

COMUNICAÇÃO CIENTÍFICA

ATIVIDADE “IN VITRO” DE TRÊS AGENTES QUÍMICOS
FRENTE A DIFERENTES ESPÉCIES DE *ASPERGILLUS**

**M.O. Xavier¹, I.M. Madrid¹, A.R.M. Meinerz², M.B. Cleff²,
L.F.D. Schuch¹, M. de O. Nobre¹, M.C.A. Meireles¹**

¹Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Laboratório de Doenças Infecciosas, Setor de Micologia, Campus Universitário s/nº, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brasil. E-mail: melissaxavier@bol.com.br

RESUMO

A aspergilose é causada por fungos ubíquos e oportunistas do gênero *Aspergillus*, que liberam milhares de conídios no ar, contaminando o ambiente, sendo de extrema importância a utilização de filtros de ar e programas corretos de anti-sepsia e desinfecção para prevenção da enfermidade. Este estudo avaliou a eficácia “in vitro” dos agentes químicos, iodóforo, amônia quaternária e clorexidina, frente a isolados de *Aspergillus fumigatus* (8), *Aspergillus niger* (8), *Aspergillus flavus* (6) e *Aspergillus terreus* (1). Para o teste foram preparadas diluições sucessivas dos desinfetantes/anti-sépticos (\log_2) em caldo RPMI, e os inóculos foram ajustados até uma concentração final de 5×10^4 UFC/mL. Foi realizada a técnica de microdiluição em caldo de acordo com NCCLS M-38, adaptada para agentes químicos, com incubação das microplacas a 35° C em agitação constante. A leitura visual dos resultados foi realizada após 96 horas, e os isolados de *Aspergillus* spp. utilizados foram resistentes ao iodóforo nas concentrações testadas. A amônia quaternária e a clorexidina mostraram-se eficazes contra os isolados de *Aspergillus* spp., com exceção de um *A. fumigatus* e um *A. terreus*. Com estes resultados indica-se a utilização da amônia quaternária e da clorexidina na prevenção da aspergilose, questionando-se o uso de iodóforos para este fim.

PALAVRAS-CHAVE: Aspergilose, *Aspergillus* spp., desinfetantes, anti-sépticos.

ABSTRACT

IN-VITRO ACTIVITY OF THREE CHEMICAL AGENTS AGAINST DIFFERENT SPECIES OF *ASPERGILLUS*. Aspergillosis is caused by ubiquitous and opportunist moulds of the genus *Aspergillus*, which contaminate the atmosphere by liberating thousands of conidia in the air, making it extremely important to use air filters and to implement proper programs of antiseptics and disinfection for the prevention of this disease. This study evaluated the in-vitro effectiveness of the chemical agents iodophor, quaternary ammonia and chlorexidine against *A. fumigatus* (8), *A. niger* (8), *A. flavus* (6) and *A. terreus* (1). Successive dilutions of disinfectants/antiseptics (\log_2) were prepared in RPMI for the test, and the suspension was adjusted until a final concentration of 5×10^4 UFC/mL. The microdilution test was done in agreement with NCCLS M-38 adapted for chemical agents, with microplates incubation at 35° C in constant agitation. The visual results were evaluated after 96 hours, and all *Aspergillus* spp. isolates used were resistant to iodophor at all concentrations tested. Quaternary ammonia and chlorexidine showed effectiveness against *Aspergillus* spp. isolates, except for one *A. fumigatus* and one *A. terreus*. According to these results the use of quaternary ammonia and chlorexidine is indicated for the prevention of aspergillosis, while the use of iodophor is questionable.

KEY WORDS: Aspergillosis, *Aspergillus* spp., disinfectants and antiseptics.

