbicos	<i>Enterococcus</i> sp.
<i>Bacillus</i> sp. (não <i>B. anthracis</i>)	Fungos filamentosos
	Leveduras

O Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem da Santa Casa de Porto Alegre foi inaugurado em 2005, sendo até o ano de 2012 o único em funcionamento no Brasil, suprimindo toda a demanda nacional. Durante o período de fevereiro de 2008 a julho de 2010 foram realizados 35 procedimentos de colheita, sendo as doações divididas em 108 lotes, dos quais 22 (20,04%) foram descartados e os 86 lotes restantes, forneceram um total de aproximadamente 47.756,1 cm² de tecido viável para transplante (SILVEIRA et al., 2013).

Estudos observaram que os tratamentos não conseguem eliminar os microrganismos aderidos à pele, mesmo estes sendo sensíveis aos antimicrobianos utilizados (PITT et al., 2013; GAUCHER et al., 2015; SERAFINI et al., 2016), o que levou a hipótese de que estes microrganismos estão aderidos na forma de biofilme, uma vez que outros estudos já relataram formação de biofilme sobre a pele por alguns microrganismos (SHIN et al., 2013).

BIOFILME

De acordo com Donlan (2002), biofilmes são definidos como uma comunidade sésil, composta por microrganismos, caracterizada por células que estão irreversivelmente ligadas a um substrato ou interface ou umas às outras. São embebidos em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares por eles produzida e exibem um fenótipo alterado com respeito a taxa de crescimento e transcrição gênica (AIOLA et al., 2012). Acredita-se que cerca de 90% de todos os microrganismos vivem numa comunidade estruturada de células, uma vez que constituem uma forma mais eficiente de sobreviver em ambientes hostis. Praticamente não há superfície que não possa ser colonizada, de materiais inertes a células ou tecidos vivos (GOMES, 2011).

Os fatores ambientais, como temperatura, pH, pressão, composição de nutrientes e oxigênio são determinantes para a composição do biofilme, que não necessariamente será uniforme. Sendo considerado uma estrutura muito adsorvente e porosa, o biofilme tem a matriz extracelular composta principalmente de água (90-99%), células microbianas (2-5%) e substância polimérica extracelular (1-2%) (JAMAL et al., 2017; SUTHERLAND, 2001). Uma vez que o biofilme é constituído de agregados de células e a formação de sua estrutura tridimensional é um processo dinâmico que envolve uma série de eventos moleculares coordenados, ele representa um ambiente propício para a comunicação célula-célula, ou “quorum sensing” (QS), que leva à expressão diferencial de genes em resposta a mudanças na densidade populacional (ALMEIDA, 2014).

A formação de biofilme é complexa, existindo divergências sobre a quantidade de estágios envolvidos, mas de modo geral ela ocorre em quatro etapas: I) Inicialmente os microrganismos se fixam de forma reversível a superfície, podendo fazer isso através de seus apêndices ou de interações eletrostáticas. A hidrofobicidade da superfície também pode favorecer o fortalecimento da fixação, pois reduz a força de repulsão entre as bactérias e a superfície. II) Nesta etapa ocorre a transição da fixação reversível para irreversível, a partir de um processo de multiplicação e divisão de células microbianas determinado pelo “quorum sensing”. Este processo leva à formação de microcolônias, que consistem em muitos tipos de microcomunidades que se coordenam entre si em múltiplos aspectos, como na troca de substratos, distribuição de produtos metabólicos e excreção, que caracterizam a fase III de maturação de arquitetura. IV) Na fase final as células microbianas se dispersam dos biofilmes. Durante o processo de separação, comunidades microbianas dentro do biofilme produzem diferentes enzimas sacarolíticas

que ajudam a liberar a superfície dos microrganismos para uma nova área de colonização, iniciando, assim, um novo ciclo (GOMES, 2011; JAMAL et al., 2017).

O estilo de vida do biofilme permite que as bactérias suportem condições ambientais hostis, como escassez de nutrientes, dessecação e as torna capazes de causar uma ampla gama de doenças crônicas. Por isso, é considerada uma das principais causas de infecções hospitalares persistentes em pacientes imunocomprometidos (ROY et al., 2017). Quando formado o biofilme, torna-se muito difícil tratá-lo clinicamente, uma vez que, as bactérias em seu interior estão protegidas da resposta imune do hospedeiro, bem como da difusão de antibióticos (CRAMTON et al., 1999; HØIBY et al., 2009; ROY et al., 2017).

O biofilme tem na sua estrutura a formação de diferentes gradientes de substâncias disponíveis no seu interior, ou seja, as células das camadas mais externas são aeróbicas e metabolicamente ativas, já que têm mais acesso a oxigênio e nutrientes. As células das camadas mais internas são anaeróbicas e deficientes de nutrientes, como consequência são células de crescimento mais lento. Essa característica permite que um mesmo biofilme apresente diferentes respostas ao tratamento antimicrobiano, por exemplo, alguns antibióticos, como fluorquinolonas, β -lactâmicos e aminoglicosídeos, não são ativos em condições anaeróbicas, conseqüentemente, afetam apenas a parte externa do biofilme onde o oxigênio está presente (BORRIELLO et al., 2004). Além disso, a maioria dos antibióticos mostra uma ação bactericida mais eficiente em células de rápida divisão, sendo as células de crescimento lento mais resistentes (BORRIELLO et al., 2004; MACIÀ; ROJO-MOLINERO; OLIVER, 2014). Por fim, outro mecanismo de tolerância a antimicrobianos desenvolvido por biofilmes é a mutação que ocorre com alta frequência, quando comparado às células planctônicas. Esse processo de mutação pode resultar no aumento da expressão de bombas de efluxo e redução da permeabilidade das células por alterações na membrana externa (HØIBY et al., 2009; OLSEN, 2015).

ANTIMICROBIANOS ESCOLHIDOS PARA ESTE ESTUDO

Um derivado natural da antraquinona, o emodin (1,3,8-trihidroxi-6-metil-antraquinona), ocorre em muitas ervas medicinais chinesas amplamente utilizadas, como o *Rheum palmatum*, *Polygonum cuspidatum* e *Polygonum multiflorum*. Ele tem sido usado na medicina tradicional chinesa há mais de 2000 anos e por ser um ingrediente ativo de muitas ervas, ainda está presente em várias preparações à base de plantas (DONG

et al., 2016). O mecanismo de ação do emodin ainda não foi completamente elucidado, já foi visto que ele atua em diferentes sistemas. De acordo com a literatura ele é designado como um inibidor específico da proteína tirosina quinase p65lck (SRINIVAS et al., 2006). Dentre suas aplicações, a mais difundida clinicamente é como agente catártico utilizado para estimular a evacuação dos intestinos (DONG et al., 2016). Estudos anteriores mostraram que o emodin possui um amplo espectro de propriedades farmacológicas, incluindo atividades anticancerígena, hepatoprotetora, antiinflamatória, antioxidante e antimicrobiana (DONG et al., 2016; YANG et al., 2019).

Vários trabalhos na literatura reafirmam a eficiência do efeito antimicrobiano do emodin sobre bactérias Gram-positivas (CHUKWUJEKWU et al., 2005), de cepas de MRSA (CAO et al., 2015) e sobre a formação de biofilmes de *S. aureus* (YAN et al., 2017). Outros estudos ainda trazem o emodin como um agente imunossupressor com potencial inibitório na rejeição aguda do aloenxerto após transplante de fígado em ratos (SHENG-ZHANG et al., 2010). Contudo, a literatura ainda carece de estudos que explorem o potencial antimicrobiano do emodin sobre os aloenxertos.

A clorexidina, uma biguanida catiônica, foi sintetizada em 1949, na Inglaterra, por cientistas que buscavam um agente para atuar no combate à malária. Alguns anos depois, o cloridrato de clorexidina foi desenvolvido e introduzido como um antisséptico, e apenas na década de 70 chegou aos Estados Unidos, onde se destacou por ser um antisséptico de baixa toxicidade, afinidade química com as estruturas da pele e mucosa, possuir largo espectro, eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (TORTORA; FUNKE; CASE, 2000). Em 1983, foi considerada como substância essencial pelo órgão máximo de saúde internacional filiado à ONU, o WHO (World Health Organization) e passou a ser o tratamento ouro (NEOBRA).X).

O mecanismo de ação antibacteriano é devido à molécula catiônica da clorexidina ser atraída pela carga negativa da superfície da bactéria, ocorrendo adsorção na membrana celular por interações eletrostáticas através de ligações hidrofóbicas ou pontes de hidrogênio, sendo essa adsorção concentração-dependente. Deste modo, em dosagens baixas ocorre o extravasamento dos componentes bacterianos de baixo peso molecular, e em doses elevadas, resulta em precipitação, coagulação das proteínas citoplasmáticas e morte bacteriana (AMORAS, 2013).

Em razão da clorexidina se tratar de um poderoso antisséptico amplamente utilizado no ambiente hospitalar, alguns estudos avaliaram o efeito inibitório deste sobre biofilmes bacterianos (BONEZ et al., 2013; SHEN et al., 2009). No que concerne à aloenxertos, existem publicações que trazem a clorexidina como um dos compostos utilizados nos protocolos de descontaminação de enxertos musculoesqueléticos (MOHR et al., 2016) e osteocondrais (CAMPBELL et al., 2014). Contudo, não existem estudos recentes que descrevam a utilização de clorexidina para descontaminação de aloenxertos de pele.

O ácido peracético, uma combinação de ácido acético e peróxido de hidrogênio, surgiu no mercado mundial na segunda metade do século passado, sendo incluído como desinfetante/ esterilizante pela Portaria nº 15 de 23/08/1988 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA e reconhecido como princípio ativo autorizado pelo Ministério da Saúde. É classificado pela legislação vigente como desinfetante de alto nível com eficácia microbiológica comprovada, é biodegradável, proporciona alto poder germicida em baixas concentrações e mantém suas propriedades em presença de matéria orgânica, sendo recomendado como substituto ao uso do glutaraldeído 2% e do hipoclorito 1% (BÁRBARA; MIYAMARU, 2014).

