UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

ERICK NELO PEDREIRA

AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBIDOR TUMORAL DO ÓLEO RESINA DE COPAÍBA *IN NATURA (Copaifera reticulata)* E MANIPULADO ARTESANALMENTE NO MODELO DE CARCINOGÊNESE BUCAL EXPERIMENTAL DMBA INDUZIDA

BAURU – 2007

AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBIDOR TUMORAL DO ÓLEO RESINA DE COPAÍBA *IN NATURA (Copaifera reticulata)* E MANIPULADO ARTESANALMENTE NO MODELO DE CARCINOGÊNESE BUCAL EXPERIMENTAL DMBA INDUZIDA

ERICK NELO PEDREIRA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

BAURU – 2007

FICHA TÉCNICA

Erick Nelo Pedreira: concepção original, experimento, processamento histotécnico, redação do texto, fotografias clínicas, análise microscópica, fotomicrografias, digitação e formatação final.
Luís Antônio de Assis Taveira: concepção original, redação do texto, análise microscópica, orientação e revisão final
Camila Lopes Cardoso: experimento, processamento histotécnico, fotografias clinicas e revisão final
Fátima Aparecida Silveira: processamento histotécnico
Denise Tostes Oliveira: fotomicrografias
José Roberto Pereira Lauris: análise e orientação estatística
Fabrício Rodrigues: figuras, tabelas e formatação final
Valdir João Afonso: revisão vernacular
Gisele Dalben: tradução do artigo original e abstract
José Roberto Amadei: normatização técnica e referências bibliográficas
Graça Zogbhi: análise por cromatografia gasosa
Marcus e Ana Amélia Thame: cópias e encadernação

Pedreira, Erick Nelo

P343a Avaliação do efeito inibidor tumoral do óleo resina de Copaíba *in natura (copaifera reticulata)* e manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese bucal experimental Dmba induzida. Erick Nelo Pedreira. - Bauru, 2007.
169p.: il.; 30cm.

Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese por processos fotocopiadores e/ou meios eletrônicos.

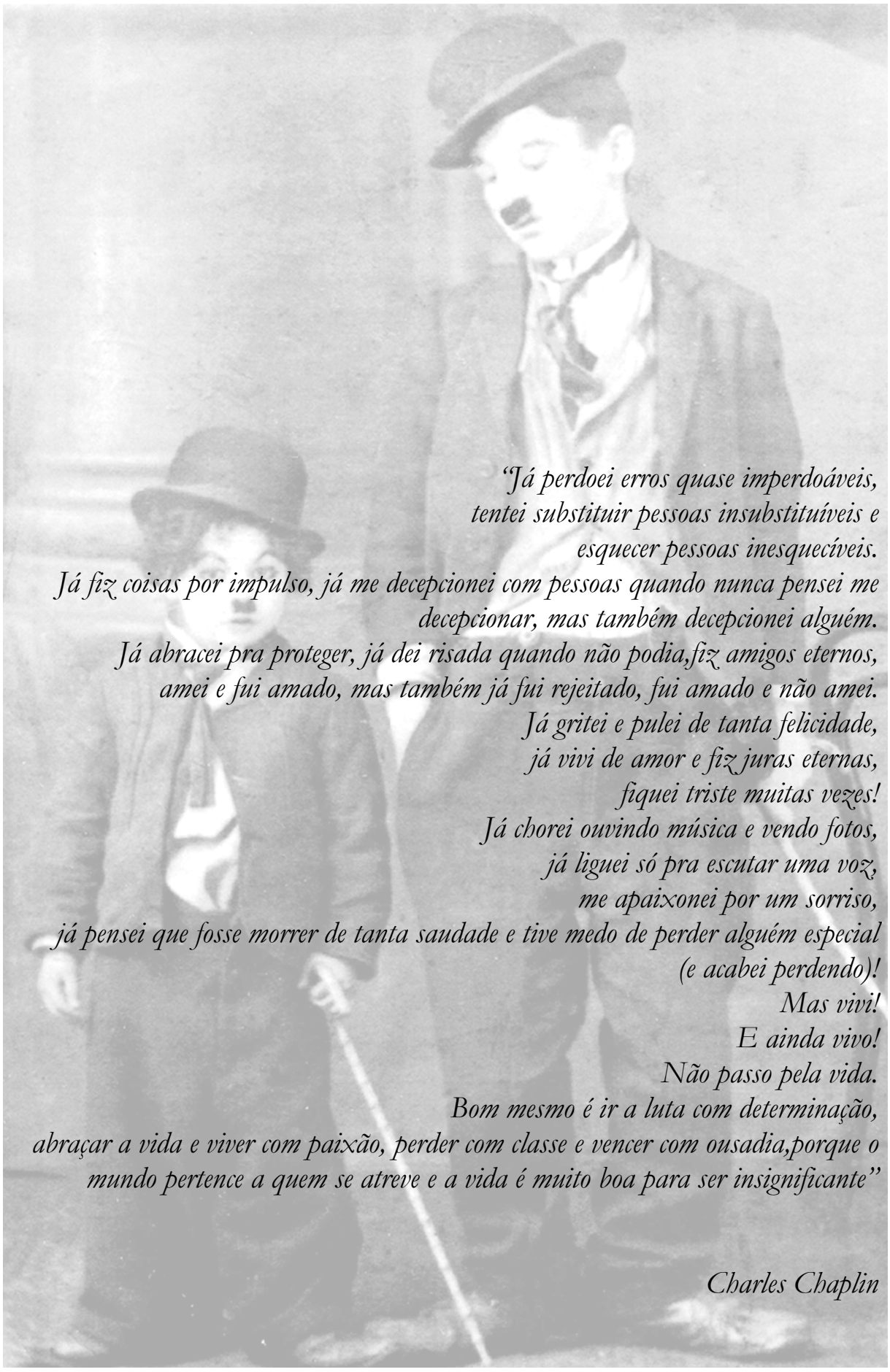
Assinatura do autor:

Bauru (SP), 06 de junho de 2007.

Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética em Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo; Projeto de Pesquisa n. 024/2005.

ERICK NELO PEDREIRA

30 de dezembro de 1974 Belém - Pa	Nascimento
Filiação	Heron da Costa Pedreira Virginia Maria Nelo Pedreira
1992 - 1997	Curso de Graduação em Odontologia na Universidade Federal do Pará – UFPa
1997 - 1998	Curso de Especialização em Estomatologia na Escola de Aperfeiçoamento Profissional da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas EAP/APCD – SP
1998	Professor Efetivo do Departamento de Anatomia Patológica, do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Pará - UFPa
1998 – 1999	Curso de Especialização em Radiologia Odontológica na Fundação para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico da Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo FDCTO – FO/USP
1999 – 2001	Curso de Pós-graduação, nível de Mestrado em Diagnóstico Bucal Subárea Radiologia na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo – FO/USP
2003 – 2007	Curso de Pós-graduação, nível de Doutorado em Patologia Bucal na Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo – FOB/USP
Associações	ABO Pa - Associação Brasileira de Odontologia Secção Pará SBPQO - Sociedade Brasileira de Pesquisas Odontológicas ABENO - Associação Brasileira de Ensino Odontológico



"Já perdoei erros quase imperdoáveis,
tentei substituir pessoas insubstituíveis e
esquecer pessoas inesquecíveis.
Já fiz coisas por impulso, já me decepcionei com pessoas quando nunca pensei me
decepcionar, mas também decepcionei alguém.
Já abracei pra proteger, já dei risada quando não podia,fiz amigos eternos,
amei e fui amado, mas também já fui rejeitado, fui amado e não amei.
Já gritei e pulei de tanta felicidade,
já vivi de amor e fiz juras eternas,
fiquei triste muitas vezes!
Já chorei ouvindo música e vendo fotos,
já liguei só pra escutar uma voz,
me apaixonei por um sorriso,
já pensei que fosse morrer de tanta saudade e tive medo de perder alguém especial
(e acabei perdendo)!
Mas vivi!
E ainda vivo!
Não passo pela vida.
Bom mesmo é ir a luta com determinação,
abraçar a vida e viver com paixão, perder com classe e vencer com ousadia,porque o
mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito boa para ser insignificante"

Charles Chaplin

À memória de meu avô Virgílio,
com quem aprendi muitas lições...

Dedico este trabalho

*A **Juliana, estrela da minha vida,** suas atitudes e seu caráter me fazem ver que nossa união vale a pena. Obrigado pela paciência, compreensão, incentivo e amor que você me dispensa todos os dias.*

> *"O amor é paciente o amor é prestativo; não é invejoso, não se ostenta, não se incha de orgulho. Nada faz de inconveniente, não procura seu próprio interesse, não se irrita, não guarda rancor. Não se alegra com a injustiça, mas se regozija com a verdade. Tudo desculpa, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor jamais passará "*
>
> *(Corintios-13, 1-8)*

*Aos meus pais **Heron** e **Virginia**, que com muita perseverança e amor lutam pela educação de seus filhos "o bem mais precioso"!*

Meus pais são como cristais,
puros e sem quaisquer sinais,
simples como vidros, mas antes,
valiosos como raros diamantes

Sempre foram o meu alento,
minha alegria e sentimento,
amor assim, tão verdadeiro,
sobrevive um infinito inteiro...

Aos meus irmãos ***Leonardo*** *e* ***Ana Carolina*** *pela compreensão, amor e fidelidade que representa nossa união e conivência; dedico este trabalho também a vocês!*

A minha Vovó ***Rosa****,* ***tios****,* ***tias****,* ***primos*** *e* ***primas*** *pelo amor e incentivo constante a minha carreira profissional!*

Ao Vô ***Sebastião*** *e Vó* ***Zoca*** *(in memoriam), que me carregavam no colo com uma felicidade tão gostosa de lembrar...*

Aos meus sogros ***Carlos*** *e* ***Arlete****, e meu cunhado* ***Leandro*** *que sempre me receberam de braços abertos, me ajudando muito e torcendo pelas minhas realizações. Admiro e sou muito grato a vocês!*

Agradecimento Especial

Ao meu orientador ***Professor Dr. Luís Antônio de Assis Taveira*** *agradeço a oportunidade de orientação, bem como a confiança na realização deste trabalho. Admiro muito sua integridade de caráter, bondade e respeito com seus alunos. Sua paciência e orientação científica me proporcionaram um grande enriquecimento pessoal e profissional.*

Minha gratidão!

Agradecimentos

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru da USP ***Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof.ª Dr.ª Denise Tostes Oliveira, Prof.ª Dr.ª Vanessa Soares Lara*** *e* ***Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira,*** *pelos ensinamentos pessoais e profissionais que recebi ao longo do curso de doutorado.*

Agradeço ao ***Prof. Dr. Alberto Consolaro*** *a oportunidade de realização do curso de Pós-graduação em Patologia Bucal na Faculdade de Odontologia de Bauru da USP; seus ensinamentos pessoais e profissionais, fundamentados no rigor científico e compromisso com a ciência levarei como lição. Sou grato pelo incentivo constante e fundamental na realização deste trabalho*

A ***Profa. Dra. Denise Tostes de Oliveira*** *pelo auxílio na realização das fotomicrografias deste trabalho.*

A ***Cristina Carrara Felipe (Cris)*** *pelo constante apoio e alegria com que me recebia, fazendo de Bauru uma extensão de minha casa, e pelos conselhos que em muito me ajudaram a superar os momentos difíceis!*

Ao amigo ***Valdir Afonso****, por todas as experiências vividas; pelos domingos de descontração assistindo o nosso "Norusca" e muito obrigado pelo auxílio nas correções vernaculares.*

A ***Fátima Aparecida Silveira (Fatiminha)*** *por todos os conselhos, ensinamentos e pela confecção histotécnica das lâminas utilizadas neste estudo.*

A amiga mestranda ***Camila Lopes Cardoso****; este trabalho tem muito da sua contribuição, seu auxílio foi fundamental na parte experimental. Torço muito pelo seu sucesso profissional. Muito Obrigada!*

Aos meus colegas de turma ***Leda, Marta, Rosário, Suzana e Patrícia*** *por todos os momentos de alegria e descontração e pela constante manifestação de amizade.*

A minha amiga ***Leda Aparecida Francischone (Ledinha)*** *pelos anos de convivência em Bauru, pelos conselhos e ensinamentos que ficarão eternamente guardados em meu coração. Você é especial!*

A ***Maria Fernanda Martins-Ortiz Consolaro*** *pelos momentos de alegria dispensados a mim e a Juliana e pelos conselhos que você nos ofereceu. Muito obrigado.*

Aos demais pós-graduandos e ex-pós-graduandos da Patologia Bucal da FOB-USP ***Renata Consolaro, Renata Falchete, Renato, Camila Rodini, Thiago, Bethânia, Tânia, João Adolfo, Andréa, Maria Renata, Aline, Maria Fernanda, Ana Carolina, Carlos, Érika Martins, Érika Sinara, Janaína, Simone, Aroldo, Fernanda, Patrícia Freitas, Bruno, Sylvie, Maria Carolina, Gastão Moura Neto, Carime, Michele, Melaine, Karem, Miltom*** *por todas as experiências vivenciadas e pelo carinho com que sempre me trataram.*

Aos técnicos de Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru ***Erasmo; Luis; Richard e Elias*** *pela disponibilidade e atenção dispensada na parte experimental do trabalho.*

À equipe do ***Biotério do Hospital Lauro de Souza Lima*** *pelo carinho e atenção.*

Ao ***Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris*** *pela realização e orientação estatística deste trabalho.*

À empresa ***Brasmazon*** *Exportação LTDA pela cessão do óleo de Copaíba natural utilizado nesta pesquisa.*

À farmácia de manipulação ***Artesanal*** *pela oferta da emulsão do óleo de Copaíba manipulado, de grande utilidade na parte experimental do trabalho.*

À pesquisadora do Museu Paraense Emílio Goeldi ***Profa. Dra. Graça Zoghbi*** *pela realização dos testes de cromatografia gasosa na amostra de Óleo de Copaíba.*

A ***todos os funcionários*** *da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru, em nome de* ***Cybelle de Assumpção Fontes****, pelo auxílio e orientações no transcorrer do curso. De modo especial ao* ***José Roberto Amadei*** *pelas correções realizadas nas referências bibliográficas.*

A ***todos os funcionários*** *da Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, em especial a* ***Giane Tenório Quintela****, pela prontidão com que sempre me atenderam.*

A amiga e pós graduanda ***Gisele Dalben*** *pela confecção do abstract e tradução do artigo original.*

Ao amigo ***Fabrício Rodrigues*** *pelo auxílio na formatação e acabamento da tese.*

Ao ***Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro*** *pelo companheirismo e disponibilidade no trabalho junto a disciplina de ciências propedêuticas e patológicas do curso de Odontologia da UFPa.*

Aos ***Profs. Drs. João Evandro da Silva Miranda, Antonio José da Silva Nogueira e Paulo Roberto Alves Amorim*** *da Universidade Federal do Pará -UFPa pelo incentivo a carreira acadêmica.*

Ao ***Prof. Dr. Mario Honorato Silva e Souza Junior*** *pela carta de recomendação para a realização do curso de Pós-graduação na Faculdade de Odontologia de Bauru.*

Ao ***Prof. Dr. Cláudio Fróes de Freitas****,* ***Áurea, Betinho e Rafa*** *pelo carinho e estímulo à carreira docente.*

Ao ***Prof. Dr. Omar Gabriel da Silva Filho, Prof. Dr. Leopoldino Capelozza e todo o setor de ortodontia do Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da USP (Centrinho)*** *pela maneira carinhosa e gentil dispensada a mim e Juliana durante o tempo que estivemos em Bauru. Muito obrigado!*

Aos inesquecíveis amigos de Bauru que traziam alegria aos nossos dias: ***Ghisa, Maria Helena, Larissa, Helder, Bruna, Duda, Emiliana, Gui Bibiano, Túlio, Flávio, Edmundo, Lívia, Duda, Rodrigo, Dudão, Fred, Kizze, Maria Fernanda Aranha, Anderson, Mariana, Ana Leão, Caricati, Ana Márcia, Fernanda, Ayelo, Cinthia, Fernando Torres, Marcelo Hamata e tantos outros...***

Agradecimentos Institucionais

À Direção da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa do Diretor ***Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro.***

À Comissão de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa da Presidente ***Profa. Dra. Maria Aparecida Moreira Machado.***

Ao Coordenador dos Cursos de Pós-graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru ***Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira.***

Ao Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo pela cessão dos animais experimentais utilizados na pesquisa.

À Reitoria da Universidade Federal do Pará, na pessoa do magnífico reitor ***Prof. Dr. Alex Bolonha Fiúza de Melo*** *pela liberação das atividades profissionais, e pelo incentivo a realização do curso de Pós-graduação.*

À Pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação (Propesp) da Universidade Federal do Pará pela viabilização da bolsa de estudos.

Ao Departamento de Anatomia Patológica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará pela liberação de minhas atividades docentes para realização do curso de pós-graduação.

A CAPES através do Programa de Incentivo a Capacitação Docente e Técnica (PICDT) pelo auxílio pecuniário.

RESUMO

A Medicina natural tem se apresentado como alternativa para a cura de inúmeras doenças que afetam a população, utilizando-se de plantas da flora brasileira; muito embora ainda não sejam totalmente esclarecidos os princípios ativos, mecanismo de ação e características de citotoxicidade destes produtos. Uma dessas substâncias é um óleo extraído de uma árvore de grande porte da familia *Leguminosea* e encontrado em todo o Brasil, denominado óleo de Copaíba cujo uso é bastante difundido pela população da região amazônica, e com as seguintes comprovações científicas: diurético, laxante, antitetânico, anti-séptico do aparelho urinário, cicatrizante, antiinflamatório e inibidor tumoral. Com esse propósito avaliou-se o comportamento quimiopreventivo do óleo resina de Copaíba na forma natural e manipulado artesanalmente no desenvolvimento de neoplasias DMBA induzidas na mucosa bucal de hamsters sírios dourados *(Mesocricetus auratus)*. Oitenta animais foram divididos em cinco grupos experimentais: (Grupo I: DMBA; Grupo II: óleo de Copaíba *in natura*; Grupo III Óleo de Copaíba manipulado; Grupo IV: DMBA + óleo de Copaíba *in natura* e Grupo V: DMBA + óleo de Copaíba manipulado artesanalmente). Procedeu-se a aplicação das substâncias experimentais, precedido por rígida observação clínica respeitando-se os períodos de 7, 13 e 20 semanas respectivamente. Após os intervalos cronológicos os animais foram mortos e os espécimes linguais avaliados morfologicamente. Os resultados demonstraram que as substâncias experimentais apresentaram estreita associação com o peso dos animais; lesões de aspecto macroscópico e microscópico mais significativo foram observadas no grupo I quando comparado ao grupo IV e V, respectivamente, sugerindo um efeito inibidor das duas apresentações do óleo de Copaíba. Não encontramos diferença estatística significante entre a capacidade de inibição tumoral quando comparamos o grupo IV e o grupo V, respectivamente. A ocorrência das lesões bucais não se mostrou restrita a borda lateral da língua exclusivamente; ocorrendo em outras regiões como: soalho bucal, ventre lingual, mucosa jugal e comissura labial. Nossos estudos baseados em parâmetros como: peso dos animais, diâmetro das lesões bucais, aspectos macroscópicos e microscópicos puderam observar significativa redução nos grupos IV e V em relação ao grupo I. Novos estudos devem ser conduzidos, baseados em ensaios imunoistoquímicos e de biologia molecular para maior confiabilidade e aprofundamento de nossos resultados.

Palavras-Chave: Óleos vegetais. Neoplasias bucais. Modelos animais. 9,10-Dimetil-1,2 benzoantraceno. Cromatografia. Fitoterapia.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE TUMOR INHIBITIVE EFFECT OF *IN NATURA (Copaifera reticulata)* AND HAND PREPARED COPAIBA OIL IN THE DMBA-INDUCED ORAL CARCINOGENESIS MODEL

Natural Medicine has been considered an alternative to cure several diseases affecting the population, using plants from the Brazilian flora, even though the active principles, mechanism of action and cytotoxicity of these products have not been fully elucidated so far. One such substance is the copaiba oil, extracted from a large tree of the family *Leguminosae*, found throughout Brazil. This oil has widespread use by the Amazonian population and has been scientifically demonstrated to be diuretic, laxative, antitetanic, antiseptic for the urinary system, healing, antiinflammatory, and tumor inhibitive. Within this context, this study evaluated the chemopreventive effect of copaiba oil, in natural form and hand prepared, on the development of DMBA-induced neoplasia of oral mucosa in golden Syrian hamsters (*Mesocricetus auratus*). Eighty animals were divided into five study groups, as follows: Group I – DMBA; Group II – copaiba oil in natura; Group III – hand prepared copaiba oil; Group IV – DMBA + copaiba oil in natura; and Group V – DMBA + hand prepared copaiba oil. The experimental substances were applied and the animals were maintained under strict clinical observation for 7, 13 and 20 weeks. After these time periods, the animals were killed and specimens obtained from the tongue were morphologically evaluated. The results demonstrated that the experimental substances presented close association with the weight of animals; lesions with more significant macroscopic and microscopic aspect were observed for Group I compared to Groups IV and V, respectively, suggesting an inhibitive effect of both forms of copaiba oil. There was no statistically significant difference in tumor inhibition ability between Groups IV and V. The occurrence of oral lesions was not restricted to the lateral border of the tongue; rather, it was also observed on other regions, including the mouth floor, ventral tongue, oral mucosa and lip commissure. Investigation of the weight of animals, diameter of oral lesions, macroscopic and microscopic aspects revealed significant reduction in Groups IV and V compared to Group I. Further studies should be conducted, including histochemistry and molecular biology analyses, to enhance the reliability and strengthen the present outcomes.

Keywords: Plants oils. Mouth Neoplasms. Models, animal. 9,10-Dimethyl-1,2 benzanthracene. Chromatography. Phytotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Representação das estruturas anatômicas removidas por necrópsia do hamster sírios dourados (*Mesocricetus auratus*) de importância no estudo da carcinogênese experimental DMBA induzida.	42
Figura 02	Representação química dos principais constituintes dos óleos resina de Copaíba.	55
Figura 03	Autoclave horizontal utilizado na esterilização da maravalha para forramento das caixas plásticas.	67
Figura 04	Marcação da orelha dos animais experimentais, adaptado do sistema australiano de marcação de suínos, para melhor identificação do grupo experimental.	68
Figura 05	Balança utilizada para avaliação do peso dos animais no início do experimento e no dia da morte, em seus respectivos tempos experimentais.	69
Figura 06	Pó de DMBA (9,10-Dimetil-1,2-benzoantraceno) utilizado no experimento.	70
Figura 07	Balança de alta precisão utilizada para pesagem do pó de DMBA.	70
Figura 08A	Contenção mecânica do animal com a finalidade de melhor aplicação das soluções experimentais.	72
Figura 08B	Aplicação com pincel das soluções na borda lateral da língua dos hamsters, quatro vezes consecutivamente	72
Figura 09	Contenção mecânica do animal seguida da aplicação do anestésico e relaxante muscular na região posterior caudal do hamster.	73
Figura 10	Realização da tricotomia na região dorsal do animal imobilizado com a utilização de tesoura apropriada; seguido de necropsia onde foi removida a língua, linfonodos regionais, fígado, rins e pulmão, para avaliação macroscópica e microscópica.	73
Figura 11	Leitura por cromatografia gasosa do óleo resina de Copaíba *(Copaifera reticulata)* exibindo seus principais constituintes.	75
Figura 12A	Aspecto de normalidade em relação à mucosa bucal do animal do grupo I no período experimental de 7 semanas.	96
Figura 12B	Discreta pápula avermelhada na região de soalho bucal do animal do grupo I no período experimental de 7 semanas de aplicação exclusivamente da solução de DMBA.	96
Figura 13	Presença de múltiplas lesões papilomatosas na borda lateral, ventre lingual e soalho bucal com áreas centrais ulceradas e superfície ligeiramente branca avermelhada no animal experimental do grupo I no período de 13 semanas de aplicação de DMBA.	96
Figura 14	Lesão papilomatosa única na região de ventre lingual e pequeno nódulo ulcerado na região da mucosa jugal do animal do grupo IV no período experimental de 13 semanas.	99
Figura 15	Presença de extenso nódulo ulcerado com discreta pseudomembrana esbranquiçada na região de mucosa jugal e comissura labial, sugerindo clinicamente carcinoma espinocelular no período experimental de 20 semanas; submetidos à aplicação exclusiva da solução de DMBA. (Grupo I 20 semanas)	99
Figura 16	Presença de múltiplos nódulos ulcerados, sangrantes ao toque, na região de mucosa jugal e comissura labial, compatível clinicamente com carcinoma espinocelular no período de 20 semanas submetidos a aplicação exclusiva da solução de DMBA. (Grupo I 20 semanas)	101
Figura 17	Presença de lesão esbranquiçada de aspecto úlcero vegetante localizada no limite da região de soalho bucal e ventre lingual sugerindo clinicamente carcinoma espinocelular papiliforme pequeno.	101

Figura 18	Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais experimentais do grupo I no período de 7 semanas, onde se destaca a presença de áreas de hiperplasia epitelial com hiperortoqueratinização e ausência de displasia epitelial. (Coloração H.E.)	109
Figura 19	Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais experimentais do grupo I no período de 7 semanas, onde se destaca a presença de discretas áreas de hiperplasia epitelial com displasia epitelial leve. (Coloração H.E.)	109
Figura 20	Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais experimentais do grupo IV no período de 7 semanas, onde se destaca a presença de acentuada hipeortoqueratose, com moderada hiperplasia e ausência de displasia epitelial . (Coloração H.E.)	109
Figura 21	Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais experimentais do grupo I, no período experimental de 13 semanas, onde se destaca a presença de carcinoma espinocelular papiliforme de pequeno tamanho. (Coloração H.E.)	113
Figura 22A	Aspecto microscópico da mucosa bucal do animal experimental do grupo I, no período de 13 semanas, onde se destaca a presença de carcinoma espinocelular papiliforme de grande tamanho. (Coloração H.E.)	113
Figura 22B	Aspecto microscópico em maior aumento da mucosa bucal do animal experimental do grupo I, no período de 13 semanas, onde se destaca a presença de mitoses atípicas, hipercromatismo nuclear, pleomorfismo nuclear e celular intenso, pérolas córneas e invasão perivascular. Nota-se ainda a presença de leucócitos mononucleares no conjuntivo. (Coloração H.E.)	113
Figura 23	Aspecto microscópico em maior aumento da mucosa bucal de um animal do grupo IV no período de 13 semanas; onde se destaca a presença de mitoses atípicas, hipercromatismo nuclear, pleomorfismo nuclear e celular intenso, note que a camada basal mostra-se intacta sem invasão de ilhotas epiteliais para à lâmina própria e tecido conjuntivo subjacente; compatível com displasia moderada. (Coloração H.E.)	117
Figura 24A e 24B	Aspecto microscópico da mucosa bucal de um animal experimental do grupo I no período de 20 semanas; onde se destaca a presença de intenso pleomorfismo celular, perda de adesão celular, grande quantidade de queratina permeando as células tumorais, perda de integridade do estrato epitelial e invasão de ilhotas epiteliais tumorais para lâmina própria e tecido conjuntivo subjacente. (Coloração H.E.)	117
Figura 25A e 25B	Aspecto microscópico da mucosa bucal de um animal do grupo I no período experimental de 20 semanas; compatível com carcinoma espinocelular bem diferenciado onde se destaca a presença de inúmeras mitoses atípicas, hipercromatismo nuclear, pleomorfismo celular intenso, grande quantidade de queratina por entre as células tumorais; além de intensa invasão epitelial para o tecido conjuntivo subjacente. (Coloração H.E.)	119
Figura 26	Aspecto microscópico da mucosa bucal de animal experimental do grupo III no período experimental de 20 semanas, onde se destaca a presença de acentuada hiperortoqueratose, com moderada hiperplasia epitelial. (Coloração H.E.)	119
Figura 27	Aspecto microscópico da mucosa bucal de um animal do grupo IV no período experimental de 20 semanas; onde se destaca a presença de hiperplasia epitelial associado a intenso pleomorfismo celular, perda de adesão celular, mitoses atípicas, compatível com displasia epitelial de aspecto moderado. (Coloração H.E.)	121
Figura 28A e 28B	Aspecto microscópico da mucosa bucal de um animal do grupo V no período experimental de 20 semanas; onde se observa a presença de múltiplos carcinomas espinocelulares papiliformes havendo a proliferação epitelial em ilhotas para o tecido conjuntivo, com a formação de pérolas córneas, na camada epitelial. (Coloração H.E.).	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Critérios de malignidade microscópica utilizada no estudo de Bryne et al, 1991. Apenas as partes mais invasivas dos tumores foram classificadas.	77
Tabela 2	Valores referentes ao peso dos animais dos diferentes grupos experimentais, quando da morte dos animais no período de 7, 13 e 20 semanas.	84
Tabela 3	Valores expressos para as médias de variação de peso dos animais, em relação aos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas de experimento.	85
Tabela 4	Valores expressos para as médias do tamanho das lesões, em relação aos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas de experimento.	87
Tabela 5	Valores expressos para as frequências de localização da lesão, em relação aos diferentes grupos, no período de 7 semanas de experimento.	89
Tabela 6	Valores expressos para as frequências de localização da lesão, em relação aos diferentes grupos, no período de 13 semanas de experimento.	90
Tabela 7	Valores expressos para as frequências de localização da lesão, em relação aos diferentes grupos, no período de 20 semanas de experimento.	91
Tabela 8	Alterações macroscópicas observadas nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação aos cinco grupos experimentais.	92
Tabela 9	Valores expressos para as médias dos valores numéricos do aspecto macroscópico das lesões, em relação aos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas.	93
Tabela 10	Valores expressos para as médias dos valores numéricos do aspecto microscópico das lesões, em relação aos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas.	104
Tabela 11	Aspectos microscópicos e seus respectivos escores observados nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação ao grupo experimental I (DMBA).	106
Tabela 12	Aspectos microscópicos e seus respectivos escores observados nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação ao grupo experimental II (Óleo de Copaíba *In Natura*).	106
Tabela 13	Aspectos microscópicos e seus respectivos escores observados nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação ao grupo experimental III (Óleo de Copaíba Manipulado Artesanalmente).	107
Tabela 14	Aspectos microscópicos e seus respectivos escores observados nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação ao grupo experimental IV (Óleo de Copaíba *In Natura* + DMBA).	107
Tabela 15	Aspectos microscópicos e seus respectivos escores observados nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação ao grupo experimental V (Óleo de Copaíba Manipulado Artesanalmente + DMBA).	111

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Evolução das médias dos valores numéricos, nos diferentes grupos, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas de experimento.	85
Gráfico 2	Representação gráfica da média dos valores numéricos em relação ao tamanho da lesão, nos diferentes grupos, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas de experimento.	87
Gráfico 3	Representação gráfica da freqüência de localização da lesão, nos diferentes grupos, no período de 7 semanas de experimento.	89
Gráfico 4	Representação gráfica da freqüência de localização da lesão, nos diferentes grupos, no período de 13 semanas de experimento.	90
Gráfico 5	Representação gráfica da freqüência de localização da lesão, nos diferentes grupos, no período de 20 semanas de experimento.	91
Gráfico 6	Representação gráfica das médias dos valores numéricos do aspecto macroscópico das lesões, nos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas, respectivamente.	93
Gráfico 7	Representação gráfica das médias dos valores numéricos do aspecto microscópico das lesões, nos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas.	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Alfa
β	Beta
°C	Graus Celsius
4NQO	4,1 Óxido de nitroquinoleno
a.C	Antes de Cristo
Bcl-2	Célula-B de linfoma 2
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEEPA	Comissão de Ética em Ensino e Pesquisas Animais
cm	Centímetros
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação animal
CPQB	Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas da Universidade de Campinas
d.C	Depois de Cristo
DMBA	9,10-Dimetil-1,2Benzoantraceno
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
g	Grama
GPx	Glutationa peroxidase
GSH	Glutationa Reduzida
HE	Hematoxilina e Eosina
IQ	Instituto de Química
Kg	Kilograma
lbs	Libras
mg	Miligrama
ml	Mililitro
NOR	Regiões organizadoras nucleolares
NQO	Óxido de nitroquinoleno
PA	Estado do Pará
pol^3	Polegadas ao cubo
SP	São Paulo
USA	Estados Unidos da América, do inglês United States of America
USP	Universidade de São Paulo
VN	Valores numéricos
WHO	Organização Mundial de Saúde, do inglês World Health Organization

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 33

2 REVISÃO DE LITERATURA 39

2.1 O hamster como animal no modelo de carcinogênese experimental 39

2.1.1 Breve histórico 39

2.1.2 Aspectos fisiológicos e anatômicos dos hamsters 42

2.2 O modelo de carcinogênese experimental DMBA induzida 43

2.3 Efeito quimiopreventivo e o modelo de carcinogênese experimental DMBA 48

2.4 Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos, fitoterapia e saúde bucal 51

2.5 Óleo resina de Copaíba 54

2.5.1 Histórico e considerações sobre o uso de plantas do gênero Copaifera 54

2.5.2 Atividade biológica do óleo resina de Copaíba 56

3 PROPOSIÇÃO 61

4 MATERIAL E MÉTODOS 65

4.1 Material 67

4.1.1 Amostragem e as condições do experimento 67

4.1.2 Classificação e caracterização dos grupos experimentais 69

4.1.2.1 A solução de DMBA 70

4.1.2.2 Óleo resina de Copaíba na forma *in natura* 71

4.1.2.3 Solução de óleo de Copaíba Manipulado artesanalmente 71

4.2 Métodos 71

4.2.1 Aplicação dos agentes químicos 71

4.2.2 Morte dos animais, obtenção e preparação dos espécimes 72

4.2.3 Análise físico química do óleo resina de Copaíba 74

4.2.4 Análise cromatográfica do óleo resina de Copaíba 74

4.2.5 Avaliação macroscópica 75

4.2.6 Avaliação microscópica 76

4.3 Tratamento Estatístico 78

4.4 Princípios Éticos 79

5 RESULTADOS 81
5.1 Variação do peso dos animais experimentais 83
5.2 Tamanho das lesões na mucosa bucal dos animais experimentais 86
5.3 Localização das lesões na mucosa bucal dos animais experimentais 88
5.4 Aspecto macroscópico 92
5.4.1 Da mucosa bucal dos animais experimentais 92
5.4.1.1 Análise macroscópica descritiva dos animais experimentais 94
5.4.2 Dos outros orgãos avaliados macroscopicamente 95
5.5 Aspecto microscópico 103
5.5.1 Da mucosa bucal dos animais experimentais 103
5.5.1.1 Análise microscópica descritiva dos animais experimentais 105
5.5.2 Dos outros orgãos avaliados microscopicamente 121

6 DISCUSSÃO 125

7 CONCLUSÕES 139

REFERÊNCIAS 145

ANEXOS 159

1

Introdução

1 Introdução

A forma pela qual o homem tem interpretado os fenômenos da natureza – dentre estes os biológicos - vem mudando continuamente. Os conceitos sobre saúde e doença diretamente influenciados pelos conhecimentos científicos, contribuem significativamente para a compreensão do organismo humano e conseqüente evolução da espécie.

