UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo
essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguatório bucal**

Mateus Freire Leite

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo
essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguatório bucal**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do título de Doutor em Ciências
Farmacêuticas

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos

Orientado: Mateus Freire Leite

Orientador: Prof. Dr. Augusto César Cropanese
Spadaro

Ribeirão Preto
2009

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Leite, Mateus Freire

Desenvolvimento e caracterização de microemulsões para enxaguatório bucal com extrato de *Baccharis dracunculifolia*. Ribeirão Preto, 2009. 166p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado apresentada Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Spadaro, Augusto César Cropanese

1. Enxaguatório bucal 2. Microemulsões 3. *Baccharis dracunculifolia* 4. *Streptococcus mutans* 5. Cárie

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mateus Freire Leite

Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguatório bucal.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Augusto César Cropanese Spadaro

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

A Deus

Por tudo, sempre.

*Por me conceder a vida com muita saúde,
por me dar uma família especial,
pelos obstáculos concedidos para que eu pudesse crescer,
por me acompanhar, proteger, conduzir e fortalecer na
execução de meus projetos de vida...*

Por mostrar que tudo é possível para quem Nele crê!

À minha família

Minha esposa, Camila, pelo amor, companheirismo, paciência e por cuidar sempre de mim com muito carinho. Por compreender e apoiar esta jornada, sobretudo os meus momentos de ausência... Sem sua compreensão tudo teria sido mais difícil!

Meus pais, Jucelino e Genoveva, pelo exemplo de fé, honestidade e dedicação aos filhos... Por me fazerem entender o verdadeiro significado da palavra família... Pelo amor, apoio e presença constante, independente dos quilômetros que têm nos separado, ultimamente...

Meus irmãos, Gustavo, Raquel e Angélica, pela nossa valiosa amizade, pelo apoio, por renovarem meu coração e por serem pessoas tão especiais na minha vida.

Meu sobrinho, Gustavinho, pelo amor, pela alegria... Por me remeter sempre à infância quando estamos juntos.

A vocês dedico este trabalho!

*Ao Prof. Dr. João Bosco Oliveira Ribeiro da Silva,
Odontopediatra e Poeta, meu tio,
com muito orgulho*

*....do coração e da memória
de quem sente muitas saudades da amizade, do carinho, do
amor, das brincadeiras, da alegria, do profissionalismo, do
incentivo e das boas conversas...
Minha eterna gratidão e satisfação*

Saudades...

*Ao Prof. Dr. Augusto César Cropanese Spadaro, meu
orientador*

*Minha gratidão, admiração e respeito pelos exemplos e
ensinamentos durante este tempo de convivência.*

*Pela oportunidade, pela paciência e prontidão com que
sempre me atendeu...*

Por acreditar na execução deste trabalho...

*Por poder continuar contando com sua experiência e
orientação...*

Muito obrigado!

À Pátria Amada, Brasil

Pela Biodiversidade...

Pela Baccharis dracunculifolia!

Vale a amizade sim
para valer mais a vida,
para se saber que quando somos unidos,
somos e valemos muito mais
que quando separados.

Vale a amizade sim
para ser aprendizado de partilha,
para ser conquista alcançada,
com esforço e dedicação
unindo braços e coração.

Vale a amizade sim
para provar que amigo
é ombro, choro e sorriso,
é braço, abraço e abrigo,
em todos os momentos,
como presença que se pode contar,
como presente que se deve amar.

Vale o amigo que se tem
e mais ainda o amigo que se é,
acreditando que para o homem
esta é e será sempre sua maior riqueza.

J Bosco

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À pesquisadora Ana Cristina Morseli Polizello, pelo apoio constante, pela presteza, pelos ensinamentos, pela amizade, docilidade e solidariedade, acolhendo-me juntamente com seu marido, Maurílio Polizello Jr. sempre com muito carinho.

À aluna de Iniciação Científica Ingrid Pontes de Sousa, pela dedicação ao projeto e prontidão, pela valiosa colaboração impulsionando a realização de alguns experimentos.

Ao meu amigo João Paulo Barreto de Sousa, do laboratório de farmacognosia da FCFRP, pela valiosíssima contribuição desde antes da existência deste projeto até as etapas de finalização do mesmo, por estar sempre presente, apoiando, criticando e sempre empenhado em conseguirmos bons resultados. À sua esposa Lídiane Cristina Silva que, juntos, formaram “minha família” em Ribeirão Preto acolhendo-me em sua residência sempre de forma hospitaleira.

À minha co-orientadora Profa. Dra. Renata Fonseca Vianna Lopez, do Laboratório de Farmacotécnica da FCFRP, pelo apoio, ensinamentos e orientação.

Ao amigo Alcides Silva Pereira, pela amizade, por sua incessante disponibilidade em me ajudar, por tornar alegres e descontraídos os nossos dias. Pela sua bondade e solidariedade. À sua esposa Ana Maria de Paula Pereira, que juntos sempre me acolheram com muito carinho, preparando sempre deliciosas guloseimas.

À Sra. Nadir Mazzucato, pelas orações. Pela maneira sempre atenciosa, prestativa e carinhosa com que se relacionou comigo.

*À Profa. Dra. Denise Pimenta da Silva Leitão, da FCFRP, por iniciar os estudos de avaliação das propriedades anti-cariogênicas dos extratos de *Baccharis dracunculifolia*, por compartilhar dos objetivos de obtenção deste produto e por acreditar nesta proposta.*

À Laura Martins Valdevite, pela amizade, convivência e pelos momentos de descontração.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica: Profa. Dra. Ana Isabel de Assis Pandochi, à Profa. Dra. Carem Gledes Vargas Rechia, ao Prof. Dr. Carlos Curti e à Profa. Dra. Yara Maria Lucisano Valim.

Às queridas funcionárias e pesquisadoras do laboratório de Bioquímica, Ana Elisa Caleiros Seixas Azzolini, Ieda Maria Razaboni Prado e Luciana Ceribelli pela dedicação, profissionalismo e por toda a ajuda a mim dispensada durante a realização deste trabalho.

À Maria Regina de Pila Raphaeloski, sempre atenciosa e prestativa em todos os momentos.

À amiga Dra. Ana Paula Garcia Landi Librandi pela atenção e pelas boas conversas.

Aos professores Dr. Jairo Kenup Bastos, Dra. Níege Araçari Jacometti Cardoso Furtado e Dr. Fernando Batista da Costa, do laboratório de Farmacognosia da FCFRP, por cederem estrutura para obtenção dos extratos e realização dos experimentos por CLAE.

.

Aos funcionários José Orestes Del Ciampo e Henrique Diniz, do Laboratório de Farmacotécnica da FCFRP, pela valiosa colaboração em algumas etapas deste projeto, atenção e prontidão com que sempre me atenderam.

Ao Prof. Msc. Juliano Geraldo Amaral, meu amigo, companheiro de moradia e de estrada, em grande parte desta jornada, tanto na pós-graduação quanto nas nossas atividades docentes. Agradeço pela colaboração, pela amizade, pela convivência, pelas boas conversas e inúmeros momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Wanderley Pereira de Oliveira pela valiosa contribuição no exame de qualificação, por disponibilizar seu laboratório para a realização dos experimentos

de reologia, pela prontidão e pelas boas conversas. Agradeço também ao seu grupo de pesquisa, especialmente a Dra. Cláudia.

À Prof. Dra. Maria José Vieira Fonseca pelo apoio e discussão de alguns resultados.

Aos funcionários da FCFRP, Franklin, Walter Lopes e Toninho, pela valiosa colaboração na realização de alguns experimentos.

A todos amigos e colegas de pós-graduação do Laboratório de Bioquímica da FCFRP, Adriana Balbina Pascholato, Alexandre Kanashiro, Anaísa Fernandes Calgato Helena, Andréa Garcia Siva de Figueiredo, Carlos Eduardo Mendes d'Angelis, Cássio de Barros Pontes, Cláudia da Silva Bittencourt, César Rangel Pestana, Daniel Junqueira Dorta, Everton de Oliveira Lima Santos, Felipe Fernando Aparecido Mariano de Souza, Fernando Postalli Rodrigues, José Franciraldo de Lima, Livia Maria Cordeiro Simões Ambrósio, Luciana Mariko Kabeya, Miriam Ribeiro Moreira, Taís Nader Chrysostomo e Wagner Rodrigo de Souza, pela agradável convivência.

Aos pós-graduandos do laboratório de Farmacotécnica da FCFRP, Luciana Mattoso Pires de Campos Araújo, Stephânia Fleury Taveira, Daniellê Cristine Almeida Silva de Santana, Guilherme Martins Gelfuso e Joel Gonçalves de Souza, pela convivência, atenção e presteza.

Às pós-graduandas do Laboratório de Farmacognosia da FCFRP, Ana Paula Santin Brancalion e Renata Fabiana Jorge, pela agradável convivência.

Às funcionárias da Seção de Pós-graduação da FCFRP, Ana Lúcia, Rosana e Eleni, que sempre me atenderam prontamente, ajudando-me e solucionando minhas dúvidas.

Aos estagiários de Iniciação Científica, Helga Namie Ferreira Murakami e João Paulo Mello.

Às funcionárias, D. Vera e Margarida, pela agradável convivência, pelas boas conversas e momentos de descontração.

À Profa. Dra. Marílisa Guimarães Lara, da FCFRP, pela valiosa contribuição no exame de qualificação.

Ao Prof. Dr. Auro Nomizo, do Laboratório de Imunologia da FCFRP, por ceder cordialmente a linhagem de células para realização dos experimentos de citotoxicidade.

À Vipi Indústria, Comércio, Exportação e Importação e Produtos Odontológicos, na pessoa do Sr. Ari Ferreira, que prontamente nos atendeu cedendo os dentes para a realização dos experimentos de manchamento.

Ao funcionário Edson Volta, do LIPEM - Laboratório Integrado de Pesquisa de Biocompatibilidade de Materiais, que colaborou na execução dos experimentos de manchamento.

Ao Robson Falcão, funcionário da UFBA e à Regina Agüena Albuquerque, funcionária da FCFRP, que prontamente colaboraram na formatação de alguns materiais.

À Universidade Federal da Bahia, por me conceder afastamentos periódicos para a conclusão deste projeto.

À Quem mui gentilmente sempre acompanhou, incentivou e colaborou de forma grandiosa na execução deste projeto, desde o início e ainda continua acreditando e se empenhando para que este seja finalizado da melhor forma possível.

