



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Araçatuba

Rafaela Larizo Rabelo

**CITOTOXICIDADE E EFEITO INDUTOR DE
MINERALIZAÇÃO DE FLAVONOIDES SOBRE
CÉLULAS OSTEÓBLÁSTICAS**

Araçatuba - SP
2021

Rafaela Laruzo Rabelo

**CITOTOXICIDADE E EFEITO INDUTOR DE
MINERALIZAÇÃO DE FLAVONOIDES SOBRE
CÉLULAS OSTEÓBLÁSTICAS**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de
Araçatuba, para obtenção de título de Mestre em
Ciência Odontológica - Área de Concentração:
Saúde Bucal da Criança

Orientadora: Prof^a Dr^a Cristiane Duque

Coorientadora: Dr^a Karina Sampaio Caiaffa

**Araçatuba - SP
2021**

Catálogo-na-Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

R114c Rabelo, Rafaela Laruzo.
Citotoxicidade e efeito indutor de mineralização de flavonoides sobre células osteoblásticas / Rafaela Laruzo Rabelo. - Araçatuba, 2021
52 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristiane Duque
Coorientadora: Profa. Karina Sampaio Caiaffa

1. Flavonoides 2. Osteoblastos 3. Periodontite periapical
4. Calcificação fisiológica I. T.

Black D27
CDD 617.645

Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dados Curriculares
Rafaela Laruzo Rabelo

Nascimento	20.09.1996 – Goiandira - GO
Filiação	Magno Rabelo Tânia Aparecida Mariano
2014/2018	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba –UNESP.
2017/2018	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica, com auxílio PIBIC-CNPq.
2018/2018	Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica, com auxílio PIBIC-CNPq.
2019/2019	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).
2019/2019	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq.
2019/2021	Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP.
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica.

Comissão Examinadora
Defesa de Dissertação

Profa. Dra. Cristiane Duque - Orientadora Professora Associada do Departamento de Odontologia Infantil e Social, Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia – FOA/UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba.

Profa. Dra. Karina Cogo Müller – Professora Doutora na área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica na Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNICAMP e da pós-graduação em Odontologia, FOP-UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas.

Profa. Dra. Thaís Marchini de Oliveira – Professora Doutora do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP - Universidade de São Paulo, Bauru.

*"Se não podes entender, crê para que
entendas. A fé precede, o intelecto segue."*

Santo Agostinho

*À minha família, meus pais Magno Rabelo e
Tânia Aparecida Mariano, e meus irmãos Amanda Laruzo
Rabelo e Gabriel Laruzo Rabelo, com gratidão por todo
apoio recebido durante esta trajetória*

Agradecimentos

A **Deus**, por todas as bênçãos já concedidas e por me guiar em tudo que faço em minha vida, dando-me força e coragem para nunca desistir dos meus sonhos.

Aos meus pais, **Magno** e **Tânia**, por não medirem esforços na realização dessa etapa tão importante, vocês sempre fazem o possível e o impossível para que tudo dê certo. Só quero poder retribuir todas as coisas maravilhosas que já fizeram por mim, pelas quais serei eternamente grata. Sei que tudo isso só foi possível com o apoio e dedicação de vocês. E também aos meus irmãos, **Amanda** e **Gabriel**, por comporem comigo essa família abençoada. Obrigada por todo apoio e por serem as pessoas que mais confio.

A minha querida professora orientadora, **Profa. Dra. Cristiane Duque**, pela orientação nesses anos todos. Não canso de dizer o quanto admiro a senhora pela sua inteligência, dedicação, garra, carisma e prestatividade. Você é uma profissional que sem dúvida se difere de qualquer outro por conseguir mesclar com imensa facilidade a sensibilidade e o profissionalismo. E isso faz com que a senhora não seja apenas nossa professora orientadora, mas sim nossa professora amiga. Esse comportamento não poderia deixar de refletir na nossa equipe, em que você nos inspira a manter o companheirismo e o apoio de um para com o outro. Agradeço muito a senhora por todo conhecimento que me foi passado, sempre disposta a ensinar, sem medir esforços. Nada disso teria se consolidado sem sua ajuda e orientação. Com certeza, o mestrado é um marco na minha vida e agradeço a Deus por ter sido realizado com a senhora. Obrigada por tudo e pelo carinho, profa.!