O entendimento dos mecanismos moleculares e imunológicos que ocorrem no organismo, em seu estado fisiológico e relacionados ao desenvolvimento tumoral, são de fundamental importância para a instituição de medidas terapêuticas. (COTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000; PARISE JR., 2000; ALBERT, 2002; DERKA et al. 2006) A extensa variedade de neoplasias com as mais diferentes gradações histológicas, comportamento biológico e resposta orgânica dificultam a descoberta de novas drogas que possam atuar inibindo o crescimento tumoral. (BONNE e YOU, 1997; SUGIMOTO, 2003).

Baseado nisto a procura por modalidades terapêuticas que tenham como objetivo a prevenção, representam o principal alvo de investigação da carcinogênese Shaklar, 1980; Miller, 1989; Nehlig e Debry, 1994; Tanaka et al. 1994; Fukushima et al. 1997; Mori, 1997; Nishino, 1997; Rui, 1997; Balasenthil et al. 1999; Balasenthil e Nagini, 2000; Mans, Rocha e Schwartsmann, 2000; Bhuvaneswari et al. 2001; Saroja, 2001; Balasenthil, Rao e Nagini, 2002; Li et al. 2002; Livny 2002; Wada et al. 2003; Chen et al. 2006; Manoharan et al. 2006; Mohan et al. 2006 estando diretamente relacionada ao acúmulo de alterações genéticas, particularmente nos genes que regulam o crescimento, diferenciação, morte celular, estabilidade e reparo do DNA. (ODUKOYA e SHKLAR, 1984; STEIDLER e READE, 1986; COTRAN, KUMAR e COLLINS, 2000; CWIKLA et al. 2000; ALBERT, 2002).

Dentre todas as formas de neoplasias que afetam o corpo humano, as relacionadas à cavidade bucal apresentam significativa prevalência, representando 3 a 5% de todas as neoplasias, acometendo predominantemente homens a partir da quinta década (PARISE JR., 2000). Essa significativa prevalência das neoplasias bucais é atribuida ao

fato da boca estar constantemente submetida à ação de variados agentes físicos e químicos, merecendo uma criteriosa avaliação em relação ao potencial carcinogênico de inúmeras substâncias (LIMA, 1997; LIMA, 1999; CAMARGO, 1999; MESQUITA et al. 2003; PIEROLI, 2003). Desta forma, devem ser rigorosamente avaliadas quanto à intensidade e freqüência de exposição necessária para o desenvolvimento de tumores; aos fatores potencializadores ou depressores de sua atividade carcinogênica, além de uma série de questionamentos passíveis de serem esclarecidos por meio de ensaios experimentais.

A utilização destes modelos experimentais tem assumido grande importância no sentido de avaliar o potencial carcinogênico e quimiopreventivo de inúmeras substâncias, de modo especial àquelas utilizadas como medicamentos, bebidas e alimentos. (AL-DAMOUK, 1993; FUKUSHIMA et al. 1997; LIMA, 1997; LIMA, 1999; BALASENTHIL e NAGINI, 2000; BHUVANESWARI et al. 2001; BALASENTHIL, RAO E NAGINI, 2002; BALASENTHIL, RAO e NAGINI, 2002; LI et al. 2002; SHABANY et al. 2002; MESQUITA et al. 2003). Dentre os modelos relacionados à carcinogênese química bucal, destaca-se o que se utiliza de uma substância com potencial carcinogênico bem estabelecido: 9-10-Dimetil Benzantraceno (DMBA); que se apresenta comercialmente sob a forma de um pó de hidrocarboneto aromático policíclico, que quando diluído em acetona e aplicado na mucosa bucal dos hamsters, é capaz de produzir lesões malignas induzidas quimicamente.

Dentro desta linha de estudo, outros agentes carcinogênicos químicos podem ser utilizados com essa finalidade, como o metilcolantreno, a NQO e o benzopireno, porém a preferência pela utilização do DMBA está associada a sua ação local, por suas propriedades de iniciação e promoção da carcinogênese, bem como pela presença de tempos experimentais muito bem estabelecidos na literatura. (SALLEY, 1954; MORRIS, 1961; EVESON, 1981; SLAGA e GIMENEZ-CONTI, 1992; GIMENEZ-CONTI, 1993; MATIAKIS et al. 1994; TANAKA et al. 1994; SHKLAR, 1999; DERKA et al. 2006)

As pesquisas recentes apontam na direção de fármacos que interfiram na inibição do desenvolvimento tumoral, pois estes podem atuar aumentando significativamente a sobrevida de pacientes portadores de neoplasias malignas; como também exercer ação sobre a viabilidade das células tumorais e no combate imunológico as doenças.

No âmbito desses estudos, é crescente a utilização de espécies vegetais testadas experimentalmente. (MARTIN-SMITH e SNEADER, 1969; AKERELE, 1988; BASILE et al. 1988; PAIVA et al. 1998; PAIVA et al. 2002; PAIVA et al. 2003; CASTRO e SILVA JR. 2004; CARVALHO et al. 2005; SUBAPRIYA et al. 2005)

Baseando-se neste contexto a medicina natural tem-se mostrado como alternativa, principalmente pela população de menor recurso econômico. (DI STASI, 1996; OLIVEIRA e FERRAZ, 1998; PEREIRA, 1998; LIMA JR. et al. 2005) No Brasil, destaca-se a utilização de diversas espécies vegetais, dentre estas a Copaíba (gênero *Copaífera)*, planta nativa da região Amazônica; do tronco dessa árvore é extraído um óleo, ao qual são atribuídas diversas propriedades terapêuticas. (BASILE et al. 1988; ARAUJO JR., 1998; PAIVA, 1998; PESSOA et al. 2000; PAIVA et al. 2002; LIMA, 2003; PAIVA et al. 2003; SUGIMOTO, 2003; CASTRO e SILVA JR. et al. 2004; CARVALHO et al. 2005). Esse óleo é composto basicamente por sesquiterpenos e diterpenos; substâncias responsáveis por grande parte das atividades farmacológicas, variando qualitativa e quantitativamente de acordo com a procedência e espécie estudada. (BIAVATTI et al. 2006)

Atualmente acredita-se que no território brasileiro existam mais de 20 espécies do óleo de Copaíba com indicações terapêuticas comprovadas cientificamente. (BANDEIRA et al. 1999; MACIEL, PINTO e VEIGA JR., 2002; VEIGA JR. e PINTO, 2002) Este óleo é obtido por meio de um furo na porção central do tronco das árvores, onde escorre um líquido incolor, límpido, com coloração variando do amarelo ao marrom, apresentando odor e sabor característicos. (BIAVATTI et al. 2006)

Nos últimos anos, o interesse pelos extratos de plantas vegetais utilizados na medicina popular tem crescido, com o objetivo de descobrir novos compostos com diferentes efeitos farmacológicos, e menor efeito indesejável se comparado aos fármacos já existentes. Apesar do uso tradicional e freqüente por parte da população, duas questões precisam ser aprofundadas: real efetividade e ausência de toxicidade. É necessário conhecer a dose eficaz e aquela que produz toxicidade, sendo fundamental a instituição de um estudo farmacodinâmico e toxicológico padronizado.

O estudo farmacológico pré-clinico de um determinado produto natural comprova a sua eficácia e toxicidade visando os seus benefícios para uso em humanos. (SECCO, 1990; BANDEIRA et al. 1999; COSTA-LOTUFO et al. 2002). Somado a isso

é possível traçar um perfil dos efeitos colaterais, relacionando esses efeitos às doses e definindo um seguro mecanismo de ação.

Partindo-se do princípio que o óleo resina de Copaíba tem apresentado evidências de participação no controle do desenvolvimento tumoral e que não existem trabalhos na literatura avaliando o seu papel na inibição tumoral em neoplasias malignas de cabeça e pescoço, julgou-se válido avaliar a resposta macroscópica e microscópica tecidual frente à aplicação do óleo resina de Copaíba na forma *in natura* e em emulsão oral, manipulado artesanalmente no modelo de carcinogênese experimental DMBA induzida.

2

Revisão de Literatura

2 Revisão de Literatura

Neste capítulo, inicialmente serão revisados trabalhos relacionados à utilização do hamster como animal modelo experimental, secundariamente artigos que tratam da aplicação do modelo de carcinogênese experimental DMBA induzida e sua relação com a quimioprevenção; por fim trabalhos que discutem a utilização de plantas medicinais e sua associação com o mecanismo de inibição tumoral, com especial destaque ao óleo resina de Copaíba.

2.1 O Hamster como animal no modelo de carcinogênese experimental

2.1.1 Breve histórico

A utilização do hamster como animal de laboratório remonta à década de 1920; sendo os hamsters de origem chinesa os primeiros a serem utilizados em trabalhos experimentais. Devido à dificuldade de manutenção em cativeiros e o pouco conhecimento sobre seu manejo, sua difusão pelo mundo ocorreu de forma gradual. (LAKARS e HERRING, 1980; EVESON, 1981).

Apesar de o *hamster sírio* ser denominado de "hamster de laboratório", outras espécies continuam a ser utilizadas em pesquisas experimentais, mesmo que de forma pouco freqüente (HOOSIER e MCPHERSON, 1987). A eleição do hamster sírio deve-se ao fato deste possuir tamanho intermediário, adaptar-se muito bem ao ambiente de biotério, reproduzir-se em grandes quantidades e apresentar um comportamento mais dócil, quando comparado a outras espécies de roedores. (LAKARS e HERRING, 1980; THOMAS, SPENCER e WORLD, 2007)

Os primeiros trabalhos reportando a utilização do hamster como animal experimental, remontam à década de 30; onde estes roedores eram utilizados em pesquisas de tuberculose, leishmaniose e lepra; desde esse período a sua utilização tem crescido no âmbito das pesquisas experimentais biomédicas.

Algumas marcantes características do hamster sírio estão relacionadas à tolerância imunológica a tumores humanos, parasitas, vírus, bactérias, possuindo um par de bolsas laterais, que servem como "sítios propícios" para o estudo de fenômenos vasculares, ensaios com transplantes, avaliação do comportamento biológico de neoplasias e doenças neuromusculares. (FASSONI, 1992; SANTOS 2002; SUZUKI, 2006; THOMAS et al. 2006)

2.1.2 Aspectos fisiológicos e anatômicos dos hamsters

O hamster sírio dourado, de maneira diferente de outros roedores, é um animal de corpo compacto e cauda muito curta; seu comprimento em geral, quando adulto, situa-se entre 15 a 17cm, e seu peso médio varia geralmente entre 80 a 120 gramas. O pêlo mostra-se com aspecto curto e avermelhado na região dorsal – recebendo a denominação de dourado – os olhos são escuros e a pele mostra-se com aspecto flácido.

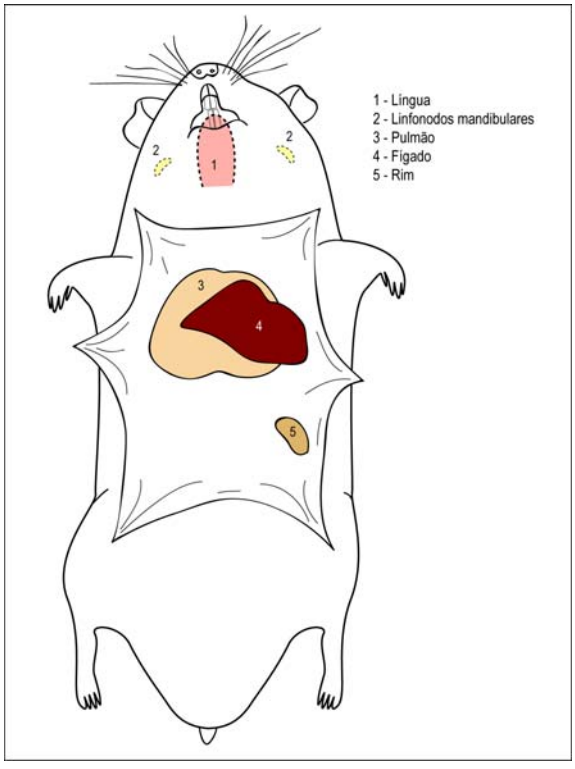


Figura 01 – Representação das estruturas anatômicas removidas por necrópsia do hamster sírios dourados (*Mesocricetus auratus*) de importância no estudo da carcinogênese experimental DMBA induzida.

De forma marcante apresentam duas bolsas laterais no interior da boca, que servem de sítio propício ao armazenamento de alimentos e curiosamente servem para as

mães agasalharem seus filhotes quando estes se encontram ameaçados; sendo também um local propício para estudos experimentais. (LAKARS e HERRING, 1980; EVESON, 1981; AL-DAMOUK e MAC DONALD, 1987; CHIANG et al. 2004)

São animais escavadores com excelente poder de adaptação nos mais variados ambientes; apresentando hábitos noturnos e tendo preferência por temperaturas ambientais acima de 25°C. (SANTOS, 2002)

2.2 O modelo de carcinogênese experimental DMBA induzida

Por mais de meio século a técnica para produção de tumores experimentais em hamsters sírios, utilizando-se de três hidrocarbonetos policíclicos associados ao uso do DMBA tem sido amplamente difundida na literatura, desde esta época, este modelo tem sido largamente empregado para avaliação do potencial carcinogênico de variadas substâncias que diariamente entram em contato com a mucosa bucal. (SALEY, 1954)

Os mecanismos de carcinogênese são amplamente estudados na literatura; havendo consenso em relação ao papel do ciclo celular neste processo. Para a ocorrência dos tumores é fundamental a existência de duas fases distintas: a primeira representada pelo processo de iniciação, no qual células normais são convertidas em células tumorais latentes em um curto período de tempo, sob a ação de uma substância carcinogênica. Posteriormente, a promoção no qual células tumorais latentes são estimuladas a progredir, após um longo período de tempo por ação repetitiva de uma determinada substância atuando na mucosa bucal. (ODUKOYA e SHKALAR, 1984; STEILDLER e READE, 1986; MATIAKIS et al. 1994; SHKLAR, 1999; ALBERT, 2002; LORO, VINTERMYR e JOHANNESSEN, 2003).

O câncer bucal é uma doença genética induzida por alterações na homeostasia da mucosa bucal e pela manutenção do mecanismo de proliferação celular e apoptose. As substâncias mediadoras do ciclo celular, relacionados ao processo de apoptose estão freqüentemente desreguladas durante a carcinogênese, logo uma deleção no gene doc-1 na fase S do ciclo celular seria a responsável por uma série de mutações, levando a célula ao descontrole no estádio de proliferação celular. (NISHIMURA, 1999; COTRAN, KUMAR

e COLLINS, 2000; CWIKLA et al. 2000; PARISE JR. 2000; ALBERT, 2002 ; LORO et al. 2003; DERKA et al. 2006)

As vantagens na utilização do modelo de carcinogênese experimental DMBA induzida estão relacionadas à importante contribuição em relação ao tratamento clínico de pacientes com câncer bucal. As principais vantagens em relação a esta metodologia experimental seriam: a técnica para a indução dos carcinomas é simples, facilidade de visualização em relação à lesão que está se desenvolvendo, ampla região a ser analisada, similaridade entre as alterações microscópicas, bioquímicas e moleculares com a mucosa bucal humana e finalmente resposta tecidual similar em relação aos agentes prolifáticos e terapêuticos. (GIMENEZ-CONTI, 1993; SCHWARTZ et al. 2004; MOHAN et al. 2006)

A mucosa bucal dos animais em idade avançada exibe maior resistência à ação dos carcinógenos, quando comparada a animais em idade precoce. A solução de DMBA a concentração de 50% representa uma concentração ideal para a produção de tumores experimentais em intervalos mais curtos de tempo, sendo que a resposta tecidual do animal frente à aplicação do carcinógeno não estaria exclusivamente relacionada com o gênero do animal, mas sim diretamente influenciada pela freqüência de aplicação, que deveria ser pelo período de três vezes por semana, com intervalos consecutivos de 48 horas entre as aplicações. (MORRIS, 1961)

As alterações ultraestruturais que ocorrem na mucosa bucal dos hamsters como resultado da aplicação do DMBA, revelaram significativas alterações nas pontes intercelulares das células epiteliais. Essas alterações puderam ser inicialmente observadas a partir do segundo dia de aplicação do carcinógeno; isto poderia representar uma facilidade maior de penetração do carcinógeno na camada germinativa do epitélio, estendendo-se conseqentüemente à lâmina própria e a regiões mais internas do tecido conjuntivo. (LISTGARTEN, ALBRIGHT e GOLDHABER, 1963; WHITE e GOHARI 1984; WHITE e GOHARI 1985; HASSANIN, ASHRAFI e DAS, 1987)

Com a finalidade de avaliação dos efeitos do traumatismo crônico sobre a mucosa bucal dos hamsters e ainda possível contribuição na etiologia e patogênese do câncer bucal, foi realizado um estudo que procurou analisar as características clínicas e microscópicas da mucosa bucal dos animais, realizando a morte no período de 4, 8, 12, 16, 18, 20 e 24 semanas, respectivamente. Os resultados atestaram que a irritação

mecânica crônica somente foi capaz de produzir lesões de aspecto ulcerativo, sendo que as lesões neoplásicas ocorreram exclusivamente no grupo em que o carcinógeno estava presente. Como conclusão pode-se sugerir que o trauma crônico, atuando isoladamente, não seria capaz de produzir lesões neoplásicas na mucosa bucal dos animais. (RENSTRUP, SMULOW e GLICKMAN, 1962)

A utilização do álcool e tabaco em uma grande parte dos estudos demonstra uma íntima associação com o desenvolvimento do câncer bucal. Partindo-se dessa constatação foi estudado o efeito da ingestão do álcool, no desenvolvimento de leucoplasias, displasias e carcinomas bucais induzidos experimentalmente; no trabalho pode ser observado que o sítio de localização do tumor, tamanho e número de lesões estava diretamente relacionado com as condições sistêmicas dos animais; isto é, os animais que exibiam lesões em borda lateral de língua, com tamanho e número significativo apresentavam clinicamente importantes sintomas de imunodepressão. (BLOT, 1992; LIMA, 1999; SUBAPRIYA et al. 2005).

A avaliação do comportamento biológico tumoral e sua relação com a presença de metástases, também foi alvo de estudos baseados no modelo de carcinogênese experimental DMBA induzida. Com o propósito de investigar os resultados controversos da literatura em relação à ocorrência de metástases foi realizado um trabalho, baseado na metodologia proposta por Salley, 1954; sendo inicialmente aplicado o DMBA e em seguida a Vimblastina, uma droga que apresenta propriedades citostática. Os resultados demonstraram que de seis animais sobreviventes ao final do experimento somente um deles apresentou metástase; podendo-se classificar esse tumores como potencialmente metastizantes. (RWOMUSHANA, POLLIACK e LEVIJ, 1970)

No entanto, ao revisarmos a literatura podemos observar que o modelo de carcinogênese DMBA induzida, não representa o melhor método experimental para avaliação e indução do desenvolvimento de metástases a partir de tumores bucais quimicamente produzidos. (GIMENEZ-CONTI, 1993)

Com o objetivo de estudar os mecanismos de invasão óssea foi realizado um estudo microscópico minucioso em tumores DMBA induzidos de ocorrência no soalho bucal de hamsters, através da aplicação do DMBA diluído a 0,5% em acetona, aplicado pelo período de três vezes por semana, no tempo experimental de 10 a 12 semanas. Ao final da aplicação das substâncias experimentais a mandíbula dos animais foram

removidas e analisadas quanto ao padrão de invasividade tumoral; podendo ser classificada em três grupos distintos: *Grupo 1*: alterações limitadas ao periósteo e córtex superficial do osso alveolar; *Grupo 2*: reabsorção menor que a metade da espessura do osso alveolar e *Grupo 3*: Reabsorção maior que a metade da espessura do osso alveolar. As conclusões apontaram para um processo de invasão óssea representada seqüencialmente pelos seguintes eventos: destruição do periósteo, reabsorção da superfície externa do osso cortical, alargamento dos canais de Harvers e Volkerman, invasão do tumor pelos canais alargados, crescimento tumoral com acometimento da medula óssea e reabsorção da região endosteal. (TOTSUKA, AMEMIYA e TOMITA, 1986)

Apesar do estudo acima ter contribuído no sentido de tentar elucidar o mecanismo de invasão tumoral no modelo de carcinogênese DMBA induzida, limitações devem ser atribuídas ao trabalho, relacionadas principalmente à estrutura anatômica da bolsa intrabucal do animal e da pouca quantidade de saliva no interior da cavidade bucal; o que mostra diferença em relação à espécie humana.

A utilização da solução de azul de toluidina como corante *in vivo* aplicado à eleição de sítios teciduais mais representativos para a realização de biópsias incisionais tem sido freqüentemente empregada, como recurso exploratório de diagnóstico. (PARISE JR. 2000; CHEN et al. 2006; MISSMANN et al. 2006). Baseados em estudos *in vitro* que demonstraram efeitos mutagênicos, sugerindo uma possível ação carcinogênica, foi investigado o seu efeito tecidual, valendo-se do mecanismo de carcinogênese experimental DMBA induzida. Os resultados demonstraram que a solução de azul de toluidina não atua como carcinógeno, cocarcinógeno e nem como substância promotora da carcinogênese. (REDMAN, KRASNOW e SNIFFEN, 1992)

Na disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da USP, a utilização do modelo de carcinogênese bucal DMBA induzida foi padronizado a partir de um estudo que estabeleceu um protocolo para estudos de carcinogênese experimental. O trabalho contou com uma amostra de 120 hamsters sírios dourados *(Mesocricetus auratus),* divididos em grupos de 30 animais e posteriormente subdivididos em três tempos experimentais de 7, 13 e 20 semanas respectivamente. As conclusões atestaram que o DMBA propicia a produção de lesões cancerizáveis e carcinomas passíveis de serem avaliados macro e microscopicamente nos respectivos períodos experimentais acima preconizados. (FASSONI, 1992)

Seguindo essa linha de estudo experimental, uma série outros estudos foram conduzidos na disciplina de Patologia avaliando o potencial carcinogênico de inúmeras substâncias: formocresol diluído a 1/5, glutaraldeido a 2%; bebidas de alto teor alcólico (cachaça e uísque); peróxido de hidrogênio a 27% e peróxido de carbamida a 10%. Estudos que tinham como propósito avaliar se estas substâncias atuariam como agentes iniciadores ou promotores da carcinogênese. Os resultados sinalizaram que o formocresol diluído a 1/5 e o glutaraldeído a 2% não puderam ser enquadrados como carcinógenos. Em relação às bebidas alcoólicas de alto teor (cachaça e uísque) estas apresentaram potencial carcinogênico em relação a mucosa bucal. Por fim o estudo envolvendo os agentes claeadores concluiu que o peróxido de hidrogênio age como promotor da carcinogênese, pois potencializa os efeitos dos agentes iniciadores na carcinogênese química bucal. (SALLES, 1993; LIMA, 1997; LIMA, 1999; CAMARGO, 1999)

Baseado na preocupante utilização em larga escala de agentes clareadores a base de peróxido de carbamida a 10%, usados com freqüência na técnica de clareamento caseiro de dentes desvitalizados; foi realizado um estudo em que se avaliou a proliferação celular em carcinomas espinocelulares desenvolvidos no modelo de DMBA-indução associado ao peróxido de carbamida a 10%, utilizando-se de marcação imunoistoquímica pela técnica do AgNOR. Os resultados demostraram que no grupo I (Acetona), grupo II (Opalescence), grupo III (White & Brite) e VII (Água Destilada) não se observou proliferação celular compatível com alteração neoplásica; sendo a ocorrências de NORs/núcleo menor que nos demais grupos. No grupo IV (DMBA), o número de ocorrência de NORs/núcleo foi menor que nos grupos V (DMBA+Opalescence) e VI (DMBA+White e Brite), em que foram desenvolvidos carcinomas espinocelulares mais exuberantes, sendo observado no grupo V e VI, respectivamente maior proliferação celular e maior padrão de invasividade dos carcinomas. As conclusões apontam para uma taxa maior de proliferação celular nos grupos em que ocorreu a associação do agente clareador com o DMBA; se comparado ao grupo em que o DMBA foi aplicado de forma isolada; isso ocorrendo provavelmente em decorrência do efeito promotor dos agentes clareadores. (PIEROLI, NAVARRO e CONSOLARO,. 2000; PIEROLI, 2003)

A partir da necessidade de se avaliar o potencial carcinogênico da uretana em baixas concentrações, que é comumente encontrada em alimentos fermentados tais como: pães, iogurtes, molho de soja e em bebidas alcoólicas como vinhos, licores, uísque e

cachaça, valendo-se do modelo de carcinogênese experimental DMBA-induzida; realizou-se um trabalho com uma amostra de cem hamsters sírios dourados que foram agrupados em cinco grupos experimentais. O grupo I recebeu aplicações tópicas de uretana a 0.5% na borda lateral da língua; o grupo II aplicação de uretana a 6%; o grupo III recebeu aplicação de uretana a 0.5% associado à solução de DMBA; o grupo IV foi administrada a uretana a 6%, seguido da solução de DMBA; e finalmente o grupo V com a aplicação exclusivamente de DMBA atuando como grupo controle positivo. Os resultados demostraram que a uretana a concentração de 0.5% e 6% não foi capaz de induzir alterações microscópicas nos grupos I e II. A 7formação de carcinomas nos animais tratados com uretana e DMBA ocorreu em proporções menores se comparados aos que foram submetidos à aplicação exclusiva da solução de DMBA. A uretana a 0.5% e 6% reduziu a o potencial carcinogênico do DMBA, não apresentando potencial de iniciação, promoção e/ou progressão tumoral. (MESQUITA et al. 2003)

2.3 Efeito quimiopreventivo e o modelo de carcinogênese experimental DMBA induzida.

Quimioprevenção é a nova ferramenta farmacológica no tratamento dos pacientes com câncer Rui, 1997; Katiyar e Mukhtar, 1997; Mohan, et al. 2006, tendo como objetivo identificar quais substâncias poderiam inibir o desenvolvimento tumoral ainda em estádios precoces; evitando o estabelecimento da neoplasia em seus mais variados graus de diferenciação. (BOONE e YOU 1997; NISHINO, 1997; BALASENTHIL et al. 1999; SHABANY et al. 2002; MOHAN et al. 2005; LAMBERT et al. 2005; MANOHARAN et al., 2006; SAMY, GOPALAKRISSHNAKONE e IGNACIMUTHU, 2006)

A preocupação com a deficiência vitamínica e uma possível associação desta com a invasividade tumoral, fez com que se estudasse o efeito da carência de vitamina A no modelo da carcinogênese bucal experimental, podendo-se observar que nestes animais a produção dos tumores ocorreu de forma mais expressiva. A avaliação sistêmica destes animais mostrava uma maior taxa de imunodepressão se comparada aos animais que recebiam uma dieta rica em vitamina A. Esses achados sinalizam um possível papel quimiopreventivo da vitamina A no desenvolvimento de neoplasias malignas induzidas

experimentalmente. (ROWE e GORLIN, 1959; MORI et al. 1997; MANOHARAN et al. 2006)

Seguindo nessa mesma linha de estudo, outro importante trabalho avaliou os efeitos do ácido retinóico, um análogo da vitamina C, sendo testado em relação a sua atividade antitumoral no modelo de carcinogênese experimental DMBA induzida (SHKLAR et al. 1980; KENNEDY, 1994). A amostra consistiu de 53 hamsters sírios dourados, divididos em quatro grupos experimentais, aplicando-se as substâncias experimentais pelo período de três vezes por semana, durante 18 semanas. O *grupo 1*: tratado com solução de DMBA à concentração de 0,5% associado ao óleo mineral. O *grupo 2*: recebeu a solução de DMBA associado à solução de ácido retinóico; ao *grupo 3* foi administrada somente a solução de ácido retinóico e o *grupo 4* atuando como placebo. Os animais foram mortos na 6º, 12º e 18º semanas e os tecidos foram submetidos à avaliação macroscópica e microscópica. Os resultados revelaram desenvolvimento de carcinomas induzidos quimicamente, no grupo em que foi aplicada exclusivamente a solução de DMBA. Ao grupo em que foi associado o DMBA com a solução de ácido retinóico pode ser observado uma atrofia epitelial com áreas de intensa proliferação glandular. A conclusão sinaliza que os animais que fizeram uso exclusivamente do ácido retinóico exibiram áreas de metaplasia epitelial; sendo que quando o acido retinóico foi associado à solução de DMBA este não foi capaz de inibir o desenvolvimento tumoral. (GILMORE e GIUNTA, 1981)

O consumo de alho tem sido associado ao decréscimo no risco de desenvolvimento de neoplasias malignas Boone e You 1997; Fukushima et al. 1997; Balasenthil e Nagini 2000; Balasenthil, Rao e Nagini 2002; baseado nesta hipótese foi realizado um estudo que teve como propósito testar o efeito quimiopreventivo da Alilcisteina-S, que é a solução aquosa que se obtém pela trituração do alho, no modelo experimental DMBA induzido. Os animais foram divididos em quatro grupos, com seis animais em cada grupo. Na mucosa jugal de cada animal do grupo I, foi pincelada a solução de DMBA respeitando a concentração de 0,5%. Aos animais do grupo II foi aplicada a solução de DMBA associada a 200 mg/Kg da solução de Alilcesteina-S administrada três vezes por semana e aplicados em dias alternados a administração do DMBA; os animais do grupo III receberam somente a solução de Alilcesteina-S e os animais do grupo IV, atuaram como grupo controle. Os animais foram mortos após o

período experimental de 14 semanas; podendo ser avaliado microscopicamente o efeito da Alilcesteina-S. Os resultados mostraram que o alho pode exercer um efeito quimiopreventivo, representado pela inibição no desenvolvimento de alterações displásicas e diminuição na presença de carcinomas nos animais experimentais. (BALASENTHIL, RAO E NAGINI, 2002)

Outro importante trabalho, seguindo esta mesma linha de estudo, propôs investigar a capacidade indutora de apoptose em relação ao extrato aquoso de alho no modelo de carcinogênese DMBA induzida; valendo-se de estudos que avaliaram a fragmentação do DNA e a expressão de proteínas pró-apoptóticas, respectivamente transglutaminase tecidual e Bcl-2. A administração do extrato de alho associado ao DMBA promoveu a inibição do desenvolvimento tumoral, caracterizado pela ausência de neoplasia, indução da transglutaminase tecidual além da inibição na expressão de Bcl-2. Os resultados de seu estudo sugeriram um possível efeito quimiopreventivo do extrato de alho baseado no processo de apoptose. (BALASENTHIL, RAO E NAGINI, 2002)

O Chá verde é um produto popular consumido em quase todo o mundo, em sua composição nota-se a presença de polifenóis que apresentam alta atividade oxidante se comparada a qualquer outro produto natural (KATIYAR e MUKHTAR, 1997). Foi realizada uma revisão sobre o papel do chá verde e sua relação com as lesões em pele afirmando que a maior e mais atuante substância quimiopreventiva é o 3-galatil-epilogocatequin, constituinte do grupamento fenol e que apresenta alta capacidade antiinflamatória, atividade reguladora da proliferação celular e resposta à progressão tumoral. (SANTOSH, NIHAL e HASAN, 2000; LI et al 2002; LAMBERT et al 2005; MOHAN et al 2005.

A utilização do extrato de café torrado como substância quimiopreventiva no processo de carcinogênese é descrito na literatura (MILLER et al 1989; NEHLIG e DEBRY, 1994; HARNACK et al, 1997; SAROJA et al 2001), um importante trabalho utilizou como parâmetro a ativação dos biomarcadores enzimáticos de quimioprevenção, tais como: glutone peroxidase (GPx), glutone reduzida (GSH) e peroxidase lipídica; a partir de uma amostra de quarenta animais divididos em quatro grupos experimentais. A administração do extrato de café torrado associado ao DMBA não apresentou efeito preventivo na indução do câncer bucal, isto concluído pelo fato do volume tumoral ser semelhante no grupo em que somente foi aplicado à solução de DMBA. O resultado de

seu estudo mostrou que o café torrado não interferiu no volume e na progressão tumoral quando administrado durante o processo de carcinogênese DMBA induzida. (SAROJA et al. 2001)

Pesquisas têm sido desenvolvidas a partir do estudo dos carotenos atuando como agentes quimiopreventivos, principalmente em relação a carcinogênese; com maior ênfase aos betacarotenos que comprovadamente atuam prevenindo a iniciação e progressão de várias formas de cânceres humanos. (TANAKA et al. 1994; NISHINO, 1997, MANJANATHA, 2006).

