

Enxaguatórios bucais: avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis

Mouthwashes: antimicrobial efficacy assessment in commercially available products

RIALA6/1060

Adriana BUGNO^{1*}, Maria Aparecida NICOLETTI², Adriana A. B. ALMODÓVAR¹, Tatiana C. PEREIRA¹, Mariângela T. AURICCHIO¹

* Endereço para correspondência: ¹Instituto Adolfo Lutz, Av. Dr. Arnaldo, 355, 01246-902, SP/SP e-mail: adrbugno@ial.sp.gov.br

² Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo - Departamento de Farmácia/Farmácia Universitária

Recebido: 27/03/2006 – Aceito para publicação: 24/05/2006

RESUMO

Os enxaguatórios bucais podem ser utilizados como complemento à higienização bucal. A atividade antimicrobiana de seis produtos comercialmente disponíveis foi avaliada frente a *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*. Verificou-se a sobrevivência dos microrganismos após 30, 60 e 90 segundos de contato com os produtos. O tempo de redução decimal (Valor D) e a redução da população microbiana obtida após os intervalos de contato (log UFC/mL vs tempo) foram utilizados para comparar a atividade antimicrobiana dos produtos avaliados. Os resultados indicaram diferenças na sobrevivência dos microrganismos e o produto composto por óleos essenciais evidenciou a melhor atividade antimicrobiana.

Palavras-Chave. enxaguatório bucal, atividade antimicrobiana, redução logarítmica, Valor D.

ABSTRACT

Mouthwashes have been used to supplement the oral hygiene procedures. The antimicrobial activity efficacy of six commercially available products was assessed on to *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. Microbial survival was evaluated after being left in contact with the mouthwash products for 30, 60, and 90 seconds. The decimal reduction time (D-value), and the microorganisms logarithm reduction at contact time intervals were calculated from the obtained curves (Log CFU/mL vs time), and they were used for comparing the antimicrobial activity of analyzed products. Differences on microbial survival were observed, and the product compounded of essential oils showed the best antimicrobial activity.

Key Words. mouthwash, antimicrobial activity, logarithmic reduction, D-value.

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de gengivites está relacionado com a formação de placa bacteriana, sendo necessário seu controle e prevenção na manutenção da saúde da cavidade bucal. Neste contexto, incluem-se procedimentos mecânicos, químicos e de controle da dieta¹⁻⁵.

Os enxaguatórios bucais têm sido utilizados no controle químico de placa bacteriana como substitutos ou adjuntos aos procedimentos mecânicos, além de se constituírem em facilitadores para a veiculação de compostos ativos para o tratamento de afecções específicas^{1-3,5-6}. Em geral, os anti-sépticos bucais não apresentam composição complexa; o diferencial neste tipo de produto é a sua eficácia antimicrobiana considerando os compostos ativos presentes, associados ou não

a compostos de flúor^{1,6}.

Os antimicrobianos dos anti-sépticos bucais rompem a parede celular e inibem a atividade enzimática da célula microbiana. Adicionalmente, previnem a agregação bacteriana e diminuem a multiplicação microbiana^{1,7}.

Entre os compostos ativos mais utilizados em anti-sépticos bucais temos a clorexidina, cloreto de cetilpiridíneo e triclosan, além de óleos essenciais^{1,5,7-8}. A clorexidina, um dos biocidas mais utilizados em formulações anti-sépticas, é uma biguanida catiônica que age principalmente sobre bactérias Gram-positivas, além de leveduras e dermatófitos, enquanto que o cloreto de cetilpiridíneo, sobre bactérias Gram-positivas e leveduras. Entre os compostos fenólicos, o triclosan tem sido o mais utilizado em formulações para controle da placa bacteriana, apresentando ação principalmente contra bactérias Gram-

positivas; no entanto, este ativo tem sido utilizado em associação a copolímeros, que aumentam seu espectro de ação sobre bactérias gram-negativas e leveduras^{1,7-8}.

