FLÁVIO FERRAZ DE CAMPOS JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO*
DA LIGA NÍQUEL-BERÍLIO ÀS CÉLULAS
BACTERIANAS E À LINHAGEM CELULAR
NCTC CLONE 929.**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades Bioengenharia - Escola de Engenharia de São Carlos / Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de doutor em Ciências.

Área de Concentração: Bioengenharia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

VERSÃO CORRIGIDA

São Carlos,
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO,
POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS
DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

C198a Campos Júnior, Flávio Ferraz de
Avaliação da citotoxicidade in vitro da liga
níquel-berílio às células bacterianas e à linhagem
celular NCTC Clone 929 / Flávio Ferraz de Campos
Júnior; orientadora Elisabeth Loshchagin Pizzolitto.
São Carlos, 2015.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação
Interunidades Bioengenharia e Área de Concentração em
Bioengenharia -- Escola de Engenharia de São Carlos;
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São Paulo,
2015.

1. níquel. 2. berílio. 3. resistência bacteriana.
4. ligas metálicas. 5. citotoxicidade. I. Título.

Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia
EESC / FMRP / IQSC

Flávio Ferraz de Campos Junior

Título: "Avaliação da citotoxicidade in vitro da liga níquel-berílio às células bacterianas e à linhagem celular NCTC clone 929".

TESE APRESENTADA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INTERUNIDADES BIOENGENHARIA - EESC/FMRP/IQSC DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE
DOUTOR EM CIÊNCIAS NA ÁREA DE BIOENGENHARIA.

Aprovada em: 17 / 04 / 2015

Prof^a. Dr^a. Elisabeth Loshchagin Pizzolitto
(Orientadora)

Resultado: Aprovado

Universidade Estadual Paulista – "Júlio de
Mesquita Filho" - UNESP

Assinatura: Elisabeth Loshchagin Pizzolitto

Prof. Dr. Adilson Cesar Abreu Bernardi

Resultado: Aprovado

Centro Universitário de Araraquara - UNIARA

Assinatura: Adilson Cesar Abreu Bernardi

Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Resultado: Aprovado

Universidade Federal de São Carlos - UFSCAR

Assinatura: Clovis Wesley Oliveira de Souza

Dr^a. Bruna Leite Simioni

Resultado: Aprovado

Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Assinatura: Bruna Leite Simioni

Prof. Dr. Anísio Storti

Resultado: Aprovado

Faculdades Integradas de Fernandópolis - FIFE

Assinatura: Anísio Storti

Homologado em: ____ / ____ / ____

DEDICATÓRIA

A minha esposa, companheira e conselheira, Rafaela Messias. O meu muito obrigado pelos momentos de incentivo e compreensão da minha ausência. Obrigado por ser essa pessoa tão maravilhosa e obrigado por me dar tranquilidade para concluir mais uma etapa da minha vida, mais esta realização pessoal e profissional.

A minha princesa, Laura, por existir, por me dar tanta alegria e por me ensinar a verdadeira razão de viver.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Flávio e Lourdes, que me apoiaram, me incentivaram e me deram suporte para terminar meu doutoramento. Agradeço por me ensinarem a crer nos meus sonhos. A minha irmã, Karen, por todo carinho, apoio, compreensão prestado durante estes 4 anos de doutoramento.

Aos meus sogros, Sr. Messias e Dona Lourdes, que também me deram tranquilidade para realizar este processo de doutoramento, por confiarem no meu trabalho e me incentivarem a concluir mais esta etapa. Os considero também meus pais. Ao meu cunhado, Guilherme, agradeço pela amizade e pelas conversas.

Ao meu grande amigo e companheiro de trabalho, de pesquisa e viagens, Cássio Antonio Lanfredi dos Santos. O meu muito obrigado por todos os seus conselhos microbiológicos. Conte sempre comigo.

As funcionárias do setor de Microbiologia Clínica do CRD/NAC.

Ao engenheiro, professor Dr. João Manuel Domingos de Almeida Rollo, pela grande ideia de testar a liga níquel-berílio, pelos conselhos fornecidos, pela informação compartilhada e pelo sua grande dedicação à pesquisa. Obrigado por crer no meu potencial.

Ao grande amigo, Paulo José Martins Bispo, que me auxiliou e cedeu as cepas ATTCs utilizadas na realização de toda parte prática do projeto e pelas considerações feitas na língua inglesa.

Ao professor e amigo, Adilson César de Abreu Bernardi, por todos os ensinamentos passados sobre microbiologia, e também, por ter acreditado em meu potencial.

Aos meus grandes amigos, Marcelo Cremonez, Jader Moreno, Juliano Chaker, Fernanda Sanchez, Paulo Barreto Júnior e Carlos Mellaci Jr., Normandis Cardoso Filho, Raquel Camargo, Willys Tristão, Diego R. Rodrigues e Jhonatan Perin pelo incentivo, confiança e carinho depositados a mim.

A Deus por me abençoar e iluminar minha vida. Aos meus mentores, agradeço imensamente pelos conselhos e pelas palavras de amor que me direcionaram nos momentos difíceis dessa caminhada.

Obrigado a todos que acreditaram em meu sonho.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

A professora Doutora Elisabeth Loshchagin Pizzolitto por todo apoio, incentivo, determinação, ensinamentos, paciência, calma e carinho para comigo. Obrigado por ter acreditado e lutado comigo durante esses anos. Lembrarei da senhora com muito carinho, respeito e admiração durante toda minha vida. Uma excelente profissional, excelente pesquisadora e um excelente ser humano. Obrigado por tudo.

Que o amor à pesquisa, à microbiologia, aos biofilmes e aos docência NUNCA acabem!

EPÍGRAFE

Penso noventa e nove vezes e nada descubro.

Deixo de pensar, mergulho em profundo silêncio e

eis que a verdade se revela.

Albert Einstein

RESUMO

CAMPOS JÚNIOR, F. F. **AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DA LIGA NÍQUEL-BERÍLIO ÀS CÉLULAS BACTERIANAS E À LINHAGEM CELULAR NCTC CLONE 929**. 2015. 114f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC / FMRP / IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

A contaminação de equipamentos e materiais hospitalares por microrganismos potencialmente infecciosos e altamente resistentes aos antibióticos incitam grupos de pesquisa e indústrias ao redor do mundo a produzir novos materiais, e que estes possuam propriedades capazes de inibir ou eliminar (quase que completamente) a permanência desses patógenos sobre sua superfície. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade da liga níquel-berílio quando em contato com as cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (amostra clínica) e *Escherichia coli* (ATCC 11775), após diferentes períodos de incubação, e em contato com a linhagem celular NCTC Clone 929, célula de tecido conectivo de camundongo. Para realização destes ensaios, foram confeccionados corpos de prova da liga níquel-berílio, com aproximadamente 10,0 mm e diâmetro e 3,0 mm de espessura. Para metodologia de citotoxicidade as células bacterianas preparou-se um inóculo bacteriano de 10^9 Unidades Formadoras de Colônia por mililitro. Para cada bactéria, um inóculo bacteriano foi preparado e deste, 40 µl foram aplicados em um swab estéril e espalhado no corpo de prova, onde foram introduzidos em placas de Petri, deixados a temperatura 20°C, por diferentes períodos de exposição (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72 horas). Este teste foi realizado em triplicata. Após cada período de tempo, os corpos de prova eram pressionados contra o meio de cultura Agar Mueller-Hinton, em dez diferentes pontos da placa. O método de difusão em Agar foi utilizado para verificar a citotoxicidade da liga níquel-berílio à linhagem celular NCTC clone 929. Os resultados obtidos demonstram uma maior resistência a liga níquel-berílio das bactérias gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) quando comparadas com as gram-negativas (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli*). Destas últimas citadas, a *E. coli* foi a única que sobreviveu até a sexta hora de exposição, quando em contato de uma hora com o corpo de prova. Todavia, os *S. aureus* e *S. epidermidis* foram capazes de resistir até a décima segunda hora em contato com a liga níquel-berílio. Contudo, a partir deste período de incubação, nem mesmo os estafilococos toleraram a presença desses íons. Quando analisados os resultados de citotoxicidade, a liga não apresentou qualquer efeito citotóxico as células NCTC clone 929, sendo classificadas como índice de zona (IZ) zero. Os dados obtidos demonstram que a liga possui propriedades antibacteriana contra as células bacterianas testadas e que não possui nenhum efeito tóxico à linhagem celular NCTC clone 929. Além disso, a liga NiBe mostrou-se mais citotóxica contra as bactérias gram-negativas.

Palavras-chave: níquel; berílio; resistência bacteriana; ligas metálicas; citotoxicidade; células NCTC 929.

ABSTRACT

CAMPOS JÚNIOR, F. F. **EVALUATION OF IN VITRO CYTOTOXICITY OF NICKEL-BERYLLIUM ALLOY THE BACTERIAL CELLS AND CELL LINE NCTC CLONE 929.** 2015. 114f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação Interunidades em Bioengenharia – EESC / FMRP / IQSC, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

The contamination of equipment and hospital supplies for potentially infectious microorganisms and highly resistant to antibiotics encourage research groups and industries around the world to produce new materials, and they have properties able to inhibit or eliminate (almost completely) to stay these pathogens on its surface. The objective of this study was to evaluate the cytotoxicity of nickel-beryllium alloy when in contact with the bacterial strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25932), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Klebsiella pneumoniae* (clinical sample) and *Escherichia coli* (ATCC 11775), after different periods of incubation, and in contact with the cell line NCTC Clone 929, connective tissue of mouse cell. For these assays were prepared coupons of nickel-beryllium alloy, with approximately 10.0 mm and diameter and 3.0 mm thick. For cytotoxicity methodology bacterial cells prepared in a bacterial inoculum of 10^9 Colony-Forming Units per milliliter. For each bacterium, a bacterial inoculum was prepared and this, 40 μ l were applied in a sterile swab and spread in the coupons, which were introduced in Petri dishes left at 20°C temperature, for different exposure times (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 and 72 hours). This test was performed in triplicate. After each time period, the samples were pressed against the culture medium Mueller-Hinton Agar at ten different points of the plate. The agar diffusion method was used to assess the cytotoxicity of nickel-beryllium alloy to clone cell line NCTC 929. The results show a greater resistance to nickel-beryllium alloy of gram-positive bacteria (*S. aureus* and *S. epidermidis*) compared to gram-negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae* and *E. coli*). Of the latter mentioned, *E. coli* was the only one that survived until the sixth hour of exposure when contact an hour with the alloy. However, *S. aureus* and *S. epidermidis* were able to hold out until the twelfth time in contact with nickel-beryllium alloy. However, from this incubation period, even staphylococci tolerated the presence of these ions. When analyzed the results of cytotoxicity, the alloy showed no cytotoxic effect the NCTC clone 929 cells, are classified as zone index (IZ) zero. The data obtained show that the alloy possesses antibacterial properties against the tested bacterial cells and has no toxic effect on the cell line NCTC clone 929. Furthermore, NiBe alloy was more cytotoxic against gram-negative bacteria.

Keyword: nickel, beryllium, bacterial resistance; alloys; cytotoxicity; NCTC 929 cells.

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS, ELEMENTOS QUÍMICOS E UNIDADES DE MEDIDA

a.C – antes de Cristo

Al – Alumínio.

ATCC – American Type Culture Collection

ATSDR – Agência de Substância Tóxicas e Registro de Doenças (Agency for Toxic Substances and Disease Registry).

ATV – Associação de Tripsina 0,20% e Versene 0,02%.

Be – Berílio.

BeO – Óxido de berílio.

BGN – Bacilo gram-negativo.

C – Carbono.

CDC – Centros de Controle e Prevenção de Doenças (Centers for Disease Control and Prevention).

cm² – Centímetro quadrado.

Co – Cobalto.

Cr – Cromo.

Cu – Cobre.

EPA – Agência de Proteção Ambiental (Environmental Protection Agency).

FDA – Administração de Drogas e Alimentos (Food and Drug Administration).

Fe – Ferro.

g – Grama.

IARC – Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (International Agency For Research On Cancer).

ICA – Associação Internacional do Cobre.

IRAS – Infecção Relacionada à Assistência à Saúde.

ISO – Organização Internacional de Padronização (International Organization for Standardization).

IZ – Índice de zona.

LEMC – Laboratório Especializado em Microbiologia Clínica.

ml – mililitros.

mM – Milimolar.

MME – Meio Mínimo de Eagle.

MRSA – *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

NAC – Núcleo de Atendimento à Comunidade.

NCC - Núcleo de Cultura Celulares.

NCTC clone 929 - Cultura de células de tecido conjuntivo de camundongo.

Ni – Níquel.

nm – Nanômetro.

°C – graus Célsius (unidade de medida de temperatura).

OMS – Organização Mundial de Saúde.

Pb – Chumbo.

PBP – Proteína ligantes/ligadora de penicilina.

pH – Potencial Hidrogeniônico.

ppb – Partes por bilhão.

PPR – Penicilina-Penicilinase Resistente.

RODAC – Contagem e Detecção de Organismos Replicados.

SFB – Soro Fetal Bovino.

Si – Silício.

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.

Sn – Estanho.

TSB – Caldo de Soja Trípica.

UFC – Unidades formadoras de Colônia.

USGS – Pesquisa Geológica dos Estados Unidos.

USP – Farmacopeia dos Estados Unidos (United States Pharmacopeia).

UTI – Unidade de Terapia Intensiva.

VRE - *Enterococcus* resistente a vancomicina.

Zn – Zinco.

µl – Microlitro.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Reserva e produção mundial do níquel.	19
Tabela 2	Reserva e produção mundial do berílio.	26
Tabela 3	Porcentagem dos isolados bacterianos encontrados na pesquisa de CHIKERE et al., 2008.	40
Tabela 4	Patógenos, nichos ecológicos e significância clínica (ZIMRING et al., 2013).	42
Tabela 5	Persistência das bactérias clinicamente relevante em superfícies secas inanimadas (KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006).	47
Tabela 6	Composição química da liga níquel-berílio testada no presente estudo.	57
Tabela 7	Descreve e classifica o IZ (USP 23, 1995; USP 24, 1999; USP 25, 2002):	63
Tabela 8	Representação qualitativa do potencial de toxicidade da liga de níquel-berílio as cepas bacterianas testadas de acordo com os períodos de exposição.	64
Tabela 9	Média e desvio padrão da representação quantitativa de UFC de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> sobreviventes ao contato com a superfície de níquel-berílio, após os períodos de incubação	65
Tabela 10	Índice de zona (IZ) obtido da cultura celular NCTC 929 após contato de 24 horas com a liga de níquel-berílio.	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rotas de transmissão de patógenos hospitalares. (MRSA – <i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina; VRE – Enterococos resistentes à vancomicina; BGN – bacilos gram-negativos)	45
Figura 2	Demonstração dos corpos de prova da liga níquel-berílio.	55
Figura 3	Momento da aplicação do swab contendo 10^9 UFC sobre a superfície do corpo de prova da liga de NiBe.	59
Figura 4	Corpos de prova da liga NiBe em contato com as cepas testadas, a temperatura ambiente.	60
Figura 5	Após cada período de exposição a temperatura ambiente, retirava-se os corpos de prova da placa de Petri e aplicava-se o mesmo sobre a superfícies do Agar Mueller-Hinton, me dez locais diferentes.	61
Figura 6	Unidades Formadoras de Colônia sobreviventes após cada período de exposição (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72h) da <i>Pseudomonas aeruginosa</i> com a liga NiBe.	66
Figura 7	Unidades Formadoras de Colônia sobreviventes após cada período de exposição (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72h) da <i>Klebsiella pneumoniae</i> com a liga NiBe.	67
Figura 8	Unidades Formadoras de Colônia sobreviventes após cada período de exposição (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72h) da <i>Escherichia coli</i> com a liga NiBe.	68
Figura 9	Unidades Formadoras de Colônia sobreviventes após cada período de exposição (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72h) do <i>Staphylococcus epidermidis</i> com a liga NiBe.	69
Figura 10	Unidades Formadoras de Colônia sobreviventes após cada período de exposição (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72h) do <i>Staphylococcus aureus</i> com a liga NiBe.	70
Figura 11	Representação gráfica da média e desvio padrão das UFCs sobreviventes de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> , após cada período de exposição a liga NiBe.	71

SUMÁRIO

1– INTRODUÇÃO.....	14
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 – Os metais e as ligas metálicas – Um breve histórico.....	16
2.2 – O níquel e suas funções.....	18
2.3 – Níquel e sua citotoxicidade.....	22
2.4 –O berílio e suas funções.....	25
2.5 – Berílio e sua citotoxicidade.....	27
2.6 – Infecção Hospitalar: uma preocupação mundial.....	30
2.7 – Os principais patógenos no ambiente hospitalar.....	33
2.8 – A busca de novos materiais para reduzir a contaminação das superfícies e as infecções hospitalares.....	40
3. OBJETIVO.....	54
3.1 – Objetivo Geral.....	54
3.1.1 – Objetivos específicos.....	54
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	55
4.1 – Material.....	55
4.1.1 – Corpos-de-prova da liga níquel-berílio.....	55
4.1.2 – Microrganismos.....	55
4.1.3 – Linhagem celular.....	56
4.1.4 – Meios de Cultura.....	56
4.1.4.1. – Ágar Mueller-Hinton.....	56
4.1.4.2 – Agar de Soja Tríplica.....	56
4.1.4.3 – Caldo de Soja Tríplica.....	57
5 – MÉTODOS.....	57
5.1 – Confeção dos corpos-de-prova da liga níquel-berílio.....	57
5.2 – Preparo do inóculo bacteriano.....	58
5.3 – Ensaio de sobrevivência microbiana sobre superfície metálica seca.....	58
5.4 – Cultura Celular.....	61
5.4.1 – Método de difusão em Agar.....	62
5.5 – Análise Estatística.....	63

6 – RESULTADOS	64
6.1 – Sobrevivência bacteriana sobre superfície da liga níquel-berílio	64
6.1.1 - Análise qualitativa da capacidade citotóxica da liga níquel-berílio em relação à sobrevivência bacteriana	64
6.1.2 - Quantificação de Unidades Formados de Colônia (UFC) de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> sobreviventes a liga níquel-berílio, após os períodos de exposição	64
6.1.2 - Quantificação de Unidades Formados de Colônia de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> resistentes a liga níquel-berílio, após os períodos de exposição	64
6.1.3 – Imagens das UFCs recuperadas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> e <i>S. epidermidis</i> , após seus respectivos períodos de exposição a liga NiBe	65
6.1.3.1 – <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	66
6.1.3.2 – <i>Klebsiella pneumoniae</i>	67
6.1.3.2 – <i>Escherichia coli</i>	68
6.1.3.3 – <i>Staphylococcus epidermidis</i>	69
6.1.3.4 – <i>Staphylococcus aureus</i>	70
6.1.4 – Representação gráfica das UFCs sobreviventes após cada período de exposição a liga NiBe	71
6.2 – Determinação da citotoxicidade da liga níquel-berílio através do teste realizado com a linhagem celular NCTC 929	71
7 – DISCUSSÃO	73
8 - CONCLUSÃO	82
REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	
ANEXO A – INFORMAÇÕES SOBRE A AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE	113
ANEXO B – LAUDO DO TEXTE DE CITOTOXICIDADE DA LIGA NiBe	114

1 – INTRODUÇÃO

A busca incessante por melhorias dos materiais que são utilizados no revestimento dos equipamentos nos estabelecimentos da área da saúde, bem como das indústrias alimentícias, propulsiona empresas e grupos de pesquisas a desenvolverem novas estratégias para minimizar possíveis formas de contaminação e transmissão de microrganismos patogênicos nestes locais (AFESSA et al., 2010).

A contaminação microbiana nos alimentos e nos equipamentos deste ramo industrial são considerados problemas de saúde pública, uma vez que com a vida moderna, o ser humano sente maior necessidade de se alimentar fora de casa. A manipulação imprópria e a contaminação cruzada durante o processo industrial, ou a manipulação inadequada do consumidor, pode contribuir para disseminar perigosos microrganismos (FAÚNDEZ et al., 2004). O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) e a Administração de Drogas e Alimentos (FDA) dos Estados Unidos, estima que mais de 30 milhões de pessoas adoecem por ano devido a infecções causadas por contaminação de alimentos (durante o processo industrial ou durante o manuseio), e aproximadamente 9000 morrem (BUTZBY; ROBERTS, 1996; MAED et al., 1999). No Reino Unido, estima-se que 1 a cada 10 pacientes que entram no hospital para fazer um procedimento médico adquire infecção hospitalar, e estas infecções custaram cerca de 1 bilhão de libras por ano a mais para os hospitais. Os principais patógenos envolvidos nestas infecções são os *Staphylococcus sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella sp.* (BREATHNACH, 2005). Nos Estados Unidos da América, estima-se que ocorrem mais de 1,7 milhões de infecções hospitalares por ano, na qual esta resulta em aproximadamente 99.000 mortes/ano (KLEVENS et al., 2007).

Weber et al. (2010) relatam que uma variedade de fatores podem facilitar bactérias patogênicas serem transmitidas em um ambiente hospitalar, são eles: i) a capacidade destes microrganismos em sobreviver sobre superfícies por longos períodos de tempo; ii) a habilidade de permanecerem virulentos mesmo após contaminaram o ambiente; iii) frequente contaminação do ambiente hospitalar; iv) capacidade de colonizar pacientes; v) habilidade de transitar pelas mãos dos profissionais da saúde; vi) habilidade de serem transmitidos via contaminação das

mãos dos profissionais da saúde, e; vii) uma pequena dose inoculada em um paciente suscetível é capaz de levá-lo a morte (elevado potencial de virulência).

Com isso, muitos centros de pesquisa investiram no tratamento dessas superfícies com substância biocidas. A primeira superfície que sofreu tratamento e apresentou boas características antimicrobianas foram os plásticos. Logo, deram início a produção de telefones recobertos com esse material, assentos de banheiros, brinquedos e entre outros materiais (AIREY; VERRAN, 2007).

As contaminações bacterianas são tão preocupantes na saúde pública, que em qualquer tipo de material, inicialmente deve ser testado sua ação sobre as bactérias, somente depois de comprovado sua eficácia, que este deve passar por experimentos com fungos, algas e vírus. Este material pode apresentar excelentes propriedades antimicrobianas, mas se for tóxico à célula humana, o mesmo não poderá ser implantado para o contato com o homem (no caso de indústrias, hospitais e etc).

Mediante a essa premissa, diversos pesquisadores ao redor do mundo iniciaram testes com vários tipos de materiais metálicos a fim de encontrar àquele que possua melhor atividade antimicrobiana, inibindo assim, a capacidade destes microrganismos de se multiplicar e de sobreviver sobre essas superfícies. Somente em 2008, 275 ligas de cobre foram protocoladas e aprovadas pela Agência de Proteção Ambiental (EPA, em inglês) como material contendo propriedades antibacterianas. Após isso, a Associação Internacional do Cobre (ICA, em inglês) deu início a implantação destas superfícies em ambientes hospitalares. O cobre é o elemento químico mais testado no momento quanto as suas propriedades antimicrobianas, contudo, pouco se sabe sobre seus mecanismos de ação no contato direto com os microrganismos. Outro fator negativo sobre esse íon são os relatos encontrados na literatura científica de isolados de microrganismos (principalmente bactérias) portadores de plasmídeos (material genético circular, presente no citoplasma e constituinte não obrigatório) que codificam genes de resistência ao cobre, surgindo assim a necessidade de encontrar outros materiais (formados por compostos diferentes) com ação antimicrobiana.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Os metais e as ligas metálicas – Um breve histórico

Diferentes materiais têm acompanhado a humanidade desde seus primórdios, e estes tendo sido usados para produzir uma grande variedade de objetivos, entre estes exemplos estão ferramentas, utensílio, armas, objetos decorativos, etc. Sua utilização em determinadas épocas foi tão importante que períodos antigos foram denominados a partir do material neles predominantemente utilizados. A substituição de um material por outro trazia sempre novas aplicações e a transição entre os diferentes períodos era progressiva, tendo ocorrido em épocas diferentes em cada região do mundo. Os metais, inicialmente usados em seu estado nativo e, mais tardiamente, extraídos de minérios, apresentavam inúmeras vantagens em relação à pedra: eles podiam ser vazados na forma final, deformados e endurecidos por trabalho a frio ou amolecidos por aquecimento (HUMMEL, 1998.).

A palavra metal, deriva de *métallon* (que significa mina, em grego) e assume, nos dias de hoje, vários significados conforme o contexto em que é utilizada. No âmbito da Química, a palavra *ferro*, por exemplo, pode referir-se ao material sólido com esse nome utilizado em múltiplas aplicações – pontes e linhas férreas, máquinas agrícolas, instrumentos industriais, mobiliários, utensílios domésticos, etc. – ou aos íons ferro, que por exemplo, intervêm na constituição da hemoglobina, ou fazem parte da ferrugem (GIL et al., 2005).

No continente europeu a utilização de ligas metálicas remonta ao terceiro milênio antes de Cristo, quando o homem calcolítico descobriu, por experiência ou coincidência, que a combinação de certos elementos metálicos – formando ligas – melhorava as propriedades do material, ampliando consideravelmente as possibilidades de aplicação do mesmo. Enfim, o avanço tecnológico responsável pela elaboração da ampla gama de ligas metálicas atuais teve sua origem há pelo menos quase cinco mil anos, quando a maior parte dos efeitos produzidos pela introdução de elementos de liga – aumento da resistência, diminuição do ponto de fusão, endurecimento por trabalho a frio, amolecimento por aquecimento, reatividade química diferencia – já era conhecida, como o atestam objetos encontrados (SMITH, 1981).

Os metais são geralmente empregados na forma de ligas, ou seja, substâncias que consistem em misturas íntimas de dois ou mais elementos químicos, dos quais pelo menos um é metal, e possuindo propriedade metálica (CHIAVERINI, 1986).

As ligas constituem, pois, uma combinação de duas ou mais variedades de átomos, resultando numa substância que apresenta alterações às vezes muito profundas, tanto nas propriedades físicas como químicas, em relação aos elementos correspondentes (CHIAVERINI, 1986).

O número de possíveis combinações de apenas dois elementos, dos quais um deve ser sempre metal, é muito grande. Por outro lado, para cada composição específica de uma liga, procura-se determinar as modificações estruturais que podem ocorrer às diversas temperaturas, a partir da sua temperatura de fusão (CHIAVERINI, 1986).