Baseados em ensaios experimentais de quimioprevenção tumoral, foi estudada a eficácia quimiopreventiva do Licopene no modelo de carcinogênese DMBA induzida; podendo-se concluir que o Licopene exerce ação inibitória tumoral pela modulação de uma enzima denominada *peroxidase lipídica* (que regula o ciclo celular) e discreto aumento de outra enzima a *redutase* (que age regulando a proliferação celular). (JOHNSON, 2000; BHUVANESWARI et al. 2001; LIVNY, 2002)

2.4 Aspectos históricos sobre plantas medicinais, seus constituintes ativos, fitoterapia e saúde bucal

Remonta às civilizações mais antiga a utilização de drogas de origem vegetal, animal e mineral para o tratamento de inúmeras doenças que afetam a população (MARTIN-SMITH e SNEADER 1969; CARRARA JR. e MEIRELLES 1996; LIMA JR. et al. 2005). Os primeiros relatos associando a utilização de vegetais para fins terapêuticos foram encontrados nos escritos do imperador chinês Shen Nung (3.000 a.C.), no código de Hamurabi (2.000 a.C.), no Papiro de Ebers (1.500 a.C.) e em Galeno (131 d.C.) (RIO, 2001)

No entanto, a pesquisa sistêmica de plantas medicinais iniciou-se somente no século XIX, quando o farmacêutico alemão Friederich Wilhelm Seturner isolou a morfina, substância responsável pela ação hipoanalgésica do ópio. Da mesma forma que a morfina muitos outros fármacos que compõem o arsenal terapêutico atual, derivaram da purificação de extratos vegetais e do isolamento de seus princípios ativos. (TREASE, 1983; PINTO et al. 2002)

No Brasil, o estudo farmacológico de plantas medicinais reveste-se de grande importância na introdução à terapêutica de novos medicamentos de origem vegetal, levando-se em conta que aproximadamente 90% das matérias primas farmacêuticas são importadas e cerca de 80% da população brasileira não tem acesso a medicamentos essenciais (BRASIL CENTRAL DE MEDICAMENTOS, 1987, apud RIO, 2001; WHO, 1991). A fitoterapia possibilitaria a essa população de baixa renda, que não tem acesso a medicamentos industrializados, um medicamento mais barato e de qualidade comprovada (AKERELE, 1988; VEIGA JR., PINTO e MACIEL, 2005).

A busca de novos medicamentos em plantas tropicais é, hoje, a esperança mais concreta para os pacientes e o caminho mais curto para os pesquisadores; sendo um grande desafio à elucidação dos seus componentes ativos assim como seus mecanismos de ação, representando um dos maiores objetos de estudo da farmacologia botânica. (MANS, ROCHA e SCHWARTSMANN, 2000; MACIEL, PINTO, VEIGA JR., 2002)

Embora o Brasil seja um país rico em Biodiversidade e domine a maioria das tecnologias para a produção de fitomedicamentos; há um elevado grau de desconhecimento da classe médica acerca dos princípios ativos, indicações e contra-indicações desses fitoterápicos; somado a visão de descrença da eficácia de ação desses produtos nas diversas doenças que afetam a população. (NASCIMENTO, 2000; VEIGA JR., PINTO e MACIEL, 2005).

A OMS define planta medicinal como sendo "todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgão, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos" podendo ser aplicada a várias afecções do organismo humano, com resultados científicos comprovados. (WHO, 1991)

Atualmente o estudo de plantas medicinais, ou mais abrangentemente produtos naturais, está relacionado com vários temas polêmicos como: conservação do meio ambiente, biopirataria e preservação dos povos indígenas (DI STASI, 1996; COUTINHO, TRAVASSOS e AMARAL, 2002). Foi realizado um estudo onde se obtiveram informações sobre 119 drogas derivadas de algumas plantas, que são utilizadas em larga escala no mundo, podendo-se verificar que 74% delas apresentam o mesmo uso que o das plantas das quais derivaram. Isto reforça a idéia de que a pesquisa de novos

fármacos apresenta um grande caminho ainda para ser percorrido, baseado nas propriedades etnofarmacológicas. (FARNSWORTH, 1988)

Nesse sentido, trabalhos reportam as indicações de plantas medicinais no tratamento das afecções bucais (OLIVEIRA e FERRAZ, 1998; PEREIRA, 1998; VEIGA JR. e PINTO, 2002). São encontrados relatos na literatura que associam a utilização da casca do cajueiro (*Anacardium occidentale*) e as folhas da mangueira (*Mangifera indica*), obtendo excelente ação em úlceras bucais (SAMPAIO, 1997). Pode ser observado ainda que o pó da madeira do pau-brasil apresenta importantes propriedades relacionadas ao fortalecimento gengival. (LIMA JR. et al., 2005)

Tomando por base indicações mais genéricas, aventa-se a hipótese dessas preparações fitoterápicas agirem sobre a massa de bactérias extremamente organizadas, que se aderem seletivamente às superfícies dentárias, constituindo o biofilme microbiano.

Ensaios laboratoriais *in vitro* têm demonstrado que a tintura de camomila (*Matricaria chamomilla*) possui efeito em certos microrganismos formadores do biofilme atuando de modo semelhante à clorexidina. (PEREIRA, 1998)

Outras substâncias naturais como o óleo de cajueiro *(Anacardium occidentale)* e do cravo *(Eugenia caryophyllata)* apresentam indicação no tratamento de infecções odontogênicas (XAVIER, 1995). Outro estudo demonstrou que o Romã *(Punica granatum)* apresenta atividade antimicrobiana sobre cepas de *Streptococcus mutans*, microrganismo de extrema importância no início do processo de cárie, além de ser bem empregado em gengivites e úlceras bucais devido a sua ação anti-séptica e antiinflamatória. (OLIVEIRA e FERRAZ, 1998)

O uso de preparações que se utilizam de plantas quando feito com critérios, só vem a contribuir com a saúde de quem a utiliza. Esses critérios referem-se à identificação do quadro clínico (doença ou sintoma), à escolha correta da planta a ser empregada, à adequada preparação, além do amplo conhecimento acerca dos efeitos tóxicos que o vegetal pode promover no corpo humano. (BANDEIRA et al. 1999; COSTA-LOTUFO et al. 2002; MACIEL, PINTO e VEIGA JR., 2002; VEIGA JR., PINTO e MACIEL, 2005)

2.5 Óleo Resina de Copaíba:

2.5.1 Histórico e considerações sobre o uso de plantas do gênero *Copaifera*

A Copaíba *(Copaifera sp)* ou Copaibeira é uma árvore de grande porte da família Leguminosae; estando o seu nome relacionado ao tupi "cupa-yba": a árvore que tem depósito, ou que tem jazida, em alusão ao óleo que guarda no interior do seu tronco. Popularmente conhecida como copaibeiras ou pau-dóleo, as espécies de Copaíba são comumente encontradas nas regiões amazônicas, centro-oeste e sudeste do Brasil. (PIO CORRÊA, 1984; BASILE et al. 1988; CASCON e GILBERT, 2000; RIO, 2001; BRAGGIO, 2003; ARAÚJO JR., 2004).

O óleo de Copaíba foi bastante utilizado entre os índios brasileiros, quando os portugueses aqui chegaram; estando seu uso apoiado em animais que quando feridos esfregavam-se no tronco dessas árvores (PINTO et al. 2002; VEIGA JR. e PINTO, 2002). Os índios o utilizavam principalmente como susbstância cicatrizante. (COUTINHO, TRAVASSOS e AMARAL, 2002).

No século XVII, os primeiros médicos do Brasil contornavam parcialmente a escassez de remédios, cujo suprimento à colônia era irregular, recorrendo às drogas indígenas. Os viajantes se abasteciam dessas drogas, "comprovadamente eficazes", antes de se aventurarem por lugares, até então, desconhecidos. Dentre essas drogas o óleo de Copaíba era uma das que desfrutava de maior prestígio entre os viajantes. (CORRÊA, 1978; SECCO, 1990; VIEIRA, 1992)

A primeira citação sobre o óleo de Copaíba talvez tenha sido feita numa carta de Petrus Martius ao Papa Leão X, publicada em 1534, em Estrasburgo. Naquela carta ele faz referência ao "Copei" como uma droga indígena, detentora de forte cheiro e que parecia possuir propriedades cicatrizantes.

Segundo o livro "De Natura Novi Orbis" escrito pelo padre jesuíta José Acost, traduzido para o português por José Maffeu que o intitulou "História Natural e Moral das Índias", assim se referiu ao óleo de Copaíba:

> "*O bálsamo é celebrado com razão por seu excelente odor, e muito maior efeito para curar feridas, e outros diversos remédios que para enfermidades, que nele se experimentam...*

... nos tempos antigos os índios apreciavam em muito o bálsamo,
com eles os índios curavam suas feridas e que delas aprenderam os espanhóis."

Nos dias atuais, o óleo de Copaíba pode ser facilmente encontrado em toda a Amazônia, onde é vendido em mercados e feiras populares, com diferentes denominações como: Panchimouti, palo de aceite, cabimo, copahyba, copaibarana, copaúba, copaibo, copal, maram, marimari e bálsamo dos jesuítas. Seu uso tão difundido torna o remédio natural mais usado e conhecido, principalmente pelas populações mais pobres dessa região, sendo utilizado como diurético, laxativo, antitetânico, antiblenorrágico, anti-reumático, anti-séptico do aparelho urinário, cicatrizante, antiinflamatório e com ação quimiopreventiva do câncer. (BASILE et al. 1988; BRITO, 1995; DOONAN e HUNT, 1996; PAIVA et al. 1998; BANDEIRA et al. 1999; BRITO et al. 2000; PESSOA et al. 2000; PAIVA et al. 2002; SUGIMOTO, 2003; LIMA, 2003; PAIVA et al. 2003; ARAÚJO JR., 2004; CASTRO e SILVA JR. et al. 2004; CARVALHO et al. 2005; VEIGA JR. et al. 2006).

Estudos fitoquímicos recentes mostram que os óleos de Copaíba verdadeiros são constituídos essencialmente de sesquiterpenos e diterpenos; sendo o ácido copálico e os sesquiterpenos β-cariofileno e α-copaeno (Figura 2A, 2B e 2C) os principais componentes do óleo. (VEIGA JR., PINTO e MACIEL, 2005; BIAVATTI et al. 2006)

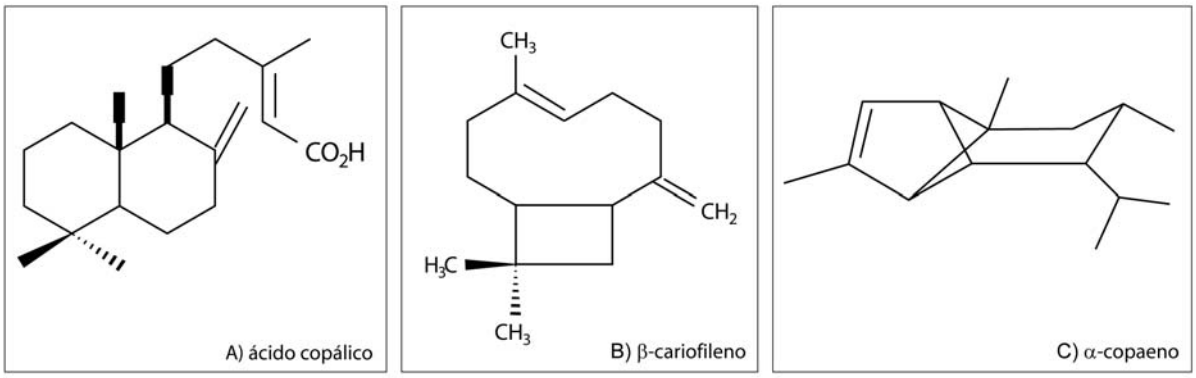


Figura 02 – Representação química dos principais constituintes dos óleos resina de Copaíba.

No território brasileiro, são encontradas mais de vinte espécies do óleo, e entre as mais abundantes destacam-se *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C.*

multijuga Hayne, *C. confertiflora* Bth., *C. langsdorffi* Desf., *C. coriacea* Mart. (VEIGA JR. e PINTO 2002)

A coleta do óleo pode ser realizada de forma sustentável pela confecção de um furo por meio de um trado na parte superior do tronco até o lenho, onde estão localizados grandes reservatórios do óleo; posteriormente abre-se outro orifício na parte inferior do tronco de onde se obtém um líquido transparente de viscosidade variável, cuja coloração pode variar do amarelo ao marrom, apresentando alta efetividade biológica, podendo também ser utilizado pelas indústrias cosméticas e de vernizes, atuando como agente fixador.(BANDEIRA et al. 1999; VEIGA JR., PINTO e MACIEL, 2005)

A carência de estudos químicos visando à caracterização do óleo de Copaíba, aliada à variabilidade natural inerente a esta matéria prima e à crescente demanda do mercado por medicamentos fitoterápicos, pode comprometer a autenticidade e efetividade dos produtos à base do óleo de Copaíba. Somado a isso, há uma grande dificuldade em garantir a identidade botânica da copaibeira, já que o óleo vem sendo obtido na maioria das vezes via extrativismo sustentável, e simultaneamente de várias espécies de *Copaifera*, sem a preocupação de uma padronização em relação a sua extração e classificação. (VEIGA JR., PINTO e MACIEL, 2005)

Um trabalho analítico recente teve como propósito realizar uma padronização desta matéria prima, apesar da grande diversidade natural, a cromatografia gasosa mostrou ser a técnica melhor indicada para estas avaliações. (BIAVATTI et al. 2006)

2.5.2 Atividade biológica do óleo resina de Copaíba

O conhecimento dos benefícios de certas plantas no tratamento de infecções faz parte do acervo da cultura popular desde a mais remota antiguidade. (NASCIMENTO, 2000; RIO, 2001). Em qualquer parte do mundo a crença de que as plantas da flora local são indicadas para determinadas enfermidades é um aspecto relevante a ser considerado. (TREASE, 1983; WHO 1991; XAVIER, 1995; DI STASI, 1996; PINTO et al. 2002)

Avaliações *"in vivo"* e *"in vitro"* têm demonstrado que os óleos de várias espécies de copaíferas possuem atividade antiinflamatória, cicatrizante, antiedematogênica, antitumoral e bactericida; sendo crescente seu uso como fitoterápico. (BASILE et al.

1988; BRITO, 1995; DOONAN e HUNT, 1996; PAIVA et al. 1998; BANDEIRA et al. 1999; BRITO et al. 2000; PESSOA et al. 2000; PAIVA et al. 2002; SUGIMOTO, 2003; LIMA, 2003; PAIVA et al. 2003; ARAÚJO JR., 2004; CASTRO e SILVA JR. et al. 2004; CARVALHO et al. 2005; VEIGA JR. et al. 2006).

Um dos importantes trabalhos comprovando cientificamente a eficácia do óleo resina de Copaíba avaliou a diminuição do edema da pata de ratos que foram tratados com o óleo, podendo também ser observado uma acentuada redução no mecanismo de permeabilidade vascular. (VEIGA JR. et al. 2006)

A preocupação com a biocompatibilidade do óleo resina de Copaíba e posterior validação no seu uso em Odontologia, fez com que Ribeiro, 1989 realizasse uma tese onde estudou através de determinação quantitativa do líquido plasmático extravasado, o potencial irritativo do óleo resina de Copaíba, água de cal e eugenol; atuando como substância controle o óleo mineral Nujol e solução salina fisiológica. Os resultados baseados nos valores médios obtidos de densidade óptica revelaram-se baixos à moderados para o óleo resina de Copaíba; moderados para água cal e de intensa densidade óptica para o eugenol. Em relação aos grupos controles estes exibiram valores pouco significantes estatisticamente. O autor baseado em seu protocolo experimental pode concluir que o óleo de Copaíba possui biocompatibilidade e deve ser empregado com segurança em Odontologia.

Com o propósito de se avaliar o efeito de proteção gástrica do óleo de Copaíba em comparação ao Etanol e Indometacin foi realizado um estudo experimental, onde o estômago dos animais foi agredido por altas doses de Etanol e Indometacin; em seguida eram administrados por via oral doses de 200 e 400mg/kg do óleo resina de Copaíba; após quatro horas os animais eram mortos podendo ser observada uma significativa redução no volume do suco gástrico, e da secreção mucosa, notando-se também um decréscimo nos índices de acidez estomacal. Os resultados sinalizaram um possível efeito gastroprotetor do óleo resina de Copaíba. (PAIVA et al. 1998)

Seguindo a mesma linha do estudo acima, outro trabalho se propõe a avaliar o efeito do óleo de Copaíba sobre o epitélio do colo uterino de ratas ooferoctomizadas, foi realizado um estudo com 120 ratas adultas, distribuídas em quatro grupos: as que receberam aplicação do óleo de Copaíba, óleo de milho, água e um grupo controle. Todos os animais foram submetidos à ooferoctomia bilateral e posteriormente mantidos em

gaiolas por um período de vinte dias sob observação. As substâncias foram administradas via vaginal na dose de 0,3ml diariamente, até os dias determinados para a morte, respectivamente 7, 14 e 21 dias. Todos os animais do grupo Copaíba apresentaram epitélio exuberante do tipo pavimentoso estratificado, queratinizado com 10 à 15 fileiras de células epiteliais, lâmina própria com tecido conjuntivo denso, rico em fibras colágenas, apresentando inúmeros vasos sanguíneos e ocasionais células inflamatórias mononucleares em arranjo difuso pelo tecido conjuntivo. Como conclusão observou-se que o óleo de Copaíba atuaria promovendo o espessamento do epitélio do colo uterino destes animais. (BRITO et al. 2000)

O processo de reparação tecidual representa um importante mecanismo de resposta a injúrias teciduais, caracterizando uma série de eventos celulares, fisiológicos e moleculares, relacionados com a restauração da integridade funcional e estrutural do tecido lesado. Muitos extratos de plantas têm apresentado potencial terapêutico contribuindo para uma melhor reparação tecidual. (OOMMEN, RAO e RAJU, 1999; MUKHERJEE, VERPOORTE e SURESH, 2000; PAIVA et al. 2002)

Uma das importantes propriedades do óleo de Copaíba relaciona-se ao seu poder cicatrizante, nos poucos trabalhos que avaliaram a ação tópica do óleo, pode ser observado macroscopicamente um aumento no diâmetro da crosta das lesões, perda de pêlos e presença de escaras em torno de feridas cutâneas em ratos; as quais corresponderam microscopicamente à presença de maior quantidade de tecido de granulação, maior número de vasos sanguíneos, com significativa redução na quantidade de fibras colágenas. (PAIVA et al. 2002; CARVALHO et al. 2005)

Ao contrário do estudo acima, outro trabalho demonstrou que a aplicação tópica do óleo acelerou significativamente a contração de feridas cutâneas em dorso de ratos, quando comparada à aplicação de uma solução de soro fisiológico isoladamente. (BRITO, 1995);

Ainda relacionado à aplicação do óleo de Copaíba em estudos envolvendo cicatrização tecidual; foi realizado um estudo que propôs uma comparação histológica entre o óleo resina de Copaíba, digluconato de clorexidina a 0.12% e soro fisiológico (controle positivo) no processo de cicatrização tecidual em dorso de ratos em três períodos predeterminados de 1, 7 e 15 dias. Os resultados histológicos quantitativos demonstraram uma redução estatisticamente significante no grau de inflamação nos três

grupos avaliados. A análise microscópica demonstrou que nos períodos inicial e final, havia um perfil semelhante de cicatrização entre os dois tipos de tratamento. Entretanto no período experimental intermediário de sete dias, as feridas cutâneas encontravam-se completamente epitelizadas apenas nos grupos clorexidina a 0.12% e óleo-resina de Copaíba. A conclusão do estudo sinaliza para o fato de que as feridas cutâneas tratadas com solução aquosa de digluconato de clorexidina a 0.12% apresentariam uma velocidade de cicatrização mais rápida se comparada com àquelas tratadas com soro fisiológico e óleo resina de Copaíba. (CAVALCANTI NETO et al. 2005)

Na Odontologia, são poucos os trabalhos, que abordam a aplicação biológica do óleo resina de Copaíba; um dos trabalhos importantes nesta área promoveu uma avaliação comparativa da biocompatibilidade biológica em molares de rato, associando o uso do óleo resina de Copaíba e do hidróxido de cálcio; seus resultados puderam atestar que essa associação promoveu uma melhor reparação tecidual e uma diminuição de intensidade do infiltrado inflamatório, esse trabalho foi o ponto de partida para pesquisas com produtos naturais que pudessem fornecer potencial de reparação ao tecido pulpar. (BANDEIRA, et al. 1999)

Um estudo desenvolvido pelo Instituto de Química (IQ) e pelo Centro de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade de Campinas analisou substâncias sintetizadas em laboratório a partir de componentes do óleo de Copaíba, apresentando resultados importantes contra nove linhagens de câncer, inibindo a proliferação de células neoplásicas. O processo de estudo com a Copaíba ainda carece de testes toxicológicos com a finalidade de avaliar se as substâncias não afetariam também as células normais, o que exigiria estudos mais detalhados sobre dosagens até que se chegasse a uma concentração que os pesquisadores julgam não ser tóxica (ideal) ao organismo humano.

Outro importante trabalho estudou o efeito da administração oral do óleo resina de Copaíba em cobaias imunologicamente comprometidas e em linhagens de cultura de células de melanoma. Os testes *in vitro* procuraram avaliar o efeito citotóxico do óleo resina; enquanto os testes *in vivo* avaliaram frações de diterpenos e sesquiterpenos aplicados nos tumores induzidos. Os resultados do estudo mostraram que o óleo resina de Copaíba apresentou propriedades citotóxicas além de uma atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo.* (LIMA, 2003).

3

Proposição

3 Proposição

Baseado em um modelo experimental para o estudo da carcinogênese química bucal e sua semelhança com os carcinomas bucais humanos; e ao grande número de trabalhos que associam substâncias exercendo um papel quimiopreventivo do câncer bucal é que foi desenvolvido este trabalho, cujos principais objetivos foram:

3.1 Avaliar macroscopicamente e microscopicamente as alterações decorrentes da aplicação tópica do DMBA, ratificando o seu potencial carcinogênico;

3.2 Avaliar macroscopicamente e microscopicamente as alterações decorrentes da aplicação tópica do óleo resina de Copaíba *in natura* e em emulsão oral, manipulado artesanalmente.

3.3 Correlacionar às alterações macroscópicas com os aspectos microscópicos, procedendo ao correto diagnóstico das lesões cancerizáveis e das neoplasias DMBA-induzidas, na mucosa bucal dos animais experimentais nos respectivos períodos de 7, 13 e 20 semanas de aplicação das substâncias exprimentais;

3.4 Avaliar estatisticamente alguns parâmetros nos animais da amostra; tais como:

3.3.1 Variação de peso dos animais

3.3.2 Tamanho das lesões bucais

3.3.3 Localização das lesões bucais

3.5 Avaliar o efeito inibidor tumoral do óleo resina de Copaíba in natura e em solução, por meio da metodologia experimental DMBA induzida.

4

Material e Métodos

4 Material e Métodos

4.1 Material

4.1.1 A amostra e as condições do experimento

Foram utilizados 80 hamsters sírios dourados *(Mesocricetus auratus),* sendo 30 fêmeas e 50 machos.

Os animais foram obtidos em linhagem do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, ocorrendo posterior encaminhamento destes para o Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo; esperando-se atingir a idade de 60 dias e um peso corporal médio entre 90 e 100 gramas, permanecendo sob observação diária por um período de 25 dias.

Figura 03 – Autoclave horizontal utilizado na esterilização da maravalha para forramento das caixas plásticas.

Durante todo o experimento os animais foram acomodados em gaiolas plásticas, criteriosamente separadas pelo gênero, respeitando-se o limite de cinco animais por gaiola, totalizando três gaiolas para cada grupo. As mesmas eram higienizadas em dias alternados, com trocas das caixas plásticas, lavagem, secagem e acondicionamento da serragem não pulverizada.

A maravalha, do tipo pinus, era armazenada em sacos plásticos de 20 quilos e transportada ao biotério do Instituto Lauro de Souza Lima para remoção de impurezas e posterior autoclavagem (Figura 3).

As gaiolas encontravam-se dispostas uma ao lado da outra, apresentando identificação que individualizava o nome do (s) pesquisador (es), departamento responsável pela pesquisa e título da pesquisa. Os animais faziam uso de ração padronizada Nuvilab CR-1, além de água *ad libitum*.

Com a finalidade de evitar possíveis trocas dos animais em relação aos seus respectivos grupos, no início do experimento procedeu-se a marcação na orelha dos animais baseado no sistema australiano de marcação de Suínos, e modificado para nosso trabalho através de perfuração, com alicate perfurador de lençol de borracha (Figura 4).

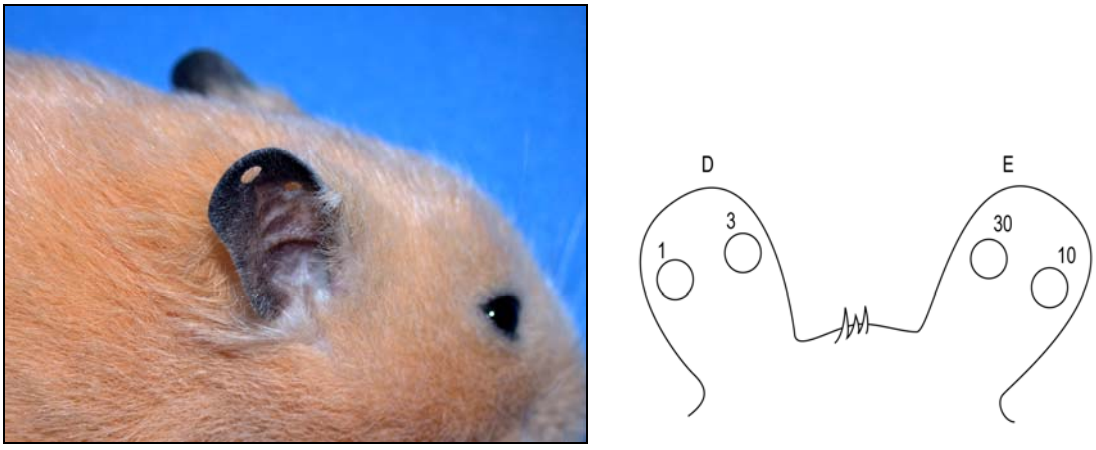


Figura 04 – Marcação da orelha dos animais experimentais, adaptado do sistema australiano de marcação de suínos, para melhor identificação do grupo experimental.

Os animais foram pesados em dois tempos experimentais; quando do inicio da aplicação das substâncias e no dia da morte, respectivamente. Utilizou-se uma balança de alta precisão específica para pesagem de animais (Figura 5); sendo em seguida os dados anotados em fichas apropriadas.

Nas colônias de animais de laboratório convencionais, a incidência de parasitas é um evento constante, acarretando alterações nutricionais e fisiológicas; interferindo no desenvolvimento animal e conseqüentemente nos resultados da pesquisa. Com o propósito de realização de um controle parasitológico dos animais previamente a aplicação das substâncias experimentais, foram colhidas as fezes dos animais de cada

grupo experimental, e em seguida realizado exame coproparasitológico, em uma clinica veterinária particular; não sendo observado microrganismos patogênicos bem como ovos, larvas e cistos de protozoários; o que nos proporcionou maior segurança em relação à utilização dos animais experimentais, assim como em relação aos resultados da pesquisa. (Anexo 3)

No biotério, o ambiente onde os animais permaneceram era parcialmente iluminado, com luz artificial no período noturno, apresentando uma temperatura ambiente que variava entre 25º e 30º, não havendo exposição direta a radiação solar.

Figura 05 – Balança utilizada para avaliação do peso dos animais no início do experimento e no dia da morte, em seus respectivos tempos experimentais.

4.1.2 Classificação e caracterização dos grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em cinco grupos experimentais, apresentando quinze animais em cada grupo, e mais um animal excedente distribuído por cada grupo, correspondendo a três períodos experimentais no intervalo de 7, 13 e 20 semanas, respectivamente.

A distribuição dos grupos experimentais obedeceu à seguinte classificação:

GRUPO I	9,10-Dimetil-1,2-Benzoantraceno (DMBA)
GRUPO II	Óleo resina de Copaíba na forma *in natura*
GRUPO III	Emulsão de óleo de Copaíba manipulada artesanalmente
GRUPO IV	9,10-Dimetil-1,2-Benzoantraceno (DMBA) + Óleo resina de Copaíba na forma *in natura*
GRUPO V	9,10-Dimetil-1,2-Benzoantraceno (DMBA) + Emulsão de óleo de Copaíba manipulada artesanalmente

4.1.2.1 A solução de DMBA

O carcinógeno foi preparado com a finalidade de obtermos uma solução a concentração de 0,5%, diluída em acetona. O DMBA (Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA) na forma de pó (500mg) foi depositado em recipientes plásticos específicos e posteriormente pesado em uma balança de alta precisão Gehaka modelo BG 440; sendo em seguida diluído em 100ml de acetona (Figura 6 e 7). A solução obtida foi homogeneizada em um agitador magnético marca Fisatom, modelo 752A pelo período de 30 minutos, sendo posteriormente acondicionada em vidro âmbar, rotulada e conservada em geladeira a temperatura de 4ºC, no Laboratório de Processamento Histotécnico da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Figura 06 – Pó de DMBA (9,10-Dimetil-1,2-benzoantraceno) utilizado no experimento.

Figura 07 – Balança de alta precisão utilizada para pesagem do pó de DMBA.

4.1.2.2 Óleo resina de Copaíba na forma *in natura*

A solução de óleo de Copaíba utilizada foi da espécie *Copaifera reticulata Ducke*, adquirida junto a Empresa Brasmazon Importação e Exportação LTDA. Este óleo foi submetido à análise de cultura bacteriana, análise físico-química e cromatográfica. A cultura foi realizada com o intuito de avaliar o crescimento ou não de colônias bacterianas; na análise físico-química foram obtidos os índices de acidez, saponificação e refração da amostra; enquanto a análise cromatográfica revelou seus principais constituintes e definiu seus graus de impureza. Optou-se pela utilização do óleo na sua forma *in natura*, pois é desta maneira que o mesmo é utilizado pela população mais carente, das várias regiões do Brasil, especialmente da região amazônica.

4.1.2.3 Solução de óleo de Copaíba manipulado artesanalmente

Foi pincelada na borda lateral esquerda da língua do animal uma emulsão oral de óleo de Copaíba, manipulada artesanalmente na Pharmácia Específica de Bauru-SP, contendo: óleo de Copaíba *Copaifera reticulata Ducke* (ativo), óleo de rícino hidrogenado a 5% (emulsionante), metilparabeno e propilparabeno (conservantes), sacarose a 68% (edulcorante), Butilhidroxitolueno e Butilhidroxianisol (antioxidantes) e água destilada (veículo). A escolha desta formulação decorre do fato de esta ser a prescrição mais solicitada pelos profissionais da saúde junto a esta farmácia de manipulação; logo representando a forma de uso mais difundida entre a população.

4.2 Métodos

4.2.1 Aplicação dos agentes químicos

Seguindo a técnica preconizada por Fassoni em 1992, foram aplicadas diretamente na porção média da borda lateral esquerda da língua dos animais as soluções experimentais acima descritas. Esta aplicação foi realizada após secagem da borda lateral da língua com uma gaze e realizada com um pincel pelo de camelo numero zero (Tigre) realizando a aplicação dos produtos experimentais por quatro vezes consecutivamente. Para cada uma das soluções experimentais foi utilizado um pincel específico previamente identificado, havendo extremo cuidado em não contaminar o pincel com outras

substâncias. No grupo que recebeu a solução de DMBA associada à solução de óleo de Copaíba esta foi aplicada consecutivamente, respeitando-se o intervalo de dez minutos entre a aplicação da solução de DMBA (1º solução aplicada) e Óleo de Copaíba *in natura* e manipulada artesanalmente (2º solução aplicada).

Durante a aplicação, os animais foram contidos mecanicamente, de modo que a cavidade bucal permanecesse o máximo possível de tempo aberta. Em seguida, com o auxílio de uma pinça dente de rato realizou-se o tracionamento da língua, permitindo que as soluções fossem mais facilmente aplicadas na borda lateral esquerda da língua. Foi observado imediatamente após a aplicação, que a solução algumas vezes não se limitava exclusivamente à borda lateral da língua, escorrendo para outras regiões da mucosa bucal dos animais experimentais, como exemplo soalho bucal e mucosa jugal. (Figura 8A e 8B)

Figura 08A – Contenção mecânica do animal com a finalidade de melhor aplicação das soluções experimentais.

Figura 08B – Aplicação com pincel das soluções na borda lateral da língua dos hamsters, quatro vezes consecutivamente.

4.2.2 Morte dos animais, obtenção e preparação dos especimes

Como descrito anteriormente cada grupo amostral foi composto por 15 animais divididos em três tempos experimentais de 7, 13 e 20 semanas, respectivamente. Os animais foram anestesiados associando-se o anestésico com relaxante muscular, empregando-se cloridato de quetamina a 10%, via intramuscular, na dosagem de 0,1 mL/100 g de peso corporal, e cloridato de xilazina, via intraperitoneal, na dosagem de 0,01 mL/100 g de peso corporal; seguido de decaptação e tricotomia da região dorsal por meio de tesoura e barbeador descartável (Figura 9 e 10). Logo após foi realizada necropsia onde foi removida a língua, linfonodos regionais, fígado, rins e pulmões. Os órgãos retirados foram fixados em formaldeído tamponado a 10% e colocados em frascos de

vidro devidamente identificados permanecendo por 48 horas, após o que foram preparados pelo procedimento laboratorial de rotina até serem incluídos em parafina. Após a confecção dos blocos de parafina foram obtidas três lâminas de cada animal com cortes de cinco micrometros de espessura, em micrótomo Spencer 820, American Optical Company, USA com navalhas descartáveis e coradas em seguida pela técnica histoquímica da hematoxilina e eosina (H.E.).

Figura 09 – Contenção mecânica do animal seguida da aplicação do anestésico e relaxante muscular na região posterior caudal do hamster.

Figura 10 – Realização da tricotomia na região dorsal do animal imobilizado com a utilização de tesoura apropriada; seguido de necropsia onde foi removida a língua, linfonodos regionais, fígado, rins e pulmão, para avaliação macroscópica e microscópica.

4.2.3 Análise físico-química do óleo resina de Copaíba

Foi utilizado para estudo um litro de óleo resina de Copaíba natural obtido por meio da empresa Brasmazon Ltda, da espécie *Copaifera reticulata*, de origem da região transamazônica; entre as cidades de Santarém e Itaituba, no estado do Pará; possuindo aparência liquída transparente e com baixa viscosidade. O liquido exibia coloração verde clara, sendo que quando exposto ao ar escurecia e ao ser espalhado em uma superfície seca produzia uma película dura, resinosa. O óleo mostrava-se insolúvel em água e solúvel em solventes orgânicos, sendo parcialmente solúvel em álcool 95 %. Os valores relativos à densidade foram: 0,930 +-0,020; índice de acidez correspondendo a 12,4% e índice de refração de 1,500 +- 0,020. (Anexo 1)

4.2.4 Análise cromatográfica do óleo resina de Copaíba

A análise cromatográfica do óleo da espécie *copaifera reticulata*, para autenticação e conhecimento de seus principais componentes, foi realizado em um cromatógrafo de fase gasosa modelo HP 5890-II propriedade do Museu Paraense Emílio Goeldi – Belém/Pa equipado com detector de ionização de chama e condutividade térmica, usando como gás de arraste para a ionização de chama o hidrogênio e pressão de 20 a 40 lbs/pol^3; esse aparelho estava acoplado a um integrador HP 3396-II.