As micoses oportunistas, como a aspergilose, adquiriram uma grande importância em saúde pública nas últimas décadas, devido à incidência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), o desenvolvimento de novas terapias para pacientes

oncológicos, e os avanços nas técnicas cirúrgicas de transplantes de órgãos, que culminaram com o aumento do número de pacientes imunocomprometidos (BRETAGNE *et al.*, 1997; LATGÉ, 1999; STEVENS *et al.*, 1999; MARTINS-DINIZ *et al.*, 2005). Em medicina veterinária,

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS, Brasil.

*Parte integrante da dissertação de mestrado do primeiro autor.

esta micose se destaca por causar sérios prejuízos à produção avícola, acometendo principalmente aves jovens e ovos embrionados, e por determinar altas taxas de mortalidade em pingüins e outras aves silvestres mantidas em cativeiro, em zoológicos e/ou centros de reabilitação (FLACH *et al.*, 1990; ANDREATTI, 2000; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; LAIR-FULLERINGER, 2003).

As espécies comumente envolvidas com quadros clínicos tanto em humanos quanto em animais são principalmente o *Aspergillus fumigatus*, seguido do *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* (LATGÉ, 1999; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003). Como o *Aspergillus* spp. é um fungo ubíquo, milhares de conídios são desprendidos das fiáldes diariamente e dispersos no ar, contaminando o ambiente (LATGÉ, 1999). Neste contexto, é de extrema importância, além da utilização de filtros de ar, o emprego correto de programas de anti-sepsia e desinfecção, à medida que auxilia na prevenção da enfermidade através da redução do nível de contaminação por microrganismos fúngicos em tecidos vivos, superfícies e objetos inanimados (LATGÉ, 1999; McDONNELL; RUSSEL, 1999; ABUNDIS-SANTAMARIA, 2003; TESSARI *et al.*, 2004).

A escolha de um agente químico desinfetante não é uma tarefa fácil frente a grande variedade de produtos existentes no mercado, devendo ser levado em consideração fatores como espectro de atividade desejada, toxicidade, poder residual, custo, estabilidade, e natureza do material a ser tratado. Os principais desinfetantes utilizados são álcoois, formaldeído, glutaraldeído, compostos liberadores de cloro ativo (como hipoclorito de sódio), compostos quaternário de amônio (como cloreto de benzalcônio), iodóforos e biguaninas (como clorexidina). Dentre esta gama de opções, não existe um produto que apresente todas as características desejadas, cada um possui vantagens e desvantagens que devem ser avaliadas no momento da seleção para o uso (BRASIL, 1994; McDONNELL; RUSSEL, 1999).

A ação de desinfetantes e anti-sépticos tem sido testada contra bactérias e leveduras, no entanto poucos estudos foram encontrados na literatura consultada (PubMed; Portal CAPES) confrontando estes agentes com fungos filamentosos. Visto que os fungos filamentosos em geral são mais resistentes que leveduras e bactérias não esporuladas, testes realizados com estes microrganismos unicelulares não servem de parâmetro ou indício para sua utilização contra fungos chamados “bolores” de importância médica e veterinária, como *Aspergillus* spp. (TERLECKY; AXLER, 1987; BRASIL, 1994; McDONNELL; RUSSEL, 1999). Assim, este estudo objetivou testar a eficácia “in vitro” de três agentes químicos de baixa toxicidade contra diferentes espécies de fungos do gênero *Aspergillus*.

A atividade dos desinfetantes e anti-sépticos, iodóforo, cloreto de benzalcônio (amônia quaternária) e digluconato de clorexidina, foi testada frente a 23 amostras de *Aspergillus* spp. isoladas do ambiente e de casos clínicos, sendo 8 *A. fumigatus*, 8 *A. niger*, 6 *A. flavus*, e 1 *A. terreus*.

A técnica de microdiluição em caldo utilizada para testes “in vitro” de antifúngicos foi realizada de acordo com NCCLSM-38, porém com adaptação para agentes químicos. Foram utilizadas 12 placas de microdiluição (96 orifícios) estéreis, as quais foram preenchidas com o inóculo fúngico e com os desinfetantes/anti-sépticos previamente diluídos e ajustados em meio RPMI líquido. Todas as amostras de *Aspergillus* spp. foram testadas em duplicata frente aos três desinfetantes/anti-sépticos.