A minhas amigas **Karina** e **Vanessa**, a amizade de vocês foi o melhor presente que eu poderia ter ganhado nesses anos. Vocês foram essenciais ao longo dessa trajetória, tanto dentro da faculdade quanto fora. Pude compartilhar com vocês momentos de felicidade, de tristeza, de euforia, decepções e conquistas. Agradeço a Deus por vocês terem feito parte de tudo isso e com certeza as levarei sempre comigo.

A **Amanda**, **Jesse**, **Gabriela** e **Rafael**, que são muito mais que colegas, são meus amigos. Trabalhar ao lado de vocês tornou tudo mais leve. Agradeço por toda ajuda e companheirismo. Sentirei muita saudade desta rotina.

A **Maria Eduarda, Vivian e Warley**, agradeço pela ajuda no laboratório e por toda prestatividade quando foi necessária.

Ao **Heitor**, meu namorado, obrigada por sempre me apoiar, você que esteve ao meu lado durante toda essa trajetória acompanhando minhas alegrias e tristezas, sua parceria foi essencial.

A **Maria Juliana**, minha amiga de longa data, compartilhamos os mesmos objetivos e estamos sempre apoiando uma à outra. Obrigada pela sua amizade e companhia nesses anos todos.

Ao **Gabriel**, meu grande amigo, no qual nossos laços foram fortalecidos durante a pós-graduação, agradeço sua amizade e por ser tão solícito.

Aos amigos de departamento **Igor, Caio, Letícia e Francienne**, obrigada pela excelente convivência no laboratório, por todo apoio e ajuda. Vocês são muito queridos e torço muito pelo sucesso de vocês.

Aos meus amigos **Paulo e Caroline**, fizemos escolhas semelhantes e foi muito bom saber que podia contar com vocês nesse meio acadêmico, obrigada por tudo.

Aos amigos **Laís Kataoka, Allan, Luis Felipe, Leticia Bizzi, Letícia e Luanna**, obrigada pela amizade, mesmo vocês não estando diretamente relacionados ao trabalho, com certeza me ajudaram a manter a sanidade mental nesse período, ainda mais em meio a uma pandemia.

À **Profa. Dra. Sandra Helena Penha de Oliveira** e ao **Victor Gustavo Balera Brito**, agradeço o apoio e toda colaboração durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos **docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Araçatuba, UNESP, Prof. Dr. Alberto Carlos B. Delbem, Prof. Dr. Robson Federico Cunha e Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan**, muito obrigada por todo conhecimento transmitido, pela fácil acessibilidade, assim como a ótima convivência.

Aos **funcionários do Departamento de Odontopediatria**, Ricardo, Mário e Luisinho, obrigada por manterem a organização no laboratório e por toda a ajuda e dedicação.

À **Banca do Exame Geral de Qualificação** e à **Banca de Defesa**, obrigada pela contribuição no trabalho, regada de muitos conhecimentos.

À **Faculdade de Odontologia de Araçatuba**, na pessoa dos professores: Prof. Tit. Glauco Issamu Miyahara, digníssimo Diretor e Prof. Tit. Alberto Carlos Botazzo Delbem, digníssimo Vice-Diretor.

Ao **Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP**, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra.

Aos **funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP**, Ana Cláudia, Luzia, Ivone, Cláudio, Maria Cláudia, Luiz, Denise e Izamar, obrigada pela atenção e disponibilidade com que nos recebem.

À **Valéria, Cristiane e Lilian** da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, pelo profissionalismo e atenciosidade.

À **FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo)** processo 2019/02129-7, a **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** e ao **CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq)**, processo 133897/2019-2, pela concessão de recursos que possibilitou a realização deste curso de mestrado.

E a **todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a elaboração e conclusão desta dissertação,**

Minha eterna gratidão.

Rabelo RL. **Citotoxicidade e efeito indutor de mineralização de flavonoides sobre células osteoblásticas.** [Dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2021.