Utilizou-se o seguinte sistema de análise:

- Coluna de aço inoxidável com coluna capilar de sílica DB-5MS (30m x 0,25mm x 0,25mm)
- Temperatura do injetor e do detector: 250ºC
- Temperatura do vaporizador: 250ºC
- Fluxo do gás: 30 mL/min
- Programa de temperatura: 60ºC-240ºC (3ºC/min)
- Velocidade do papel: 1 pol/min
- Atenuação de saída do cromatógrafo: 1K
- Ajuste de fundo da escala: 10
- Atenuação de saída do integrador: 10

A imagem do cromatograma de íons totais da amostra exibe como componentes principais: beta-cariofileno (70,4%), alfa-humuleno (9,6%), alfa-copaeno (3,8%), óxido de cariofileno (1,1%) (Figura 11).

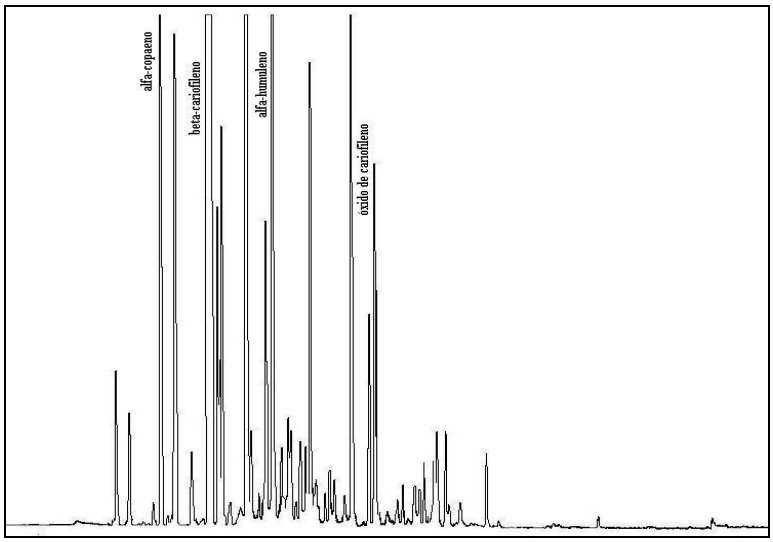


Figura 11 – Leitura por cromatografia gasosa do óleo resina de Copaíba *(Copaifera reticulata)* exibindo seus principais constituintes.

A obtenção do óleo essencial e da resina do óleo bruto da *copaifera reticulata* foi realizada em um aparelho de destilação, sendo que o óleo essencial foi separado da resina por densidade, obtendo-se um rendimento de 30% e 60%, respectivamente. A essência mostrou-se como um líquido incolor, límpido e resina como um líquido viscoso e amarelado.

4.2.5 Avaliação macroscópica

Durante todo o experimento, os animais foram monitorados quanto a alterações comportamentais sendo estas classificadas clinicamente e registradas em fichas apropriadas, onde também foram documentadas fotograficamente, utilizando-se uma máquina Nikon D-70, com lente macro de 105mm. As modificações macroscópicas observadas e classificadas de acordo com sua morfologia foram adaptadas; a partir das classificações estabelecidas por Fassoni, 1992; Salles, 1993; Lima, 1999; Camargo, 1999; estando assim agrupadas:

1	Sem alterações
2	Pápula
3	Lesão papilomatosa
4	Úlcera rasa
5	Nódulo sem ulceração
6	Nódulo ulcerado

4.2.6 Análise microscópica

Os cortes teciduais foram corados e observados em microscópio Binocular Olympus, Modelo CHS 2 (Olympus Optical Co. Ltda Japan). As análises microscópicas foram realizadas por um único observador, previamente calibrado, respeitando o intervalo de tempo de 30 dias entre as duas análises. As alterações observadas foram diagnosticadas, classificadas e quantificadas em valores numéricos (VN) de acordo com os trabalhos de Fassoni, 1992; Salles, 1993; Lima, 1999; Camargo, 1999 e estabelecidas de maneira crescente de acordo com a severidade da lesão:

4.2.6.1 Mucosa normal (VN = 1)

A mucosa bucal do animal, como um todo, é revestida por epitélio estratificado pavimentoso, apresentando áreas de variados padrões de queratinização, dependendo da localização. As variações na estrutura da mucosa em diferentes partes da boca refletem variações em suas funções. Na mucosa lingual lateral, o epitélio de revestimento assume padrão estratificado pavimentoso discretamente queratinizado. A camada granulosa é mínima e a junção epitélio-conjuntivo apresentando moderadas projeções epiteliais que migram em direção à lâmina própria.

4.2.6.2 Hiperplasia e hiperqueratose (VN = 2)/(VN = 3)

A hiperplasia epitelial foi considerada sempre que se observava um aumento significativo do número de camadas epiteliais provenientes de qualquer camada epitelial, especialmente do estrato espinhoso, ultrapassando o número de camadas da mucosa normal da borda lateral lingual dos hamsters. Tendo em vista a discreta queratinização do epitélio, a presença de um aumento da paraqueratose ou ortoqueratose, em qualquer intensidade foi considerada.

A hiperplasia e hiperqueratose foram subdivididas quanto à presença ou ausência de displasia epitelial.

a) Hiperplasia e hiperqueratose sem displasia epitelial

Neste item foi quantificado subjetivamente o grau da hiperplasia e hiperqueratose, considerando-a como **discreta (VN=2,0)**, **moderada (VN=2,4)** e **intensa (VN=2,8)**. O valor numérico definitivo para cada caso

em relação à hiperplasia e hiperqueratose, foi estabelecido a partir da média dos valores numéricos relacionados a cada uma delas.

b) Hiperplasia e hiperqueratose com displasia epitelial

O diagnóstico de displasia epitelial obedeceu aos critérios adotados pela WHO (1978) e Katz, Shear e Altini (1985). Estes critérios estão demonstrados a seguir:

1) Perda de polaridade das células da camada basal;
2) Várias camadas de células com padrão basalóide;
3) Aumento do índice núcleo/citoplasma;
4) Grande quantidades de figuras de mitose;
5) Intenso pleomorfismo celular;
6) Hipercromatismo nuclear;
7) Nucléolos evidentes;
8) Diminuição da coesão celular;
9) Disqueratose moderada a intensa;
10) Cristas epiteliais irregulares;
11) Estratificação epitelial irregular;
12) Mitoses atípicas

Para melhor padronização dos diagnósticos microscópicos de carcinoma espinocelular em relação à mucosa bucal dos animais experimentais, bem como a obtenção de valores numéricos que facilitem a tabulação estatística, foi utilizada a classificação proposta por Bryne et al. 1991.

Tabela 1 – Critérios de malignidade microscópica utilizada no estudo de Bryne et al, 1991. Apenas as partes mais invasivas dos tumores foram classificadas.

Característica morfológica	Escore			
	1	2	3	4
Grau de queratinização	Altamente queratinizado (> 50% das células)	Moderadamente* queratinizado (20-50% das células)	Mínima* queratinização (5-20% das células)	Ausência de queratinização (0-5% das células)
Polimorfismo nuclear	Pouco polimorfismo nuclear (> 75% células maduras)	Polimorfismo nuclear moderadamente* abundante (50-75% células maduras)	Polimorfismo nuclear abundante* (25-50% células maduras)	Polimorfismo nuclear extremo* (0-25% células maduras)
N° de mitoses (campo de grande aumento)	0-1	2-3*	4-5*	> 5
Padrão de invasão	Bordas infiltrativas ativas e bem delineadas*	Linhas, bandas e/ou cordões sólidos infiltrativos*	Pequenos grupos* ou cordões de células infiltrativas (n > 15)	Dissociação celular acentuada e disseminada em pequenos grupos e/ou células isoladas (n < 15)

4.2.6.3 Carcinoma microinvasivo (VN = 4)

Este diagnóstico foi estabelecido a partir da destruição da membrana basal do epitélio lingual dos hamsters pelas células neoplásicas atípicas, com invasão localizada e restrita à lâmina própria.

4.2.6.4 Carcinoma invasivo sem metástase aparente (VN = 5)

Foi diagnosticado quando a invasão comprometeu a lâmina própria e submucosa, porém sem a presença de metástases regionais ou à distância.

4.2.6.5 Carcinoma invasivo com metástase aparente (VN = 6)

Neste caso, as características para o diagnóstico do carcinoma invasivo foram semelhantes as do item anterior, sendo acrescentada à presença de metástases nos órgãos retirados durante a necropsia dos animais. Os linfonodos, rins, pulmão e fígado foram analisados criteriosamente, avaliando-se morfologicamente os seguintes aspectos: desorganização estrutural, alterações degenerativas, presença de infiltrado inflamatório e a ocorrência de neoplasia primária ou metastática

4.3 Tratamento estatístico

Os valores numéricos relacionados a cada grupo experimental foram tabulados estatisticamente, com a finalidade de avaliação da significância estatística baseando-se no método não paramétrico de Kruskal Wallis, que objetivou comparar a ocorrência de alterações como: peso dos animais, tamanho da lesão, quantidade de lesões em relação aos cinco grupos experimentais e teste Dunn aplicado ao estudo de comparação múltipla entre os cinco grupos experimentais. Em relação à localização das lesões no interior da cavidade bucal não foram realizados testes indutivos, somente análise descritiva da ocorrência e localização dessas alterações. Como auxilio na elaboração dos dados estatísticos foram utilizados os softwares: Statistica versão 5.1 (Stat Soft Inc.) e Sigma Stat versão 2.0 (Spss Inc.).

4.4 Princípios éticos

O protocolo utilizado neste estudo está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e aprovado pela Comissão de Ética em Ensino e Pesquisa em Animais (CEEPA) da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo FOB/USP, em reunião de 25 de março de 2003, segundo o Protocolo de Pesquisa nº 024/05. (Anexo 2)

5

Resultados

5 Resultados

Neste capítulo, serão descritas as características de maior relevância relacionadas aos animais experimentais e seus respectivos grupos. Os resultados serão apresentados respeitando-se a seguinte seqüência: Variação do peso dos animais, tamanho, localização das lesões, aspectos macroscópicos e microscópicos.

Procurou-se apresentar os resultados sob a forma de tabelas e gráficos; sendo as particularidades de maior interesse relacionadas a cada grupo experimental, destacadas ao longo do texto. Os achados clínicos apresentados na forma de figuras foram escolhidos levando-se em consideração os aspectos morfológicos mais relevantes de ocorrência nos diversos grupos.

O critério de seleção das fotomicrografias respeitou a análise microscópica mais significativa dos espécimes de cada grupo experimental, procurando-se registrar cada fenômeno em quadros elaborados para esse fim, isso com o intuito de facilitar o entendimento evolutivo em relação a estes achados microscópicos.

Durante a realização da fase experimental pode-se observar e documentar a morte de seis animais experimentais (dois machos e quatro fêmeas). Dois animais morreram provavelmente em decorrência de disputa entre os animais de um mesmo grupo; outros dois animais apresentaram quadros de caquexia ao longo do experimento, o que culminou com as mortes no período entre a 17º e 19º semana de aplicação das substâncias experimentais, e por fim os outros dois animais morreram por contato físico, seguido de prática de canibalismo; o que é frequentemente encontrado nos relatos envolvendo esta espécie animal.

5.1 Variação do peso dos animais experimentais

A preocupação com os possíveis efeitos sistêmicos nos animais envolvidos na pesquisa e sua relação com o desenvolvimento dos tumores bucais, como conseqüência da aplicação das substâncias, DMBA (9,10-Dimetil-1,2-benzoantraceno), óleo resina de Copaíba natural e em emulsão manipulada artesanalmente, fez com que se procedesse a avaliação do peso dos animais em dois momentos experimentais; cujos valores encontram-se expressos na tabela abaixo:

Tabela 2 – Valores referentes ao peso dos animais dos diferentes grupos experimentais, quando da morte dos animais no período de 7, 13 e 20 semanas.

Grupo	Tempo (semanas)	Animal	Gênero	Peso inicial (g)	Peso final (g)
Grupo I (DMBA)	7	1	M	118	126
		2	M	118	124
		3	M	128	143
		4	M	119	128
		5	M	122	136
		6++	F	145	Óbito
	13	1	F	135	138
		2	F	138	134
		3	F	118	123
		4	F	119	116
		5	F	123	118
	20	1	M	139	110
		2	M	128	73
		3	M	115	84
		4	M	132	Óbito
		5	M	125	63
Grupo II (*Óleo in natura*)	7	1	F	139	143
		2	F	119	126
		3	F	145	168
		4	F	148	168
		5	F	170	176
	13	1	M	112	110
		2	M	115	142
		3	M	119	125
		4	M	105	114
		5	M	118	133
	20	1	F	131	140
		2	F	128	142
		3	F	147	159
		4	F	121	153
		5	F	121	165
		6++	F	134	Óbito
Grupo III (*Óleo manipulado*)	7 Sem	1	M	129	159
		2	M	134	158
		3	M	138	156
		4	M	115	186
		5	M	114	Óbito
	13 sem	1	F	143	184
		2	F	121	167
		3	F	137	166
		4	F	138	162
		5	F	142	162
	20	1	M	131	151
		2	M	132	165
		3	M	138	164
		4	M	132	198
		5	M	154	195
		6	M	128	146
Grupo IV (*Dmba + Óleo in natura*)	7	1	F	145	150
		2	F	130	151
		3	F	137	161
		4	F	146	Óbito
		5	F	128	142
	13	1	M	117	132
		2	M	142	173
		3	M	132	152
		4	M	133	164
		5	M	130	156
	20	1	M	126	139
		2	M	121	155
		3	M	98	134
		4	M	123	143
		5	M	116	136
		6++	F	121	195
Grupo V (*Dmba + Óleo manipulado*)	7	1	M	117	132
		2	M	105	128
		3	M	124	159
		4	M	142	152
		5	M	128	140
	13	1	M	120	136
		2	M	121	138
		3	M	117	144
		4	M	123	139
		5	M	117	136
	20	1	M	120	117
		2	M	116	Óbito
		3	M	140	155
		4	M	131	127
		5	M	132	149
		6++	F	137	110

Os dados relacionados à média da variação de peso dos animais, quando da comparação entre os diversos grupos, nos três tempos experimentais, encontram-se representados na tabela 3 e no gráfico 1 abaixo, onde pôde-se observar que no grupo I (DMBA) no período experimental de 20 semanas os animais apresentaram uma expressiva perda de peso, quando comparado aos outros grupos experimentais da amostra.

Tabela 3 – Valores expressos para as médias de variação de peso dos animais, em relação aos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas de experimento.

Grupo	Tempo experimental (semanas)	Média	N	DP
Grupo I (DMBA)	7	10,40	5	3,91
	13	-0,80	5	4,49
	20	-44,25	4	16,72
Grupo II (*Óleo in natura)*	7	12,00	5	8,80
	13	11,00	5	10,84
	20	22,20	5	15,14
Grupo III (*Óleo manipulado*)	7	35,75	4	24,01
	13	32,00	5	11,11
	20	34,00	6	17,83
Óleo Grupo IV (*Dmba + óleo in natura*)	7	16,00	4	8,45
	13	24,60	5	7,02
	20	32,83	6	22,04
Grupo V (*Dmba + Óleo Manipulado)*	7	19,00	5	10,22
	13	19,00	5	4,64
	20	-0,40	5	17,80

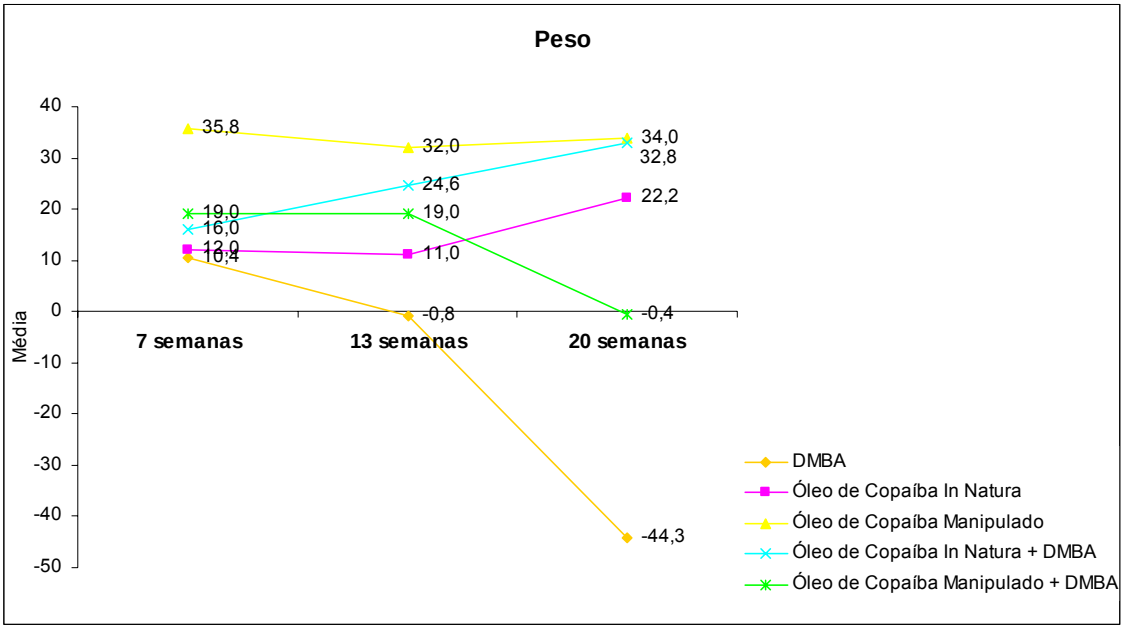


Gráfico 1 – Evolução das médias dos valores numéricos, nos diferentes grupos, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas de experimento.

De modo geral, notou-se que os animais que fizeram exclusivamente uso do óleo resina de Copaíba na sua forma natural, quer de maneira isolada, quer associado ao DMBA, apresentaram um aumento no peso corpóreo ao termino da 20ª semana de aplicação das substâncias experimentais; quando da comparação com os demais grupos amostrais.

Um outro dado relevante mostra que até a 13ª semana de aplicação das substâncias experimentais ocorreu pouca variação na média dos pesos dos animais, ocorrendo alterações mais significativas no período compreendido entre a 13ª e a 20ª semana de aplicação.

5.2 Tamanho das lesões na cavidade bucal dos animais experimentais

Os dados referentes à média do tamanho das lesões quimicamente induzidas na mucosa bucal dos hamsters estão representados na Tabela 4 e Gráfico 2**,** abaixo; na qual se observa um maior tamanho (diâmetro) das lesões no grupo I se comparada ao grupo IV e V respectivamente.

Para efeito de padronização quando da mensuração do tamanho das lesões e posterior tabulação estatística, os valores referentes ao tamanho das lesões bucais foram classificados, de acordo com escores numéricos:

0	Ausência de lesão
1	Diâmetro da lesão entre 1 e 5 mm
2	Diâmetro da lesão entre 5 e 10 mm
3	Diâmetro da lesão maior que 10 mm

Notou-se que o tamanho das lesões bucais nos animais do grupo IV e V foi comparativamente menor que o grupo I nos períodos experimentais de 13 e 20 semanas, respectivamente.

Ao relacionarmos a média dos valores para o grupo IV e o grupo V; pode-se observar um menor tamanho das lesões no grupo IV; sugerindo possivelmente um ligeiro efeito preventivo maior do óleo resina de Copaíba natural se comparado à contraparte manipulada artesanalmente.

Tabela 4 – Valores expressos para as médias do tamanho das lesões, em relação aos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas de experimento.

Grupo	Tempo experimental (semanas)	Média	N	DP
Grupo I (DMBA)	7	0,20	5	0,45
	13	1,40	5	0,55
	20	2,25	4	0,50
Grupo II (*Óleo in natura)*	7	0,00	5	0,00
	13	0,00	5	0,00
	20	0,00	5	0,00
Grupo III (*Óleo manipulado*)	7	0,00	4	0,00
	13	0,00	5	0,00
	20	0,00	6	0,00
Óleo Grupo IV (*Dmba + óleo in natura*)	7	0,00	4	0,00
	13	0,80	5	0,84
	20	1,33	6	1,03
Grupo V (*Dmba + Óleo Manipulado)*	7	0,20	5	0,45
	13	0,80	5	0,45
	20	1,80	5	1,10

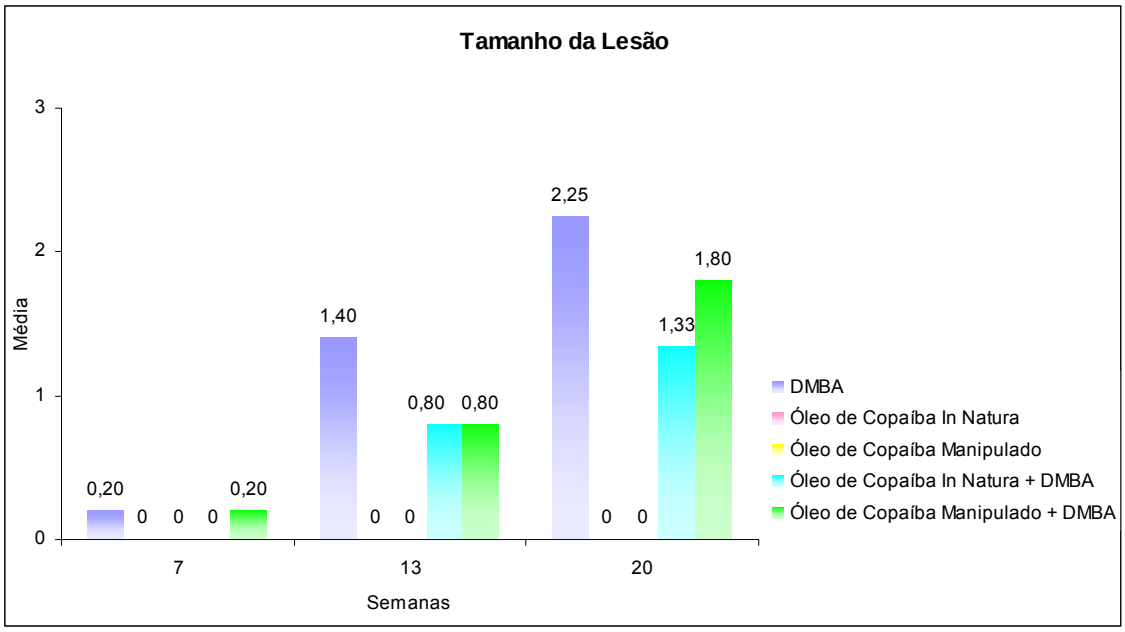


Gráfico 2 – Representação gráfica da média dos valores numéricos em relação ao tamanho da lesão, nos diferentes grupos, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas de experimento.

5.3 Localização das lesões na mucosa bucal dos animais experimentais

Um aspecto interessante quando da presença das lesões na cavidade bucal dos animais experimentais, diz respeito à ocorrência destas lesões em variadas localizações. De modo geral as lesões iniciavam-se entre a borda lateral da lingual, mucosa jugal e comissura labial; no entanto em alguns casos as lesões localizavam-se em outros sítios da boca. Para efeito de inspeção clinica destas lesões, quantificação e posterior tabulação estatística as localizações foram assim divididas:

0	Ausência de lesão
1	Borda lateral da língua
2	Dorso lingual
3	Ventre lingual
4	Mucosa jugal
5	Comissura labial
6	Soalho bucal
7	Outras localizações

Apesar da aplicação das substâncias ocorrer diretamente na borda lateral da língua dos animais, notou-se que estes líquidos fluiam para os tecidos adjacentes, o que justifica a variedade na localização destas lesões.

Para melhor interpretação dos dados, serão apresentados abaixo três gráficos e tabelas, relacionando-se os diferentes grupos nos tempos experimentais de 7, 13 e 20 semanas e a respectiva localização das lesões no interior da cavidade bucal dos animais experimentais.

Tabela 5 – Valores expressos para as frequências de localização da lesão, em relação aos diferentes grupos, no período de 7 semanas de experimento.

		Localização						
		0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
DMBA	N	4	1	0	0	0	0	0
	%	80	20	0	0	0	0	0
Óleo de Copaíba In Natura	N	5	0	0	0	0	0	0
	%	100	0	0	0	0	0	0
Óleo de Copaíba Manipulado	N	4	0	0	0	0	0	0
	%	100	0	0	0	0	0	0
Óleo de Copaíba In Natura + DMBA	N	4	0	0	0	0	0	0
	%	100	0	0	0	0	0	0
Óleo de Copaíba Manipulado + DMBA	N	4	0	0	0	0	1	0
	%	80	0	0	0	0	20	0

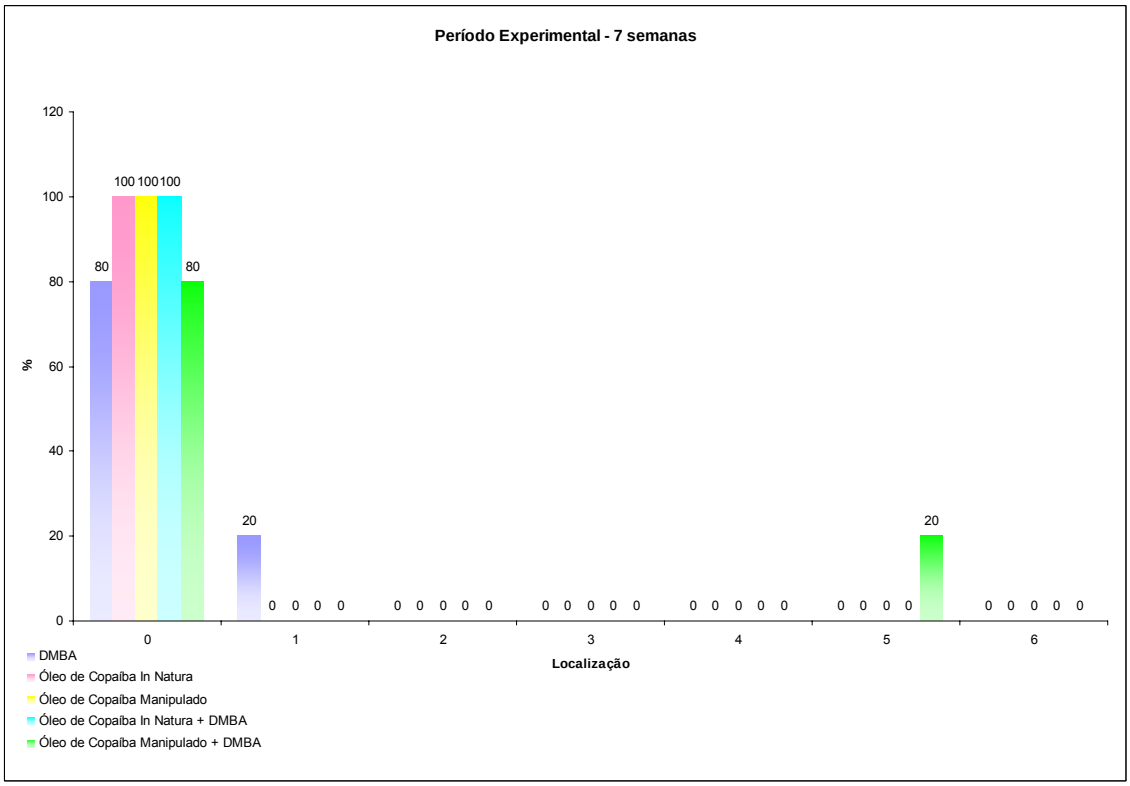


Gráfico 3 – Representação gráfica da freqüência de localização da lesão, nos diferentes grupos, no período de 7 semanas de experimento.

Tabela 6 – Valores expressos para as frequências de localização da lesão, em relação aos diferentes grupos, no período de 13 semanas de experimento.

		Localização						
		0	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
DMBA	N	0	1	1	2	1	0	0
	%	0	20	20	40	20	0	0
Óleo de Copaíba In Natura	N	5	0	0	0	0	0	0
	%	100	0	0	0	0	0	0
Óleo de Copaíba Manipulado	N	5	0	0	0	0	0	0
	%	100	0	0	0	0	0	0
Óleo de Copaíba In Natura + DMBA	N	2	0	0	0	2	1	0
	%	40	0	0	0	40	20	0
Óleo de Copaíba Manipulado + DMBA	N	1	0	0	0	2	2	0
	%	20	0	0	0	40	40	0

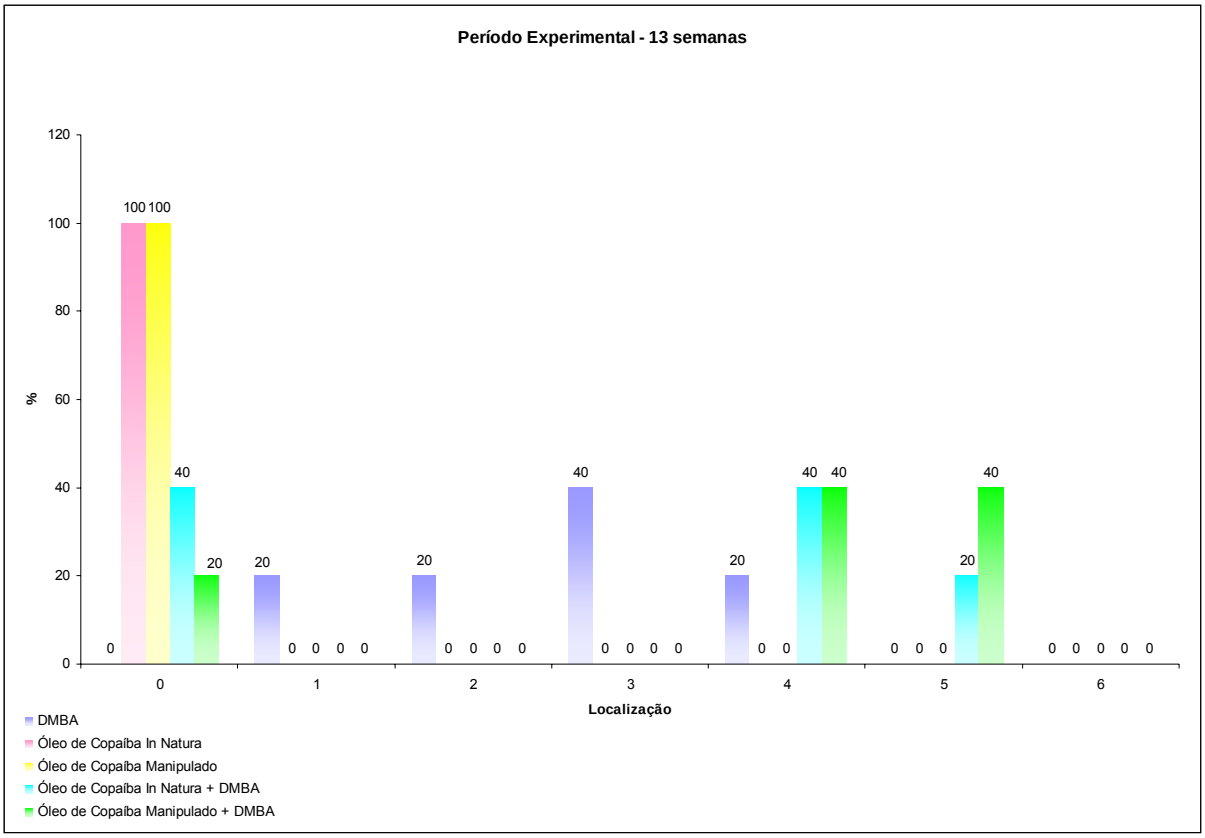


Gráfico 4 – Representação gráfica da freqüência de localização da lesão, nos diferentes grupos, no período de 13 semanas de experimento.

Tabela 7 – Valores expressos para as frequências de localização da lesão, em relação aos diferentes grupos, no período de 20 semanas de experimento.

		Localização						
	N	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**
DMBA	N	0	3	0	0	1	0	0
	%	0	75	0	0	25	0	0
Óleo de Copaíba In Natura	N	5	0	0	0	0	0	0
	%	100	0	0	0	0	0	0
Óleo de Copaíba Manipulado	N	6	0	0	0	0	0	0
	%	100	0	0	0	0	0	0
Óleo de Copaíba In Natura + DMBA	N	1	4	0	0	0	0	1
	%	16,67	66,67	0	0	0	0	16,67
Óleo de Copaíba Manipulado + DMBA	N	1	2	0	0	2	0	0
	%	20	40	0	0	40	0	0

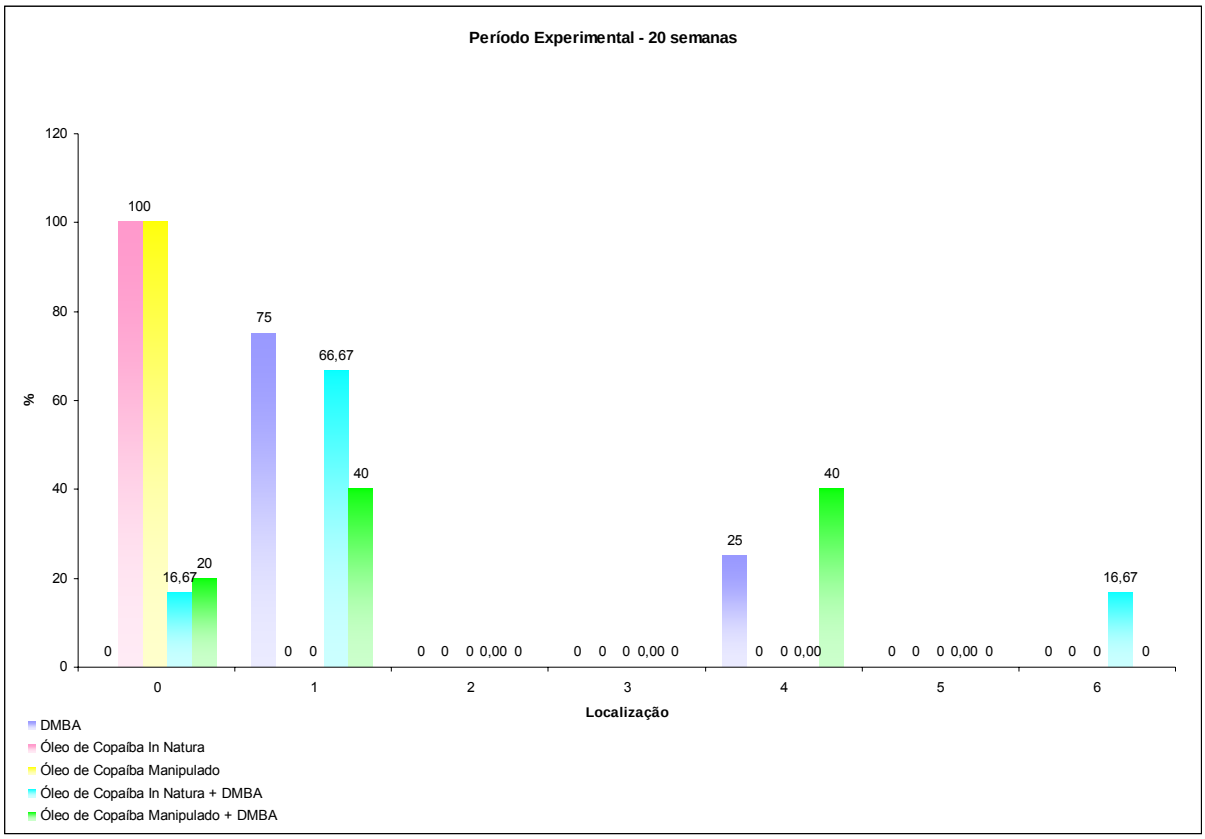


Gráfico 5 – Representação gráfica da freqüência de localização da lesão, nos diferentes grupos, no período de 20 semanas de experimento.