Para preparação dos inóculos fúngicos as amostras foram previamente semeadas em placa de Petri contendo ágar batata dextrose (Potato Dextrose Agar – PDA) e incubadas a 35° C por 7 dias, obtendo-se culturas jovens e puras. Após o crescimento fúngico foi adicionado às culturas, 1 mL de salina estéril com 1% de Tween 20, e em seguida os conídios e hifas foram coletados da superfície da colônia com auxílio de pipeta estéril e transferidos para um tubo de ensaio estéril. Decorrido o tempo de sedimentação de 5 min, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio estéril, e então homogeneizado em agitador de tubos vortex por 15 segundos, e sua concentração final foi ajustada a 5×10^4 UFC/mL. Esta suspensão foi diluída a 1:50 em caldo RPMI, alcançando duas vezes a concentração necessária, para ser adicionada a cada orifício da microplaca em volume igual ao do agente químico, conforme o protocolo padrão. Para confirmação da concentração do inóculo foi realizada a técnica de Pour-plate em ágar Sabouraud dextrose, e contagem das Unidades Formadoras de Colônia (UFC).

Foram preparadas seis diluições sucessivas dos 3 agentes químicos em \log_2 , utilizando-se caldo RPMI como diluente, os quais foram identificados como: IF (iodóforo), CB (cloreto de benzalcônio) e DC (digluconato de clorexidina). As concentrações finais dos desinfetantes IF e CB referiram-se a 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25 vezes a concentração de uso recomendada pelo fabricante do produto, e do desinfetante DC variaram de 2 a 0,05 vezes a concentração de uso indicada.

A primeira coluna das microplacas (coluna A) foi utilizada como controle de crescimento sendo preenchida com 200 μ L do inóculo, e a última coluna (coluna H) correspondeu ao controle de esterilidade onde os orifícios foram preenchidos com 200 μ L da maior diluição do desinfetante. As demais colunas (colunas de B a G) foram preenchidas com 100 μ L do inóculo e 100 μ L da diluição do agente químico em seqüência, da maior para menor diluição do produto.

As microplacas foram incubadas em uma estufa "shaker" regulada a uma temperatura de 35° C e constante agitação (40 ciclos/min), e a leitura visual dos resultados foi realizada após 96h, sendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) determinada pela maior diluição do agente químico capaz de inibir o crescimento fúngico.

Das 23 amostras de *Aspergillus* spp., os 8 isolados de *A. niger* e os 6 de *A. flavus* foram sensíveis ao DC e CB, e resistentes ao IF. O *A. terreus* foi sensível ao CB e resistente ao IF e DC, e os 8 isolados de *A. fumigatus* foram sensíveis ao DC e resistentes ao IF, sendo que destes, 7 foram sensíveis ao CB. Os resultados estão descritos na Tabela 1.

Todos os isolados de *Aspergillus* spp. foram resistentes ao iodóforo nas diluições testadas (Fig. 1). O cloreto de benzalcônio mostrou atividade "in vitro" no controle das quatro espécies de *Aspergillus*, com exceção de uma amostra de *A. fumigatus*, que apresentou resistência a este agente químico mesmo em uma concentração duas vezes recomendada. O digluconato

de clorexidina apresentou eficácia frente a todos os isolados de *A. fumigatus*, *A. niger* e *A. flavus*, no entanto, a amostra de *A. terreus* foi considerada resistente a todas as diluições testadas.

Não foram detectadas diferenças na sensibilidade em relação à origem dos isolados, caso clínico ou ambiente, porém, o número de isolados de casos clínicos correspondeu a apenas 17% das amostras.