O mecanismo de ação do ácido peracético é semelhante aos agentes oxidantes como o peróxido de hidrogênio. Devido ao seu alto poder oxidante, ele promove a oxidação das ligações S-S e SH dos componentes celulares, agindo sobre a membrana citoplasmática, desativando as funções fisiológicas como por exemplo a barreira osmótica. Tem ação esporocida em temperaturas baixas e mesmo em presença de matéria orgânica (SÃO PAULO, 2011; WESSELS; INGMER, 2013). Vários estudos têm avaliado o uso do ácido peracético na esterilização de aloenxertos ósseos e válvulas cardíacas, sendo nestes considerado um desinfetante de alto nível, com atividade esporocida, bactericida e viricida (AIDULIS et al., 2002; PRUSS et al., 2001). Lomas et al. (2003), sugerem a utilização de ácido peracético (PAA) à 0,1% como possibilidade de desinfetante para peles alógenas, com a vantagem de não produzir componentes citotóxicos residuais e ser eficiente contra a formação de esporos.

O peróxido de hidrogênio, também conhecido comercialmente como água oxigenada, é um líquido límpido, incolor e miscível com água. Sua fórmula molecular é

H_2O_2 , foi sintetizado pela primeira vez em 1818 por Louis Jacques Thénard, através da reação de ácido nítrico com peróxido de bário. Atualmente, é produzido industrialmente a partir do equilíbrio entre antraquinol e antraquinona na presença de oxigênio e água, método desenvolvido por Riedl e Pfeleiderer em 1939 (URBAN; RATH; RADTKE, 2017). Por ser um agente oxidante o peróxido de hidrogênio é comumente encontrado em cosméticos, agentes branqueadores, creme dental e detergentes. Devido a sua instabilidade, ele reage ao contato com matéria orgânica oxidável, metal e em soluções alcalinas, produzindo radicais livres de hidroxila, que reagem com lipídios, proteínas e DNA (CIRIMINNA et al., 2016; LEGGETT et al., 2016; URBAN; RATH; RADTKE, 2017).

Além das aplicações anteriormente mencionadas, o peróxido de hidrogênio tem sido amplamente utilizado na prática hospitalar como desinfetante em aloenxertos de diferentes tipos, entre eles, aloenxerto tendíneo, ósseo e dérmico (GARDNER et al., 2013; LEON-DYKE; ROONEY; KEARNEY, 2017). Podendo ser utilizado como um potencializador de outras substâncias antimicrobianas, como o PAA, por exemplo (BOUNOURE; FIQUET; ARNAUD, 2006).

1.1 JUSTIFICATIVA

Em razão da alta taxa de descartes de peles alógenas pelos bancos de pele e contaminação por biofilmes bacterianos observa-se a necessidade da incorporação de um tratamento antimicrobiano mais eficiente a ser realizado sobre peles alógenas visando, a descontaminação desses tecidos para utilização segura para enxertia. Ressalta-se assim, a importância de estudos do potencial inibitório de compostos alternativos sobre biofilmes bacterianos. O que justifica a realização desta pesquisa que busca avaliar a ação antimicrobiana do ácido peracético, peróxido de hidrogênio, emodin e clorexidina sobre isolados bacterianos formadores de biofilme obtidos de amostras de peles alógenas e não alógenas.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antimicrobiano dos compostos emodin, clorexidina, ácido peracético e peróxido de hidrogênio sobre biofilmes bacterianos, a fim de sugerir-los como possíveis candidatos a serem utilizados na esterilização de peles alógenas para sua utilização como aloenxertos.

1.2.2 Objetivos específicos

Avaliar o potencial inibitório de diferentes concentrações de emodin, clorexidina, ácido peracético e peróxido de hidrogênio, sobre biofilmes bacterianos formados de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas de amostras de peles alógenas e não alógenas.

Avaliar o potencial inibitório da associação ácido peracético 0,1% e peróxido de hidrogênio 1%, sobre biofilmes bacterianos formados de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas isoladas de amostras de peles alógenas e não alógenas.

Avaliar qual concentração é mais eficiente e se há diferença na sua ação diante de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

2 ARTIGO CIENTÍFICO

Microbiologia Clínica

ATIVIDADE INIBITÓRIA DOS COMPOSTOS EMODIN, CLOREXIDINA, ÁCIDO PERACÉTICO E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO SOBRE BIOFILMES DE BACTÉRIAS ISOLADAS DE PELES HUMANAS

Jéssica Araújo de Souza¹, Karine Lena Meneghetti¹, Gertrudes Corção¹

¹ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Sarmento Leite 500, 90050-170, Porto Alegre, Brasil.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Tratamentos nos bancos de tecidos não conseguem eliminar microrganismos aderidos a peles alógenas em forma de biofilme, mesmo estes sendo sensíveis aos antimicrobianos utilizados, representando um dos principais motivos de descarte de tecidos. **OBJETIVO:** Avaliar o potencial inibitório dos compostos emodin, clorexidina, ácido peracético (PAA) e peróxido de hidrogênio sobre bactérias formadoras de biofilme, a fim de sugerir-las como possíveis candidatos na esterilização de peles alógenas, para sua utilização como aloenxertos. **METODOLOGIA:** Em placa de 96 poços foram testados os compostos: emodin (nas concentrações de 1 µg/mL a 256 µg/mL); clorexidina (145 µg/mL a 9302 µg/mL); ácido peracético (0,1% e 0,2%); peróxido de hidrogênio (na concentração 3% e na concentração 1% juntamente com ácido peracético 0,1%) sobre o biofilme formado de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. **RESULTADOS:** O emodin, apresentou baixo potencial inibitório, tendo melhor resultado na concentração 256 µg/mL para *Bacillus* sp. A clorexidina inibiu a atividade metabólica em torno de 85% nas bactérias Gram-negativas, com fraca aderência e resistentes a beta-lactâmicos e macrolídeos. O PAA, apresentou maior potencial inibitório na concentração 0,1% sobre Gram-positivas fortemente e moderadamente aderentes. A única Gram-negativa fortemente aderente (*P. agglomerans*), foi melhor inibida pelo PAA 0,2%. Não houve potencialização deste composto utilizando o peróxido de hidrogênio. Contudo, quando avaliado separadamente, o peróxido na concentração de 3% apresentou percentagem de inibição de 62% - 86% nos *Bacillus* sp. e bactérias Gram-negativas. Possuindo melhor desempenho inibitório sobre a única bactéria Gram-positiva fracamente aderente (*B. cereus*), resistente a beta-lactâmicos e aminoglicosídeos. **CONCLUSÕES:** Através dos resultados concluiu-se que a clorexidina na concentração de 290 µg/mL e PAA 0,1% apresentam os melhores resultados gerais sobre bactérias formadoras de biofilmes.

INTRODUÇÃO

Define-se por aloenxerto ou enxerto homólogo qualquer tipo de transplante entre indivíduos de uma mesma espécie, mas com características genéticas desiguais. Os aloenxertos de pele de doadores humanos falecidos representam uma opção temporária e muito utilizada para a cobertura da pele após lesões por queimaduras severas, perda

extensa de pele, feridas cirúrgicas e úlceras nos membros [1]. O aloenxerto serve de barreira contra infecção, ajuda a controlar a dor, promove a reepitelização e restaura importantes funções da pele. Por estas razões, seu uso resulta em uma redução significativa nas taxas de permanência e mortalidade hospitalar e pode gerar economia de custos [2].

Cabe aos bancos de tecidos/pele, após a coleta da pele de doador cadáver, realizar todo processamento seguindo legislações nacionais e internacionais, prezando a segurança e qualidade dos tecidos para torná-los adequados para enxertia [3]. Contudo, a contaminação microbiana representa um dos principais motivos de descartes de tecidos [4], pois apesar de serem aplicados protocolos de descontaminação, nenhum é completamente efetivo na descontaminação dos tecidos.

A contaminação microbiana pode ocorrer a partir da microbiota do doador, durante a coleta dos tecidos dos doadores e/ou durante o processamento destes [5]. Além disso, o ambiente hospitalar possui microrganismos próprios, característicos deste ambiente, e que podem acabar colonizando a pele de doadores que permaneceram hospitalizados por longos períodos [6,7].

Tratamentos atuais não conseguem eliminar os microrganismos aderidos à pele, mesmo estes sendo sensíveis aos antimicrobianos utilizados nos protocolos de tratamentos de aloenxertos de pele [4,8,9], o que levou a hipótese de que estes microrganismos estão aderidos na forma de biofilme, uma vez que outros estudos já relataram formação de biofilme sobre a pele por alguns microrganismos [10,11].

Os biofilmes são comunidades de microrganismos organizados em uma estrutura embebida em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares (EPS) [12], que fornecem características que os tornam mais resistentes aos efeitos dos agentes antimicrobianos [13]. Alguns trabalhos já descreveram a presença de biofilme em outros tipos de enxertos, como enxertos ósseos [14] e vasculares [15].

Lomas et al. (2003)[6] sugerem a utilização de Ácido Peracético (PAA) à 0,1% como possibilidade de desinfetante para peles alógenas, com a vantagem de não produzir componentes citotóxicos residuais. Visando aumentar a eficiência do ácido peracético [16], o peróxido de hidrogênio se apresenta como uma possibilidade interessante, já que possui a capacidade de atacar a membrana lipídica, DNA e outros componentes das células, pelos radicais livres tóxicos que o peróxido produz [17]. O estudo de Yan et al. (2017)[18], apresenta uma abordagem para avaliação do efeito de Emodin (derivado de

antraquinona isolada de *Polygonum cuspidatum* e *Rheum palmatum*) sobre formação de biofilmes de *S. aureus*. Por fim, alguns estudos [19,20], avaliaram o efeito inibitório da clorexidina sobre biofilmes bacterianos, já que este composto se trata de um poderoso antisséptico amplamente utilizado no ambiente hospitalar.