A localização mais freqüente das lesões bucais ocorreu na borda lateral da língua nos animais do grupo 20 semanas, submetidos à aplicação da solução de DMBA isoladamente; logo em seguida pode ser observada uma freqüência menor de lesões também na borda lateral lingual em animais em que o óleo resina de Copaíba natural encontrava-se associado à solução de DMBA pelo período de 20 semanas.

Observou-se uma baixa freqüência em relação à presença de lesões na região do soalho bucal dos animais, quando da avaliação dos cinco grupos experimentais.

5.4 Aspecto Macroscópico

5.4.1 Da cavidade bucal dos animais experimentais

As informações referentes à análise macroscópica da borda lateral da língua e cavidade bucal dos cinco grupos experimentais nos três diferentes tempos de observação encontram-se expressas na Tabela 8, representada abaixo:

Tabela 8 – Alterações macroscópicas observadas nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação aos cinco grupos experimentais.

	Grupo I						Grupo II						Grupo III						Grupo IV						Grupo V					
	7s		13s		20s		7s		13s		20s		7s		13s		20s		7s		13s		20s		7s		13s		20s	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Sem alterações	4	80					5	100	5	100	5	100	4	100	5	100	6	100	4	100	2	40	1	16,6	4	80	1	20	1	20
Pápula	1	20																			1	20			1	20	2	40		
Lesão papilomatosa			3	60	1	25															2	40	2	33,2			2	40	1	20
Úlcera rasa			1	20	1	25																								
Nódulo sem ulceração			1	20																									1	20
Nódulo ulcerado					2	50																	3	49,8					2	40

A média da ocorrência de alterações macroscópicas no grupo 7 semanas exibiu valores bem abaixo da metade da média.

A média das alterações macroscópicas em relação ao tempo experimental de 13 e 20 semanas mostra que mais da metade dos animais do grupo I (DMBA) desenvolveu lesões.

Na avaliação da presença de lesões no grupo IV e grupo V, tempo experimental de 13 semanas, observamos que menos da metade dos animais desenvolveu lesões

macroscopicamente detectáveis; ao passo que no período experimental de 20 semanas ocorreu uma multiplicação na ocorrência dessas lesões, como é representado na tabela e gráfico abaixo:

Tabela 9 – Valores expressos para as médias dos valores numéricos do aspecto macroscópico das lesões, em relação aos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas.

Grupo	Tempo experimental (semanas)	Média	N	DP
Grupo I (DMBA)	7	1,20	5,00	0,45
	13	3,60	5,00	0,89
	20	4,75	4,00	1,50
Grupo II (*Óleo in natura)*	7	1,00	5,00	0,00
	13	1,00	5,00	0,00
	20	1,00	5,00	0,00
Grupo III (*Óleo manipulado*)	7	1,00	4,00	0,00
	13	1,00	5,00	0,00
	20	1,00	6,00	0,00
Óleo Grupo IV (*Dmba + óleo in natura*)	7	1,00	4,00	0,00
	13	2,00	5,00	1,00
	20	4,17	6,00	2,14
Grupo V (*Dmba + Óleo Manipulado)*	7	1,20	5,00	0,45
	13	2,20	5,00	0,84
	20	4,20	5,00	2,17

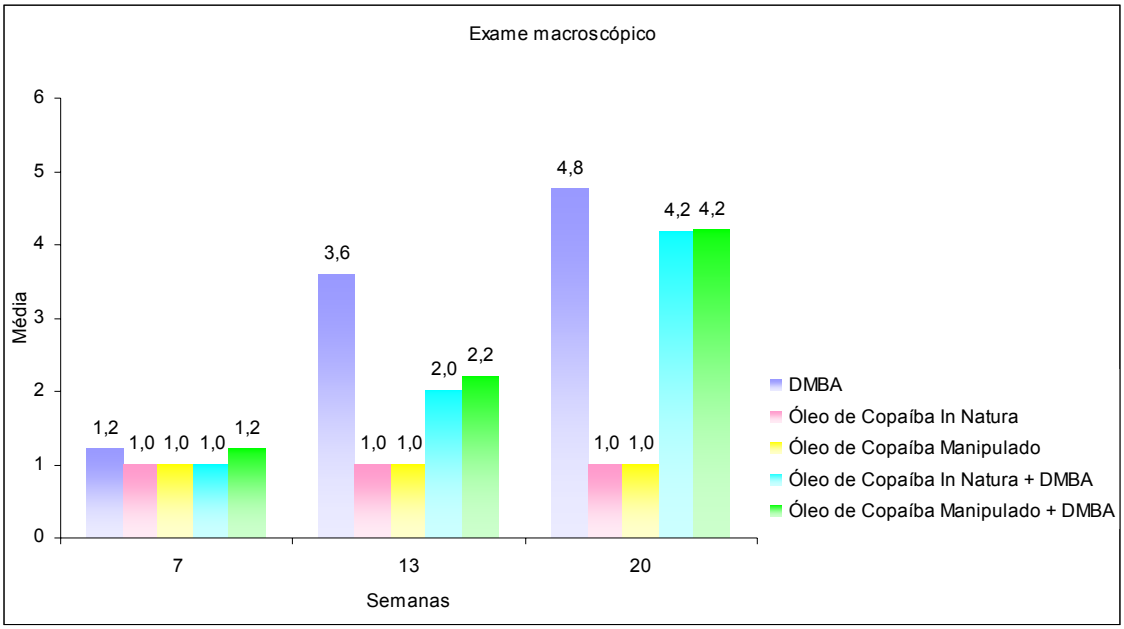


Gráfico 6 – Representação gráfica das médias dos valores numéricos do aspecto macroscópico das lesões, nos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas, respectivamente.

5.4.1.1 Análise macroscópica descritiva dos grupos experimentais

De acordo com a avaliação clínica dos animais no período experimental 7 semanas, somente um animal do grupo experimental I (DMBA) e um outro animal do grupo V (DMBA + Óleo manipulado artesanalmente) apresentaram pápulas avermelhadas na região do soalho bucal; (Figura 12A); os outros animais não apresentavam alterações morfologicamente detectáveis; o que é bem reportado nos estudos da literatura, afirmando ser o prazo de 7 semanas muito curto para a ocorrência de lesões malignas quimicamente induzidas. (Figura 12B)

Quando da inspeção clínica da cavidade bucal dos animais pertencentes ao grupo 13 semanas, pode-se observar que em relação ao grupo I (DMBA), três animais apresentavam múltiplas lesões papilomatosas na borda lateral, mucosa jugal e na região do soalho bucal respectivamente, um outro animal exibiu úlcera rasa na mucosa jugal, e por fim o último animal apresentou nódulo não ulcerado com aspecto papilomatoso superficial, medindo em seu maior diâmetro 0,4 x 1,5cm. Nestas lesões observavam-se ainda extensas áreas de necrose superficial, acompanhado de recobrimento da área por discreta pseudomembrana esbranquiçada. (Figura 13)

Ainda relacionado à avaliação no período experimental de 13 semanas, pode-se observar que no grupo IV, dois animais não exibiram alteração na mucosa bucal morfologicamente detectável; um animal mostrou presença de pápula na região do soalho bucal de aspecto esbranquiçado com pequena área ulcerada associada, levemente sangrante ao toque, com dimensões de 0,2 x 1,3cm em seu maior eixo; e por fim outros dois animais exibiram formações exofíticas, papiliformes únicas na região de ventre lingual de dimensões de 0,5 x 1,3 e 0,4 x 1,6cm aproximadamente. (Figura 14)

Quando da observação macroscópica do grupo V no período de 13 semanas, pode-se observar que um animal não exibiu alterações na mucosa bucal; outros dois animais apresentaram pápulas avermelhadas em soalho bucal e comissura labial respectivamente, e os outros dois animais restantes exibiram formações exofíticas papiliformes únicas na região de mucosa jugal e ventre lingual de dimensões que variavam de 0,3 x 0,9 e 0,4 x 1,3cm, aproximadamente.

Os animais do grupo experimental I, IV e V que foram mortos no tempo experimental de 20 semanas exibiram alterações macroscópicas em maior número e de aspectos morfológicos mais significativos.

Pode ser observado clinicamente que os quatro animais do grupo I exibiam presença de alterações morfológicas de significativa importância clínica. Um animal exibiu lesão papilomatosa na região de transição do soalho bucal e ventre lingual, medindo 0,4 x 1,1cm. Outro animal apresentava úlcera rasa na borda lateral da língua, sangrante ao mínimo toque e por fim os outros dois animais exibiam importantes nódulos ulcerados de tamanho significativo 1,3 x 1,9 e 0,8 x 1,8cm. (Figura 15 e 16)

Em relação aos grupos IV e V no período de 20 semanas de aplicação das substâncias, notou-se que a freqüência, número de lesões na cavidade bucal e tamanho das lesões foi menor quando comparado ao grupo I (DMBA) isoladamente. Nestes animais pode se observar a presença ora de lesões de aspecto papilomatoso, ora sob a forma de úlcera rasa de menor tamanho e poucas lesões sob a forma de nódulos não ulcerados, diferente do grupo I (DMBA), no intervalo de 20 semanas, onde tivemos a ocorrência de três lesões de aspectos ulcerativos. (Figura 17)

5.4.2 Dos outros órgãos avaliados macroscopicamente

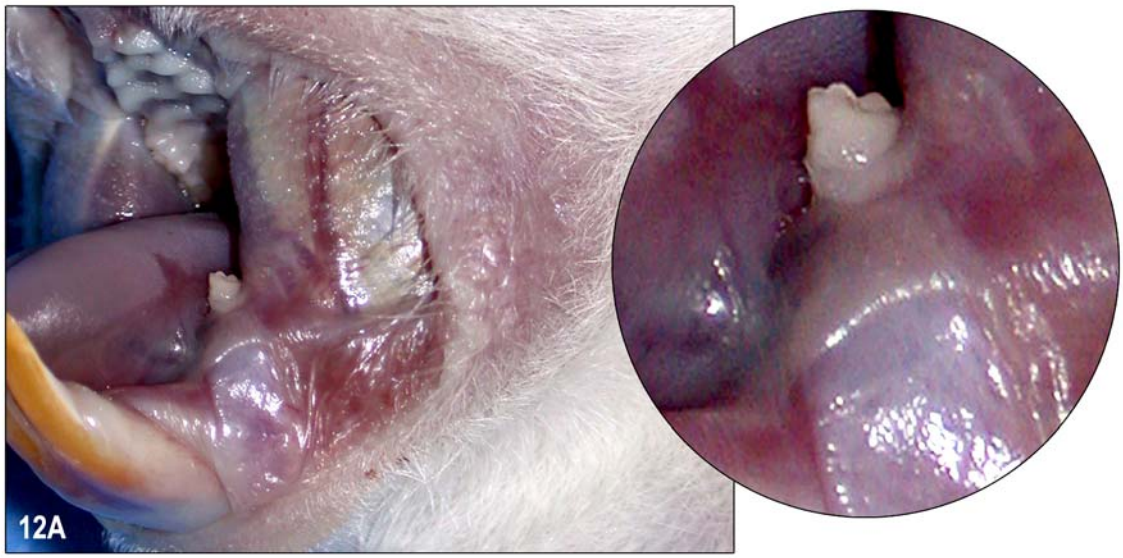
Os órgãos viscerais e linfonodos ganglionares foram removidos, por meio de necropsia, nos animais em todos os cinco grupos experimentais; não sendo observado alteração de coloração, textura e tamanho destes, passíveis de sugerir lesões neoplásicas. As avaliações clínicas foram realizadas em dois momentos:

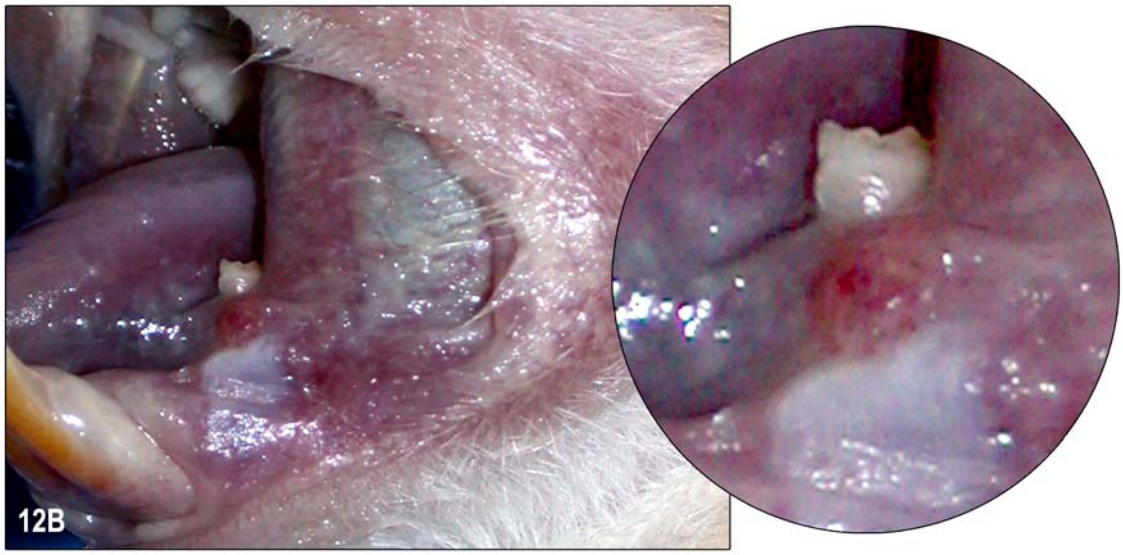
1) Durante a realização da necropsia
2) No ato de realização da macroscopia após o tecido ter permanecido por 48h na solução de formol tamponado.

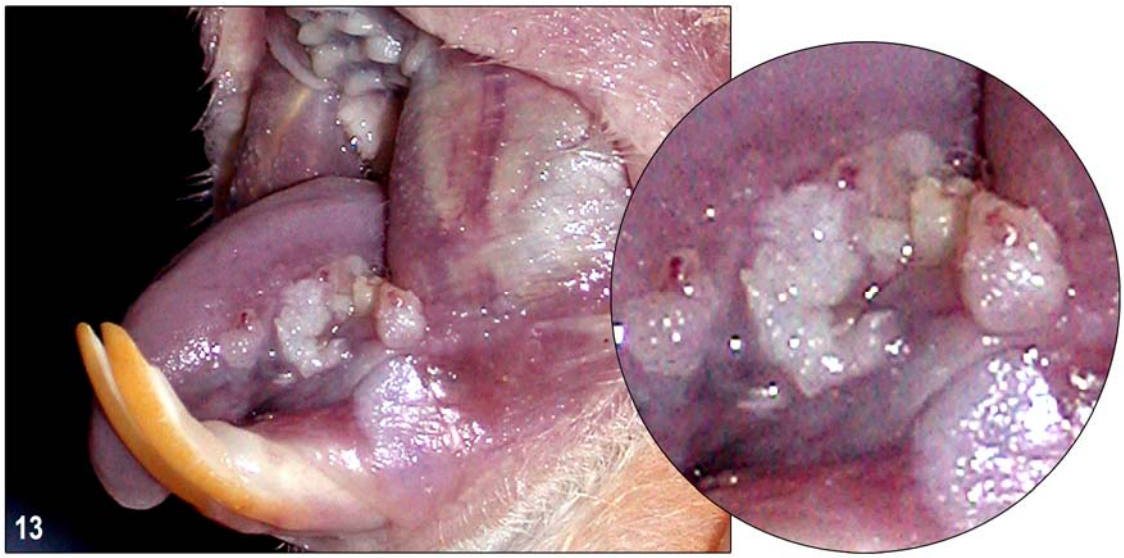
Figura 12A – Aspecto de normalidade em relação à mucosa bucal do animal do grupo I no período experimental de 7 semanas.

Figura 12B – Discreta pápula avermelhada na região de soalho bucal do animal do grupo I no período experimental de 7 semanas de aplicação exclusivamente da solução de DMBA.

Figura 13 – Presença de múltiplas lesões papilomatosas na borda lateral, ventre lingual e soalho bucal com áreas centrais ulceradas e superfície ligeiramente branca avermelhada no animal experimental do grupo I no período de 13 semanas de aplicação de DMBA.


12A


12B


13

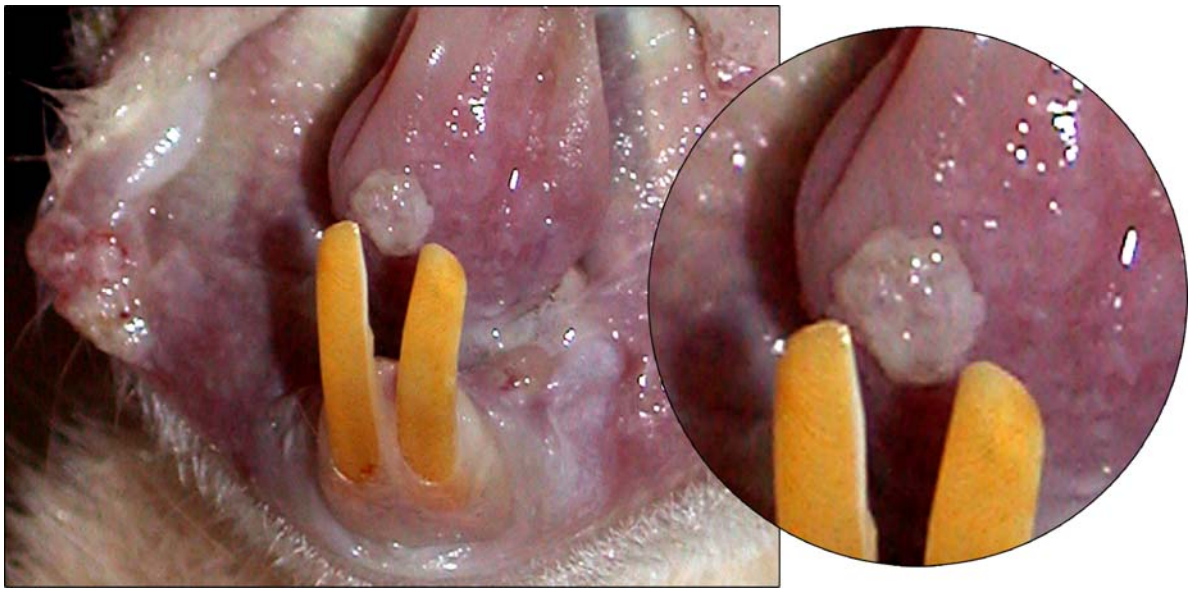


Figura 14 – Lesão papilomatosa única na região de ventre lingual e pequeno nódulo ulcerado na região da mucosa jugal do animal do grupo IV no período experimental de 13 semanas.

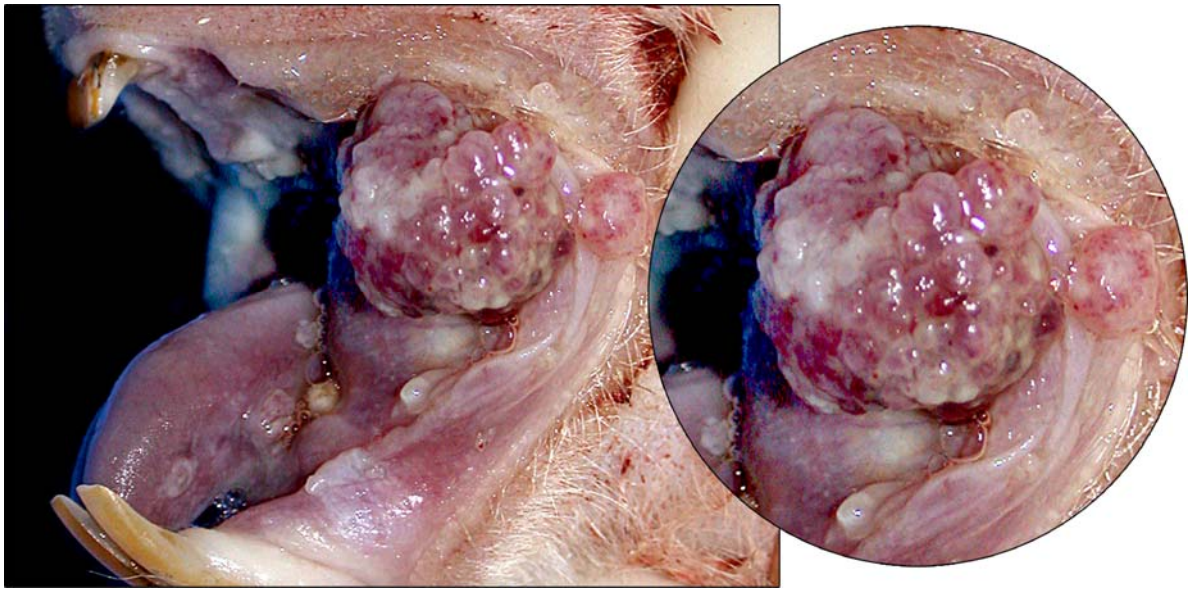


Figura 15 – Presença de extenso nódulo ulcerado com discreta pseudomembrana esbranquiçada na região de mucosa jugal e comissura labial, sugerindo clinicamente carcinoma espinocelular no período experimental de 20 semanas; submetidos à aplicação exclusiva da solução de DMBA. (Grupo I 20 semanas)

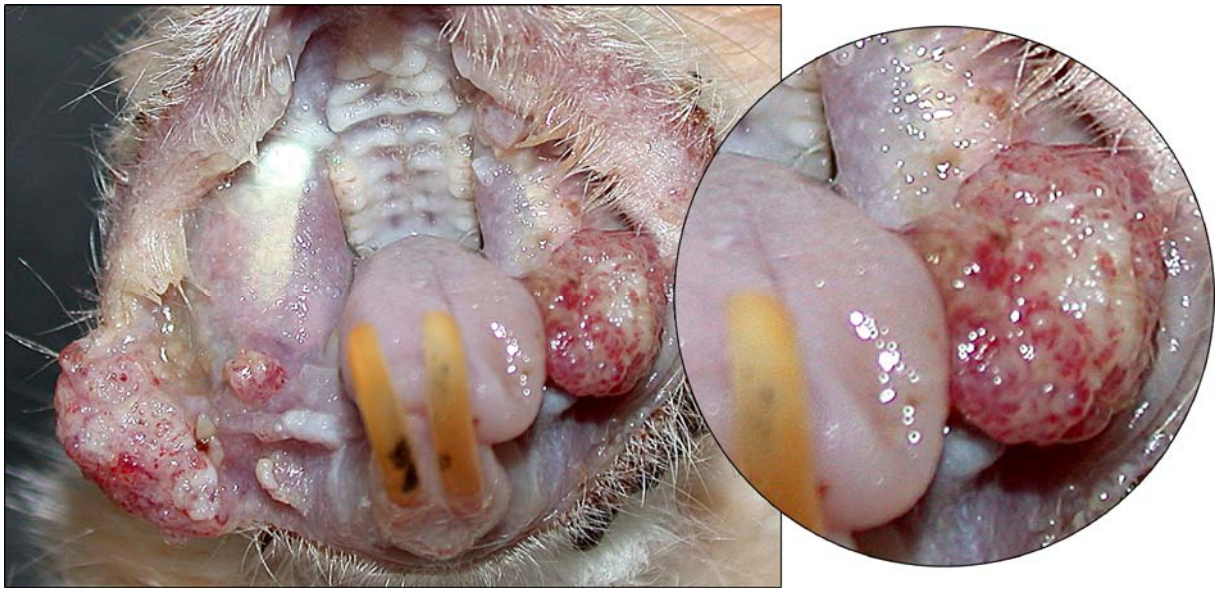


Figura 16 – Presença de múltiplos nódulos ulcerados, sangrantes ao toque, na região de mucosa jugal e comissura labial, compatível clinicamente com carcinoma espinocelular no período de 20 semanas submetidos a aplicação exclusiva da solução de DMBA. (Grupo I 20 semanas)

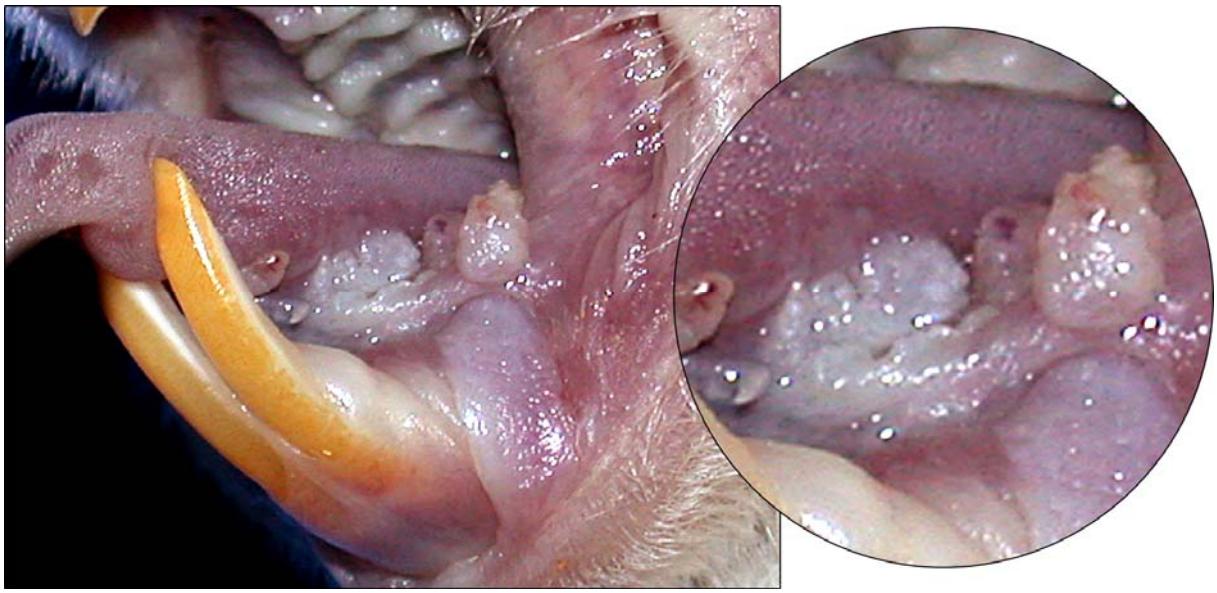


Figura 17 – Presença de lesão esbranquiçada de aspecto úlcero vegetante localizada no limite da região de soalho bucal e ventre lingual sugerindo clinicamente carcinoma espinocelular papiliforme pequeno.

5.5 Aspecto Microscópico

5.5.1 Da mucosa bucal dos animais experimentais

Com o intuito de melhor uniformização na análise microscópica e posterior elaboração dos dados estatísticos as alterações morfológicas foram assim classificadas:

1,0	Mucosa bucal normal
2,0	Hiperplasia e Hiperqueratose discreta sem displasia
2,4	Hiperplasia e Hiperqueratose moderada sem displasia
2,8	Hiperplasia e Hiperqueratose intensa sem displasia
3,0	Hiperplasia e Hiperqueratose com displasia discreta
3,4	Hiperplasia e Hiperqueratose com displasia moderada
3,8	Hiperplasia e Hiperqueratose com displasia intensa
4,0	Carcinoma microinvasivo
5,0	Carcinoma invasivo sem metástase
6,0	Carcinoma invasivo com metástase

Os dados relacionados às alterações microscópicas respeitadas as suas respectivas médias e desvio padrão são apresentadas na tabela 10 e gráfico 7, respectivamente, para os grupos experimentais de I a V, no intervalo de 7, 13 e 20 semanas de aplicação das substâncias experimentais.

O tempo de sete semanas de aplicação das substâncias experimentais revelou-se muito curto para a ocorrência de alterações neoplásicas passíveis de avaliação microscópica, os valores de média para esse grupo expressos na tabela e gráfico acima exibem valores numéricos muito próximos entre os grupos I, IV e V semanas.

Quando da extrapolação para a o período de 13 semanas, pode-se observar um significativo aumento na média das alterações microscópicas quando da avaliação dos grupos I, IV e V semanas, respectivamente.

No entanto, os valores de médias em relação às alterações microscópicas, nos grupos acima, apresentaram índices semelhantes; sem apresentar significância estatística.

Tabela 10 – Valores expressos para as médias dos valores numéricos do aspecto microscópico das lesões, em relação aos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas.

Grupo	Tempo experimental (semanas)	Média	N	DP
Grupo I (DMBA)	7	2,28	5,00	0,83
	13	3,84	5,00	0,75
	20	5,00	4,00	0,00
Grupo II (*Óleo in natura)*	7	1,88	5,00	0,52
	13	1,40	5,00	0,55
	20	2,08	5,00	0,18
Grupo III (*Óleo manipulado*)	7	1,60	4,00	0,71
	13	1,76	5,00	0,77
	20	1,67	6,00	0,52
Óleo Grupo IV (*Dmba + óleo in natura*)	7	2,50	4,00	0,58
	13	3,76	5,00	1,19
	20	4,20	6,00	0,66
Grupo V (*Dmba + óleo Manipulado)*	7	2,20	5,00	0,84
	13	3,96	5,00	1,00
	20	3,84	5,00	0,75

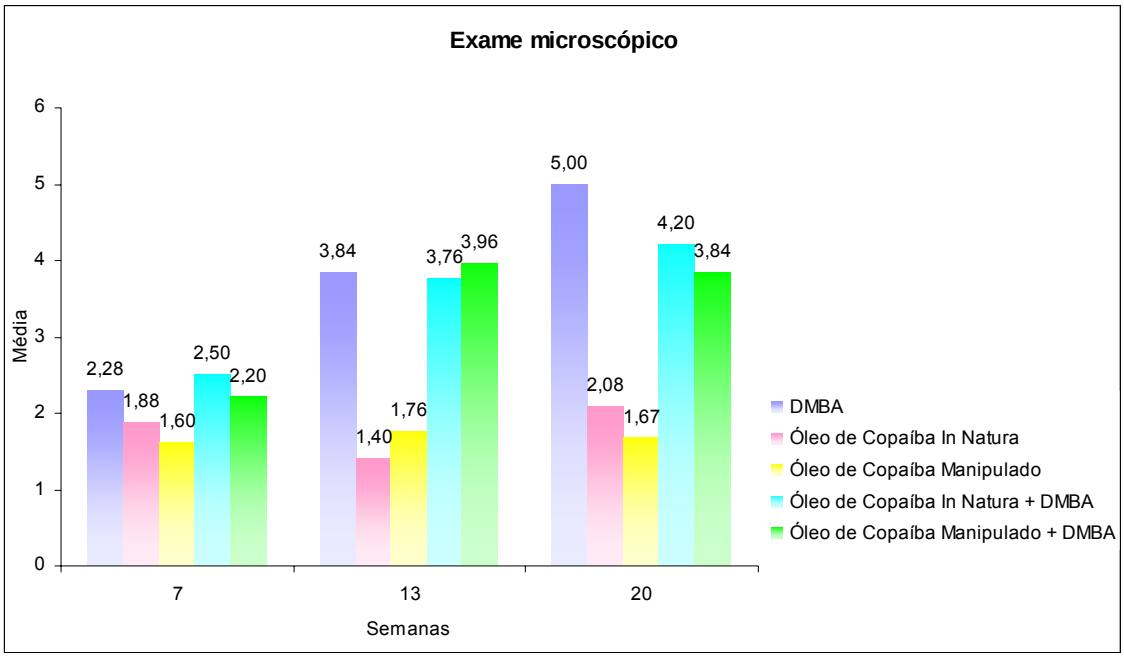


Gráfico 7 – Representação gráfica das médias dos valores numéricos do aspecto microscópico das lesões, nos diferentes grupos experimentais, nos períodos de 7, 13 e 20 semanas.

No período experimental de 20 semanas, as médias das alterações microscópicas mostraram-se mais expressivas; o que provavelmente esteja relacionado com a presença de alterações microscópicas mais significativas nos grupos experimentais deste período.

No grupo I, a média das lesões bucais assumiu os maiores valores em relação a todos os grupos e tempos experimentais avaliados.

No grupo IV e V, respectivamente, a média de ocorrência das alterações microscópicas mostrou valores inferiores se comparado ao grupo I, o que pode sugerir um efeito inibidor das duas apresentações do óleo de Copaíba quando associado ao DMBA.

Ao estabelecermos comparação entre as médias de ocorrência das alterações microscópicas entre o grupo IV e grupo V; notamos que o grupo V apresentou uma média ligeiramente menor na presença de alterações microscópicas em relação a cavidade bucal dos animais experimentais.