As ligas são verdadeiras soluções sólidas, obtidas a partir da mistura dos componentes fundidos, seguida de resfriamento. Com efeito, é fácil imaginar a substituição de alguns cernes na estrutura do metal principal, normalmente um metal de transição, por átomos de outros elementos, mantendo-se, na essência, o “mar” de elétrons (CHIAVERINI, 1986).

As alterações estruturais ocasionadas pela formação de ligas conduzem a importantes modificações das propriedades originais do material, que encontram uma gama variada de aplicações e vantagens. Desde o processo de elaboração a introdução de elementos de liga traz vantagens econômicas importantes, pois em geral o metal nobre é parcialmente substituído por outro de menor valor, fato que reduz o custo energético, diminui o ponto de fusão do material e a formação de poros. Talvez uma das principais razões para o desenvolvimento de tão grande diversidade de ligas metálicas tenha sido a busca de propriedades mecânicas especiais (CHIAVERINI, 1986).

A busca de materiais mais resistentes à corrosão também contribuiu para o desenvolvimento de tipos especiais de liga, como os aços inoxidáveis. Neste caso, elementos formadores de filmes passivos – níquel e cromo – são adicionados a um material com boas características mecânicas e custo relativamente baixo, como é o caso dos aços ao carbono (CHIAVERINI, 1986).

2.2 - O Níquel e suas utilizações

O nome níquel (Ni) é um metal duro e prateado, deriva de “*kupfernickel*”, referência dada a nicolita pelos mineradores alemães, quando a identificaram no século XVII. Antes da era cristã, o metal já era utilizado. Moedas japonesas de 800 anos a.C. e gregas de 300 anos a.C. continham níquel. Acredita-se que seja uma liga natural com o cobre. Nos anos 300 ou 400 a.C. fabricavam-se armas que possuíam ferro meteorítico, com conteúdo de níquel variando de 5 a 15% (SILVA, 2001). O níquel foi descoberto em 1751 por Axel Frederich Cronstedt. Em 1804, Richter descreveu as propriedades desse metal (ALI et al., 1987; RANA, 2006). Este metal teve pouca importância real na economia industrial até 1820, quando Michael Faraday, com a colaboração de seu associado Stodard, foram bem sucedidos fazendo uma liga sintética de ferro-níquel, sendo o início da liga níquel-aço que tem uma grande contribuição para o desenvolvimento industrial do mundo (SILVA, 2001). O níquel é um metal duro e ferromagnético, com densidade de $8,9 \text{ g/cm}^3$ (ALI et al., 1987; WHO, 2005). É um elemento de transição e pertence ao grupo 10 da tabela periódica. Ocorre naturalmente em cinco formas isotópicas: 58 (67,8%), 60 (26,2%), 61 (1,2%), 62 (3,7%) e 64 (1,2%) (WHO, 2005). O níquel forma uma grande quantidade de compostos e complexos, nos quais apresenta os estados de oxidação -1, 0, +1, +2, +3, +4. Embora possa existir em vários estados de oxidação, o mais importante sob condições ambientais é aquele que apresenta o estado de valência 2 (HABER et al., 2000).

A procura global por níquel tem sido aumentada ao longo do tempo, principalmente devido a intensa produção de aço inoxidável. Níquel é usado em cerca de 250.000 aplicações industriais nas formas de carbonato de níquel, níquel carbonil, cloreto de níquel, nitrato de níquel, óxido de níquel, sulfato de níquel e sulfeto de níquel. Algumas aplicações incluem o uso em processamento de ferro, niquelagem, baterias de níquel-cádmio, certas soldagens e máquinas copiadoras. O ferro-níquel é utilizado em equipamentos elétricos, o cobre-níquel é utilizado como um anticorrosivo para navios e equipamentos marítimos, enquanto que o titanato de níquel é usado como pigmento de tintas (PASCALICCHIO, 2002)

O níquel é o 24º elemento mais abundante da crosta terrestre, compreendendo cerca de 3% da composição da terra. É o quinto elemento mais

abundante em peso depois do ferro, oxigênio, magnésio e silício (CEMPEL; NIKEL, 2006). Ele é encontrando principalmente combinado com oxigênio, enxofre e com vários minerais que ocorrem naturalmente na crosta terrestre (ATSDR, 2005; DAS et al., 2008).

As reservas mundiais de níquel apresentaram um crescimento de 3,5% em relação a 2009. A China foi o país que mais contribuiu neste aumento, com uma expansão de 172,7% de suas reservas de níquel em relação ao ano de 2009, seguido pelo Brasil com 34,73%. Dessa forma, classificou o país na 2ª posição no ranking mundial. A produção mundial cresceu 20,0%, a Rússia apresentou a maior participação na produção total (16,6%), seguida da Indonésia (14,6%), Filipinas (9,8%) e Canadá (9,7%) (DMPM, 2011).

Discriminação	Reservas (10³t)	Produção (10³t)			
Países	2010	2008	2009	2010	%
Brasil	7.532.310	67.116	41.059	108.983	6,8
Rússia	6.000.000	277.000	262.000	265.000	16,6
indonésia	3.900.000	193.000	203.000	232.000	14,6
Filipinas	1.100.000	83.900	137.000	156.000	9,8
Canadá	3.800.000	260.000	137.000	155.000	9,7
Austrália	24.000.000	200.000	165.000	139.000	8,7
Nova Caledônia	7.100.000	103.000	92.000	138.000	8,7
China	3.000.000	68.400	79.000	77.000	4,8
Cuba	5.500.000	67.000	67.000	74.000	4,6
Colômbia	1.600.000	76.400	72.000	70.200	4,4
África do Sul	3.700.000	31.700	34.600	41.800	2,6
Botswana	490.000	38.000	28.600	32.400	2,0
Venezuela	490.000	13.000	13.200	14.300	0,9
Madagascar	1.300.000	-	-	7.500	0,5
República Dominicana	960.000	31.300	-	3.100	0,2
Outros países	4.500.000	46.000	51.700	77.800	4,9
Total	74.972.310	1.555.816	1.384.659	1.592.083	100

Legenda: t = toneladas.

Tabela 1 – Reserva e produção mundial do níquel (fonte: DIPLAM / DNPM e USGS: Mineral Commodity Summaries – 2011).

O níquel é um elemento pertencente a família do ferro (ferro, cobalto e níquel), com número atômico é 28, e seu peso atômico é 58,71. Devido às suas propriedades física e química, o níquel metálico e seus compostos são amplamente utilizados na indústria (ALBRACHT, et al., 1984).

Os compostos de níquel são importantes na indústria moderna e são usados como galvanoplastia, eletroformados, pela produção de baterias de níquel-cádmio e de equipamentos eletrônicos. As ligas de níquel, como aço inoxidável, são usadas na produção de ferramentas, maquinários, armamentos e outras aplicações. Eles também são usados na produção de moedas, joias e próteses médicas. As fontes de contaminação ambiental por níquel incluem a produção e o processamento do níquel e de seus produtos, a reciclagem de produtos contendo níquel e o desperdício durante o seu descarte. Os compostos de níquel são encontrados também no solo e estão presentes na forma insolúvel e solúvel (GARRETT, 2000).

O níquel também está presente na atmosfera, mas as espécies de níquel encontradas dependem da fonte de contaminação. Das fontes antropogênicas, o níquel é emitido como óxidos, sulfetos, silicatos, compostos solúveis, e em menor extensão, como níquel metálico. A queima de combustíveis fósseis produzem a maior contribuição de compostos de níquel no ar ambiente (MERIAN, 1984). Embora a concentração atmosférica de níquel nas áreas industrializadas tem sido estimada em uma variação de 120 -170 ng/m³, e 6 -17 ng/m³ nas áreas suburbanas (NORSETH; PISCATOR, 1979).

Devido a abundância do níquel na crosta terrestre, estima-se que seja difícil encontrar uma dieta alimentar que não contenha o elemento níquel presente (FOSTER; HUTT, 1960; BENNETT, 1984; NIELSON, 1991; SUNDERMAN; OSKARSSON, 1991). Muitos autores tem estimado que o consumo de níquel ingeridos diariamente através das dietas (FOSTER; HUTT, 1960; ANKE et al. 1995; BARCELOUX, 1999). Sabe-se que o níquel é essencial para produção de diversas enzimas e cofatores nos organismos superiores. Todos estes fatores tem contribuído para concluir se o níquel é ou não essencial aos seres humanos. Apesar dessa incerteza, no início de 1920 foi sugerido que o níquel pode ter funções fisiológicas nos organismos superiores, e essa observações se deu através de resultados obtidos através de experimentos animais com dietas deficientes de níquel. Foi

constato um aumento importante nos resultados de mortalidade perinatal, bem como, decréscimo nos índices de desenvolvimento (NIELSON et al., 1975; SCHNEGG; KIRCHGESSNER, 1975; KIRCHGESSNER et al., 1982). Outro estudo mostrou que a deficiência de níquel resultou em anemia, como consequência da diminuição da hemoglobina e dos valores de hematócrito (NIELSON et al., 1984; LEACH et al., 1985; SPEARS et al., 1986). Após essas pesquisas, surgiram outras que mostraram que a deficiência de níquel reduz a atividade de muitas enzimas envolvidas no metabolismo de carboidratos e dos aminoácidos (NIELSEN, 1991; STANGL, 1996).

Enzimas dependentes de níquel também são conhecidas no mundo bacteriano (ANKEL-FUCHS; THAUER, 1988; STANGL, 1996; HAUSINGER, 1997; RAGSDALE, 1998; MARONEY, 1999;). Acreditava-se que somente sete enzimas eram dependentes, incluindo hidrogenase, CO-dehidrogenase, metilcoenzima M-redutase, Ni-superóxido dismutase, glicoxilase I e a *cis-trans* isomerase. Watt e Ludden (1999) estudaram as bactérias com enzimas dependentes de níquel, o biometabolismo no níquel, sistemas de transporte e proteínas ligantes de níquel. Algumas enzimas bacterianas dependentes de níquel também estão sendo estudadas por suas relações às doenças humanas.

O níquel é comumente encontrado na água como poluente de resíduos industriais. Este metal é tipicamente encontrado no estado de Ni(0) ou Ni(II) devido a estabilidade dessas espécies na água (NIEMINEN et al., 2007).

Até a década de 60, o níquel era conhecido somente pelos seus efeitos tóxicos. Foi então que em 1965, Barth e Ordal, durante seus estudos com bactérias, notaram que esse íon era um nutriente essencial para muitos microrganismos, responsável por muitas reações metabólicas (BARTHA; ORDAL, 1965).

O níquel é utilizado por uma variedade de bactérias para funções de sobrevivência. Até hoje, o níquel foi identificado como elemento essencial para nove enzimas microbianas (MARONEY, 1999; MULROONEY; HAUSINGER, 2003). Embora as bactérias necessitem do níquel para realizar diversos processos enzimáticos, a alta concentração de íons níquel torna-se tóxico para esses microrganismos. Como resultado, as bactérias tiveram que se adaptar a presença desse íon em altas concentrações e desenvolveram mecanismos sofisticados para

regular os níveis intracelulares de níquel (MULROONEY; HAUSINGER, 2003; EITINGER; MANDRAND-BERTHOLET, 2000).

O níquel é um dos metais com mais propriedades antimicrobianas, quando em altas concentrações. Seu íon pode penetrar na célula microbiana e matá-la principalmente pela inativação de suas enzimas (CHOHAN, 2000). Muitos pesquisadores mostraram diferentes complexos de níquel manifestando ação antimicrobiana (RAO; REDDY, 1990; THIRUMALAIKUMAR et al., 1999; CHOHAN et al., 2002; SINGH et al., 2003; PATEL et al., 2004). Nos últimos anos, diversas pesquisas estão sendo desenvolvidas para uma melhor compreensão para a ação antimicrobiana íons metálicos, sua toxicidade e sua termoestabilidade tem sido estabelecida nesses últimos anos (KAMALAKANNAN; VENKAPPAYYA, 2002).

Tem sido provado cientificamente a atividade antimicrobiana de alguns compostos de níquel (NAIK et al., 2002; SHIVANKAR; TAKKAR, 2003). Blasco et al., (1996) estabeleceram um complexo de níquel que comprovou in vitro sua atividade inibitória contra importantes patógenos como a *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus*.

2.3 - Níquel e sua citotoxicidade

Devido as suas propriedades físicas e químicas, o níquel metálico e seus componentes são amplamente usados na indústria moderna. O elevado consumo de produtos contendo níquel, inevitavelmente, levou a poluição ambiental por níquel e por seus produtos em todos os estágios de produção, reciclagem e descarte (IARC, 1990).

A citotoxicidade do níquel nos humanos recebeu intensa atenção devido as ligações entre o níquel e o câncer (DENKHAUS; SALNIKOW, 2002; KAZPRZAK, SUNDERMAN; SALNIKOW, 2003; SALNIKOW, 2007; DAS; DAS; DHUNDASI, 2008). Este metal não é prejudicial apenas ao homem, sabe-se que ele causa danos a diversos microrganismos (DENKHAUS; SALNIKOW, 2002; KASPRZAK et al., 2003; DAS et al., 2008; YUSUF et al., 2011) e há relatos de sua citotoxicidade também é relatada nas plantas (YUSUF et al., 2011).

A exposição humana ao níquel ocorre primariamente via inalação e ingestão deste elemento. Concentração significantes de níquel, em diferentes formas, podem

ser depositadas no corpo humana através da exposição ocupacional e da dieta de uma vida toda. Uma vez que o níquel não tem sido reconhecido como um elemento essencial para os seres, não é claro o modo com que os compostos de níquel são metabolizados. Sabe-se, todavia, que a exposição aos compostos de níquel podem ter efeitos adversos na saúde humana. Alergia ao níquel na forma de contato com a pele é a mais comum e bem conhecida reação. Embora o acúmulo do níquel no corpo humano através da exposição crônica pode levar a uma fibrose pulmonar, doenças cardiovasculares e renais, e a maior preocupação relatada é a atividade carcinogênica do níquel. Estudos epidemiológicos tem claramente envolvido os compostos de níquel como bases carcinogênicas em uma maior incidência dos pulmões e câncer nasal com trabalhadores de refinarias e mineradores. Em vários modelos animais, os compostos de níquel induzem tumores próximo ao sítio que foi administrado. Além disso, os compostos de níquel insolúveis como o subsulfeto de níquel são excelentes indutores a alterações celulares em roedores e em humanos. Baseadas nestas observações a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC) avaliou a carcinogenicidade do níquel em 1990 (IARC, 1990)

A intoxicação por níquel nos microrganismos acreditava-se ser um problema limitado as células expostas a poluição industrial ou da ocorrência natural de solos contaminados com níquel (BABICH; STOTZKY, 1983). Essa teoria foi anulada, contudo, quando um sistema de defesa do níquel foi caracterizado em uma *Escherichia coli* (RODRIGUE et al., 2005). Após esse estudo, diversos genes de defesa ao níquel foram detectados nas bactérias (RODRIGUE et al., 2005). Estas descobertas sugerem que o excesso do níquel é uma preocupação fisiológica dos microrganismos. Por exemplo, as bactérias comensais no intestino humano são expostas a 150-900µg de níquel por dia, como constituinte da dieta (BARCELOUX, 1999).

O níquel pode ser útil e essencial para as bactérias, entretanto, ele também pode apresentar toxicidade e ser letal (MACOMBER; HAUSINGER, 2011). Sempre que esses microrganismos entram em contato com uma quantidade de níquel superior a que eles necessitam, eles podem morrer ou desenvolver formas de se proteger dessa sobrecarga de níquel (HAUSINGER, 1987).

Alguns microrganismos possuem enzimas e proteínas capazes de que coordenam a absorção ou a expulsão (efluxo) de metais pesados, como no caso o níquel. Dessa forma, mantém-se a homeostase do níquel. Além dessas alternativas, os microrganismos contêm um sistema de proteínas (proteínas metalo-regulatórias de níquel) responsáveis pela percepção e resposta ao níquel (KALUARACHCHI et al., 2010).

No ambiente, os microrganismos estão sujeitos a diversas alterações, dentre elas, as mudanças nas concentrações de metais. Para agravar ainda mais este problema, muitos microrganismos possuem tendências de concentrar/absorver metais (OUTTEN; O'HALLORAN, 2001; FINNEY; O'HALLORAN, 2003). Por estas razões os microrganismos tem desenvolvido formas para se proteger da alta concentração de metais. Uma resposta microbiana comum a elevada concentração de metais tóxicos é a síntese de um sistema específico de efluxo, assim reduzindo a concentração internado destas espécies de metais (NIES, 2003). As bombas de efluxo são as melhores características dos organismos que exibem elevada resistência aos metais, tipicamente isolados em solos ricos em níquel, poluídos ou que apresentam uma quantidade natural deste metal.

Bactérias que possuem esses genes contêm proteínas na membrana externa que expulsa substâncias em excesso ou tóxicas ao meio. Estas proteínas são conhecidas por bombear metais para fora da membrana externa, e portanto, não são encontradas em microrganismos ausentes desta membrana (HANEY et al., 2005). A proteína codificada, conhecida como *nreB*, é conhecida como responsável por bombear o níquel para fora do citoplasma bacteriano (GRASS et al, 2001). A expressão da *nreB* na *E. coli* aumenta a resistência intracelular ao níquel. Já foram encontradas proteínas homólogas a *nreB* em outras bactérias (NIES, 2003; PARK et al., 2004).

A bomba de efluxo RcnA foi identificada pela primeira vez na *E. coli* e mostrou ser responsável pelo bombeamento de níquel e cobalto para fora do citoplasma (RODRIGUES et al., 2005).

Embora o efluxo de níquel seja amplamente usada pelas células para se protegerem contra elevadas concentração deste metal, vários outros mecanismos são utilizados por outros microrganismos. A *E. coli* exibe uma resposta quimiostática

a concentração de níquel no meio, com o níquel agindo como um repelente quimostático (TSO; ADLER, 1974; BORROK ET AL., 2005; ENGLERT et al., 2010). A *Pseudomonas putida* acumula níquel em seu periplasma, possivelmente em um complexo proteico, como um mecanismo de resistência a este metal (TRIPATHI; SRIVASTAVA, 2006). Em contraste, a cepa *Pseudomonas aeruginosa* acumula o níquel intracelularmente (SAR; KAZY; SINGH, 2001). Formas de defesa ao níquel são sistemas comumente encontrado em diversos microrganismos. Este sistema sugere que o excesso de níquel é uma preocupação para a homeostase fisiológica desses microrganismos (MACOMBER; HAUSINGER, 2011).

2.4 - O Berílio e suas funções

Berílio, assim denominado por ter sido obtido a partir de um mineral conhecido como *berilo*. O berílio foi descoberto por Vauquelin em 1798, ao analisar amostras de dois minerais, berilo e esmeralda. Ao novo elemento encontrado, Vauquelin deu o nome de glucínio, uma vez que seus sais conhecidos na época tinham um sabor mais doce. Mais tarde, tomou-se berílio como o nome aceito. O abade Haüy chamara a atenção para o fato de o berilo e a esmeralda serem muito semelhantes quanto à estrutura cristalina, dureza e densidade e que portanto era provável que fossem idênticos quimicamente. Vauquelin demonstrou que de fato os dois minerais eram idênticos. Hoje, sabe-se que tanto o berilo como a esmeralda são silicatos duplos de berílio e alumínio, $\text{Be}_3\text{Al}_2(\text{SiO}_3)_6$, a diferença básica entre o berilo e a esmeralda é que esta contém cerca de 2% de Cr, conferindo-lhe uma cor verde (DIAS, 1973; PEIXOTO, 1996).

Apesar do trabalho pioneiro de Vauquelin, o berílio só foi produzido 30 anos mais tarde sobre a forma metálica, em 1828, por dois pesquisadores, Wöhler e Bussy (DIAS, 1973; PEIXOTO, 1996).

Suas propriedades químicas demonstram um peso atômico de 9,012, uma valência de 2, um número atômico de 4 e é um metal alcalino terroso. Na Terra existe um único isótopo natural do Be, no entanto são conhecidos seis isótopos. A proporção de berílio na crosta terrestre é de 2 g a cada 1 tonelada. Este elemento é cerca de 3,5 vezes mais denso que o lítio, seu ponto de fusão é cerca de 1287,2°C, considerado um dos únicos metais leves com ponto de fusão significativamente alto.

O principal uso do berílio é na fabricação de ligas metálicas (cobre-berílio, bronze-berílio, dentre outros (PEIXOTO, 1996).

O elemento berílio (Be) está presente em diversos minerais, porém, o berílio ($\text{Be}_3\text{Al}_2\text{Si}_6\text{O}_{18}$) é comercialmente, o mais importante. As reservas oficiais desse minério em nosso país são pouco representativas, com teores entre 10 a 12% de BeO. Encontra-se em rochas pegmatíticas distribuídas, nos estados de Minas Gerais, Bahia e Ceará (DNPM, 2011).

De acordo com o Serviço Geológico dos Estados Unidos - *United Geological Survey (USGS)*, estima-se que a reserva mundial de berílio de 2010 seja superior a 80.000 toneladas, encontradas, principalmente em depósitos pegmatíticos. Os Estados Unidos, principais consumidores e fornecedores de concentrado e de produtos manufaturados de berílio, são detentores de 65% da reserva mundial de berílio. Destaque deve ser dado ao depósito não pegmatítico de *Spor Mountain*, no Estado de Utah – EUA, onde as reservas medidas estão em torno de 16.000 toneladas de berílio contido, provenientes do minério bertrandita ($\text{Be}_4\text{Si}_2\text{O}_7$) (DNPM, 2011).

As desejáveis propriedades físico-químicas de baixa densidade, resistência a corrosão, elevado ponto de fusão, resistência a tensão, justifica o uso do berílio na produção de uma ampla variação de produtos incluindo armas nucleares, próteses dentais e etc. O hidróxido de berílio é usado na produção de óxidos de berílio, o metal puro e as ligas de cobre. O óxido de berílio (BeO), ligas de cobre, alumínio, níquel e o metal puro são usados em inúmeras aplicações incluindo cerâmicas, nas indústrias produtoras de naves aeroespaciais, produtos eletrônicos, materiais esportivos e aeronaves (GORDON, T; BOWSER, D, 2003).

Discriminação	Reserva (tonelada)	Produção (t)		
Países	2010	2009	2010	(%)
Brasil	6.000	0	0	0
Estados Unidos	52.000	120	170	88,1
China	sem registro	20	20	10,4
Moçambique	sem registro.	2,0	2	1,0
Outros países	27.500	1	1	0,5
Total	85.500	142	193	100

Tabela 2 – Reserva e produção mundial do berílio (Fonte: DIPLAM / DNPM e USGS: Mineral Commodity Summaries – 2011).

No grupo do mineral berílio, a variedade de berílio industrial apresenta grande potencial de uso, por se constituir geralmente de rejeito da extração das gemas (esmeralda, água marinha e outras), em diversas jazidas no Brasil. No ano de 2011, o estado brasileiro que mais extraiu esse mineral foi Minas Gerais (DNPM, 2011).

2.5 - Berílio e sua citotoxicidade

O berílio (Be) é altamente tóxico, podendo ocorrer envenenamento agudo por inspiração de seus sais, produz calafrios, febre, tosse dolorosa e acúmulo de líquidos nos pulmões, podendo levar à morte. A inalação de compostos insolúveis pode levar à beriliose, quando os pulmões são lesado (formação de granulomas). Esta doença é também conhecido como granulomatose pulmonar crônica e seus sintomas aparecem, em média, 15 anos após a exposição a certos compostos de Be, como aqueles usados no revestimento interno de lâmpadas fluorescentes. A toxicidade dos compostos de Be deve-se provavelmente a sua capacidade de deslocar o Mg em enzimas que contém magnésio. Por essas razões, garimpeiros e lapidadores de água-marinha, berilo e esmeralda devem tomar precauções especiais (PEIXOTO, 1996).

A exposição humana ao berílio e a seus componentes tem sido associado com a doença crônica do berílio (ou beriliose). Desde o início de 1960 ao meados de 1980, acreditou-se que esta doença quase eliminada através do local de trabalho dos engenheiros e de suas práticas. Entretanto, o melhoramento da vigilância médica, da tecnologia diagnóstica, e uma alteração no critério e diagnóstico da beriliose, permitiram detectar a forma subclínica da doença de uma maneira mais rápida e precisa, na qual anteriormente esse tipo de diagnóstico não era possível. O melhoramento da técnica de identificação da beriliose mostrou que a doença era muito mais incidente nos trabalhadores do que era esperado (DEUBNER et al, 2001).

A população em geral está exposta ao berílio através do ar, da água e da alimentação. A estimativa total da exposição diária ao berílio através de diversas fontes (incluindo ar, água e comida) pode variar de 0,5 a 20µg de Be por dia (Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 1997).

Não tem sido relatado casos de beriliose na população em geral como um resultado da exposição natural provenientes de materiais contendo berílio (DUEBNER et al., 2001).

Poucas pesquisas estão focadas na exposição oral ao berílio, pois geralmente presume-se ser pobremente absorvido e limitado na toxicidade através desta rota de exposição (Agência de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 1997). A fração de uma dose ingerida que torna-se absorvida na circulação sistêmica depende na forma química do berílio, do tamanho da partícula e da dose exposta. A estrutura química interfere na solubilidade do berílio. Exemplo os sais de berílio [BeF_2 , BeCl_2 , $\text{Be}(\text{NO}_3)_2$, BeSO_4] são solúveis, portanto, são adequados para absorção. Entretanto, a geração de sais de berílio é primariamente restrita à extração de berílio do minério. Apenas poucas quantidades de sais de berílio são comercializadas. Em contraste, as formas de berílio mais comumente encontradas no comércio (exemplo do metal berílio, ligas de cobre-berílio com menos de 2% de Be, e algumas cerâmicas de berílio) são consideradas insolúveis e somente são capazes de sofrer uma dissolução limitada no estômago, mas a maior parte passa pelo trato gastrointestinal sem ser absorvido (REEVES, 1965). Com isso, tem sido geralmente assumido que a absorção oral do berílio apresenta um risco insignificante ao homem (DUEBNER et al., 2001).

Em 1943, o Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos estabeleceu um valor de absorção gastrointestinal pelo berílio de 0,006%. Pesquisas subsequentes não confirmaram este valor, mas deram indícios que a absorção ao berílio no trato gastrointestinal é baixa, provavelmente menos do que 1% (DUEBNER et al., 2001).

