

**Uso da mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina como meio de conservação em reimplante dentário**

**Use of  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin mixture as a storage medium in dental replantation**

**Uso de la mezcla de  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina como medio de conservación en reimplantación dental**

Recebido: 02/09/2020 | Revisado: 08/09/2020 | Aceito: 12/09/2020 | Publicado: 14/09/2020

**Luiza Monzoli Côvre**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6983-9910>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: lumcovre@gmail.com

**Caio Vinicius Lourenço Debortoli**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2160-7242>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: caiodebortoli@hotmail.com

**Marina Fuzette Amaral**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3305-3080>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: marina\_fuzette.amaral@hotmail.com

**Adonias Almeida Carvalho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0142-0798>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

Instituto Federal do Piauí, Brasil

E-mail: adoniasac@hotmail.com

**Jurema Santana de Freitas**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1286-3423>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: jurema.santana.freitas@gmail.com

**Gerardo Magela Vieira Júnior**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8113-8957>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: magela@ufpi.edu.br

**Mariana Helena Chaves**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1541-6757>

Universidade Federal do Piauí, Brasil

E-mail: [mariana@ufpi.edu.br](mailto:mariana@ufpi.edu.br)

**Cláudio Aparecido Casatti**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5650-7343>

Universidade Estadual Paulista, Brasil

E-mail: [claudio.casatti@unesp.br](mailto:claudio.casatti@unesp.br)

**Daniela Atili Brandini**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3444-8519>

Universidade Estadual Paulista, Brasil.

E-mail: [daniela.brandini@unesp.br](mailto:daniela.brandini@unesp.br)

**Resumo**

O objetivo do estudo foi avaliar o processo de reparo periodontal de dentes de ratos reimplantados conservados em solução de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina a 10%. Foram utilizados incisivos superiores direitos de 36 ratos divididos em 3 grupos, os dentes foram extraídos e deixados em meio seco e no respectivo meio de conservação por 20 minutos e reimplantados. A divisão dos grupos foi de acordo com o meio de conservação utilizado: SO – soro fisiológico 0,9%; AMSC - solução de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina a 10%, sem tratamento endodôntico; e AMCC - solução de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina a 10%, com tratamento endodôntico. Após 60 dias foi realizada eutanásia por perfusão transcardíaca. Os cortes obtidos foram corados em Hematoxilina e Eosina e Picrosirius Red. Foi avaliada matriz extracelular e vasos sanguíneos, perfil nuclear, fibras colágenas, organização do ligamento periodontal, extensão e intensidade do processo inflamatório, reabsorção dentária e anquilose. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparação entre grupos. Dentre as diferenças significativas, o terço apical da raiz no grupo AMCC obteve maior área de vasos sanguíneos em comparação a SO, menor área de fibras colágenas de birrefringência vermelha e maior de fibras verdes, ao contrário, AMSC apresentou maior área de fibras de birrefringência vermelha e menor de fibras verdes. As outras variáveis não apresentaram diferença entre os grupos. Conclui-se que a mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina em ambiente pré-clínico mostrou possuir potencial para utilização como meio de conservação em avulsão dentária.

**Palavras-chave:** Avulsão dentária; Burseraceae; Reimplante dentário; Traumatismos dentários.

### **Abstract**

The aim of the study was to evaluate the periodontal repair process of reimplanted rats teeth preserved in 10%  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin solution. Maxillary right incisors of 36 rats were used, divided into 3 groups, the teeth were extracted and left in a dry medium and in the respective storage medium for 20 minutes and reimplanted. The groups were divided according to the conservation method used: SO - saline; AMSC - 10%  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin solution, without endodontic treatment; AMCC - 10% solution of  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin, with endodontic treatment. After 60 days, euthanasia was performed by transcatheter perfusion. The cuts obtained were stained in Hematoxylin and Eosin and Picrosirius Red. Extracellular matrix and blood vessels, nuclear profile, collagen fibers, organization of the periodontal ligament, extent and intensity of the inflammatory process, tooth resorption and ankylosis were evaluated. The Kruskal-Wallis test was used for comparison between groups. Among the significant differences, the apical third of the root in the AMCC group obtained a greater area of blood vessels compared to SO, a smaller area of collagen fibers of red birefringence and a greater area of green fibers, in contrast, AMSC presented a greater area of red birefringence fibers and smaller of green fibers. The other variables showed no difference between the groups. It is concluded that the mixture of  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin in pre-clinical environment shown to have potential for use as a means of preservation in tooth avulsion.

**Keywords:** Tooth avulsion; Burseraceae; Tooth replantation; Tooth injuries.

### **Resumen**

El objetivo del estudio fue evaluar el proceso de reparación periodontal de dientes de rata reimplantados conservados en  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina. Se utilizaron incisivos superiores derechos de 36 ratas, divididos en 3 grupos, se extrajeron los dientes y se dejaron en un medio seco y en el medio de conservación respectivo durante 20 minutos y reimplantaron. Los grupos se dividieron según el método de conservación utilizado: SO - salina; AMSC - solución de  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina 10%, sin tratamiento endodóntico; y AMCC - solución de  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina 10%, con tratamiento endodóntico. A los 60 días se realizó la eutanasia mediante perfusión transcárdica. Los cortes obtenidos fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina y Picrosirius Red. Se evaluaron matriz extracelular, vasos sanguíneos, perfil nuclear, fibras de colágeno, organización del ligamento periodontal, extensión e intensidad del proceso inflamatorio,

reabsorción dentaria y anquilosis. Se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para la comparación. Entre las diferencias significativas, el tercio apical de la raíz en el grupo AMCC obtuvo mayor área de vasos sanguíneos en comparación con SO, menor área de fibras de colágeno de birrefringencia roja y mayor área de fibras verdes, en contraste, AMSC presentó mayor área de fibras de birrefringencia rojas y más pequeñas de fibras verdes. Las otras variables no mostraron diferencias entre los grupos. Se concluye que la mezcla de  $\alpha$  y  $\beta$ -amirina en un entorno preclínico ha mostrado potencial para su uso como medio de conservación en la avulsión dental.

**Palabras clave:** Avulsión de diente; Burseraceae; Reimplante dental; Traumatismos de los dientes.

## 1. Introdução

O trauma dentário pode ser definido como uma lesão proveniente de um impacto externo sobre os dentes e/ou outros tecidos duros e moles no interior e ao redor da cavidade oral. É geralmente repentino, inesperado e acidental, requerendo em alguns casos atendimento de emergência (Lam, et al., 2016; Ugolini, et al., 2018). A maior prevalência de trauma dentário na população mundial envolve crianças e adolescentes, no entanto, todos os indivíduos estão susceptíveis, devido a suas atividades comuns diárias, e o aumento dos níveis de violência e do número de acidentes de trânsito, sendo assim, um problema de saúde pública emergente (Lam, et al., 2016; Traebert, et al., 2012).

A avulsão é considerada o tipo mais grave de trauma dentário, ocorre quando há o completo deslocamento do dente para fora de seu alvéolo, caracterizado pelo rompimento do feixe vaso-nervoso e das fibras do ligamento periodontal (Longo, et al., 2018; Dos Santos, et al., 2009).