A todos que direta ou indiretamente estiveram envolvidos no desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

LEITE, M. F. **Desenvolvimento e caracterização de microemulsões contendo extrato e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* para enxaguatório bucal**. 2009. 166p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

O uso de enxaguatórios bucais contendo substâncias ativas antimicrobianas tem sido proposto como um importante meio de redução da formação de biofilme dental supragengival quando usados concomitantemente com higienização mecânica da cavidade bucal. A microemulsão é um moderno sistema de liberação de fármacos, que pode solubilizar tanto compostos lipo quanto hidrossolúveis. Foi demonstrado que extratos de *Baccharis dracunculifolia* (Bd), popularmente conhecido como alecrim-do-campo apresentaram atividade anticariogênica, sugerindo sua utilização em produtos para higiene bucal. No entanto, o extrato de *Baccharis dracunculifolia* é pouco solúvel em água. No presente trabalho, nós desenvolvemos e caracterizamos microemulsões com extrato e óleo essencial das folhas de Bd para incorporar em formulação de enxaguatório bucal sem álcool, com finalidades preventiva e terapêutica, contendo extrato hidroetanólico e óleo essencial das folhas de *Baccharis dracunculifolia* e avaliar o seu efeito sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) *in vitro*. Foram obtidos 4 diagramas de fase pseudo-ternário: 1. Labrasol® (L-polietilenoglicol-8-caprilato/caprato)/Plurol® (P-isoestearato de poligliceril) (3:1)/Oleato Etila - (LP); 2. PEG 40 (óleo de rícino hidrogenado e etoxilado)/Sorbitol (2:1)/ Oleato de etila - (PSO); 3. PEG 40/Sorbitol (2:1)/Miristato de isoropila - (PSM) e 4. PEG 40/Sorbitol/Glicerol (1:1:1)/Oleato de etila e óleo essencial de *B. dracunculifolia* - (PSG). Os sistemas foram caracterizados (microscopia óptica, estabilidade preliminar, reologia, pH, tamanho de gotículas, viscosidade, condutividade elétrica, densidade relativa e índice de refração). Foram desenvolvidas 4 formulações enxaguatórias com a microemulsão escolhida e submetidas à análise sensorial por teste de preferência. O efeito do enxaguatório bucal contendo o extrato hidroetanólico e óleo essencial de *B. dracunculifolia* foi avaliado *in vitro*, sobre fatores cariogênicos de *S. mutans*: inibição do potencial acidogênico, concentração inibitória mínima (CIM) e influência no perfil de crescimento. Além disso, foram avaliados citotoxicidade por MTT e capacidade de

manchamento de dentes de estoque pelo padrão CIELAB do enxaguatório bucal foi O sistema microemulsionado escolhido apresentou as seguintes propriedades físico-químicas: viscosidade de 12,40 cP, tamanho de gotícula 19,53 nm, condutividade 204,63 $\mu\text{S}/\text{cm}$, pH final 4,95, densidade relativa 1,0394g/mL, índice de refração igual a 1,3595. A formulação escolhida para desenvolver o enxaguatório bucal, apresenta pH final igual a 5,89, densidade igual a 1,0425 g/mL, índice de refração de 1,3614 e viscosidade igual a 12,0 cP. O enxaguatório bucal apresentou atividade inibitória sobre a produção bacteriana de ácidos, com valor de CI_{50} igual a 128 μg de extrato bruto/mL da formulação, apresentando CIM (Concentração Inibitória Mínima) igual a 400 μg de extrato bruto/mL da formulação, para uma concentração final de inóculo igual a 5×10^3 ufc/mL. Na avaliação de mudança de coloração dos dentes, o enxaguatório bucal de referência Periogard® (contendo digluconato de clorexidina 0,12%) e o enxaguatório de *B. dracunculifolia* apresentaram valores de ΔE iguais a 2,62 e 0,55 unidades CIELAB, respectivamente, evidenciando que o primeiro mancha os dentes e o segundo não, mas que os dois são clinicamente aceitáveis. Além disso, enxaguatório bucal contendo extrato e óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresenta baixa interferência na proliferação celular, por teste de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium). Os resultados sugerem que a formulação final escolhida possui propriedades antimicrobianas superiores ao extrato hidroetanólico bruto, com baixo efeito citotóxico, credenciando-o para avaliação clínica.

Palavras-chave: enxaguatório bucal, microemulsões, *Baccharis dracunculifolia*, *Streptococcus mutans*, cárie.

ABSTRACT

LEITE, M. F. **Development and characterization of *Baccharis dracunculifolia* microemulsion mouthrinse.** 2009. 166p. Thesis (Doctoral) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

The use of antimicrobial mouthrinses to help the plaques supragingival control and gingivitis has been shown to significantly contribute to patients' daily oral hygiene. Formulations based on microemulsions have several interesting characteristics such as the ability to protect labile drugs, their release control, and to increase their solubility and bioavailability. It has been demonstrated that extracts from *Baccharis dracunculifolia* (Bd), a Brazilian shrub species, popularly known as "alecrim-do-campo", show anticariogenic properties, which suggests its appliance into oral care products. However, *Baccharis dracunculifolia* extracts are poorly water soluble. In this work, we have developed and characterized microemulsions in which *Baccharis dracunculifolia* extract and essential oil may be incorporated to produce a clear solution in an alcohol-free mouthrinse. Four Bd extract - containing microemulsion systems (1) ethyl oleate/Labrasol®/Plurol® (LP), (2) isopropyl miristate/PEG 40/Sorbytol (PSM), (3) ethyl oleate/PEG 40/Sorbytol (PSO) and (4) ethyl oleate/*Baccharis dracunculifolia* extract/essential oil/PEG 40/Sorbytol/Glycerol (PSG), were prepared in aqueous mixtures at room temperature, using the conventional titration technique. The pseudo-ternary phase diagrams were prepared at room temperature. The systems were characterized by optical microscopy, preliminary stability, rheology, pH, droplet size, electrical conductivity, relative density, viscosity and refractive index. The inhibitory effect on bacterial acid production was evaluated through the potentiometric measurement of pH from bacterial suspensions treated with serial concentrations of Bd mouthrinse (16 - 400 µg/mL). For the antibacterial activity assay, the inhibitory effect on bacterial growth and the minimum inhibitory concentrations (MIC) were determined. Bd mouthrinse's four formulations sensory analysis was evaluated at preference test. The cytotoxicity was evaluated by MTT method and staining potential was measured by CIELAB standart. Two regions were identified in the first diagram (bifasic system and microemulsion) while three regions were identified on the others (bifasic system, emulsion and microemulsion). All systems displayed an oil-in-water microemulsion region. The system chosen for the mouthrinse presented viscosity (12.40 cP), droplet size

(19.53nm), conductivity (204.63 μ S/cm), pH (4.95), relative density (1.0394g/mL) and refractive index (1.3595). The chosen mouthrinse presented viscosity (12.00 cP), droplet size (19.53nm), final pH (5.89), relative density (1.0425g/mL) and refractive index (1.3614). The mouthrinse displayed inhibitory effects upon *S. mutans* virulence factors. The IC₅₀ value for the inhibitory effect on the bacterial acid production was 128 μ g/mL. The MIC value was 400 μ g/mL. Bd mouthrinse tested by the agar diffusion method, was not displayed growth inhibition. The acrylic resin teeth stainability test displayed ΔE values of 2.62 CIELAB units for the reference mouthrinse (Periogard®) and 0,55 for Bd mouthrinse. According to results, the reference mouthrinse (Periogard®) causes resin acrylic teeth color variation while Bd mouthrinse did not cause teeth staining or cytotoxicity by MTT method. The Results indicate that these systems could be an interesting Bd vehicle for a mouthrinse and suggest that the final rising formulation has antimicrobial properties superior to the rough hydroetanolic extract, with low cytotoxic effect, turning it credible to clinical evaluation.

Key words: mouthrinse, microemulsion, *Baccharis dracunculifolia*, *S. mutans*, carie

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cárie

O uso de enxaguatórios bucais contendo substâncias ativas antimicrobianas tem sido proposto como um importante meio de redução na formação de biofilme dental supragengival e gengivites quando usados concomitantemente com higienização mecânica da cavidade bucal (MENENDEZ et al., 2005; MANDEL, 1988; OVERHOLSER et al., 1990; LAMSTER et al., 1983; LANG et al., 1982).

A literatura tem mostrado dados consistentes de que o grupo mutans de bactérias gram positivas, particularmente, o *Streptococcus mutans*, são microrganismos sempre presentes no biofilme dental, sendo, portanto, de grande interesse na prevenção de doenças como a cárie e a doença periodontal (McNEIL; HAMILTON, 2003; LI; BURNE, 2001; LOESCHE, 1986; HAMADA; KOGA; OOSHIMA, 1984).

A capacidade do *S. mutans* em iniciar uma cárie depende da associação de vários fatores de virulência, incluindo (i) aderência inicial à superfície dos dentes por meio de glicoproteínas de adesão, (ii) capacidade de sintetizar polissacarídeos extracelulares insolúveis, por meio de enzimas glucosiltransferases (GTFs), o que promove o acúmulo e permanência do microrganismo nas superfícies dos dentes, (iii) alta capacidade para catabolizar carboidratos e produzir ácidos que desmineralizam o esmalte dental e (iv) habilidade para crescer e dar continuidade à metabolização de carboidratos em baixo pH (BANAS, 2004; BURNE, 1998; KURAMITSU, 1993).

A produção de ácidos e a capacidade de metabolização de substratos em meio ácido, foram os primeiros fatores de virulência atribuídos a microrganismos específicos relacionados à etiologia da cárie dental (KÖHLER et al., 1995; LOESCHE, 1986).

A glucose, assim como a sacarose e outros carboidratos provenientes da dieta alimentar, representa uma importante fonte energética para o *S. mutans*. Sua catabolização pela via glicolítica de Embden – Meyerhof – Parnas implica em uma série de reações químicas de óxido-redução, que fornecem energia armazenada na forma de ATP para manutenção dos processos vitais da célula (TAKAHASHI – ABBE et al., 2001).

O transporte de glucose para o citoplasma, através da membrana celular, requer a presença de proteínas transportadoras de membrana específicas. O *S. mutans* possui dois sistemas transportadores de glucose: o sistema de co-transporte de prótons ligado a permease (HAMILTON; St. MARTIN, 1982) e o sistema enzimático fosfotransferase dependente de fosfoenolpiruvato (VADEBONCOEUR; PELLETIER, 1997; SCHACHETELE; MAYO, 1973). O sistema fosfotransferase tem alta afinidade pela glucose (constante de saturação K_s igual a $5,0 \mu\text{mol/L}$), apresentando atividade máxima quando a disponibilidade deste substrato é baixa e o pH do meio está próximo ao neutro. Por outro lado, a permease de membrana tem baixa afinidade pela glucose ($K_s = 100,0 \mu\text{mol/L}$), funcionando apenas quando a concentração deste substrato é alta e o pH do meio está baixo (VADEBONCOEUR; PELLETIER, 1997; ELLWOOD; PHIPPS; HAMILTON, 1979).