Após a exposição oral à compostos de berílio, a toxicidade sistêmica é limitada. A mais abrangente avaliação até hoje envolve a administração de sulfato de berílio na dieta de ratos por dois anos (MORGAREIDGE et al., 1975). Neste estudo, não houve efeitos observados no sistema cardiovascular, pulmões, trato gastrointestinal, sangue, sistema musculoesquelético, fígado, pele, olhos, baço, linfonodos, cérebro e sistema reprodutivo. Foi constatado um aumento no peso dos rins, mas não foi observado dano morfológico ao órgão. Esforços por outros pesquisadores revelaram a ausência da toxicidade sistêmica após a exposição ao

berílio (REEVES, 1965; SCHROEDER; MITCHENER, 1975; SCHROEDER; MITCHENER, 1975).

Em sua avaliação da literatura publicada sobre a toxicidade da exposição oral ao berílio, a Agência de Proteção Ambiental selecionou lesões no intestino delgado como a extremidade mais sensível a toxicidade através da exposição oral (EPA, 2000). Esta toxicidade provavelmente reflete na ação corrosiva direta dos sais de berílio nos tecidos intestinais após sua ingestão, e não foram relatados efeitos subsequentes à absorção na corrente sanguínea (DUEBNER et al., 2001).

A absorção cutânea dos diversos metais é baixa. Em 1980, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos forneceu orientações onde relatavam que o fator da absorção cutânea era de 0,01 µg para os componentes inorgânicos (EPA, 1998). Este fator de absorção é um valor de proteção e conservação à saúde, onde é utilizado para todos os compostos inorgânicos, independente das suas propriedades químicas. Especificamente ao berílio, a absorção através da pele intacta é considerado ser insignificante (fator de absorção muito menor que 0,01 µg) (Agencia de Substâncias Tóxicas e Registro de Doenças - *Agency for Toxic Substances and Disease Registry*, 1997). A baixa absorção e solubilidade cutânea pelos sais de berílio estão relacionadas primariamente a baixa solubilidade dos níveis de pH fisiológico, e o berílio iônico reage com os constituintes epidérmicos (FRIBERG et al., 1979).

Embora a absorção de berílio através do contato da pele íntegra seja insignificante, o berílio em contato com uma pele não íntegra pode permitir o contato com uma dose maior de berílio e este ser absorvido pelo corpo (IVANNIKOV et al., 1982). Neste estudo, Ivannikov e colaboradores aplicaram BeCl₂ diretamente na pele de animais vivos que apresentavam três tipos de feridas: abrasivas (trauma superficial), cortes (trauma de pele e superfície muscular) e penetrantes (trauma muscular profundo). Nas três situações testadas, os pesquisadores encontraram uma quantidade significativa de berílio, onde a inoculação de berílio nos tecidos mais profundos apresentaram uma elevada concentração sistêmica (IVANNIKOV et al., 1982; EPSTEIN, 1991).

Um considerável número de estudos epidemiológicos tem examinado o potencial do berílio em causar tumores no trato respiratório de trabalhadores

expostos ao berílio no transporte aéreo (WARD et al. 1992; GORDON, T.; BOWSER, D, 2003). Até o presente momento, não há relatos na literatura científica sobre a atividade do berílio aos microrganismos.

2.6 – Infecção Hospitalar: uma preocupação mundial

Infecções nosocomiais são aquelas adquiridas ou associadas com os hospitais. Elas também são conhecidas como infecções adquiridas em hospitais ou Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS). A definição mais usual da infecção nosocomial é aquela infecção que não estava presente ou incubada quando o paciente foi admitido no hospital ou no estabelecimento de saúde. Em caso de dúvida, usa-se um período de coorte (isolamento) de 48 horas após a admissão. Os termos de infecções adquiridas em hospitais ou associadas aos cuidados de saúde são frequentemente alterados, mas o termo “relacionados à assistência à saúde” também apresenta um significado muito amplo, englobando qualquer infecção adquirida e em qualquer ambiente (BREANTHNACH, 2013).

Apesar dos recentes avanços na ciência médica, as infecções nosocomiais ainda causam doenças consideráveis e o aumento da taxa da mortalidade. Estima-se que 5-10% dos pacientes nos hospitais britânicos e irlandeses apresentam uma infecção nosocomial, sendo a prevalência mais elevada nas feridas cirúrgicas e nas unidades de terapia intensiva, e a menor prevalência nas unidades médicas (SMYTH et al., 2008).

Além do dano relevante conhecido que os cuidados médicos trazem aos pacientes, a infecção nosocomial causa prejuízos financeiros para o hospital e para a sociedade. Em um estudo realizado na década de 90, o custo no Reino Unido, com o aumento da estadia e tratamento nos hospitais, foi estimado em 1 bilhão de libras esterlinas/ano (PLOWMAN et al., 2002). Este valor não inclui custos com processos judicial e indenizações, e nem inclui custos ao paciente, devido a sua infecção (BREANTHNACH, 2013). Nos Estados Unidos, é estimado que ocorram 1,7 milhões de infecções hospitalares por ano, na qual resulta em aproximadamente de 99 mil mortes (KLEVENS et al., 2007).

Nos países em desenvolvimento, a incidência de infecções hospitalares podem ser devastadores, resultando em um maior surtos de doenças nos hospitais e

em outras unidades de saúde. Isto pode ser atribuído a pobre/baixa infraestrutura, a superlotação e a gestão inadequada destes estabelecimentos (CHIKERE; OMONI; CHIKERE, 2008).

As infecções hospitalares são preocupações mundialmente importantes para o desenvolvimento nacional. No norte da Europa as taxas de infecção hospitalar atinge 1%, especialmente a Holanda, que introduziu medidas extremamente duras contra o controle de infecção. Contudo, também há relatos de taxas de infecções hospitalares acima de 40% em algumas partes da Ásia, América do Sul e a África Subsaariana (KLENNENS et al., 2007; NNIS, 2004; CDC, 2003; EDWARDS et al., 2007; CDC, 2005).

Cerca de 720.000 pessoas são infectadas em hospitais brasileiros por ano e, destas, 20% (144.000) evoluem para o óbito. Essas infecções podem ser atribuídas ao ambiente hospitalar e se manifestar durante a internação ou após a alta, acometendo mais de 15% dos pacientes internados, fato agravado com a resistência bacteriana (OLIVEIRA; BETTCHER, 2010; MARTINS et al., 2008; SOUZA et al., 2009).

Entre as nações mais industrializadas e desenvolvidas, a Organização Mundial da Saúde (OMS) encontrou uma taxa de 8,7% de pacientes com infecções nosocomiais, na somatória de todos os hospitais. Estudos sobre a prevalência anual das IRAS revelaram que entre 100 admissões de pacientes, a Grécia tinha 9,1% de pacientes com IRAS, 7% na Espanha, a Noruega possui uma taxa de 5,1%, enquanto que a Eslovênia registra uma taxa de 4,6% de IRAS (KLENNENS et al., 2007; KLAUS et al., 2003; DUNN; SEMMELWEIS, 2005). Em 2001, Machado et al. (2001) relatam que cerca de 5% a 15% dos pacientes internados em hospitais brasileiros contrariam IRAS. Em 2011, A OMS realizou pesquisa nos hospitais brasileiros e relatou uma taxa de 14 a 19% de infecções hospitalares, sendo que em algumas localidades menos desenvolvidas, esses índices possam chegar a 88,3% de IRAS (OMS, 2011).

O custo de um paciente com infecção hospitalar pode ser três vezes maior do que o de um paciente sem infecção. Os índices de infecção permanecem elevados no Brasil, a maior incidência ocorre em hospitais de ensino ou universitários em comparação a outros hospitais, devido à variedade de doenças, à realização de

procedimentos de alta complexidade, aos longos períodos de internação e ao contato de pacientes com diversos profissionais da saúde, incluindo estudantes. Ressalta-se, ainda, a insuficiente habilidade técnica de estudantes em realizar procedimentos invasivos (MENEZES et al., 2007; MOURA et al., 2007).

Os pacientes internados em instituições de saúde estão expostos à variedade de microrganismos patogênicos, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), cujo o risco de infecções é elevado, favorecendo o surgimento de IRAS, apresentando risco médio de 5 a 10 vezes maior do que outros setores hospitalares, que atingem cerca de 10 a 30% dos pacientes internados, contribuindo com taxa de mortalidade que varia de 10 a 80%, de acordo com o perfil do paciente internado (LIMA; ANDRADE; HASS, 2007; PAULA, 2008).

O próprio ambiente hospitalar é um reservatório em potencial de agentes infecciosos, uma vez que abriga pacientes com diversos microrganismos patogênicos, bem como indivíduos imunocomprometidos ou susceptíveis (RHOMBERG et al., 2006; ZHANEL et al., 2008).

Para a contaminação ambiental desempenhar um papel importante na aquisição de um patógeno nosocomial, o microrganismo deve demonstrar certas características microbiológicas, exemplos: a) o patógeno deve ser capaz de sobreviver por um prolongado período de tempo em superfícies ambientais; b) habilidade de permanecer virulento após exposição ambiental; c) contaminação frequente do ambiente hospitalar; d) habilidade de colonizar pacientes; e) habilidade de colonizar transitoriamente as mãos dos trabalhadores da saúde; f) ser transmitidos através das mãos contaminadas dos trabalhadores da saúde; g) pequena dose infectante; h) apresentar relativa resistência aos desinfetantes usados na higienização das superfícies inanimadas (WEBER et al., 2010).

Os patógenos nosocomiais que causam infecções podem ser transmitidos de fontes endógenas ou exógenas. As fontes endógenas são aqueles microrganismos provenientes da própria microbiota normal dos pacientes, enquanto que as exógenas são microrganismos presentes no próprio ambiente hospitalar. Um paciente pode se contaminar com sua própria microbiota durante o pós-cirúrgico, no qual na maioria dos casos o médico administra drogas que suprimem o sistema imunológico do paciente, permitindo assim a multiplicação do microrganismos e o

acesso ao mesmo a regiões mais internas do corpo humano (PELCZAR et al., 1993). Superfícies animadas e inanimadas são fontes exógenas de infecção, incluindo a equipe médica, outros pacientes, visitantes, comida/alimentos, água, fômites, cateteres urinários, dispositivos intravenosos, equipamento respiratório e próteses (PRESCOTT et al., 2005).

Os fatores de risco que fazem com que pacientes se tornem susceptíveis a estas infecção incluem: infecções concomitantes, dispositivos protéticos, cirurgias, agentes imunossupressores, administração de antibióticos de amplo espectro, e o surgimento de patógenos multirresistentes aos antibióticos (PELCZAR et al., 1993; COURVALAINE; WEBER, 2005). Outros fatores de risco incluem a idade do paciente, o tempo de internação, doenças crônicas como diabetes mellitus, tumores e a superlotação nos hospitais (PRESCOTT et al., 2005).

2.7 – Os principais patógenos no ambiente hospitalar

As infecções nosocomiais e a distribuição dos patógenos variam de acordo com o cenário clínico, as características do paciente (diagnóstico primário, multiplicas morbidades, realizado procedimento) e o cenário do cuidado com a saúde (se possui terapia intensiva, unidade para queimados, e quais são os cuidados destes estabelecimentos) e também por coorte (neonatal e adulta) (ROBIN; McFEE, 2009).

A principal fonte de patógenos nosocomiais acredita-se ser de microrganismos da própria microbiota do paciente, mas estima-se que de 20 a 40% das infecções nosocomiais atribuem-se as infecções cruzadas, sendo que as mãos dos profissionais da saúde são as principais vias de transmissão (WEINSTEIN, 1991). A contaminação das mãos dos profissionais da saúde podem resultar ou na contaminação direta ou indireta de pacientes, ou de superfícies inanimadas do hospital. A alternativa menos comum de se transmitir um patógeno é quando um paciente pode se tornar colonizado com um patógeno hospitalar através do contato direto com uma superfície ambiental contaminada (KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006).

As bactérias que comumente causam infecções nosocomiais são os *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Bacillus cereus*, *Acinetobacter spp.*,

Staphylococcus coagulase-negativa, enterococos, *Pseudomonas aeruginosa*, membros da família *Enterobacteriaceae*, como a *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella spp.*, *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae* (ESPOSITO; LEONE, 2007; ZHANEL et al., 2008).

Dentre os cocos gram-negativos, os *S. aureus* são microrganismos comumente encontrados na pele e na cavidade nasal da população (SANTOS, 2007; MOURA et al., 2010). Essa colonização determina o estado de portador ou portador assintomático, uma vez que a presença da bactéria no organismo do hospedeiro não ocasiona lesões aparentes (CAVALCANTI et al., 2006). Mesmo sendo considerado parte da microbiota normal do ser humano, em algumas condições o *S. aureus* pode tornar-se patogênico e causar uma ampla variedade de infecções sendo o responsável por diversas infecções nosocomiais e comunitárias. Tais episódios são desencadeados pela ruptura da barreira cutânea ou queda da imunidade (GELATTI et al., 2009). A relação entre colonização e infecção ainda não é compreendida em sua totalidade, mas sabe-se que está associada a fatores intrínsecos do hospedeiro e também à cepa de *S. aureus* que o mesmo está carreando (GORWITZ, 2008).

As infecções causadas por essa bactéria frequentemente acometem a pele, e tecido subcutâneo, sendo muito comum sua associação com dispositivos e aparelhos implantados, especialmente em pacientes cujo sistema imunológico encontra-se debilitado, bem como em crianças e idosos. (CAVALCANTI et al., 2006). Algumas dessas infecções têm caráter agudo e podem gerar focos metastáticos, disseminando para outros tecidos. Há ainda o risco de infecções “mais graves”, como: septicemia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais (GELATTI et al., 2009).

Cerca de um terço da população possui essa bactéria como parte da microbiota transitória da pele (RAZERA et al., 2009) constituindo uma importante fonte de infecção para o próprio indivíduo ou para outras pessoas (CAVALCANTI et al., 2006). Estima-se que cerca de 11% a 43% dos pacientes colonizados adquirem infecção (GELATTI et al., 2009). Já a transmissão de pessoa para pessoa pode ocorrer por contato direto, sendo muito comum no ambiente hospitalar, onde os trabalhadores da área da saúde podem contaminar suas mãos ao prestar assistência a pacientes portadores persistentes ou manusear objetos colonizados e

subsequentemente transmitir o microrganismo para outros pacientes (CAVALCANTI et al., 2006).

O *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (MRSA) é a principal causa de infecções nosocomiais na América Latina, e sua prevalência em infecções adquiridas na comunidade não para de crescer (RODRIGUEZ-NORIEGA; SEAS, 2010). Estima-se que, já na década de 90, 2,9% dos *S. aureus* isolados eram resistentes à metilina. Em 2000, a prevalência era de 19% e, três anos depois, em 2003 já era de 62,4% (RAZERA et al., 2009). Deve-se ressaltar também que as infecções causadas por MRSA apresentam elevado índice de letalidade, muito superior ao que ocorre em infecções estafilocócicas causadas por cepas não resistentes (KLEVENS et al., 2007).

O aumento nas taxas da incidência e a recém-observada mudança no padrão epidemiológico das cepas de MRSA, ao lado da dificuldade do tratamento das infecções causadas por essa bactéria têm colocado a mesma em posição de destaque dentre os microrganismos de importância médica e têm também feito dela um verdadeiro desafio à saúde pública (MORAN et al., 2005; PRESCOTT et al., 2005; MCCRAIG et al., 2006; SCHEIDER-LINDER et al., 2007; SALES; SILVA, 2012).

O *S. epidermidis* é a espécie mais frequentemente isolada de epitélio humano, e colonizadores predominantemente das axilas, cabeça e narinas (OTTO, 2009). Como parte da microbiota do epitélio humano, o *S. epidermidis* frequentemente tem uma relação benigna com o hospedeiro. Além disso, alguns estudos propõem que este microrganismo apresenta função probiótica, prevenindo assim colonizações de outros patógenos, tais como o *S. aureus* (LINA et al., 2003). Entretanto, as infecções por o *S. epidermidis* e os mecanismos pelo qual o *S. epidermidis* promove doenças tem se tornado amplamente estudado. Entre os estafilococos coagulase-negativa, o *S. epidermidis* causa o maior número das infecções (CARMODY; OTTO, 2004). Este microrganismo representa o mais frequente agente causador de infecções de dispositivos médicos implantáveis, tais como cateter venoso central ou periférico (ROGERS; FEY; RUPP, 2009), infecção de sítio cirúrgico, artroplastias, válvulas cardíacas, dentre outras. Ao menos, 22% das infecções na corrente sanguínea, aonde o paciente possui um biomaterial ou sofreu

uma cirurgia, o *S. epidermidis* é o responsável por tal enfermidade (O'GRAY et al., 2002; CDC, 2004; ROGERS; FEY; RUPP, 2009).

A *Klebsiella pneumoniae*, também conhecida como bacilo de Friedländer, é um bacilo gram-negativo, membro da família *Enterobacteriaceae*, encontrado em locais como água, solo, plantas e esgoto. Sua colonização em seres humanos provavelmente ocorre por contato com diversas fontes ambientais e pode ser encontrada colonizando a orofaringe e no trato gastrointestinal de pessoas saudáveis, já no organismo de pessoas imunocomprometidas esta bactéria encontra um ambiente propício para o seu crescimento, levando aos quadros de infecção. Dentre as espécies de *Klebsiella* conhecidas, além da *K. pneumoniae*, pode-se citar as seguintes: *K. oxytoca*, *K. ozaenae*, *K. rhinoscleromatis*, *K. ornithinolytica*, *K. planticola*, *K. terrigena*. São anaeróbios facultativos ou aeróbios, fermentam um grande número de carboidratos, possuem estrutura antigênica complexa e produzem uma variedade de toxinas e de outros fatores de virulência (FARMER; KELLY, 1991; PODSCHUM; ULLMANN, 1998; DESIMONI et al., 2004; MARTINEZ et al., 2004). Algumas doenças, como cirrose, desordens do trato biliar, diabetes mellitus e o alcoolismo, podem prejudicar as defesas do organismos e aumentar o risco de infecções pela *K. pneumoniae* (TSAI et al., 2010)

A *Escherichia coli*, inicialmente chamada de "*Bacterium coli commune*", foi isolada pela primeira vez nas fezes de uma criança em 1885, pelo cientista Theodor Escherich. Ela é uma bactéria gram-negativa, anaeróbia facultativa pertencente à família *Enterobacteriaceae* (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004). A grande maioria dessas amostras é pertencente à microbiota intestinal, tanto de seres humanos quanto de animais de sangue quente. No entanto, aproximadamente, 10% são patogênicas, podendo causar infecções intestinais e infecções extraintestinais, exemplo infecções nosocomiais, septicemia, infecções do trato urinário, dentre outras (JOHNSON; RUSSO, 2005; KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004).

A *Pseudomonas aeruginosa* é um patógeno nosocomial frequente que é o grande responsável por infecções em pacientes com fibrose cística, bronquiectasia, neutropenia, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), e/ou queimados, e pacientes com doenças metabólicas, hematológicas ou malignas (OBRITSCH et al., 2004; YETKIN et al., 2006; LIPSKY et al., 2010; LEWIS et al., 2012; COETZEE;

RODE; HKAHN, 2013). Esta bactéria é predominantemente responsável por pneumonias associadas à ventilação mecânica, infecção do sítio cirúrgico, infecção do trato urinário e sepse em pacientes da unidade de terapia intensiva. A maioria destas cepas são comumente resistentes a muitos antibióticos incluindo imipenem e meropenem, com isso, são geralmente patógenos problemáticos na terapia. (NDIP et al., 2005; LU et al., 2014). A *P. aeruginosa* é geralmente adquirida do ambiente, raramente ocorre disseminação de pessoa a pessoa (ANTHONY et al., 2002). A contaminação de equipamentos de cuidados respiratório, irrigação de soluções, cateteres, infusões, cosméticos, soluções antissépticas, soluções desinfetantes, e até mesmo no sabonete tem sido relatados como veículos de transmissão (PIER; RAMPHAL, 2005; BERROUANE et al., 2000; DOUBIS et al., 2001).

Cepas patogênicas de *E. coli* podem causar diferentes formas de infecções gastrointestinais. A *P. aeruginosa* é um comum patógeno hospitalar em infecções como pneumonia, do trato urinário, infecções do sítio cirúrgico e infecções em queimados. O *S. aureus* é comumente associado com infecções de pele e de tecidos moles, infecções cirúrgicas, infecções do trato respiratório baixo e infecções em neonatos (MCCRAING et al., 2006; PILOUT et al., 2005; PILOUT et al., 2007).

BARROS et al. (2012) realizaram um estudo para identificar a prevalência dos principais microrganismos patogênicos em uma Unidade de Terapia Intensiva de um hospital de Fortaleza (CE), Brasil. Seus resultados expressam que a *P. aeruginosa* foi o principal patógeno isolado, logo em seguida o *S. aureus*, *Acinetobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *E. coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Estes microrganismos supracitados foram responsáveis por infecções graves, tais como: infecção respiratório, sepse, infecção de sítio cirúrgico e infecção do trato urinário.

Praticamente qualquer patógeno encontrado no ambiente hospitalar pode ser causador de uma infecção nosocomial. Entretanto, os mais frequentes causadores destas enfermidades têm como alvo àqueles pacientes com o sistema imunológico comprometido, ou com fatores de risco, bem como exposição aos antibióticos, queimaduras, cirurgias ou traumas (SANDS; VINEYARD PLATT, 1996; MANIAN; MEYER, 1997; ZEREY et al., 2007; ARONSON; SANDERS; MORAN, 2006; CDC, 2004).

Sem dúvidas, se tivéssemos que listar os principais patógenos hospitalares mencionaríamos o *Staphylococcus aureus*, especialmente os resistentes a meticilina (HEALTH STATISTICS, 2007; GRIFFIN, 2007). A proporção de *S. aureus* isolados entre pacientes de unidades de terapia intensivas são que a resistência à meticilina, oxacilina ou nafcilina é de aproximadamente 60% (ROBIN; McFEE, 2009).

O *Staphylococcus aureus* é um importante agente etiológico associado às infecções adquiridas, tanto na comunidade quanto em hospitais, e que se tornou um paradigma das infecções bacterianas. É considerado um dos principais patógenos humanos, destacando-se por sua elevada frequência e patogenicidade que o capacita a produzir doenças, tanto em indivíduos imunocomprometidos quanto em hígidos e por sua fácil disseminação intra-hospitalar associada à resistência aos antimicrobianos. (TOKARS et al., 2004; AMERICAN HOSPITAL ASSOCIATION, 2004). A característica mais extraordinária do *S. aureus* é a sua elevada capacidade de adquirir resistência aos antibióticos. Nenhuma outra espécie bacteriana, com semelhante nível de virulência para o organismo humano, apresenta tamanho grau de flexibilidade para suportar e sobreviver à terapia antimicrobiana AMERICAN HOSPITAL ASSOCIATION, 2004; BURKE, 2004). Cerca de 70% dos isolados de *S. aureus* de infecções hospitalares, nos principais hospitais brasileiros, são resistentes à meticilina (CATÃO; FREITAS; SILVA; FEITOSA et., 2013).

O mecanismo de resistência dos MRSA está relacionado à alteração de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) codificada pelo gene *mecA*. A presença da PBP2a faz com que a meticilina e os compostos penicilina-penicilinase resistentes (PPR) tenham baixa afinidade pelo local de ligação na bactéria, a parede celular e, conseqüentemente, deixem de ser efetivos. O grupo PPR é composto pelas drogas: oxacilina; meticilina; nafcilina; cloxacilina; e dicloxacilina (GOTIJO FILHO, 2006).

No Brasil, vários estudos tem demonstrado prevalência de infecções hospitalares por *S. aureus* variando entre 17% a 26%, e aproximadamente 70% a 100% são causadas por amostras multirresistentes (OLIVEIRA; MARUYAMA, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE; 1998). De modo que, diante da disseminação de bactérias multirresistentes, é necessária a adoção de programas de vigilância que envolvem, entre outras medidas, a avaliação do perfil de sensibilidade dos isolados

empregando-se metodologias apropriadas e recomendadas por órgãos de referência (MARQUES et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE; 1998).

A *Klebsiella pneumoniae* tem demonstrado um aumento de 50% na taxa de resistência das cefalosporinas de terceira geração. Outro patógeno bastante isolado em infecções hospitalares é a *Pseudomonas aeruginosa*, ainda mais pela grande quantidade de antibióticos intrinsecamente resistentes desta espécie (ROBIN; McFEE, 2009).

A maioria das infecções hospitalares estão associadas com infecções do trato urinário, do sítio cirúrgico, pneumonia, sepses e outras, incluindo infecções gastrintestinais (KLENVENS et al., 2007). Cateteres uretrais são dispositivos que apresentam um risco bem conhecido. Infecções no cirúrgico contabilizam mais de 240.000 relatos na “Vigilância Nacional de Infecções Nosocomiais”, de 1992 a 2004, nos Estados Unidos da América. Existe também uma variação sazonal associados a esses patógenos hospitalares (ROBIN; McFEE, 2009).

Embora os microrganismos causadores de muitas infecções nosocomiais frequentemente são da microbiota normal do próprio corpo dos pacientes, o contato com o ambiente hospitalar, onde os patógenos podem sobreviver em superfícies ou instrumentos oferece um significativo risco ao homem. O paciente interage com a equipe médica, com os auxiliares e com os instrumentais médicos. Como os pacientes se locomovem muito dentro do hospital e os períodos de internação são cada vez mais curtos, muitos pacientes recebem alta (dispensa médica para retorna a sua residência) enquanto estão assintomáticos, antes da infecção se tornar aparente. Um grande desafio do controle da infecção encontra-se no fato de que muitas infecções nosocomiais em pacientes hospitalizados originalmente surgem no setor ambulatorial e só torna-se aparente (sintomática) após a alta do paciente (ROBIN; McFEE, 2009).