O reimplante é o tratamento mais preconizado para o dente avulsionado, mesmo que as condições não sejam favoráveis (Dos Santos, et al., 2009), no entanto, o prognóstico de dentes reimplantados é sempre duvidoso. A polpa e o ligamento periodontal sofrem grandes danos quando o tempo extra-alveolar é muito grande, assim como com o modo de manuseio do dente, grau de formação radicular e o emprego ou não de um meio de conservação adequado (Andreasen & Andreasen, 2001). Desse modo, o reimplante imediato é a melhor alternativa, já que há uma relação proporcional entre o tempo que o dente permanece fora do alvéolo e os danos às células do ligamento periodontal, de modo que quanto maior esse tempo, mais sombrio será o prognóstico. Sendo assim, uma vez realizado o reimplante de

forma imediata é possível manter a viabilidade celular permitindo uma maior probabilidade de reinserção das fibras e preservação do dente (Andreasen, et al., 1995; Prueksakorn, et al., 2016; Consolaro, 2013; Melo, et al., 2016). No entanto, o reimplante tardio ocorre com maior frequência, nesses casos o emprego de um meio de conservação adequado é de extrema importância para preservação da viabilidade celular. Várias substâncias têm sido estudadas, como a solução de balanceada de Hanks, saliva, soro fisiológico, leite, clara de ovo, própolis, entre outras (Longo, et al., 2018).

Atualmente, o mercado farmacêutico tem demonstrado grande interesse para pesquisas referentes ao emprego de plantas medicinais, sobretudo a aquelas utilizadas pela população, dando lugar ao desenvolvimento de novas drogas. O Brasil é um país com grande diversidade vegetal, possuindo um enorme potencial para o desenvolvimento de medicamentos que aliem o conhecimento tradicional vinculado às plantas fitoterápicas e a tecnologia, possibilitando ampliar os benefícios gerados com essa substância (Brasil, Ministério da saúde, 2015).

A resina obtida da árvore *Protium heptaphyllum* é bastante utilizada na medicina popular e vêm sendo estudada nas áreas de farmacologia, medicina e odontologia, devido a suas propriedades anti-inflamatória, analgésica, antiplaquetária, antinoceptiva, efeitos hipoglicemiantes e hipolipemiantes, atividade anticonvulsivante, efeitos ansiolíticos e antidepressivos (de Almeida, et al., 2015; Aragão, et al., 2006; Aragão, et al., 2007; Aragão, et al., 2008; Aragão, et al., 2015; Díaz-Ruiz, et al., 2012; Melo, et al., 2011; Okoye, et al., 2014; Pinto, et al., 2014; Pinto, et al., 2008; Santos, et al., 2012; Soldi, et al., 2008).

A árvore *Protium heptaphyllum*, pertence à família Burseraceae, conhecida popularmente por “almecega” e “breu-branco”, é encontrada na América do Sul, na região Amazônica, Piauí, Bahia, Minas Gerais, Goiás, e em países como Suriname, Colômbia, Venezuela e Paraguai. A obtenção da substância é realizada a partir de incisões no tronco da árvore, em que se obtém um óleo-resina aromático, que em contato com o ar se solidifica. É importante ressaltar que o processo de obtenção da resina não causa nenhum dano à árvore (Júnior, et al., 2005). Essa resina exsudada é rica em uma mistura de triterpenos, identificados como  $\alpha$ -amirina,  $\beta$ -amirina, breína, maniladiol,  $\alpha$ -amirona,  $\beta$ -amirona e lupenona, além de óleo essencial rico em mono e sesquiterpenos (Júnior, et al., 2005; Lima, et al., 2014).

Os triterpenos tem chamado atenção nos últimos anos devido as suas atividades terapêuticas. Na resina extraída da *P. heptaphyllum* a maior concentração de triterpenos está na forma de  $\alpha$ -amirina e  $\beta$ -amirina, triterpenos pentacíclicos considerados o seu principal componente e principal responsável pelas propriedades terapêuticas citadas acima, principalmente a anti-inflamatória (de Almeida, et al., 2015).

No replante, controlar a inflamação durante o reparo periodontal é de extrema importância, uma vez que a persistência da inflamação aguda ou crônica durante um grande período estabelece um ambiente que estimula e favorece a ocorrência da reabsorção radicular (Consolaro, 2013; Melo, et al., 2016).

Diante do exposto, o objetivo desse estudo é testar a resina de *P. heptaphyllum* e seus componentes, avaliando o processo de reparo periodontal de dentes de ratos replantados conservados em solução de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina a 10%.

## **2. Metodologia**

O presente estudo foi iniciado somente após aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação animal da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP, sob número de processo 00467-2018.

### ***Obtenção da mistura $\alpha$ e $\beta$ -amirina extraída resina de *P. heptaphyllum* para uso tópico***

Um total de 10g da mistura da  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina na forma de pó foi obtida através de uma parceria com o Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, Teresina/PI, que forneceu o material para estudo. A obtenção da mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina extraídas da resina de *P. heptaphyllum* foi realizada como descrito anteriormente por Júnior (2005). Para aplicação como meio de conservação, a mistura foi diluída em solução de Tween 80, chegando a uma solução com concentração de 10% da mistura  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (Aphoticário Farmácia de manipulação, Araçatuba, São Paulo, Brasil).

### ***Animais envolvidos e procedimentos realizados***

Para definição da amostra, foi realizado o cálculo amostral, em que para um poder da amostra de 80%, adotando nível de significância de 5%, com a diferença da média de 0,854 e desvio padrão de 0,563, ficou estabelecido um número de 11 animais por grupo. Adotamos 12 animais por grupo, para obter uma margem para possíveis intercorrências durante o estudo.

Foram utilizados 36 ratos Wistar machos, com peso corporal variando entre 200-300g. Os animais foram obtidos junto ao biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba – UNESP. Os ratos foram acomodados em gaiolas com cinco animais cada, a uma temperatura

ambiente de  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ,  $50 \pm 10\%$  de umidade relativa do ar e ciclos de claro/escuro de 12/12 horas. Receberam água *ad libitum* e ração granulada durante todo o experimento.

Para execução dos procedimentos experimentais os animais receberam como relaxante muscular a xilazina (10mg/kg, Coopazine; Coopers, São Paulo, Brasil) e para a anestesia o cloridrato de quetamina (80 mg/kg, Vetanarcol; Laboratórios König, Buenos Aires, Argentina), ambas as drogas administradas por via intramuscular (I.M.). Posteriormente, foi realizada a antissepsia da porção anterior da maxila, com polivinilpirrolidona-iodo (Riodeine – Ind Farmac. Rioquímica Ltda), sindesmotomia, luxação e extração do incisivo superior direito (ICSD) com auxílio de instrumental especialmente adaptado. Os dentes extraídos tiveram a papila dentária e o órgão do esmalte seccionados com lâmina de bisturi nº15 (EMBRAMAC Exp. E Imp). Os dentes extraídos, foram armazenados em meio seco por um período de 20 minutos à temperatura ambiente e após permaneceram por mais 20 minutos imersos em um meio de conservação, de acordo com a divisão dos grupos experimentais.

Após armazenamento, os dentes extraídos do grupo AMCC tiveram a polpa removida por via retrógrada e o canal instrumentado, empregando-se lima tipo Kerr nº 25 ligeiramente curva (Kerr 25 mm, Maillefer - Dentsply). Os canais foram irrigados com soro fisiológico (Arboreto, Minas Gerais, Brasil) e secos com cones de papel absorvente (Dentsply). Depois, os canais foram preenchidos com pasta de hidróxido de cálcio (Ultracal XS Kit - Ultradent) e realizado plug de MTA (Cimento reparados MTA - Angelus) nos 3mm finais do canal radicular.