5.5.1.1 Análise microscópica descritiva dos grupos experimentais

Ao realizarmos a observação microscópica do grupo I, no período de sete semanas; pode-se perceber que dois animais exibiram alterações hiperplásicas sem presença de displasia no epitélio de padrão focal; enquanto em outro animal a mucosa bucal revelou alteração hiperplásica com displasia epitelial leve. Um animal apresentou aspecto de normalidade em relação à mucosa jugal. (Tabela 11, Figura 18 e 19)

Em relação aos grupos experimentais II e III, quando da avaliação no período de sete semanas, a mucosa encontrava-se microscopicamente normal, com alguns animais apresentando hiperplasia associada à hiperparaqueratinização discreta a moderada com ausência de displasia. A maior parte dos animais apresentava microscopicamente a mucosa bucal com aspecto normal. (Tabela 12 e 13)

Em relação aos grupos IV e V no período experimental de sete semanas, pode-se observar, que dos dez animais que iniciaram o experimento (soma dos animais dos dois grupos) ocorreu uma morte com um animal do grupo IV; dois animais exibiram hiperplasia e hiperqueratose discreta sem displasia e outros dois animais exibiram hiperplasia e hiperqueratose discreta com hiperplasia. (Tabela 14, Figura 20)

Tabela 11 – Aspectos microscópicos e seus respectivos escores observados nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação ao grupo experimental I (DMBA).

Avaliação Microscópica (VN)	Período		7 semanas							13 semanas						20 semanas					
	Animais		1	2	3	4	5	6*	T	1	2	3	4	5	T	1	2	3	4*	5	T
Mucosa normal		1,0							1,0												
Hiperplasia e Hiperqueratose sem displasia	Discreta	2,0							2,0												
	Moderada	2,4							2,4												
	Intensa	2,8																			
Hiperplasia e Hiperqueratose com displasia	Discreta	3,0							6,0						9,0						
	Moderada	3,4																			
	Intensa	3,8																			
Carcinoma microinvasivo		4,0													4,0						
Carcinoma invasivo sem metástase		5,0													5,0						20,0
Carcinoma invasivo com metástase		6,0																			
Total			**2,0**	**3,0**	**3,0**	**1,0**	**2,4**		**11,4**	**4,0**	**3,0**	**3,0**	**5,0**	**3,0**	**18,0**	**5,0**	**5,0**	**5,0**		**5,0**	**20**
Média dos valores numéricos									**2,28**						**3,6**						**5,0**

Tabela 12 – Aspectos microscópicos e seus respectivos escores observados nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação ao grupo experimental II (Óleo de Copaíba *In Natura*).

Avaliação Microscópica (VN)	Período		7 semanas						13 semanas						20 semanas						
	Animais		1	2	3	4	5	T	1	2	3	4	5	T	1	2	3	4	5	6*	T
Mucosa normal		1,0						1,0						3,0							
Hiperplasia e Hiperqueratose sem displasia	Discreta	2,0						6,0						4,0							8,0
	Moderada	2,4						2,4													2,4
	Intensa	2,8																			
Hiperplasia e Hiperqueratose com displasia	Discreta	3,0																			
	Moderada	3,4																			
	Intensa	3,8																			
Carcinoma microinvasivo		4,0																			
Carcinoma invasivo s/ metástase		5,0																			
Carcinoma invasivo c/ metástase		6,0																			
Total			**1,0**	**2,0**	**2,0**	**2,4**	**2,0**	**9,4**	**2,0**	**1,0**	**1,0**	**2,0**	**1,0**	**7,0**	**2,4**	**2,0**	**2,0**	**2,0**	**2,0**		**10,4**
Média dos valores numéricos								**1,88**						**1,40**							**2,08**

Tabela 13 – Aspectos microscópicos e seus respectivos escores observados nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação ao grupo experimental III (Óleo de Copaíba Manipulado Artesanalmente).

Avaliação Microscópica (VN)	Período		7 semanas						13 semanas						20 semanas						
	Animais		1	2	3	4	5*	T	1	2	3	4	5	T	1	2	3	4	5	6	T
Mucosa normal		1,0						2,0						2,0							2,0
Hiperplasia e Hiperqueratose sem displasia	Discreta	2,0						2,0						4,0							8,0
	Moderada	2,4						2,4													
	Intensa	2,8												2,8							
Hiperplasia e Hiperqueratose com displasia	Discreta	3,0																			
	Moderada	3,4																			
	Intensa	3,8																			
Carcinoma microinvasivo		4,0																			
Carcinoma invasivo s/ metástase		5,0																			
Carcinoma invasivo c/ metástase		6,0																			
Total			**2,0**	**1,0**	**2,4**	**1,0**		**6,4**	**2,8**	**1,0**	**1,0**	**2,0**	**2,0**	**8,8**	**2,0**	**1,0**	**2,0**	**2,0**	**2,0**	**1,0**	**10**
Média dos valores numéricos								**1,6**						**1,76**							**1,66**

Tabela 14 – Aspectos microscópicos e seus respectivos escores observados nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação ao grupo experimental IV (Óleo de Copaíba *In Natura* + DMBA).

Avaliação Microscópica (VN)	Período		7 semanas						13 semanas						20 semanas						
	Animais		1	2	3	4*	5	T	1	2	3	4	5	T	1	2	3	4	5	6	T
Mucosa normal		1,0																			
Hiperplasia e Hiperqueratose sem displasia	Discreta	2,0						4,0						2,0							
	Moderada	2,4																			
	Intensa	2,8																			
Hiperplasia e Hiperqueratose com displasia	Discreta	3,0						6,0						3,0							
	Moderada	3,4												3,4							3,4
	Intensa	3,8																			3,8
Carcinoma microinvasivo		4,0																			8,0
Carcinoma invasivo s/ metástase		5,0												10							10,0
Carcinoma invasivo c/ metástase		6,0																			
Total			**3,0**	**2,0**	**2,0**		**3,0**	**10,0**	**5,0**	**3,4**	**5,0**	**3,0**	**2,0**	**18,4**	**5,0**	**4,0**	**4,0**	**5,0**	**3,8**	**3,4**	**25,2**
Média dos valores numéricos								**2,50**						**3,68**							**4,20**

Figura 18 – Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais experimentais do grupo I no período de 7 semanas, onde se destaca a presença de áreas de hiperplasia epitelial com hiperortoqueratinização e ausência de displasia epitelial. (Coloração H.E.)

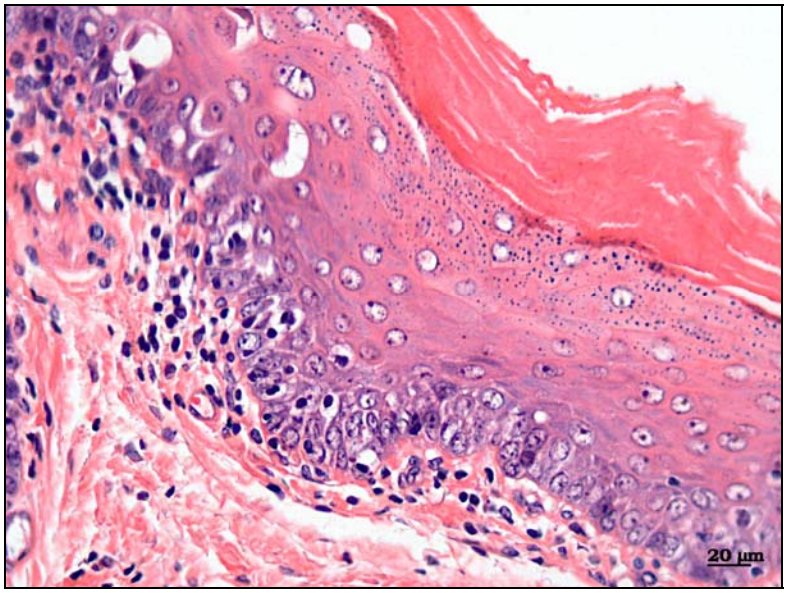


Figura 19 – Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais experimentais do grupo I no período de 7 semanas, onde se destaca a presença de discretas áreas de hiperplasia epitelial com displasia epitelial leve. (Coloração H.E.)

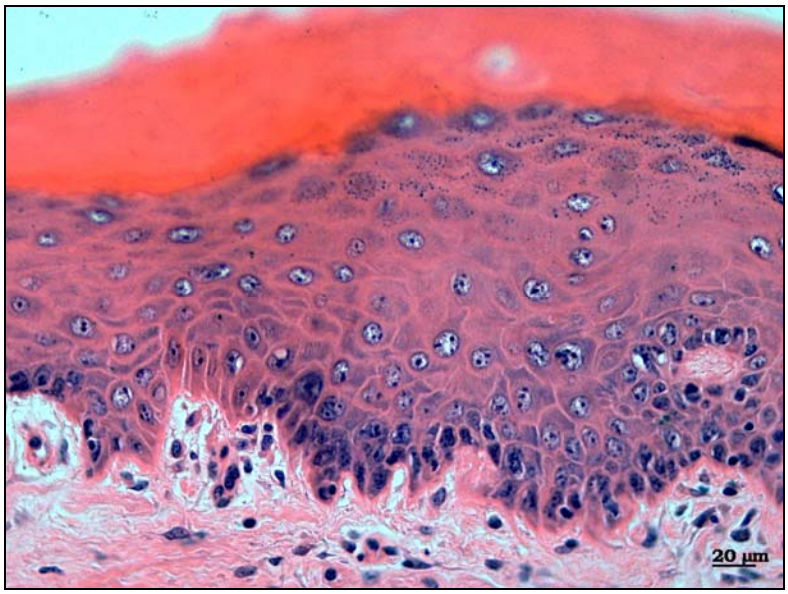


Figura 20 – Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais experimentais do grupo IV no período de 7 semanas, onde se destaca a presença de acentuada hipeortoqueratose, com moderada hiperplasia e ausência de displasia epitelial . (Coloração H.E.)

Na análise microscópica do grupo experimental V, um animal apresentou mucosa bucal de aspecto normal, dois animais apresentaram mucosa bucal com hiperplasia e hiperqueratose discreta sem displasia; e os últimos dois animais hiperplasia e hiperqueratose com displasia de aspecto discreto. (Tabela 15)

Tabela 15 – Aspectos microscópicos e seus respectivos escores observados nos períodos experimentais de 7, 13 e 20 semanas em relação ao grupo experimental V (Óleo de Copaíba Manipulado Artesanalmente + DMBA).

Avaliação Microscópica (VN)	Período		7 semanas						13 semanas						20 semanas						
	Animais		1	2	3	4	5	T	1	2	3	4	5	T	1	2*	3	4	5	6	T
Mucosa normal		1,0						1,0													
Hiperplasia e Hiperqueratose sem displasia	Discreta	2,0						4,0													
	Moderada	2,4																			
	Intensa	2,8																			
Hiperplasia e Hiperqueratose com displasia	Discreta	3,0						6,0						6,0							3,0
	Moderada	3,4																			3,4
	Intensa	3,8												3,8							3,8
Carcinoma microinvasivo		4,0																			4,0
Carcinoma invasivo s/ metástase		5,0												10,0							5,0
Carcinoma invasivo c/ metástase		6,0																			
Total			**3,0**	**1,0**	**3,0**	**2,0**	**2,0**	**11,0**	**3,0**	**5,0**	**5,0**	**3,0**	**3,8**	**19,8**	**3,0**		**3,8**	**5,0**	**4,0**	**3,4**	**19.2**
Média dos valores numéricos								**2,20**						**3,96**							**3,20**

Um maior número de alterações microscópicas foi observado a partir da 13ª semana de aplicação das substâncias experimentais; havendo um equilíbrio em relação à freqüência dessas lesões quando da comparação entre os grupos I, IV e V, como exposto acima. No grupo I, em que os animais foram submetidos à aplicação da solução de DMBA pelo período de 13 semanas, a mucosa bucal de três animais apresentou quadros de hiperplasia e hiperqueratose com displasia discreta; a mucosa bucal de um outro animal revelou lesão compatível com carcinoma espinocelular papiliforme micro invasivo; e por fim um carcinoma espinocelular bem diferenciado de padrão invasivo. (Tabela 11, Figura 21, 22A e 22B)

Em relação aos dez animais dos grupos II e III; a mucosa bucal encontrava-se microscopicamente normal, e apenas dois animais apresentaram mucosa bucal com discretos sinais de queratinização. (Tabela 12 e 13)

Figura 21 – Aspecto microscópico da mucosa bucal dos animais experimentais do grupo I, no período experimental de 13 semanas, onde se destaca a presença de carcinoma espinocelular papiliforme de pequeno tamanho. (Coloração H.E.)

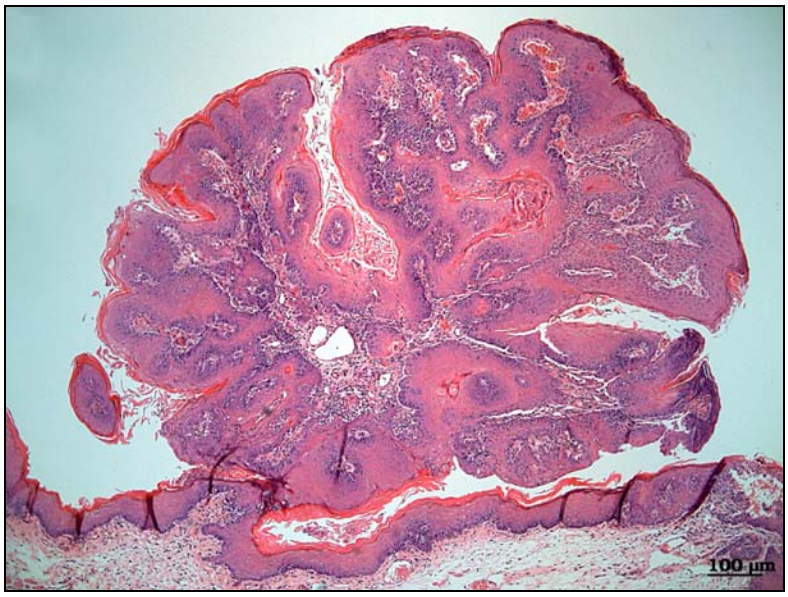


Figura 22A – Aspecto microscópico da mucosa bucal do animal experimental do grupo I, no período de 13 semanas, onde se destaca a presença de carcinoma espinocelular papiliforme de grande tamanho. (Coloração H.E.)

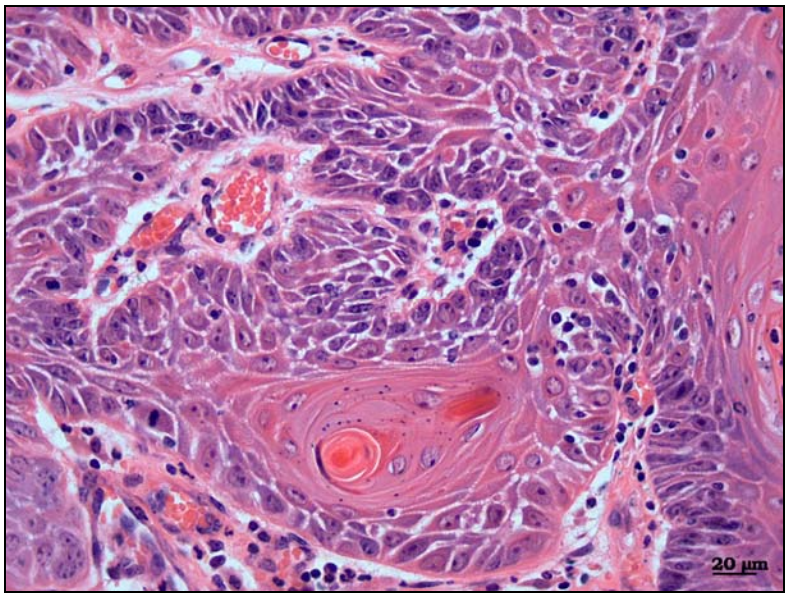


Figura 22B – Aspecto microscópico em maior aumento da mucosa bucal do animal experimental do grupo I, no período de 13 semanas, onde se destaca a presença de mitoses atípicas, hipercromatismo nuclear, pleomorfismo nuclear e celular intenso, pérolas córneas e invasão perivascular. Nota-se ainda a presença de leucócitos mononucleares no conjuntivo. (Coloração H.E.)

Quando da avaliação microscópica dos animais dos grupos IV e V no período experimental de 13 semanas, os resultados mostraram que em relação ao grupo IV a mucosa bucal de dois animais exibiu aspecto de normalidade, um animal apresentou aspecto de hiperplasia e hiperqueratose leve sem displasia, e a mucosa bucal dos últimos dois animais hiperplasia e hiperqueratose com displasia discreta. (Tabela 14, Figura 23)

Na análise microscópica do grupo experimental V, um animal apresentou mucosa bucal de aspecto normal, dois animais apresentaram aspecto microscópico compatível com hiperplasia e hiperqueratose discreta sem displasia, e dois outros animais hiperplasia e hiperqueratose discreta com displasia moderada.

Por fim, no tempo experimental de 20 semanas como já esperado, as alterações microscópicas se mostraram mais acentuadas, definindo em conseqüência um maior dano tecidual. Nesse período, a presença de lesões de aspecto displásico e carcinomatoso exibiu alta freqüência.

Em relação ao grupo I, um animal veio a óbito, enquanto os quatro animais restantes do grupo apresentaram achados microscópicos compatíveis com carcinoma espinocelular bem diferenciado; onde se observou claramente a presença de critérios de malignidade, tais como: intenso pleomorfismo celular, bizarrismo, mitoses atípicas, perda de adesão celular, invasão de ilhotas epiteliais em forma de gota para o conjuntivo subjacente e também a presença de pérolas córneas no epitélio. (Figura 24A, 24B, 25A e 25B)

Na análise dos grupos II e III, no período de 20 semanas de aplicação das substâncias experimentais, notou-se que o epitélio se mostrava hiperplásico, com um significativo espessamento da camada de queratina na superfície córnea do epitélio. Durante a fase experimental um animal do grupo II evoluiu a óbito. (Figura 26)

Quando da avaliação microscópica do grupo IV no período de 20 semanas; a mucosa bucal de um animal apresentou hiperplasia e hiperqueratose com displasia discreta; em relação a outro animal do grupo, a mucosa bucal apresentou aspecto de hiperplasia e hiperqueratose com displasia intensa. Dois animais apresentaram-se com a mucosa bucal exibindo carcinomas micro invasivos e nos outros dois animais foram observados carcinomas invasivos bem diferenciados. (Figura 27)

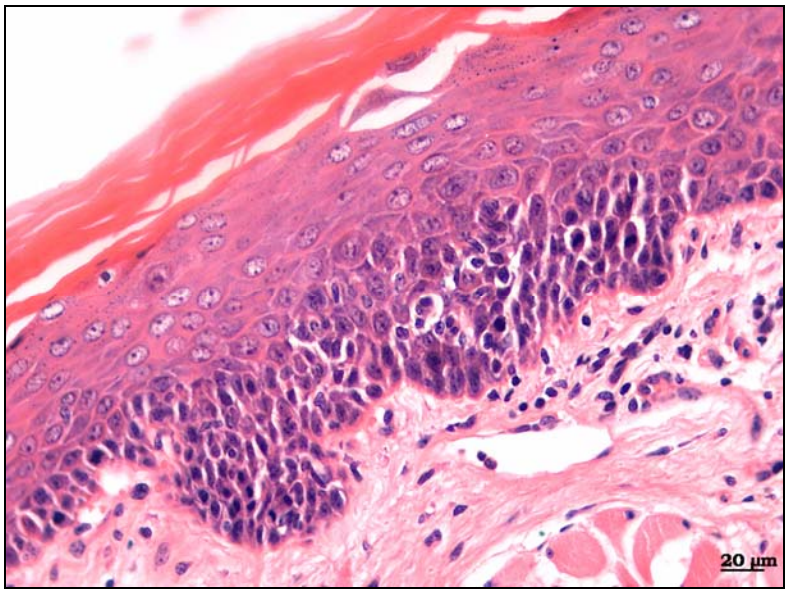
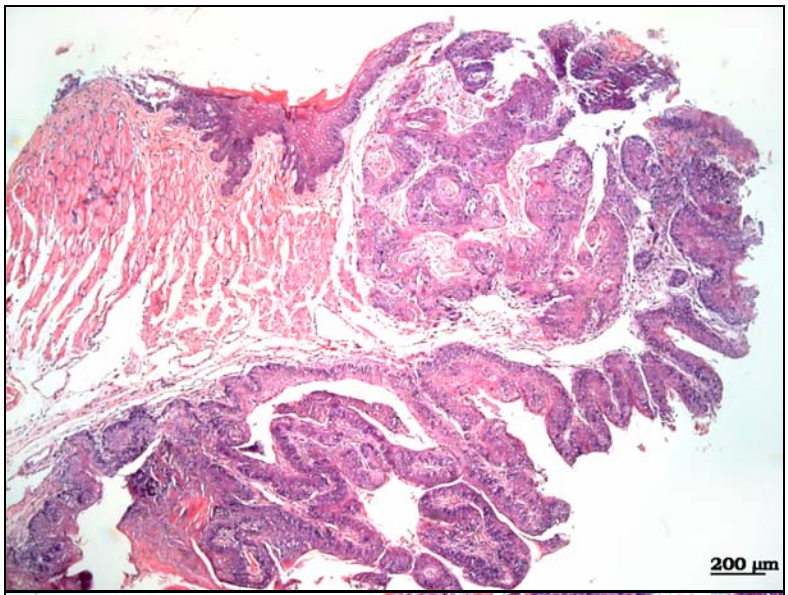


Figura 23 – Aspecto microscópico em maior aumento da mucosa bucal de um animal do grupo IV no período de 13 semanas; onde se destaca a presença de mitoses atípicas, hipercromatismo nuclear, pleomorfismo nuclear e celular intenso, note que a camada basal mostra-se intacta sem invasão de ilhotas epiteliais para à lâmina própria e tecido conjuntivo subjacente; compatível com displasia moderada. (Coloração H.E.)



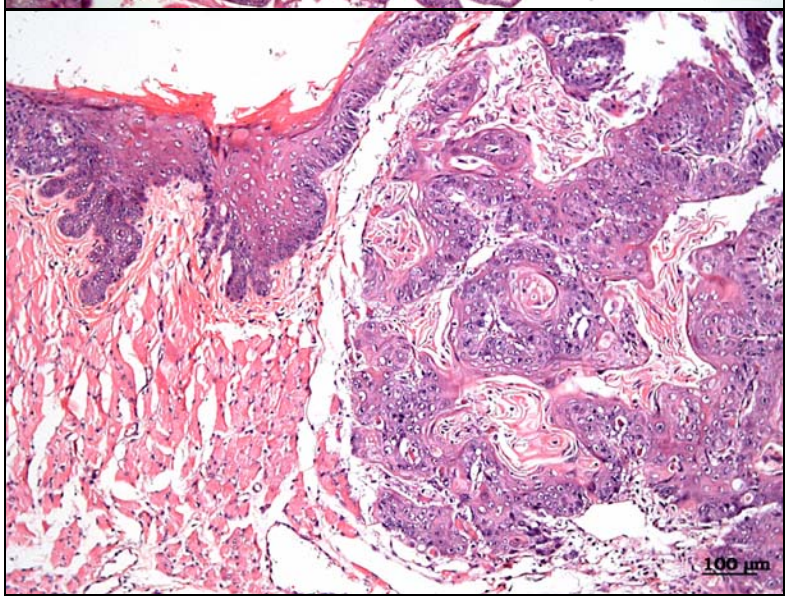


Figura 24A e 24B – Aspecto microscópico da mucosa bucal de um animal experimental do grupo I no período de 20 semanas; onde se destaca a presença de intenso pleomorfismo celular, perda de adesão celular, grande quantidade de queratina permeando as células tumorais, perda de integridade do estrato epitelial e invasão de ilhotas epiteliais tumorais para lâmina própria e tecido conjuntivo subjacente. (Coloração H.E.)

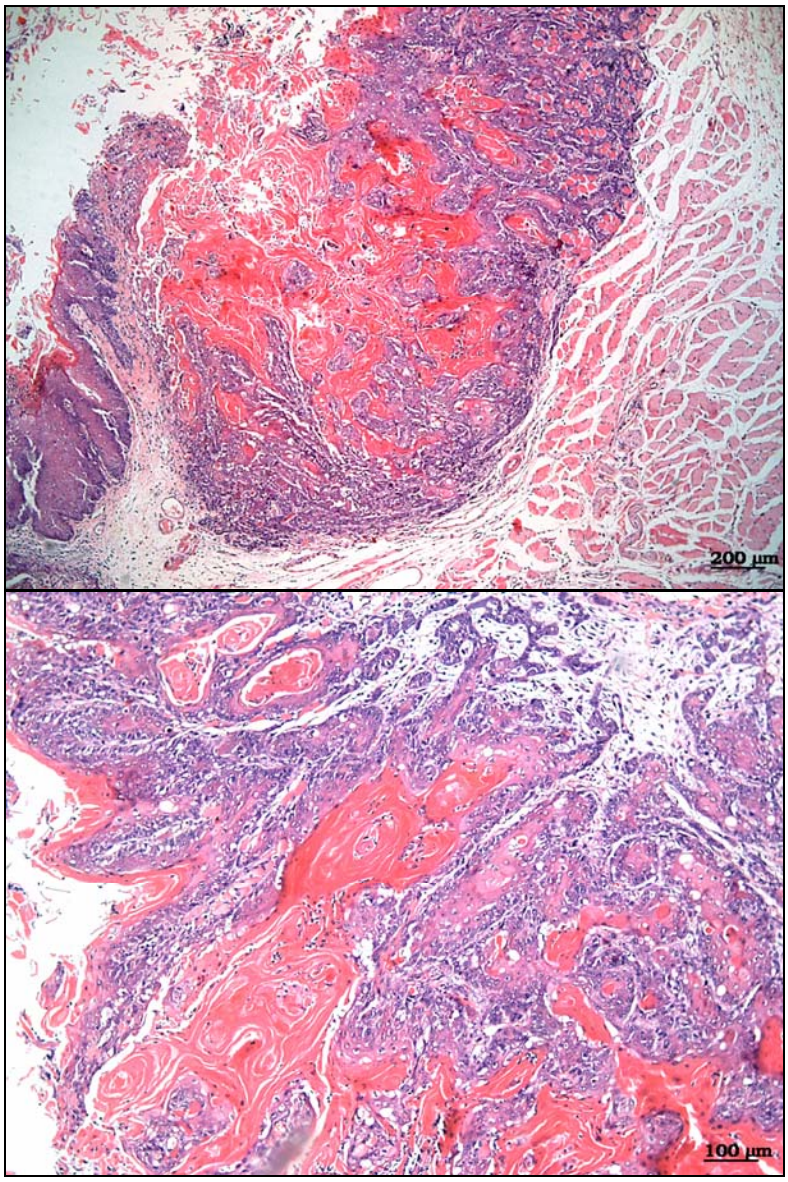


Figura 25A e 25B – Aspecto microscópico da mucosa bucal de um animal do grupo I no período experimental de 20 semanas; compatível com carcinoma espinocelular bem diferenciado onde se destaca a presença de inúmeras mitoses atípicas, hipercromatismo nuclear, pleomorfismo celular intenso, grande quantidade de queratina por entre as células tumorais; além de intensa invasão epitelial para o tecido conjuntivo subjacente. (Coloração H.E.)

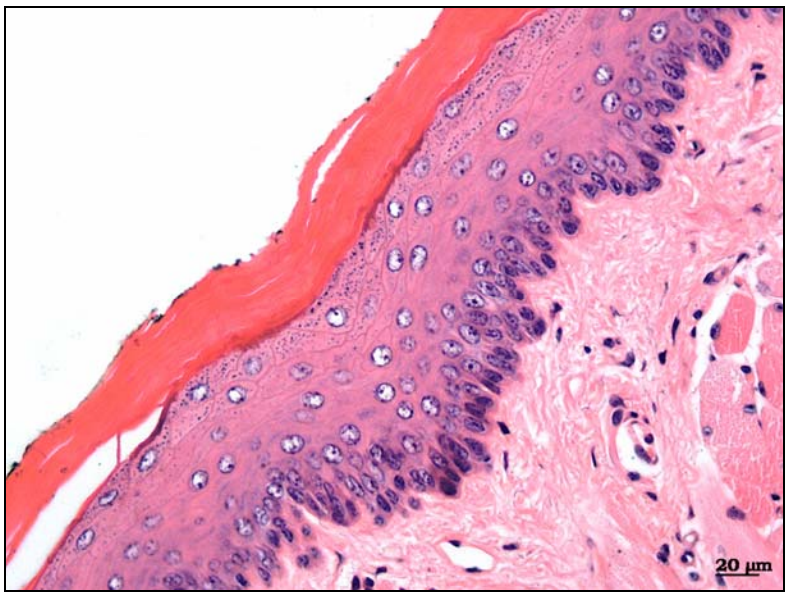


Figura 26 – Aspecto microscópico da mucosa bucal de animal experimental do grupo III no período experimental de 20 semanas, onde se destaca a presença de acentuada hiperortoqueratose, com moderada hiperplasia epitelial. (Coloração H.E.)

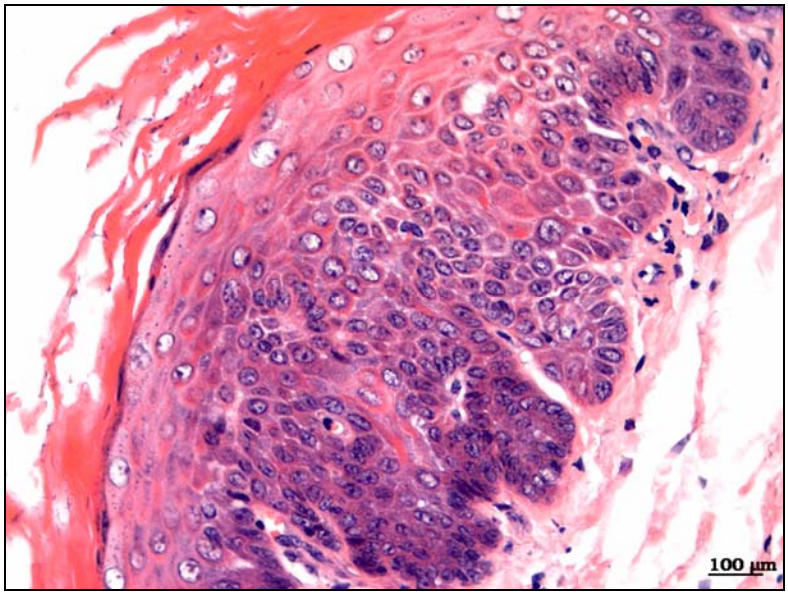


Figura 27 – Aspecto microscópico da mucosa bucal de um animal do grupo IV no período experimental de 20 semanas; onde se destaca a presença de hiperplasia epitelial associado a intenso pleomorfismo celular, perda de adesão celular, mitoses atípicas, compatível com displasia epitelial de aspecto moderado. (Coloração H.E.)

Em relação ao grupo V, pode-se constatar a morte de um animal, quando da 17ª semana de aplicação das substâncias experimentais. Neste grupo experimental, ocorreu uma variação em relação aos padrões microscópicos; ocorrendo desde aspectos de hiperplasia e hiperqueratose com displasia discreta até quadros microscópicos de carcinoma invasivo bem diferenciado. (Figura 28A e 28B)

5.5.2 Dos outros órgãos avaliados microscopicamente

Procedeu-se a análise microscópica dos linfonodos, rins, fígado e pulmão dos animais experimentais. Um achado interessante foi encontrado no fígado de dois animais do grupo experimental 7 semanas, submetidos à aplicação da solução de DMBA seguido da aplicação do óleo de Copaíba natural. Nestes animais pode ser observado material enegrecido de aspecto granular difusamente arranjado; mas em grande quantidade permeando as regiões microscópicas referentes aos capilares sinusóides hepáticos.

Nos demais grupos, não foram observados alterações microscópicas de caráter degenerativo, inflamatório e/ou neoplásico, decorrente da ação das substâncias experimentais testadas; bem como a ausência de neoplasias metastáticas; quando analisamos microscopicamente os órgãos viscerais dos animais, em relação aos cinco grupos experimentais.

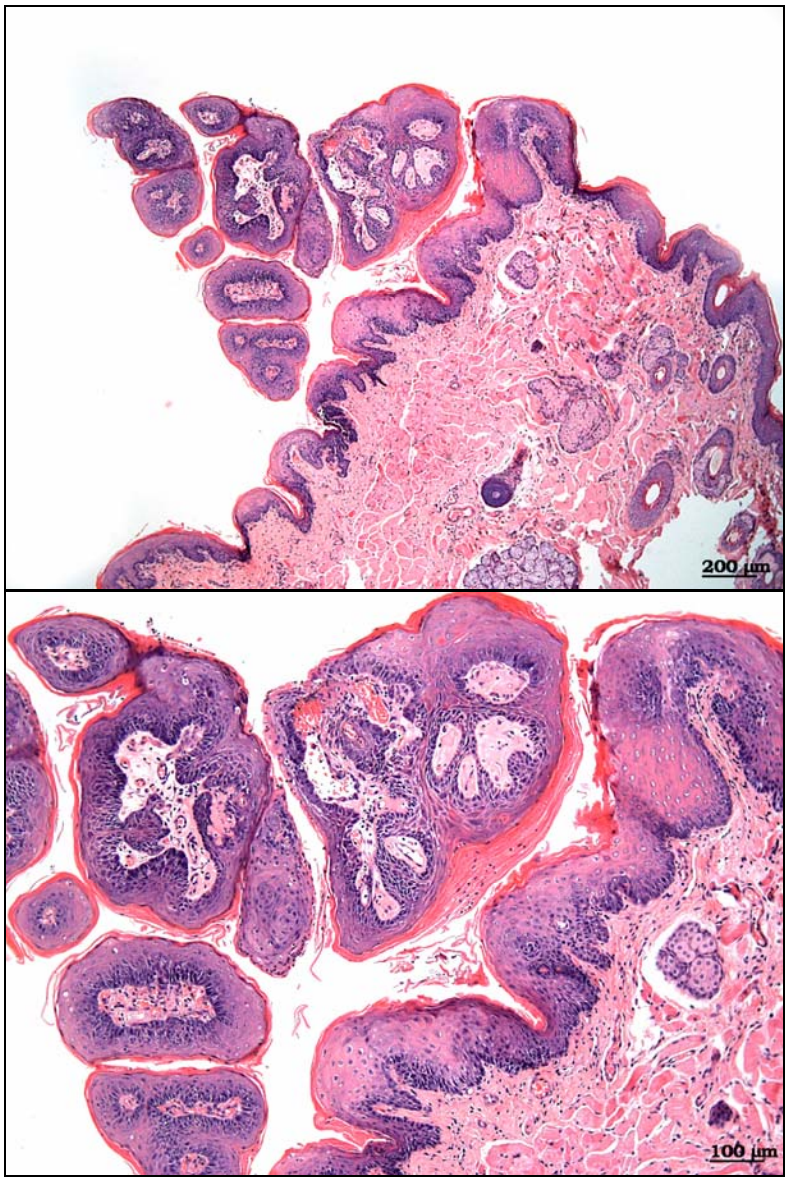


Figura 28A e 28B – Aspecto microscópico da mucosa bucal de um animal do grupo V no período experimental de 20 semanas; onde se observa a presença de múltiplos carcinomas espinocelulares papiliformes havendo a proliferação epitelial em ilhotas para o tecido conjuntivo, com a formação de pérolas córneas, na camada epitelial. (Coloração H.E.).