Devido à necessidade da incorporação em bancos de pele de um tratamento antimicrobiano mais eficiente a ser realizado sobre peles alógenas visando menores taxas de descartes por contaminação bacteriana, ressalta-se a importância de estudos da ação antimicrobiana de diferentes compostos sobre biofilmes bacterianos. Neste contexto, esta pesquisa buscou avaliar a atividade inibitória do PAA, peróxido de hidrogênio, emodin e clorexidina sobre bactérias formadoras de biofilme, isoladas de peles alógenas e não alógenas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Aspectos éticos

Esse trabalho é continuidade dos projetos de pesquisa aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (CEP/ISCOMPA) (protocolo CAAE 45100215.1.0000.5335, parecer 1.092.445) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (CEP/UFRGS) (protocolo CAAE 36949514.8.0000.5347, parecer 936.163 – para peles alógenas e protocolo CAAE 52049415.0.0000.5347 – para amostras de peles não alógenas). A remoção e doação da pele dos doadores foram autorizadas por parentes próximos dos doadores. A requisição destes tecidos para pesquisa foi solicitada e autorizada pela chefia responsável do Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Isolados bacterianos de peles alógenas e não alógenas

Os isolados utilizados nesse trabalho foram obtidos em estudos prévios, sendo as provenientes de peles alógenas obtidas a partir de 30 amostras de pele de doador cadáver disponibilizadas pelo Banco de Pele Dr. Roberto Corrêa Chem do hospital Santa Casa de Porto Alegre– RS, descartadas na triagem inicial e/ou pós-processamento por cultura positiva[11]. E os isolados de peles não alógenas foram obtidos a partir de suabes da pele (do abdômen e parte superior das costas) de 30 indivíduos saudáveis. Em todos os

experimentos relativos à formação de biofilme, o controle positivo utilizado foi o *S. epidermidis* (ATCC 35954). Foram utilizadas nove bactérias (*Staphylococcus epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus* (2), *Klebsiella variicola*, *Pantoea agglomerans* e Cocobacilo Gram-negativo) escolhidas com base em seus diferentes níveis de formação de biofilme e perfil de resistência a antimicrobianos [25] (tabela2).

Tabela 2: Informações de identificação, origem e capacidade de aderência do biofilme formado por cada isolado.

Isolado bacteriano/ Identificação	Origem (aloenxerto ou pele)	Biofilme	Perfil de resistência a antimicrobianos
18.1.2 <i>S. epidermidis</i>	Aloenxerto	Forte	PEN-CFO-CIP-AZM
18.7.2 <i>S. saprophyticus</i>	Aloenxerto	Forte	CFO-CIP-AZM
27.12.4 <i>S. aureus</i>	Aloenxerto	Moderado	PEN-CFO-CIP-AZM
3.12.2 <i>B. subtilis</i>	Aloenxerto	Forte	SENSÍVEL A TODOS ATM
8.4.2 <i>Bacillus cereus</i>	Aloenxerto	Moderado	PEN-CFO
31.1.2 <i>Bacillus cereus</i>	Aloenxerto	Fraco	PEN-CFO-EST
82.5.2 <i>Klebsiella variicola</i>	Pele	Fraco	PEN-AZM
59.1.2 <i>Pantoea agglomerans</i>	Pele	Forte	PEN-CFO-AZM
81.2.2 Cocobacilo Gram-negativo	Pele	Fraco	PEN-CFO-AZM

PEN, penicilina; CFO, cefoxitina; CIP, ciprofloxacina; EST, estreptomicina; AZM, Azitromicina; ATM, antimicrobiano. Fonte: adaptado de Meneghetti et al. (2018).

Potencial inibitório dos compostos sobre biofilme bacteriano

A determinação da viabilidade dos isolados na forma de biofilme foi realizada de acordo com o método de Pettit et al. [20] e Flemming et al. [21], com modificações. Os isolados bacterianos foram semeados em TSA (Ágar Triptona de Soja) e incubados a 37°C durante 24 h. A partir do TSA, os isolados foram ajustados à turbidez 6 da escala de Mc Farland (aproximadamente $1,8 \times 10^9$ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL), utilizando-se caldo TSB (Caldo Triptona de Soja). Em placas de cultura de tecidos de poliestireno de 96 poços de fundo plano, foi adicionado a cada poço 200 µL de caldo TSB com crescimento do isolado em análise e incubado a 37°C por 24h, com o propósito de formar o biofilme. Após a incubação, foram realizadas três lavagens com 200 µL de salina estéril 0,9%, a fim de retirar as células planctônicas e permanecer apenas os microrganismos aderidos à placa. Após período de secagem, foi adicionado 200 µL de

caldo Mueller Hinton com os compostos. Para o emodin foram testadas nove diferentes concentrações, de 1 µg/mL a 256 µg/mL. O PAA foi testado nas concentrações 0,1% e 0,2%. A clorexidina foi testada em nove diferentes concentrações, de 145 µg/mL até 9302 µg/mL. E o peróxido de hidrogênio foi testado na concentração 3% e na concentração 1% juntamente com o ácido peracético 0,1%.

Nessa etapa, o controle positivo continha a cepa controle (*S. epidermidis*) em 200 µL de caldo Mueller Hinton sem antimicrobiano. O controle negativo (controle diluição), por sua vez, possuía 200 µL de caldo Mueller Hinton com antimicrobiano em cada uma das diluições a fim de detectar possível interação entre o antimicrobiano e o corante. No controle de esterilidade foi adicionado apenas 200 µL de caldo Mueller Hinton.

Posteriormente à incubação a 37°C por 24h, foram realizadas três lavagens com solução salina 0,9%, para retirar o excesso do composto utilizado, para que ele não interagisse com o corante. Na sequência, foi adicionado 20 µL de solução a 20 µM do corante resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) filtrado todos os poços. Após incubação a 37°C por 1h, foi realizada a leitura visual da placa. Os poços com coloração azul indicaram ausência de viabilidade celular e aqueles com coloração rosa indicaram metabolismo celular ativo. As análises foram realizadas em octoplicata para todos os isolados e para cada composto.

Em seguida, foi realizada a leitura da absorvância nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm. A diferença percentual na redução do corante entre o poço tratado e o controle positivo não tratado foi utilizada para determinar a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de promover uma inibição maior ou igual a 80% da atividade metabólica bacteriana do poço teste em relação ao controle positivo não tratado, determinada através da fórmula a seguir que mostra como resultado a percentagem de células vivas:

$$\frac{(\varepsilon_{OX})\lambda_2 A \lambda_1 - (\varepsilon_{OX})\lambda_1 A \lambda_2 \text{ do poço teste tratado}}{(\varepsilon_{OX})\lambda_2 A^\circ \lambda_1 - (\varepsilon_{OX})\lambda_1 A^\circ \lambda_2 \text{ do controle positivo não tratado}} \times 100$$

Onde ε_{OX} = coeficiente de extinção molar da forma oxidada do corante resazurina;
A = absorvância dos poços de teste; A° = absorvância do poço do controle positivo não

tratado; $\lambda_1 = 570\text{nm}$; $\lambda_2 = 600\text{ nm}$. O valor resultante da fórmula fornece a percentagem de células vivas e para a percentagem de inibição, calcula-se 100% das células menos a percentagem encontrada de células vivas.

O protocolo utilizado apresentou limitações durante os ensaios, devido a interação do corante resazurina com os compostos. O Emodin apresenta coloração amarela e quando em contato com o corante, formou uma coloração vermelho bordô. A Clorexidina, apesar de ser um composto líquido transparente, interagiu com a resazurina, apresentando uma coloração roxa. Dessa forma, tornou-se inviável analisar visualmente o resultado já que o corante utilizado indica ausência de viabilidade celular através da coloração azul e metabolismo celular ativo, com a coloração rosa. Diante desse problema, foi necessário adaptar o protocolo experimental, incluindo após a etapa de incubação com o composto, uma etapa de três lavagens com solução salina, a fim de retirar o excesso do composto, para que não houvesse interação na etapa seguinte de coloração. Enquanto para a Clorexidina obteve-se êxito com essa alteração, para o Emodin as lavagens não evitaram sua interação, tornando a interpretação do resultado visual infactível. Com a finalidade de padronizarmos os ensaios, foi realizada a etapa de lavagem em todos os compostos, mesmo naqueles que não haviam apresentado interação com o corante.

RESULTADOS

O antimicrobiano emodin foi testado em nove concentrações diferentes de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 256 $\mu\text{g/mL}$ sobre as bactérias Gram-positivas, e não apresentou inibição da atividade metabólica igual ou superior a 80% em nenhuma das concentrações. Dentre todas as concentrações avaliadas a que apresentou melhor desempenho foi a de 256 $\mu\text{g/mL}$, tendo potencial inibitório em torno de 35% nos isolados de *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* e de 11% para *S. aureus*. Já para o gênero *Bacillus* sp., o potencial inibitório indica um valor aproximado entre 41 a 64%. A concentração que apresentou pior desempenho foi de 64 $\mu\text{g/mL}$, na qual houve um crescimento bacteriano maior do que o controle positivo (Figura 1). Em nenhuma das concentrações testadas, o emodin destacou-se como tendo melhor desempenho (em relação aos outros compostos), mesmo nos isolados com capacidade de aderência fraca e sensíveis a todos antimicrobianos.