Os dentes de todos os grupos foram reimplantados em seus respectivos alvéolos, com preparo prévio do mesmo, por meio de curetagem com auxílio de cureta cirúrgica e irrigados com soro fisiológico. Nenhuma contenção foi realizada.

Grupos Experimentais:

Os 36 animais, foram divididos em grupos de acordo com o meio de conservação utilizado, com 60 dias de observação cada:

- Grupo SO: Dentes foram extraídos e armazenados em meio seco durante 20 minutos e depois imersos em 2mL de soro fisiológico 0,9% (Arboreto, Minas Gerais, Brasil) por 20 minutos e reimplantados, sem tratamento dos canais.
- Grupo AMSC: Dentes foram extraídos e armazenados em meio seco durante 20 minutos e depois imersos em 2mL da mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina a 10% (Aphoticário Farmácia de manipulação, Araçatuba, São Paulo - Brasil), por 20 minutos e reimplantados, sem tratamento dos canais.

- Grupo AMCC: Dentes foram extraídos e armazenados em meio seco durante 20 minutos e depois imersos em 2mL da mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina a 10% (Aphoticário Farmácia de manipulação, Araçatuba, São Paulo - Brasil), por 20 minutos e reimplantados, com tratamento dos canais (Hidróxido de cálcio).

Após o reimplante, todos os animais receberam uma única dose intramuscular de 20.000 UI de penicilina G benzatina (Fontoura Wyeth S.A., São Paulo - Brasil).

### ***Eutanásia e processamento histológico***

A eutanásia ocorreu por meio de perfusão transcardíaca, 60 dias após o reimplante. A maxila direita foi separada da esquerda na linha mediana com o emprego de uma lâmina de bisturi n° 15 (Embramac Exp. E Imp.). Um corte com tesoura reta na porção distal do 3° molar possibilitou a obtenção da área da maxila contendo o dente reimplantado. As maxilas foram imediatamente dissecadas e colocadas em solução fixadora por 24 horas. A descalcificação das maxilas foi realizada por meio EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) a 10% (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, EUA) em PBS.

Após descalcificação, as peças passaram por desidratação em soluções de alcoóis, diafanizadas em soluções de xilol, e seguidamente impregnadas em parafina de baixa fusão (56-58 °C) com três trocas de parafina, de uma hora cada. Os cortes longitudinais de 4 $\mu$ m de espessura no sentido longitudinal foram colocados em banho-maria (40-50°C) e recolhidos em lâminas silanizadas ou revestidas de poli-L-lisina, sendo três cortes por lâmina com diferença de 40 $\mu$ m entre eles. Os cortes histológicos foram utilizados para a coloração no método de Hematoxilina-eosina (HE) e Picrocirius Red.

### ***Análise Histomorfométrica***

A análise histológica foi realizada em um microscópio óptico comum (Leica – Aristoplan, Alemanha) com uma câmera digital acoplada AxioCam MRc (AxioCam Mrc— Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha), para as imagens em HE. As imagens referentes ao Picrosirius Red foram obtidas em microscópio de luz polarizada (DM4000B; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os campos visuais das regiões analisadas de cada corte em 400x foram coletados com o software Axiovision Rel 4.0 (Carl Zeiss, GmbH, Alemanha). Foram considerados o terço médio e apical da raiz, na face palatina.

Os cortes corados com H.E. foram utilizados na avaliação das áreas de vasos sanguíneos, matriz extracelular, perfil nuclear, reabsorção radicular, espessura, organização e

inflamação do ligamento periodontal (LP) e anquilose. Já os cortes submetidos ao método Picrosirius Red foram utilizados para a análise do percentual de fibras colágenas de birrefringência verde e vermelha.

### ***Análise histológica qualitativa e quantitativa***

Na análise quantitativa foi considerada a porcentagem relativa da área ocupada por fibras colágenas, vasos sanguíneos, matriz extracelular, largura do ligamento periodontal e número de perfis nucleares. A quantificação da organização do ligamento periodontal, processo inflamatório, reabsorção radicular e anquilose foram feitas por meio de escores. O examinador não soube a que grupo que pertence às imagens, a fim de evitar um viés na análise.

### ***Análise quantitativa da porcentagem de área de fibras colágenas, vasos sanguíneos, matriz extracelular***

Para a análise quantitativa da área de vasos sanguíneos, fibras colágenas e matriz extracelular, as imagens foram processadas no programa de análise de imagens ImageJ (National Institutes of Health, EUA). Foram avaliadas em um aumento de 400x, na região do terço médio e apical da raiz, pela face palatina, pois somente nessa face o incisivo do rato possui ligamento periodontal.

Os tipos de fibras colágenas foram quantificados pelo programa QWin (Leica QWin V3; Leica Microsystems), selecionando quanto a coloração, entre as fibras de birrefringência vermelha e de birrefringência verde.

### ***Análise quantitativa do número de perfis nucleares do ligamento periodontal***

Para a contagem das células foi utilizada uma ferramenta do Programa ImageJ chamada de “Mult Point”, que impossibilita que uma mesma célula seja contada novamente.

### ***Análise quantitativa da largura do LP***

A espessura do ligamento periodontal foi obtida por meio das médias das regiões de escolha do ICSD com o auxílio do programa ImageJ.

***Análise quantitativa da organização e inflamação do ligamento periodontal, reabsorção radicular e anquilose dentária da raiz do ICS***

Para a quantificação das ocorrências histomorfológicas serão atribuídos escores de 1 a 4, listados na Tabela 1, onde 1 corresponde ao melhor resultado e 4 ao pior, ocupando os escores 2 e 3 posições intermediárias (Panzarini, et al., 2007).

**Tabela 1.** Distribuição dos escores variando de 1 a 4, atribuídos aos parâmetros histológicos avaliados.

<b>Evento histológico</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
Ligamento periodontal - Organização	Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em toda a extensão	Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em 2/3 da extensão	Fibras periodontais inseridas no osso e cimento em 1/3 da extensão	Ausência de fibras com inserção em osso e cimento
Ligamento periodontal - Intensidade do infiltrado inflamatório	Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias	Pequeno número de células inflamatórias (Até 10 células/ 400X)	Moderado número de células inflamatórias (11 a 50 células/ 400X)	Grande número de células inflamatórias (>50 células/ 400X)
Ligamento periodontal - Extensão do infiltrado inflamatório	Ausência ou presença ocasional de células inflamatórias	Processo inflamatório presente apenas no ligamento periodontal apical ou coronário ou pequena área lateral	Processo inflamatório atingindo mais que 1/2 do ligamento periodontal lateral da raiz do dente	Processo inflamatório em todo ligamento periodontal
Raiz do dente - Reabsorção ativa e inativa	Ausência de reabsorção radicular e ou reabsorções reparadas	Áreas de reabsorção inativa (ausência de células clásticas)	Pequenas áreas de reabsorções ativas	Extensas áreas de reabsorção ativa

Raiz do dente - Extensão da reabsorção	Ausência de reabsorção	Extensão média de 1 a 1000 micrometros	Extensão média de 1001 a 5000 micrometros	Extensão média maior que 5001 micrometros
Raiz do dente - Profundidade de reabsorção	Ausência de reabsorção	Profundidade média de 1 a 100 micrometros	Profundidade média de 101 a 200 micrometros	Profundidade média maior que 201 micrometros
Raiz do dente - Reparo	Ausência de reabsorção ou deposição cimento neoformado em toda extensão	Deposição cimento neoformado em 1/2 ou mais da extensão das áreas reabsorvidas	Deposição cimento neoformado em menos da 1/2 das áreas reabsorvidas	Ausência de deposição de cimento neoformado nas áreas reabsorvidas
Tecido ósseo - Anquilose	Ausência de anquilose	Pequenos pontos de anquilose	1/3 da raiz está anquilosada	Mais de 1/3 da raiz está anquilosada

Fonte: Elaborado pelos autores.