O enxaguatório que apresenta o maior histórico de uso é composto por solução hidro-alcoólica dos óleos essenciais timol, mentol e eucaliptol. Embora sejam normalmente utilizados como flavorizantes, os óleos essenciais podem contribuir com a propriedade antimicrobiana do produto devido à presença de compostos fenólicos como seus principais constituintes, os quais agem principalmente sobre bactérias Gram-positivas e leveduras^{1-2,7-9}.

No Brasil, os enxaguatórios bucais são categorizados como produtos de higiene pessoal e cosméticos, sendo as formulações que apresentam indicações específicas, como anti-sépticos, antiplaca e de uso infantil, classificadas como produtos de grau 2 e demandam a comprovação da sua segurança e eficácia antimicrobiana¹⁰.

A avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos anti-sépticos bucais pode ser efetuada por testes *in vivo* ou *in vitro*, sendo que estes são geralmente adaptações dos procedimentos de difusão em ágar, de determinação da concentração inibitória mínima (CIM) ou, ainda dos ensaios para determinação do tempo de redução decimal^{2-3,7-8,11}. O método de difusão em ágar pode ser utilizado apenas para a avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana; como o fenômeno de difusão depende das propriedades físico-químicas do produto e do meio de cultura utilizado, o diâmetro da zona de inibição não pode ser considerado como parâmetro de comparação de diferentes formulações, assim como a ausência de halo de inibição de crescimento pode não ser indicativo da ausência de atividade. A concentração inibitória mínima pode ser utilizada para a avaliação quantitativa de diferentes formulações, porém este método não fornece informações referentes ao comportamento do produto durante o período de uso, sendo mais interessante a utilização de procedimentos analíticos que permitam avaliar o perfil de morte microbiana, a exemplo dos métodos de avaliação da eficácia de sistemas conservantes. Orth¹²⁻¹³ propôs a utilização do método de regressão linear para avaliar sistemas conservantes em cosméticos, que permite calcular o tempo de redução decimal (valor D), equivalente ao tempo necessário para reduzir 90% da população microbiana. Protocolos analíticos como os métodos para avaliação da atividade germicida de sanitizantes, publicado pela AOAC¹⁴ e para avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes e anti-sépticos da AFNOR¹⁵⁻¹⁶ também avaliam a capacidade de reduzir populações microbianas utilizadas em testes de desafio, considerando como eficazes os produtos capazes de reduzir 99,999% da população microbiana em 30 segundos de contato, no caso do método AOAC e no tempo estabelecido de uso do produto, no caso da AFNOR.

Por não haver no país, uma metodologia oficial para avaliação da atividade anti-séptica de enxaguatórios bucais, este estudo teve como objetivo, avaliar a eficácia antimicrobiana *in vitro* de produtos comercialmente disponíveis frente a microrganismos frequentemente relacionados aos processos de afecções bucais^{4,6,11}: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175),

Enterococcus faecalis (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (ATCC 10231), utilizando o método de regressão linear para determinar o perfil de letalidade destes produtos, considerando os modos de uso indicados em termos de concentração e tempo de contato.

MATERIAL E MÉTODOS

Enxaguatórios bucais

O material deste estudo consistiu de seis produtos comercialmente disponíveis em farmácias e drogarias da cidade de São Paulo, Brasil, identificados de acordo com o seu componente ativo. As amostras CP e CP+OE apresentaram cloreto de cetilpiridíneo (0,5 mg/mL) como componente ativo, sendo a segunda, associada a tinturas de camomila e de mirra e a óleos de sálvia, melaleuca e eucalipto. OE corresponde à amostra composta por timol (0,6 mg/mL), eucaliptol (0,92 mg/mL), mentol (0,42 mg/mL) e salicilato de metila (0,6 mg/mL); TCS, apresentou triclosan (0,3 mg/mL) associado a copolímero, o produto CHX apresentou gluconato de clorexidina (1,2 mg/mL) e o produto FL, fluoreto de sódio (equivalente a 1000 ppm de flúor). Todos os produtos foram avaliados quanto a atividade antimicrobiana sem diluição, conforme a indicação de uso.