Chikere et al. (2008) realizaram um estudo a fim de isolar e identificar os principais patógenos da enfermaria de um hospital da Nigéria. De acordo com seus resultados, foram isolados 39,2% de *S. epidermidis*, 28,5% de *S. aureus*, 8,9% de *Streptococcus sp.*, 7,1% de *E. coli*, 5,3% de *K. pneumoniae*, 3,5% de *Proteus sp.* e 3,5% de *Enterobacter aerogenes*. Sendo que o setor da enfermaria que apresentou

maior concentração de microrganismos foi a ortopedia. Abaixo, encontra-se uma tabela sobre a distribuição dos isolados, por setor de enfermaria.

Bactéria isolada	Ortopedia	Pediatria	Cirurgia	Clínica
<i>S. epidermidis</i>	40,9%	22,7%	18,2%	18,2%
<i>S. aureus</i>	37,5%	37,5%	16,3%	18,7%
<i>Streptococcus sp.</i>	-	20%	60%	20%
<i>E. coli</i>	50%	25%	25%	-
<i>K. pneumoniae</i>	66,7%	-	-	33,3%
<i>Proteus sp.</i>	50%	-	50%	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	-	100%	-	-
<i>Bacillus cereus</i>	100%	-	-	-

Tabela 3 - Porcentagem dos isolados bacterianos encontrados na pesquisa de CHIKERE et al., 2008.

As infecções do trato urinário representam a principal causa de infecção nosocomial em nações industrializadas, enquanto que em países em desenvolvimento os procedimentos invasivos são a principal causa (CHRISTENSON et al., 2006; WENZEL, 2007; ROSENTHAL et al., 2009). As intervenções cirúrgicas são uma das maiores fontes de infecções nosocomiais, com uma taxa de 1,2% a 23,6%, sendo que os principais patógenos causadores destas enfermidades nos países em desenvolvimento são os *S. aureus* (20%), *E. coli* (18%) e outras enterobactérias (LANCET, 2009; ALLEGIANZI et al., 2011; MAWALLA et al., 2011).

2.8 - A busca de novos materiais para reduzir a contaminação de superfícies e as infecções hospitalares

A contaminação de equipamentos hospitalares, médicos e suprimentos de água e alimentos com patógenos hospitalares é causa bem conhecida de fontes de infecção nos estabelecimentos da saúde (VILLEGAS; HARTSTEIN, 2003; DANCER, 2009). Amplas orientações sobre prevenção e controle da contaminação são disponibilizadas pelos fabricantes, especialistas, e departamentos de saúde, e há

frequentemente exigências legais com regulamentações de saúde e segurança. Em contraste, o grau para qual a atual contaminação de superfícies do meio contribuem para o desenvolvimento das infecções associadas a serviços de saúde não é clara, e suas abordagens para o controle é incerta (OTTER et al., 2011).

A Tabela 4 abaixo, fornece uma visão global dos microrganismos mais comumente discutidos na literatura, concentrando-se na estratégia de intervenção por todo o ambiente hospitalar.

Tabela 4 - Patógenos, nichos ecológicos e significância clínica (ZIMRING et al., 2013).

PATÓGENOS	NICHO ECOLÓGICO NOS HOSPITAIS	SOBREVIVÊNCIA EM SUPERFÍCIES INANIMADAS	PRINCIPAL MODO DE TRANSMISSÃO	PAPEL DAS SUPERFÍCIES INANIMADAS COMO FONTE DE TRANSMISSÃO	EVIDÊNCIAS DE QUE A TRANSMISSÃO PODE SER ATENUADAS ATRAVÉS DAS SUPERFÍCIES INANIMADAS	SURTOS ASSOCIADOS COM AS SUPERFÍCIES INANIMADAS	SIGNIFICÂNCIAS CLÍNICAS DO PATÓGENO NOS HOSPITAIS
<i>Staphylococcus aureus</i> , incluindo a cepa resistente à meticilina (MRSA)	Superfícies da pele humana e mucosas; Superfícies inanimadas	De dias a meses	Contato	Modesta	Algumas evidências apresentam redução com o melhoramento da limpeza	Transmissão com equipamentos médicos reutilizáveis	Principal patógeno associado aos cuidados médicos; causa de moderadas a graves infecções, incluindo as infecções de sítio cirúrgico e associados a cateteres.
<i>Enterococcus spp.</i> , incluindo as cepas resistentes a vancomicina (VRE)	Cólon humano; Superfícies inanimadas	De dias a meses	Contato	Moderado	Algumas evidências apresentam redução com o melhoramento da limpeza	Transmissão com equipamentos médicos reutilizáveis	Pode causar uma variedade de infecções associadas aos cuidados médicos, particularmente em pacientes imuno-comprometidos

Continuação da Tabela 4 - Patógenos, nichos ecológicos e significância clínica (ZIMRING et al., 2013).

<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Água; cólon humano	De dias a meses	Contato	Documentado em surtos; papel desconhecido no cenário endêmico	Sim, em surtos.	Torneiras e pias.	Principal patógeno associado a infecções relacionadas a cuidados médicos; frequentemente associada com pneumonia associada a ventilação mecânica
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Trabalhadores da saúde; pacientes com a doença ativa	Dias a meses	Ar	Relevante	Sim, pode ser reduzido com a ventilação de pressão negativa e irradiação de luz ultravioleta	Transmissão de pacientes fonte em hospitais sem adequado controle ambiental	Doenças pulmonares e extrapulmonares.
<i>Acinetobacter sp.</i>	Água; superfícies; pode colonizar a pele e mucosas humanas	De dias a meses	Contato	Documentado em surtos; papel endêmico desconhecido	Sim, em surtos.	Cortina; toalhas; pias; torneiras e sistema de ventilação	Patógeno principalmente relacionado a doenças respiratórias; pacientes com ventilação mecânica.

Continuação da Tabela 4 - Patógenos, nichos ecológicos e significância clínica (ZIMRING et al., 2013).

Os pacientes internados disseminam patógenos no meio, mas existe um debate sobre a importância da contaminação da superfície resultando em um possível fonte de transmissão. Desde 1950, o modelo dos hospitais e as práticas higiênicas tem sido amplamente direcionada para o controle de patógenos nosocomiais através do ar, das mãos, equipamentos e das superfícies (WILLIAMS et al., 1966). Entretanto, nos anos 70 e no início dos anos 80 muitos estudos sugeriram que o ambiente hospitalar tinha uma contribuição insignificante para a transmissão de patógenos (WEBER et al., 1976; MAKI et al., 1982). Culturas rotineiras de vigilância do ambiente hospitalar foram injustificáveis, e a importância das culturas realizadas no hospital durante surtos infecciosos eram questionadas.

Consequentemente, após essas informações, as culturas de vigilância reduziram em 3/4 nos hospitais dos Estados Unidos. De fato, naquela época o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) orientou os hospitais a realizarem o processo de busca ativa no ambiente hospitalar somente durante o surto infeccioso (SEHULSTER; CHINN, 2003). O CDC fez uma reavaliação sobre essa informação e sobre o papel desempenhado por superfícies contaminadas na transmissão de patógenos nosocomiais (DANCER, 2009; WEBER et al., 2010).

A transferência do patógeno de um paciente infectado ocorre frequentemente através das mãos dos trabalhadores da saúde, mas objetos contaminados, superfícies e o ar podem ser diretamente ou indiretamente envolvidos na trajetória da transmissão. Um exemplo encontra-se na Figura 1, onde é representado as possíveis rotas de contaminação dos principais patógenos hospitalares (OTTER et al., 2011).

Figura 1 – Rotas de transmissão de patógenos hospitalares. (MRSA – *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina; VRE – Enterococos resistentes à vancomicina; BGN – bacilos gram-negativos) (OTTER et al., 2011).

Estima-se que 40-60% dos patógenos causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde em Unidades de Terapia Intensiva estejam relacionados a própria microbiota do paciente; 20-40% infecção cruzada via mãos de profissionais de/da saúde; 20-25% administração de antibióticos que resultam na alteração da microbiota do paciente; 20% outras causadas (incluindo contaminação do ambiente nosocomial) (WEBER; ANDERSON; RUTALA, 2013). Ao longo da última década, a evidência científica substancial tem acumulado dados que a contaminação da superfície ambiental (inanimada) das salas hospitalares desempenham um importante papel na transmissão de vários patógenos-chave associados aos cuidados da saúde, incluindo *Clostridium difficile*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), Enterococos resistentes à vancomicina (VRE), *Acinetobacter*

baumannii, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella sp.* (VANDENBERGH et al., 1999; BOYCE, 2007; WEBER et al., 2010; OTTER et al., 2011).

As evidências que sustentam o papel da contaminação das superfícies ambientais na transmissão de patógenos-chave associados aos cuidados médicos está resumido a seguir: I. A superfície ambiental nas salas de pacientes colonizados ou infectados é frequentemente contaminado com o patógeno; II. O patógeno é capaz de sobreviver na superfície das salas hospitalares e em equipamentos médicos por um longo período de tempo; III. O contato com as superfícies das salas hospitalares ou equipamento médico dos profissionais da saúde frequentemente conduzem a contaminação das mãos e/ou das luvas; IV. A frequência na qual as superfícies das salas hospitalares são contaminadas correlaciona-se com a frequência das contaminação das mãos e/ou luvas dos profissionais da saúde; V. O surto de cepas clones contaminando a superfícies das salas hospitalares de um paciente colonizado ou infectado demonstra ser devido a transmissão pessoa a pessoa ou compartilhamento de equipamentos médicos; VI. O paciente admitido em uma sala previamente ocupada por um paciente colonizado ou infectado com um patógeno (MRSA, VRE, *C. difficile*, *Acinetobacter sp*) tem uma maior probabilidade de desenvolver colonização ou infecção com aquele patógeno; VII. O melhoramento da limpeza no ambiente hospitalar conduz a uma diminuição da taxa de infecção nosocomial; VIII. Melhoramento de desinfecção final (exemplo a vaporização por peróxido de hidrogênio) conduz a uma diminuição na taxa de infecção em pacientes subsequentemente admitidos a uma sala onde um ocupante (paciente) anterior estava colonizado ou contaminado (WEBER et al., 2013).

Embora a transferência do patógeno, de um paciente colonizado ou infectado a um paciente suscetível, pode ocorrer através da via de transmissão/disseminação direta ou indireta, frequentemente ocorre via mãos dos profissionais da saúde, superfícies ou equipamentos médicos contaminados (e menos comum, através da água e ar). Estas vias de transmissão tem sido esquematizadas e estes modelos fornece a base para desenvolver intervenções para interromper a transmissão (RUTALA; WEBER, 2009; OTTER et al., 2011).

A proporção de superfícies hospitalares contaminadas com MRSA tem variado de acordo com as publicações entre 1 a 27% das superfícies nos quartos dos pacientes das enfermarias de hospitais, e poucos porcentos até a 64% nas unidades de queimados (BOYCE, 2007). Um artigo de revisão reportou que de 7–29% dos sítios ambientais de hospitais foram positivos nas áreas em que haviam pacientes portadores do enterococos resistente à vancomicina (WEBER; RULATA, 2007).

A sobrevivência dos patógenos nosocomiais nas superfícies ambientais tem sido revisada sistematicamente (HOTA, 2004; KRAMER; SCHWEBKE; KAMPG, 2006), como demonstrado na Tabela 5:

Tipo de bactéria	Duração da persistência	Referências
<i>Acinetobacter sp.</i>	3 dias a 5 meses	JAWAD et al., 1996; WENDT et al., 1997; NEELY, 2000; WEBSTER et al., 2000; MUSA et al., 1990; GETCHELL-WHITE et al., 1989.
<i>Bordetella pertussis</i>	de 3 a 5 dias	HAHN; ARVAND, 2001; MISTSCHERLICH; MARTH, 1984.
<i>Campylobacter jejuni</i>	Até 6 dias	BOUCHER et al., 1998.
<i>Clostridium difficile</i> (esporos)	5 meses	KIM et al., 1981; McFARLAND; STAMM, 1986.
<i>Chlamydia pneumoniae</i> ; <i>Chlamydia trachomatis</i>	Até 30 horas	NOVAK et al., 1995; FALSEY; WALSH, 1993.
<i>Chlamydia psittaci</i>	Até 15 dias	MISTSCHERLICH; MARTH, 1984.
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	De 7 dias até 6 meses	MISTSCHERLICH; MARTH, 1984; CROSBIE;

		WRIGHT, 1941;
<i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i>	De 1 até 8 dias	MISTSCHERLICH; MARTH, 1984; CROSBIE; WRIGHT, 1941;
<i>Escherichia coli</i>	1,5 horas até 16 meses	DICKGIESSER, 1978; GUNDERMANN, 1972; WILLIAMS et al., 2005; WILKS et al., 2005; NEELY, 2000; SCOOT; BLOOMFIELD, 1990; MISTSCHERLICH; MARTH, 1984; MAULE, 2000; ABRISHAMI et al., 1994; KAMPF et al., 1998.
<i>Enterococcus sp.</i> (incluindo VRE e VSE)	De 5 dias até 4 meses	NEELY; MALEY, 2000; BALE et al., 1993; NEELY, 2000; NOSKIN et al., 1995; WENDT et al., 1998.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Até 12 dias	MISTSCHERLICH; MARTH, 1984.
<i>Helicobacter pylori</i>	Até 99 minutos	BOEHMIER et al., 1996.
<i>Klebsiella spp.</i>	De 2 horas a 30 meses	DICKGLESSER, 1978. GUNDERMANN, 1972; NEELY, 2000; SCOOT; BLOOMFIELD, 1990; MISTSCHERLICH; MARTH, 1984.
<i>Listeria spp.</i>	De 1 dia a meses	HELKE; WONG, 1994; MISTSCHERLICH; MARTH, 1984; MIELKE; HAHN, 2001.

<i>Mycobacterium bovis</i>	Menos que 2 meses	HIRAI, 1991; MISTSCHERLICH; MARTH, 1984.
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1 dia a 4 meses	SMITH, 1942; MISTSCHERLICH; MARTH, 1984
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	1 a 3 dias	ELMOS, 1977; PERES et al., 1990; MISTSCHERLICH; MARTH, 1984
<i>Proteus vulgaris</i>	1 a 2 dias	MISTSCHERLICH; MARTH, 1984
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	6 horas a 16 meses	DICKGLESSER, 1978; GUNDERMANN, 1972; NEELY, 2000; SCOOT; BLOOMFIELD, 1990; KAMPF et al, 1998; GOULD, 1963; ,PANEGEA et al., 2005.
<i>Salmonella typhi</i>	6 horas a 4 semanas	MISTSCHERLICH; MARTH, 1984
<i>Salmonella typhimurium</i>	10 dias a 4,2 anos	HELKE; WONG, 1994; MISTSCHERLICH; MARTH, 1984; ROBERTSON, 1972.
<i>Salmonella spp</i>	1 dia	SCOOT; BLOOMFIELD, 1990.
<i>Serratia marcescens</i>	3 dias a 2 meses	DICKGLESSER, 1978 e MISTSCHERLICH; MARTH, 1984
<i>Shigella spp.</i>	2 dias a 5 meses	MISTSCHERLICH;

		MARTH, 1984, NASS, 1977; ISLAM et al., 2001.
<i>Staphylococcus aureus</i> , incluindo MRSA	7 dias a 7 meses	NEELY; MALEY, 2000; WAGENVOORT; PENDERS, 1997; GUNDERMANN, 1972; SCOOT; BLOOMFIELD, 1990; KAMPF et al, 1998; WAGENVOORT et al., 200.
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	1 a 20 dias	MISTSCHERLICH; MARTH, 1984
<i>Streptococcus pyogenes</i>	3 dias a 6 meses	MISTSCHERLICH; MARTH, 1984
<i>Vibrio cholerae</i>	1 a 7 dias	MISTSCHERLICH; MARTH, 1984; BARUA, 1970.

Tabela 5 - Persistência das bactérias clinicamente relevante em superfícies secas inanimadas (KRAMER; SCHWEBKE; KAMPF, 2006).

Bactérias, esporos e vírus são disseminados de pacientes colonizados ou infectados (e as vezes, pela própria equipe de saúde) no ambiente hospitalar. A ampla variação relatada na frequência da contaminação ambiental pode ser explicada por diversos fatores, incluindo a capacidade de se cultivar estes microrganismos, metodologia de amostragem, a facilidade de contaminação (ou a dificuldade de descontaminação) do ambiente hospitalar e se há um surto no hospital no momento da busca ativa (OTTER et al., 2011).

Os pacientes são a primeira fonte de contaminação no ambiente hospitalar, e as superfícies em volta destes pacientes são tocadas frequentemente pelos profissionais da saúde e outros pacientes. Estas superfícies são conhecidas como “superfícies altamente tocadas”, pois possuem uma maior frequência de

contaminação do que outros sítio (HAYDEN et al., 2008; HUSLAGE et al., 2010; BOYCE et al., 1997; DUCKRO et al., 2005). Por exemplo, um estudo recente definiu as superfícies altamente tocadas como os apoiadores da cama, superfície da cama, cadeira de rodas dentre outros equipamentos que são comumente tocados por diversas mãos (HUSLAGE et al., 2010). O desenvolvimento de uma compreensão de quais sítios comumente são mais contaminados com patógenos pode conduzir a prática de controle e de outras inovações (OTTER et al., 2011).

Áreas ao redor dos pacientes são frequentemente contaminadas com MRSA, VRE e alguns bacilos gram-negativos (ex. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, etc). Pacientes infectados disseminam mais patógenos do que aqueles que são somente colonizados, e àqueles pacientes que estão com quadro de diarreia são caracterizados com o que mais distribuem microrganismos no ambiente hospitalar (BOYCE et al., 1994; BOYCE et al., 1997; BOYCE et al., 2007).

A contaminação de quartos de pacientes não colonizados ou infectados pelos patógenos hospitalares tem sido relatada. Das amostras obtidas de sala de pacientes não colonizados ou contaminados, 43% apresentavam presença de MRSA na cama do paciente, 13% apresentaram VRE em todo o quarto. A contaminação dos quartos de pacientes não infectados ou colonizados é mais comum do que se imagina, além disso, favorece com que o microrganismo continue a ser disperso no ambiente hospitalar (BOYCE et al., 1997; HARDY et al., 2006; DREES et al., 2008). Em geral, pacientes colonizados ou infectados tem uma maior concentração de microrganismos patogênicos, que podem contaminar as superfícies ao redor, do que propriamente as superfícies sabidamente contaminadas (exemplo as superfícies altamente tocadas) (BONTEN et al., 1996; FRENCH et al., 2004; DUCKRO et al., 2005; SEXTON et al., 2006; BOYCE et al., 2007; ECKSTEIN et al., 2007; ROHR et al., 2009). A concentração de VRE é aproximadamente 10^3 unidades formadoras de colônia (UFC) em 50 cm^2 na pele do paciente, enquanto que a concentração de VRE e MRSA atingem 10^3 a 10^9 UFC/grama nas fezes (MAYER et al., 2003; BOYCE et al., 2007; AL-NASSIR et al., 2008).

A presença de um patógeno na superfície não necessariamente representa um risco de transmissão. Todavia, a dose infecciosa para a maioria dos patógenos

nosocomiais associadas a contaminações ambientais parece ser baixa. Por exemplo, menos de 15 células de *Staphylococcus aureus* são suficientes para causar uma infecção em uma lesão experimental (FOSTER; HUTT, 1960), menos de 1 UFC/cm² de *Clostridium difficile* foi suficiente para causar doença em camundongos (LAWLEY et al., 2010). Consideravelmente, apesar da baixa concentração de contaminação nas superfícies, se compararmos com a pele de um paciente contaminada por VRE e uma superfície contaminada pelo mesmo microrganismo, ambas superfícies apresentam o mesmo risco de adquirir o VRE através do toque das mãos (DUCKRO et al., 2005; HAYDEN et al., 2008).

Kramer et al. (2006) investigaram a capacidade de sobrevivência dos patógenos nosocomiais em diversas superfícies, e obtiveram como resultado que o VRE, MRSA, espécies de *Acinetobacter sp.* e bacilos gram-negativos podem sobreviver de 4-5 meses ou mais em superfícies secas.

Uma das alternativas de eliminação destes microrganismos é a limpeza e desinfecção dessas superfícies. A limpeza é caracterizada como a remoção de sujeiras (sujidades) e contaminantes de uma superfície, enquanto que a desinfecção é a inativação dos patógenos (SEHULSTER; CHINN, 2003). Os microrganismos variam nas suas resistências à desinfecção, com isso essas substâncias deve ser escolhidos cuidadosamente para que haja completa eficácia (MCDONNELL; RUSSELL, 1999). Além disso, o ambiente hospitalar é complexo e frequentemente difícil à limpeza e o uso de agentes de limpeza que não são efetivos contra o microrganismo alvo favorecem com que os patógenos sejam difundidos em outras superfícies (MCDONNELL; RUSSELL, 1999; BARKER et al., 2004).

Além disso, diversos desinfetantes líquidos geram danos aos equipamentos, especialmente os eletrônicos, e o materiais contendo cloro (ex. água sanitária) pode corroer os metais. Os desinfetantes podem prejudicar potencialmente os usuários, e a liberação (descarga) de resíduos biocidas e antibióticos no ambiente podem favorecer a resistência de ambos. Por estas razões, alguns autores tem questionado o uso rotineiro de desinfetante para descontaminação do ambiente hospitalar (DETTENKOFER; BLOCK, 2005).

A limpeza e a desinfecção não são as melhores formas de erradicar microrganismos de uma superfície. Exemplo disso, foram cultivados VRE de 71% das superfícies desinfetadas após um surto pelo mesmo microrganismos (ECKSTEIN et al., 2007). O MRSA foi cultivado em 66% das 124 superfícies limpas com soluções desinfetantes. Já no caso dos vírus (WU et al., 2005) e da bactéria *Acinetobacter baumannii* (CORBELLA et al., 1999), a desinfecção das superfícies se mostrou efetiva.

Os profissionais da saúde tem frequente contato com as superfícies ambientais das salas dos pacientes, fornecendo uma ampla oportunidade de disseminar estes patógenos através das luvas e/ou mãos (HUSLAGE et al., 2010). Consideravelmente, a contaminação das mãos com o MRSA tem sido demonstrada ocorrer com igual frequência se os trabalhadores da saúde tem contato direto com o paciente colonizado ou infectado ou através do simples toque da superfície contaminada (STIEFEL et al., 2011).

O mais importante fator de risco pela contaminação das mãos e/ou luvas dos profissionais da saúde com patógenos multirresistentes aos antimicrobianos tem sido demonstrado através das culturas positivas do ambiente nosocomial e da cultura das mãos desses profissionais (MORGAN et al., 2012).

3 - OBJETIVOS

3.1 – OBJETIVO GERAL

- O presente estudo teve como objetivo avaliar a citotoxicidade da liga Níquel-Berílio quando em contato com diversas cepas bacterianas e com a linhagem celular NCTC clone 929 (Cultura de Células do Tecido Conjuntivo de Camundongo).

3.1.1 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar qualitativamente a citotoxicidade da liga níquel-berílio, quando em contato com cepas padrão de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, em diferentes períodos de contato;
- Quantificar as Unidades Formadoras de Colônia (UFC) das bactérias viáveis após cada período de contato com a liga de níquel-berílio, para cada cepa bacteriana;
- Avaliar a citotoxicidade da liga de Níquel-Berílio em contato com a linhagem celular NCTC Clone 929 (Célula de Tecido Conjuntivo de Camundongo);

4 – MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – Materiais

4.1.1 – Corpos de prova da liga níquel-berílio.

Os corpos de prova de Ni-Be foram preparados por torneamento, a partir da liga no estado bruto de fusão. Após a fusão, foram obtidos tarugos de uma polegada de diâmetro e deles foram extraídos os corpos de prova. Estes apresentavam a forma de discos com 10,0 mm de diâmetro e 3,0 mm de espessura, e foram confeccionados no Laboratório de Transformação de Fase, do Professor Dr. João Manuel Domingos de Almeida Rollo, na Universidade de São Paulo, campus São Carlos.

Figura 2 – Demonstração dos corpos de prova da liga níquel-berílio.

4.1.2 – Microrganismos

Para realização deste experimento, foram utilizadas as seguintes cepas ATCC (*American Type Culture Collection*):

- *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 ⁽¹⁾;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25932 ⁽¹⁾;
- *Pseudomonas aeruginosa* - ATCC 27853 ⁽¹⁾;
- *Klebsiella pneumoniae* - cepa de campo⁽³⁾.
- *Escherichia coli* - ATCC 11775 ⁽²⁾.

- (1) cepas ATCCs cedidas pelo Laboratório Especial de Microbiologia Clínica – LEMC, da Faculdade Paulista de Medicina – UNIFESP, da cidade de São Paulo, com autorização do Professor Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari.
- (2) Cepa ATCC cedida pela Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, do estado do Rio de Janeiro.
- (3) Cepa isolada e identificada no Laboratório de Microbiologia Clínica do Laboratório de Análises Clínicas “Professor Antônio Longo”, do Centro de Referência Diagnóstica, do Núcleo de Atendimento a Comunidade – NAC, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP.

4.1.3 – Linhagem celular

Para realização deste experimento, foram utilizadas células provenientes da linhagem NCTC clone 929, do Núcleo de Cultura Celulares do Instituto Adolfo Lutz.

4.1.4 - Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados para o cultivo bacteriano foram: caldo Mueller Hinton (*Mueller Hinton broth*-MHb), ágar soja tríptica (*Tryptic Soy Agar*-TSA), caldo soja tríptica (*Tryptic Soy Broth*-TSB). Todos foram preparados de acordo com as instruções do fabricante.

4.1.4.1. - Ágar Mueller-Hinton

Infusão de carne bovina.....	300,0 g
Peptona ácida.....	17,5 g
Amido.....	1,5 g
Água destilada.....	1000,0mL

Hidratar de acordo com as especificações do fabricante em água ultra pura, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar como desejar.

4.1.4.2 – Agar de Soja Tríptica - *Tryptic Soy Agar* (TSA)

Peptona de Caseína.....	15,0 g
Peptona de soja.....	5,0 g

Cloreto de sódio.....	5,0 g
Ágar.....	15,0 g
Água destilada.....	1000,0mL

Hidratar de acordo com as especificações do fabricante em água ultra pura, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar como desejar.

4.1.4.3 – Caldo de Soja Triptica - *Tryptic Soy Broth* (TSB)

Peptona de Caseína.....	17,0 g
Peptona de soja.....	3,0 g
Glicose.....	2,5 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Fosfato de potássio.....	2,5 g
Água destilada.....	1000,0mL

Hidratar de acordo com as especificações do fabricante em água ultra pura, esterilizar em autoclave durante 15 minutos a 121°C e dispensar como desejar.