### *Análise estatística*

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico Graph Pad Prisma 7.0 ( $\alpha=0,05$ ). Após aplicação do teste de normalidade da amostra, o teste Kruskal-Wallis, com post-hoc de Bonferroni foi utilizado para a comparação entre os grupos.

### **3. Resultados e Discussão**

No grupo SO, foram perdidos quatro animais, em dois houve fratura da raiz do ICSD no momento da exodontia durante a cirurgia experimental e nos outros dois, houve falha no corte histológico, durante a microtomia, diminuindo a amostra para 8 espécimes. Já no grupo AMCC, três animais foram perdidos, dois deles morreram durante o procedimento cirúrgico e um animal apresentou expansão alveolar, durante a exodontia do ICSD, impedindo o seu correto reimplante, ficando o grupo com 9 espécimes. No grupo AMSC, não foi perdido nenhum animal, permanecendo o grupo com 12 amostras.

A Tabela 2 apresenta os dados dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal do ICSD, analisados através da coloração pela técnica H.E. Já a Tabela 3, também apresenta os dados dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal do ICSD, porém analisados através coloração pela técnica do Picrosirius Red. As Tabelas 4 e 5 mostram, respectivamente, os dados semi-quantitativos das alterações histomorfométricas no ligamento periodontal, raiz dentária e osso alveolar.

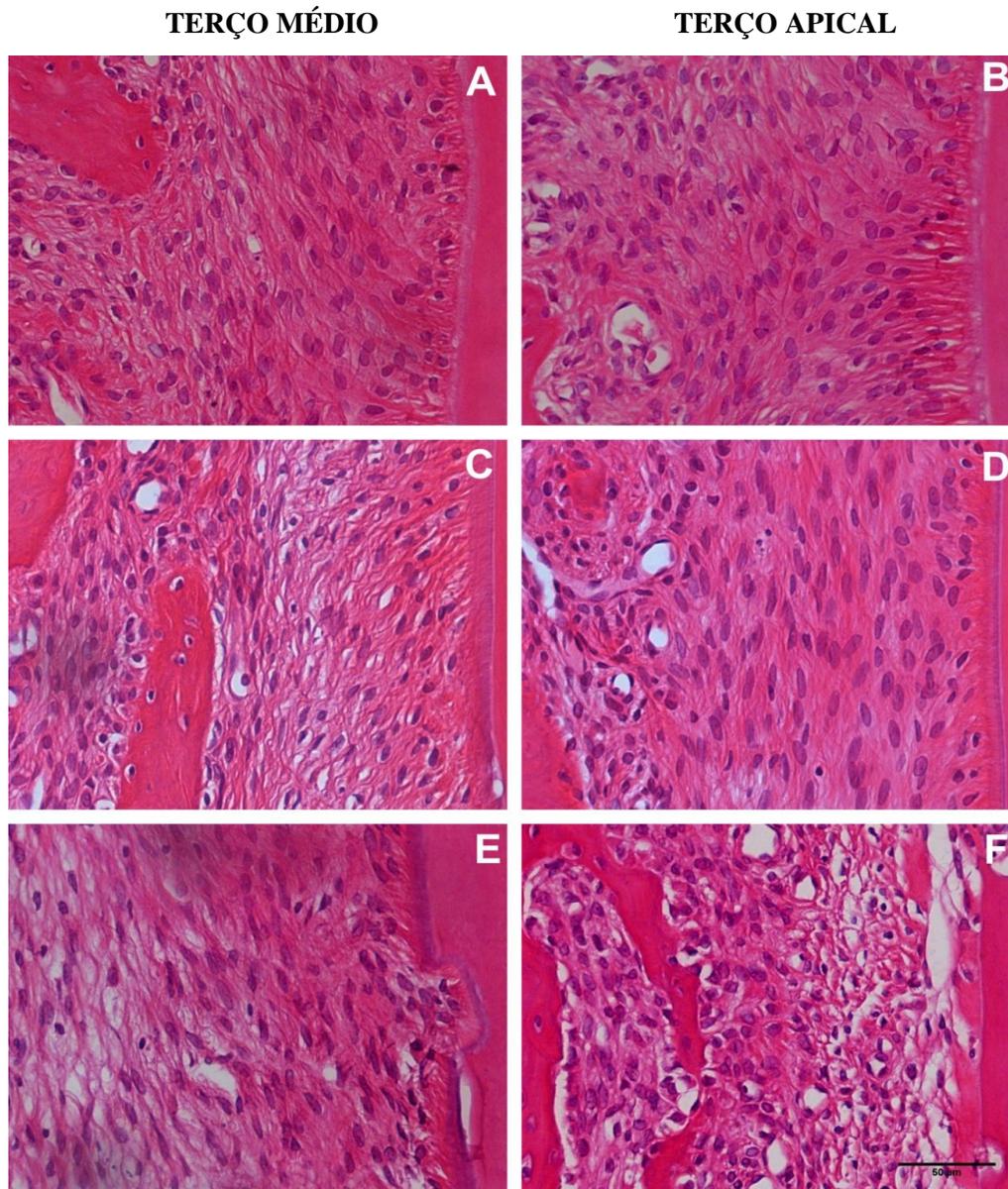
Observando os grupos experimentais, notou-se que a espessura do ligamento periodontal, área de matriz extracelular e área de fibras colágenas apresentaram comportamentos semelhantes no terço médio e apical da raiz (Figura 1), já para os vasos sanguíneos, no terço apical, foi registrado aumento da área do grupo AMCC em relação ao grupo SO. Os perfis nucleares não tiveram alterações significativas entre os grupos (Tabela 2).

**Tabela 2.** Análise estatística dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal corados pela técnica H.E. nos grupos experimentais pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% nível de significância. Todos os dados estão expressos em média.

Área analisada	Variável	GRUPOS		
		SO	AMCC	AMSC
TERÇO MÉDIO DA RAZ	Área de vasos sanguíneos (%)	1,75 <sup>A</sup>	1,44 <sup>A</sup>	0,70 <sup>A</sup>
	Área de fibras colágenas (%)	50,66 <sup>A</sup>	56,12 <sup>A</sup>	50,80 <sup>A</sup>
	Área de matriz extracelular (%)	47,45 <sup>A</sup>	42,43 <sup>A</sup>	48,49 <sup>A</sup>
	Perfil Nuclear (n)	154,68 <sup>A</sup>	157,88 <sup>A</sup>	141,45 <sup>A</sup>
	Espessura do Ligamento Periodontal (µm)	240,02 <sup>A</sup>	242,28 <sup>A</sup>	232,99 <sup>A</sup>
TERÇO APICAL DA RAZ	Área de vasos sanguíneos (%)	0,55 <sup>A</sup>	2,12 <sup>B</sup>	1,19 <sup>AB</sup>
	Área de fibras colágenas (%)	49,03 <sup>A</sup>	50,01 <sup>A</sup>	48,01 <sup>A</sup>
	Área de matriz extracelular (%)	50,41 <sup>A</sup>	47,85 <sup>A</sup>	50,78 <sup>A</sup>
	Perfil Nuclear (n)	137,31 <sup>A</sup>	155,83 <sup>A</sup>	171,62 <sup>A</sup>
	Espessura do Ligamento Periodontal (µm)	229,54 <sup>A</sup>	232,72 <sup>A</sup>	220,32 <sup>A</sup>

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Fonte: Elaborado pelos autores.