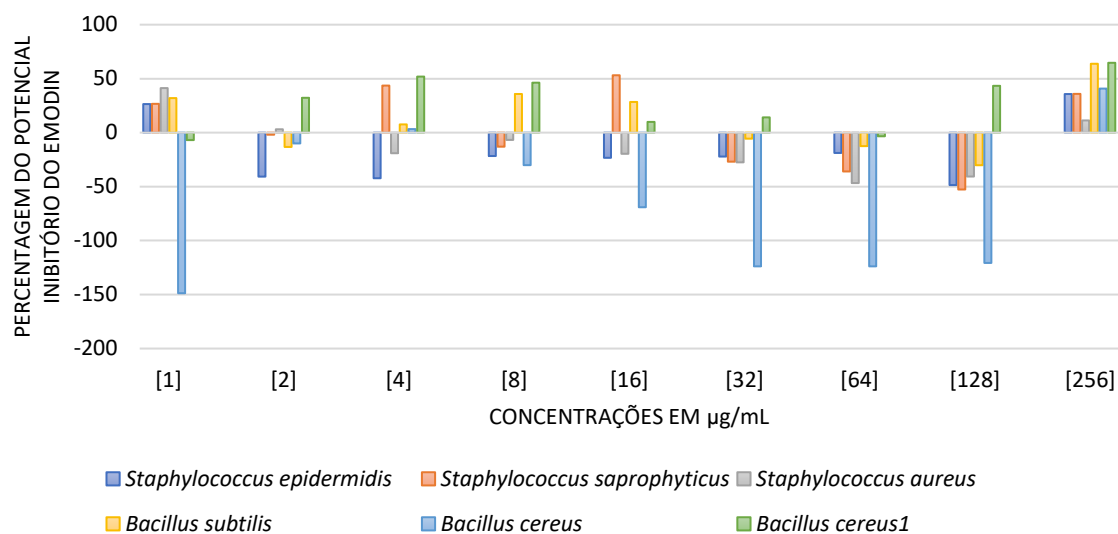


Figura 1: Percentagem de inibição do emodin em diferentes concentrações sobre atividade metabólica dos isolados de *Bacillus* e *Staphylococcus*.

Para a clorexidina, testou-se as concentrações 145 µg/mL a 9302 µg/mL (em Gram-positivos), e todas apresentaram ação inibitória, inclusive as concentrações limites, tiveram percentual de inibição semelhantes. Entre todas, a concentração que apresentou melhor desempenho foi a de 290 µg/mL (sob a qual foram avaliados além dos Gram-positivos, os Gram-negativos). Nessa concentração houve uma inibição que variou de 50 a 80% entre as bactérias Gram-positivas (Figura 2). E entre as Gram-negativas a inibição ficou acima de 82% (*P. agglomerans* apresentou inibição de 82%, *K. variicola* e *Cocobacilo* 86%). A concentração que apresentou pior desempenho foi 4651 µg/mL (27 a 53%). A clorexidina, na concentração de 290 µg/mL, foi o composto que apresentou maior inibição metabólica dos Gram-negativos que possuíam capacidade de aderência fraca (*K. variicola* e *Cocobacilos*) e resistência a beta-lactâmicos e macrolídeos.

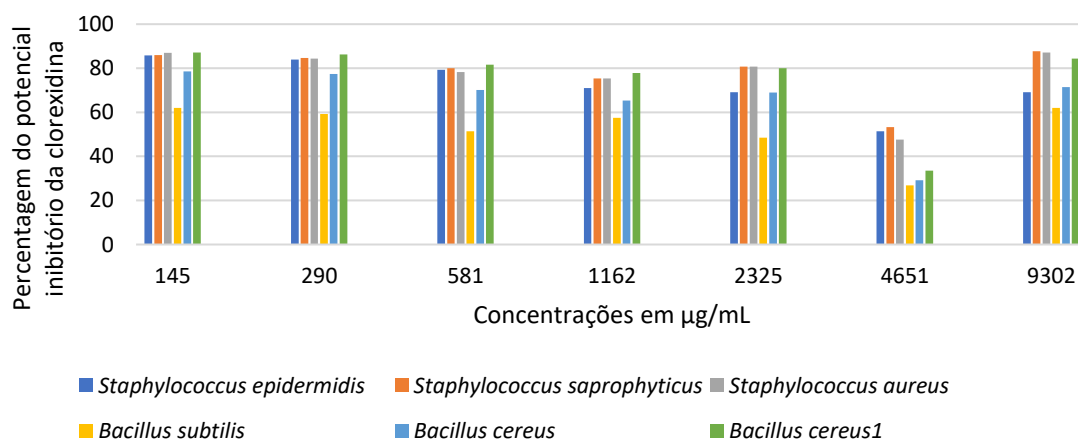


Figura 2: Percentagem de inibição da clorexidina em diferentes concentrações sobre bactérias Gram-positivas.

O PAA foi avaliado nas concentrações 0,1% e 0,2%, de forma isolada e atuando juntamente com peróxido de hidrogênio 1%. Os resultados das concentrações 0,1% e 0,2% foram muito semelhantes, com exceção de *K. variicola*, na qual a concentração 0,1% foi menos eficiente. Atuando sozinho, o PAA, nas concentrações de 0,1% e 0,2% tiveram desempenho melhor do que quando avaliado atuando juntamente com o peróxido de hidrogênio 1% (25% - 81%) (Figura 3). Apresentando diferenças de até 61% a menos no potencial inibitório sobre *S. aureus* em relação com PAA 0,1%. O PAA 0,1% foi o composto que apresentou maior inibição metabólica nos isolados Gram-positivos fortemente aderentes (*S. epidermidis*, *S. saprophyticus* e *B. subtilis*) e moderadamente aderentes (*S. aureus* e *B. cereus*), com diferentes perfis de resistência. Na concentração 0,2%, o PAA, apresentou o melhor potencial inibitório sobre o único isolado fortemente aderente Gram-negativo (*P. agglomerans*).

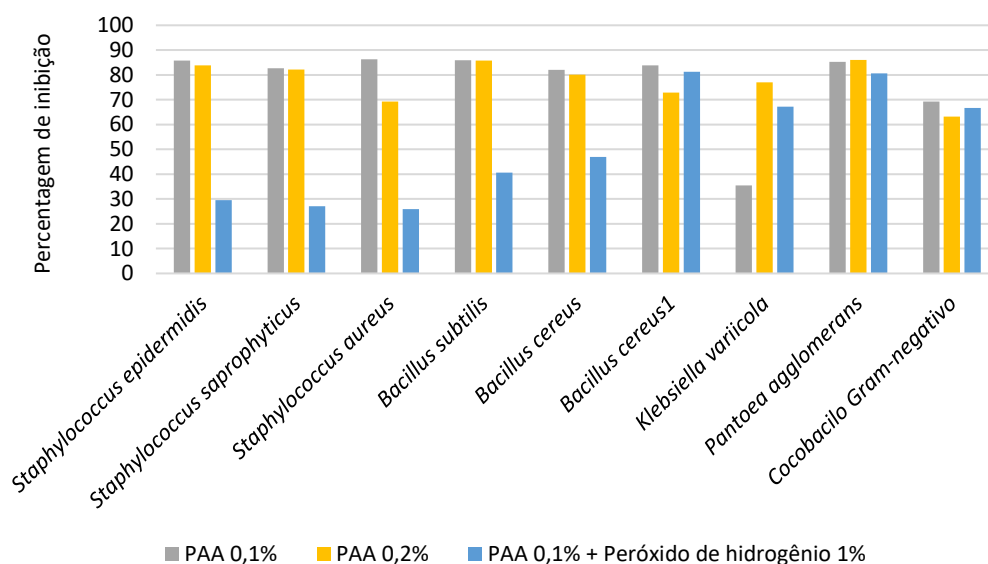


Figura 3: Relações de desempenho do potencial inibitório do PAA em diferentes concentrações e atuando juntamente com o peróxido de hidrogênio sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Na concentração de 3%, o peróxido de hidrogênio apresentou potencial inibitório que variou de 62 a 86% nos *Bacillus* sp. e isolados Gram-negativos, entre esses, os isolados que tiveram sua atividade metabólica mais inibida foram *B. cereus*₁ (86%) e *P. agglomerans* (84%), em contrapartida o menos inibido foi *K. variicola* (62%). Já nos *Staphylococcus* o potencial inibitório fica bem inferior, entre 30% (*S. aureus*) e 51% (*S. epidermidis*) (Figura 4). O peróxido de hidrogênio 3% foi o composto que apresentou

melhor potencial inibitório sobre o único isolado Gram-positivo com capacidade de aderência fraca (*B. cereus*₁) e com perfil de resistência que além de beta-lactâmicos e aminoglicosídeos.

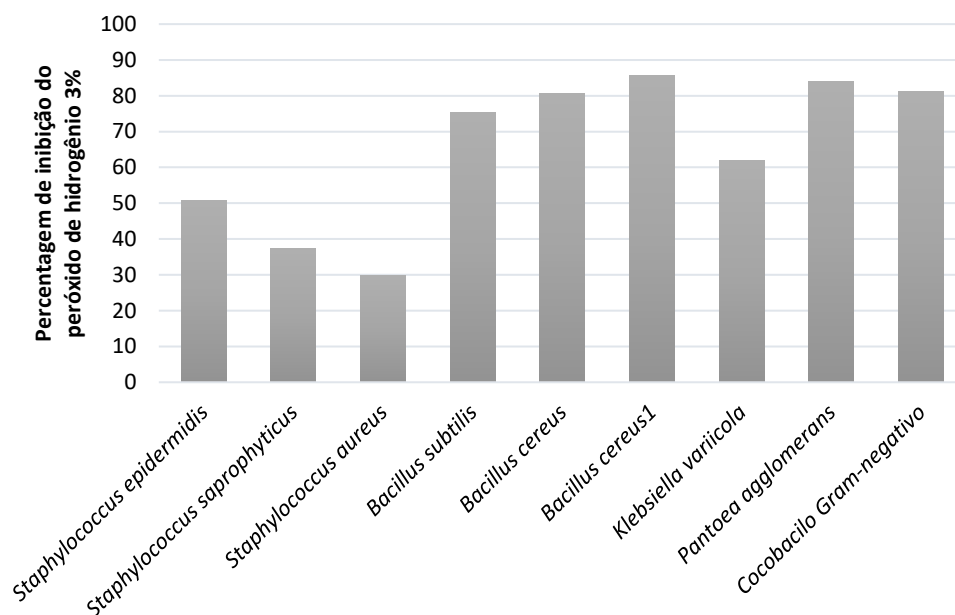


Figura 4: Percentagem de inibição do peróxido de hidrogênio 3% sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

DISCUSSÃO

Os bancos de tecidos encontram grandes desafios desde a obtenção de doadores de pele alógena (seja por questão religiosa ou por ser algo pouco conhecido por grande parte da sociedade, que trata o assunto com muitos preconceitos) até o alto número de descartes, em razão da contaminação bacteriana. Visto que, apesar de serem aplicados protocolos de descontaminação, nenhum é completamente efetivo na eliminação das bactérias dos tecidos. Podendo esta contaminação ocorrer a partir de um doador cujo tecido foi infectado, durante a coleta dos tecidos e/ou durante o processamento destes [5]. Dentre as possíveis causas da contaminação dos aloenxertos, há também o ambiente hospitalar que possui microrganismos próprios, característicos deste ambiente, e que podem acabar colonizando a pele de doadores que permaneceram hospitalizados por longos períodos [3,7]. De acordo com Rooney et al. (2008) [21], após realizado o processamento dos tecidos, cerca de 22% ainda apresentam algum tipo de contaminação.