5 – MÉTODOS

5.1 – Confeção dos corpos de prova da liga níquel-berílio

A liga metálica de níquel-berílio utilizada como base para confecção dos corpos de prova é procedente da empresa *Brush Wellman Engineering Materials*, localizada no Estado de Ohio, Estados Unidos da América, sendo sua composição descrita na Tabela 6 abaixo:

Tabela 6 – Composição química da liga níquel-berílio testada no presente estudo.

Componentes	% em peso
Níquel	97,18
Berílio	2,30
Carbono	0,48
Cobalto	0,04

Também são componentes da liga níquel-berílio traços de carbono (C), cobre (Cu), ferro (Fe), silício (Si), estanho (Sn), alumínio (Al), zinco (Zn), cromo (Cr) e chumbo (Pb).

No total, duzentos e sessenta corpos de prova foram confeccionados, esterilizados em autoclave e armazenados assepticamente até o momento do uso.

5.2 – Preparo do inóculo bacteriano

As cepas *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* encontravam-se armazenadas em freezer à -21°C com *Tryptic Soy Broth* (TSB) suplementado de glicerol. Antes de realizar o procedimento de preparo do inóculo, os tubos foram retirados do freezer e deixados descongelar a temperatura ambiente.

Após o descongelamento, as cepas foram semeadas, individualmente, em ágar de Soja Tríptica e as placas foram incubadas em estufa bacteriológica 35±2°C por 24 horas, para reativar as células bacterianas. Com auxílio de agulha bacteriológica, cerca de quatro unidades formadoras de colônia foram transferidas para 5,0 ml de TSB.

O meio TSB contido em tubos foi homogeneizado em vortex por 15 segundos, a seguir a turvação monitorada por espectrofotômetro com comprimento de onda de 625nm. O branco foi padronizado com o caldo TSB esterilizado e ausente de bactéria.

Ao atingir a absorbância entre 0,08 - 0,12 nm (10⁹ Unidades Formadoras de Colônia/ml), a suspensão bacteriana encontrava-se adequada para ser utilizada nos próximos testes.

5.3 – Ensaio de sobrevivência microbiana sobre superfície metálica seca

O presente experimento foi realizado de acordo com a padronização de ESPIRITO SANTO et al. (2010).

Para determinação da sobrevivência de *S. aureus*, *S. epidermidis*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* sobre a superfície seca do corpos de prova de níquel-berílio estéreis (em autoclave), foram realizados cultivos de 24 horas dos microrganismos supracitados e padronizado, por espectrofotometria, a concentração

de 10^9 Unidades Formadoras de Colônia ml^{-1} . Uma amostra de 40 μl foi aplicada em um swab e espalhado sobre a superfície do corpos de prova, como demonstrado na Figura 3. A concentração aplicada sobre a superfície do corpos de prova foi, aproximadamente, de $2,83 \pm 0,17 \mu\text{l}$ (7% do total do volume), contendo $1,4 \times 10^9$ células (4,3% do número inicial de células aplicadas no cotonete). Esta discrepância ocorre provavelmente devido a ligação das células as fibras de algodão do cotonete. Entretanto, o número de células aplicadas aos corpos de prova possui alta capacidade de replicação.

Figura 3 – Momento da aplicação do swab contendo 10^9 UFC sobre a superfície do corpos de prova da liga de NiBe.

Para identificação da resistência bacteriana sobre a superfície metálica de níquel-berílio, aproximadamente 10^9 Unidades Formadoras de Colônia foram aplicadas, em cada corpos de prova. O experimento foi realizado em triplicata para cada microrganismos. Todas as amostras foram completamente secas dentro de 5 segundos após o contato com a superfície. Para evitar contaminação do ambiente laboratorial, os corpos de prova foram introduzidos em placas de Petri, à

temperatura de $23\pm 2^{\circ}\text{C}$, em diversos períodos de incubação (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 72 horas), como demonstrado na Figura 4.

Figura 4 – Após a inoculação das UFC, os corpos de prova eram colocados em placas de Petri estéreis e deixados a temperatura ambiente por 1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72 horas.

Após cada período de incubação, os corpos de prova eram retirados das placas de Petri e então carimbados diretamente, em dez locais diferentes, no meio

de cultura sólido (Agar Mueller-Hinton), como descrito nas Figuras 5, e as placas eram incubadas em estufa bacteriológica por 24 e 48 horas de incubação, a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$. Após os períodos de incubação, a liga NiBe era classificada como antibacteriana se 10 ou menos UFCs se desenvolvesse, e com 11 ou mais UFC, sem propriedades antibacterianas. A liga apresenta efeito antimicrobiano, caso após 24 e 48 horas de incubação.

Figura 5 – Após cada período de exposição a temperatura ambiente, retirava-se os corpos de prova da placa de Petri e aplicava-se o mesmo sobre a superfícies do Agar Mueller-Hinton, em dez locais diferentes. Realizado este procedimento, os meios de cultura eram incubados em estufa bacteriológica, a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 e 48 horas.

5.4 – Cultura celular

O presente ensaio fora realizado pelo Núcleo de Cultura Celulares – NCC, do Instituto Adolfo Lutz, da cidade de São Paulo – SP.

Para a realização do teste de citotoxicidade da liga NiBe, foi utilizada a linhagem celular NCTC clone 929 (ATCC-CCL 1), células de tecido conjuntivo de camundongos, do Seção de Culturas Celulares do Instituto Adolfo Lutz.

A linhagem celular NCTC clone 929 foi cultivada em meio mínimo de Eagle (MME), suplementado com 0,1 mM de aminoácidos não essenciais, 1,0 mM de piruvato de sódio e 10% de soro fetal bovino (SFB), sem antibiótico (MME com 10% de SFB) (CRUZ, 2003).

A manutenção destas linhagens foi feita a 36°C, em garrafas de 75cm² ou 250 ml e repiques com intervalos médios de 72 horas. A dispersão da monocamada celular foi efetuada utilizando uma associação de tripsina 0,20% e versene 0,02% (ATV). Após a dispersão, as células foram novamente suspensas nos seus respectivos meios de cultura e distribuídas em placas de Petri, que foram utilizadas durante a realização dos ensaios de citotoxicidade (PAUL, 1975; FRESHNEY, 1987; DOYLE, GRIFFITHS; NEWVELL, 1994).

5.4.1 Método de Difusão em Agar

As células foram semeadas em volumes de 5 mL em placas de Petri (60x15 mm), na concentração de $3,0 \times 10^5$ céls/ml para as linhagens NCTC - clone 929. A incubação foi realizada por 48 horas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após este período, com a monocamada de células já formadas, o meio de cultura foi desprezado e adicionado volume de 5ml de meio overlay, em cada placa de Petri. Este meio é composto de partes iguais de MME duas vezes concentrado e ágar (BBL-Becton Dickinson) a 1,8% contendo 0,01% de vermelho neutro (Merck), como corante vital. No momento do uso o ágar foi fundido e misturado com o MME, ambos à temperatura de $44 \pm 1^\circ\text{C}$. (GUESS et al., 1965; USP 22, 1990; ISO, 1992).

Como controles positivos foram utilizados fragmentos de látex e como controles negativos discos de papel de filtro, respeitando a dimensão de 0,5 cm de diâmetro para ambos. As amostras foram avaliadas em triplicata.

Os corpos de prova da liga de Níquel-Berílio foram colocadas diretamente sobre esse meio de cobertura e as placas incubadas por 24 horas, e este procedimento foi realizado em quadruplicata.

As placas foram analisadas macroscópica e microscopicamente e a citotoxicidade foi constatada pela presença de um halo claro sob ou ao redor da

amostra testada. A partir da medida da toxicidade, os índices de zona foram graduados em:

Índices de Zona	Descrição	Classificação
0	Nenhum zona sob ou ao redor da amostra	Nenhuma
1	Alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra	Fraca
2	Zona limitada sob a amostra	Leve
3	Zona entre 0,5 – 1,0 cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona maior que 1,0 cm ao redor da amostra	Severa

Tabela 7 – Descreve e classifica o teste de citotoxicidade da amostra NiBe.

O ensaio celular supracitado foi realizado em quadriplicata de quatro corpos de prova distintos, em placas separadas, perfazendo um total de 16 (dezesseis) testes para confirmar o potencial citotóxico da liga de níquel-berílio. Ensaio realizado no laboratório do Núcleo de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz.

5.5 – Análise Estatística

Os dados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (sd). A análise estatística foi realizada com o software QtiPlot (versão 0.9.8.9, LINUX).

6 – RESULTADOS

6.1 - Sobrevivência bacteriana sobre superfície da liga níquel-berílio.

6.1.1 - Análise qualitativa da capacidade citotóxica da liga níquel-berílio em relação à sobrevivência bacteriana, após diferentes períodos de exposição.

Tabela 8 – Representação qualitativa do potencial de toxicidade da liga de níquel-berílio as cepas bacterianas testadas de acordo com os períodos de exposição.

Microrganismos testados	Desenvolvimento bacteriano após o tempo de exposição a liga de NiBe.							
	1 hora	3 horas	6 horas	9 horas	12 horas	18 horas	24 horas	72 horas
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> (cepa de campo)	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	+	+	+	+	-	-	-	-
<i>E. coli</i> (ATCC 11775)	+	+	+	-	-	-	-	-

Legenda: (+) crescimento bacteriano de ≥ 11 UFC; (-) Crescimento de bacteriano de ≤ 10 UFC.

6.1.2 - Quantificação de Unidades Formados de Colônia (UFC) de *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis* sobreviventes a liga níquel-berílio, após os períodos de exposição.

A quantificação de UFCs sobreviventes, dos microrganismos testados, a liga de níquel-berílio estão representadas na Tabela 9, abaixo:

Tabela 9 – Média e desvio padrão da representação quantitativa de UFC de *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis* sobreviventes ao contato com a superfície de níquel-berílio, após os períodos de exposição:

Microrganismos testados	Média das UFCs sobreviventes após o tempo de exposição a liga de NiBe, com desvio padrão.							
	1 h	3 h	6 h	9 h	12 h	18 h	24 h	72 h
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	6	0	0	0	0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i> (cepa de campo)	1	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> (ATCC 11775)	341± 18	361± 14	156±8	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> (ATCC 29213)	550± 56	287± 3	246±70	17± 2	0	0	0	0
<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	660± 56	409±8	273± 17	126± 24	62±21	0	0	0

6.1.3 – Imagens das UFCs recuperadas de *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, após seus respectivos períodos de exposição a liga NiBe.

6.1.3.1 – *Pseudomonas aeruginosa*.

Abaixo, estão representados nas figuras, as UFCs sobreviventes após cada período de exposição (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72h) da *P. aeruginosa* com a liga NiBe.

6.1.3.2 – *Klebsiella pneumoniae*.

Abaixo, estão as figuras das UFCs sobreviventes após cada período de exposição (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72 horas) da *K. pneumoniae* com a liga NiBe.

6.1.3.2 – *Escherichia coli*.

Abaixo, estão representados nas figuras as UFCs sobreviventes após cada período de exposição (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72 horas) da *E. coli* com a liga NiBe.

6.1.3.3 – *Staphylococcus epidermidis*.

Abaixo, estão representados nas figuras as UFCs sobreviventes após cada período de exposição (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72 horas) do *S. epidermidis* com a liga.

6.1.3.4 – *Staphylococcus aureus*.

Abaixo, estão representados as UFCs sobreviventes após cada período de exposição (1, 3, 6, 9, 12, 18, 24 e 72 horas) da *S. aureus* com a liga NiBe.

6.1.4 – Representação gráfica das UFCs sobreviventes após cada período de exposição a liga NiBe.

Figura 11 – Representação gráfica da média e desvio padrão das UFCs sobreviventes de *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *S. aureus* e *S. epidermidis*, após cada período de exposição a liga NiBe.

6.2 – Determinação da citotoxicidade da liga níquel-berílio através do teste realizado com a linhagem celular NCTC 929.

De acordo com o teste de citotoxicidade realizado no Instituto Adolfo Lutz, a Tabela 10 expressa a liga metálica de níquel-berílio quando em contato com as células de conjuntiva de rato, pelo período de incubação de 24 horas.

Tabela 10 – Índice de zona (IZ) obtido da cultura celular NCTC 929 após contato de 24 horas com a liga de níquel-berílio.

Descrição da Amostra Testada	Índice de zona obtido após a leitura das placas de culturas celulares			
	Nº1	Nº2	Nº3	Nº4
Liga de níquel-berílio	IZ	IZ	IZ	IZ
	0	0	0	0
Controle negativo (papel de filtro)	0	0	0	0
Controle positivo (fragmentos de látex)	4	4	4	4

No ANEXO A, encontra-se o laudo emitido pelo Núcleo de Cultura Celular do instituto Adolfo Lutz, contendo as informações supracitadas.

7 – DISCUSSÃO

Os microrganismos podem persistir nas superfícies por longos períodos de tempo (dias a meses), dependendo das propriedades biológicas do organismos, da presença de matéria orgânica ou da umidade da superfície, além das condições ambientais e do tipo da superfície. Enquanto a contaminação das superfícies ambientais persistirem, os microrganismos sobrevivem por variáveis períodos de tempo (ZIMRING et al., 2013).

O níquel não é muito bem conhecido pela população e a sua principal utilidade está na preparação de ligas. As ligas de níquel são conhecidos por sua elevada resistência ao aquecimento e a corrosão. Estas propriedades fazem com que o níquel seja amplamente utilizado na indústria, como processamento de alimentos. As ligas de níquel também são comumente utilizadas como dispositivos médicos (marca-passos, implantes ortopédicos, agulhas, instrumentos cirúrgicos e etc). Um dos principais produtos da corrosão do aço inoxidável é o níquel, e a bactéria pode entrar facilmente em contato com esse íon. As ligas de níquel são requeridas para assegurar que o produto ou implante permaneça livre de contaminações (HERTEL et al., 2005).

Tornou-se comum encontrar evidências na literatura científica que relatam microrganismos capazes de tolerar a presença de componentes tóxicos. Nestes casos, os principais relatos são referentes as cepas *E. coli* e *P. aeruginosa*, que são muito bem estudadas no momento. A sobrevivência bacteriana quando em contato com íons tóxicos é dependente dos mecanismos de resistência e tolerância. A resistência de uma determinada bactéria a estes compostos tóxicos dependem de cinco principais estratégias: i) bomba de efluxo; ii) sequestro do componente tóxico; iii) redução da permeabilidade da membrana bacteriana; iv) alteração enzimática para uma forma menos tóxica, e; v) redução da sensibilidade da célula alvo (BRUINS et al., 2000). Estes mecanismos de resistência descritos acima permitem ocorrer o crescimento bacteriano mesmo em altas concentrações de um antibiótico ou de um metal. Em contraste com a resistência, algumas células são capazes de sobreviver ao ataque dos metais tóxicos ou de antibióticos sem expressarem ou

usarem estes mecanismos de resistência citados. Contudo, essas células, são mencionadas como células persistentes ou dormentes, e não possuem capacidade de se dividir (LEWIS, 2007).

A aderência das bactérias as superfícies industriais e hospitalares podem levar a uma infecção, ou contaminação, e/ou a destruição (perda de função) destes materiais (GANESH; ANAND, 1998; MANGRAM et al., 1999; VIDELA, 2002). A prevenção da aderência bacteriana as superfícies metálicas é o melhor método de solucionar estes problemas. Pesquisas em materiais antimicrobianos resultou na produção de diversos materiais como os plásticos antibacterianos (VAN HEERDEN et al., 2009), cerâmicas antibacterianas (VITALE-BRAVARONE et al., 2008), roupas antibacterianas (CHUN et al., 2009), e aços inoxidáveis contendo prata e cobre (OKUBO et al., 1998; YOKOTA et al., 1998).

O uso destes materiais antibacterianos tornou-se significativo por exemplo nas indústrias alimentícias (GANESH; ANAND, 1998), nos hospitais (MANGRAM et al., 1999), e nos asilos. Nos hospitais, o uso dos materiais com ação antibacteriana auxilia reduzir as infecções nosocomiais (SHIERHOLZ et al., 1998; MANGRAM et al., 1999). Em muitas indústrias, o uso de materiais antibacteriano auxiliam prevenir a deterioração do material pela bactéria, pois a mesma é reconhecida como a principal causa de danos nestes materiais (YASUYUKI et al., 2010).

A composição química da bactéria demonstra a presença de macro e micronutrientes. Os principais elementos presentes nas bactérias incluem carbono, hidrogênio, oxigênio, fósforo e enxofre. Se excedidos, esses elementos que são considerados essenciais a estes microrganismos, tornam-se tóxicos. O mesmo ocorre com os metais prata, cobre e chumbo que são conhecidos como tóxicos (SHIERHOLZ et al., 1998). Todavia, existem algumas atividades do metabolismo destes microrganismos que necessitam da presença de metais, como por exemplo, a produção de uma substância extracelular polimérica pelas bactérias, envolvem o processo de captação e acumulação intra e extracelular de metais pesados do meio (GUTNICK; BACH, 2000; TIAN, 2008). Nies (1999) revisou a acumulação dos metais nas bactérias, seus impactos e os mecanismos de resistência que esses microrganismos possuem. Com isso, o pesquisador concluiu que a acumulação de

íons metais afetam os microrganismos de duas formas: direta e indireta. Os íons metais dissolvidos afetam diretamente as bactérias através da incorporação deste íons durante o processo de multiplicação, onde as proteínas que estão sendo produzidas tornam-se não funcionais ou não conseguem realizar totalmente suas funções (mau funcionamento). Por outro lado, a dissolução dos íons metais no meio, resultando na formação de radicais livres no qual afetam diretamente a bactéria, resultando na ruptura da parede celular, acometendo assim, na morte da mesma.

No presente estudo, ao analisar os resultados apresentados na Tabela 9, observou-se uma maior resistência das bactérias, classificadas como gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*) a liga de níquel-berílio onde foram capazes de sobreviver até 9 horas em contato com o material, quando comparadas as gram-negativas (*K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. aeruginosa*) que apresentaram resistência ao metal somente até a primeira hora do teste (*P. aeruginosa*), enquanto que as demais (*K. pneumoniae* e *E. coli*) não sobreviveram com uma hora de contato com a liga. Com base na classificação de Gram destes microrganismos, nossos estudos não corroboraram com os de YASUYUKI et al. (2010), onde utilizou-se bactérias gram-positivas e gram-negativas para testar a tolerância (resistência) das bactérias frente ao titânio, cobre, níquel, zinco, zircônio, molibdênio, estanho e chumbo, e concluíram que é muito importante a utilização de cepas com espessuras diferentes de peptídeoglicano, pois as bactérias apresentam diferentes níveis de tolerância aos íons metal e estas diferenças podem ser atribuídas a este constituinte da parede celular das bactérias. Todavia, no estudo supracitado, os autores informam que mesmo conhecendo a maior vulnerabilidade apresentadas pelas bactérias gram-negativas quando comparadas com as gram-positivas, não encontraram diferença significativa da resistência entre a cepa de *E. coli* e a de *S. aureus* aos metais testados. Entretanto, YASUYUKI et al. (2010) concluíram que o níquel puro apresenta excelente propriedade antibacteriana contra as *E. coli*, bem como, o *S. aureus*, e que este metal pode ser considerado um bom candidato para ser incorporado aos materiais antibacterianos. Contudo, os quando analisados os resultados da presente pesquisa com os de ISOBE (2001), constatamos dados concordantes no que se refere a maior resistência (tolerância) das cepas gram-

positivas quando comparadas as gram-negativas. O pesquisador acrescenta que as bactérias gram-positivas possuem uma camada mais espessa de peptídeoglicano (50-60µm) sobre a membrana, e esta camada é responsável por auxiliar a bactéria a superar a tensão física superficial (ISOBE, 2001). Esta camada da parede celular bacteriana é também responsável por reduzir a penetração dos íons metais tóxicos. Entretanto, as bactérias gram-negativas possuem uma camada fina de peptídeoglicano sobre várias camadas da membrana celular. Estes microrganismos, apresentam porinas na membrana externa da bactéria que age como canais para substâncias de baixo peso molecular entrar na célula, exemplos os metais (MADIGAN et al., 2009).

GOULD et al. (2009) relatam que infecções hospitalares por bactérias gram-positivas e gram-negativas são os principais problemas no ambiente nosocomial. Este fator é mais intensificado pelos microrganismos que apresentam elevado potencial de desenvolver resistência aos antibióticos, como no caso, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli* (LEUTENBACH; POLK, 2007).

Em um ambiente hospitalar, os principais locais de contaminação de microrganismos potencialmente infecciosos são superfícies inanimadas que podem ser tocadas pelo homem, exemplo: maçanetas de portas, puxadores (de gavetas, armários), torneiras, entre outros. Estes, deveriam ser compostos por materiais com propriedades antimicrobianas a fim de evitar transmissões diretas ou indiretas. A escolha do aço inoxidável para estes materiais resulta em sua durabilidade, facilidade em limpeza, bem como a ausência de manchas que podem fazer com que a superfície aparente não estar limpa. Entretanto, uma revisão literária recente concluiu que importantes microrganismos, como gram-positivos (*Staphylococcus aureus* resistente a meticilina - MRSA, e o *Enterococcus* vancomicina resistente - VRE) e gram-negativos (*Acinetobacter* spp., *E. coli* e *P. aeruginosa*), tem sobrevivido a superfície do aço inoxidável por longos períodos de tempo (KRAMER et al., 2006). Essas superfícies, que não são capazes de eliminar os patógenos com o tempo, podem atuar potencialmente como reservatórios para transferir estes microrganismos aos funcionários da área da saúde, pacientes e membros de suas famílias. Ultimamente, os trabalhadores da saúde lideram como agentes

responsáveis pela transmissão de microrganismos patogênicos aos pacientes (OIE et al., 2002).

Há um crescimento evidente de que as fontes/superfícies ambientais de um hospital ser como um importante meio de transmissão dos patógenos. Por exemplo, estudos moleculares mostraram que os mesmos organismos que contaminavam o ambiente podiam causar infecções hospitalares e eram encontrados em diversos pacientes do mesmo hospital (ZIMRING et al., 2013).

Muitos estudos demonstraram que quando foram realizadas culturas dos materiais metálicos provenientes de ambiente hospitalar, o aço inoxidável demonstrou não ter efeito antimicrobiano sobre um período de seis horas (FAÚNDEZ et al., 2004; NOYCE et al., 2006 (a); NOYCE et al., 2006 (b); AIREY;VERRAN, 2007; MEHTAR et al., 2008; WEAVER et al., 2008). Todavia, se compararmos esses dados com os obtidos neste estudo, observamos uma redução da concentração dos microrganismos testados desde a primeira hora de incubação (60 minutos). Com 9 horas de contato, constatamos a inibição total do crescimento da *E. coli*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae*. Sendo que a *P. aeruginosa* apresentou crescimento apenas na primeira hora, e mesmo assim, resultou em uma cultura de apenas 9 UFC após 24 e 48 horas. Mediante ao protocolo padronizado por ESPIRITO SANTO et al. (2010), um material metálico é considerado com ação antimicrobiana quando o valor obtido de uma cultura de 48 horas é menor ou igual a 10 UFC, caracterizando assim, a liga de níquel-berílio com ação antibacteriana para as três bactérias mencionadas anteriormente.

ESPIRITO SANTO et al. (2010) realizaram pesquisa para analisar a resistência bacteriana ao cobre, uma vez que este íon (encontrado nas moedas) entra facilmente em contato com as bactérias da microbiota da pele, e sabe-se que a pele apresenta uma ampla variedade de microrganismos. Dentre as 115 cepas isoladas da superfície de moedas (contendo cobre e níquel), as que apresentaram maior resistência foram *Pseudomonas* sp. (sua sobrevivência variou de 1 hora até 48 horas), *S. epidermidis* (que variou de 1 hora de sobrevivência até 24 horas), o *Staphylococcus warnerii* (demonstrou capacidade de sobreviver a liga por 48 horas). Os autores comentam que identificar e isolar microrganismos com certo potencial de

resistência (de 1 ou 2 dias) quando em contato com a liga de cobre-níquel é considerado preocupante, uma vez que a utilização prolongada de materiais de contato com atividade bacteriana não somente seleciona as cepas resistentes, mas também favorece a coseleção de genes que codificam resistência a diversos antibióticos. Os autores sugerem que deve-se incentivar mais pesquisas para desenvolver novos materiais que possuam superfícies antibacterianas, assim, aumentaria as opções de usos e poderia ocorrer uma diminuição da resistência microbiana a alguns metais, uma vez que estes (níquel, cobre e aço inoxidável) são amplamente utilizados.

A utilização incessante do cobre como material com ação antimicrobiana resultou no surgimento de genes de resistências plasmidiais e cromossomais em diversos tipos de bactérias. Encontra-se descrito o isolamento e identificação de genes de resistência cromossomais (*copA* e *copB*) nos *Enterococcus sp.* (gram-positivo), que determina respectivamente a absorção (na quantidade adequada) e o efluxo (da quantidade excedida) do íon (ODERMATT et al., 1993). Todavia, outros genes plasmidiais que codificam resistência ao cobre também foram descritos em bactérias (gram-negativas), tais como a *E. coli* (genes *pcoABCDE*) e a *Pseudomonas sp.* (genes *copABCD*, *copR* e *copS*) (BROWN et al., 1994; BROWN et al., 1995; COOKSEY, 1993; COOKSEY, 1994). Por não haver relatos da utilização da liga de níquel-berílio na literatura, acredita-se que não exista, até o presente momento, relatos de resistência bacteriana (nem plasmidial e nem cromossomal) a estes íons associados.