Uma vez no interior da célula, a glucose é fosforilada a glucose-6-fosfato e degradada à piruvato pela via glicolítica, provocando um aumento no nível de NADH intracelular pela ação da enzima gliceraldeído-fosfato-desidrogenase (TAKAHASHI-ABBE et al., 2001). Este NADH precisa ser oxidado à NAD^+ , a fim de manter o equilíbrio de óxido-redução celular e possibilitar a continuidade do processo glicolítico (CARLSSON;

HAMILTON, 1994). Para tanto, o *S. mutans* desenvolveu sistemas versáteis de conversão do piruvato em produtos finais ácidos.

Em condições anaeróbicas, particularmente, quando há excesso de substrato, o piruvato é reduzido a L-ácido láctico, através da via da lactato-desidrogenase. Ao reduzir piruvato à L-lactato, NADH é oxidado à NAD⁺ preservando o balanço óxido-redutor da célula (IWAMI; YAMADA, 1999). Por outro lado, este processo provoca um aumento da concentração hidrogeniônica no citoplasma, o que poderia ser fatal para o microrganismo. Contudo, o *S. mutans* é capaz de manter o pH intracelular 0,5 a 1,0 unidade acima do pH extracelular, permitindo-lhe desenvolver-se e nutrir-se em valores de pH iguais ou inferiores a 4,0 (BURNE, 1998). Esta notável tolerância à acidez, que confere ao microrganismo um caráter acidúrico, está relacionada à capacidade desta espécie em bombear prótons H⁺ para fora da célula através de F – ATPases de membrana.

O uso de substâncias agindo no metabolismo bacteriano inibindo a produção ácida apresenta efeitos anticariogênicos sinérgicos na presença de fluoreto (TRAHAN, 1995), que é uma reconhecida substância de uso mundial no controle da cárie dental, com efeito significativo, interferindo fisicoquimicamente no desenvolvimento da cárie dental, reduzindo a desmineralização e aumentando a remineralização do esmalte dental (DAWES; TEN CATE, 1990).

1.2. Enxaguatórios Bucais

A prática de enxaguar a boca é usada por humanos há mais de 2000 anos, sendo que a mesma foi atribuída pela primeira vez aos chineses (WEINBERGER, 1948). No entanto, há pouco mais de 30 anos ocorreu a chegada de um enxaguatório bucal disponível

comercialmente, especificamente formulado para controlar a placa supragengival e gengivite (MORAN, 2008).

Reconhece-se que enxaguatórios bucais são veículos ideais para se incorporar substâncias químicas que promovem hálito fresco e ajudam a atenuar o problema de mau odor bucal. Como resultado da facilidade de utilização de um enxaguatório bucal, algumas melhorias podem ser esperadas (QUIRYNEN, 2003; YAEKAKY et al., 2002), tais como: melhorar o hálito e o frescor da boca, prevenção de problemas bucais, como a cárie dentária, controle de cálculo dental, redução de sensibilidade dentinária, alívio de patologias orais, como ulcerações orais e, sobretudo, pela prevenção da formação do biofilme dental. No entanto, os enxaguatórios bucais têm pouca penetração no ambiente subgengival (MORAN, 2008; PITCHER; NEWMAN; STRAHAN, 1980).

Devido ao controle mecânico do biofilme dental bacteriano pela maioria dos indivíduos serem muitas vezes inadequado, os enxaguatórios bucais deveriam ajudar a reduzir o biofilme deixado pelas falhas de escovação (ADDY, 2003).

Atualmente, por várias razões apontadas a seguir, tem havido uma demanda por enxaguatórios bucais livres de álcool. Assim, enxaguatórios bucais contendo cloreto de cetilpiridíneo, clorexidina, triclosan, além de compostos amino fluoretados e fluoreto de estanho, sem a inclusão de álcool, tem sido avaliados quanto à eficácia, sendo que alguns já foram introduzidos ao mercado (GURGAN et al., 2006; ALMERICH et al., 2005; BLENMAN et al., 2005). A ideia de preparar enxaguatórios bucais livres de álcool tem sido baseada, preliminarmente em: (i) razões sociais, que incluem objeções religiosas além do potencial de detecção de álcool no hálito e (ii) razões de saúde, uma vez que a mucosa oral de alguns indivíduos é sensível ao álcool, mostrando aumento evidente de desconforto proporcionalmente à concentração de álcool (MORAN, 2008; BOLANOWSKI;

GESCHEIDER; SUTTON, 1995). Outro problema decorrente da inclusão de álcool em enxaguatórios bucais inclui o amolecimento e a redução da estabilidade de cor de restaurações (VON FRAUNHOFER et al., 2006) e a possibilidade de aumentar o risco de desenvolvimento de câncer bucal (CARRETERO PELAEZ et al., 2004).

Faz-se importante saber se a inclusão ou exclusão de álcool poderia afetar o efeito e atividade dos enxaguatórios bucais. Há evidências de que enxaguatórios, sem adição de álcool, não tendem a ser menos efetivos que enxaguatórios que contêm álcool (ALMERICH et al., 2005; VAN STRYNDONCK et al., 2005) e que realmente a ausência de álcool parece reduzir a incidência de efeitos adversos tais como irritação e distúrbio de paladar (ALMERICH et al., 2005). Inversamente, segundo Gurgan et al. (2006) as reações adversas com enxaguatórios bucais não alcoólicos, contendo clorexidina em concentração igual a 0,2%, mostraram-se aumentadas, incluindo maior irritação da mucosa oral, aumento de sensação de queimadura e alteração na percepção de sabor (GURGAN et al., 2006).

No controle químico do biofilme dental bacteriano, através do uso de enxaguatório bucal, um agente antimicrobiano deveria inibir o estágio de adesão da colonização bacteriana no biofilme dental, afetando o crescimento e a atividade metabólica dos microrganismos do biofilme sem, entretanto, a interferência em qualquer outro processo biológico. Além disso, a toxicidade deveria ser baixa, uma vez que tais soluções, ao serem utilizadas, poderiam ser eventualmente engolidas (GUIMARÃES et al., 2006). A associação dos efeitos cariostáticos do fluoreto a agentes antimicrobianos, tem sido sugerida (KATZ, 1982; LEITE et al., 2008) e esta combinação tem sido mostrada como efetiva em lesões cariosas de pacientes irradiados com capacidade tamponante salivar mínima devido às baixas taxas de fluxo de saliva (KATZ, 1982).

A substância antimicrobiana mais comumente utilizada é a clorexidina, devido à sua comprovada eficácia em alterar as funções de membrana, controlando o biofilme dental e inibindo o metabolismo de microrganismos, uma vez que interfere na produção ácida do biofilme dental bacteriano (GUIMARÃES et al., 2006; VAN RIJKOM; TRUIN; VAN 'T HOF, 1996).

Por outro lado, a clorexidina é conhecida por causar, além das reações adversas já mencionadas, efeitos adversos diretamente relacionados com o aumento da concentração (YATES et al., 1993), tempo de uso e com o consumo de alguns agentes cromogênicos, tais como café ou chá, por exemplo, que podem aumentar o manchamento dos dentes, que é um dos problemas mais reconhecidos relacionados à clorexidina (GUIMARÃES et al., 2006).

Além disso, o sabor amargo da clorexidina e a redução temporária da percepção de alguns sabores poderiam comprometer a adesão ao tratamento com enxaguatórios bucais contendo clorexidina (LEARD; ADDY, 1997).

1.3. *Baccharis dracunculifolia* – Alecrim-do-campo

O gênero *Baccharis*, pertencente à família Asteraceae e à tribo Astereae, possui cerca de 500 espécies distribuídas principalmente no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai. A grande concentração de espécies no Brasil, principalmente no cerrado, indica que esta região é um provável centro de origem do gênero (FERRACINI et al., 1995). No Brasil estão descritas 120 espécies de *Baccharis*, com a maior parte delas localizada na região sudeste do país. As plantas deste gênero são em geral arbustos, como a vassoura e a carqueja, que medem até quatro metros de altura (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

A maioria das espécies do gênero *Baccharis* apresenta elevado valor sócio-econômico, com ampla dispersão nos estados de São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais e Paraná, onde grande número delas, segundo Verdi, Brighente e Pizzolatti, (2005), é utilizado na medicina popular. É consumida principalmente, na forma de chás com indicações para males do estômago, fígado, anemias, inflamações, diabetes, doenças na próstata, sendo também descritas como remédio para o processo de desintoxicação do organismo.

Baccharis dracunculifolia DC (Asteraceae), conhecida popularmente como “alecrim-do-campo” e “vassoura”, é um arbusto lenhoso, nativo do Brasil, ocorrendo nas regiões sul, sudeste e centro-oeste (BARROSO, 1976). Cresce principalmente em áreas de cerrado, pastagens abandonadas e áreas em processo de sucessão (BASTOS, 2001; FERRACINI, et al., 1995), onde se adapta facilmente a habitats pobres em nutrientes e pastagens abandonadas. A figura 1 destaca ramo e ápices foliares de *B. dracunculifolia*.

Figura 1. Ramo e ápices foliares de *Baccharis dracunculifolia* conhecida como alecrim-do-campo ou alecrim-de-vassoura. Fotografado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas - CPQBA, Unicamp (Campinas, SP)
Fonte: LEITÃO, 2005.

Considerando seu emprego na medicina popular, Shuhama (1988), Queiroga, Fukai e Marsaioli (1990), além de Fernandez, Sandi e Kokoska (2003) relatam o uso desta espécie no tratamento de feridas e processos inflamatórios, além de ser utilizada para combater doenças gastrointestinais e hepáticas. Além disso, o alecrim-do-campo tem sido objeto de numerosos estudos entomológicos, devido à sua riqueza de insetos herbívoros e galhadores (ESPÍRITO-SANTO; FARIA; FERNANDES, 2004; ESPÍRITO-SANTO; FERNANDES, 1998) destacando-se, principalmente por sua relação peculiar com as abelhas *Apis mellifera*. De acordo com Bankova et al. (1999), Park et al. (2004) e Kumazawa et al. (2003), *Baccharis dracunculifolia* é uma das principais fontes botânicas para produção da própolis “verde” produzida no sudeste brasileiro. A figura 2 destaca abelhas (*Apis mellifera*) visitando os ápices foliares desta planta.

Figura 2. Interação entre *Apis mellifera* e *B. dracunculifolia*, uma das principais fontes da própolis “verde”.

Fonte: Sousa et al., 2009a

B. dracunculifolia vem se destacando na comunidade científica mundial, especialmente nos últimos 10 anos. O extrato das partes aéreas desta planta já foi submetido a diferentes ensaios biológicos, os quais demonstraram que este apresenta atividades antimutagênica (MUNARI et al., 2008), imunomodulatória (MISSIMA et al., 2007), anticariogênica (LEITE et al., 2008; LEITÃO et al., 2004), entre outras. Aliados aos resultados destes diferentes ensaios, Sousa (2009a) demonstrou que o cultivo desta planta é bastante viável, no que diz respeito à obtenção de extrato bruto e óleo essencial em escala industrial, sendo que a mesma se apresenta pronta para colheita após o 12º mês de cultivo.