6

Discussão

6 Discussão

6.1 Da concepção do trabalho

A utilização de modelos experimentais como suporte a inúmeras pesquisas que objetivem o estudo de substâncias que possam "frear" o desenvolvimento do câncer humano é um caminho muito explorado e infelizmente ainda não completamente elucidado.

Após as doenças cardiovasculares a segunda maior causa de óbitos em relação à espécie humana, são as neoplasias, representadas por proliferações celulares desordenadas e atípicas, apresentando estreita relação com fatores genéticos, hereditários e ambientais; como é bem descrito por Parise Jr., 2000.

Muito se avançou nos últimos dez anos em relação ao diagnóstico e terapia dos mais variados tipos de tumores malignos, o câncer de boca não é exceção, tendo como foco a redução dos danos biológicos que a doença poderia causar no organismo, e também o desenvolvimento de estratégias que restringiriam o surgimento e proliferação das neoplasias.

A ocorrência do câncer não se mostra dependente de um determinado fator de risco atuando isoladamente, mas sim decorrente da associação de fatores, que podem atuar em maior ou menor grau, interferindo com os estádios de homeostasia e provocando lesões celulares irreversíveis no DNA das células, a partir daí desenvolvendo as neoplasias. (COTRAN; KUMAR e COLLINS, 2000; CWIKLA et al. 2000)

O trabalho de Shklar, 1999 nos sinaliza para a importância dos estudos experimentais que tenham como alvo a carcinogênese, quer seja tentando descobrir o efeito iniciador ou promotor de determinadas substâncias, quer avaliando o efeito inibidor. O autor afirma que as pesquisas do câncer devem estar apoiadas em ensaios imunológicos, genéticos, nutricionais e dos mecanismos inibidores do desenvolvimento tumoral.

Baseado em uma criteriosa análise da literatura podemos identificar uma série de trabalhos que se preocupavam não somente em estudar quais substâncias poderiam causar o câncer; e sim delinear o papel quimiopreventivo exercido por estas. (BOONE e YOU, 1997; SHABANY et al. 2002)

Isto justifica a grande importância dada, nos dias atuais, a prevenção no âmbito das ciências biomédicas.

Estes trabalhos propunham-se a estudar o efeito inibidor tumoral, valendo-se da metodologia experimental DMBA induzida, principalmente em substâncias naturais como: Licopene, alicesteine, alho, ácido retinóico, café, chá preto e chá mate. (GILMORE e GIUNTA, 1981; HARNACK et al. 1997; KATIYAR e MUKHTAR, 1997; BALASENTHIL e NAGINI, 2000; JOHNSON, 2000; SANTOSH, NIHAL e HASAN, 2000; BHUVANESWARI et al. 2001; SAROJA et al. 2001; BALASENTHIL, RAO e NAGINI, 2002; LI et al. 2002; LIVNY, 2002; MOHAN et al. 2005 e MOHAN et al. 2006)

Não devemos perder de vista que os modelos experimentais apesar de "imitarem" a morfofisiologia humana, mostram limitações principalmente em relação a fatores ambientais e psicossociais; o que é bem reportado no trabalho de Morris, 1961.

No Brasil, é crescente a valorização da medicina popular aplicada à cura de um grande número de doenças, principalmente pela população de menor poder aquisitivo, Lima Jr. et al. 2005; isso ratificado pela venda desenfreada dos chamados "remédios milagreiros" em feiras livres das grandes cidades, principalmente das regiões Norte e Nordeste do país; muitas vezes comercializados sem a preocupação em relação ao controle fitossanitário, de identidade e de pureza; bem como com os efeitos adversos que essas formulações podem provocar no organismo humano. (BIAVATTI et al. 2006)

Ao consultarmos a literatura, notamos uma carência de estudos químicos discutindo aspectos em relação à caracterização do óleo, muitas vezes dificultado por sua ampla variabilidade natural e à crescente e desmedida demanda do mercado por medicamentos fitoterápicos.

Alguns trabalhos analíticos têm sido conduzidos no sentido de promover uma padronização desta matéria prima, apesar de suas variações naturais, sendo a cromatografia gasosa a técnica melhor empregada para esta finalidade. (CASCON e GILBERT, 2000; BIAVATTI et al. 2006)

É crescente o interesse de pesquisas com fitoterápicos, objetivando a produção de fármacos mais baratos e com efeitos semelhantes aos medicamentos tradicionais hoje existentes no mercado.

Seguindo esses estudos, e considerando que na disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, há uma linha de pesquisa orientada para se estudar a carcinogênese experimental, despertou nosso interesse avaliar o efeito de um óleo natural encontrado no Brasil, denominado óleo de Copaíba que apresenta diversas propriedades farmacológicas cientificamente comprovadas, tais como: antiinflamatória, cicatrizante, anti-séptico, antioxidante e inibidor do desenvolvimento tumoral. (BASILE et al. 1988; BRITO, 1995; DOONAN e HUNT, 1996; PAIVA et al. 1998; BANDEIRA et al. 1999; BRITO et al. 2000; PESSOA et al. 2000; PAIVA et al. 2002; SUGIMOTO, 2003; LIMA, 2003; PAIVA et al. 2003; ARAÚJO JR., 2004; CASTRO e SILVA JR. et al. 2004; CARVALHO et al. 2005; VEIGA JR. et al. 2006).

Baseado na ausência de trabalhos científicos que pudessem avaliar clinicamente o papel do óleo resina de Copaíba no desenvolvimento de tumores malignos bucais; bem como a ausência de ensaios experimentais envolvendo produtos naturais e sua ação quimiopreventiva na carcinogênese bucal, é que fundamentamos o nosso estudo.

6.2 Da metodologia experimental empregada

Desde que Salley em 1954 descreveu na literatura a técnica para produção de tumores experimentais DMBA induzidos este modelo tem sido largamente empregado para avaliação do potencial carcinogênico de inúmeras substâncias que diariamente entram em contato com a mucosa bucal.

Como os hamsters são animais de hábitos noturnos, que apresentam excelentes condições de manutenção e manejo, além de apresentarem excelente adaptação em ambientes de biotério. (HOSSIER e MC PHERSON, 1987); procurávamos aplicar as substâncias experimentais no final da manhã, pois dessa forma respeitavamos o intervalo de 48 horas entre uma aplicação e outra, e também esse horário correspondia ao período em que os animais encontravam-se menos hiperativos. (RENSTRUP, SMULOW e

GLICKMAN, 1962; ODUKOYA e SHKLAR, 1984; MATIAKIS, et al. 1994; WADA et al. 2003).

Para Haywood, Singh e Borke [199-?] a "alta incidência de tumores espontâneos de ocorrência nos roedores seria um importante fator que limitaria a extrapolação de resultados experimentais, quando se desejasse mensurar o risco humano a uma determinada exposição de um agente químico".

Em nosso estudo foram respeitadas às concentrações previamente estabelecidas na literatura, quanto ao uso do DMBA, visando uma melhor homogeneização da solução. Notou-se que mesmo mantendo-a em ambiente refrigerado e em recipiente fechado, ocorria uma significativa evaporação da solução.

Em nosso estudo piloto podemos observar que quando a aplicação foi realizada respeitando-se o intervalo de 24 horas, os animais exibiram lesões de tamanho e quantidades maiores, precocemente, somado a isso um grande número de animais experimentais evoluiu rapidamente para óbito. Quando respeitamos o intervalo de aplicação de 48 horas a maior parte das lesões ocorreu a partir da 13ª semana de aplicação das substâncias experimentais; indicando realmente ser esta a melhor freqüência para a aplicação dos produtos experimentais.

Extrapolando aos nossos resultados, pode-se observar uma significativa presença das lesões em outros sítios da cavidade bucal dos animais, que não exclusivamente a borda lateral lingual; o que não é concordante com o trabalho de Maeda e Kameyama, 1986. Quando realizavamos a aplicação das substâncias diretamente na borda lateral lingual, notavamos que as mesmas escoavam para outras regiões da cavidade bucal, isto acontecendo em decorrência do aspecto fluido do líquido e também da constante movimentação da língua destes animais.

Com a finalidade de avaliação de possíveis focos metastáticos procedemos à realização de necropsia, removendo: fígado, rins, pulmão e linfonodos regionais; seguido de criteriosa análise clínico microscópica. Nossos achados corroboram com os estudos de Fassoni, 1992; Salles, 1993; Lima, 1999 e Camargo, 1999 onde não foram observadas alterações macro e microscópicas compatíveis com metástase, nestes orgãos. Baseado nestes resultados, o modelo de carcinogênese experimental DMBA induzida parece não ser a melhor forma de avaliação quando se deseja estudar o mecanismo de ocorrência de metástases.

Em nosso trabalho a utilização do 9,10-dimetil-1,2 benzantraceno (DMBA) está relacionada à iniciação da carcinogenese; a aplicação do óleo resina de Copaíba nas suas diferentes formas teria um papel voltado à restrição do processo de iniciação tumoral.

Nos trabalhos de carcinogênese química experimental, as lesões malignas representadas pelo carcinoma espinocelular, são freqüentemente precedidas por lesões de aspecto hiperqueratóticas e displásicas que exibem aspecto comparativamente semelhante aos encontrados em leucoplasias bucais em humanos. (WHO, 1978; SHAKLAR, 1999)

As lesões exofíticas papiliformes em modelos experimentais DMBA induzidos corresponderiam ao carcinoma espinocelular de padrão papiliforme na espécie humana; sendo uma neoplasia moderadamente invasiva apresentando um crescimento exofítico, papiliforme que lembra o aspecto de um carcinoma verrucoso; apesar de seu comportamento apresentar-se bem mais agressivo quando comparado ao carcinoma verrucoso. (LIMA, 1999). Em nosso trabalho podemos observar a presença dessas lesões exofíticas sugestivas de carcinoma espinocelular papiliforme a partir da 13ª semana de aplicação das substâncias experimentais; mostrando-se de aspecto mais freqüente no grupo I (13 semanas) e nos grupos IV e V (20 semanas).

Os carcinomas espinocelulares DMBA induzidos, em geral, são bem diferenciados, pois ao mesmo tempo em que apresentam sinais de atipia celular representado pelo pleomorfismo e hipercromatismo intenso, mitoses freqüentes e perolas córneas de caráter abundante; alguns outros fatores como: organização tecidual, relação intercelular e diferenciação celular mostram-se ainda em estádios de maturação. (FASSONI, 1992). Um fato que nos chamou a atenção foi que no grupo I no período de 20 semanas todos os animais desenvolveram carcinomas espinocelulares bem diferenciados.

6.3 Da utilização de plantas medicinais em pesquisas biomédicas

Quando nos deparamos com algum artigo, revista, livro, informativo abordando a utilização de plantas medicinais e sua ação no organismo humano; e comum nos questionarmos: elas promovem a cura segura?

Por mais espantoso que seja a utilização de plantas com fins medicinais, aplicadas ao tratamento, cura e prevenção das doenças, é uma das mais antigas formas de prevenção da humanidade.

No início da década de 1990, a organização mundial de saúde divulgou um boletim, onde demonstrava que 65 a 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados terapêuticos básicos. (WHO, 1991).

No Brasil, nota-se um consumo desenfreado dessas plantas medicinais, muitas vezes com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas, representando um campo aberto para possíveis adulterações. Nos Estados Unidos e Europa as normas para certificação e controle de qualidade envolvendo as preparações vegetais mostram-se bem mais rígidas. (VEIGA JR., PINTO e MACIEL, 2005)

Ao estabelecermos comparação das plantas medicinais com os medicamentos utilizados nos tratamentos convencionais, questões relacionadas à toxicidade e concentração ideal de plantas medicinais podem representar um aspecto banal. Isto, entretanto, não corresponde à verdade uma vez que a toxicidade de plantas medicinais representa um sério problema de saúde pública.

No artigo intitulado: plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares; Maciel, Pinto e Veiga Jr., 2002 nos chamam a atenção para a grande variedade de plantas com potencial terapêutico, mas advogam que seu uso deve ser prescrito de forma racional levando-se em consideração possíveis adulterações, toxidez, bem como sua ação sinérgica com outras drogas.

Seguindo a trajetória do trabalho acima; novos estudos multidisciplinares envolvendo profissionais etnobotânicos, químicos, farmacêuticos, patologistas, homeopatas devem ser conduzidos no sentido de ampliar o conhecimento sobre as plantas medicinais, sendo capazes de responder os seguintes questionamentos: como agem? quais os seus possíveis efeitos citotóxicos? como seria a sua interação com medicamentos alopatas? e por fim quais as estratégias para o controle de qualidade e produção de fitoterápicos? Questões passíveis de serem respondidas visando uma criteriosa utilização desses fármacos naturais.

Nosso trabalho experimental se propôs a estudar uma planta muito conhecida por suas supostas propriedades medicinais, denominada óleo de Copaíba, que é obtido

em larga escala na região Amazônica, a partir de perfurações no tronco das arvores, de onde é obtido um líquido transparente, viscoso e fluido com odor e sabor *sui generis*.

Uma grande quantidade de estudos na literatura aborda as diferentes aplicações do óleo de Copaíba estabelecendo padrões fitoquímicos e antiedematogênicos (VEIGA JR. et al. 2006); cicatrização tecidual (BRITO, 1995; PAIVA et al. 2002); proteção gástrica (PAIVA et al. 1998; PAIVA et al. 2003); proteção do colo uterino e região vaginal (BRITO et al. 2000); atuação antiinflamatória e analgésica (BASILE et al. 1988; CARVALHO et al. 2005) e de compatibilidade biológica (BANDEIRA et al. 1999)

Uma linha de pesquisa importante está sendo conduzida pelo Departamento de Química da Universidade de Campinas, onde os pesquisadores através de estudo *in vitro* já conseguiram sucesso contra nove linhagens tumorais, utilizando-se de várias espécies do óleo. Esses resultados abrem uma perspectiva fantástica ainda merecendo testes toxicológicos com a finalidade de avaliar se as substâncias não afetariam também a viabilidade das células normais. (SUGIMOTO, 2003)

Essa realmente parece ser a questão central, que restringe a utilização clínica desses produtos; isso pôde ser atestado durante o primeiro mês de aplicação das soluções a base de óleo de Copaíba em nosso estudo. Neste período, os animais mostravam-se hiperativos e intolerantes quando da administração do óleo; fornecendo-nos indícios de possível restrição tóxica aos componentes do óleo resina de Copaíba. Pensamos em talvez ser esse o motivo pelo qual não existam estudos experimentais avaliando o efeito do óleo resina de Copaíba e sua ação na mucosa bucal.

Um dos trabalhos mais importante na literatura avaliando o efeito inibidor tumoral *in vivo* e *in vitro* do óleo resina de Copaíba foi publicado por Lima, 2003; onde os autores fracionaram o óleo, separando os sesquiterpenos e diterpenos, que correspondem a parte do óleo responsável pelo processo de inibição tumoral e testaram em linhagens de melanoma. Os resultados deste estudo revelaram que o óleo apresentou citotoxicidade e atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro*.

Essa parece ser uma limitação de nosso trabalho, pois utilizou a solução pura do óleo e a contraparte manipulada artesanalmente sem a preocupação de fracionar os seus constituintes, logo se isolássemos a substância essencial ao processo de inibição tumoral, como descrito acima, poderíamos ter resultados quimiopreventivos mais significativos.

De aplicação direta na Odontologia, podemos ter acesso a um único trabalho desenvolvido por Bandeira, et al. 1999 que inicialmente publicou um estudo farmacológico preliminar sobre o óleo de Copaíba, e em seguida realizou um estudo onde avaliou a compatibilidade biológica do óleo quando associado ao Hidróxido de Cálcio; podendo ser observada uma excelente biocompatibilidade e redução na resposta inflamatória pulpar quando da associação destes dois produtos.

6.4 Dos resultados obtidos

Com o propósito de padronização, foram avaliados os seguintes critérios, em nosso estudo experimental: variação do peso dos animais, tamanho das lesões, localização das lesões, aspecto macroscópico e microscópico.

A preocupação em relação aos determinantes sistêmicos nos animais experimentais da pesquisa, e sua possível interferência no comportamento animal; e conseqüentemente nos resultados da pesquisa, nos conduziram a avaliar a variação do peso animal em dois intervalos de tempo, antes do início da aplicação das substâncias experimentais e no dia do sacrifício do respectivo grupo experimental.

Quando da análise da evolução das médias em relação aos cinco grupos experimentais, observamos que no grupo em que a solução de DMBA foi aplicada isoladamente os animais exibiram significativa redução no peso corpóreo. Seguindo ainda esta análise, pode-se perceber que até a 13º semana de aplicação das substâncias as variações no peso dos animais foram pouco significativas; ocorrendo variações mais marcantes a partir da 13º semana de aplicação das substâncias experimentais em relação aos cinco grupos experimentais.

Acreditamos ser essa uma importante contribuição de nosso trabalho, pois ao analisarmos a literatura não encontramos trabalhos de carcinogênese experimental DMBA induzida, preocupados com a variação no peso dos animais durante o período experimental.

Nos animais do grupo 20 semanas submetidos à aplicação da solução de DMBA isoladamente, a caquexia foi um aspecto clínico relevante a ser considerado; isto é enfatizado no trabalho de Camargo, 1999.

Um outro critério adotado correspondeu à avaliação do tamanho das lesões na cavidade bucal dos animais experimentais. Para proporcionar melhor avaliação facilidade na tabulação estatística dos dados amostrais, classificamos as lesões de acordo com escores previamente estabelecidos e que representavam o tamanho da lesão. Esses dados foram colhidos, procurando-se mensurar o maior diâmetro da lesão com o auxílio de um paquímetro, sendo em seguida os dados transportados para uma régua apropriada. Na literatura a preocupação com o tamanho das lesões bucais no modelo de carcinogênese DMBA induzida já era descrito por Morris em 1961.

Para efeito de caracterização dos grupos experimentais e auxílio no processo de elaboração estatística, assim dividimos os cinco grupos experimentais: Grupo I (DMBA); Grupo II (óleo resina de Copaíba *in natura*); Grupo III (solução de óleo de Copaíba manipulada artesanalmente); Grupo IV (DMBA + óleo de Copaíba *in natura)* e Grupo V (DMBA + solução de óleo de Copaíba manipulado artesanalmente).

Estatisticamente podemos comprovar um maior diâmetro das lesões no grupo I em relação ao grupo IV e V, no período experimental de 13 e 20 semanas, respectivamente; e quando da comparação entre os valores de média para o grupo IV e V; pode-se observar uma redução no tamanho das lesões do grupo IV. Estes achados nos permitem pensar que quando foi associado o óleo de Copaíba ao DMBA as lesões mostraram-se em diâmetros menores; e quando da análise, relacionado à média, entre os grupos IV e V, a associação com o óleo natural apresentou lesões bucais de diâmetros menores.

Apesar da aplicação das substâncias experimentais ocorrer na borda lateral da língua dos animais experimentais como preconizado por Shaklar, 1980; Fassoni, 1992; Matiakis et al. 1994; pode ser observado em nosso estudo piloto que as lesões fluiam para outros sítios da cavidade bucal dos animais; o que justificava a necessidade de uma criteriosa avaliação da localização dessas lesões. Para melhor interpretação, dividimos topograficamente a cavidade bucal nos seguintes sítios: borda lateral da língua, dorso lingual, ventre lingual, mucosa jugal, comissura labial, soalho bucal e outras localizações.

Para interpretação desses resultados não foi possível serem realizados testes estatísticos indutivos, somente análise descrita da ocorrência de localização das lesões.

No período experimental de sete semanas a ocorrência de lesões bucais foi significativamente baixa, a maior parte dos animais não exibia lesões clinicamente e

microscopicamente detectáveis, sendo observada apenas uma lesão em borda lateral de língua e outra na região de comissura. Estes achados estão de acordo com os relatos de Fassoni, 1992; Camargo, 1999; Pieroli, Navarro e Consolaro, 2000

No tempo experimental de 13 semanas, todos os sítios bucais foram acometidos pela ocorrência de lesões clinicamente detectáveis, havendo uma maior ocorrência na região de mucosa jugal. Por fim, no período de 20 semanas de aplicação das substâncias experimentais notou-se maior presença destas na porção média da borda lateral lingual.

É importante ressaltar que alguns trabalhos preconizam a aplicação das substâncias experimentais na área correspondente à bolsa glútea do animal, Balasenthil et al. 1999; Balasenthil e Nagini, 2000; Balasenthil, Rao e Nagini, 2002; Balasenthil, Rao e Nagini, 2002; fato discordante de nosso trabalho que segue a padronização de aplicação das soluções experimentais preconizada por Fassoni, 1992, sugerindo melhores resultados quando da aplicação na borda lateral lingual.

Quando da análise das alterações macroscópicas no período de 13 semanas; notamos que o grupo I (DMBA) apresentou lesões de tamanho e características clínicas mais expressivas quando comparado ao grupo IV (DMBA + óleo resina de Copaíba *in natura*) e V (DMBA + solução de óleo de Copaíba manipulado artesanalmente) respectivamente; conforme observado na figura 14.

Na avaliação estatística entre os grupos experimentais IV e V, observamos valores de média das alterações macroscópicas muito semelhantes, entre os dois grupos, o que não nos permite, baseado no aspecto macroscópico apontar diferenças estatisticamente significante entre os dois grupos experimentais.

Da mesma forma, no período de 20 semanas, notou-se que o grupo I apresentou lesões clinicamente mais importantes; sendo da mesma forma que o grupo anterior estatisticamente pouco significante a comparação entre o grupo IV e o grupo V.

É importante salientar que durante a fase experimental, seis animais experimentais morreram, conforme descrito na tabela 2. Um dos aspectos relevantes, sobretudo na fase final do experimento, era a presença de acentuada caquexia nos animais principalmente do grupo em que a solução de DMBA foi administrada isoladamente.

Da mesma forma que Camargo, 1999; também pensamos em criar um valor numérico, que chamaríamos de VN=7,0 para caracterizar macro e microscopicamente os

animais portadores de quadros de carcinoma com caquexia, mas também optamos por não fazer em razão do curto estágio para óbito que esses animais apresentariam e também por questões de respeito ao modelo de carcinogênese experimental padronizado por Fassoni, Salles e Consolaro, 1993.

Pode-se observar que no período experimental de 20 semanas, a ocorrência de alterações microscópicas mostrou-se mais expressiva. Em relação ao grupo I, todos os animais exibiram quadros microscópicos de carcinoma invasivo bem diferenciados sem metástases.

Em relação ao grupo II e III, observamos microscopicamente apenas quadros de hiperplasia discreta e moderada sem sinais de atipia; o que pode sugerir um efeito de espessamento do epitélio pelo óleo de Copaíba, isto comprovado no trabalho de Brito et al. 2000.

Quando da avaliação microscópica do grupo IV e grupo V no período experimental de 20 semanas, observou-se uma ampla variação em relação aos seus padrões microscópicos; o que não pode ser constatado no grupo em que somente foi aplicado o DMBA isoladamente, onde todas as lesões foram compativeis microscopicamente com carcinoma espinocelular bem diferenciado. Isso nos reforça a idéia de que o óleo possa ter promovido alguma ação inibitória na formação desses tumores.

Como já foi discutido anteriormente, este modelo de indução de carcinogênese experimental parece não ser propício ao estudo de metástases como bem descrito por Fassoni, 1992; porém um achado microscópico nos despertou atenção quando da avaliação microscópica do fígado de dois animais experimentais do grupo IV, tratava-se de um material enegrecido de aspecto granular, que mostrava aspecto semelhante a "cacho de uva" localizado por entre os capilares sinusóides hepáticos. Na literatura não observamos relatos anteriores que abordem esse achado; nossa sugestão é que se trata de algum corpo estranho presente no óleo resina de Copaíba e que estava sendo em grande quantidade metabolizado no fígado. Nestes cortes microscópicos não se observava critérios de malignidade.

Acreditamos que este trabalho contribuiu, como ponto de partida, em um vasto campo de pesquisa utilizando-se de substâncias naturais e seus efeitos na inibição do desenvolvimento tumoral valendo-se do modelo de carcinogênese DMBA induzida, e que

novas pesquisas com técnicas imunoistoquímicas e biomoleculares possam ser realizados com o intuito de complementar essa linha de estudo.

7

Conclusões

7 Conclusões

Baseado na avaliação das respostas macroscópica e microscópica da mucosa bucal dos hamsters sírios dourados, frente a aplicação do óleo resina de Copaíba natural (*Copaifera reticulata*) e manipulado artesanalmente, valendo-se da metodologia de carcinogênese experimental DMBA induzida; e considerando as limitações inerentes à metodologia empregada, ao padrão de subjetividade da análise morfológica e extrapolação desses resultados para a espécie humana, pôde-se verificar que:

1. O período experimental de sete semanas de aplicação das substâncias experimentais mostrou-se curto para a obtenção de lesões cancerizáveis e carcinomas DMBA induzidos, quando diluído em acetona a 0,5% e aplicado na mucosa bucal dos hamsters sírios dourados;

2. A variação no peso dos animais experimentais no grupo I (DMBA) mostrou-se em significativa queda durante todo o período experimental; associado com quadros de caquexia severa e alteração de lentidão comportamental dos animais desse grupo; o que não foi observado nos demais grupos;

3. As lesões DMBA induzidas (grupo I) se mostraram em tamanho maior se comparadas ao grupo IV e V; sugerindo um aspecto de inibição na formação e tamanho desses tumores quando associado ao óleo de Copaíba, natural e manipulado artesanalmente;

4. A presença das lesões DMBA induzidas, não se mostraram restritas à borda lateral da língua; havendo ocorrência dessas em outros sítios da cavidade bucal como: soalho bucal, ventre lingual, mucosa jugal e comissura labial;

5. A presença de alterações macroscopicamente detectáveis na mucosa bucal dos animais do grupo experimental I mostrou-se significativamente maior se comparada ao grupo IV e V;

6. A média das alterações microscópicas relacionadas ao grupo I, IV e V no período de 13 semanas não mostrou diferença estatística significante;

7. No período de 20 semanas, todos os animais do grupo I exibiram aspectos microscópicos de carcinomas invasivos bem diferenciados; o que não foi observado no grupo IV e V; provavelmente sugerindo um efeito preventivo do óleo de Copaíba nas suas duas apresentações;

8. Não houve diferença estatisticamente significante na comparação entre os grupos IV e V no que diz respeito a maior capacidade de inibição no desenvolvimento tumoral;

9. Em relação a mucosa bucal dos animais do grupo II e III, no período de 13 e 20 semanas, podemos observar microscopicamente um espessamento do epitélio com hiperqueratinização, com ausência de displasia epitelial;

10. Não observamos alterações macroscópicas e microscópicas características de malignidade, nos linfonodos, rins, pulmão e fígados. Apenas um achado isolado provavelmente associado a corpo estranho, presente no óleo de Copaíba e que estava

sendo metabolizado em larga escala no fígado; o que reforça a idéia de que este modelo não é o sugerido para avaliação da ocorrência de metástases.

Baseado nesses achados, pôde-se concluir que:

a) Morfologicamente é mais prudente estabelecermos comparação em relação às alterações da carcinogênese bucal DMBA induzida após o período experimental de 13 semanas;

b) O óleo resina de Copaíba *in natura* e manipulado artesanalmente desempenha efeito inibidor no desenvolvimento dos tumores bucais DMBA induzidos;

c) Estudos elucidando o efeito citotóxico do óleo sobre a mucosa bucal devem ser conduzidos, e comparados com nossos resultados;

d) Novos estudos apoiados em técnicas imunocitoquímicas e de biologia molecular devem ser realizados no sentido de aprofundar e respaldar os nossos resultados.

Referências

Referências*

AKERELE, O. Medicinal plants and primary health care: an agenda for action. **Fitoterapia,** Milano, v. 50, n. 5, p. 355-363, 1988.

ALBERT, B. **Fundamentos da biologia celular: uma introdução à biologia molecular da célula**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2002. 775 p.

AL-DAMOUK, J. D. Oral epithelial response to experimental chronic alcohol ingestion in hamsters. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v. 76, n. 6, p. 736-741, Dec. 1993.

AL-DAMOUK, J. D.; Mac DONALD, D. G. Oral epithelial response to experimental folate deficiency in the golden hamster. **Epithelia**, v. 1, p. 257-266, 1986 **apud** HOSSIER, G.L.; Mc PHERSON, C.W. Laboratory hamsters. London: Academic Press, 1987. 163 p.

ARAÚJO JR., F. A. **Efeito do óleo de Copaíba no desenvolvimento de células neoplásicas e na sobrevida de camundongos portadores do tumor ascítico de Ehrlich**. 2004. 55 p. Monografia (Graduação em Medicina) - Universidade do Estado do Pará, Belém, 2004.

BALASENTHIL, S. et al. Chemopreventive potential of neem (Azadirachta indica) on 7, 12-dimethyl[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **J Ethnopharmacol**, Lausanne, v. 67, n. 2 p. 189-195, Feb. 1999.

BALASENTHIL, S.; NAGINI, S. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis by S-allylcysteine. **Oral Oncol**, Oxford, v. 36, n. 4, p. 382-386, Apr. 2000.

BALASENTHIL, S.; RAO, K. S.; NAGINI, S. Altered cytokeratin expression during chemoprevention of experimental hamster buccal pouch carcinogenesis by garlic. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 31, n. 3, p. 142-146, Mar. 2002.

BALASENTHIL, S.; RAO, K. S.; NAGINI, S. Garlic induces apoptosis during 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Oral Oncol**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 431-436, Apr. 2002.

* Normas sugeridas para uso no âmbito da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo com base no capítulo "Referências" do Manual: "Diretrizes Básicas Para Elaboração de Dissertações e Teses"; aprovado pela comissão de Pós graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da USP

BANDEIRA, M. F. C. L. et al. Estudo farmacológico preliminar de Copaifera Multijuga (óleo de Copaíba). **JBC J Bras Clin Estet Odontol**, Curitiba, v. 3, n. 16, p. 39-42, 1999.

BASILE, A. C. et al. Anti-inflammatory activity of oleoresin from brazilian copaifera. **J Ethnopharmacol**, Lausanne, v. 22, n. 1, p. 101-109, Jan. 1988.

BHUVANESWARI, V. et al. Chemopreventive efficacy of lycopene on 7, 12-dimethyl[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 72, n. 8, p. 865-874, Aug. 2001.

BIAVATTI, M. W. et al. Análise de óleos-resinas de Copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Rev Bras Farmacog**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 230-235, Abr./Jun. 2006.

BLOT, W. J. Alcohol and cancer. **Cancer Res**, Baltimore, v. 52, n. 7, p. 2119-2123, Apr. 1992.

BOONE, C. W.; YOU, M. Progress in cancer chemoprevention: agents. **J Cell Biochem Suppl**, New York, v. 27, n. 6/7, ,1997.

BRAGGIO, M. M. Plantas medicinais: noções básicas e aplicações na agropecuária. **Biológico**, São Paulo, v. 65, n. 1/2, p. 45-46, Jan./Dez. 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Políticas de Saúde. Departamento de Atenção Básica a Saúde. Brasília, DF, 1987 apud RIO, R. G. W. **Atividade antiinflamatória, toxicidade e fitoquímica do óleo resina de Copaíba, proveniente de diferentes espécies e de suas respectivas frações.** 2001. 130 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

BRITO, N. M. B **Aspectos morfológicos e morfométricos da cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos tratados com óleo de Copaíba.** 1995. 59 p. Dissertação (Mestrado em Cirurgia Experimental) – Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, São Paulo, 1995.

BRITO, N. M. B. et al. Aspectos morfológicos e morfométricos do colo uterino de ratas ooferoctomizadas após a aplicação do óleo de Copaíba. **Rev Bras Ginecol Obstet**, Rio de Janeiro, v. 22, n. 8, p. 489-493, ago. 2000.

BRYNE, M. et al. Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 20, n. 8, p. 369-372, Sept. 1991.

CAMARGO, W. R. **Análise do potencial carcinogênico de dentifrício com peróxido de hidrogênio e de agente clareador dentário**: avaliação clínico-macroscópica em hamsters no modelo de carcinogênese bucal DMBA-induzida. 1999.

116 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1999.

CARRARA JR., E.; MEIRELLES, H. A indústria química e o desenvolvimento do Brasil: 1500-1889. São Paulo: Metalivros, 1996. 84 p.

CARVALHO, J. C. T. et al. Topical anti-inflammatory and analgesic activities of Copaifera duckei dwyer. **Phytoter Res**, London, v. 19, n. 11 p. 946-950, Nov. 2005.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of Copaifera guianensis Desf.; Copaifera duckei Dwyer and Copaifera multijuga Hayne. **Phytochemistry**, New York, v. 55, n. 7 p. 773-778, Dec. 2000.

CASTRO e SILVA JR., O. et al. Antiproliferative activity of copaifera duckei oleoresin on liver regeneration in rats. **Phytother Res**, London, v. 18, n. 1 p. 92-94, Jan. 2004.

CAVALCANTI NETO, A. T. et al. Análise comparativa entre o óleo-resina de Copaíba e o digluconato de clorexidina no processo de cicatrização tecidual: estudo histológico em dorso de ratos. **Rev Odontol Unesp**, Araraquara, v. 34, n. 2, p. 107-112, 2005.