HARRINSON et al. (2004) executaram a análise da suscetibilidade das cepas *E. coli*, *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e do *S. aureus* (ATCC 29213) formadoras de biofilme quando em contato com 17 diferentes compostos metálicos, após 24 horas de incubação. De acordo com os resultados obtidos, a *Pseudomonas aeruginosa* após formar biofilme, aumentou em 100 vezes a sua capacidade de resistência a 14 metais. De todas as bactérias testadas, tanto as células do biofilme, quanto as células planctônicas, demonstraram alta toxicidade quando em contato com o níquel (mesmo em baixas concentrações) presente no meio de cultura. ESPIRITO SANTO et al. (2008), comentam que há um contraste de comportamento bacteriano quando

o teste é realizado com a intenção de analisar a toxicidade do metal em um ensaio experimental de formação de biofilme, com um ensaio de toxicidade de superfície seca (ou que rapidamente se seca). Os autores comentam que em uma superfície de contato, a bactéria não possui tempo para captar a quantidade adequada de nutrientes, se multiplicar e formar biofilme. Muito pelo contrário, ela passa por um estresse nutricional e fisiológico, e as condições de sobrevivência são diferentes daquelas oferecidas em um sistema aquoso. Com isso, uma bactéria pode apresentar resistência a um determinado metal, quando em meio líquido, e outra tolerância em superfície seca. Os autores demonstram que uma cepa de *E. coli* demonstrou-se ser suscetível a íons cobre dissolvidos em solução aquosa, todavia, quando em contato com o corpo-de-prova de cobre (99% puro), a bactéria demorou 24 horas para ser lisada.

MACOMBER e HAUSINGER (2011) relatam o efeito tóxico do níquel em diversas células, e informam que basicamente o níquel pode agir em quatro atividades metabólicas da bactéria: 1) o níquel substitui o metal essencial das metaloproteínas bacterianas (muito estudado no caso das *Pseudomonas sp.* quando em presença de íons metal); 2) o níquel se liga a enzimas que não toleram a presença do íon metal (ocorre com grande frequência com a *E. coli*); 3) o níquel liga-se a sítios externos de uma enzima e inibe sua função; 4) a presença do níquel leva a célula (bacteriana ou de humanos) a um estresse oxidativo que afeta a síntese de proteínas, DNA ou lipídeos. Este último fator está intimamente correlacionado a citotoxicidade do níquel e sua contribuição a carcinogênese em humanos. Nossos resultados são concordantes com as informações fornecidas pelos pesquisadores, uma vez que observamos o efeito citotóxico nas células bacterianas, onde de acordo com o tempo, reduziu-se a concentração (morte celular) das bactérias que estavam em contato com o corpo-de-prova de níquel-berílio. Todavia, quando analisado o teste de citotoxicidade da liga de níquel-berílio quando em contato direto com as células NCTC clone 929 (células de tecido conjuntivo de camundongos), ficou demonstrado que a liga estudada não apresenta qualquer efeito citotóxico do material (índice de zona igual a zero em todos os dezesseis testes realizados). Não há relatos na literatura científica sobre alguma análise da citotoxicidade da liga

níquel-berílio. A pouca informação que conhecemos é referente a citotoxicidade do berílio (quando em elevadas concentrações) quando em contato prolongado com as células humanas, podendo causar diversos tipos de câncer.

É importante relatar que independente do material (antibacteriano ou sem nenhuma eficácia contra esses e outros microrganismos) utilizado nos ambientes dos estabelecimentos de saúde, algumas estratégias de prevenção não devem ser descartadas, como a descontaminação destas superfícies e a permanente higienização das mãos dos trabalhadores da saúde (TRIANDAFILLU et al., 2003). Pacientes colonizados com bactérias multirresistentes apresentam 73% de probabilidade de contaminar o ambiente do quarto em que se encontra, e 69% de colonizar outros pacientes do mesmo hospital, através das mãos dos trabalhadores da saúde (BOYCE et al., 1997).

Ao pesquisar bibliotecas *online* no mundo todo e periódicos científicos disponíveis, foi possível encontrar somente duas referências de ligas de cobre que utilizam os íons níquel e/ou berílio em sua composição. De acordo com um site de patentes dos Estados Unidos da América, a liga patenteada C17510 (*Beryllium Copper*) registrada na Agência de Proteção Ambiental (*Environmental Protection Agency – EPA*) dos EUA, é composta por 98,7% de cobre, 0,4% de berílio e 1,8% de níquel. A outra liga patenteada C17200 (*Beryllium Copper*) registrada também na EPA dos EUA possui na sua composição, 98,1% de cobre e 1,90% de berílio. Ambas são registradas como “materiais antimicrobiano”. Todavia, não há publicações destes resultados em qualquer periódico científico. Com isso, impossibilita averiguar se a ação antibacteriana desta liga ocorre devido a presença do íon berílio e/ou do cobre. O que sabemos é que muitas empresas e pesquisas relatam a eficiência antimicrobiana de, aproximadamente, 99,97% de superfícies de cobre (MICHELS et al., 2008).

A procura incessante por novos materiais com atividade antimicrobiana (contra vírus, fungos, bactérias e parasitas) e que reduza a quantidade de infecções e colonizações de superfícies tem estimulado muitos grupos de pesquisa ao redor de todo o mundo. Todavia, até o presente momento, ainda há uma limitação de estudos de materiais (não implantáveis) com essa característica, descritos na

literatura científica. E ao realizar um levantamento bibliográfico detalhado sobre a liga de níquel-berílio nos principais periódicos científicos, depara-se com a ausência de referências para podermos utilizá-las como base. Novas estratégias, referências e metodologias para avaliar a resistência dos microrganismos quando em contato com os metais tóxicos devem ser realizadas, ainda mais quando se trata de ligas não convencionais (como no caso da liga níquel-berílio), mas que apresentam atividade antibacteriana e não citotóxica.

8 - CONCLUSÃO

A liga níquel-berílio demonstrou ter propriedades antibacterianas, uma vez que foi capaz de inibir as bactérias gram-negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*) quanto as gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermidis*), em diversos períodos de contato.

A liga níquel-berílio demonstrou maior eficácia contra as cepas *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

A cepa de *Staphylococcus epidermidis* foi a cepa que apresentou maior resistência à liga, quando comparadas com as demais bactérias testadas.

A avaliação quantitativa das células viáveis após os oito períodos de contato com a liga níquel-berílio demonstrou, de modo geral, que a partir de 18 horas a liga foi capaz de eliminar as cinco bactérias avaliadas no presente ensaio.

Pela análise da citotoxicidade, através do método de difusão em Agar, comprovou-se que a liga níquel-berílio testada não é capaz causar qualquer tipo de dano celular quando em contato com a linhagem NCTC clone 929, sendo classificada como IZ zero.

REFERÊNCIAS¹

- ABRISHAMI, S. H.; TALL, B. D.; BRUURSEMA, T. J.; EPSTEIN, P. S.; SHAH, D. B. Bacterial adherence and viability on cutting board surfaces. **Journal of Food Safety**, v. 14, p. 153-172, 1994.
- AFESSA, B.; SHORR, A. F.; ANZUETO, A. R.; CREVEN, D. E.; SCHINNER, R.; KOLLEF, M. H. Association between a silver-coated endotracheal tube and reduced mortality in patients with ventilator-associated pneumonia. **Chest.**, v. 137, p. 1015–1021, 2010.
- AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY: A TSDR **Toxicological Profile for Beryllium**. A TSDR, 1997.
- AIREY, P.; VERRAN, J. Potential use of copper as a hygienic surface: problems associated with cumulative soiling and cleaning. **J. Hosp. Infect.**, v. 67, p. 271-277, 2007.
- AL-NASSIR, W. N.; SETHI, A. K.; NERANDZIC, M. M.; BOBULSKY, G. S.; JUMP, R. L.; DONSKEY, C. J. Comparison of clinical and microbiological response to treatment of *Clostridium difficile*–associated disease with metronidazole and vancomycin. **Clin. Infect. Dis.**, v. 47, n. 1, p.56-62, 2008.
- ALBRACHT, S. P. J.; VAN DER ZWAAN, J. W.; FONTIJN, R. D. EPR spectrum at 4, 9, and 35 GHz of hydrogenase from *Chromatium vinosum*. Direct evidence for spin-spin interactions between Ni(III) and the iron-sulfur cluster. **Biochim. Biophys. Acta** 766:245-258, 1984.
- ALI, S. A.; GROTTI, A.; RISCALA, C. M. O níquel e suas ações sobre o organismo humano. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 62, p. 85-96, 1987.
- ALLEGIANZI, B.; BAGHERI, S. N.; COMBESURE, C.; GRAAFMANS, W.; ATTAR, H.; DONALDSON, L.; PITTET, D. Burden of endemic health-care-associated infection in developing countries: systematic review and meta-analysis. **Lancet**, v. 377, n. 9761, p. 228-241, 2011.
- ALVARES, C.; LABARCA, J.; SALLES, M. Prevention strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin América. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 14., n. 2, p. 107-108, 2011.

1 De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

American Hospital Association, Hospital Statistics 2004. Chicago Health Forum LLC, 2005.

ANKE, M.; ANGELOW, L.; GLEI, M.; MULLER, M.; ILLING, H. The biological importance of nickel in the food chain. **Fresenius J. Anal. Chem.**, v. 352, p. 92–96, 1995.

ANKEL-FUCHS, D.; THAUER, R. K. **Nickel in biology: nickel as an essential trace element**. In: Lancaster JR, editor. The bioinorganic chemistry of nickel. Weinheim: VCH, p. 93–110, 1988.

ANTHONY, M.; ROSE, B.; PEGLER, M. B. et al. Genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the sputa of Australian adult cystic fibrosis patients. **J. Clin. Microbiol.**, v. 40, p. 2772-2778, 2002.

AODHÁN S. Breathnach. Nosocomial infections and infection control. **Medicine**, v. 41, n. 11, p. 649–653, 2013.

ARONSON, N. E.; SANDERS, J. W.; MORAN, K. A. In harm's way: Infections in deployed American military Forces. **Clin. Infect. Dis.**, v. 43, p. 1045-1051, 2006.

ATSDR, Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological profile for nickel. US Public Health Service. Atlanta. USA, 351 p., 2005.

BABICH, H.; STOTZKY, G. Toxicity of nickel to microbes: environmental aspects. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 29, p. 195-265, 1983.

BALE, M. J.; BENNETT, P. M.; BENNINGER, J. E.; HINTON, M. The survival of bacteria exposed to dessication on surfaces associated with farm buildings. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 75, p. 519-528, 1993.

BARCELOUX, D. G. Nickel. **Clin. Toxicol.**, v. 37, p. 239–258, 1999.

BARKER, J.; VIPOND, I. B.; BLOOMFIELD, S. F. Effects of cleaning and disinfection in reducing the spread of norovirus contamination via environmental surfaces. **J. Hosp. Infect.**, v. 58, p. 42–49, 2004.

BARROS, L.M.; BENTO, J. N. C.; CAETANO, J. A.; MOREIRA, R. A. N.; PEREIRA, F. G. F.; FROTA, N. M.; ARAÚJO, T. M.; SOARES, E. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público do Brasil. **Rev. Cienc. Farm. Básica Ap.**, v 33, n. 3, p. 429-435, 2012.

BARTHA, R.; ORDAL, E. J. Nickel-dependent chemolithotrophic growth of two *Hydrogenomonas* strains. **J. Bacteriol.**, v. 89, p. 1015-1019, 1965.

BARUA, D. Survival of cholera vibrios in food, water and fomites. **Public Health Papers**, v. 40, p. 29-31, 1970.

BENNETT, B. G. **Environmental nickel pathways to man**. In: SUNDERMAN JR, F. W. Nickel in the human environment, vol. 53. Lyon: IARC Scientific Publications, 487–495, 1984.

BERGOGNE-BEREZIN, E.; TOWNER, K. J. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. **Clin. Microbiol.**, v. 19, p. 148-165, 1996.

BERROUANE, Y. F.; MCNUTT, L. A.; BUSCHELMAN, B. J.; RHOMBERG, P. R.; SANFORD, M. D.; HOLLIS, R. J. et al. Outbreak of severe *Pseudomonas aeruginosa* infections caused by a contaminated drain in a whirlpool bathtub. **Clin. Infect. Dis.**, v. 31, p. 1331-1337, 2000.

BLASCO, F., PERELLO, L.; LATORRE, J.; BORRAS, J.; GARCIA-GRANDA, S. Cobalt (II), nickel (II), and copper (II) complexes of sulfanilamide derivatives: synthesis, spectroscopic studies, and antibacterial activity. crystal structure of [Co(sulfacetamide)₂(ncs)₂]. **J. Inorg. Biochem.**, v. 61, n. 2, p. 143–154, 1996.

BOEHMLER, G.; GERWERT, J.; SCUPIN, E.; SINELL, H. J. Zur Epidemiologie der Helicobacteriose des Menschen; Untersuchungen zur Überlebensfähigkeit des Erregers in Lebensmitteln. **Deutsche Tierärztliche Wochenschrift**, v. 103, p. 438-443, 1996.

BONTEN, M. J.; HAYDEN, M. K.; NATHAN, C., et al. Epidemiology of colonisation of patients and environment with vancomycin-resistant enterococci. **Lancet**, v. 348, p. 1615–1619, 1996

BORROK, D., BORROK, M. J., FEIN, J. B., AND KIESSLING, L. L. Link between chemotactic response to Ni²⁺ and its adsorption onto the *Escherichia coli* cell surface. **Environ. Sci. Technol.**, v. 39, p. 5227-5233, 2005.

BOUCHER, S. N.; CHAMBERLAIN, A. H. L.; ADAMS, M. R.; Enhanced survival of *Campylobacter jejuni* in association with wood. **Journal of Food Protection**, v. 61, p. 26-30, 1998.

BOYCE, J. M. Environmental contamination makes an important contribution to hospital infection. **J. Hosp. Infect.**, v. 65, sup. 2, p. 50-54, 2007.

BOYCE, J. M.; HAVILL, N. L.; OTTER, J. A.; ADAMS, N. M. Widespread environmental contamination associated with patients with diarrhea and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization of the gastrointestinal tract. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 28, p. 1142–1147, 2007.

BOYCE, J. M.; OPAL, S. M.; CHOW JW, et al. Outbreak of multidrug-resistant *Enterococcus faecium* with transferable vanB class vancomycin resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p.1148-1153, 1994.

BOYCE, J. M.; POTTER-BYNOE, G.; CHENEVERT, C.; KING, T. Environmental contamination due to methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: possible infection control implications. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 18, p. 622–627, 1997.

Brasil, Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM). **Sumário Mineral / Ministério de Minas e Energia. Departamento Nacional de Produção Mineral.** Thiers Muniz Lima, Carlos Augusto Ramos Neves (coordenadores). – Brasília: DNPM / DIPLAM, v. 31, p.111, 2011.

BREATHNACH, A. S. Nosocomial infections and infection control. **Medicine**, v. 41, n. 11, p. 649-653, 2013.

BREATHNACH, A. S. Nosocomial infections. **Medicine**, v. 33, n. 3, p. 22-26, 2005.

BROWN, N. L.; BARRETT, S. R.; CAMAKARIS, J.; LEE, B. T. O.; ROUCH, D. A. Molecular genetics and transport analysis of the copper-resistance determinant (pco) from *Escherichia coli* plasmid RJ1004. **Mol. Microbiol.**, v. 17, p. 1153-1166, 1995.

BROWN, N. L.; LEE, B. T. O.; SILVER, S. **Bacterial transport of and resistance a copper.** In: Metal ions in biological systems. vol. 30, p. 405-434, Marcel Dekker, New York, 1994.

BRUINS, M. R.; KAPIL, S.; OEHME, F. W. Microbial resistance to metals in the environment. **Ecotoxicol. Environ. Saf.**, v. 45, p. 198-207, 2000.

BURKE, J. P. Infection control – A problem for patient safety. **N. Engl. J. Med.**, v. 348, p. 651-656, 2004.

BUTZBY JC, ROBERTS T: ERS update U.S Foodborne Disease Costs for Seven Pathogens. **Food Review**, v. 19, p. 20-25, 1996.

CARMODY, A. B.; OTTO, M. Specificity grouping of the accessory gene regulator quorum-sensing system of *Staphylococcus epidermidis* is linked to infection. **Arch. Microbiol.** v. 181, p. 250–253, 2004.

CASTELLANO GONZALES, M.; BERMUDEZ NAVARRO, R. J.; ARMINDO PEROZO MENA, L. M. et al. *Staphylococcus aureus*: estado de portador en personal de enfermería y patrones de susceptibilidad antimicrobiana. **Rev. Soc. Ven. Microbiol.**, v. 25, n. 2, p. 72-78, 2005.

CAVALCANTI, S. M. M.; FRANÇA, E. R.; VILELA, M. A.; MENTENEGRO, F.; CABRAL, C.; MEDEIROS, A. C. R. Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 9, n. 4, p. 436-446, 2006.

CDC. National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **Am. J. Infect. Control.**, v. 32, p. 470–485, 2004.

CDC. NNIS system. National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992-June 2003. Issued August 2003. **Am. J. Infect. Cont.**, v. 31, p. 481-498, 2003.

CEMPEL, M; NIKEL, G. Nickel: a review of its sources and environmental toxicology. **Polish J. of Environm. Stud.**, vol. 15, n. 3, p. 375-382, 2006.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). **Outline for health care-associated infection surveillance.** Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/nhsn2documents.html>>. Acesso em 23 de março de 2014.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Reduction in central line associated bloodstream infection among patients in intensive care units—Pennsylvania. April 2001-March 2005. **MMWR Morb Wkly Rep.**, v. 54, p. 1013-1016, 2005.

CHIAVERINI, V. **Tecnologia mecânica – estrutura e propriedades das ligas metálicas.** 2 ed., McGraw-Hill, 1986.

CHIKERE, C. B.; OMONI, V. T.; CHIKERE, B. O. Distribution of potential nosocomial pathogens in a hospital environment. **A. J. B.**, v. 7, n. 20, p. 3535-3539, 2008.

CHOHAN, Z. H. Symmetric 1,1'-dimethylferrocene-derived amino acids: their synthesis, characterization, ligational and biological properties with cu(II), co(II) and ni(II) ions. **Metal Based Drugs**, v. 7, p. 177 – 183, 2000.

CHOHAN, Z. H.; SCOZZAFAVA, A.; SUPURAN, C. T. Unsymmetrical 1,1'-disubstituted ferrocenes: synthesis of co(II), cu(II), ni(II) and Zn(II) chelates of ferrocenyl-1-thiadiazolo-1'-tetrazole, -1- thiadiazolo-1'-triazole and -1-tetrazolo-1'-triazole with antimicrobial properties. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, v. 17, n. 4, p. 261 – 266, 2002.

CHRISTENSON, M.; HITT, J. A.; ABBOTT, G.; SEPTIMUS, E. J.; IVERSEN, N. Improving patient safety: resource availability and application for reducing the incidence of healthcare-associated infection. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 27, n. 3, p. 245-251, 2006.

CHUN, D. T. W.; FOULK, J. A.; MCALISTER, DD.; Testing for antibacterial properties of cotton/flax denim. **Ind. Crop. Prod.**, v. 29, p.371–376, 2009.

COETZEE, E.; RODE, H; KAHN, D. *Pseudomonas aeruginosa* burn wound infection in a dedicated paediatric burns unit. **S. Afr. J. Surg.**, v. 51, p. 50-53, 2013.

COOKSEY, D. A. Copper uptake and resistance in bacteria. **Mol. Microbiol.**, v. 7, p. 1-5, 1993.

COOKSEY, D. A. Molecular mechanisms of copper resistance and accumulation in bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 14, p. 381-386, 1994.

CORBELLA, X.; PUJOL, M.; ARGERICH, M. J.; et al. Environmental sampling of *Acinetobacter baumannii*: moistened swabs versus moistened sterile gauze pads. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 20, p. 458-460, 1999.

COURVALIN, P.; WEBER, J. T. Antimicrobial drugs and resistance. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 791-797, 2005.

CROSBIE, W. E.; WRIGHT, H. D. Diphtheria bacilli in floor dust. **The Lancet**, v. 1, p. 656, 1941.

CRUZ, A. S. **Teste de citotoxicidade in vitro como alternativa ao teste in vivo de Draize na avaliação de produtos cosméticos**. São Paulo, 2003. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo.

DANCER, S.J. The role of environmental cleaning in the control of hospital-acquired infection. **J. Hosp. Infect.**, v. 73, p. 378-285, 2009.

DAS, K. K.; DAS, S. N.; DHUNDASI, S. A. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. **Indian J. Med. Res.**, v. 128, p. 412-425, 2008.

DENKHAUS, E.; SALNIKOW, K. Nickel essentiality, toxicity, and carcinogenicity. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 42, p. 35–56, 2002.

DESIMONI, M.C.; ESQUIVEL, G.P.; MERINO, L.A. Fecal colonization by extended-spectrum betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. **Enferm. Infec. Microbiol. Clin.**, v.22, n.9, p. 507-511, 2004.

DETTENKOFER, M.; BLOCK, C. Hospital disinfection: efficacy and safety issues. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 18, p. 320–325, 2005.

DEUBNER, C. D.; LOWNEY, Y. W.; PAUSTENBACH, D. J.; WARNERDAM, J. Contribution of incidental exposure pathways to total beryllium exposures. **Applied Occupational and Environmental Hygiene**, v. 16, n. 5, p. 568-578, 2001.

DIAS, J. **Perfil analítico do berílio**. Rio de Janeiro, Departamento Nacional de Produção Mineral, 1973, pp.170.

DICKGIESSER, N. Untersuchungen über das Verhalten gram-positiver und gram-negativer Bakterien in trockenem und feuchtem Milieu. **Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene**, v. 167, p. 48-62, 1978.

Division of Healthcare Quality Promotion; National Center for Infectious Disease; Centers for Disease Control and Prevention. National nosocomial infections surveillance (NNIS) system report, data summary from January 1992 through June 2004, issued October 2004. **Am. J. Infect. Cont.**, v. 32, p. 470-485, 2004.

DOYLE, A., GRIFFITHS, J.B., NEWELL, D.G. **Cell and tissue culture: laboratory procedures**. New York: Chichester: John Wiley, 1994. v.1-2, s.p.

DREES, M.; SNYDMAN, D.; SCHMID, C.; et al. Prior environmental contamination increases the risk of acquisition of vancomycin-resistant enterococci. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, p. 678–685, 2008.

DUBOIS, V.; ARPIN, C.; MELON, M.; MELON, B.; ANDRE, C.; FRIGO, C. et al. Nosocomial outbreak due to a multiresistant strain of *Pseudomonas aeruginosa* P12:

efficacy of cefepime-amikacin therapy and analysis of b-lactam resistance. **J. Clin. Microbiol.**, v. 39, p. 2072-2078, 2001.

DUCKRO, A. N.; BLOM, D. W.; LYLE, E. A.; WEINSTEIN, R. A.; HAYDEN, M. K. Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands. **Arch. Intern. Med.**, v. 165, p. 302–307, 2005.

DUNN, P. M.; SEMMELWEIS, I. Of Budapest and the prevention of puerperal fever. **Arch. Dis. Child. Fetal. Neonatal Ed.**, v. 90, n. 4, p. F345-F348, 2005.

ECKSTEIN, B. C.; ADAMS, D. A.; ECKSTEIN, E. C.; et al. Reduction of *Clostridium difficile* and vancomycin-resistant *Enterococcus* contamination of environmental surfaces after an intervention to improve cleaning methods. **BMC Infect Dis.**, v. ;7, p. 61, 2007.

EDWARDS, J. R.; PETERSON, K. D.; ANDRUS, M. L. et al. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report. Data summary for 2006, issued 2007. **Am. J. Infect. Cont.** 2007;35:290-301.

ELMOS, T. Survival of *Neisseria gonorrhoeae* on surfaces. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 57, p. 177-180, 1977.

ENGLERT, D. L.; ADASE, C. A.; JAYARAMAN, A.; MANSON, M. D. Repellent Taxis in Response to Nickel Ion Requires Neither Ni²⁺ Transport nor the Periplasmic NikA Binding Protein. **Journal of Bacteriology**, vol. 192, n. 16, pp. 4259-4259, 2010.

EPSTEIN, W. L. **Cutaneous effects of beryllium**. In: Beryllium Biomedical and Environmental Aspects, M. Rossman; O. Preuss; M. Powers, Eds. Williams & Wilkins, Baltimore 1991.

ESPIRITO SANTO, C.; MORAIS, P. V.; GRASS, G. Isolation and characterization of bacteria resistant to metallic copper surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 5, p. 1341-1348, 2010.

ESPIRITO SANTO, C.; TAUDTE, N.; NIES, D. H.; GRASS, G. Contribution of copper ion resistance to survival of *Escherichia coli* on metallic copper surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 977-986, 2008.

ESPOSITO, S.; LEONE, S. Antimicrobial treatment for intensive care unit (ICU) infections including the role of the infectious diseases specialist. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 29, p. 494-500, 2007.

FALSEY, A. R.; WALSH, E. E. Transmission of *Chlamydia pneumoniae*. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 168, p. 492-496, 1993.

FAÚNDEZ, G.; TRONCOSO, M.; NAVARRETE, O.; FIGUEROA, G. Antimicrobial activity of copper surfaces against suspensions of *Salmonella enterica* and *Campylobacter jejuni*. **BMC Microbiol.**, v. 4, p. 19, 2004.

FINNEY, L. A.; O'HALLORAN, T. V. Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors. **Science**, v. 300, p. 931-936, 2003.

FÖRSTNER, V.; WITTMANN, G. T. W. **Metal pollution in the aquatic environment**. New York: Springer, 1983.

FOSTER, W. D.; HUTT, M. S. Experimental staphylococcal infections in man. **Lancet**, v. 2, p. 1373-1376, 1960.

FRENCH, G. L.; OTTER, J. A.; SHANNON, K. P.; ADAMS, N. M.; WATLING, D.; PARKS, M. J. Tackling contamination of the hospital environment by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): a comparison between conventional terminal cleaning and hydrogen peroxide vapour decontamination. **J Hosp Infect.**, v. 57, p. 31-37, 2004.

FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 2.ed. New York: Wiley-Liss, 1987. 397p.

FRIBERG, L.; NORBERG, G.F .; VOUK, V .B. **Handbook on the Toxicology of Metals**. Elsevier/North-Holland Press, Amsterdam, 1979.

GANESH, K. C.; ANAND, S. K. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. **Int. J. Food. Microbiol.**, v. 42, p.9-27, 1998.

GARRETT, R. G. **Natural sources of metals to the environment**. In: CENTENO, J. A.; COLLERY, P.; FERNET, G.; FINKELMAN, R. B.; GIBB, H.; ETIENNE, J-C. Metal ions in biology and medicine, vol. 6. Paris: John Libbey Eurotext, :508-510, 2000.