**Figura 1.** Cortes longitudinais do ligamento periodontal da face palatina do ICSD corados em H.E., sob microscopia de luz. Objetiva de 40x.



Imagens A-B: Grupo SO; C-D: Grupo AMSC; E-F: Grupo AMCC. Em A e B é observado organização do ligamento periodontal, tecido ósseo normal, integridade da camada de cimento e dentina, com presença de algumas células inflamatórias. Em C e D há desorganização das fibras do ligamento periodontal, integridade da camada de cimento e dentina, com presença moderada de células inflamatórias. Em E há presença de reabsorção inflamatória acometendo a porção superficial da raiz, desorganização das fibras do ligamento periodontal e aumento de matriz extracelular. Em F há perda da integridade da camada de cimento e dentina, com grande desorganização das fibras do ligamento periodontal e intenso número de células inflamatórias.

Fonte: Elaborado pelos autores.

Na comparação entre as fibras colágenas, na análise do terço médio da raiz, as fibras birrefringência verde e vermelha não possuem diferença entre os grupos. Em contrapartida, no terço apical houve uma diminuição significativa de fibras colágenas de birrefringência

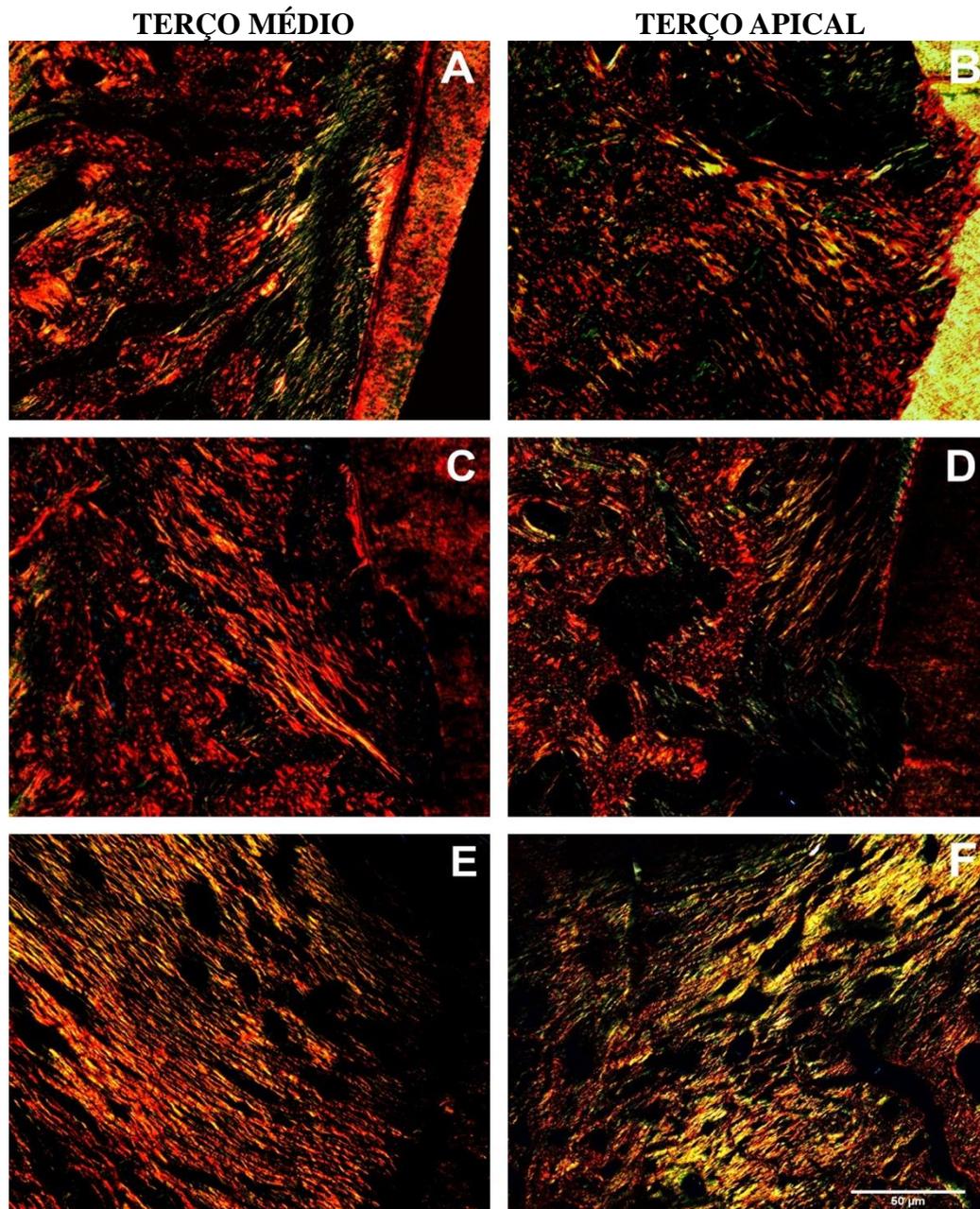
vermelha no grupo AMCC, assim como o aumento de fibras de birrefringência verde no mesmo grupo. Em contrapartida, o grupo AMSC apresentou maior número de fibras colágenas de birrefringência vermelha (Figura 2) (Tabela 3).

**Tabela 3.** Análise estatística dos eventos histomorfométricos associado ao ligamento periodontal corados pela técnica Picrosirius Red nos grupos experimentais pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% nível de significância. Todos os dados estão expressos em média.

Área analisada	Variável	GRUPOS		
		SO	AMCC	AMSC
TERÇO MÉDIO DA RAIZ	Área de fibras colágenas de birrefringência vermelha (%)	68,40 <sup>A</sup>	59,25 <sup>A</sup>	66,74 <sup>A</sup>
	Área de fibras colágenas de birrefringência verde (%)	31,58 <sup>A</sup>	40,74 <sup>A</sup>	33,26 <sup>A</sup>
TERÇO APICAL DA RAIZ	Área de fibras colágenas de birrefringência vermelha (%)	67,69 <sup>A</sup>	50,91 <sup>B</sup>	70,39 <sup>A</sup>
	Área de fibras colágenas de birrefringência verde (%)	32,44 <sup>AB</sup>	46,81 <sup>A</sup>	29,60 <sup>B</sup>

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Fonte: Elaborado pelos autores.

**Figura 2.** Cortes longitudinais do ligamento periodontal da face palatina do ICSD corados em Picrosirius Red, em microscopia de luz polarizada. Objetiva de 20x.



Imagens A-B: Grupo SO; C-D: Grupo AMSC; E-F: Grupo AMCC. Em A observa-se organização das fibras colágenas do ligamento periodontal, com predominância de fibras colágenas de birrefringência verde. Em B, há ligeira desorganização das fibras colágenas, com maior área de fibras de birrefringência vermelha. Em C e D há predominância de fibras de birrefringência vermelha, com pouca área de fibras colágenas. Em E e F há maior número de fibras colágenas de birrefringência verde, com desorganização das mesmas.