Considerando a composição química desta espécie, já foram identificados no mínimo 100 diferentes compostos pertencentes às classes de diterpenos, triterpenos, ácidos fenólicos, flavonóides, derivados prenilados do ácido cumárico, entre outros (os quais têm demonstrado distintas atividades biológicas (LEMOS et al., 2007; FUKUDA et al., 2006; SALATINO et al., 2005; PARK et al., 2004; AKAO et al., 2003). De uma maneira geral, no extrato hidroalcoólico das folhas de alecrim-do-campo é possível detectar 10 compostos fenólicos promissores: ácido caféico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido cinâmico, AME (aromadendrina-4'-metil éter), isosakuranetina, drupanina, artepelin C, bacarina e DCBEN (2,2-dimetil-6-carbóxi-etenil-2H-1-benzopirano) (SOUSA et al., 2009b).

Considerando os compostos fenólicos detectados nas folhas desta espécie, o ácido 3,4-diprenil-4-hidróxicinâmico, conhecido como artepelin C, inibiu peroxidação lipídica e o desenvolvimento de células cancerosas pulmonares em camundongos, além de ser considerado um importante quimio-preventivo com relação ao desenvolvimento de carcinomas uterinos (PIANTINO et al., 2008). Estudos realizados com os flavonóides aromadendrina-4-metil éter – AME e a isosakuranetina sugerem que a ingestão destes pode

influenciar os processos fisiológicos potencializando o efeito da cicatrização, bem como agindo como potentes agentes antioxidantes (SAWAYA et al., 2004). Já os derivados do ácido *p*-cumárico demonstraram ação positiva contra *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *T. cruzi* (SALOMÃO et al., 2008). Artepelin C e DCBEN também foram ativos contra *T. cruzi* e *S. aureus* (MARCUCCI et al., 2001). Adicionalmente, Barros et al. (2008) divulgaram que os ácidos caféico, ferúlico, *p*-cumárico e cinâmico possuem atividade gastro-protetora.

Os óleos voláteis ou essenciais, produtos do metabolismo secundário, são definidos como misturas complexas de mono, sesqui e diterpenos, os quais possuem grande valor agregado devido às suas aplicações em medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos (PINTO et al., 2002). Apresentam como principais características o sabor acre e picante, quando recentemente extraídos são incolores ou ligeiramente amarelados e possuem baixa estabilidade na presença de ar, luz, calor, umidade e metais. Os óleos essenciais já foram considerados como “desperdício fisiológico” (KNOBLOCH et al., 2003), ou mesmo como produto de desintoxicação (MOTHES, 2003). Hoje, sabe-se que o acúmulo desses metabólitos tem função de proteger a planta contra parasitas, competidores e agentes predadores e, desse modo, possuindo um papel fundamental dentro da ecologia química (SPRING, 2000).

Nas amostras de óleos essenciais proveniente das folhas de Bd já foram detectados no mínimo 50 componentes, sendo que os mais conhecidos são: α -pineno, β -pineno, limoneno, trans-cariofileno, aromadrendeno, α -humuleno, germacreno D, biciclogermacreno, δ -cadineno, nerolidol, espatulenol, virilidol, guaiol e α -muurulol (SOUSA et al., 2009c) (Figura 3). O sesquiterpeno oxigenado nerolidol (33,5 %) é o componente majoritário seguido por espatulenol com percentual relativo de 16 %. É importante ressaltar que o óleo essencial de *B. dracunculifolia* possui aroma exótico e propriedades odoríferas

intensas. Estudos realizados por Sousa et al. (2007) demonstraram que o nerolidol pode ser detectado nesta planta em todo período do ano e em elevadas quantidades. Assim, com base neste perfil de variabilidade estas propriedades odoríferas podem ser atribuídas principalmente à presença deste sesquiterpeno oxigenado. Destaca-se, ainda, que este metabólito é de interesse para indústria de fragrâncias, pois o mesmo é utilizado como matéria-prima na produção de perfume exótico. Além disso, segundo Klopel et al. (2007), o nerolidol apresenta atividade antiulcerogênica.

Figura 3: Perfil cromatográfico do óleo essencial de alecim-do-campo por CG-DIC. X. a = piperonal, padrão interno utilizado como referência. 1. α -pineno; 2. β -pineno; 3. limoneno; 4. trans-cariofileno; 5. aromadrendeno; 6. α -humuleno; 7. germacreno D; 8. biciclogermacreno; 9. β -cadineno; 10. nerolidol; 11. espatulenol; 12. virilidol; 13. guaiol e 14. α -muurulol

Fonte: SOUSA, 2007.

Tem sido demonstrado que extratos apolares das folhas e óleo essencial das folhas frescas de *Baccharis dracunculifolia* apresentaram propriedades anticariogênicas significativamente semelhantes (LEITÃO et al., 2004) àquelas encontradas no extrato de própolis verde (DUARTE et al., 2003; KOO et al., 2002; KOO et al., 2000; PARK et al.,

1998), sugerindo que este potencial terapêutico também pode ser explorado na matéria-prima vegetal.

Estes foram os primeiros relatos na literatura discutindo uma possível aplicação terapêutica de extratos de *B. dracunculifolia* na manutenção da saúde bucal. Desta maneira, dando continuidade a estes estudos, buscamos desenvolver uma formulação farmacêutica, para enxaguatório bucal, que seja capaz de veicular o extrato das folhas e o óleo essencial de *B. dracunculifolia*, preservando sua atividade biológica e/ou propriedade terapêutica.

1.4. Microemulsões

Dentre os diversos sistemas utilizados como veículos e sistemas de liberação de substâncias ativas podem-se destacar as microemulsões, ou seja, emulsões que apresentam gotículas menores que 1 μm , geralmente na faixa de 0,1 μm (AULTON, 2005; OLIVEIRA et al., 2004; ANSEL; POPOVICH, ALLEN, 1999) (Tabela 1), nas quais um óleo ou um fármaco lipofílico é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado. Apresentam-se como dispersões isotrópicas líquidas, transparentes e termodinamicamente estáveis, compostas por água, óleo e tensoativos (OSBORNE; MIDDLETON; ROGERS, 1988). A combinação precisa dessas substâncias faz com que esse sistema forme-se espontaneamente, sem a necessidade de forte agitação ou altas temperaturas. Para obtê-las são utilizados tensoativos não-iônicos (DJORDJEVIC; PRIMORAC; STUPAR, 2005; CONSTANTINIDES; SCARLAT, 1997).

Tabela 1. Estrutura Granulométrica das Emulsões.

	Aparência	Denominação	Aspecto
2 - 20 μ m		Macro emulsão	Branca leitosa
0,1 – 0,3 μ m		Nanoemulsão	Branca azulada
< 0,1 μ m		Microemulsão	Translúcida
0,01 μ m		Soluções micelares	Transparentes
0,001 μ m		Soluções moleculares	Transparentes

Fonte: (ANSEL; POPOVICH, ALLEN, 1999)

Normalmente, os sistemas microemulsionados podem ser diferenciados visualmente dos outros, uma vez que os demais sistemas apresentam como emulsões líquidas opacas, emulsões géis opacas, representadas por sistemas de viscosidade elevada, ou com separação de fases. Já os sistemas microemulsionados líquidos são caracterizados como sistemas translúcidos ou opticamente transparentes (FORMARIZ, 2004).

Apesar das microemulsões apresentarem várias vantagens com respeito à facilidade de preparação, alta estabilidade e limpidez, os sistemas mais comumente examinados apresentam álcoois de cadeia curta como o butanol, pentanol e hexanol, os quais apresentam certa toxicidade e tornam esses sistemas inadequados para propósitos farmacêuticos. No entanto, o uso destas substâncias, conhecidas como cotensoativos, não é obrigatório e microemulsões “livres de álcool” vêm sendo descritas na literatura (SUBRAMANIAN et al., 2005; GELFUSO; LOPEZ, 2003; OSBORNE; MIDDLETON; ROGERS, 1988). Além disso, dois tensoativos pouco irritantes, o Labrasol e o Óleo de Rícino Hidrogenado e etoxilado (PEG 40)

têm demonstrado capacidade de formar microemulsões com alguns co-tensoativos não alcoólicos, diminuindo o risco de reações toxicológicas e aumentando a relevância farmacêutica das microemulsões (SINTOV; SHAPIRO, 2004; KREILGAARD, 2002). Portanto, é desejável o desenvolvimento de microemulsões que possam ser preparadas em larga escala, com óleos e tensoativos seguros, atóxicos e não-irritantes e com componentes que são normalmente conhecidos como seguros.

A literatura mostra que a adição de um cotensoativo diminui o tamanho das gotículas e amplia as regiões de microemulsões (KUNEIDA; UMIZU; YAMAGUCHI, 1999). Dessa forma, o tamanho da gotícula é fortemente afetado pela mistura de tensoativo no sistema, havendo tendência à diminuição do tamanho das gotículas com o aumento da concentração de tensoativo, gerando sistema opticamente transparente ou translúcido (LUNDBERG; MORTIMER; REDGRAVE, 1996). Isso ocorre porque a mistura de tensoativo com um cotensoativo é mais eficiente em reduzir a tensão interfacial entre óleo-água, proporcionando a redução máxima do tamanho das gotículas da fase interna (TROTTA; PATTARINO; IGNONI, 2002).

A natureza e estrutura do tensoativo, cotensoativo e óleo são fatores essenciais na formulação de sistemas microemulsionados. A construção de diagramas de fase pode ser uma ferramenta fundamental para caracterizar em que condições experimentais as microemulsões existem e em que proporções dos componentes outras estruturas podem estar presentes. A partir desses dados, pode-se selecionar a região do diagrama de fases que mais convenientemente represente a condição mais apropriada para que o fármaco seja incorporado (FORMARIZ, 2004).

Do ponto de vista microestrutural, as microemulsões podem ser do tipo água em óleo (A/O), óleo em água (O/A) ou estruturas bicontínuas (CRUZ; UCKUN, 2001) (Figura 4). Nas microemulsões do tipo A/O, o componente hidrofílico é disperso na forma de gotículas coloidais

no componente lipofílico. Já nas microemulsões do tipo O/A, o componente lipofílico é disperso na forma de gotículas coloidais no componente hidrofílico (CRUZ; UCKUN, 2001; MO; ZHONG; ZHONG, 2000) e ambas podem ser invertidas de A/O para O/A ou vice-versa ao variar as condições de emulsificação (MO; ZHONG; ZHONG, 2000). Em relação ao último tipo de sistema microemulsionado, os componentes hidrofílicos e lipofílicos formam microemulsão com estrutura bicontínua, com canais adjacentes alongados com gotículas na faixa de 1-100 nm (CRUZ; UCKUN, 2001), como uma rede de tubos aquosos em matriz oleosa ou rede de tubos oleosos em matriz aquosa (MO; ZHONG; ZHONG, 2000).