GELATTI, L. C.; SUKIENNIK, T.; BECKER, A. P.; INOUE, M.; CARMO, M. S.; CASTRUCCI, F. M. S.; PIGNATARI, A. C. C.; RIBEIRO, L. C.; BONAMIGO, R. R.; D'AZEVEDO, P. A. Sepse por *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, n. 4, p.458-460, 2009.

GELATTI, L. C.; T.; BECKER, A. P.; BONAMIGO, R. R.; D'AZEVEDO, P. A. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina: disseminação, emergente na comunidade. **An. Bras. Dermatol.** v. 84, n. 5, p. 501-506.

GETCHELL-WHITE, S. I.; DONOWITZ, L. G.; GROSCHEL, D. H. The inanimate environment of an intensive care unit as a potential source of nosocomial bacteria: evidence for long survival of *Acinetobacter calcoaceticus*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 10, p. 402-407, 1989.

GIL, V.; PAIVA, J. C.; FERREIRA, A.; VALE, J. **Química**. 12ª edição, Texto Editores, Lisboa. 2005.

GORDON, T; BOWSER, D. Beryllium: genotoxicity and carcinogenicity. **Mutation Research**, n. 533, p. 99-105, 2003.

GOULD, J. C. *Pseudomonas pyocyanea* infections in hospitals. Oxford, Editora Blackwell, p. 119-130, 1963.

GRASS G, FAN B, ROSEN BP, LEMKE K, SCHLEGEL HG, RENSING C. NreB from *Achromobacter xylosoxidans* 31A Is a nickel-induced transporter conferring nickel resistance. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 9, p. 2803-2807, 2001.

GRIFFIN, F. As. Reducing methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. **Jt. Comm. J. Qual. Patient Safety/JCAHO**, v. 33, n. 12, p. 726-731, 2007.

GUESS, W.L., ROSENBLUTH, S.A., SCHMIDT, B., AUTIAN, J. Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. **J. Pharm. Sci.**, New York, v.54, p.1545-1547, 1965.

GUNDERMANN, K. O. Untersuchungen zur Lebensdauer von Bakterienstämmen im Staub unter dem Einfluß unterschiedlicher Luftfeuchtigkeit. **Zentralblatt für Bakteriologie und Hygiene**, v. 156, p. 422-429, 1972.

GUTNICK,D. K.; BACH, H. 2000. Engineering bacterial biopolymers for the biosorption of heavy metals: new products and novel formulations. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 54, p.441–460, 2000.

HABER, L. T.; DIAMOND, G. L.; ZHAO, Q.; ERDREICH, L.; DOURSON, M. L. Hazard identification and dose-response of ingested nickel soluble salts. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 31, p. 231-241, 2000.

HAHN, H.; ARVAND, M. **Bordetellen**. In Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie 4ª Edição, Berlin, Springer; p. 320-325, 2001.

HANEY, C. J.; GRASS, G.; FRANKE, S.; RENSING, C. New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.**, v. 32, p. 215-26, 2005.

HARDY, K. J.; OPPENHEIM, B. A.; GOSSAIN, S.; GAO, F.; HAWKEY, P. M. A study of the relationship between environmental contamination with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and patients acquisition of MRSA. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 27, p.127–132, 2006.

HARRINSON, J. J.; CERI, H.; STREMICK, C. A.; TURNER, R. J. Biofilm susceptibility to metal toxicity. **Environmental Microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1220-1227, 2004.

HAUSINGER, R. P. Metallocenter assembly in nickel-containing enzymes. **J. Biol. Inorg. Chem.**, v. 2, p. 279–286, 1997.

HAUSINGER, R. P. Nickel utilization by microorganisms. **Microbiol. Rev.** 51, p. 22-42, 1987.

HAYDEN, M. K.; BLOM, D. W.; LYLE, E. A.; MOORE, C. G.; WEINSTEIN, R. A. Risk of hand or glove contamination after contact with patients colonized with vancomycin-resistant *Enterococcus* or the colonized patients environment. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 29, p. 149–154, 2008.

HELKE, D. M.; WONG, A. C. L. Survival and growth characteristics of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* on stainless steel and Buna-N rubber. **Journal of Food Protection**, v. 57, p. 963-968, 1994.

HERTEL, R. F.; MASS, T.; MÜLLER, V. R. **Nickel**. In: HERTEL, R. F. (ed), Environmental health criteria, vol. 108. World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2005.

HIRAI, Y. Survival of bacteria under dry conditions from a view-point of nosocomial infection. **Journal of Hospital Infection**, v. 19, p. 191-200, 1991.

HOTA, B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 1182-1189, 2004.

HUMMEL, R.E. **Understanding materials Science: history, properties and application**. New York, Springer Verlag, 1998.

HUSLAGE, K.; RUTALA, W. A.; GERGEN, M. F. et al. Microbioal assesement of high-medium-, and low-touch hospital room surfaces. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 18, p. 306-309, 2013.

HUSLAGE, K.; RUTALA, W. A.; SICKBERT-BENNETT, E.; WEBER, D. J. A quantitative approach to defining “high-touch” surfaces in hospitals. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 31, p. 850–853, 2010.

IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER), **IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, vol. 58, Beryllium, Cadmium, Mercury and Exposures in the Glass Manufacturing Industry, IARC, Lyon, p 41-117, 1993.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARTIZATION. ISO 10.993-5: **Biological evaluation of medical devices**. Part 5. Test for cytotoxicity: in vitro methods. Geneva: ISO, 1992. 7p.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC). **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Schistosomes, Liver Flukes and *Helicobacter pylori*, vol. 61. Lyon: IARC; 1994.

International Agency for Research on Cancer. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. In: Chromium, nickel and welding, vol. 49. Lyon: IARC, 1990.

ISLAM, M. S.; HOSSAIN, M. A.; KHAN, S. I.; KHAN, M. N.; SACK, R. B.; ALBERT, M. J.; HUQ, A.; COLWELL, R. R. Survival of *Shigella dysenteriae* type 1 on fomites. **Journal of Health, Population and Nutrition**, v. 19, p. 177-182, 2001.

ISOBE, K. The strategy for existence of microorganisms–adhesion to solid surfaces. **J. Surf. Sci. Soc. Jpn.**, v. 22, p. 652–662, 2001.

IVANNIKOV, A. T.; POPPV, B. A.; PARFENOVA, I. M. Resorption of Soluble Beryllium Compounds through the Injured Skin. **Gig. Tr. Prof. Zabol.**, v. 9, p. 50 – 52, 1982.

JAWAD, A.; SNELLING, A. M.; HERITAGE, J.; HAWKEY, P. M. Influence of relative humidity and suspending menstrua on survival of *Acinetobacter spp.* on dry surfaces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2881-2887, 1996.

JOHNSON, J. R.; RUSSO, T. A. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **Inter. J. Med. Microb.**, v. 295, p. 383-404, 2005.

JONATHAN, R.; EDWARDS, MSTAT.; KELLY, D.; PETERSON, BBA.; YI, M. U.; SHAILENDRA, B.; KATHERINE, A. B. National Healthcare Safety Network (NHSN) Report. Data summary for 2006, issued 2007. **Am. J. Infect. Cont.**, v.35, p. 290-301, 2007.

KALTWASSER, H., FRINGS, W. **Transport and metabolism of nickel in microorganisms**, p. 463-491. In J. O. Nriagu (ed.), Nickel in the environment. John Wiley & Sons, Inc., New York, 1980.

KALUARACHCHI, H.; CHUNG, K. C. C.; ZAMBLE, D. B. Microbial nickel proteins. **Nat. Prod. Rep.**, v. 27, p. 681-694, 2010.

KAMALAKANNAN, P.; VENKAPPAYYA, D. Synthesis and characterization of cobalt and nickel chelates of 5-dimethylaminomethyl-2-thiouracil and their evaluation as antimicrobial and anticancer agents. **J. Inorg. Biochem.**, v. 90, n. 1-2, p. 22-37, 2002.

KAMPF, G.; DIETZE, B.; GROSSE-SIESTRUP, C.; WENDT, C.; MARTINY, H. The microbiocidal action of a new silver-containing polymer (SPI-ARGENT II). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, p. 2440-2442, 1998.

KAPER, J. B.; NATARO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 123-140, 2004.

KASPRZAK, K. S.; SALNIKOW, K. **In Metal Ions in Life Sciences**, ed. SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O.. John Wiley & Sons, Ltd., New York, NY, vol. 2, pp. 619–660, 2007.

KASPRZAK, K. S.; SUNDERMAN JR., F. W.; SALNIKOW, K. Nickel carcinogenesis. **Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.**, v. 533, p. 67–97, 2003.

KIM, K. H.; FEKETY, R.; BATTS, D. H.; BROWN, D.; CUDMORE, M.; SILVA, J.; WATERS, D. Isolation of *Clostridium difficile* from the environment and contacts of patients with antibiotic-associated colitis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 143, p. 43-50, 1981.

KIRCHGESSNER, M.; ROTH-MAIER, D. A.; SCHNEGG, A. Contents and distribution of Fe, Cu, Zn, Ni, and Mn in fetuses amniotic fluid, placenta, and uterus of rats. **Res. Exp. Med.**, v.180, p. 247–254, 1982.

KLEVENS, R. M.; EDWARDS, J. R.; RICHARDS, C. L.; HORAN, T. C.; GAYNES, R. P.; POLLOCK, D. A.; CARDO, D. M. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. **Pub. Health. Rep.**, v. 122, p. 160-166, 2007.

KOLLEF, M. H.; AFESSA, B.; ANZUETO, A.; VEREMAKIS, C.; KERR, K. M.; MARGOLIS, B. D.; CRAVEN, D. E.; ROBERTS, P. R.; ARROLIGA, A. C.; HUBMAYR, R. D.; RESTREPO, M. I.; AUGER, W. R.; SCHINNER, R. Silver-coated endotracheal tubes and incidence of ventilator-associated pneumonia: the NASCENT randomized trial. **J.A.M.A.**, v. 300, p. 805–813, 2008.

KRAMER A, SCHWEBKE I, KAMPF G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? a systematic review. **BMC Infect. Dis.**, v. 6, n. 130, p. 1-8, 2006.

LAUTENBACH, E.; POLK, R. E. Resistant Gram-negative bacilli: a neglected healthcare crisis? **Am. J. Health-Syst. Ph.**, v. 64, p. 3-21, 2007.

LAWLEY, T. D.; CLARE, S.; DEAKIN, L. J.; et al. Use of purified *Clostridium difficile* spores to facilitate evaluation of health care disinfection regimens. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.76, p. 6895–6900, 2010.

LEACH JR, C. N.; LINDEN, J. V.; HOPFER, S. M.; CRISOSTOMO, M. C.; SUNDERMAN JR, F. W. Nickel concentrations in serum of patients with acute myocardial infarction or unstable angina pectoris. **Clin. Chem.**, v. 31, p. 556–560, 1985.

LEWIS, G. J.; FANG, X.; GOOCH, M.; COOK, P. P. Decreased resistance of *Pseudomonas aeruginosa* with restriction of ciprofloxacin in a large teaching hospital's intensive care and intermediate care units. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. ;33, p. 368-373, 2012.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 5, p. 48-56, 2007.

LIESEGANG, H.; LEMKE, K.; SIDDIQUI, R. A.; SCHLEGEL, H. G. Characterization of the inducible nickel and cobalt resistance determinant *cnr* from pMOL28 of *Alcaligenes eutrophus* CH34. **J. Bacteriol.** v .175, n. 3, p. 767-778, 1993.

LIMA, M. E.; ANDRADE, D.; HAAS, V .J. Avaliação prospectiva da ocorrência de infecção em pacientes críticos de Unidade de Terapia Intensiva. **Rev. Bras. Ter. Intensiva.** v. 19, n. 3, p. 342-347, 2007.

LINA, G.; BOUTITE, F.; TRISTAN, A.; BES, M.; ETIENNE, J.; VANDENESCH, F. Bacterial competition for human nasal cavity colonization: role of staphylococcal agr alleles. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, p. 18–23, 2003.

LIPSKY, B. A.; TABAK, Y. P.; JOHANNES, R. S.; VO, L.; HYDE, L.; WEIGELT, J. A. Skin and soft tissue infections in hospitalised patients with diabetes: culture isolates and risk factors associated with mortality, length of stay and cost. **Diabetologia**, v. 53, p. 914-923, 2010.

LU, Q.; EGGIMANN, P.; LUYT, C. E.; WOLFF, M.; TAMM, M. et al. *Pseudomonas aeruginosa* serotypes in nosocomial pneumonia: prevalence and clinical outcomes. **Critical care**, v. 18, R17, p. 1-9, 2014.

MACHADO, A.; FERRAZ, A.A.B.; FERRAZ, E.; ARRUDA, E.; NOBRE, J.; KONKEWICZ LR.; PIMENTEL, M.L.; LEÃO, M.T.C.; TRABASSO, P.; GRIMBAUM, R. ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA (AMB); CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA (CFM). Projeto Diretrizes. Prevenção da Infecção Hospitalar. São Paulo: AMB/CFM; 2001. Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/065.pdf. Acesso em: 2 jan 2014.

MACOMBER, L.; HAUSINGER, R. Mechanisms of nickel toxicity in microorganisms. **Metallomics**, v. 3, p. 1153-1162, 2011.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M, Dunlap PV, Clark DP. **Biology of microorganisms**. 12th ed. New York: Pearson Benjamin Cummings, pp. 1061, 2009.

MAKI, D. G.; ALVARADO, C. J.; HASSEMER, C. A.; ZILZ, M. A. Relation of the inanimate hospital environment to endemic nosocomial infection. **N. Engl. J. Med.**, v. 307, p. 1562–1566, 1982.

MANGRAM, A. J.; HORAN, T. C.; PEARSON, M. L.; SILVER, L. C.; JARVIS, W. R. Guidelines for prevention of surgical site infection. **Am. J. Infect. Cont.**, v. 27, p. 97–134, 1999.

MANIAN, F.; MEYER, L. Adjunctive use of monthly physician questionnaires for surveillance of surgical site infections after hospital discharge and in ambulatory surgical patients: Report of a seven year experience. **Am. J. Infect. Cont.**, v. 25, p. 390-294, 1997.

MARONEY, M. J. Structure function relationships in nickel metallo-biochemistry. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 3, p. 188-199, 1999.

MARTINEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; SILVA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **Int. Microbiol.**, v.7, n.4, p.261-8, 2004.

MARTINS, M. E.; FRANÇA, E.; MATOS, J. C.; GOULART, E. M. A. Vigilância pós-alta das infecções de sítio cirúrgico em crianças e adolescentes em um hospital universitário de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, v. 24, n. 5, p. 1033-1041, 2008.

MAULE, A. Survival of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in soil, water and on surfaces. Symposium Series (**Society for Applied Microbiology**), v. 29, p. 71S-78S, 2000.

MAWALLA, B.; MSHANA, S. E.; CHALYA, P. L.; IMIRZALIOGLU, C.; MAHALU, H.; FREI, R.; WIDMER, A. Risk factors for surgical site infections among patients undergoing major surgery at Bugando Medical Centre in Northwestern Tanzania. **BMC Surg.**, v. 11, p. 21, 2011.

MAYER, R. A.; GEHA, R. C.; HELFAND, M. S.; HOYEN, C. K.; SALATA, R. A.; DONSKEY, C. J. Role of fecal incontinence in contamination of the environment with vancomycin-resistant enterococci. **Am. J. Infect. Control.**, v. 31, p. 221–225, 2003.

McCRAIG, L. F.; MCDONALD, L. C.; MANDAL, S.; JERNIGAN, D. B. *Staphylococcus aureus* associated skin and soft tissue infections in ambulatory care. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 12, p. 1715-1723, 2006.

MCDONNELL, G.; RUSSELL, A. D. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 147–179, 1999.

MCFARLAND, L. V.; STAMM, W. E. Review of *Clostridium difficile*-associated diseases. **American Journal of Infection Control**, v. 14, p. 99-109, 1986.

McFEE, R. B. Nosocomial or Hospital-acquired Infections: An Overview. **Dis. Mon.**, v. 55, n. 7, p. 442-438, 2009.

MEAD, P. S.; SLUTSKER, L.; DIETZ, V.; MCCAIG, L. F.; BRESEE, J. S.; SHAPIRO, C.; GRIFFIN, P. M.; TAUXE, R. V. Food-related illness and death in the United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 607-25, 1999.

MEHTAR, S.; WILD, I.; TODOROV, S. D. The antimicrobial activity of copper and copper against nosocomial pathogens and *Mycobacterium tuberculosis* isolates from healthcare facilities in the Western Cape: an in-vitro study. **J. Hosp. Infect.**, v. 68, p. 41-45.

MENEZES, E. A.; SÁ, K. M.; CUNHA, F. A.; ANGELO, M. R. F.; OLIVEIRA, I. R. N.; SALVIANO, M. N. C. Frequency and susceptibility percentile of bacteria isolated in patients assisted in the Intensive Care Unit of General Hospital of Fortaleza. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 3, p. 149-155, 2007.

MERIAN, E. Introduction on environmental chemistry and global cycles of chromium, nickel, cobalt, beryllium, arsenic, cadmium, and selenium, and their derivatives. **Toxicol. Environ. Chem.**, v. 8, p. 9-38, 1984.

MICHELS, H. T.; MORAN, W.; MICHEL, J. Antimicrobial properties of copper alloy surfaces, with a focus on hospital-acquired infections. **Advanced Materials & Processes**, p. 1-12, 2009.

MIELKE, M.; HAHN, H. **Anthropozoonoseerreger ohne Familienzugehörigkeit: Listerien, Brucellen, Francisellen und Erysipelothrix.** In Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie 4^a edição, Springer; p. 330-340, 2001.

MILLAR, M.; COAST, J.; ASHCROFT, R. Are methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bloodstream infection targets fair to those with other types of healthcare-associated infection or cost-effective? *J. Hosp. Infect.*, v. 69, p. 1-5, 2008.

MITSCHERLICH, E.; MARTH, E. H. **Microbial survival in the environment.** Berlin, Springer; 1984.

MÔNICA DE FÁTIMA OLIVEIRA. **Efeito Da Exposição Crônica Ao Níquel Nos testículos De Ratos Wistar Adultos.** Dissertação de Mestrado. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, para obtenção do título de Magister Scientiae. VIÇOSA MINAS GERAIS – BRASIL 2010

MORAN, G. J.; AMII, R. N.; ABRAHAMIAN, F. M.; TALAN, D. A. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in community-acquired skin infections. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 11, p. 928-930, 2005.

MORGAN, D. J.; ROGAWSKI, E.; THOM, K. A., et al. Transfer of multidrug-resistant bacteria to healthcare workers' gloves and gowns after patient contact increases with environmental contamination. **Crit. Care Med.**, v. 40, p. 1045-1051, 2012.

MORGAREIDGE, K.; COX, G.E.; BAILEY, D.E. Chronic Feeding Studies with Beryllium Sulfate in Rats: Evaluation of Carcinogenic Potential. **Final Report to the Aluminum Company of America. Food and Drug Research Laboratories, Inc.,** Pittsburgh, PA, 1975.

MOURA, J. P.; GIR, E.; ROSA, J. O.; BELÍSSIMO-RODRIGUES, F.; CRUZ, E. D. A.; OLIVEIRA, A. C. A.; PIMENTA, F. C. Resistência à mupirocina entre isolados de *Staphylococcus aureus* de profissionais de enfermagem. **Acta Paul. Enferm.**, v. 23, n. 3, p. 399-403, 2010.

MOURA, M. E.; CAMPELO, S. M.; BRITO, F. C.; BATISTA, O. M. A.; ARAUJO, T. M. E.; OLIVEIRA, A. D. S.; Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 60, n. 4, p. 416-421, 2007.

MULROONEY, S. B.; HAUSINGER, R. P. Nickel uptake and utilization by microorganisms. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, p. 239-261, 2003.

MUSA, E. K.; DESAI, N.; CASEWELL, M. W. The survival of *Acinetobacter calcoaceticus* inoculated on fingertips and on formica. **Journal of Hospital Infection**, v. 15, p. 219-227, 1990.

NAIK, A. D.; ANNIGERI, S. M.; GANGADHARMATH, U. B.; REVANKAR, V. K.; MAHALE, V. B.. The stereochemical diversity of a new snons binucleating ligand towards 3d metal ions. spectrochim. **Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 58, n. 8, p. 1713–1719, 2002.

NASS W. Zur Überlebensdauer von Shigellen auf Plastikwerk-stoffen. **Zeitschrift für die gesamte Hygiene**, v. 23, p. 395-397, 1977.

NDIP, R. N.; DILONGA, H. M.; NDIP, L. M.; AKOACHERE, J. F. K.; NKUO-AKENJI, T. *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from clinical and environmental samples in Buea, Cameroon: current status on biotyping and antibiogram. **Trop. Med. Int. Health**, v. 10, p. 74-81, 2005.

NEELY, A. N.; MALEY, M. P. Survival of enterococci and staphylococci on hospital fabric and plastic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, p. 724-726, 2000.

NIELSEN, F. H. Nutritional requirements for boron, silicon, vanadium, nickel, and arsenic: current knowledge and speculation. **FASEB J.**, v. 5, p. 2661-2667, 1991.

NIELSON, F. H. Nickel. In: MERTZ, W. **Trace elements in human and animal nutrition**, vol. 1, 5 ed. San Diego: Academic Press, p.245–273, 1987.

NIELSON, F. H.; MYRON, D. R.; GIVAND, S. H.; ZIMMERMANN, T. J.; OLLERICH, D. A. Nickel deficiency in rats. **J. Nutr.**, v. 105, p. 1620–1630, 1975.

NIELSON, F. H.; SHULER, T. R.; MCLEOD, T. G.; ZIMMERMANN, T. J. Nickel influences iron metabolism through physiologic, pharmacologic, and toxicologic mechanisms in the rat. **J. Nutr.**, v. 114, p. 1280–1288, 1984.

NIEMINEN, T. M.; UKONMAANAHO, L.; RAUSCH, N.; SHOTYK. **In Metal Ions in Life Sciences**, ed. SIGEL, A.; SIGEL, H.; SIGEL, R. K. O., John Wiley & Sons, Ltd., New York, NY, vol. 2, pp. 1–30, 2007.

NIES, D. H. Microbial heavy metal resistance. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 51, p. 730–750, 1999.

NIES, D.H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 27, n.2-3, p. 313-339, 2003.

NORSETH, T.; PISCATOR, M. Nickel. In: FRIBERG, L.; NORDBERG, G. F.; VOUG, V. B. **Handbook on the toxicology of metals**. Amsterdam: Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1979.

NOSKIN, G. A.; STOSOR, V.; COOPER, I.; PETERSON, L. R. Recovery of vancomycin-resistant enterococci on fingertips and environmental surfaces. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 16, p. 577-581, 1995.

NOVAK, K. D.; KOWALSKI, R. P.; KARENCHAK, L. M.; GORDON, Y. J. *Chlamydia trachomatis* can be transmitted by a nonporous plastic surface in vitro. **Cornea**, v. 14, p. 523-526, 1995.

NOYCE, J. O.; MICHELS, H.; KEEVIL, C. W. Potential use of copper surfaces to reduce survival of epidemic meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the healthcare environment. **J. Hosp. Infect.**, v. 63, p. 289-297, 2006.

NOYCE, J. O.; MICHELS, H.; KEEVIL, C. W. Use of copper cast alloys to control *Escherichia coli* O157 cross-contamination during food processing. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 72, p. 4239-4244, 2006.

O'GRADY, N. P.; ALEXANDER, M.; BURNS, L. A. et al. Guidelines for the prevention of intravascular catheter-related infections. **MMWR Recomm. Rep.** v. 51, p. 1–26, 2002.

OBRITSCH, M. D.; FISH, D. N.; MACLAREN, R.; JUNG, R. National surveillance of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from intensive care unit patients from 1993 to 2002. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, p. 4606-4610, 2004.

ODERMATT, A.; SUTER, H.; KRAPP, R.; SOLIOZ, M. Primary structure of two P-types ATPase involved in copper homeostasis in *Enterococcus hirae*. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 12775-12779, 1993.

OIE, S.; HOSOKAWA, I.; KAMIYA, A. Contamination of room door handles by methicilin-sensitive/ methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. I. **Hosp. Infect.**, v. 51, p. 140-143, 2002.

OKUBO, N.; NAKAMURA, S.; HASEGAWA, M.; YAMAMOTO, M.; MIYAKUSU, K. Antimicrobial activity and basic properties of antimicrobial stainless steels. **NSSAM Series Nisshin Steele Rep.**, v.77, p.69–81, 1998.

OLIVEIRA, A. C.; BETTCHER, L. Aspectos epidemiológicos da ocorrência do *Enterococcus* resistente à vancomicina. **Rev. Esc. Enferm. USP**, v. 44, n. 3, p. 161-165, 2010.

OTTER, J. A.; YEZLI, S.; SALKELD, J. A. G.; FRENCH, G. L. Evidence that contaminated surface contribute to the transmission of hospital pathogens and an overview of strategies to address contaminated surfaces in hospital settings. **Am. J. Infect. Control.**, v. 41, sup. 4, p. S6-S11, 2013.

OTTER, J.A.; YEZLI, S.; FRENCH, G. L. The role played by contaminated surfaces in transmission of nosocomial pathogens. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 32, n. 7, p. 687-699, 2011.

OTTO, M. *Staphylococcus epidermidis* — the ‘accidental’ pathogen. **Nature**. v. 7, p. 555-567, 2009.

OUTTEN, C. E.; O’HALLORAN, T. V. Femtomolar Sensitivity of Metalloregulatory Proteins Controlling Zinc Homeostasis. **Science**, v. 292, p. 2488–2492, 2001.

PANAGEA, S.; WINSTANLEY, C.; WALSHAW, M. J.; LEDSON, M. J.; HART, C. A. Environmental contamination with an epidemic strain of *Pseudomonas aeruginosa* in a Liverpool cystic fibrosis centre, and study of its survival on dry surfaces. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, p. 102-107, 2005.

PARK, J.E., SCHLEGEL, H.G., RHIE, H.G. AND LEE, H.S., 2004. Nucleotide sequence and expression of the ncr nickel and cobalt resistance in *Hafnia alvei* 5-5. **Internat. Microbiol.**, v. 7, p. 27 –34, 2004.

PASCALICCHIO, A. A. E. Contaminação por metais pesados. São Paulo: Annablume. 134p., 2002.