Resumo Geral

A perda óssea dentária e a formação de lesões periapicais surgem como uma consequência do desequilíbrio da homeostase óssea. Os osteoblastos, juntamente com os osteoclastos e osteócitos, atuam na formação e na reabsorção óssea. Vários marcadores de formação óssea são produzidos por osteoblastos ativos e refletem diferentes aspectos da diferenciação osteoblástica e da remodelação óssea. Com isso, muitos autores têm explorado o uso de fitoterápicos, visando obter novos compostos que apresentem propriedades terapêuticas, como os flavonoides, e que estimulem a neoformação óssea e o reparo da região periapical. O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro a citotoxicidade e efeito indutor de mineralização de flavonoides sobre células osteoblásticas humanas. Para isso, células osteoblásticas da linhagem Saos-2 foram expostas aos seguintes flavonoides: quercetina, miricetina e seus derivados taxifolina, isoquercitrina, rutina, ampelopsina e EGCG, além de pinocembrina, crisina e canferol, de forma isolada e combinada. Foi avaliado o efeito citotóxico, a atividade de fosfatase alcalina e indução de nódulos de mineralização. Os resultados foram analisados pelo método de Shapiro-Wilk, e as variáveis foram submetidas à análise de ANOVA seguida pelo teste de Tukey para comparar entre os grupos e/ou concentrações ou teste de Dunnett para comparar entre cada grupo e o controle, com nível de significância de 5%. A viabilidade da cultura de osteoblastos não teve uma redução estatisticamente significativa na presença da maioria dos compostos, exceto crisina a 100µM. Taxifolina, isoquercitrina, rutina, ampelopsina e EGCG foram os compostos que estimularam significativamente a atividade da fosfatase alcalina, juntamente com as combinações taxifolina+isoquercitrina, taxifolina+ampelopsina e taxifolina+rutina a 25/25 µM. Quanto a formação de nódulos de mineralização, ampelopsina, isoquercitrina, rutina, pinocembrina e miricetina isolados e taxifolina+isoquercitrina, taxifolina+ampelopsina e taxifolina+rutina combinados obtiveram os melhores resultados, variando de acordo com as concentrações. Conclui-se que a taxifolina, isoquercitrina, rutina e ampelopsina

e combinações de taxifolina com esses flavonoides são citocompatíveis e apresentam efeito indutor de mineralização em osteoblastos Saos-2.

Palavras-chave: Flavonoides; Osteoblastos; Periodontite periapical; Calcificação fisiológica.

Rabelo RL. **Cytotoxicity and inducing effect of mineralization of flavonoids on osteoblastic cells.** [Dissertação]. Araçatuba: Universidade Estadual Paulista; 2021.

General Abstract

Dental bone loss and the formation of periapical lesions arise as a consequence of imbalance of bone homeostasis. Osteoblasts, together with osteoclasts and osteocytes, act in bone formation and resorption. Several markers of bone formation are produced by active osteoblasts and reflect different aspects of osteoblastic differentiation and bone remodeling. Thus, many authors have explored the use of phytotherapies in order to obtain new compounds with therapeutic properties, such as flavonoids, and also stimulate bone neoformation and periapical region repair. The objective of this study was to evaluate *in vitro* the cytotoxicity and inducing effect of flavonoid mineralization on human osteoblastic cells. For this, osteoblastic cells of the Saos-2 lineage were exposed to the following flavonoids: quercetin, myricetin and its derivatives taxifoline, isoquercitrin, rutin, ampelopsin and EGCG, in addition to pinocembrin, chrysin and kaempferol, in an isolated and combined manner. The cytotoxic effect, the activity of alkaline phosphatase and the induction of mineralization nodules were evaluated. The results were analyzed using the Shapiro-Wilk method, and the variables were submitted to ANOVA analysis followed by the Tukey test to compare between groups and/or concentrations or Dunnett's test to compare between each group and the control, with a level of 5% significance. The viability of the osteoblast culture did not have a statistically significant reduction in the presence of most compounds, except 100 μ M chrysin. Taxifoline, isoquercitrin, rutin, ampelopsin and EGCG were the compounds that significantly stimulated the activity of alkaline phosphatase, together with the combinations taxifoline+isoquercitrin, taxifoline+ampelopsin and taxifoline+rutin at 25/25 μ M. As for the formation of mineralization nodules, ampelopsin, isoquercitrin, rutin, pinocembrin and myricetin alone and taxifoline+isoquercitrin, taxifoline+ampelopsin and taxifoline+rutin combined obtained the best results, varying according to the concentrations. It is concluded that taxifoline, isoquercitrin, rutin and

ampelopsin and combinations of taxifoline with these flavonoids are cytocompatible and have a mineralization-inducing effect on Saos-2 osteoblasts.