Preparação da suspensão microbiana

A partir das culturas-estoque de *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Candida albicans* (ATCC 10231), foram realizados três subcultivos consecutivos em caldo Caseína de soja (DIFCO®), incubados a (36 + 1)°C por 24 horas, sendo que as culturas de *Streptococcus mutans* e de *Enterococcus faecalis* foram incubadas sob condições de microaerofilia (10% CO₂). O terceiro subcultivo foi quantificado de acordo com os compêndios farmacopêicos¹⁷, em ágar Caseína de soja (DIFCO®), utilizando as mesmas condições de incubação descritas anteriormente. Após a determinação da carga microbiana, a suspensão, mantida sob refrigeração, foi ajustada com solução salina estéril para conter entre 7,5 x 10⁷ e 1,2 x 10⁸ UFC/mL¹³⁻¹⁶.

Avaliação da atividade antimicrobiana

Cada produto foi submetido à avaliação da atividade antimicrobiana utilizando o método de regressão linear¹¹. Para determinar o perfil de letalidade (logUFC/mL vs tempo), verificou-se a capacidade de cada produto em reduzir, em escala logarítmica, as populações microbianas padronizadas após 30, 60 e 90 segundos de contato. Foi considerada como atividade satisfatória, a redução de, no mínimo, 5 Log₁₀ (equivalente à redução de 99,999%) em 60 segundos.

Confirmação da capacidade de neutralização da atividade antimicrobiana residual do anti-séptico bucal

Para garantir a validade dos resultados obtidos na enumeração de microrganismos sobreviventes após contato com o anti-séptico bucal, é necessário comprovar a neutralização da

atividade antimicrobiana do resíduo do produto transferido aos meios de cultura após o tempo de contato estabelecido.

Neste estudo, o caldo Lethen (DIFCO®) foi utilizado como meio de cultura neutralizante da ação antimicrobiana residual dos anti-sépticos bucais e para confirmar esta capacidade neutralizante, alíquotas de 1,0 mL do produto foram adicionadas a três tubos contendo 9,0 mL de caldo Lethen (DIFCO®). Em seguida, alíquotas de 0,5 mL de suspensão microbiana contendo 1000 UFC/mL foram adicionadas a cada um dos tubos. Após homogeneização manual, alíquotas de 1,0 mL e de 0,1 mL foram transferidas para placas de Petri, em duplicata, homogeneizadas com 20 mL de ágar Caseína de soja (DIFCO®) e incubadas por 48 horas sob as mesmas condições de incubação utilizadas na preparação da suspensão microbiana. Após o período de incubação, foi realizada a enumeração da população microbiana sobrevivente e calculada a taxa de recuperação microbiana obtida.

Enumeração da população microbiana após contato com o produto.

Tubo contendo 9,0 mL do produto, na concentração de uso indicada na rotulagem, foi mantido em banho-maria a (22 + 2)°C por aproximadamente 10 minutos. Em seguida, alíquota de 1,0 mL da suspensão microbiana ajustada (contendo aproximadamente 10⁸ UFC/mL) foi transferida ao tubo e após homogeneização manual o tubo foi recolocado em banho. 30 segundos após a adição do inóculo, alíquota de 1,0 mL da mistura foi transferida para tubo contendo 9,0 mL de caldo Lethen (DIFCO®), meio de cultura utilizado para neutralizar a ação antimicrobiana residual do produto. Em seguida, procedeu-se à enumeração de microrganismos¹⁷, sendo as diluições decimais seriadas efetuadas em caldo Lethen (DIFCO®); alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para placas de Petri, em duplicata, homogeneizadas com 20 mL de ágar Caseína de soja (DIFCO®) e incubadas por 48 horas sob as mesmas condições de incubação utilizadas na preparação da suspensão microbiana. O mesmo procedimento foi realizado após 60 segundos e após 90 segundos da adição da suspensão microbiana.