PATEL, R. N.; N. SINGH. SHUKLA, K. K.; CHAUHAN, U. K.; CHAKRABORTY, S.; NICKOL-GUTIERREZ, J.; CASTINEIRAS, A. X-ray, spectral and biological (antimicrobial and superoxide dismutase) studies of oxalato bridged Cu II-Ni II and Cu II-Zn II complexes with pentamethyldiethylenetriamine as a capping ligand. **J. Inorg. Biochem.**, v. 98, n. 2, p.231– 237, 2004.

PAUL, J. **Cell and tissue culture**. 5.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1975. 484p.

PAULA, D. M. **Precauções de contato: conhecimento e comportamento dos profissionais de um centro de terapia intensiva em um hospital geral de Belo Horizonte**. [Dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Enfermagem, da Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

PEIXOTO, E. M. A. Berílio. **Rev. Elemento Químico**, n. 03, p. 31-35, 1996.

PELCZAR, J. R.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. Microbiology: Concepts and Applications. McGraw-Hill Inc., New York, p. 591-603, 1993.

PEREZ-PEREZ, G. I.; OLIVARES, A. Z.; COVER, T. L.; BLASER, M. J. Characteristics of *Helicobacter pylori* variants selected for urease deficiency. **Infect. Immunol.**, v. 60, p. 3658–3663, 1992.

PÉREZ, J. L.; GÓMEZ, E.; SAUCA, G. Survival of gonococci from urethral discharge on fomites. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 1, p; 54-55, 1990.

PIER, G. B.; RAMPHAL, R. *Pseudomonas aeruginosa*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. **Principles and practice of infectious diseases**. Philadelphia, PA: Elsevier Churchill Livingstone; 2005. p. 2587-615.

PITOUT, J. D. D.; CHURCH, D. L.; GREGSON, D. B.; CHOW, B. L.; MCCracken, M.; MULVEY, M.; LAUPLAND, K. B. Molecular epidemiology of CTXM-producing *Escherichia coli* in the Calgary Health Region: emergence of CTX-M-15-producing isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 1281-1286, 2007.

PITOUT, J. D. D.; NORDMAN, P.; LAUPLAND, K. B.; POIREL, L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 56, p. 52-59, 2005.

PLOWMAN, R.; GRAVES, N.; GRIFFIN, M. A.; ROBERTS, J. A.; SWAN, A. V.; COOKSON, B.; TAYLOR, L. The rate and cost of hospital acquired infections

occurring in patients admitted to selected specialties of a district general hospital in England and the national burden imposed. **J. Hosp. Infect.**, v. 47, p. 198-209, 2001.

PODSCHUM, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin. Microbiol. Rev.**, n.11, p. 589-603, 1998.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. Microbiology. 6 th ed. McGraw-Hill, New York, p. 833-842, 2005.

RAGSDALE, S. W. Nickel biochemistry. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 2, p. 208–215, 1998.

RANA, S. V. S. **Environmental pollutions: health and toxicology**. Alpha Science. International, 269 p., 2006.

RAO, N. S.; REDDY, M. G. Studies on the synthesis, characterization and antimicrobial activity of new co(II), ni(II) and Zn(II) complexes of schiff base derived from ninhydrin and glycine. **Biol. Met.**, v. 3, n. 1, p. 19–23, 1990.

RAZERA, F.; STEFANI, S.; BONAMIGO, R. R.; OLM, G. S.; DIAS, C. A. G.; NARVAEZ, G. A. CA-MRSA em furunculose: relato de caso do sul do Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, v. 84, n. 5, p. 515-518, 2009.

REEVES, A.L.: The Absorption of Beryllium from the Gastrointestinal Tract. **Arch. Environ. Health.**, v. 11, p. 209 – 214, 1965.

RHOMBERG, P. R.; FRITSCH, T. R.; SADER, H. S.; JONES, R. N. Antimicrobial susceptibility pattern comparisons among intensive care unit and general ward gram-negative isolates from meropenem yearly susceptibility test information collection program (USA). **Diagno. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 56, p. 57-62, 2006.

ROBERTSON, M. H. Survival of *S. typhimurium* in floor dust: a possible reservoir of infection in institutions. **Public Health**, v. 97, p. 39-45, 1972.

RODRIGUE, A.; EFFANTIN, G.; MANDRAND-BERTHELOT, M. A. Identification of *rcnA* (*yohM*), a nickel and cobalt resistance gene in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 8, p. 2912-2916, 2005.

RODRIGUEZ-NORIEGA, E.; SEAS, C. The changing pattern of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clones in Latin America: implications for clinical practice in the region. **Braz. J. Infec. Dis.**, vol.14, suppl.2, p. 87-96, 2010.

ROGERS, K. L.; FEY, P. D.; RUPP, M. E. Coagulase-negative staphylococcal infections. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 23, p. 73–98, 2009.

ROHR, U.; KAMINSKI, A.; WILHELM, M.; JURZIK, L.; GATERMANN, S.; MUHR, G. Colonization of patients and contamination of the patients' environment by MRSA under conditions of single-room isolation. **Int. J. Hyg. Environ. Health.**, v. 212, p. 209-215, 2009.

ROSENTHAL, M. B. Nonpayment for performance? Medicare's new reimbursement rule. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, p. 1573-1575, 2007.

ROSENTHAL, V. D.; MAKI, D. G.; SALOMAO, R.; MORENO, C. A.; MEHTA, Y.; HIGUERA, F.; CUELLAR, L. E.; ARIKAN, O. A.; ABOUQAL, R.; LEBLEBICIOGLU, H. Consortium International Nosocomial Infection Control: device-associated nosocomial infections in 55 intensive care units of 8 developing countries. **Ann. Intern. Med.**, v. 145, n. 8, p. 582-591, 2009.

ROSSMAN, M.; JONES-WILLIAMS, W. **Immunopathogenesis of Chronic Beryllium Disease**. In: Beryllium: Biomedical and Environmental Aspects, M. ROSSMAN; O. PREUSS; M. Powers, Eds., pp. 121–132. Williams & Wilkins, Baltimore, 1991.

RUSSO, T. A.; JOHNSON, J. R. A proposal for an inclusive designation for extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* : ExPEC. **J. Infect. Dis.**, v. 181, p. 1753-1754, 2000.

RUTALA, W. A.; WEBER, D. J. **Cleaning, desinfecion and sterelization**. In Carrico, R. **APIC text of infection control and epidemiology**. 3ª Ed., Washington D.C: Association for professioals in infection Control And Epidemiology, p. 21-31, 2009.

SALES, L. M.; SILVA, T. M. *Staphylococcus aureus* meticilina resistente: um desafio para a saúde pública. **Acta Biomedica Brasiliensia**, v. 3, n. 1, p. 1-13, 2012.

SANDS, K.; VINEYARD, G.; PLATT, R. Surgical site infections occurring after hospital discharge. **J. Infect. Dis.**, v. 173, p. 963-970, 1996.

SANTOS, A.; SANTOS, D. O.; FREITAS, C. C.; FERREIRA, B. L. A.; AFONSO, I.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

SAR, P.; KAZY, S. K.; SINGH, S. P. Intracellular nickel accumulation by *Pseudomonas aeruginosa* and its chemical nature. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 32, p. 257–261, 2001.

SCHEIDER-LINDER, V.; DELANEY, J. A.; DIAL, S.; DASCAL, A. Antimicrobial drugs and community-acquired resistant *Staphylococcus aureus*, United Kingdom. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 13, p. 994–999, 2007.

SCHIERHOLZ, J. M.; LUCASI, L. I.; RUMP, A.; PUVERER, G. Efficacy of silver-coated medical devices. **J. Hosp. Infect.**, v. 40, p. 257–262, 1998.

SCHMIDT, T.; SCHLEGEL, H. G. Combined nickel-cobalt-cadmium resistance encoded by the ncc locus of *Alcaligenes xylosoxidans* 31A. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 22, p. 7045–7054, 1994.

SCHNEGG, A.; KIRCHGESSNER, M. The essentiality of nickel for animal growth. **Z Tierphysiol Tierernahr Futtermittelkd**, v. 36, p. 63–74, 1975.

SCHROEDER, H.; MITCHENER, M.: Life-Term Effects of Mercury, Methylmercury, and Nine Other Trace Metals on Mice. **J. Nutr.**, v. 105, p. 452–458, 1975.

SCHROEDER, H.A.; MITCHENER, M.: Life-Term Studies in Rats: Effects of Aluminum, Barium, Beryllium, and Tungsten. **J. Nutr.**, v. 105, p. 421–427, 1975.

SCOTT, E.; BLOOMFIELD, S. F. The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands and utensils. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 68, p. 271–278, 1990.

SEGAL, E. D.; SHON, J.; TOMPKINS, L. S. Characterization of *Helicobacter pylori* urease mutants. **Infect. Immunol.**, v. 60, p. 1883–1889, 1992.

SEHULSTER, L.; CHINN, R. Y. Guidelines for environmental infection control in health-care facilities: recommendations of CDC and the Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). **MMWR Recomm. Rep.**, v. 52.p; 1–42, 2003.

SEXTON, T.; CLARKE, P.; O'NEILL, E.; DILLANE, T.; HUMPHREYS, H. Environmental reservoirs of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in isolation rooms: correlation with patient isolates and implications for hospital hygiene. **J. Hosp. Infect.**, v. 62, p. 187–194, 2006.

SHIVANKAR, V. S.; TAKKAR, N. V. Synthesis, characterization and antimicrobial activity of some mixed ligand co(II) and ni(II) complexes. **Acta Pol. Pharm.**, v. 60, n. 1, p. 45-50, 2003.

SILVA, A. C. F.; HOMEM, P. M. **Ligas metálicas – investigação e conservação**. 1 ed., Universidade do Porto, 2008, 137p.

SILVA, C. S. Níquel. *Balanço Mineral Brasileiro*, p. 1-18, 2001.

SINGH, N.; SHUKLA, K. K.; PATEL, R. N.; CHAUHAN, U. K.; SHIRIVASTAVA, R. E.s.r., magnetic, optical and biological (sodand antimicrobial) studies of imidazolate bridged cu(II)-Zn(II) and cu(II)-ni(II) complexes with tris(2-amino ethyl)amine as capping ligand: a plausible model for superoxide dismutase. spectrochim. **Acta A. Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 59, n.13, p. 3111–3122, 2003.

SMITH, C. R. Survival of tubercle bacilli: the viability of dried tubercle bacilli in unfiltered roomlight, in the dark, and in the refrigerator. **American Review of Tuberculosis**, v. 5, p. 334-345, 1942.

SMITH, C. S. **A search for structure**. Cambridge, Massachsetts, MIT PRes, 1981.

SMYTH, E. T.; MCILVENNY, G.; ENSTONE, J. E.; EMMERSON A. M.; HUMPHREYS, H.; FITZPATRICK, F.; DAVIES, E.; NEWCOMBE, R. G.; SPENCE, R.C. Four country healthcare associated infection prevalence survey 2006: overview of the results. **J. Hosp. Infect.**, v. 69, p. 230-248, 2008.

SOUZA, C. M.; MOURA, M. E.; SANTOS. A. M.; NUNES, B. M. V. T.; ALVES, M. S. C. F. Responsabilidade civil dos profissionais de enfermagem nos procedimentos invasivos. **Rev. Bras. Enferm.**, v. 62, n. 5, p. 717-722, 2009.

SPEARS, J. W.; HARVEY, R. W.; SAMSELL, L. J. Effects of dietary nickel and protein on growth, nitrogen metabolism and tissue concentrations of nickel, iron, zinc, manganese, and copper in calves. **J. Nutr.**, v. 116, p.1873–82, 1986.

STÄHLER, F. N.; ODENBREIT, S.; HAAS, R.; WILRICH, J.; VAN-VLIET, A. H.; KUSTERS, J. G.; KIST, M.; BERESWILL, S. The novel *Helicobacter pylori* CznABC metal efflux pump is required for cadmium, zinc, and nickel resistance, urease modulation, and gastric colonization. **Infect. Immun.**, v. 74, n. 7, p. 3845-3852, 2006.

STANGL, G. I.; KIRCHGESSNER, M. Nickel deficiency alters liver lipid metabolism in rats. **J. Nutr.**, v. 126, p. 2466–2473, 1996.

STIEFEL, U.; CADNUM, J. L.; ECKSTEIN, B. C. et al. Contamination of hands with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* after contact with environmental surfaces and after contact with the skin of colonized patients. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 32, p. 185-187, 2011.

SUNDERMAN JR, F. W.; OSKARSSON, A. **Nickel**. In: MERIAN, E, editor. Metals and their compounds in the environment. Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, p. 1101–1126, 1991.

TEITZEL, G. M.; GEDDIE, A.; De LONG, S. K.; KIRISITS, M. J.; WHITELEY, M.; PARSEK, M. R. Survival and Growth in the presence of elevated copper: transcriptional profiling of copper-stressed *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 20, p. 7242-7256, 2006.

THIRUMALAIKUMAR, M.; SIVAKOLUNTHU, S.; MUTHUSUB-RAMANIAN, S.; MOHAN, P.; SIVASUBRAMANIAN, S. Synthesis, characterization and antimicrobial studies of metal (II) bischelates and mixed-ligand complexes of alpha-(2-hydroxyphenyl)-n-(1-phenyl-2-nitroethyl) nitron. **Boll. Chim. Farm.**, v. 138, n. 5, p. 207–210, 1999.

TIAN, Y. Behaviour of bacterial extracellular polymeric substances from activated sludge: a review. **Int. J. Environ. Pollut.**, v. 32, p. 78–89, 2008.

TOKARS, J. I.; RICHARDS, C.; ANDRUS, M. et al. The changing face of surveillance for health care associated infections. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, p. 1347-52, 2004.

TRIANDAFILLU, K.; BALAZS, D. J.; ARONSSON, B. O. et al. Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* strains to untreated and oxygen-plasma treated poly vinyl chloride (PVC) from endotracheal intubation devices. **Biomaterials**, v. 24, p. 1507-1518, 2003.

TRIPATHI, V. N.; SRIVASTAVA, S. Extracytoplasmic storage as the nickel resistance mechanism in a natural isolate of *Pseudomonas putida* S4. **Can. J. Microbiol.**, v. 52, p. 287–292, 2006.

TSAI, S. S.; HUANG, J. C.; CHEN, S. T.; SUN, J. H.; WNAG, C. C.; LIN, S. F.; HSU, B. R.; LIN, J. D.; HUANG, S. Y.; HUANG, Y. Y. Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in community-acquired and nosocomial infections in diabetic patients. *Chang Gung Med J.*, v. 33, n. 5, p. 532-539, 2010.

TSO, W. W.; ADLER, J. J., Negative chemotaxis in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 118, p. 560-576, 1974.

U.S. Environmental Protection Agency: Integrated Risk Information Service (IRIS) for Beryllium. EPA, Washington, D.C. 2000.

U.S. EPA of Emergency and Remedial Response: Risk Assessment Guidance for Superfund Volume 1: Human Health Evaluation Manual. Supplemental Guidance: Dermal Risk Assessment. Interim Guidance. EPA, Washington, D.C., 1998.

UNITED States Pharmacopeia. 22.ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention, 1990. p.1495-1497.

VAN HEERDEN, J.; TURNER, M.; HOFFMANN, D.; MOOLMAN, J. Antimicrobial coating agents: can biofilm formation on a breast implant be prevented? **J. Plastic Reconstruct. Aesthet. Surg.**, v. 62, p. 610–617, 2009.

VANDENBERGH, M. F.; VERWEIJ, P.E.; VOSS, A. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 34, p. 221–227, 1999.

VIDELA, H. A. Prevention and control of biocorrosion. **Int. Biodeterior. Biodegr.**, 49:259–270, 2002.

VILLEGAS, M.V.; HARTSTEIN, A.I. *Acinetobacter* outbreaks. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 23, p. 284-295, 2003.

VITALE-BROVARONE, C.; MIOLA, M.; BALAGNA, C.; VERNE, E. 3D-glass-ceramic scaffolds with antibacterial properties for bone grafting. **Chem. Eng. J.**, v. 137, p.129–136, 2008.

WAGENLEHNER, E.; LOIBL, E.; VOGEL, H.; NABER, K. G.; Incidence of nosocomial urinary tract infections on a surgical intensive care unit implications for management. **Int. J. Antimicro. Agents**, v. 28, n. 1, p. 86-90, 2006.

WAGENVOORT, J. H. T.; PENDERS, R. J. R. Long-term in-vitro survival of an epidemic MRSA phage-group III-29 strain. **Journal of Hospital Infection**, v. 35, p. 322-325, 1997.

WAGENVOORT, J. H.; SLUIJSMAN, W.; PENDERS R.J. Better environmental survival of outbreak vs. sporadic MRSA isolates. **Journal of Hospital Infection**, v. 45, p. 231-234, 2000.

WARD, E.; OKUN, A.; RUDER, A.; FINGERHUT, M.; STEENLAND, K. A mortality study of workers at seven beryllium processing plants. **Am. J. Ind. Med.**, v. 22, p. 885–904, 1992.

WATT, R. K.; LUDDEN, P. W. Nickel-binding proteins. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 56, p. 604–625, 1999.

WEAVER, L.; MICHELS, H. T.; KEEVIL, C. W. Survival of *Clostridium difficile* on copper and steel: futuristic options for hospital hygienic. **J. Hosp. Infect.**, v. 68, p. 145–151.

WEBER, D. J.; RULATA, W. A. Role of environmental contamination in the transmission of vancomycin-resistant enterococci. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 18, p. 306 – 309, 2007.

WEBER, D. J.; RUTALA, W. A.; MILLER, M. B. et al. Role of hospital surface in the transmission of emerging healthcare-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. **Am. J. Infect. Control.**, v. 38, p. S25–S33, 2010.

WEBER, D. J.; RUTALA, W. A.; MILLER, M. B.; HUSLAGE, K.; SICKBERT-BENNETT, E. Role of hospital surfaces in the transmission of emerging health care-associated pathogens: norovirus, *Clostridium difficile*, and *Acinetobacter* species. **Am. J. Infect. Control.**, v. 38, p. 25–33, 2010.

WEBER, D.O.; GOOCH, J.J.; WOOD, W.R.; BRITT, E.M.; KRAFT, R.O. Influence of operating room surface contamination on surgical wounds: a prospective study. **Arch. Surg.**, v. 111, p. 484–488, 1976.

WEBSTER, C.; TOWNER, K. J.; HUMPHREYS, H. Survival of *Acinetobacter* on three clinically related inanimate surfaces. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 21, p. 246, 2000.

WENDT, C.; DIETZE, B.; DIETZ, E.; RÜDEN, H. Survival of *Acinetobacter baumannii* on dry surfaces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, 1394–1397, 1997.

WENDT, C.; WIESENTHAL, B.; DIETZ, E.; RÜDEN, H. Survival of vancomycin-resistant and vancomycin-susceptible enterococci on dry surfaces. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, p. 3734–3736, 1998.

WENZEL, R. P. Health care-associated infections: major issues in the early years of 21st century. **Clin. Infect. Dis.**, v. 45, s. 1, p. s85–s88, 2007.

WHO, World Health Organization. **Nickel in Drinking Water**. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 22 p., 2005.

WILKS, S. A.; MICHELS, H.; KEEVIL, C. W. The survival of *Escherichia coli* O157 on a range of metal surfaces. **International Journal of Food Microbiology**, v. 105, p. 445-454, 2005.

WILLIAMS, A. P.; AVERY, L. M.; KILLHAM, K.; JONES, D. L. Persistence of *Escherichia coli* O157 on farm surfaces under different environmental conditions. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p.1075-1083, 2005.

WILLIAMS, R.E.O.; BLOWERS, B.; GERROD, L.P.; SHOOTER, R.A. **Hospital infections**: causes and preventions. 2 ed, London: Lloyd-Luke, 1966.

World Association for Patient Safety. Safe surgery prevents infection. **Lancet Infect Dis.**, v. 9, n. 4, p. 203, 2009.

WU, H. M.; FORNEK, M.; SCHWAB, K. J.; CHAPIN, A. R.; GIBSON, K.; SCHWAB, E.; SPENCER, C.; HENNING, K. A norovirus outbreak at a long-term-care facility: the role of environmental surface contamination. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 26, p. 802–810, 2005.

YASUYUKI, M.; KUNIHIRO, K.; KURISSERY, S.; KANAVILLIL, N.; SATO, Y.; KIKUCHI, Y. Antimicrobial properties of nine pure metals: a laboratory study using a *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Biofouling**, v. 26, n. 7, p. 851-858, 2010.

YETKIN, G.; OTLU, B.; CICEK, A.; KUZUCU, C.; DURMAZ, R. Clinical, microbiologic, and epidemiologic characteristics of *Pseudomonas aeruginosa* infections in a University Hospital, Malatya, Turkey. **Association for Professionals in Infection Control and Epidemiology**, v. 34, n. 4, p. 188-192, 2006.

YOKOTA, T.; TOCHIHARA, M.; KOBAYASHI, M. Antibacterial ferrite stainless steel containing stainless silver. **Kawasaki Steele Rep.**, v. 30, p.53–54, 1998.

YUSUF, M.; FARIDUDDIN, Q.; HAYAT, S.; AHMAD, A. Nickel: An Overview of Uptake, Essentiality and Toxicity in Plants. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 86, p. 1-17, 2011.

ZEREY, M.; PATON, B. L.; LINCOURT, A. E. et al. The burden of *Clostridium difficile* in surgical patients in the United States. **Surg. Infect. (Larchmt)**, v. 8, n. 6, p. 557-566, 2007.

ZHANEL, G. G.; DECORBY, M.; LAING, N.; WESHNOWESKI, B.; VASHISHT, R.; TAILOR, F.; NICHOL, K. A.; WIERZBOWSKI, A.; BAUDRY, P. J.; KARLOWSKY, J. A.; LAGACE-WIENS, P.; WALKTY, A.; MCCracken, M.; MULVEY, M. R.; JOHNSON, J.; HOBAN, D. J. Antimicrobial-resistant pathogens in intensive care units in Canada: results of the Canadian National Intensive Care Unit (CAN-ICU) study, 2005-2006. **Antimicrobiol. Agents Chemother.** v. 52, p. 1430-1437, 2008.

ZIMRING, C.; JACOB, J. T.; DENHAM, M. E.; KAMEROW, D. B.; HALL, K. K.; COWAN, D. Z.; STEINBERG J. P. The role of facility design in preventing the transmission of healthcare-associated infections: Background and conceptual framework. **Health Environments Research & Design Journal**, v. 7 p. 18-30, 2013.

ANEXO A – INFORMAÇÕES SOBRE A AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
NÚCLEO DE CULTURA DE CÉLULAS
Av.Dr.Arnaldo,355-São Paulo-SP-CEP:01246-902
Fone/Fax: (11) 3068-2910
email cultcel@ial.sp.gov.br

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* (REATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO*) METODO DE DIFUSÃO EM ÁGAR

LINHAGEM CELULAR: NCTC Clone 929, células de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL-1) são semeadas em placas de Petri e incubadas por 48 horas para formação da monocamada celular. O meio de cultura líquido é substituído pelo meio de cobertura sólido, que é composto de partes iguais de meio 2x concentrado e ágar com vermelho neutro. As amostras são colocadas sobre esse meio de cobertura e as placas novamente incubadas por 24 horas. Observa-se macro e microscopicamente o índice de zona (IZ) que é a área não corada pelo corante vital. As amostras são testadas em quadruplicatas em placas separadas.

IZ	DESCRIÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
0	Nenhuma Zona sob e ao redor da amostra	Nenhuma
1	Alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra	Fraca
2	Zona limitada sob a amostra	Leve
3	Zona entre 0,5 - 1,0 cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona maior que 1,0 cm ao redor da amostra	Severa

Amostras sólidas: são colocadas diretamente sobre o meio de cobertura.

Amostras em pó: são colocadas dentro de 1 cilindro fixado sobre o meio de cobertura

Amostras líquidas: discos de papel de filtro atóxico são embebidos com a amostra e colocados sobre o meio de cobertura.

Controle positivo: fragmento de 0,5 cm x 0,5 cm de látex tóxico

Controle negativo: discos de papel de filtro atóxico com 0,5 cm de diâmetro

Bibliografia: ASTM F895-84: 1984 - Standard test method for agar diffusion cell culture screening for cytotoxicity
ISO 10993.5: 2009-Biological evaluation for medical devices Tests for cytotoxicity:*in vitro* methods
US Pharmacopéia 34, 2011 - Biological reactivity tests *in vitro*
Farmacopéia Brasileira, 5ª ed., 2010 – Testes de Reatividade Biológica *in vitro*.

ANEXO B – LAUDO DO TEXTE DE CITOTOXICIDADE DA LIGA NiBe

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CITOTOXICIDADE *IN VITRO* (REATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO*)

Requisitante: BIOENGENHARIA USP - ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS

Endereço: Avenida Trabalhador São Carlense N° 400 São Carlos – SP
CNPJ: (MF) 63.025.530/0028-24 IE - Isento

A/C: Dr. João Manuel D. de A. Rollo

Amostra Teste: 5790 livro teste XVIII pág. 112

Descrição da Amostra: Liga Eutética de Níquel-berílio – Composição: Ni - % em Peso: Bal. Be - % em Peso: 2,3 C - % em Peso: 0,48 Co - % em Peso: 0,04 Data de validade: Indeterminada, Lote: 01.

ANÁLISE DE ORIENTAÇÃO: 4570.00/2012.

PROCESSO: 199258 (03/12/2012).

Descrição da Amostra	Índice de Zona obtido após a leitura das placas de culturas celulares			
	Nº1	Nº2	Nº3	Nº4
Liga Eutética de Níquel-berílio – Composição: Ni - % em Peso: Bal. Be - % em Peso: 2,3 C - % em Peso: 0,48 Co - % em Peso: 0,04 Data de validade: Indeterminada, Lote: 01.	IZ	IZ	IZ	IZ
	0	0	0	0
- Controle Negativo	0	0	0	0
- Controle Positivo	4	4	4	4

Estes resultados têm valor restrito à amostra analisada, sendo vedado seu uso para fins de propaganda

CONCLUSÃO: A amostra nº 5790 não apresentou efeito tóxico para a linhagem celular NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1).

São Paulo, 04 de dezembro de 2012

Tamiko Ichikawa Ikeda

Núcleo de Cultura de Células - IAL

CRBio03264/86