Fonte: Elaborado pelos autores.

Quanto à reabsorção radicular, os espécimes apresentaram em sua maioria pequenas áreas de reabsorções ativas, alguns animais dos grupos SO e AMSC apresentaram áreas ativas e inativas. A maioria apresentou pouca extensão e profundidade. Todos os grupos

apresentaram maiores percentuais com deposição de cimento neoformado em menos da metade das áreas reabsorvidas. Com pequenos pontos de anquilose, em maior número em todos os grupos (Figura 1) (Tabela 4).

O ligamento periodontal apresentou organização variada entre os espécimes e grupos, desde fibras periodontais inseridas no osso e cimento em toda a extensão do ligamento a fibras inseridas em um terço da extensão, não apresentando diferença significativa. Assim como para o infiltrado inflamatório, em que houve presença de inflamação moderada em todos os grupos, com ligeira variação entre sua extensão e profundidade (Tabela 5).

**Tabela 4.** Distribuição de escores e análise estatística de detalhes histomorfométricos na raiz dental e tecido ósseo pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% de nível de significância. Os dados estão apresentados em percentual de eventos.

<b>Grupos</b>			
Evento/Escore	SO (%)	AMCC (%)	AMSC (%)
<b>Reabsorção dentária</b>			
1	12,5	0	8,3
2	25	55,6	41,7
3	62,5	22,2	41,7
4	0	22,2	8,3
Comparação entre grupos	A	A	A
<b>Reabsorção dentária – extensão</b>			
1	12,5	0	8,3
2	87,5	77,8	75
3	0	22,2	16,7
4	0	0	0
Comparação entre grupos	A	A	A
<b>Reabsorção dentária - profundidade</b>			
1	12,5	0	8,3
2	12,5	55,6	50
3	50	11,1	8,3
4	25	33,3	33,3
Comparação entre grupos	A	A	A
<b>Reabsorção dentária - reparo</b>			
1	12,5	0	8,3
2	37,5	22,2	41,7
3	50	66,7	41,7
4	0	11,1	8,3
Comparação entre grupos	A	A	A
<b>Tecido ósseo - Anquilose</b>			
1	25	44,4	33,3
2	62,5	33,3	33,3
3	12,5	11,1	25
4	0	11,1	8,3
Comparação entre grupos	A	A	A
Número total de casos por grupo	8	9	12

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Fonte: Elaborado pelos autores.

**Tabela 5.** Distribuição de escores e análise estatística de detalhes histomorfométricos do ligamento periodontal pelo teste Kruskal-Wallis com teste post-hoc de Bonferroni com 5% de nível de significância. Os dados estão apresentados em percentual de eventos.

<b>Grupos</b>			
Evento/Escore	SO (%)	AMCC (%)	AMSC (%)
<b>Ligamento periodontal - organização</b>			
1	37,5	11,1	16,7
2	25	22,2	41,7
3	25	55,6	41,7
4	12,5	11,1	0
Comparação entre grupos	A	A	A
<b>Ligamento periodontal – inflamação – intensidade</b>			
1	0	0	0
2	62,5	11,1	41,7
3	25	77,8	41,7
4	12,5	11,1	16,7
Comparação entre grupos	A	A	A
<b>Ligamento periodontal – inflamação - extensão</b>			
1	0	0	0
2	37,5	11,1	41,7
3	50	44,4	41,7
4	12,5	44,4	16,7
Comparação entre grupos	A	A	A
Número total de casos por grupo	8	9	12

Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre os grupos. Fonte: Elaborado pelos autores.

Este estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina dissolvida em Tween 80 como meio de conservação de dentes avulsionados. No geral, os grupos com a mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina apresentaram resultados semelhantes ao grupo armazenado em soro no reparo do ligamento periodontal no terço médio da raiz. Foram encontradas diferenças nos resultados para o terço apical, nessa região o grupo AMCC apresentou maior porcentagem de área de vasos sanguíneos em comparação ao grupo SO. O grupo AMCC também apresentou na análise das fibras colágenas, menor área de fibras de birrefringência vermelha e maior área de fibras verdes, em contrapartida o grupo AMSC apresentou a maior área de fibras de birrefringência vermelha e menor de fibras verdes.

Apesar das várias propriedades farmacológicas da mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina já comprovadas na literatura, incluindo efeitos anticonvulsivantes (Aragão, et al., 2015), antidepressivos (Aragão, et al., 2006), gastroprotetores (Oliveira, et al., 2004), hepatoprotetores (Oliveira, et al., 2005), anti-hiperglicêmicos (Prabhakar, et al., 2005), assim como analgésicos e anti-inflamatórios (Pinto, et al., 2008; Santos, et al., 2012; Bhat, et al., 2016; Melo, et al., 2011), poucos estudam esses efeitos relacionados à área odontológica. O efeito anti-inflamatório apresenta grande emprego dentro da prática do reimplante dentário, uma vez que controlar a inflamação durante o reparo periodontal é de grande importância, pois quando há persistência da inflamação aguda ou crônica durante um grande período, é estabelecido um ambiente que estimula e favorece a ocorrência de reabsorção radicular (Consolaro, 2013; Melo, et al., 2011).

No estudo de Pinto (2008), foi avaliado o potencial anti-inflamatório da mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina em ratos com periodontite em fase aguda, os ratos receberam doses da mistura duas horas antes da indução da inflamação, por via sistêmica. Foi visto que houve uma inibição significativa de TNF- $\alpha$  associados à periodontite e as mieloperoxidase gengival (MPO), substâncias pró-inflamatórias. Esses resultados fornecem evidências de que a mistura retarda a inflamação aguda no modelo de periodontite em ratos.

A mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina possui baixa solubilidade aquosa, necessitando de solventes orgânicos para sua diluição (Aragão, et al., 2007). Na maioria dos estudos encontrados, o veículo de diluição utilizado foi o polisorbato (Tween 80), em diferentes concentrações, tanto puro como também associado à água destilada.

O tween 80 é um surfactante não iônico da família polioxietileno, constituído por ésteres de ácidos graxos de polioxietileno sorbitol, os surfactantes são produtos capazes de promover a solubilidade de substâncias hidrofóbicas em água. Para promover a diluição, o tween pode ser utilizado em diversas concentrações, em nosso estudo, devido à ausência de trabalhos que avaliam a aplicação tópica da mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, foi utilizada uma alta concentração do tween 80 para diluição. No entanto, concentrações altas podem levar a efeitos citotóxicos as células, principalmente a membrana celular, gerando alterações morfológicas e em sua permeabilidade, já concentrações mais baixas não promovem tal efeito (Rege, et al., 2002). Tal condição pode ter impedido a melhor expressão dos efeitos benéficos associados a  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina de se evidenciarem. Uma vez que quando a viabilidade celular é prejudicada, a célula entra em colapso, levando a sua desvitalização, com isso induzindo o estímulo inflamatório, visando elimina-las.

Os resultados positivos do uso da mistura foram obtidos principalmente por meio da aplicação sistêmica desse composto e diluídas em baixa concentração de tween 80 (Aragão, et al., 2006; Aragão, et al., 2015; Pinto, et al., 2008; Oliveira, et al., 2004; Melo, et al., 2011).