Figura 4. Representação esquemática da organização das microemulsões

Fonte: FORMARIZ et al., 2005, modificado.

As microemulsões apresentam várias propriedades biológicas e farmacêuticas interessantes, entre elas pode-se citar: biodegradabilidade, biocompatibilidade, estabilidade física e facilidade de obtenção. Sendo assim, elas têm sido muito utilizadas como carreadoras de fármacos lipofílicos (TABOSA DO EGITO et al., 1996), na estabilização de substâncias susceptíveis a hidrólise (SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000), na diminuição da irritação ou toxicidade de alguns fármacos (KREILGAARD; PEDERSEN; JAROSZEWSKI, 2000), como sistemas de liberação sustentada através da formação de depósito após a injeção subcutânea e como sistema de liberação sítio específica (MBELA; VERSCHUREN, 1997; PANKERD; STELLA, 1990). No entanto, existem relativamente poucos estudos com relação à administração tópica de microemulsões (GELFUSO; LOPEZ, 2003; WU et al., 2001; KREILGAARD; PEDERSEN; JAROSZEWSKI, 2000; DELGADO-CHARRO et al., 1997; OSBORNE; WARD; O'NEILL, 1991), sendo encontrado um relato de uso de microemulsão bucal para tratamento de líquen plano eritematoso (AGUIRRE et al., 2004). No entanto, não foi encontrado nenhum relato de microemulsão enxaguatória bucal com fins preventivos, descrito na literatura.

As microemulsões diferem das emulsões não somente por serem opticamente transparentes, mas essencialmente, pela estabilidade termodinâmica. Assim, em proporções adequadas entre seus componentes e em condições de temperatura, pressão e força iônica constantes, o sistema forma-se espontaneamente, quando a energia remanescente da interface está próxima de zero (OLIVEIRA et al., 2004).

1.5. Considerações

A resistência bacteriana levanta sérias preocupações para a continuidade da eficácia de agentes antimicrobianos na medicina, na agricultura e na indústria (MILNER,

1996). Com o aumento da prevalência de resistência microbiana para os antissépticos convencionais, a atenção agora está voltada para o uso de componentes antimicrobianos naturais (COWAN, 1999). O aumento na demanda por novos antimicrobianos tem provocado várias investigações em direção à busca de efeitos antimicrobianos de fitoquímicos extraídos de uma gama de espécies de origem botânica (LEITE et al., 2005; LEITÃO et al., 2004; HWANG et al., 2003; KATSURA et al., 2001).

Assim, considerando o potencial anti-cariogênico de *Baccharis dracunculifolia* relatado por nosso grupo de pesquisa, a proposta do presente trabalho foi desenvolver um enxaguatório bucal que veiculasse o extrato bruto hidroetanólico e óleo essencial de *B. dracunculifolia*. Como o extrato é insolúvel na água, optou-se por desenvolver uma microemulsão com fase externa aquosa, com baixa toxicidade, desprovido de propriedade de manchamento de dentes e que mantivesse as propriedades biológicas dos extratos.

Conclusões

5. CONCLUSÕES

5.1. Foi possível obter microemulsões com os quatro diagramas LP, PSO, PSM e PSG, todos apresentando ampla região de microemulsão, com possíveis aplicações farmacêuticas ou cosméticas.

5.2. As microemulsões selecionadas apresentaram-se como sistemas estáveis.

5.3. As microemulsões selecionadas apresentaram tamanho de gotículas: LP – 83,10 a 549,67 nm; PSO - 20,83 a 21,97 nm; PSM – 21,27 a 24,73 nm; e PSG – 15,70 a 25,70 nm.

5.4. A microemulsão escolhida para desenvolvimento da formulação enxaguatória bucal foi a PSG 5, que apresentou viscosidade de 12,40 cP, tamanho de gotícula 19,53 nm, condutividade de 204,63 $\mu\text{S/cm}$, pH de 4,95, densidade relativa de 1,0394 e índice de refração igual a 1,3595.

5.5. A formulação enxaguatória bucal número 2 foi aceitável e a preferida dentre as quatro formulações avaliadas sensorialmente, apresentando pH final igual a 5,89, densidade igual a 1,0425 g/mL, índice de refração de 1,3614 e viscosidade igual a 12,0 cP.

5.6. O enxaguatório bucal contendo extrato bruto e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* inibiu o pontencial acidogênico de *S. mutans* em perfil dose – dependente na

faixa de concentração de 16 a 400 µg/mL. O valor de CI_{50} para o extrato ficou estabelecido em 128 µg/mL (expresso em concentração de extrato Bd).

5.7. O valor da Concentração inibitória mínima (CIM) foi de 400 µg/mL para o enxaguatório bucal Bd (expresso em concentração de extrato Bd).

5.9. Em concentração 2,5 vezes menor do que a proposta para a formulação, o enxaguatório bucal interferiu no perfil de crescimento de *S. mutans*, diminuindo sua taxa de multiplicação celular e inibindo-a quase completamente.

5.10. O enxaguatório bucal contendo extrato bruto e óleo essencial de *B. dracunculifolia* apresentou pouca interferência na proliferação celular, na avaliação de citotoxicidade por MTT, evidenciando que o mesmo pode ser utilizado de forma segura.

5.11. O enxaguatório bucal contendo extrato bruto e óleo essencial de *Baccharis dracunculifolia* não mancha os dentes, sendo aceitável clinicamente.

5.12. Os resultados sugerem que a formulação final escolhida possui propriedades antimicrobianas superiores ao extrato hidroetanólico bruto, com baixo efeito citotóxico, credenciando-o para avaliação clínica.

*Referências
Bibliográficas*

6. Referências Bibliográficas¹

ABOOFAZELI, R.; BARLOW, D.; LAWRENCE, M. J. Particle size analysis of concentrated Phospholipid microemulsions II. Photon correlation spectroscopy. **AAPS PharmSci**, Alexandria , v. 2, n. 3, E.19, 2000.

ADDY, M. Oral hygiene products: potencial for harm to oral and systemic health? **Periodontology** **2000**, Singapura, v. 48, p. 54-65, 2008.

ADDY, M. The use of antiseptics in periodontal therapy. In: LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG, N. **Clinical periodontology and implant dentistry**. Oxford: Blackwell Munksgaard, 2003. p. 467–481.

AGUIRRE, J. M.; BAGA, J. V.; RODRIGUEZ, C.; JIMENEZ, Y.; MARTINEZ-CONDE, R.; DIAZ DE ROJAS, F.; PONTE, A. Efficacy of mometasone furoate microemulsion in the treatment of erosive-ulcerative oral lichen planus: pilot study. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Copenhagen, v. 33, p. 381-385, 2004.

AKAO, Y.; MARUYAMA, H.; MATSUMOTO, K.; OHGUCHI, K.; NISHIZAWA, K.; SAKAMOTO, T.; ARAKI, Y.; MISHIMA, S.; NOZAWA, Y. Cell growth inhibitory effect of cinnamic acid derivatives from propolis on human tumor cell lines. **Biology Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo v. 26, p. 1057-1059, 2003.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WATSON, J.D. **Molecular biology of the cell**. New York: Plenum Press, 1989, p.123-156.

ALMERICH, J. M.; CABEDO, B.; ORTOLA, J. C.; POBLET, J. Influence of alcohol in mouthwashes containing triclosan and zinc: an experimental gingivitis study. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 32, p. 539–544, 2005.

ANDRADE, F. F. Desenvolvimento e avaliação de cristais líquidos obtidos em emulsões O/A à base de óleo de andiroba e éter fosfórico. 2008. 115 f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

¹ De acordo com: **Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP**: documento eletrônico e impresso. 2ed. São Paulo: USP, 2009.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN Jr, L.V. Formas farmacêuticas & sistemas de liberação de fármacos. 6ed. São Paulo: Premier, 1999.

ANVISA. **Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2004, 52p.

ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos**. Brasília: ANVISA, 2003, 43p.

ATKINSON, H. V. Modelling the semisolid processing of metallic alloys. *Progress in Materials Science*, v. 50, p. 341 – 412, 2005.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2a. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 678p.

AZZINI, R. G. Desenvolvimento e avaliação *in vitro* e *in vivo* de emulsões contendo óleo de canola e ácidos carboxílicos. 1999, 169 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1999.

BANAS, J.A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Bioscience**, Searington, v. 1, n. 9, p. 1267-1277, 2004.

BANKOVA, V. S.; BRASTEVA, G. B.; SFORCIN, J. M.; FRETE, X.; KUJUMGIEV, A.; RODELLA, R. M.; POPOV, J. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian própolis from São Paulo state. **Zeitschrift für Naturforschung [C]**, Tübingen, v. 54, n.5-6, p. 401-405, 1999.

BARNES, H. A. Rheology of emulsions – a review. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, Amsterdam, v. 91, p. 89-95, 1994.

BARNES, H. A. Tixotropy—a review. *Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics*, v. 70, n. 1, p. 1-33, 1997.

BAROLI, B.; LOPEZ-QUINTELA, M. A.; DELGADO-CHARRO, M. B.; FADDA, A. M.; BLANCO-MENDEZ, J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxalen. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 69, p. 209-218, 2000.

BARROS, M. P.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; LEITE, M. F.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Própolis. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 120, p. 372-377, 2008.

BARROSO, G. Compositae - subtribo *Bacchariridinae* Hoffman: Estudo das espécies ocorrentes no Brasil. **Rodriguesia**, Rio de Janeiro, v. 40, p. 7-273, 1976.

BASTOS, E. M. A. F. **Origem Botânica e Indicadores de Qualidade da "Própolis Verde" Produzida no Estado de Minas Gerais, Brasil**. 2001. 137 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

BENNETT, K. E.; HATFIELD, J. C.; DAVIS, H. T.; MACOSKO, C. W.; SCRIVEN, L. E. Viscosity and conductivity of microemulsions. In: ROBB, I. D. **Microemulsions**. New York: Plenum Press, 1982, p. 65-84.

BLENMAN, T. V.; MORRISON, K. L.; TSAU, G. J.; MEDINA, A. L.; GERLACH, R. W. Practice implications with an alcohol-free, 0.07% cetylpyridinium chloride mouthrinse. **American Journal of Dentistry**, San Antonio, v. 18, p. 29A-34A, 2005.

BOLANOWSKI, S. J.; GESCHIEDER, G. A.; SUTTON, S. V. Relationship between oral pain and ethanol concentration in mouthrinses. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 30, p. 192-197, 1995.

BOONME, P. Applications of microemulsions in cosmetics. **Journal of Cosmetic Dermatology**, Oxford, v. 6, p. 223-228, 2007.

BORKOVEC, M.; EICKE, F.; HAMMERICH, H.; DAS GUPTA, B. Two percolation process in microemulsion. **The Journal of Physical Chemistry**, Easton, v. 92, p. 206-211, 1988.