Teste controle

Tubo contendo 9,0 mL de solução salina estéril foi mantido em banho a (22 + 2)°C por aproximadamente 10

minutos. Em seguida, alíquota de 1,0 mL da suspensão microbiana ajustada (contendo aproximadamente 10⁸ UFC/mL) foi transferida ao tubo e após homogeneização manual o tubo foi recolocado em banho. Após 30 segundos da adição do inóculo, alíquota de 1,0 mL da mistura foi transferida para tubo contendo 9,0 mL de caldo Lethen (DIFCO®). Em seguida, procedeu-se à enumeração de microrganismos¹⁷, sendo as diluições decimais seriadas efetuadas em caldo Lethen (DIFCO®); alíquotas de 1,0 mL foram transferidas para placas de Petri, em duplicata, homogeneizadas com 20 mL de ágar Caseína de soja (DIFCO®) e incubadas por 48 horas sob as mesmas condições de incubação utilizadas na preparação da suspensão microbiana. O mesmo procedimento foi realizado após 60 segundos e 90 minutos da adição da suspensão microbiana.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Tabela 1 apresenta os resultados obtidos na avaliação da capacidade do meio de cultura utilizado de neutralizar a ação residual do anti-séptico bucal. De acordo com compêndios oficiais¹⁸, a ausência de atividade antimicrobiana é indicada por taxas de recuperação microbiana superiores a 70%. A avaliação dos resultados obtidos indica que o meio de cultura selecionado para neutralizar a atividade antimicrobiana dos resíduos dos produtos após período do contato, caldo Lethen (DIFCO®), foi satisfatório. A enumeração de microrganismos sobreviventes após o período de contato com o anti-séptico bucal, apresentada na Tabela 1, indica que não houve atividade antimicrobiana dos resíduos dos produtos em teste nas condições experimentais.

Na avaliação da atividade antimicrobiana dos anti-sépticos bucais, todos os ensaios foram realizados em triplicata. Foram calculados os valores médios obtidos na enumeração das populações microbianas, antes e após o contato com o produto e a partir destes dados, foi construído gráfico do Log₁₀ UFC/mL em função do tempo de contato (perfil de letalidade) para cada produto analisado (Figura 1). Os resultados indicam atividade antimicrobiana diferenciada entre os produtos frente aos microrganismos estudados.

Tabela 1. Porcentagem de recuperação (R) de *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans* obtida durante a avaliação da capacidade do caldo Lethen (DIFCO®) para neutralizar ação residual dos anti-sépticos bucais

Produto	<i>Streptococcus mutans</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Candida albicans</i>	
	UFC	R(%)	UFC	R(%)	UFC	R(%)	UFC	R(%)
Controle	46/42/50		48/50/48		42/48/48		46/51/48	
CP	42/42/48	95,65	46/49/47	97,12	40/48/46	97,17	44/46/46	93,79
CP + OE	43/40/48	95,00	46/46/48	95,89	41/46/46	96,30	42/46/46	92,55
OE	43/40/45	92,83	48/48/44	95,89	40/46/47	96,30	44/48/46	95,24
TCS	44/40/46	94,13	45/48/46	95,07	40/45/46	95,00	42/48/44	92,55
CHX	42/39/46	91,96	44/46/42	90,35	42/42/46	94,13	42/44/46	91,10
FL	44/41/48	96,30	46/48/48	97,12	41/48/46	97,83	44/48/48	96,69

A partir dos gr6ficos de letalidade obtidos para cada produto analisado, foram determinadas as equa76es da reta, calculados o tempo de redu76o decimal (Valor D) e o tempo necess6rio para reduzir cinco ciclos logar6tmicos ($T_{99,999\%}$) (Tabela 2).