CHEN, Y. W. et al. Use of methylene blue as a diagnostic aid in early detection of oral cancer and precancerous lesions. **Br J Oral Maxillofac Surg**, Edinburgh, 2006. In press.

CHIANG, C. P. et al. Hamsters chewing betel quid or areca nut directly show a decrease in body weight and survival rates with concomitant epithelial hyperplasia of cheek pouch. **Oral Oncol**, Oxford, v. 40, n. 7, p. 720-727, Aug. 2004.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978. v. 2, 707 p.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from Copaifera langsdorfii oleo resin. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 8, p. 1231-1234, Aug. 2002.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Robbins – patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1251 p.

COUTINHO, D. F.; TRAVASSOS, L. M. A.; AMARAL, F. M. M. do. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas em comunidades indígenas no estado do Maranhão. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 3, n. 1, p. 7-12, jan./jun. 2002.

CWIKLA, S. J. et al. Doc-1 mediated apoptosis in malignant hamster oral keratinocytes. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 58, n. 4, p. 406-414, Apr. 2000.

DERKA, S. et al. Cell proliferation and apoptosis culminate in early stages of oral oncogenesis. **Oral Oncol**, Oxford, v. 42, n. 5, p. 540-550, May 2006.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais**: arte e ciência. São Paulo: Editora Unesp, 1996. 230 p.

DOONAN, J.; HUNT, T. Why don't plants get cancer? **Nature**, London, v. 380, n. 6574, p. 481-482, Apr. 1996.

EVESON, J. W. Animal models of intra-oral chemical carcinogenesis: a review. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 10, n. 3, p. 129-146, June 1981.

FARNSWORTH, W. E. Workshops and lectures. **J Med Educ**, Washington, v. 63, n. 10, p. 809, Oct. 1988.

FASSONI, A. A. **Carcinogênese bucal química DMBA-induzida**: Estudo metodológico em hamsters sírios dourados. 1992. 87 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1992.

FASSONI, A. A.; SALLES, C. L. F.; CONSOLARO, A. Carcinogênese bucal quimicamente induzida por DMBA: estudo em hamsters sírios dourados. **Rev. Odont. USP,** São Paulo, v. 7, n. 4, p. 285-291, out./dez. 1993

FUKUSHIMA, S. et al. Cancer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion. **J Cell Biochem Suppl**, New York, v. 27, p. 100-105, 1997.

GILMORE, W.; GIUNTA, J. L. The effect of 13-cis-retinoic acid on hamster buccal pouch carcinogenesis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v. 51, n. 3, p. 256-265, Mar. 1981.

GIMENEZ-CONTI, I. The hamster cheek pouch carcinogenesis model. **Acta Odontol Latinoam**, Buenos Aires, v. 7, n. 1, p. 3-12, 1993.

HARNACK, L. J. et al. Smoking, alcohol, coffee and tea intake and incidence of cancer of the exocrine pancreas: the Iowa women's health study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, Philadelphia, v. 6, n. 12, p. 1081-1086, 1997.

HASSANIN, M. B.; ASHRAFI, S. H.; DAS, A. K. Surface ultrastructural changes in chemically induced premalignant lesions in the hamster cheek pouch. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 16, n. 5, p. 273-277, May 1987.

HAYWOOD, V. B.; SINGH, B. B.; BORKE, J. L. **Nightguard vital bleaching and tumor promotion**. [s.l.]: [s.n.], [199-?]. Disponível em: <http://www.oraltech.com.br/biblioteca/cl0004/pag01.htm>. Acesso em: 22 maio 2007.

HOSSIER, G. L.; Mc PHERSON, C. W. Laboratory hamsters. London: Academic Press, 1987. 163 p.

JOHNSON, E. J. The role of lycopene in health and disease. **Nutr Clin Care,** Washington**,** v. 3, n. 1, p. 35-43, 2000.

KATIYAR, S. K.; MUKHTAR, H. Tea antioxidants in cancer chemoprevetion. **J Cell Biochem Suppl**, New York, v. 27, p. 59-67, 1997.

KATZ, H. C.; SHEAR, M.; ALTINI, M. A critical evaluation of epithelial dysplasia in oral mucosal lesions using the Smith-Pindborg method of standardization. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 14, n. 6, p. 476-482, Nov./Dec. 1985.

KENNEDY, A. R. Prevention of carcinogenesis by protease inhibitors. **Cancer Res**, Baltimore, v. 54, n. 1, p. 1999-2005, Apr. 1994.

LAKARS, T. C.; HERRING, S. W. Ontogeny of oral function in hamsters *(Mesocricetus auratus)*. **J Morph**, New York, v. 165, n. 3, p. 237-254, Sept. 1980.

LAMBERT, J. D. et al. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. **Am J Clin Nutr**, Bethesda, v. 81, n. 1, p. 284-291, Jan. 2005.

LI, N. et al. Inhibition of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced oral carcinogenesis in hamsters by tea and curcumin. **Carcinogenesis**, New York, v. 23, n. 8, p. 1307-1313, Aug. 2002.

LIMA, JR. et al. O uso de fitoterápicos e a saúde bucal. **Rev Saúde**, São Paulo, v. 7, n. 16, p. 11-17, 2005.

LIMA, N. L. **Estudo das alterações morfológicas causadas pela indução concomitante de DMBA e bebidas alcoólicas de alto teor na carcinogênese química bucal.** 1999. 118 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1999.

LIMA, N. L. **Estudo das alterações morfológicas na carcinogênese química bucal comparando-se a indução pelo DMBA e bebidas alcoólicas de alto teor**. 1997. 102 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade Federal de Odontologia de Diamantina, Diamantina, 1997.

LIMA, S. R. M. *In vivo* and *in vitro* studies on the anticancer activity of Copaifera multijuga Hayne and its fractions. **Phytother Res**, London, v. 17, n. 9, p. 1048-1053, Nov. 2003.

LISTGARTEN, M. A.; ALBRIGHT, J. T.; GOLDHABER, P. Ultrastructural alterations in hamster cheek pouch epithelium in response to a carcinogen. **Arch Oral Biol**, Oxford, v. 8, p. 145-165, Mar./Apr. 1963.

LIVNY, O. Lycopene inhibits proliferation and enhances gap-junctions communication of KB-1 human oral tumors. **J Nutr,** Bethesda, v. 132, n. 12, p. 3754-3759, Dec. 2002.

LORO, L. L.; VINTERMYR, O. K.; JOHANNESSEN, A. C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 32, n. 3, p. 125-138, Mar. 2003.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, maio 2002.

MAEDA, H.; KAMEYAMA, Y. Effect of excisional wounding on DMBA-induced hamster tongue carcinogenesis. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 21-27, Jan. 1986.

MANJANATHA, M. G. Dietary effects of soy isoflavones daidzein and genistein on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary mutagenesis and carcinogenesis in ovariectomized Big Blue transgenic rats. **Carcinogenesis**, New York, v. 27, n. 12, p. 2555-2564, Dec. 2006.

MANOHARAN, S. et al. Evaluation of anticarcinogenic effects of Clerodendron inerme on 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene-induced hamster buccal pouch carcinogenesis. **Singapore Med J**, Singapore, v. 47, n. 12, p. 1038-1043, Dec. 2006.

MANS, D. R. A.; ROCHA, A. B. da; SCHWARTSMANN, G. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. **Oncologist**, Dayton, v. 5, n. 3, p. 185-198, 2000.

MARTIN-SMITH, M.; SNEADER, W. E. Biological activity of the terpenoids and their derivatives-recent advances. **Prog Drug Res**, Basel, v. 13, p. 11-100, 1969.

MATIAKIS, A. et al. The role of the time of application of the promoter in two-stage chemically induced carcinogenesis in the oral mucosa: experimental study in the rat. **Ann Dent**, New York, v. 53, n. 2, p. 16-20, 1994.

MESQUITA, A. T. M. et al. Estudo das alterações morfológicas causadas pela uretana em modelo de carcinogenese bucal DMBA-induzida. **R Fac Odontol Porto Alegre**, Porto Alegre, v. 44, n. 1, p. 31-35, jul. 2003.

MILLER, E. G. et al. Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by green coffe beans. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v. 65, n. 6, p. 745-749, June 1989.

MISSMANN, M. et al. Reason for the use of toluidine blue staining in the presurgical

management of patients with oral squamous cell carcinomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v. 102, n. 6, p. 741-743, Dec. 2006.

MOHAN, K. V. P. C. et al. Antiproliferative and apoptosis inducing effect of lactoferrin and black tea polyphenol combination on hamster buccal pouch carcinogenesis. **Biochim Biophys Acta**, Amsterdan, v. 1760, n. 10, p. 1536-1544, 2006.

MOHAN, K. V. P. C. et al. Comparative evaluation of the chemopreventive efficacy of green and black tea polyphenols in the hamster buccal pouch carcinogenesis model. **Clin Biochem**, Toronto, v. 38, n. 10, p. 879-886, 2005.

MORI, H. et al. Chemopreventive by naturally occurring and synthetic agents in oral, liver and large bowel carcinogenesis. **J Cell Biochem Suppl**, New York, v. 27, p. 35-41, 1997.

MORRIS, A. L. Factors influencing experimental carcinogenesis in the hamster cheek pouch. **J Dent Res**, Chicago, v. 40, n. 1, p. 3-15, Jan./Feb. 1961.

MUKHERJEE, P. K.; VERPOORTE, R.; SURESH, B. Evaluation of *in vivo* wound healing activity of Hypericum patulum (Family: *hypericaceae*) leaf extract on different wound models in rats. **J Ethnopharmacol,** Lausanne, v. 70, n. 3, p. 315-321, June 2000.

NASCIMENTO, P. C. Botânica x câncer. **Jornal da Unicamp**, Campinas, p. 12, fev. 2000. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp/unicamp_hoje/ju/fev2000/pagina12-Ju149.html>. Acesso em: 17 Out. 2004.

NEHLIG, A.; DEBRY, G. Potential genotoxic, mutagenic and antimutagenic effects of coffe: a review. **Mutat Res**, Amsterdam, v. 317, n. 2, p. 145-162, Apr. 1994.

NISHIMURA, A. Changes in Bcl-2 and Bax expression in rat tongue during 4-Nitroquinoline 1-oxide-induced carcinogenesis. **J Dent Res**, Chicago, v. 78, n. 6, p. 1264-1269, June 1999.

NISHINO, H. Cancer prevention by natural carotenoids. **J Cell Biochem Suppl**, New York, v. 27, p. 86-91, 1997.

ODUKOYA, O.; SHKLAR, G. Initiation and promotion in experimental oral carcinogenesis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v. 58, n. 3, p. 315-320, Sept. 1984.

ÓLEO DE COPAÍBA. In: PIO CORRÊA, M. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1984. v. 2, p. 370-375.

OLIVEIRA, F. T.; FERRAZ, L. R. O uso de fitoterápicos na Odontologia. 1998. 78 p. Monografia (Bolsa de Extensão) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 1998.

OOMMEN, S. T.; RAO M.; RAJU, C. V. Effect of the oil of hydnocarpus on wound healing. **Int J Lepr Other Mycobact Dis**, Washington, v. 67, n. 2, p. 154-158, June 1999.

PAIVA, L. A. F. et al. Anti-inflammatory effect of kaurenoic acid, a diterpene from Copaifera langsdorffii on acetic acid-induced colitis in rats. **Vascul Pharmacol**, New York, v. 39, n. 6, p. 303-307, 2003.

PAIVA, L. A. F. et al. Gastroprotective effect of Copaifera langsdorffii oleo-resin on experimental gastric ulcer models in rats. **J Ethnopharmacol**, Lausanne, v. 62, n. 1, p. 73-78, Aug. 1998.

PAIVA, L. A. F. et al. Investigation on the wound healing activity of Oleo-resin from Copaifera langsdorffi in rats. **Phytoter Res**, London, v. 16, n. 8, p. 737-739, Dec. 2002.

PARISE Jr., O. O câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos São Paulo: Sarvier, 2000. 256 p.

PEREIRA, J. V. **Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcólico da punica granatum linn sobre microorganismos formadores da placa bacteriana.** 1998. 79 p. Dissertação (Mestrado em Odontologia - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 1998.

PESSOA, C. et al. Antiproliferative effects of compounds derived from plants of northeast Brazil. **Phytother Res**, London, v. 14, n. 3, p. 187-191, May 2000.

PIEROLI, D. A. **Análise quantitativa das regiões organizadoras nucleolares (NoRs) em carcinomas epidermóides desenvolvidos em hamsters a partir do modelo DMBA-INDUÇÃO com agentes clareadores dentais**. 2003. 86 p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Bauru, Bauru, 2003.

PIEROLI, D. A.; NAVARRO, M. F. L.; CONSOLARO, A. Evaluation of the carcinogenic potencial of bleaching agents in DMBA induction-model. **J Oral Med Pathol**, Copenhagen, v. 5, n. 1, p. 29-34, June 2000.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 45-61, 2002.

REDMAN, R. S.; KRASNOW, S. H.; SNIFFEN, R. A. Evaluation of the carcinogenic potential of toluidine blue O in the hamster cheek pouch. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v. 74, n. 4, p. 473-480, Oct. 1992.

RENSTRUP, G.; SMULOW, J. B.; GLICKMAN, I. Effect of chronic mechanical irritation on chemically induced carcinogenesis in the hamster cheek pouch. **J Am Dent Assoc**, Chicago, v. 64, n. 6, p. 770-777, June 1962.

RIBEIRO, A. **Avaliação do potencial irritativo do óleo resina de Copaíba (substituto do eugenol) na fase exsudativa do processo inflamatório.** 1989. 77p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1989.

RIO, R. G. W. **Atividade antiinflamatória, toxicidade e fitoquímica do óleo resina de Copaíba, proveniente de diferentes espécies e de suas respectivas frações.** 2001. 130 p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ROWE, N. H.; GORLIN, R. J. The effect of vitamin a deficiency upon experimental oral carcinogenesis. **J Dent Res**, Chicago, v. 38, n. 1, p. 72-83, Jan./Feb. 1959.

RUI, H. Research and development of cancer chemopreventive agents in China. **J Cell Biochem Suppl**, New York, v. 27, p. 7-11, 1997.

RWOMUSHANA, J. W.; POLLIACK, A.; LEVIJ, I. S. Cervical limph node metastasis of hamster cheek pouch carcinoma induced with DMBA. **J Dent Res**, Chicago, v. 49, n. 1, p. 184, Jan./Feb. 1970.

SALLES, C. L. F **Avaliação do potencial carcinogênico do formocresol diluído a 1/5 e do glutaraldeido a 2% no modelo experimental DMBA induzido**. 1993. 108p. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru, 1993.

SALLEY, J. J. Experimental carcinogenesis in the cheek pouch of the syrian hamster. **J Dent Res**. Chicago, v. 33, n. 2, p. 253-62, Apr. 1954.

SAMPAIO, F. C. Fitoterapia em odontologia. In: _____. **Das plantas medicinais aos fitoterápicos**: abordagem científica. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, 1997. 65 p.

SAMY, R. P.; GOPALAKRISSHNAKONE, P.; IGNACIMUTHU, S. Anti-tumor promoting potential of luteolin against 7, 12-dimetlhylbenz(a) antracene-induced mammary tumors in rats. **Chem Biol Interact**, Amsterdam, v. 164, n. 1/2, p. 1-14, Dec. 2006.

SANTOS, B. F. Criação e manejo de Hamsters. In: ANDRADE, A.; PINTO S. C.; OLIVEIRA R. S. de. **Animais de laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz Editora, 2002. cap. 16, p. 123-126, 2002.

SANTOSH, K.; NIHAL, A.; HASAN, M. Green tea and skin. **Arch Dermatol**, Chicago, v. 136, n. 8, p. 989-994, Aug. 2000.

SAROJA, M. et al. Coffee enhances the development of 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene (DMBA)-induced hamster buccal pouch carcinomas. **Oral Oncol**, Oxford, v. 37, n. 2, p. 172-176, Feb. 2001.

SCHWARTZ, J. et al. Inhibition of experimental tobacco, carcinogen induced head and neck carcinogenesis. **Oral Oncol**, Oxford, v. 40, n. 6, p. 611-623, July 2004.

SECCO, R. S. Produtos naturais: alternativa segura? **Cienc Cult,** São Paulo, v. 42, n. 10, p. 807-810, 1990.

SHABANY, K. et al. Rapid *in vivo* assay for topical oral cancer chemopreventive agents. **Int J Oncol**, Athens, v. 21, n. 1, p. 159-164, July 2002.

SHKLAR, G. Development of experimental oral carcinogenesis and its impact on current oral cancer research. **J Dent Res**, Chicago, v. 78, n. 12, p. 1768-1772, Dec. 1999.

SHKLAR, G. et al. Retinoid inhibition of lingual carcinogenesis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v. 49, n. 4, p. 325-332, Apr. 1980.

SLAGA, T. J.; GIMENEZ-CONTI, I. B. An animal model for oral cancer. **J Natl Cancer Inst Monogr**, Bethesda, v. 13, p. 55-60, 1992

STEIDLER, N. E.; READE, P. C. Initiation and promotion of experimental oral mucosal carcinogenesis in mice. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 15, n. 1, p. 43-47, Jan. 1986.

SUBAPRIYA, R. et al. Ethanolic leaf extract of neem (*Azadirachta indica*) inhibits pouch carcinogenesis in hamsters. **Cell Biochem Funct**, Chichester, v. 23, n. 4, p. 229-238, July/Aug. 2005.

SUGIMOTO, L. Óleo de Copaíba é testado em nove tipos de câncer**. Jornal da Unicamp**, Campinas, 19-25 maio 2003. Disponível em: <http://www.unicamp.br/unicamp_hoje/ju/maio2003>. Acesso em: 17 Out. 2004.

SUZUKI, R. An animal model for the rapid induction of tongue neoplasms in human c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats by 4-nitroquinoline 1-oxide: its potential use for preclinical chemoprevention studies. **Carcinogenesis**, New York, v. 27, n. 3, p. 619-630, Mar. 2006.

TANAKA, T. et al. Chemoprevention of 4-nitroquinoline 1-oxide-induced oral carcinogenesis by dietary curcumin and hesperidin: comparison with the protective effect of beta-carotene. **Cancer Res**, Baltimore, v. 54, n. 17, p. 4653-4659, Sept. 1994.

THOMAS, M. A. et al. Syrian hamster as a permissive immunocompet ent animal model for the study of oncolytic adenovirus vectors. **Cancer Res**, Baltimore, v. 66, n. 3, p. 1270-1276, Feb. 2006.

THOMAS, M. A.; SPENCER, J. F.; WORLD, W. S. Use of the Syrian hamster as an animal model for oncolytic adenovirus vectors. **Methods Mol Med**, Totowa, v. 130, p. 169-183, 2007.

TOTSUKA, Y.; AMEMIYA, A; TOMITA, K. Histopathologic study of bone invasion by DMBA-induced carcinoma of the mouth in the hamster. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis, v. 62, n. 2, p. 683-692, Dec. 1986.

TREASE, G. E. **Drugs of biological origin**. 2. ed. Rio de Janeiro: Bailiere Tindall, 1983. 480 p.

VEIGA JR., V. F. et al. The inhibition of paw oedema formation caused by the oil of copaifera multijuga Hayne and its fractions. **J Pharm Pharmacol**, London, v. 58, n. 10, p. 1405-1410, Oct. 2006.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera L.* **Quim Nova**, São Paulo, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.

VEIGA JR., V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEIRA, L. S. **Fitoterapia da Amazônia**: manual de plantas medicinais. 2. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 1992. 347 p.

WADA, S. et al. Antitumor effect of new local hyperthermia using dextran magnetite complex in hamster tongue carcinoma. **Oral Dis**, Copenhagen, v. 9, n. 4, p. 218-223, July 2003.

WHITE, F. H.; GOHARI, K. A. J. A quantitative ultrastructural study of alterations in the area of the basal cell-stromal interface during experimental oral carcinogenesis. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen v. 14, n. 3, p. 227-235, Mar. 1985.

WHITE, F. H.; GOHARI, K. Alterations in the volume of the intercellular space between epithelial cells of the hamster cheek-pouch: quantitative studies of normal and carcinogen-treated tissues. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen v. 13, n. 3, p. 244-254, June 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition of Leukoplakia and related lesion: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, Saint Louis v. 46, n. 4, p. 518-539, Oct. 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the assessment of herbal medicines**. Geneva, 1991. 86 p.

XAVIER, M. N. **Fitoterapia no combate às afecções bucais**. João Pessoa: Idéia Editora, 1995. 108 p.

Anexos

Anexo 1

Análise físico-química do óleo resina de Copaíba

- **Espécie:** *Copaifera reticulata*
- **Origem:** Transamazônica, entre as cidades de Santarém e Itaituba no estado do Pará.
- **Comercialização:** Empresa Brasmazon comercio e exportação Ltda.
- **Data da produção:** 15/01/2004
- **Data da envase:** 20/01/2004
- **Validade:** Dois anos
- **Aparência:** Líquido transparente de baixa viscosidade.
- **Coloração:** Verde claro. Exposto ao ar escurece e ao ser espalhado em uma superfície seca, produz uma película dura, resinosa.
- **Odor:** Característico da Copaíba, lembrando odor de madeira
- **Solubilidade:** Insolúvel em água. Solúvel em solventes orgânicos, álcool absoluto, parcialmente em álcool 95%
- **Densidade:** 0,930 +- 0,020
- **Índice de acidez:** 12,4%
- **Índice de refração:** 1,500 +- 0,020

Anexo 2

Parecer da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 28/2004

Bauru, 04 de abril de 2005.

Senhor Professor,

Informamos que após nova análise do projeto de pesquisa **"Avaliação do efeito inibitório tumoral da solução de óleo de copaíba no modelo de carcinogênese experimental DMBA induzida",** de autoria do CD. Erick Nelo Pedreira, desenvolvido sob sua orientação, esta Comissão considerou o projeto **APROVADO**, "*ad referendum*" na data de 30 de março de 2005.

Sendo o que nos apresenta para o momento, despedimo-nos

Atenciosamente,

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf
Presidente da Comissão de Ética no
Ensino e Pesquisa em Animais

Ilmº Sr. **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**
DD. Docente do Departamento de Estomatologia

Anexo 3

Resultado dos exames coproparasitológicos nos animais experimentais

CENTRO VETERINÁRIO DE BAURU

CLÍNICA - CIRURGIA - VACINAÇÕES - INTERNAÇÕES - RAIO-X
LABORATÓRIO CLÍNICO - ODONTOLOGIA - ENDOSCOPIA
PLANTÃO PERMANENTE - AMBULÂNCIA - ATENDIMENTO DOMICILIAR

AV. GETÚLIO VARGAS, 15-28 - CEP 17017-339 - JD. AMÉRICA - BAURU - S.P. - FONE/FAX (14) 3224-3183

EXAMES COPROPARASITOLÓGICOS – HAMSTERS

REQUISITANTE: **ERICK NELO PEDREIRA**

PESQUISA: **AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO TUMORAL DA SOLUÇÃO DE ÓLEO DE COPAÍBA NO MODELO DE CARCINOGÊNESE EXPERIMENTAL DMBA INDUZIDA**

MÉDICAS VETERINÁRIAS: **DENISE MELO MORETTI** E **AMANDA KELLER SIQUEIRA (CENTRO VETERINÁRIO DE BAURU)**

AMOSTRAS: **"POOL" DE FEZES DAS GAIOLAS**
****OBS:** ESTE TIPO DE COLETA NÃO PERMITE A PESQUISA DE *Oxyuris* sp, UMA VEZ QUE O MESMO DEVE SER OBTIDO (QUANDO PRESENTE) COM A UTILIZAÇÃO DO MÉTODO DA "FITA ADESIVA"

MÉTODOS UTILIZADOS: **FLUTUAÇÃO (**SULFATO DE ZINCO 33%**) E SEDIMENTAÇÃO**

RESULTADOS:

1. **MOMENTO ZERO**
- GRUPO I (DMBA) – 2 ANIMAIS MACHOS: **NDN**
- GRUPO II (ÓLEO "IN NATURA") – 2 ANIMAIS MACHOS: **NDN**
- GRUPO III (ÓLEO MANIPULADO) – 2 ANIMAIS MACHOS: **NDN**
- GRUPO IV (DMBA + ÓLEO "IN NATURA") – 2 ANIMAIS MACHOS: **NDN**
- GRUPO V (DMBA + ÓLEO MANIPULADO) – 2 ANIMAIS MACHOS: **NDN**

2. **MOMENTO 7 SEMANAS**
- GRUPO I (DMBA) – 5 ANIMAIS FÊMEAS: **NDN**
- GRUPO II (ÓLEO "IN NATURA") – 5 ANIMAIS MACHOS: **NDN**
- GRUPO III (ÓLEO MANIPULADO) – 5 ANIMAIS FÊMEAS: **NDN**
- GRUPO IV (DMBA + ÓLEO "IN NATURA") – 5 ANIMAIS MACHOS: **NDN**
- GRUPO V (DMBA + ÓLEO MANIPULADO) – 5 ANIMAIS FÊMEAS: **NDN**

3. **MOMENTO 13 SEMANAS**
- GRUPO I (DMBA) – 5 ANIMAIS MACHOS: **NDN**
- GRUPO II (ÓLEO "IN NATURA") – 5 ANIMAIS FÊMEAS: **NDN**
- GRUPO III (ÓLEO MANIPULADO) – 5 ANIMAIS MACHOS: **NDN**
- GRUPO IV (DMBA + ÓLEO "IN NATURA") – 5 ANIMAIS FÊMEAS: **NDN**
- GRUPO V (DMBA + ÓLEO MANIPULADO) – 5 ANIMAIS MACHOS: **NDN**

4. **MOMENTO 20 SEMANAS**
- GRUPO I (DMBA) – 5 ANIMAIS FÊMEAS: **NDN**
- GRUPO II (ÓLEO "IN NATURA") – 5 ANIMAIS MACHOS: **NDN**
- GRUPO III (ÓLEO MANIPULADO) – 5 ANIMAIS FÊMEAS: **NDN**
- GRUPO IV (DMBA + ÓLEO "IN NATURA") – 5 ANIMAIS MACHOS: **NDN**
- GRUPO V (DMBA + ÓLEO MANIPULADO) – 5 ANIMAIS FÊMEAS: **NDN**

Denise P. Melo Moretti
Médica Veterinária
CRMV 8035 - Cel: 9771-3094

Amanda Keller Siqueira
Médica Veterinária
CRMV - SP 14.627

Carlos Eduardo Meirelles *CRMV-SP 7770*

Denise P. Melo Moretti *CRMV-SP 8035*

Maitê Shella Abreu *CRMV-SP 11 174*

Apêndice

Apêndice

Avaliação do efeito inibidor tumoral do óleo resina de Copaíba manipulado e natural no modelo de carcinogênese DMBA induzida

Grupo		Tempo	Gên.	Aspecto Macro	Aspecto Micro	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Dif. Peso	Locali-zação	N° de lesões	Tam. da lesão
DMBA	I	7	M	1,0	2,0	118	126	8	0	0	0
DMBA	I	7	M	1,0	3,0	118	124	6	0	0	0
DMBA	I	7	M	1,0	3,0	128	143	15	0	0	0
DMBA	I	7	M	1,0	1,0	119	128	9	0	0	0
DMBA	I	7	M	2,0	2,4	122	136	14	1	1	1
DMBA	I	13	F	4,0	3,4	135	138	3	3	2	2
DMBA	I	13	F	3,0	3,0	138	134	-4	4	1	1
DMBA	I	13	F	3,0	4,0	118	123	5	3	2	1
DMBA	I	13	F	5,0	5,0	119	116	-3	2	1	2
DMBA	I	13	F	3,0	3,8	123	118	-5	1	2	1
DMBA	I	20	M	6,0	5,0	139	110	-29	4	1	2
DMBA	I	20	M	6,0	5,0	128	73	-55	1	2	3
DMBA	I	20	M	3,0	5,0	115	84	-31	1	2	2
DMBA	I	20	M	4,0	5,0	125	63	-62	1	1	2
ÓLEO NATURAL	II	7	F	1,0	1,0	139	143	4	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	7	F	1,0	2,0	119	126	7	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	7	F	1,0	2,0	145	168	23	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	7	F	1,0	2,4	148	168	20	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	7	F	1,0	2,0	170	176	6	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	13	M	1,0	2,0	112	110	-2	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	13	M	1,0	1,0	115	142	27	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	13	M	1,0	1,0	119	125	6	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	13	M	1,0	2,0	105	114	9	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	13	M	1,0	1,0	118	133	15	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	20	F	1,0	2,4	131	140	9	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	20	F	1,0	2,0	128	142	14	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	20	F	1,0	2,0	147	159	12	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	20	F	1,0	2,0	121	153	32	0	0	0
ÓLEO NATURAL	II	20	F	1,0	2,0	121	165	44	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	7	M	1,0	2,0	129	159	30	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	7	M	1,0	1,0	134	158	24	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	7	M	1,0	2,4	138	156	18	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	7	M	1,0	1,0	115	186	71	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	13	F	1,0	2,8	143	184	41	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	13	F	1,0	1,0	121	167	46	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	13	F	1,0	1,0	137	166	29	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	13	F	1,0	2,0	138	162	24	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	13	F	1,0	2,0	142	162	20	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	20	M	1,0	2,0	131	151	20	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	20	M	1,0	1,0	132	165	33	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	20	M	1,0	2,0	138	164	26	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	20	M	1,0	2,0	132	198	66	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	20	M	1,0	2,0	154	195	41	0	0	0
ÓLEO MANIPULADO	III	20	M	1,0	1,0	128	146	18	0	0	0
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	7	F	1,0	3,0	145	150	5	0	0	0
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	7	F	1,0	2,0	130	151	21	0	0	0
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	7	F	1,0	2,0	137	161	24	0	0	0
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	7	F	1,0	3,0	128	142	14	0	0	0
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	13	M	2,0	5,0	117	132	15	4	2	1
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	13	M	3,0	3,4	142	173	31	4	1	1
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	13	M	1,0	5,0	132	152	20	0	0	0

DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	13	M	3,0	3,0	133	164	31	5	1	2
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	13	M	1,0	2,4	130	156	26	0	0	0
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	20	M	3,0	5,0	126	139	13	1	2	1
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	20	M	6,0	4,0	121	155	34	1	2	3
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	20	M	3,0	4,0	98	134	36	1	2	1
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	20	M	6,0	5,0	123	143	20	6	2	1
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	20	M	6,0	3,8	116	136	20	1	2	2
DMBA + ÓLEO NATURAL	IV	20	F	1,0	3,4	121	195	74	0	0	0
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	7	M	1,0	3,0	117	132	15	0	0	0
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	7	M	1,0	1,0	105	128	23	0	0	0
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	7	M	1,0	3,0	124	159	35	0	0	0
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	7	M	2,0	2,0	142	152	10	5	2	1
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	7	M	1,0	2,0	128	140	12	0	0	0
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	13	M	3,0	3,0	120	136	16	5	1	1
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	13	M	3,0	5,0	121	138	17	4	2	1
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	13	M	2,0	5,0	117	144	27	4	2	1
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	13	M	1,0	3,0	123	139	16	0	0	0
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	13	M	2,0	3,8	117	136	19	5	1	1
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	20	M	1,0	3,0	120	117	-3	0	0	0
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	20	M	6,0	3,8	140	155	15	1	2	2
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	20	M	6,0	5,0	131	127	-4	4	2	3
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	20	M	3,0	4,0	132	149	17	1	2	2
DMBA + ÓLEO MANIPULADO	V	20	F	5,0	3,4	137	110	-27	4	2	2

LEGENDAS

Total animais experimento = 80 animais
Animal experimental = Hamster (mesocricetus auratus)
50 machos ♂
30 fêmeas ♀
Ao final do experimento = 74 animais (48 machos e 26 fêmeas)

Grupo I - DMBA (14 animais)
7 semanas (5 animais ♂)
13 semanas (5 animais ♀)
20 semanas (4 animais ♂)

Grupo II - Óleo de Copaíba Natural (15 animais)
7 semanas (5 animais ♀)
13 semanas (5 animais ♂)
20 semanas (5 animais ♀)

Grupo III - Óleo de Copaíba Manipulado (15 animais)
7 semanas (4 animais ♂)
13 semanas (5 animais ♀)
20 semanas (6 animais ♂)

Grupo IV - DMBA + Óleo de Copaíba Natural (15 animais)
7 semanas (4 animais ♀)
13 semanas (5 animais ♂)
20 semanas (6 animais ♂ e ♀)

Grupo V - DMBA + Óleo de Copaíba Manipulado (15 animais)
7 semanas (5 animais ♂)
13 semanas (5 animais ♂)

20 semanas (5 animais ♂ e ♀)

Tempo de Sacrifício (Morte)
7 semanas
13 semanas
20 semanas

Aspecto Macroscópico (clínico)
1,0 Normal
2,0 Pápula
3,0 Papiloma
4,0 Úlcera rasa
5,0 Nódulo sem ulceração
6,0 Nódulo ulcerado

Aspecto Microscópico (Histopatológico)
1,0 Mucosa bucal normal
2,0 Hiperploria e Hiperqueratose discreta sem displasia
2,4 Hiperploria e Hiperqueratose moderada sem displasia
2,8 Hiperploria e Hiperqueratose interna sem displasia
3,0 Hiperploria e Hiperqueratose com displasia discreta
3,4 Hiperploria e Hiperqueratose com displasia moderada
3,8 Hiperploria e Hiperqueratose com displasia intensa
4,0 Carcinoma microinvasivo
5,0 Carcinoma invasivo sem metástase
6,0 Carcinoma invasivo com metástase

Variação do Peso
PF - PI (Peso Final - Peso Inicial)

Localização Anatômica das lesões na cavidade bucal dos Hamsters
0 - Ausência de lesão
1 - Borda lateral da língua
2 - Dorso lingual
3 - Ventre lingual
4 - Mucosa jugal
5 - Comissura labial
6 - Soalho da boca
7 - Outras localizações

Número (Quantidade) de lesões na mucosa bucal Hamsters
0 - Ausência de lesões
1 - Lesão única
2 - Múltiplas lesões

Tamanho da lesão (medida baseada no diâmetro)
0 - Ausência da lesão
1 - entre 1 e 5 mm
2 - entre 5 e 10 mm
3 - maior que 10 mm