BURNE, R. A. Oral streptococci: products of their environment. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 77, p. 445-452, 1998.

CARLSSON, J.; HAMILTON, I. Metabolic activity of oral bacteria. In: THYLSTRUP, A; FEJERSKOV, O. (Ed.). **Textbook of Clinical Cariology**. 2ed. Copenhagen: Munksgaard, 1994. p. 71-88.

CARRETERO PELAEZ, M. A.; GOMEZ, G. C. E.; FIGUERO, R. E.; LAPIEDRA, R. C. Alcohol-containing mouthwashes and oral cancer. Critical analysis of literature. **Medicina Oral**, Madrid, v. 9, p. 116-123, 2004.

CIE (International Commission on Illumination). In: **Colorimetry - Technical Report CIE**, 2nd ed. n. 15. Vienna: CIE Central Bureau, 1994.

CLOSE, J. The concept of sensory quality. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, Detroit, v. 45, p. 95-107, 1994.

CONSTANTINIDES, P. P.; SCARLAT, J. P. Formulation and physical characterization of water-in oil microemulsions containing long- versus medium-chain glycerides. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 158, p. 57-68, 1997.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 564-582, 1999.

CRUZ, D.J. O.; UCKUN, M. F. Gel-microemulsions as vaginal spermicidal and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, Stoneham, v. 64, p. 113-123, 2001.

DALGAARD, P.; KOUTSOUMANIS, K. Comparison of maximum specific growth rates and lag times estimated from absorbance and viable count data by different mathematical models. **Journal of Microbiological Methods**, Amsterdam, v. 43, p. 183-196, 2001.

DAWES, C.; TEN CATE, J. M.; Mechanisms of action and recommendation for use. **Journal of Dental Research**, Chicago, v.69, p. 505-836, 1990.

DELGADO-CHARRO, M. B.; IGLESIAS-VILAS, G.; BLANCO-MENDEZ, J.; LOPEZ-QUINTELA, M. A.; MARTY, J. P.; GUY, R. H. Delivery of hidrofobic solute through the skin from novel microemulsion systems. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Amsterdam, v. 43, p. 37-42, 1997.

DI MAMBRO, V. M. Desenvolvimento de formulações com superóxido dismutase: avaliação da estabilidade física das formulações e da atividade enzimática. 2001. 138 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M. In vitro release of diclofenac diethylamine from caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsions. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 296, n. 1/2, p. 73-79, 2005.

DJORDJEVIC, L.; PRIMORAC, M.; STUPAR, M.; KRAJISNIK, D. Characterization of caprylocaproyl macrogolglycerides based microemulsion drug delivery vehicles for an amphiphilic drug. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 271, p. 11-19, 2004.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Effect of a novel type of propolis and its chemical fractions on glucosyltransferases and on growth and adherence of mutans streptococci. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 64, p. 711-713, 1998.

ELWOOD, D. C.; PHIPPS, P. J.; HAMILTON, J. R. Effect of growth rate and glucose concentration on the activity of the phosphoenolpyruvate phosphotransferase system in *Streptococcus mutans* Ingritt grow in continuous culture. **Infection and Immunity**, Washington, v. 23, p. 224-231, 1979.

ESPÍRITO-SANTO, M. M.; FARIA, M. L.; FERNANDES, G. W. Parasitoid attack and its consequences to the development of the galling psyllid *Baccharopelma dracunculifoliae*. **Basic and Applied Ecology**, München, v. 5, p. 475-484, 2004.

ESPÍRITO-SANTO, M. M.; FERNANDES, G. W. Abundance of *Neopelma baccharidis* (Homoptera: Psyllidae) galls on the dioecious shrub *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae). **Environmental Entomology**, Lanham, v. 27, p. 860-867, 1998.

FALLEIROS JR., H. B.; AUN, C. E. Clareamento dental – Clareamento de dentes despulpados. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 217-221, 1990.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. Parte II. São Paulo: Atheneu, 1988

FERNANDEZ, E. C.; SANDI, Y. E.; KOKOSKA, L. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used in the Bustillo Province of the Potosi Department, Bolivia. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 74, p. 407-416, 2003.

FERRACINI, V. L.; PARAÍBA, L. C.; LEITÃO FILHO, H. F.; DA SILVA, A. G.; NASCIMENTO, L. R.; MARSAIOLI, A. J. Essential oils of seven Brazilian *Baccharis* species. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 7, p. 355-367, 1995.

FERREIRA, A. O. **Guia Prático da Farmácia Magistral**. 3ed. São Paulo: Pharmabooks, 2008, 410p.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia**. São Paulo: EDUSP, 2003, 736p.

FORMARIZ, T. P. Incorporação da doxorrubicina em microemulsões estabilizadas por fosfatidilcolina de soja e estudo da atividade antiproliferativa *"in vitro"* através de cultura de células. 2004. 199p. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara, 2004.

FORMARIZ, T. P.; URBAN, M. C. C.; SILVA JR., A. A.; GREMIÃO, M. P. D.; OLIVEIRA, A. G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 3, p. 301-313, 2005.

FRIBERG, S. E. Micelles, microemulsions, liquid crystals and the structure of stratum corneum lipids. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, Detroit, v. 41, p. 155-171, 1990.

FUKUDA, M.; OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Constituents of the Leaves of *Baccharis dracunculifolia* (Asteraceae) and their cytotoxic activity. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 54, p. 1465-1468, 2006.

GELFUSO, G. M.; LOPEZ, R. F. V. Water in oil nanoemulsion for topical delivery of cisplatin: obtention and characterization. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 39, n. 2, p. 326, 2003.

GIUSTINI, M.; PALAZZO, G.; COLAFEMMINA, G.; DELLAMONICA, M.; GIOMINI, M.; GEGLIE, A. Microstructure and dynamics of the water-in-oil CTBA/n-pentanol/n-hexane/water microemulsion: a spectroscopy and conductivity study. **The Journal of Physical Chemistry**, Easton, v. 70, p. 959-971, 1996.

GRAF, A.; ABLINGER, E.; PETERS, S.; ZIMMER, A.; HOOK, S.; RADES, T. Microemulsions containing lecithin and sugar-based surfactants: nanoparticle templates for delivery of proteins and peptides. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 350, p. 351-360, 2008.

GUIMARÃES, A. R. D.; PERES, M. A.; VIEIRA, R. S.; FERREIRA, R. M.; RAMOS-JORGE, M. L.; APOLINARIO, S.; DEBOM, A. Self-perception of side effects by adolescents in a chlorhexidine-fluoride-based preventive oral health program. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 14, n. 4, p. 291-296, 2006.

GÜRBAY, A.; GONTHIER, B.; BARRET, L.; FAVIER, A.; HINCAL, F. Cytotoxic effect of ciprofloxacin in primary culture of rat astrocytes and protection by Vitamin E. **Toxicology**, Amsterdam, v. 229, n.1-2, p. 54-61, 2007.

GURGAN, C. A.; ZAIM, E.; BAKIRSOY, I.; SOYKAN, E. Short-term side effects of a 0.2% alcohol-free chlorhexidine mouthrinse used as an adjunct to non-surgical periodontal treatment: a double-blind clinical study. **Journal of Periodontal**, Chicago, v. 77, p. 370–384, 2006.

HAMADA, S.; KOGA, T.; OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 63, p. 407-411, 1984.

HAMILTON, I.R.; ST. MARTIN, E.J. Evidence for the involvement of proton motive force in the transporte of glucose by a *Streptococcus mutans* strain DR 0001 defective in glucose – phosphoenolpyruvate phosphotransferase activity. **Infection and Immunity**, Whashington, v. 36, p. 567-575, 1982.

HAUGH, S. P.; ANDRES, C. J.; MOORE, B. K. Color stability and colorant effect on maxillofacial elastomers. Part III: Weathering effect on color. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 81, p. 431–438, 1999.

HOLMBERG, K.; JÖNSSON, B.; KRONBERG, B.; LINDMAM, B. **Surfactants and polymers in aqueous solution**. 2ed. New York: John Wiley & Sons Ltd., 2002 p. 451-471.

HWANG, B. Y.; ROBERTS, S. K.; CHADWICK, L. R.; WU, C. D.; KINGHORN, A. D. Antimicrobial constituents from Goldenseal (the rhizomes of *Hydrastis canadensis*) against selected oral pathogens. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 69, p. 623-627, 2003.

IDSON, B. Rheology: Fundamental Concepts. **Cosmetics & Toiletries**, New York, v. 93, n. 7, p. 23-30, 1978.

IWAMI, Y.; YAMADA, T. Intracellular flux of glucose metabolism in streptococcal cells by simultaneous monitoring of fluorescence dependent on reduced nicotinamide adenine nucleotide and acid excretion under strictly anaerobic conditions. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 14, p. 220-224, 1999.

JOHNSTON, W. M.; REISBICK, M. H. Color and translucency changes during and after curing of esthetic restorative materials. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 13, p. 89-97, 1997.

KATSURA, H.; TSUKYAMA, R. I.; SUZUKI, A.; KOBAYASHI, M. *In vitro* antimicrobial activities against oral micro-organisms. **Antimicrobial Agents and Chemoteraphy**, Washington, v. 45, p. 3009-3013, 2001.

KATZ, S. The use of fluoride and chlorhexidine for the prevention of radiation caries. **Journal of the American Dental Association**, Chicago, v. 104, n. 2, p. 164-70, 1982.

KLOPELL, F. C.; LEMOS, M.; SOUSA, J. P. B.; COMUNELLO, E.; MAISTRO, E. L.; BASTOS, J. K.; ANDRADE, S. F. Nerolidol, an Antiulcer Constituent from Essential Oil of the *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Zeitschrift für Naturforschung [C]**, Tübingen, v. 62c, p. 537-542, 2007.

KNISPEL, G. Factors affecting the process of colour matching restorative materials to natural teeth. **Quintessence International**, Berlin, v. 22, p. 525-531, 1991.

KNOBLOCK, K.; WEIGAND, H.; WEIS, N.; SCHWARM, M.; VIGENSHOW, H. Action of terpenoids on energy methabolism. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**. 5ed. Porto Alegre: Editora da Universidade/ UFRGS, p. 473-474, 2003.

KÖHLER, B.; BIRKHED, D.; OLSSON, S. Acid production by human strais of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. **Caries Research**, Basel, v. 29, n. 5, p. 402-406, 1995.

KOO, H.; PEARSON, S. K.; SCOTT-ANNE, K.; ABRANCHES, J.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; PARK, Y. K.; MARQUIS, R. E.; BOWEN, W. H. Effects of apigenin and tt-farnesol on glucosyltransferase activity, biofilm viability and caries development in rats. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 17, n. 6, p. 337-343, 2002.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; AMBROSANO, G. M.; MURATA, R. M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. **Current Microbiology**, New York, v. 41, n. 3, p. 192-196, 2000.

KOROLKOVAS, A.; BURCKHALTER, J. H. **Química Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988, p.35.