Observando-se os valores D calculados a partir da equa76o de reta obtida, verificou-se que a amostra OE apresentou a melhor atividade antimicrobiana sobre todos os microrganismos estudados, enquanto a amostra FL apresentou a menor atividade antimicrobiana. A amostra TCS apresentou a segunda melhor atividade antibacteriana, enquanto a amostra CHX, a segunda melhor atividade antif6ngica. Quanto aos produtos a base de cloreto de cetipirid6neo, a amostra CP+OE apresentou atividade antimicrobiana melhor em rela76o 6

amostra CP, provavelmente devido 6 associa76o com 6leos essenciais.

Considerando como eficaz o produto capaz de reduzir 99,999% da popula76o microbiana ap6s um minuto de contato, verificou-se que apenas a amostra OE reduziu mais de cinco ciclos logar6tmicos de todos os microrganismos estudados. Os produtos TCS e CP+OE foram eficazes contra *Streptococcus mutans* e *Enterococcus faecalis*, enquanto que o produto CHX foi eficaz somente contra *Candida albicans*.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram-se compat6veis com os estudos realizados por outros pesquisadores, embora estes tenham determinado a concentra76o inibit6ria m6nima (CIM) na avalia76o da atividade antimicrobiana. McDonnell e Russel⁷ e McBain et al¹⁹ verificaram que triclosan