Keywords: Flavonoids; Osteoblasts; Periapical Periodontitis; Physiologic Calcification.

Lista de Figuras

- Figura 1** Estrutura química dos flavonoides selecionados para este estudo. 27
- Figura 2** Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides 31
isolados por 48 h, obtida por meio dos ensaios de resazurina. *Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). HC: hidróxido de cálcio.*
- Figura 3** Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides 31
isolados por 48 h e avaliação após 8 dias, obtida por meio dos ensaios de resazurina. *Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). HC: hidróxido de cálcio.*
- Figura 4** Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides 32
isolados por 48 h e avaliação após 14 dias, obtida por meio dos ensaios de resazurina. *Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). HC: hidróxido de cálcio.*
- Figura 5** Atividade de fosfatase alcalina das células Saos-2 após tratamento com 32
os flavonoides isolados por 48 h e avaliação após 8 dias. *Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). *Diferença estatística entre cada grupo e o controle DMEM, segundo os testes de Dunnett ($p < 0,05$). HC: hidróxido de cálcio.*
- Figura 6** Quantificação dos nódulos de mineralização formados após tratamento 33
com os flavonoides isolados por 48 h e avaliação após 14 dias. *Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey*

($p < 0,05$). *Diferença estatística entre cada grupo e o controle DMEM, segundo os testes de Dunnett ($p < 0,05$). HC: hidróxido de cálcio.

Figura 7 Imagens representativas da coloração de vermelho de alizarina S para 34 os grupos controles DMEM osteogênico (A) e hidróxido de cálcio a 50 μM (B) e 25 μM (C).

Figura 8 Imagens representativas da coloração de vermelho de alizarina S para 34 os grupos Taxifolina a 50 μM (D) e 25 μM (E) e Isoquercitrina também a 50 μM (F) e 25 μM (G).

Figura 9 Imagens representativas da coloração de vermelho de alizarina S para 35 os grupos Rutina a 50 μM (H) e 25 μM (I) e Ampelopsina também a 50 μM (J) e 25 μM (K).

Figura 10 Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides 36 combinados por 48 h, obtida por meio dos ensaios de resazurina. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Tax: taxifolina; Iso: isoquercitrina; Amp: ampelopsina; Rut: rutina.

Figura 11 Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides 36 combinados por 48 h e avaliação por 8 dias, obtida por meio dos ensaios de resazurina. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada combinação isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Tax: taxifolina; Iso: isoquercitrina; Amp: ampelopsina; Rut: rutina.

Figura 12 Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides 37 combinados por 48 h e avaliação por 14 dias, obtida por meio dos ensaios de resazurina. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença

estatística entre as concentrações, considerando cada combinação isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Tax: taxifolina; Iso: isoquercitrina; Amp: ampelopsina; Rut: rutina.

Figura 13 Atividade de fosfatase alcalina das células Saos-2 após tratamento com 37

os flavonoides combinados por 48 h e avaliação após 8 dias. *Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada combinação isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). *Diferença estatística entre cada grupo e o controle DMEM, segundo os testes de Dunnett ($p < 0,05$). Tax: taxifolina; Iso: isoquercitrina; Amp: ampelopsina; Rut: rutina.*

Figura 14 Quantificação dos nódulos de mineralização formados após tratamento 38

com os flavonoides combinados por 48 h e avaliação após 14 dias. *Letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada combinação isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). *Diferença estatística entre cada grupo e o controle DMEM, segundo os testes de Dunnett ($p < 0,05$). Tax: taxifolina; Iso: isoquercitrina; Amp: ampelopsina; Rut: rutina.*

Figura 15 Imagens representativas da coloração de vermelho de alizarina S para 39

os grupos: Tax+Iso 50/50 μM (L) e 25/25 μM (M); Tax+Amp 50/50 μM (N) e 25/25 μM (O); e Tax+Rut 50/50 μM (P) e 25/25 μM (Q). *Tax: taxifolina; Iso: isoquercitrina; Amp: ampelopsina; Rut: rutina.*