KOSTORYZ, E. L.; EICK, J. D.; CHAPPELOW, C. C.; GLAROS, A. G.; WETMORE, L.; YOURTEE, D. M. In vitro effect of light-cure dental adhesive on IL-6 release from LPS-stimulated and unstimulated macrophages. **Journal of Biomedical Materials Research**, Hoboken, v. 65, n. 1, p. 89-94, 2003.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Amsterdam, v. 54, n. 1, p. 77-98, 2002.

KREILGAARD, M.; PEDERSEN, E. J.; JAROSZEWSKI, J. W. NMR characterization and transdermal drug delivery potencial of microemulsion systems. **Journal of Controlled Release**, Amsterdam, v. 69, p. 421-433, 2000.

KUMAZAWA, S.; YONEDA, M.; SHIBATA, I.; KANARDA, J.; HAMASAKA, T.; NAKAYAMA, T. Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honeybee behavior and phytochemical analysis. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 51, p. 740-742, 2003.

KUNEIDA, H.; UMIZU, G.; YAMAGUCHI, Y. Mixing effect of polyoxyethylene-type nonionic surfactants on the lipid crystalline structures. **Journal of Colloid and Interface Science**, London, v. 218, p. 88-96, 1999.

KURAMITSU, H. K. Virulence factor of mutans streptococci: role of molecular genetics. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, Alexandria, v. 4, p. 159-176, 1993.

KUREBAYASHI, A. K. Análise sensorial na determinação de atributos do consumidor como valor agregado ao produto. In: Congresso Brasileiro de Cosmetologia, 15., 2001, São Paulo. Associação Brasileira de Cosmetologia, 2001. v. 15, p. 261-268.

LAMSTER, I. B.; ALFANO, M. C.; SEIGER, M. C.; GORDON, J. M. The effect of Listerine antiseptic on reduction of existing plaque and gingivitis. **Clinical Preventive Dentistry**, Philadelphia, v. 5, p. 12-16, 1983.

LANG, N. P.; HOTZ, P.; GRAF, H.; GEERING, A. H.; SAXER, U. P.; STURZENBERG, O. P.; MECKEL, A. Effects of supervised chlorhexidine mouthrinses in children. **Journal of Periodontal Research**, Copenhagen, v. 17, p. 101-111, 1982.

LAWRENCE, M. J.; REES, D. G. Microemulsions-based as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Arlington, v. 45, p. 89-121, 2000.

LEARD, A.; ADDY, M. The propensity of different brands of tea and coffee to cause staining associated with chlorhexidine. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 24, n. 2, p. 115-118, 1997.

LEITÃO, D. P. S. ; SILVA FILHO, A. A.; POLIZELLO, A. C. M. ; BASTOS, J. K.; SPADARO, A. C. C. . Comparative evaluation of in-vitro effects of Brazilian green propolis and *Baccharis dracunculifolia* extracts on cariogenic factors of *Streptococcus mutans*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 27, n. 11, p. 1834-1839, 2004.

LEITÃO, D. P. S. **Estudo comparativo do efeito *in vitro* de extrato de própolis verde e extratos de *Baccharis dracunculifolia* sobre fatores de virulência de *Streptococcus mutans*, relacionados à cárie dental**. 2005. 125 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.

LEITÃO, D.P.S. **Estudo do efeito de enxaguatórios bucais sobre a produção de ácidos orgânicos por *Streptococcus mutans*, isolado do biofilme dental**. 2001. 121 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2001.

LEITE, M. F.; KAWATA, V. K. S. ; POLIZELLO, A. C. M. ; LEITAO, D. P. S. ; UYEMURA, S. A. ; SPADARO, A. C. C. . In vitro effect of Tamarindus indica L. extracts on cariogenic factors of Streptococcus mutans. In: CIFARP, 2005, Ribeirão Preto. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Ribeirão Preto:USP, 2005. v. 41, p. 367-367.

LEITE, M. F.; LEITÃO, D. P. S.; SOUSA, I. P.; CAMPOS, L. M. P.; POLIZELLO, A. C. M.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; LOPEZ, R. F. V.; SPADARO, A. C. C. Alecrim-do-campo microemulsion mouthrinse: development, characterization and in vitro evaluation upon virulence factors of *S. Mutans* associated with dental caries. In: SINPOSPq (Simpósio Internacional de Pós-Graduação e Pesquisa), 3., 2008, Ribeirão Preto. Anais eletrônico SINPOSPq. Ribeirão Preto:USP, 2008.

LEMOS, M.; BARROS, M. P.; SOUSA, J. P. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K. ANDRADE, S. F. *Baccharis dracunculifolia*, the main botanical source of Brazilian green propolis, displays antiulcer activity. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v. 59, p. 603-608, 2007.

LEUNG, R.; SHAH, D. O. Solubilization and phase equilibria of water-in-oil microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, New York, v. 120, n. 2, p. 330-344, 1986.

LI, Y.; BURNE, R. A. Regulation of the *gtfBC* and *ftf* genes of *Streptococcus mutans* in biofilms in response to pH and carbohydrate. **Microbiology**, Reading, v. 147, p. 2841-2848, 2001.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 50, p. 353-380, 1986.

LUNDBERG, B. B.; MORTIMER, B. C.; REDGRAVE, T. G. Submicron lipid emulsions containing amphipathic polyethylene glycol for use as drug-carriers with prolonged circulation time. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 134, p. 119-127, 1996.

MANDEL, I. D. Chemotherapeutic agents for controlling plaque and gingivitis. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 15, p. 488-498, 1988.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCIA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 74, p. 105-112, 2001.

MARRIOT, C. Reologia. In: AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, p. 56-84.

MARTINI, E. Nanoemulsões catiônicas como sistemas de liberação de oligonucleotídeos: Formulação e caracterização físico-química. 2005. 106 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

MBELA, T. K.; VERSCHUREN, E. The influence of additives on physical properties of emulsions prepared using lecithins and non-ionic surfactants. **Journal de Pharmacie de Belgique**, Bruxelles, v. 52, p. 110-116, 1997.

McNEILL, K.; HAMILTON, I. R. Acid tolerance response of biofilm cells of *Streptococcus mutans*. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 221, p. 25-30, 2003.

MENENDEZ, A.; LI, F.; MICHALEK, S. M.; KIRK, K.; MAKHIJA, S. K.; CHILDERS, N. K. Comparative analysis of the antibacterial effects of combined mouthrinses on *Streptococcus mutans*. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 20, p. 31-34, 2005.

MILNER, J. L.; STOHL, E. A.; HANDELSMAN, J.; Zwitermicin, a resistance gene from *Bacillus cereus*. **Journal of Bacteriology**, Washington, v. 178, p. 4266-4272, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Cosméticos: uma abordagem sobre ensaios físicos e químicos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/material/guia_cosmetico.pdf>. Acesso em: 3 mar. 2008.

MISSIMA, F.; DA SILVA FILHO, A. A.; NUNES, G. A.; BUENO, P. C. P.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; SFORCIN, J. M. Effect of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae) extracts and its isolated compounds on macrophage activation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v. 59, p. 463-468, 2007.

MO, C.; ZHONG, M.; ZHONG, Q. Investigation of struture and structural transition in microemulsion systems of sodium dodecyl sulfonate + *n*-heptane + *n*-butanol + water by cyclic voltammetric and electrical conductivity measurements. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, Amsterdam, v. 493, n. 1-2, p. 100-107, 2000.

MORAIS, G. G. Desenvolvimento e avaliação da estabilidade de emulsões O/A com cristais líquidos acrescidas de xantina para tratamento da hidrolipodistrofia ginóide (celulite). 2006. 158 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MORAIS, J. M. Desenvolvimento e avaliação do processo de obtenção de emulsões múltiplas A/O/A em etapa única empregando óleo de canola e tensoativo não iônico derivado do óleo de rícino. 2008. 231 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

MORAN J. M. Home-use oral hygiene products: mouthrinses. **Periodontology 2000**, Copenhagen, v. 48, p. 42-53, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOTHES, K. Historical introduction. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - da Planta ao Medicamento**. 5ed. Rev. e Ampl.; Porto Alegre, Editora da universidade/ UFRGS, Cap. 18, p. 473-474, 2003.

MOULIK, S. P.; PAUL, B. K. Structure, dynamics and transport properties of microemulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, Amsterdam, v. 78, p. 99-195, 1998.

MUNARI, C. C.; RESENDE, F. A.; ALVES, J. M.; SOUSA, J. P. B.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Mutagenicity and antimutagenicity of *Baccharis dracunculifolia* extract in chromosomal aberration assays in chinese hamster ovary cells. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 74, p. 1363-1367, 2008.

NAKAMOTO, R. Y. Use of saliva substitute in post-radiation xerostomia. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 42, p. 539-542, 1979.

NESAMONY, J.; KOLLING, W. M. IPM/DOSS/Water Microemulsions as reactors for silver sulfadiazine nanocrystal synthesis. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, New York, v. 94, n. 6, p. 1310-1329, 2005.

OKUBO, S. R.; KANAWATI, A.; RICHARDS, M. W.; CHILDRESS, S. Evaluation of visual and instrument shade matching. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 80, p. 642-648, 1998.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, p. 131-138, 2004.

ORTHABER, D.; GLATTER, O. Synthetic phospholipid analogs: a structural investigation with scattering methods. **Chemistry and Physics Lipids**, Amsterdam, v. 107, n. 2, p. 179-189, 2000.

OSBORNE, D. W.; MIDDLETON, C. A.; ROGERS, R. L. Alcohol free microemulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, New York, v. 9, p. 415-423, 1988.

OSBORNE, D. W.; WARD, A. J. L.; O'NEILL, K. J. Microemulsions as topical drug delivery vehicles: in-vitro transdermal studies of a model hydrophilic drug. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Londres, v. 43, p. 451-454, 1991.

OVERHOLSER, C. D.; MEILLER, T. E.; DePAOLA, L. G.; MINAH, G. E.; NIEHAUS, C. Comparative effects of 2 chemotherapeutic mouthrinses on development of supragingival dental plaque and gingivitis. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 17, p. 575-579, 1990.

PAIVA, J. G.; ANTONIAZZI, J. H. **Endodontia: bases para a prática clínica**. 2ª ed. São Paulo: Artes Médicas, 1988. 886p.

PANKERD, R. J.; STELLA, V. J. The use of oil-in-water emulsions as a vehicle for parenteral drug administration. **Journal of Parenteral Science and Technology**, Philadelphia, v. 44, p. 139-149, 1990.

PARK, Y. K.; KOO, H.; ABREU, J. A.; IKEGAKI, M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. **Curr Microbiol, Current Microbiology**, New York, v. 36, n. 1, p. 24-28, 1998.

PARK, Y. K.; PAREDES-GUZMAN, J. F.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; FUJIWARA, F. Y. Chemical constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the main botanical origin of southeastern Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Whashington, v. 52, p. 1100-1103, 2004.