Devido à essa dificuldade de descontaminação surgiu a hipótese de que estes microrganismos estão aderidos na forma de biofilme, uma vez que outros estudos já

relataram formação de biofilme sobre a pele [10]. Os mecanismos conhecidos de resistência aos antimicrobianos, como bombas de efluxo, enzimas modificadoras e mutações específicas, contribuem, mas não são isoladamente suficientes para explicar a maioria dos casos de proteção das bactérias de um biofilme, principalmente quando apresentam susceptibilidade a antimicrobianos [22,23].

Costerton et al. (2001) [22], mostra três hipóteses principais, que seriam possíveis mecanismos de resistência dos biofilmes aos antibióticos. A primeira hipótese é a possibilidade de penetração lenta ou incompleta do antibiótico no biofilme, devido à sua adsorção na matriz, causada pela interação (atração) das cargas do antibiótico e da matriz do biofilme. A segunda hipótese traz a possibilidade de um composto químico atuar de formas diferentes nos microambientes do biofilme. Por exemplo, os antibióticos aminoglicosídeos são claramente menos eficazes contra o mesmo microrganismo em anaerobiose (camadas mais profundas do biofilme) do que em condições aeróbicas (camadas superficiais do biofilme). A última hipótese sugere que uma subpopulação de microrganismos em um biofilme forma um único, e altamente protegido, estado fenotípico – uma diferenciação celular semelhante à formação de esporos, as chamadas células persistentes [22]

A formação e desenvolvimento de biofilmes é um processo complexo envolvendo diferentes etapas que podem ser alvo de agentes naturais que atuam na prevenção do seu desenvolvimento [24]. Ressaltando-se que a eliminação do biofilme já formado, é muito mais complexa do que no período que ele está em formação

Através da avaliação do potencial inibitório, o emodin (1,3,8-trihidroxi-6-metilntraquinona), um derivado natural de antraquinona [25] apresentou melhor desempenho na concentração 256 µg/mL, com percentual variando de 11 a 65%, mas ainda assim foi abaixo de 80%, ponto de corte para estabelecer a CIM. No estudo de Yan et al. (2017)[18], o qual avaliou através do método de coloração por Cristal Violeta, o efeito do emodin sobre *S. aureus* na forma de biofilme e células planctônicas, a CIM de 8 µg/mL foi encontrada. Alguns estudos, como Xiang et al. (2017) [26], trazem à luz o mecanismo de ação do emodin aloe (antraquinona derivada *Rheum rhabarbarum*) sobre biofilmes, tendo efeito durante os estágios iniciais de desenvolvimento e na composição da matriz, encerrando os processos de crescimento, quando adicionado nos estágios iniciais de adesão. De acordo com os resultados da literatura [26], esse composto inibe a

produção adesina polissacarídica intercelular (PIA), levando à inibição de formação do biofilme. Portanto, na avaliação do potencial inibitório do emodin deve-se adicioná-lo anteriormente à formação do biofilme, o que pode ter tido influência sobre não encontrarmos uma CIM maior que 80%, mesmo utilizando-se concentrações muito mais altas do que as analisadas na literatura.

Entre os compostos de baixa toxicidade analisou-se também a clorexidina, um anti-séptico, amplamente utilizado em ambiente hospitalar [19], que tem como mecanismo de ação adsorção à membrana celular por interações eletrostática [27]. Quando avaliado o potencial inibitório da clorexidina, a concentração de melhor desempenho foi a de 290 µg/mL, a qual já foi apontada na literatura como CIM para bactérias Gram-negativas [19]. Dentre os isolados analisados, este composto teve maior eficácia entre as bactérias Gram-negativas. Isso traz novos dados, diferentes dos apresentados na literatura, como Szkaradkiewicz et al. [28] que apresenta a clorexidina como tendo forte atividade biocida em bactérias Gram-positivas e atividade mais fraca contra bactérias Gram-negativas, que chegam a concentrações inibitórias mínimas até 256 vezes maiores, em relação as Gram-positivas.

O PAA é descrito na literatura como um agente químico antimicrobiano, que apresenta a vantagem de não apresentar componentes citotóxicos residuais [6]. Por ser um agente oxidante como o peróxido de hidrogênio, ele atua sobre a membrana citoplasmática, desativando as funções fisiológicas [29]. Quando testado sozinho, o PAA, apresentou um alto desempenho na inibição da atividade metabólica dos biofilmes, nas concentrações 0,1% e 0,2%, reforçando o que já foi mostrado na literatura para esporos de *B. subtilis* [6]. Entretanto, em desacordo com a literatura [15], os resultados do presente trabalho mostraram que o PAA em combinação com o peróxido de hidrogênio não teve seu efeito potencializado, pelo contrário, ele foi reduzido.

Por fim, quando analisado o desempenho do peróxido de hidrogênio isoladamente identificou-se que sua eficiência sobre os *Bacillus sp.* (62% - 86%) é muito semelhante à do PAA 0,2% (63% - 85%). Possivelmente essa uniformidade se dê em razão de ambos serem agentes oxidantes e, portanto, com mecanismos de ação semelhantes [23,24].

Quanto à capacidade de aderência do biofilme verificou-se que dentre os fortes formadores de biofilme (Tabela 2), o composto que teve melhor potencial inibitório foi o PAA 0,1%, apresentando potencial de inibição de 86% para *S. epidermidis* e *B. subtilis*. Este último, que além de ser um formador de biofilme fortemente aderente, foi caracterizado como sendo sensível a todos antimicrobianos testados [11]. Ainda, sobre os fortes formadores de biofilme, com PAA 0,1%, o *S. saprophyticus* apresentou redução de 83% da atividade metabólica. O PAA 0,2%, destacou-se apenas sobre a inibição de *P. agglomerans* (86%), que apresenta perfil de resistência a alguns antibióticos beta-lactâmicos (PEN e CFO) e macrolídeos (AZM). O desempenho do PAA já havia sido relatado sobre cepas de bactérias Gram-negativas com forte capacidade de aderência [30], mas não sobre Gram-positivas. Provavelmente essa capacidade de inibição mesmo em biofilmes fortemente aderentes se dê pelo mecanismo do PAA de interromper a função quimiosmótica da membrana citoplasmática da lipoproteína e se transportar através do deslocamento ou ruptura das paredes [31].

Em relação as bactérias com capacidade de aderência moderada, *S. aureus* e *B. cereus*, o ácido peracético a 0,1% mostrou percentagem de inibição de 86% e 82%, respectivamente. Ainda que o *S. aureus* apresentasse um perfil de resistência mais amplo, incluindo antibióticos beta-lactâmicos (PEN e CFO), quinolonas (CIP) e macrolídeos (AZM), que o *B. cereus*, com resistência apenas à beta-lactâmicos (PEN e CFO). Estudos como de Lee et al. (2013)[32], mostram essa capacidade de inativação do ácido peracético sobre biofilmes de aderência moderada, compostos por *S. aureus*. Contudo, nesse estudo o ácido peracético é utilizado em uma concentração maior (0,5%) e por um período menor (30 segundos), em relação ao presente trabalho. Sobre a percentagem de inibição de *B. cereus* ser menor que de *S. aureus*, uma das possibilidades que explicaria isso é a propriedade dos *Bacillus* sp. de perderem rapidamente seu estado de dormência e iniciarem o processo de germinação que é seguido pela conversão do esporo germinado em uma célula em crescimento [33].

Dentre as três bactérias com capacidade de aderência fraca, duas eram Gram-negativas e tiveram, aproximadamente, 86% de inibição da atividade metabólica. As quais, foram inibidas pela clorexidina 290 µg/mL (*K. variicola* e *Cocobacilo* Gram-negativo) e apresentavam perfil de resistência a beta-lactâmicos e macrolídeos. Apenas

*B. cereus*₁ teve a maior inibição da atividade metabólica causada por peróxido de hidrogênio 3%, sendo o único isolado que além de resistência a beta-lactâmicos, também apresentou resistência a aminoglicosídeos (EST).

Através dos resultados concluiu-se que a clorexidina na concentração 290 µg/mL, sobre bactérias Gram-negativas, e PAA 0,1%, sobre bactérias Gram-positivas, apresentaram os melhores resultados gerais sobre bactérias formadoras de biofilmes. Além desses compostos já serem muito utilizados para desinfecções gerais, o que facilitaria a inserção desses nos protocolos de esterilização em peles alógenas, outro fator importante são os baixos efeitos citotóxicos destes compostos. Da mesma forma, o emodin seria uma opção muito valiosa por se tratar de um agente natural com poucos efeitos colaterais, por isso é muito importante que mais estudos sejam feitos, visando aperfeiçoar o protocolo atual sobre biofilmes já formados.