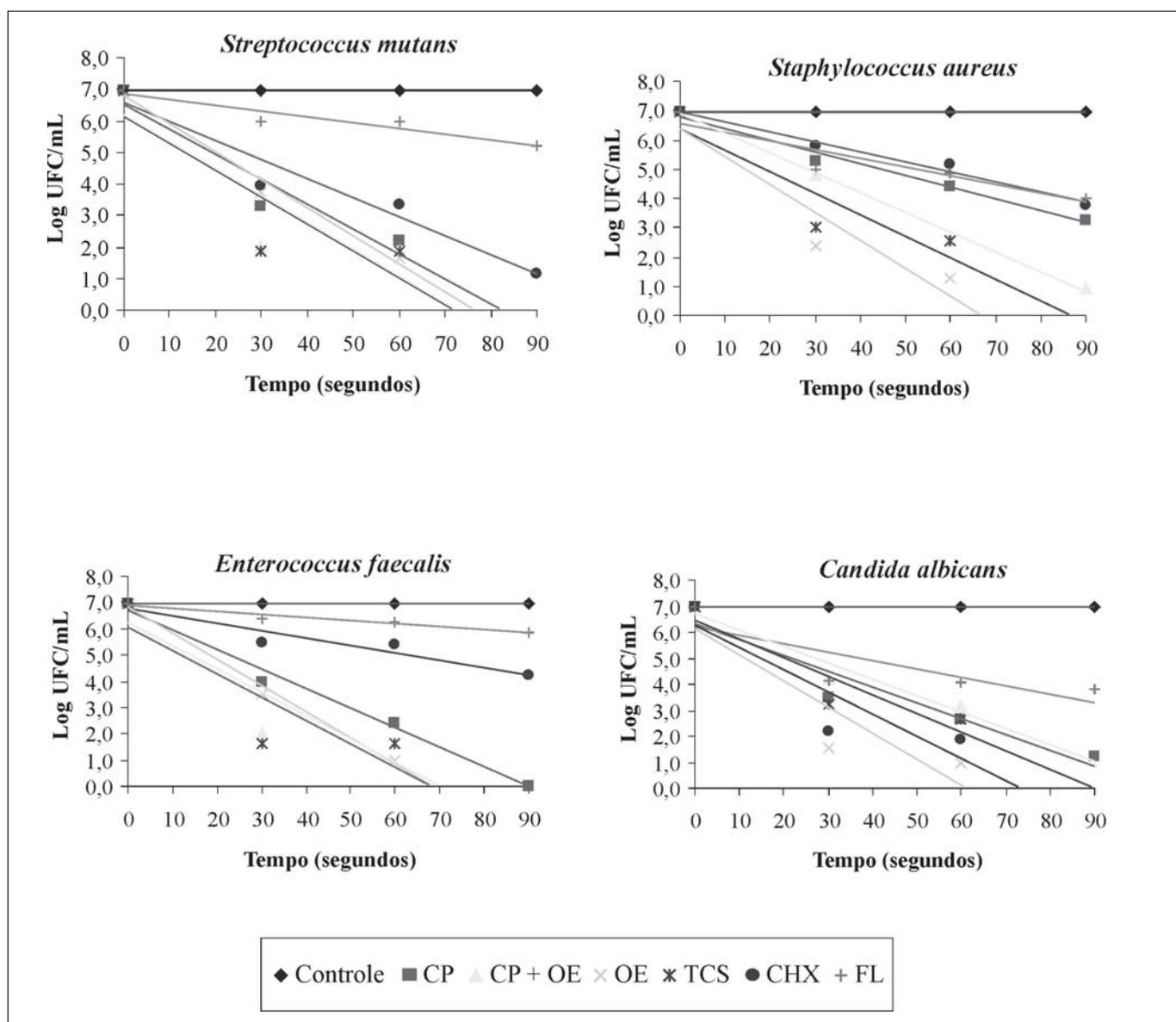


Figura 1. Redu76o decimal de microrganismos causada por anti-s6pticos bucais

Tabela 2. Equação da reta, Valor D e o tempo para redução de 5 Log₁₀ de *Streptococcus mutans* (A), *Staphylococcus aureus* (B), *Enterococcus faecalis* (C) e *Candida albicans* (D).

(A)				(B)			
Produto	Equação	Valor D (seg)	T _{99,999%} (seg)	Produto	Equação	Valor D (seg)	T _{99,999%} (seg)
CP	y = -0,080x + 6,543	12,547	62,74	CP	y = -0,040x + 6,778	24,876	124,38
CP + OE	y = -0,085x + 6,181	11,723	58,62	CP + OE	y = -0,068x + 6,880	14,793	73,96
OE	y = -0,089x + 6,786	11,274	56,37	OE	y = -0,095x + 6,385	10,504	52,52
TCS	y = -0,085x + 6,131	11,723	58,62	TCS	y = -0,074x + 6,384	13,569	67,84
CHX	y = -0,060x + 6,565	16,556	82,78	CHX	y = -0,034x + 6,967	29,155	145,77
FL	y = -0,018x + 6,832	55,866	279,33	FL	y = -0,030x + 6,561	33,333	166,67

(C)				(D)			
Produto	Equação	Valor D (seg)	T _{99,999%} (seg)	Produto	Equação	Valor D (seg)	T _{99,999%} (seg)
CP	y = -0,075x + 6,710	13,369	66,84	CP	y = -0,061x + 6,340	16,529	82,64
CP + OE	y = -0,089x + 6,215	11,249	56,24	CP + OE	y = -0,063x + 6,681	15,873	79,37
OE	y = -0,100x + 6,824	10,050	50,25	OE	y = -0,100x + 6,159	9,970	49,85
TCS	y = -0,090x + 6,079	11,173	55,87	TCS	y = -0,072x + 6,437	13,966	69,83
CHX	y = -0,028x + 6,768	35,842	179,21	CHX	y = -0,085x + 6,231	11,723	58,62
FL	y = -0,012x + 6,867	86,957	434,78	FL	y = -0,032x + 6,173	31,348	156,74