PIANTINO, C. R.; AQUINO, F. W. B.; FOLLEGATTI-ROMERO, L. A.; CABRAL, F. A. Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 47, p. 209-214, 2008.

PINTO, C. A.; BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: Atualidades, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61 2002.

PITCHER, G. R.; NEWMAN, H. N.; STRAHAN, J. D. Access to subgingival plaque by disclosing agents using mouthrinsing and direct irrigation. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 7, p. 300-308, 1980.

PODLOGAR, F.; GASPERLIN, M.; TOMSIC, M.; JAMNIK, A.; ROGAC, M. B. Structural characterization of water-Tween 40/Imwitor 308-Isopropyl myristate microemulsion using different experimental methods. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 276, p. 115-128, 2004.

PODLOGAR, F.; ROGAC, M. B.; GASPERLIN, M. The effect of internal structure of selected water-Tween 40® - Imwitor 308® - IPM microemulsions on ketoprofene release. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 302, p. 68-77, 2005.

PONTEFRAC, H.; COURTNEY, M.; NEWCOMBE, R. G.; ADDY, M. Development of methods to enhance extrinsic tooth discoloration for comparison of toothpaste: Studies *in vitro*. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 31, p. 1-6, 2004.

PRISTA, L. N.; ALVES, A. C.; MORGADO, R. M. C. **Tecnologia Farmacêutica**. 5ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 1995. 3v.

QUEIROGA, C. L.; FUKAI, A.; MARSAIOLI, A. J. Composition of the essential oil of Vassoura. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 1, n. 3, p. 105-109, 1990.

QUIRYNEN, M. Management of oral malodour. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 30, n. 5, p. 17-18, 2003.

ROSS, E. M. Farmacodinâmica: mecanismos de ação de drogas e relação entre concentração da droga e seu efeito. In: GOODMAN-GILMAN, A.; RALL, T.W.; NIES, A.S.; TAYLOR, P. (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica**. Tradução Penilson Silva. 8ed. cap.2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, 1232p.

ROZMAN, B.; ZVONAR, A.; FALSON, F.; GASPERLIN, M. Temperature-sensitive microemulsion gel: an effective topical delivery system for simultaneous delivery of vitamins C and E. **AAPS PharmSciTech**, Arlington, v. 10, n. 1, p. 54-61, 2009.

RUYTER, I. E.; NILNER, K.; MOLLER, B. Color stability of dental composite resin materials for crown and bridge veneers. **Dental Materials**, Copenhagen, v. 3, p. 246-251, 1987.

SALATINO, A.; TEIXEIRA, E. W.; NEGRI, G.; MESSAGE, D. Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence Based Complementary Alternative Medicinal**, Oxford, v. 2, p. 33-38, 2005.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P. R. S.; CAMPOS, L. C.; BORBA, C. M.; CABELLO, P. H.; MARCUCCI, M. C.; CASTRO, S. L. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evidence Based Complementary Alternative Medicinal**, Oxford, v. 5, p. 317-324, 2008.

SANCTIS, D. S. Emulsões para uso externo. **Revista Racine**, São Paulo, v. 53, p. 53-63, 1999.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: nanoemulsions and nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 208, p. 71-80, 2000.

SAWAYA, A. C. H. F.; TOMAZELA, D. M.; CUNHA, I. B. S.; BANKOVA, V. S.; MARCUCCI, M. C.; CUSTODIO, A. R.; EBERLIN, M. N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **The Analyst**, Cambridge, v. 129, p. 739-744, 2004.

SCHACHETELE, C.; MAYO, J. A. Phosphoenolpyruvate-dependent glucose transport in oral streptococci. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 52, p. 1209-1215, 1973.

SCHULMAN, J. H.; ROBERTS, T. S. Transactions of the Faraday Society. In: ROBB, I. D. **Microemulsions**. New York: Plenum Press, 1982, p. 165.

SHAH, D. O.; HAMLIN, J. R. M. Structure of water in microemulsions: electrical, birefringence and nuclear magnetic resonance studies. **Science**, Washington, v. 171, p. 483-485, 1971.

SHUHAMA, I. K. **Presença de atividade antiedematogênica no extrato bruto e frações obtidas por purificação parcial de *Baccharis dracunculifolia* DC (alecrim-do-campo)**. 1988. 91 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1988.

SIM, S. Y.; JEONG, S. T.; SUN, B. K.; MOON S. J.; GHANG, I. S. Sensory evolution of moisturizing creams: combination of descriptive analysis panel test and preference test. **IFSCC Magazine**, Augsburg, v. 5, n. 1, p. 19-23, 2002.

SINTOV, A.C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration in vitro and cutaneous drug bioavailability in vivo. **Journal of Controlled Release**, v. 95, n. 2, p. 173-183, 2004.

SOUSA, J. P. B. ; JORGE, R. F. ; DA SILVA FILHO, A. A. ; FURTADO, N. A. J. C. ; LEITE, M. F.; QUEIROGA, C. L. ; MAGALHÃES, P. M. ; SOARES, A. E. E. ; BASTOS, J. K. . Seasonal Variation of the (E)-Nerolidol and Other Volatile Compounds Within Ten Different Cultivated Populations of *Baccharis dracunculifolia* D.C. (Asteraceae). **The Journal of Essential Oil Research**, New York, v. 21, p. 308-314, 2009c.

SOUSA, J. P. B. **Influência da sazonalidade no perfil químico dos óleos essenciais e das substâncias fixas de *Baccharis dracunculifolia* cultivada, utilizando-se cromatografia em fases gasosa e líquida.** 2007. 164 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

SOUSA, J. P. B.; DA SILVA FILHO, A. A.; BUENO, P. C. P.; GREGÓRIO, L. E.; FURTADO, N. A. J. C.; JORGE, R. F.; BASTOS, J. K. A validated reverse-phase HPLC analytical method for the quantification of phenolic compounds in *Baccharis dracunculifolia*. **Phytochemical Analysis**, Chichester, v. 20, p. 24-32, 2009b.

SOUSA, J. P. B.; LEITE, M. F.; JORGE, R. F.; RESENDE, D. O.; DA SILVA FILHO, A. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SOARES, A. E. E. ; SPADARO, A. C. C.; MAGALHÃES, P. M.; BASTOS, J. K. Seasonality role on the phenolics from cultivated *Baccharis dracunculifolia*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Oxford, 2009a. In Press.

SPRING, O. Chemotaxonomy based on metabolites from glandular trichomes. **Advances in Botanical Research**, Londres, v. 31, p. 153-174, 2000.

SUBRAMANIAN, N.; GHOSAL, S. K.; ACHARYA, A.; MOULIK, S. P. Formulation and Physicochemical Characterization of Microemulsion System Using isopropyl myristate, medium-chain glyceride, polyssorbate 80 and water. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 53, p. 1530-1535, 2005.

TABOSA DO EGITO, E. S.; FESSI, H.; APPLE, M.; BARRATT, G.; LEGRAND, P.; BOLARD, J.; DEVISSAGUET, J-PH. A morphological study of na amphotericin B emulsion-based delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 145, p. 17-27, 1996.

TAKAHASHI-ABBE, S.; ABBE, K.; TAKAHASHI, N.; TAMAZAWA, Y., YAMADA, T. Inhibitory effect of sorbitol on sugar metabolism of *Streptococcus mutans* in vitro and on acid production in dental plaque in vivo. **Oral Microbiology and Immunology**, Copenhagen, v. 16, p. 94-99, 2001.

TOMSIC, M.; PODLOGAR, F.; GASPERLIN, M.; BESTER-ROGAC, M.; JAMNIK, A. Water-Tween 40/Imwitor 308-isopropyl myristate microemulsions as delivery systems for ketoprofen: small-angle X-ray scattering study. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 327, p. 170–177, 2006.

TRAHAN, L. Xylitol: a review of its action on mutans streptococci and dental plaque – its clinical significance. **International Dental Journal**, Londres, v. 45, p. 77-92, 1995.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, Arlington, v. 53, p. 2063-208, 2002.

UCHIDA, H.; VAIDYANATHAN, J.; VISWANADHAN, T.; VAIDYANATHAN, T. K.; Colour stability of dental composites as a function of shade. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 79, p. 372-377, 1998.

VADEBONCOEUR, C.; PELLETIER, M. The phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system for oral streptococci and its role in the control of sugar metabolism. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 19, p. 187-207, 1997.

VAN RIJKOM, H. M.; TRUIN, G. J.; VAN'T HOF, M. A. A meta-analysis of clinical studies on the caries-inhibiting effect of chlorhexidine treatment. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 75, n. 2, p. 790-795, 1996.

VAN STRYDONCK, D. A.; TIMMERMAN, M. F.; VAN DER VELDEN, U.; VAN DER WEIJDEN, G. A. Plaque inhibition of two commercially available mouthrinses. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 32, p. 305-309, 2005.

VASILJEVIC, D.; VULETA, G.; PRIMORAC, M. The characterization of the semi-solid W/O/W emulsions with low concentration of the primary polymeric emulsifier. **International Journal of Cosmetic Science**, Oxford, v. 27, p. 81-87, 2005.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. C. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 85-94, 2005.

VON FRAUNHOFER, J. A.; KELLEY, J. I.; DEPAOLA, L. G.; MEILLER, T. F. The effect of a mouthrinse containing essential oils on dental restorative materials. **General Dentistry**, Chicago, v. 54, p. 403-407, 2006.

WATTS, A.; ADDY, M. Tooth discolouration and staining: a review of the literature. **British Dental Journal**, London, v. 190, n. 6, p.309-316, 2001.

WEINBERGER, B. **Introduction to the history of dentistry**. St Louis: Mosby, 1948.

WIECHERS, J. W.; WORTEL, V. A. L. Making sense of data. **Cosmetics and Toiletries**, New York, v. 115, n. 3, p. 37-45, 2000.

WU, H.; RAMACHANDRAN, C.; WEINER, N. D.; ROESSSLER, B. J. Topical transport of hydrophilic compounds using water-in-oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, Amsterdam, v. 220, p. 63-75, 2001.

YAEGAKI, K.; COIL, J. M.; KAMEMIZU, T.; MIYAZAKI, H. Tongue brushing and mouth rinsing as basic treatment measures for halitosis. **International Dental Journal**, Londres, v. 52, n. 3, p. 192-196, 2002.

YANNIKAKIS, Z.; POLYZOIS, C. Colors stability provisional resin restorative materials. **The Journal of Prosthetic Dentistry**, St. Louis, v. 80, n. 5, p. 533-539, 1998.

YATES, R.; JENKINS, S.; NEWCOMBE, R.; WADE, W.; MORAN, J.; ADDY, M. A 6-month home usage trial of a 1% chlorhexidine toothpaste (1). Effects on plaque, gingivitis, calculus and toothstaining. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 20, n. 2, p. 130-138, 1993.