Referências

- [1] Leon-Villalpalos J, Eldardiri M, Dziewulski P. The use of human deceased donor skin allograft in burn care. *Cell Tissue Bank* 2010;11:99–104. <https://doi.org/10.1007/s10561-009-9152-1>.
- [2] Matoski A, da Silva CRGBP, da Silva-Cunha D, Calomeno LA, Bonato F, Nigro MV. First-year experience of a new skin bank in Brazil. *Plast Aesthetic Res* 2015;2:326. <https://doi.org/10.4103/2347-9264.169496>.
- [3] Kearney JN. Guidelines on processing and clinical use of skin allografts. *Clin Dermatol* 2005;23:357–64. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2004.07.018>.
- [4] Gaucher S, Khaznadar Z, Gourevitch JC, Jarraya M. Skin donors and human skin allografts: evaluation of an 11-year practice and discard in a referral tissue bank. *Cell Tissue Bank* 2016;17:11–9. <https://doi.org/10.1007/s10561-015-9528-3>.
- [5] Singh R, Singh D, Singh A. *World Journal of Radiology* © 2016 2016;8:355–70. <https://doi.org/10.4329/wjr.v8.i4.355>.
- [6] Lomas RJ, Cruse-sawyer JE, Simpson C, Ingham E, Bojar R, Kearney JN. Assessment of the biological properties of human split skin allografts disinfected with peracetic acid and preserved in glycerol 2003;29:515–25. [https://doi.org/10.1016/S0305-4179\(03\)00137-2](https://doi.org/10.1016/S0305-4179(03)00137-2).
- [7] Mathur M, De A, Gore M. Microbiological assessment of cadaver skin grafts received in a Skin Bank. *Burns* 2009;35:104–6.

<https://doi.org/10.1016/j.burns.2008.04.001>.

- [8] Pitt TL, Tidey K, Roy A, Ancliff S, Lomas R, McDonald CP. Activity of four antimicrobial cocktails for tissue allograft decontamination against bacteria and *Candida* spp . of known susceptibility at different temperatures 2013. <https://doi.org/10.1007/s10561-013-9382-0>.
- [9] Serafini A, Riello E, Trojan D, Cogliati E, Palu G, Manganeli R, et al. Evaluation of new antibiotic cocktails against contaminating bacteria found in allograft tissues 2016;619–28. <https://doi.org/10.1007/s10561-016-9581-6>.
- [10] Shin K, Yun Y, Yi S, Gee H, Cho J, Suh K, et al. Biofilm-forming ability of *Staphylococcus aureus* strains isolated from human skin. *J Dermatol Sci* 2013. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.04.004>.
- [11] Meneghetti KL, Canabarro C, Otton LM, Hain S. Bacterial contamination of human skin allografts and antimicrobial resistance : a skin bank problem. *BMC Microbiol* 2018;1–9.
- [12] Aiola S, Amico G, Battaglia P, Battistelli E. The Large-Scale Polarization Explorer (LSPE). *ArXiv Prepr ArXiv ...* 2012;15:167–93. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167>.
- [13] Mah TC, Toole GAO. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents 2001;9:34–9.
- [14] Trampuz A, Zimmerli W. Diagnosis and treatment of infections associated with fracture-fixation devices 2006;59–66. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2006.04.010>.
- [15] Russu E, An AM Ş. Vascular graft infections management 2011:16–9.
- [16] Frederic Bounoure, Herve Fiquet. Comparison of hydrogen peroxide and peracetic acid as isolator sterilization agents in a hospital pharmacy. *Reports Isol Steriliz Agents* 2006;63:451–5. <https://doi.org/10.2146/ajhp040451>.
- [17] Leggett MJ, Schwarz JS, Burke PA, McDonnell G, Denyer SP, Maillard J. Mechanism of Sporicidal Activity for the Synergistic Combination of Peracetic Acid and Hydrogen Peroxide 2016;82:1035–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.03010-15.Editor>.
- [18] Yan X, Gu S, Shi Y, Cui X, Wen S, Ge J. The effect of emodin on *Staphylococcus aureus* strains in planktonic form and biofilm formation in vitro. *Arch Microbiol* 2017;199:1267–75. <https://doi.org/10.1007/s00203-017-1396-8>.
- [19] Cordenonsi P, Filippi C, Vendruscolo T, Albertina V, Rigon C, Flores C, et al.

- American Journal of Infection Control Chlorhexidine activity against bacterial bio films 2013;4–7. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2013.05.002>.
- [20] Shen Y, Qian W, Chung C, Olsen I, Haapasalo M. Evaluation of the Effect of Two Chlorhexidine Preparations on Biofilm Bacteria In Vitro : A Three-Dimensional Quantitative Analysis. *J Endod* 2009;35:981–5. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.04.030>.
- [21] Rooney P, Eagle M, Hogg P, Lomas R, Kearney J. Sterilisation of skin allograft with gamma irradiation 2008;34:664–73. <https://doi.org/10.1016/j.burns.2007.08.021>.
- [22] Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135–8.
- [23] Walsh C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* 2000;406:775–81.
- [24] Mishra R, Panda AK, Mandal S De, Shakeel M. Natural Anti-biofilm Agents : Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens 2020;11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.566325>.
- [25] Dong X, Fu J, Yin X, Cao S, Li X, Lin L. Emodin : A Review of its Pharmacology , Toxicity and Pharmacokinetics. *Phyther Res* 2016;1218:1207–18.
- [26] Xiang H, Cao F, Ming D, Zheng Y, Dong X, Zhong X, et al. Aloe-emodin inhibits *Staphylococcus aureus* biofilms and extracellular protein production at the initial adhesion stage of biofilm development. *Appl Genet Mol Biotechnol Aloe-Emodin* 2017;101:6671–81. <https://doi.org/10.1007/s00253-017-8403-5>.
- [27] Amoras L da S. Uso da clorexidina na Medicina: Revisão de Literatura. Campinas, Univ Estadual D Piracicaba, Fac D E Odontol 2013:1–36.
- [28] Karpi TM, Szkaradkiewicz AK. Chlorhexidine – pharmaco-biological activity and application 2015:1321–6.
- [29] Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo. Uso do Ácido Peracético na Prática Clínica em Saúde Bucal, no Âmbito da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo – SMS-SP. Coord Da Atenção Básica Área Técnica Saúde Bucal 2011:1–14.
- [30] Costa SA, Schneider AM, Fonseca GR, Sereno MJ, Pegoraro K. AÇÃO DO ÁCIDO PERACÉTICO EM BIOFILME. XXV Congr Bras Ciência e Tecnol Aliment 2016:1–6.

- [31] Kitis M. Disinfection of wastewater with peracetic acid : a review. *Environ Int* 2004;30:47–55. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(03\)00147-8](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(03)00147-8).
- [32] Lee SHI, Cappato LP, Corassin CH, Cruz AG, Oliveira CAF. Effect of peracetic acid on biofilms formed by *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* isolated from dairy plants. *J Dairy Sci* 2016;1–7.<https://doi.org/10.3168/jds.2015-10007>.
- [33] Setlow P. Germination of Spores of *Bacillus* Species : What We Know and Do Not Know 2014;196:1297–305. <https://doi.org/10.1128/JB.01455-13>.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base em nossos resultados concluiu-se que o PAA 0,1% apresenta os melhores resultados de inibição da atividade metabólica sobre bactérias Gram-positivas formadoras de biofilmes.

A clorexidina na concentração 290 µg/mL possui melhor potencial inibitório sobre bactérias Gram-negativas formadoras de biofilme.

O PAA, apesar de ter um mecanismo de ação semelhante ao peróxido de hidrogênio não teve sua eficácia potencializada pelo mesmo. Já usado separadamente, o peróxido de hidrogênio apresenta eficácia satisfatória.

Quanto a utilização do emodin, faz-se necessário a realização de mais ensaios, a fim de aperfeiçoar o protocolo sobre biofilmes já formados.

REFERÊNCIAS

- AIDULIS, D. et al. Processing of ovine cardiac valve allografts: 1. Effects of preservation method on structure and mechanical properties. **Cell and Tissue Banking**. Netherlands, 3(2):79-89, May 2002.
- AIOLA, S. et al. **The Large-Scale Polarization Explorer (LSPE)**. In Proceedings of SPIE - The International Society for Optical Engineering. Amsterdam, 2012.
- ALMEIDA, F. A. **Influência do quorum sensing na formação de biofilme e no perfil de expressão de proteínas de salmonella enterica sorovar enteritidis**. Dissertação (mestrado), 2014. Departamento de Microbiologia. Programa de Pós-graduação em Microbiologia Agrícola. Universidade Federal de Viçosa.
- AMORAS, L. S. **Uso da Clorexidina na medicina: Revisão de Literatura**. Trabalho de conclusão de curso (especialização), 2013. Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.
- BÁRBARA, M. C. S.; MIYAMARU, L. L. **A Estabilidade do Ácido Peracético**. Centro de Medicamentos Cosméticos e Saneantes - Instituto Adolfo Lutz. 24(1):10-12, 2014.
- BONEZ, P. C. et al. Chlorhexidine activity against bacterial biofilms. **American Journal of Infection Control**. 41(12):119-22, Dec 2013.
- BORRIELLO, G. et al. Oxygen Limitation Contributes to Antibiotic Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in Biofilms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 48(7) 2659–2664, Mar 2004.
- BOUNOURE, F.; FIQUET, H.; ARNAUD, P. Comparison of hydrogen peroxide and peracetic acid as isolator sterilization agents in a hospital pharmacy. **Am J Health Syst Pharm**. 63(5):451-5, Mar 2006.
- CAMPBELL, J. et al. Salvage of Contaminated Osteochondral Allografts. **The American Journal of Sports Medicine**. 42(4):973-978, Apr 2014.