Outro fator que pode ter contribuído para inibição dos efeitos da mistura, pode ter sido uma reação química entre o Hidróxido de cálcio e o tween 80, no grupo com tratamento de canal. O tween possui em sua composição características ácidas, devido ao éster presente em sua estrutura (Kerwin, 2008), por sua vez o hidróxido de cálcio é uma base extremamente forte, em que quando na presença de ácido, ocorre uma reação exotérmica, formando sal e água (Chang, 2007). Essa reação impediria a dissociação esperada do hidróxido de cálcio e sua finalidade como curativo de demora, uma vez que os seus efeitos dependem da dissociação dos íons cálcio e hidroxila (Estrela & Pesce, 1996). Quando ocorre a reação com o ácido, a dissociação desejada não ocorre, impedindo o efeito. O Hidróxido de cálcio atua no estímulo ao reparo tecidual, induzindo a formação de tecido mineralizado e contra microorganismos presentes no canal radicular (Holland, et al., 1980).

Utiliza-se o hidróxido de cálcio nos dentes reimplantados objetivando o controle da reabsorção externa e da reabsorção inflamatória da raiz apical (Haapasalo & Endal, 2006; Majoran, et al., 2003). No entanto, o comportamento histológico apresentado pelo grupo AMCC e AMSC foram semelhantes na maioria das variáveis estudadas, o grupo AMSC apresentou apenas algumas diferenças estatísticas, com menos áreas de vaso sanguíneo e menor número de fibras colágenas de birrefringência verde e maior de birrefringência vermelha, indicando recuperação mais rápida do ligamento periodontal, já que há um aumento de colágeno de birrefringência verde nas fases iniciais de cicatrização, e posteriormente o colágeno imaturo é substituído por colágeno de birrefringência vermelha (Kaku & Yamauchi, 2014). Esse fato pode estar também correlacionado a interação entre o hidróxido de cálcio e o tween 80, onde a reação retardou o processo de cicatrização das fibras colágenas.

Por sua vez, o hidróxido de cálcio, quando extravasado para tecidos perirradiculares, pode também induzir uma reação inflamatória local, devido a seu alto pH, causando desnaturação proteica (Marão, et al., 2012), com isso podendo levar à degeneração das fibras colágenas (Andreasen, et al., 2002).

O período extra-alveolar e um adequado meio de conservação influenciam diretamente no sucesso do reimplante, é possível que o tempo de 20 minutos em meio seco adotado em nosso estudo, já tenha causados danos severos as células do ligamento periodontal (Andreasen & Schwartz, 1986), e quando adicionados ao meio de conservação de

soro fisiológico e mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, esses apenas evitaram maiores danos às estruturas celulares. Tal ocorrência pode ser a variável que proporcionou um comportamento similar na maioria dos eventos relacionados ao reparo celular nos três grupos, principalmente no terço médio.

Sugerimos para estudos futuros e apresentando uma limitação do nosso estudo, a inclusão de um grupo experimental somente utilizando o Tween 80 como meio de conservação, para avaliar os possíveis danos causados por essa solução, assim como um grupo experimental em que os dentes permaneçam totalmente em meio seco, a fim de comparar os danos causados pela falta de um meio de conservação.

Em comparação entre os terços, apical e médio da raiz, a área de vasos sanguíneos foi maior no terço apical no grupo AMCC. Provavelmente pela ausência de produtos tóxicos oriundos da necrose pulpar e presença de um feixe vascular mais volumoso nutrindo essa região.

A similaridade do infiltrado inflamatório pode estar relacionada à padronização efetuada durante a cirurgia experimental, realizada com condições assépticas, além do emprego da antibioticoterapia sistêmica após o reimplante (Hammarström, et al., 1986; Melo, et al., 2016).

#### **4. Considerações Finais**

Em ambiente pré-clínico, a mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina mostrou possuir potencial para utilização como meio de conservação em avulsão dentária.

#### **Referências**

Andreasen, J. O., & Andreasen, F. M. (2001). *Fundamentos de traumatismo dental: guia de tratamento passo a passo* (2ª ed.). Porto Alegre: Artmed.

Andreasen, J. O., & Schwartz, O. (1986). The effect of saline storage before replantation upon dry damage of the periodontal ligament. *Dental Traumatology*, 2(2), 67-70.

Andreasen, J. O., Borum, M. K., Jacobsen, H. L., & Andreasen, F. M. (1995). Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Dental traumatology*, 11(2), 76-89.

Andreasen, J. O., Farik, B., & Munksgaard, E. C. (2002). Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dental Traumatology*, 18(3), 134-137.

Aragão, G. F., Carneiro, L. M. V., Junior, A. P. F., Vieira, L. C., Bandeira, P. N., Lemos, T. L. G., & Viana, G. D. B. (2006). A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha-and beta-amyryn from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 85(4), 827-834.

Aragão, G. F., Carneiro, L. M. V., rota-Junior, A. P., Bandeira, P. N., Lemos, T. L. G. D., & Viana, G. S. D. B. (2015). Alterations in brain amino acid metabolism and inhibitory effects on PKC are possibly correlated with anticonvulsant effects of the isomeric mixture of  $\alpha$ -and  $\beta$ -amyryn from *Protium heptaphyllum*. *Pharmaceutical Biology*, 53(3), 407-413.

Aragão, G. F., Carneiro, L. M., Júnior, A. P., Bandeira, P. N., Lemos, T. L., & Viana, G. S. D. B. (2007). Antiplatelet Activity of  $\alpha$ -and  $\beta$ -Amyryn, Isomeric Mixture from *Protium heptaphyllum*. *Pharmaceutical Biology*, 45(5), 343-349.

Aragão, G. F., Pinheiro, M. C. C., Bandeira, P. N., Lemos, T. L. G., & Viana, G. S. D. B. (2008). Analgesic and anti-inflammatory activities of the isomeric mixture of alpha-and beta-amyryn from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Journal of Herbal Pharmacotherapy*, 7(2), 31-47.

Bhat, R. A., Lingaraju, M. C., Pathak, N. N., Kalra, J., Kumar, D., Kumar, D., & Tandan, S. K. (2016). Effect of ursolic acid in attenuating chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. *Fundamental & clinical pharmacology*, 30(6), 517-528.

Brasil, Ministério da Saúde. (2015). *Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: atitude de ampliação de acesso* (2ª edição). Brasília: Ministério da saúde.

Chang, R. (2007). *Química Geral: conceitos essenciais* (4ª edição). Porto Alegre: Amgh Editora.

Consolaro, A. (2013). The four mechanisms of dental resorption initiation. *Dental press journal of orthodontics*, 18(3), 7-9.

De Almeida, P., Boleti, A. P. D. A., Rüdiger, A. L., Lourenço, G. A., da Veiga Junior, V. F., & Lima, E. S. (2015). Anti-inflammatory activity of triterpenes isolated from *Protium paniculatum* oil-resins. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, eCAM, 293768.

Díaz-Ruiz, G., Hernández-Vázquez, L., Luna, H., Wachter-Rodarte, M. D. C., & Navarro-Ocaña, A. (2012). Growth inhibition of *Streptococcus* from the oral cavity by  $\alpha$ -amyrin esters. *Molecules*, 17(11), 12603-12611.

Dos Santos, C. L. V., Sonoda, C. K., Poi, W. R., Panzarini, S. R., Sundefeld, M. L. M. M., & Negri, M. R. (2009). Delayed replantation of rat teeth after use of reconstituted powdered milk as a storage medium. *Dental Traumatology*, 25(1), 51-57.