e clorexidina apresentaram alto potencial antimicrobiano frente a bactérias orais, sendo o valor da CIM para o triclosan menor que a obtida para clorexidina. Meiller et al²⁰, que avaliaram a eficácia antifúngica de três formulações contendo óleos essenciais e uma contendo digluconato de clorexidina, verificaram que todos os produtos apresentavam atividade antifúngica na concentração comercialmente disponível, sendo que as formulações contendo óleos essenciais apresentaram os melhores resultados. Giuliana et al^{21,22} investigaram a atividade antifúngica de enxaguatórios bucais contendo cloreto de cetilpiridíneo, digluconato de clorexidina, hexetina, sanguinária e triclosan e verificaram que os produtos contendo cloreto de cetilpiridíneo foram os mais efetivos, enquanto digluconato de clorexidina foi mais efetivo que o triclosan.

Pan et al²³, Riep et al²⁴, assim como Pitten e Kramer²⁵, avaliaram a taxa de redução de populações microbianas após contato com antissépticos e verificaram que produtos contendo óleos essenciais foram mais efetivos que aqueles a base de fluoretos. Pitten e Kramer²⁶ também verificaram que produtos a base de cloreto de cetilpiridíneo reduzem entre 2 e 2,5 ciclos logarítmicos as contagens microbianas na saliva.

Alguns estudos sugerem que a atividade antimicrobiana *in vitro* pode não estar altamente correlacionada à atividade clínica¹¹, como, por exemplo, Renton-Harper et al²⁷, que verificaram que formulações contendo clorexidina apresentaram atividade antimicrobiana altamente superior ao cloreto de cetilpiridíneo e triclosan, e Monfrin e Ribeiro²⁸, que também verificaram que produtos contendo clorexidina foram os mais eficientes na redução das populações microbianas presentes na saliva de voluntários, enquanto produtos contendo triclosan apresentaram pouca redução e produtos contendo óleos essenciais não reduziram a população microbiana.

As diferenças verificadas entre os métodos de avaliação *in vivo* e *in vitro* podem estar relacionadas às características de adsorção dos agentes antimicrobianos e à menor sensibilidade aos antimicrobianos observada em biofilmes em comparação a situações em que os microrganismos estão em suspensão¹¹. Apesar de eventuais diferenças, os testes *in vitro*, utilizando culturas em suspensão, são de extrema importância como método preliminar para avaliar a atividade antimicrobiana de enxaguatórios bucais.

CONCLUSÃO

Com relação à atividade antibacteriana, o produto OE apresentou a melhor atividade antimicrobiana, seguido do produto TCS. Com relação à atividade antifúngica, também o produto OE apresentou a melhor atividade antimicrobiana, seguido do produto CHX.