A toxicidade é um dos principais fatores a ser levado em consideração no momento da escolha de um agente químico para uso na presença de humanos e/ou animais. Isto se deve ao fato de que o processo de desinfecção pode acarretar desde irritação de mucosas e pele, até intoxicações, e com isso embora diminua a concentração de microrganismos, aumenta a predisposição do indivíduo à enfermidades (BRASIL, 1994; McDONNEL; RUSSEL, 1999). Contudo, foram selecionados para o teste "in vitro" digluconato de clorexidina, cloreto de benzalcônio e iodóforo, que apresentam baixa toxicidade.

Tabela 1 - Resultados do teste de suscetibilidade "in vitro" de diferentes espécies de *Aspergillus* a três desinfetantes/anti-sépticos comerciais.

Espécie	Isolado	Origem	Produto IF (CI: 0,05 µg/mL)	Ação do IF	Produto CB (CI: 0,6 mg/mL)	Ação do CB	Produto DC (CI: 0,67 mg/mL)	Ação do DC
<i>A. fumigatus</i>	1	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. fumigatus</i>	2	CC	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. fumigatus</i>	3	CC	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. fumigatus</i>	4	CC	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. fumigatus</i>	5	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. fumigatus</i>	6	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. fumigatus</i>	7	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. fumigatus</i>	8	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. niger</i>	9	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. niger</i>	10	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. niger</i>	11	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. niger</i>	12	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. niger</i>	13	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. niger</i>	14	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. niger</i>	15	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. niger</i>	16	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. flavus</i>	17	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. flavus</i>	18	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. flavus</i>	19	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. flavus</i>	20	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. flavus</i>	21	CC	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. flavus</i>	22	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
<i>A. terreus</i>	23	A	CIM: > 0,4 µg/mL	I	CIM: < 0,15 mg/mL	E	CIM: < 0,04 mg/mL	E
Eficácia (%)			0		96		96	
IF: iodóforo;			CB: cloreto de benzalcônio;				DC: digluconato de clorexidina	
A: ambiente			CC: caso clínico				CI: concentração de uso do produto	
indicada pelo fabricante;			E: eficaz;				I: ineficaz;	

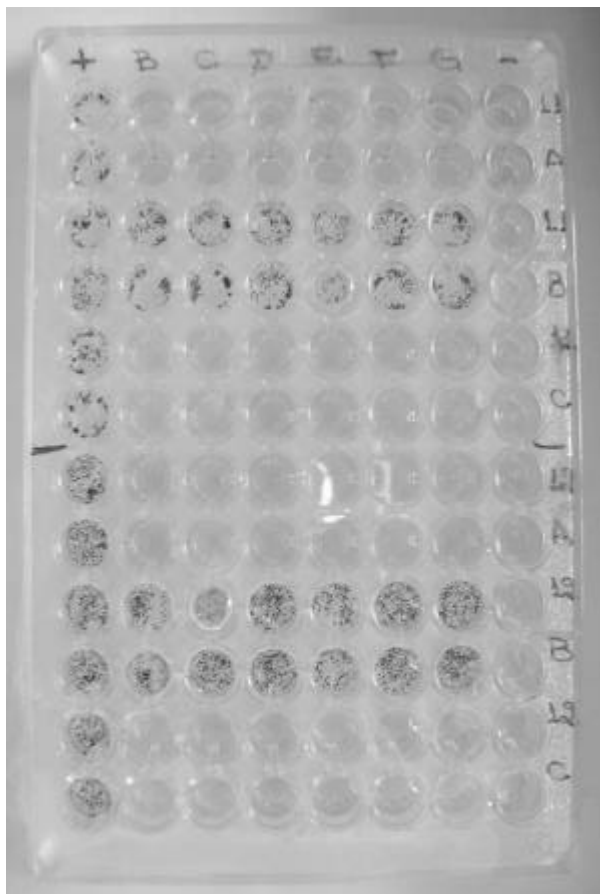


Fig. 1 - Resultado do teste de microdiluição em caldo demonstrando isolados de *A. niger* resistentes a todas as concentrações do iodóforo (linhas 3, 4, 9 e 10), e sensíveis a todas as concentrações de amônia quaternária (linhas 1, 2, 7 e 8) e digluconato de clorexidina (linhas 5, 6, 11 e 12).