CAO, F. et al. Emodin is identified as the active component of ether extracts from *Rhizoma Polygoni Cuspidati*, for anti-MRSA activity. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 93(6):485-93, Jun 2015.

CHUKWUJEKWU, J. C. et al. Emodin, an antibacterial anthraquinone from the roots of *Cassia occidentalis*. **South African Journal of Botany.** 72:295-297, Aug 2005.

CIRIMINNA, R. et al. Hydrogen Peroxide: A Key Chemical for Today's Sustainable Development. **ChemSusChem.** 9(24):3374-338, Dec 2016.

CRAMTON, S. E. et al. The Intercellular Adhesion (*ica*) Locus Is Present in *Staphylococcus aureus* and Is Required for Biofilm Formation. **American Society for Microbiology: Infection And Immunity.** 67(10): 5427–5433, Oct 1999.

DONG, X. et al. Emodin: A Review of its Pharmacology, Toxicity and Pharmacokinetics. **Phytotherapy Research.** 30: 1207–1218, May 2016.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews.** 15(2): 167–193, Apr 2002.

GALA, J. L. et al. HIV-1 detection by nested PCR and viral culture in fresh or cryopreserved postmortem skin: potential implications for skin handling and allografting. **J Clin Pathol.** Bruxelles, 50:481-484, Mar 1997.

GARDNER, E. M. H. et al. Effect of hydrogen peroxide on human tendon allograft. **Cell Tissue Bank.** 14:667–671, May 2013.

GAUCHER, S. et al. Skin donors and human skin allografts: evaluation of an 11-year practice and discard in a referral tissue bank. **Cell Tissue Bank.** Aug 2015.

GOMES, L. C. **Optimization of cultivation conditions for E. coli biofilm formation in microtiter plates**, 2011. Department of Chemical Engineering, Porto University.

HØIBY, N. et al. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents.** 35: 322–332, Dec 2009.

JAEGER, M. R. O. et al. Allograft in the treatment of deep second-degree burns in children. **Arquivos Catarinenses de Medicina**. Porto Alegre, v. 41:150-153, 2012.

JAMAL, M. et al. Bacterial biofilm and associated infections. **Journal of the Chinese Medical Association**. Taiwan, 81:7-11, Jul 2017.

KAGAN, R. J.; ROBB, E. C.; PLESSINGER, R. T. Human Skin Banking. **Clinics in Laboratory Medicine**. Cincinnati, 25:587-605, 2005.

KEARNEY, J. N. Guidelines on processing and clinical use of skin allografts. **Clinics in Dermatology**. Sheffield, 23:357-364, 2005.

LEGETT M.; SCHWARZ J.; BURKE P.; et al. Mechanism of Sporicidal Activity for the Synergistic Combination of Peracetic Acid and Hydrogen Peroxide. **Applied and Environmental Microbiology**. 82:1035-1039, 2016.

LEON-VILLAPALOS, J.; ELDARDIRI M.; DZIEWULSKI P. The use of human deceased donor skin allograft in burn care. **Cell Tissue Bank**. 11(1):99-104, Aug 2009.

LEOW-DYKE, S. F.; ROONEY, P.; KEARNEY, J. N. The efficacy and sterilisation of human decellularised dermal allografts with combinations of cupric ions and hydrogen peroxide. **Cell Tissue Bank**. 18(4):561-572, Sep 2017.

LOMAS, R. J. et al. Assessment of the biological properties of human split skin allografts disinfected with peracetic acid and preserved in glycerol. **Burns**. 29(6):515-525, Sep 2003.

MACIÀ, M. D.; ROJO-MOLINERO, E.; OLIVER, A. Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. **Clin Microbiol Infect**, v. 20(10):981-990, Oct 2014.

MATHUR M.; DE, A.; GORE, M. Microbiological assessment of cadaver skin grafts received in a Skin Bank. **Burns**. 35:104-106, Apr 2008.

MATIOSKI, A. R. et al. First-year experience of a new skin bank in Brazil. **Plastic and Aesthetic Research**. Curitiba, v. 2, n. 6, p. 6, Sep 2015.

MOCK, C. et al. A WHO plan for burn prevention and care. **World Health Organization**. Geneva, 2008.

MOHR, J. et al. Desinfection of human musculoskeletal allografts in tissue banking: a systematic review. **Cell Tissue Bank**. 17:573-584, Sep 2016.

NEOBRAx. Clorexidina: **Relatório Técnico**. São Paulo.

OBENG, M. K. et al. Cadaveric allograft discards as a result of positive skin cultures. **Burns**. 27:267-271, Sep 2000.

OLSEN, I. Biofilm-specific antibiotic tolerance and resistance. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. Berlin, 34(5):877-886, May 2015.

PITT, T. L. et al. Activity of four antimicrobial cocktails for tissue allograft decontamination against bacteria and *Candida* spp. of known susceptibility at different temperatures. **Cell Tissue Bank**. 15(1):119-125, Jun 2013.

PRUSS, A. et al. Validation of the Sterilization Procedure of Allogeneic Avital Bone Transplants Using Peracetic Acid–Ethanol. **Biologicals**. 29(2):59-66, Jun 2001.

ROY, R. et al. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **VIRULENCE**. 9(1):522-554, Mar 2017.

SÃO PAULO: Secretaria de Saúde. **Uso do ácido peracético na prática clínica em saúde bucal, no âmbito da Secretaria Municipal da Saúde de São Paulo**. Coordenação da Atenção Básica, Área Técnica de Saúde Bucal; 2011.

SCHIOZER, W. Banco de pele no Brasil. **Rev. Bras. Queimaduras**. Goiânia, 11(2):53-55, 2012.

SERAFINI, A. et al. Evaluation of new antibiotic cocktails against contaminating bacteria found in allograft tissues. **Cell Tissue Bank**. 17:619–628, Sep 2016.

SHEN, Y. et al. Evaluation of the Effect of Two Chlorhexidine Preparations on Biofilm Bacteria In Vitro: A Three-Dimensional Quantitative Analysis. **J Endod**. 35(7):981-985,0 Jul 2009.

SHENG-ZHANG, L. et al. Effect of Emodin in Suppressing Acute Rejection Following Liver Allograft Transplantation in Rats. **Chin J Integr Med**. 16(2):151-156, Apr 2010.

SHIN, K. et al. Biofilm-forming ability of Staphylococcus aureus strains isolated from human skin. **Journal of Dermatological Science**. 71(2):130-137, Aug 2013.

SILVEIRA, D. P. M. et al. Banco de Pele de Porto Alegre: produtividade e perfil dos doadores. **Rev Bras Cir Plást**. 28:6-6, 2013.

SINGH, R.; SINGH, D.; SINGH, A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. **World J Radiol**. 8(4): 355-369, Apr 2016.

SRINIVAS, G. et al. Molecular Mechanism of Emodin Action: Transition from Laxative Ingredient to an Antitumor Agent. **Medicinal Research Reviews**. 27(5):591-608, Oct 2006.

STRONG, D. M. The US Navy Tissue Bank: 50 years on the cutting edge. **Cell and Tissue Banking**. Netherlands, 1: 9–16, 2000.

SUTHERLAND, I. W. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. **TRENDS in Microbiology**. v. 9, n. 5, p. 222-227, May 2001.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

URBAN, M. V.; RATH, T.; RADTKE, C. Hydrogen peroxide (H₂O₂): a review of its use in surgery. **Wien Med Wochenschr**. 169(9-10):222-225, Nov 2017.

VICENTINO, W. et al. Guidelines to Implement Quality Management Systems in Microbiology Laboratories for Tissue Banking. **Transplantation Proceedings**. New York, 41:3481–3484, Sep 2009.

WESSELS, S.; INGMER, H. Modes of action of three disinfectant active substances: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. 67(3):456-67, Dec 2013

.

YAN, X. et al. The effect of emodin on *Staphylococcus aureus* strains in planktonic form and biofilm formation in vitro. **Arch Microbiol**. Berlin, 199(9):1267-1275, Jun 2017.

YANG, N. et al. Emodin Induced SREBP1-Dependent and SREBP1-Independent Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells. **Frontiers in Pharmacology**. 10:1-14, Jun 2019.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA



INTERNATIONAL JOURNAL OF ANTIMICROBIAL AGENTS

Official journal of the [International Society of Antimicrobial Chemotherapy](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.2
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.4



ISSN: 0924-8579

DESCRIPTION

The *International Journal of Antimicrobial Agents* provides comprehensive and up-to-date peer reviewed reference information on the physical, pharmacological, *in vitro* and clinical properties of individual **antimicrobial agents** (**antiviral** agents, **antiparasitic** agents, **antibacterial** agents, **antifungal** agents, etc.). In addition, the journal signals new trends and developments in the field through highly authoritative review articles on antimicrobial agents. Special attention is given to articles providing insight into the problems of **antimicrobial resistance** both in the hospital and in the community. Both solicited reviews by top experts in the mentioned fields and high-quality original research papers are published.

Additional information on the ISAC and its activities can be found at the ISAC Web site at:
<http://www.ischemo.org>

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our [Support Center](#)

AUDIENCE

Clinical Microbiologists, Pharmacists, Pharmaceutical Scientists, Bacteriologists, Pharmacologists, Clinical Virologists, Medical Practitioners.