REFERÊNCIAS

1. Adams D, Addy M. Mouthrinses. *Adv Dent Res* 1994; 8: 291-301.
2. Marsh, PD. Microbiological aspects of the chemical control of plaque and gingivitis. *J Dent Res* 1992; 71: 1431-8.
3. Newman MG, Hulem C, Colgate J, Anselmo C. Antibacterial susceptibility of plaque bacteria. *J Dent Res* 1979; 58: 1722-32.
4. Prista LN, Bahia MFG, Vilar E. *Dermofarmácia e Cosmética*. Porto: Assoc. Nacional de Farmácias; 1995.
5. Steinberg D, Hirschfeld Z, Tayeb I, Ben-Yosef S, David A, Friedman M. The effect of parabens in a mouthwash and incorporated into a sustained release varnish on salivary bacteria. *J Dentistry* 1999; 27: 101-6.
6. Bonadeo I. *Cosmética. Ciência y Tecnología*. Madrid: Ed Ciência, 1988.
7. McDonnell G, Russel D. Antiseptics and disinfectants. Activity, action and resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 147-79.
8. Hobson DW; Bolsen K. Methods of testing oral and topical antiseptics and antimicrobial. In: Block SS. *Desinfection, Sterilization and Preservation*. 5 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001. p. 1329-59.
9. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol* 2000; 31: 247-56.
10. Brasil. Resolução RDC nº 211, de 14 jul. 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Estabelece a definição e classificação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, DF, 18 jul. 2005. Disponível em <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=17882&word=>. Acesso em 02 ago. 2005.
11. Botelho MG. Fractional inhibitory concentration index of combinations of antibacterial agents against cariogenic organisms. *J Dentistry* 2000; 28: 565-70.
12. Orth DS. Linear regression method for rapid determination of cosmetic preservative efficacy. *J Soc Cosmet Chem* 1979; 30: 321-32.
13. Sutton SVW, Porter D. Development of the antimicrobial effectiveness test as USP chapter <51>. *PDA J Pharm Sci Technol* 2002; 56: 300-11.
14. [AOAC] Association of Official Analytical Chemists. *AOAC Official Method 960.09 – Germicidal and detergent sanitizing action of disinfectants*. Official Methods of Analysis of AOAC International. 17th edition. Gaithersburg: AOAC International, 2000.
15. [AFNOR] Association Française de Normalisation. *Norme Européenne, Norme Française – NF EN 1040 – Antiseptiques et désinfectants chimiques; Activité bactericide de base – Méthode d'essai et prescriptions (phase 1)*. Paris: Association Française de Normalisation, 1997.
16. Cremieux A; Fleurette J. Methods of testing disinfectants. In: Block SS. *Desinfection, Sterilization and Preservation*. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1991. p. 1009-27.
17. *Farmacopéia Brasileira*. 4 ed. São Paulo: Atheneu Ed; 1988. p. v.5.1.6.-1-5
18. *United States Pharmacopeia*. 28 ed. Rockville: United States Pharmacopeial Convention; 2005. p. 1809-18.
19. McBain AJ, Bartolo RG, Catrenich CE, Charbonneau D, Ledder RG, Gilbert P. Effects of triclosan-containing rinse on the dynamics and antimicrobial susceptibility of in vitro plaque ecosystems. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 3531-8.
20. Meiller TF, Kelley JI, Jabra-Rizk MA, DePaola LG, Abdullahel Baqui AAM, Falkler WA. In vitro studies of the efficacy of antimicrobials against fungi. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001; 91: 663-70.
21. Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Musotto, GC, Giangreco R. In vitro antifungal properties of mouthrinses containing antimicrobial agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral radiol Endod* 1997; 68(8): 729-33.
22. Giuliana G, Pizzo G, Milici ME, Giangreco R. In vitro activities of antimicrobial agents against *Candida* species. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral radiol Endod* 1999; 87(1): 44-9.
23. Pan PH, Finnegan MB, Sturdivant L, Barnett ML. Comparative antimicrobial activity of an essential oil and an amine fluoride-stannous fluoride mouthrinse in vitro. *J Clin Periodontol* 1999; 26(7): 474-6.
24. Riep BG, Bernimoulin JP, Barnett ML. Comparative antiplaque effectiveness of an essential oil and an amine fluoride-stannous fluoride mouthrinse. *J Clin Periodontol* 1999; 26(3): 164-8.
25. Pitten FA, Kramer A. Antimicrobial efficacy of antiseptic mouthrinse solutions. *Eur J Clin Pharmacol* 1999; 55(2): 95-100.
26. Pitten FA, Kramer A. Efficacy of cetylpyridinium chloride used as oropharyngeal antiseptic. *Arzneimittelforschung* 2001; 51(7) 588-95.
27. Renton-Harper P, Addy M, Moran J, Doherty FM, Newcombe RG. A comparison of chlorhexidine, cetylpyridinium chloride, triclosan, and C31G mouthrinse products for plaque inhibition. *J Periodontol* 1996; 67(5) 486-9.
28. Monfrim RCP, Ribeiro MC. Avaliação in vitro de anti-sépticos orais sobre a microbiota da saliva. *Rev APCD* 2000; 54(5) 400-7.