NELLY; ORLOFF (2001) realizaram um estudo sobre a sobrevivência de microrganismos em materiais hospitalares e encontraram uma maior sobrevivência de cepas de *Aspergillus* spp. isoladas de casos clínicos que isoladas de ambientes, o que não foi observado neste trabalho em relação à resistência dos isolados aos diferentes agentes químicos.

A resistência de *A. fumigatus* e *A. niger* encontrada frente ao iodóforo já foi descrita previamente por TERLECKY; AXLER (1987), no experimento sobre a atividade de diferentes agentes químicos contra diversos gêneros e espécies fúngicas. Os autores obtiveram resultados diferentes dos descritos neste trabalho, em relação à ação da amônia quaternária que se apresentou ineficaz na inibição do crescimento de ambas as espécies.

A atividade da amônia quaternária e do digluconato de clorexidina "in vitro" em diluições 4 vezes e 16 vezes maiores que a recomendada, respectivamente, sugere a ação efetiva destes produtos no ambiente, os quais devem ser utilizados em concen-

trações maiores que a CIM "in vitro" por sofrerem influência dos fatores externos, como temperatura, pH e presença de matéria orgânica (BRASIL, 1994; McDONNELL; RUSSEL, 1999).

Segundo McDONNELL; RUSSELL (1999), o *A. niger* é sensível à concentração de 200 µg/ml de clorexidina e 100-200 µg/mL de cloreto de benzalcônio. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os autores em relação à amônia quaternária, porém demonstram que 40 µg/mL de digluconato de clorexidina podem inibir o crescimento deste microrganismo.

A resistência do *A. terreus* à clorexidina, deve ser considerada com cautela, visto que somente foi utilizado um isolado desta espécie, podendo a resistência ser um fator intrínseco e individual do isolado testado (McDONNELL; RUSSEL, 1999; NELLY; ORLOFF, 2001). No entanto, é sabido que a maioria dos isolados de *A. terreus* são resistentes à Anfotericina B (STEINBACH *et al.*, 2004), o que geralmente não ocorre com as outras espécies de *Aspergillus* associadas a quadros clínicos. Este dado é importante à medida que a sensibilidade fúngica à Anfotericina B está relacionada com as glucanas da parede celular, as quais também desempenham um papel importante na suscetibilidade do microrganismo à clorexidina (McDONNELL; RUSSEL, 1999).

Não foram encontrados na literatura consultada estudos "in vitro" de agentes químicos desinfetantes e anti-sépticos frente a isolados de *A. flavus*, no entanto esta espécie não apresentou característica peculiar em relação às outras três espécies testadas em nosso estudo.

Como a atividade antimicrobiana dos desinfetantes depende de vários fatores, como temperatura, pH, diluição, presença de matéria-orgânica, entre outros, os testes "in vitro" não determinam necessariamente a real capacidade de desinfecção de um ambiente, porém resultados favoráveis e desfavoráveis nestes testes devem ser levados em consideração, sendo um indício da atividade destes produtos contra microrganismos específicos (TIMENETSKY, 1990).

Os resultados obtidos após a condução deste experimento permitem concluir que a amônia quaternária e o digluconato de clorexidina foram eficazes contra as diferentes espécies de *Aspergillus*. Em contrapartida, a ineficácia "in vitro" do iodóforo neste estudo torna questionável seu uso em superfícies e tecidos vivos para controle de fungos do gênero *Aspergillus*.

REFERÊNCIAS

- ABUNDIS-SANTAMARIA, E. *Aspergillosis in birds of prey*. 2003. Disponível em: <<http://www.aspergillus.man.ac.uk>>. Acesso em: 23 mar. 2005.