IMPACT FACTOR

2019: 4.621 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

Current Contents - Life Sciences
 Pascal Francis
 Embase
 Cambridge Scientific Abstracts
 PubMed/Medline
 Scopus
 Elsevier BIOBASE
 BIOSIS Citation Index

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

J.M. Rolain, Marseille, France

Scientific Assistant

Sophie Baron, Marseille, France

Editorial Office

J. Merrison, Kidlington, United Kingdom

Editors

R. Allaker, London, United Kingdom
A. Bal, Kilmarnock, United Kingdom
C. Bertelli, Lausanne, Switzerland
R. Bharadwaj, Pune, India
P. Colson, Marseille, France
G. Coombs, Murdoch, Australia
C. Costelloe, London, United Kingdom
S. Dancer, Edinburgh, United Kingdom
S. Diene, Geneva, Switzerland
M. Ellington, Cambridge, United Kingdom
M. E. Falagas, Athens, Greece
E.J. Giamarellos-Bourboulis, Athens, Greece
H. Giamarellou, Athens, Greece
J. Gray, Birmingham, United Kingdom
P.R. Hsueh, Taipei, Taiwan
S.H. Jeong, Seodaemun-gu, South Korea
J.C. Lagler, Marseille Cedex 05, France
D. Law, Manchester, United Kingdom
G. Levy Hara, Buenos Aires, Argentina
J. Li, Parkville, Victoria, Australia, Victoria
J. Lipman, Brisbane, Australia
K.G. Naber, Munchen, Germany
A. Olaitan, Houston, Texas, United States of America
B. Pradines, Br,tigny sur Orge, France
J. Roberts, Herston, Australia
E. Roilides, Thessaloniki, Greece
A. Seaton, Glasgow, United Kingdom
S. Simjee, Basingstoke, United Kingdom
S. Stefani, Catania, Italy
S. Straus, Vancouver, British Columbia, Canada
A. Tsakris, Athens, Greece
P.M. Tulkens, Brussels, Belgium
S. Unal, Ankara, Turkey
J Walochnik, Wien, Austria
M.G. Wang, Shanghai, China
S. Wicha, Hamburg, Germany

International Advisory Board

H.E. Akalin, İstanbul, Turkey
J. Andrews, Birmingham, United Kingdom
B. Barsic, Zagreb, Croatia
E. Bergogne-Berezin, Paris, France

K.A. Brogden, Iowa City, Iowa, United States of America
K. Bush, Bloomington, Indiana, United States of America
E. De Clercq, Leuven, Belgium
D. Denning, Manchester, United Kingdom
M. Enright, London, United Kingdom
R. Feld, Toronto, Ontario, Canada
A.P. Fraise, Birmingham, United Kingdom
J. Garau, Terrassa, Spain
J.A. Garcia-Rodriguez, Salamanca, Spain
I.M. Gould, Aberdeen, United Kingdom
M.L. Grayson, Heidelberg, Australia
K.A. Hiramatsu, Tokyo, Japan
A. Hoepelman, Utrecht, Netherlands
N. Højby, Copenhagen, Denmark
R. Jones, North Liberty, Iowa, United States of America
G. Kahlmeter, Växjö, Sweden
K.P. Klugman, Seattle, Washington, United States of America
G. Kronvall, Stockholm, Sweden
D. Lew, Geneva, Ohio, United States of America
A. MacGowan, Bristol, United Kingdom
F. MacKenzie, Aberdeen, United Kingdom
L.A. Mandell, Hamilton, Ontario, Canada
T. Matsumoto, Kitakyushu, Japan
T. Mazzei, Firenze, Italy
C.E. Nord, Huddinge, Sweden
M. Pelemis, Belgrade, Serbia
T.V. Riley, Perth, Western Australia, Australia
V. Rojny, Bratislava, Slovakia
R. Saginur, Ottawa, Ontario, Canada
F. Scaglione, Milan, Italy
A.M. Sefton, London, United Kingdom
J.H. Song, Seoul, South Korea
M. Stegger, København, Denmark
M.J. Struelens, Brussel, Belgium
F. Tenover, Sunnyvale, California, United States of America
J. Verhoef, Utrecht, Netherlands
M. Yagisawa, Shinagawa-Ku, Japan

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

These guidelines generally follow the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals". The complete document appears at <http://www.icmje.org>.

Types of paper

The following types of manuscripts are routinely accepted (please note that word count is from abstract to references but excluding references):

Original Articles: The form of these articles is discussed fully below; an abstract is required. They should be no longer than 4000 words and 40 references (as above, please note that word count also excludes tables, figures and legends). IJAA will be happy to consider papers of veterinary origin as long as there is some linkage of the scientific work back to human antibiotic use.

Letters: Headings should not be used in a letter; no abstract or keywords are required. The text should be no more than 800 words; there should be a maximum of 5 references and one table or figure may be included.

Reviews: An abstract and keywords are required. The text should be divided into sections by suitable headings. Tables and figures may be used as appropriate for the text. They should be no longer than 5000 words.

Short Communications: These should be no more than 2,500 words, with up to 20 references and a maximum of 3 figures or tables.

Hot Topics: These tend to be invited papers but unsolicited Hot Topic articles are welcome. There are no abstract, keywords or section headings.

It is required that Authors provide a list of 4 or 5 potential reviewers (e-mail and phone number) who are knowledgeable in the subject matter, have no conflict of interest, and are likely to agree to review the manuscript. Please ensure that 2 of the potential reviewers are from a different country to the authors. Please ensure that you include the Institution and country for each potential reviewer.

Contact details for submission

If you have any problems submitting your paper through this system, please contact the Editorial Office on: e-mail: ijaa@elsevier.com; tel: +44 (0)1865 843270; fax: +44 (0)1865 843992.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- Relevant declarations of interest have been made
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

Please ensure that the following are included in your submission: | One author designated as corresponding author: | Their E-mail address | Full postal address | Telephone and fax numbers | Keywords | Cover letter addressed to the Editor, introducing the manuscript and confirming that it is not being submitted concurrently elsewhere | All figure captions | All tables (including title, description, footnotes) | All necessary files have been uploaded as attachments to the e-mail | Manuscript has been spell checked | All text pages have been numbered | References are in the correct format for this journal | All references mentioned in the Reference list are cited in the text and vice versa | Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Web)

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Studies in humans and animals

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association \(Declaration of Helsinki\)](#) for experiments involving humans. The manuscript should be in line with the [Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals](#) and aim for the inclusion of representative human populations (sex, age and ethnicity) as per those recommendations. The terms [sex](#) and [gender](#) should be used correctly.

Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed. The sex of animals must be indicated, and where appropriate, the influence (or association) of sex on the results of the study.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double anonymized) or the manuscript file (if single anonymized). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information](#).

Please complete the questions in 'Additional Information' when submitting your manuscript that cover Funding, Competing Interests, Ethical Approval and Randomized Clinical Trials.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see ['Multiple, redundant or concurrent publication'](#) for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in

English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [Crossref Similarity Check](#).

Preprints

Please note that [preprints](#) can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's [sharing policy](#). Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see '[Multiple, redundant or concurrent publication](#)' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Contributors

Each author is required to declare his or her individual contribution to the article: all authors must have materially participated in the research and/or article preparation, so roles for all authors should be described. The statement that all authors have approved the final article should be true and included in the disclosure.

Authorship

All authors should have made substantial contributions to all of the following: (1) the conception and design of the study, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data, (2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content, (3) final approval of the version to be submitted.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Clinical trial results

In line with the position of the International Committee of Medical Journal Editors, the journal will not consider results posted in the same clinical trials registry in which primary registration resides to be prior publication if the results posted are presented in the form of a brief structured (less than 500 words) abstract or table. However, divulging results in other circumstances (e.g., investors' meetings) is discouraged and may jeopardise consideration of the manuscript. Authors should fully disclose all posting in registries of results of the same or closely related work.

Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The [CONSORT checklist and template flow diagram](#) are available online.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with [International Committee of Medical Journal Editors](#) recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. [More information.](#)

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information.](#)

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our [Open Access page](#) for more information.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's Author Services.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author but copies should not be provided to the journal. Only if specifically requested by the journal in exceptional circumstances (for example if a legal issue arises) the author must provide copies of the consents or evidence that such consents have been obtained. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <https://www.editorialmanager.com/IJAA/default.aspx>.

It is required that Authors provide a list of 4 or 5 potential reviewers (including the Institution, country, email and phone numbers) who are knowledgeable in the subject matter, have no conflict of interest, are not located in the same Institution and are likely to agree to review the manuscript. Please ensure that 2 of the potential reviewers are from different countries to the authors. These suggested reviewers cannot be members of the Editorial Board of IJAA. Without reviewer suggestions, processing of the manuscript may be delayed.

Editorial Review

All manuscripts are subject to peer review. If changes are requested, revisions received later than 3 months after this request will be treated as new submissions.

Authors in Japan please note: If you would like information about how to have the English of your paper checked, corrected and improved (before submission), please contact our Tokyo office who will inform you of the services provided by language correctors: Elsevier Japan, 9-15 Higashi-Azabu 1-chome, Minato-ku, Tokyo, 106 Japan, Tokyo; Tel: +81-3-5561-5032; Fax: +81-3-5561-5032.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of one independent expert reviewer to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required (maximum length 250 words). The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. Do not cite references in the abstract. Non-standard or uncommon abbreviations should be avoided in the abstract, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal as they help increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: [example Highlights](#).

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 3-6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.
- Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites). [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables should be uploaded separately and not be included as part of the manuscript text. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these

references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#). Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. [More information on how to remove field codes from different reference management software.](#)

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/international-journal-of-antimicrobial-agents>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9. <https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372>.

Reference to a journal publication with an article number:

[2] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *Heliyon*. 2018;19:e00205. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205>

Reference to a book:

[3] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[4] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Reference to a website:

[5] Cancer Research UK. *Cancer statistics reports for the UK*, <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>; 2003 [accessed 13 March 2003].

Reference to a dataset:

[dataset] [6] Oguro M, Imahiro S, Saito S, Nakashizuka T. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1; 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also [Samples of Formatted References](#)).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions [here](#) to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

For further guidance on our online proofing tool Proof Central please see: <https://www.elsevier.com/authors/journal-authors/proof-central>.

Please note that once a paper has been accepted, the only changes possible are in relation to any queries raised by the Technical Editor or Typesetter.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or [find out when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2018 Elsevier | <https://www.elsevier.com>