Estrela, C., Pesce, H. F. (1996). Chemical analysis of the release of calcium and hydroxyl ions from Calcium hydroxide in connective tissue in dogs - Part I. *Brazilian dental journal*, 7(1): 41-46.

Haapasalo, M., & Endal, U. (2006). Internal inflammatory root resorption: the unknown resorption of the tooth. *Endodontic topics*, 14(1), 60-79.

Hammarström, L., Blomlöf, L., Feiglin, B., Andersson, L., & Lindskog, S. (1986). Replantation of teeth and antibiotic treatment. *Dental Traumatology*, 2(2), 51-57.

Holland, R., Souza, V., Nery, M. J., Bernabé, D. F. E., Mello, W., Otoboni Filho, J. A. (1980). Deposição apical de tecido duro em dentes adultos de macacos com uso de hidróxido de cálcio. *Australian dental journal*, 25: 189-192.

Júnior, G. V., de Souza, C. M. L., & Chaves, M. H. (2005). Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Quim. Nova*, 28(2), 183-187.

Kaku, M., & Yamauchi, M. (2014). Mechano-regulation of collagen biosynthesis in periodontal ligament. *Journal of prosthodontic research*, 58(4), 193-207.

Kerwin, B. A. (2008). Polysorbates 20 and 80 used in the formulation of protein biotherapeutics: structure and degradation pathways. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(8), 2924-2935.

Lam, R. (2016). Epidemiology and outcomes of traumatic dental injuries: a review of the literature. *Australian dental journal*, 61, 4-20.

Lima, E. M., Nascimento, A. M., Lenz, D., Scherer, R., Meyrelles, S. S., Boëchat, G. A., ... & Endringer, D. C. (2014). Triterpenes from the *Protium heptaphyllum* resin—chemical composition and cytotoxicity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 24(4), 399-407.

Longo, D. L., Fumes, A. C., Küchler, E. C., Paula-Silva, F. W., Nelson-Filho, P., & Silva, L. A. (2018). Efficiency of different storage media for avulsed teeth in animal models: a systematic review. *Dental Traumatology*, 34(1), 12-19.

Majorana, A., Bardellini, E., Conti, G., Keller, E., & Pasini, S. (2003). Root resorption in dental trauma: 45 cases followed for 5 years. *Dental Traumatology*, 19(5), 262-265.

Marão, H. F., Panzarini, S. R., Aranega, A. M., Sonoda, C. K., Poi, W. R., Esteves, J. C., & Silva, P. I. S. (2012). Periapical tissue reactions to calcium hydroxide and MTA after external root resorption as a sequela of delayed tooth replantation. *Dental Traumatology*, 28(4), 306-313.

Melo, C. M., Morais, T. C., Tomé, A. R., Brito, G. A. C., Chaves, M. H., Rao, V. S., & Santos, F. A. (2011). Anti-inflammatory effect of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpene from *Protium heptaphyllum*, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. *Inflammation research*, 60(7), 673-681.

Melo, M. E., Silva, C. A., de Souza Gomes, W. D., Da Silva, V. F., Brandini, D. A., Poi, W. R., ... & Panzarini, S. R. (2016). Immediate tooth replantation in rats: effect of systemic

antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. *Clinical oral investigations*, 20(3), 523-532.

Okoye, N. N., Ajaghaku, D. L., Okeke, H. N., Ilodigwe, E. E., Nworu, C. S., & Okoye, F. B. C. (2014). beta-Amyrin and alpha-amyrin acetate isolated from the stem bark of *Alstonia boonei* display profound anti-inflammatory activity. *Pharmaceutical biology*, 52(11), 1478-1486.

Oliveira, F. A., Chaves, M. H., Almeida, F. R., Lima Jr, R. C., Silva, R. M., Maia, J. L., ... & Rao, V. S. (2005). Protective effect of  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(1-2), 103-108.

Oliveira, F. A., Lima-Junior, R. C., Cordeiro, W. M., Vieira-Júnior, G. M., Chaves, M. H., Almeida, F. R., ... & Rao, V. S. (2004). Pentacyclic triterpenoids,  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyryns, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 78(4), 719-725.

Panzarini, S. R., Holland, R., De Souza, V., Poi, W. R., Sonoda, C. K., & Pedrini, D. (2007). Mineral trioxide aggregate as a root canal filling material in reimplanted teeth. Microscopic analysis in monkeys. *Dental traumatology*, 23(5), 265-272.

Pinto, S. H., Pinto, L. M. S., Cunha, G. M. A., Chaves, M. H., Santos, F. A., & Rao, V. S. (2008). Anti-inflammatory effect of  $\alpha$ ,  $\beta$ -Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, 16(1), 48-52.

Pinto, S. H., Pinto, L. M. S., Guedes, M. A., Cunha, G. M. A., Chaves, M. H., Santos, F. A., & Rao, V. S. (2008). Antinoceptive effect of triterpenoid  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*, 15(8), 630-634.

Prabhakar, P., Reeta, K. H., Maulik, S. K., Dinda, A. K., & Gupta, Y. K. (2017).  $\alpha$ -Amyrin attenuates high fructose diet-induced metabolic syndrome in rats. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 42(1), 23-32.

Prueksakorn, A., Puasiri, S., Ruangsri, S., Makeudom, A., Sastraruji, T., Krisanaprakornkit, S., & Chailertvanitkul, P. (2016). The preservative effect of Thai propolis extract on the viability of human periodontal ligament cells. *Dental Traumatology*, 32(6), 495-501.

Rege, B. D., Kao, J. P., & Polli, J. E. (2002). Effects of nonionic surfactants on membrane transporters in Caco-2 cell monolayers. *European journal of pharmaceutical sciences*, 16(4-5), 237-246.

Santos, F. A., Frota, J. T., Arruda, B. R., de Melo, T. S., de Castro Brito, G. A., Chaves, M. H., & Rao, V. S. (2012). Antihyperglycemic and hypolipidemic effects of  $\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin, a triterpenoid mixture from *Protium heptaphyllum* in mice. *Lipids in health and disease*, 11(1), 98.

Soldi, C., Pizzolatti, M. G., Luiz, A. P., Marcon, R., Meotti, F. C., Miotto, L. A., & Santos, A. R. (2008). Synthetic derivatives of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 16(6), 3377-3386.

Traebert, J., de Lacerda, J. T., Foster Page, L. A., Thomson, W. M., & Bortoluzzi, M. C. (2012). Impact of traumatic dental injuries on the quality of life of schoolchildren. *Dental traumatology*, 28(6), 423-428.

Ugolini, A., Parodi, G. B., Casali, C., Silvestrini-Biavati, A., & Giacinti, F. (2018). Work-related traumatic dental injuries: Prevalence, characteristics and risk factors. *Dental traumatology*, 34(1), 36-40.

**Porcentagem de contribuição de cada autor no manuscrito**

Luiza Monzoli Côvre – 45%

Caio Vinicius Lourenço Debortoli – 10%

Marina Fuzette Amaral – 5%

Adonias Almeida Carvalho – 5%

Jurema Santana de Freitas – 5%

Gerardo Magela Vieira Júnior – 5%

Mariana Helena Chaves – 5%

Cláudio Aparecido Casatti – 5%

Daniela Atili Brandini – 15%