- ANDREATTI FILHO, R.L. Enfermidades Micóticas, In: BERCHIERI JÚNIOR, A.; MACARI, M. (Eds.). *Doenças das aves*. Campinas: FACTA, 2000. p.369-375.
- BRASIL. Ministério da Saúde, Coordenação de Controle de Infecção Hospitalar. *Processamento de Artigos e Superfícies em Estabelecimentos de Saúde*. 2.ed, Brasília, 1994, 50p.
- BRETAGNE S.; BART-DELABESSE, E.; WECHSLER, J.; KUENTZ, M. DHÉDIN N.; CORDONNIER C. Fatal primary coetaneous aspergillus's in a boné marrow transplant recipient: nosocomial acquisition in a laminar-air flow room. *Journal of Hospital Infection*, v.36, n.3, p.235-239, 1997.
- FLACH, E.J.; STEVENSON, M.F.; HENDERSON, G.M. Aspergillosis in gentoo penguins (*Pygoscelis papua*) at Edinburgh Zoo, 1964-1988. *Veterinary Record*, v.126, n.4, p.81-85, 1990.
- LAIR-FULLERINGER, S.; GUILLOT, J.; DESTERKE, C.; SEGUIN, D.; WARIN, S.; BEZILLE, A.; CHERMETTE, R.; BRETAGNE, S. Differentiation between Isolates of *Aspergillus fumigatus* from Breeding Turkeys and Their Environment by Genotyping with Microsatellite Markers. *Journal of Clinical Microbiology*, v.41, n.4, p.1798-1800, 2003.
- LATGÉ, J.P. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.12, n.2, p.310-350, 1999.
- MARTINS-DINIZ, J.N.; SILVA, R.A.M.; MIRANDA, E.T.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Monitoramento de fungos anemófilos e de leveduras em unidade hospitalar. *Revista de Saúde Pública*, v.39, n.3, p.398-405, 2005.
- MCDONNELL, G.; RUSSEL, A.D. Antiseptics and Disinfectants: Activity, Action, and Resistance. *Clinical Microbiology Review*, v.12, n.1, p.147-179, 1999.
- NELLY, A.N.; ORLOFF, M.M. Survival of Some Medically Important Fungi on Hospital Fabrics and Plastics. *Journal of Clinical Microbiology*, v.39, n.9, p.3360-3361, 2001.
- NCCLS-M38A. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard. NCCLS document M38-A. 2002. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2002.
- STEINBACH, W.J.; PERFECT, J.R.; SCHELL, W.A.; WALSH, T.J.; BENJAMIN JUNIOR, D.K. In Vitro analyses, animal models, and 60 clinical cases of invasive *Aspergillus terreus* infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.48, n.9, p.3217-3225, 2004.
- STEVENS, D.A.; KAN, V.L.; JUDSON, M.A.; MORRISON, V.A.; DUMMER, S.; DENNING, D.W.; BENNETT, J.E.; WALSH, T.J.; PATTERSON, T.F.; PANKEY, G.A. Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus*. *Clinical Infectious Diseases*, v.30, p.696-709, 2000.
- TERLECKYJ B.; AXLER, D.A. Quantitative Neutralization Assay of Fungicidal Activity of Disinfectants. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.31, n.5, p.794-798, 1987.
- TESSARI, E.N.C.; CARDOSO, A.L.S.P.; CASTRO, A.G.M.; KANASHIRO, A.M.I.; ZANATTA, G.F. Prevalência de Aspergilose Pulmonar em pintos de um dia de idade. *Arquivos do Instituto de Biologia*, São Paulo, v.71, n.1, p.75-77, 2004. Disponível em: <http://www.biologico.sp.gov.br/ARQUIVOS/V71_1/tessari.pdf>. Acesso em 23 mar. 2005.
- TIMENETSKY, J. Avaliação microbiológica de desinfetantes químicos de uso doméstico. *Revista de Saúde Pública*, v.24, n.1, p.47-50, 1990.

Recebido em 18/4/06

Aceito em 1/2/07