Lista de Abreviaturas

ALP	Fosfatase alcalina
AMP	Ampelopsina
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimetilsulfoxico
EGCG	Epigallocatequina Galato
HBMSCS	Células-tronco mesenquimais da medula óssea humana
HC	Hidróxido de cálcio
ISO	Isoquercitrina
MO	DMEM osteogênico
PBS	Tampão fosfato-salino
RUT	Rutina
TAX	Taxifolina

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	20
2 OBJETIVO	26
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4 RESULTADOS.....	31
5 DISCUSSÃO.....	40
6 CONCLUSÃO.....	44
Referências	45

1 INTRODUÇÃO

A periodontite apical ou perirradicular é um processo inflamatório crônico que se desenvolve ao redor do ápice dental, seja em dentes decíduos ou permanentes, desencadeado pela invasão bacteriana mais comumente oriunda da polpa afetada pela lesão de cárie (Siqueira & Roças, 2007). Além do efeito prejudicial direto de produtos bacterianos, a resposta inflamatória imune ativa na região gera uma cascata de sinalização intracelular, envolvendo a produção de citocinas inflamatórias, como TNF- α , IL-1 e IL-6, que estão relacionadas à migração de células inflamatórias e osteoclastogênese (Bahuguna et al., 2016; Krum et al., 2010). Todo esse processo culmina no rompimento da homeostase óssea e a suprarregulação dos fatores de reabsorção com consequente perda óssea e formação de lesões periapicais (Siqueira & Roças, 2007).

Os osteoblastos são o principal componente celular dos tecidos periapicais e, juntamente com os osteoclastos e osteócitos, medeiam a formação e reabsorção óssea (Karygianni et al., 2012; Seibel, 2005). Vários marcadores de formação óssea são produzidos por osteoblastos ativos e refletem diferentes aspectos da diferenciação osteoblástica e remodelação óssea. Marcadores do metabolismo ósseo fornecem informações dinâmicas sobre o turnover do tecido ósseo. A fosfatase alcalina é uma ectoenzima ancorada na superfície celular dos osteoblastos, capaz de liberar grupos fosfato para participação na formação e mineralização do tecido osteóide. O colágeno é sintetizado pelos osteoblastos na forma de pré-propeptídeos. Após a secreção no espaço extracelular, eles são clivados pelas colagenases e liberados na circulação e são considerados uma medida quantitativa do colágeno tipo I recém-formado (Seibel, 2005). Uma variedade de proteínas não colagenosas, tais como osteopontina e osteocalcina, presentes em abundância na matriz óssea, apresentam diversas funções na diferenciação osteoblástica e mineralização óssea. Vários fatores são necessários para a ocorrência de cicatrização periapical, como a eliminação da infecção pulpar, o controle da resposta inflamatória e a indução da mineralização (Holland et al., 2017).

Muitos autores têm explorado o uso de fitoquímicos, visando obter novos compostos que apresentem múltiplas propriedades terapêuticas. Flavonoides constituem as classes mais importantes de polifenóis, com mais de 5000 compostos já

descritos na literatura (Pietta, 2000; Tripoli et al., 2007). Estão presentes em pequenas quantidades em frutas e vegetais, geralmente como metabólitos secundários e apresentam papel importante para defesa das plantas contra agentes externos. Estudos têm apontado diversas propriedades farmacológicas dos polifenóis, como ação antimicrobiana, antioxidante, osteogênica e antiosteoclastogênica (Pietta, 2000; Tripoli et al., 2007; Pilsakova et al., 2010). Eles apresentam uma estrutura comum (flavona), sendo constituídos por um núcleo 2-phenyl-1,4-benzopyrone com dois anéis aromáticos (A e B) unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado de anel C. De acordo com as variações no anel C, os flavonoides são divididos em: flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonol, flavanóis (ou catequinas), antocianidinas e chalconas (Cushnie e Lamb, 2005).

Entre os representantes do grupo dos flavonóis destacam-se a quercetina e miricetina. A quercetina (2-(3,4-dihidroxifenil)-3,5,7-trihidroxi-4H-cromen-4-ona), membro da classe dos flavonóis, contém cinco grupos hidroxila nas posições 3, 5, 7, 30, 40 e um grupo carbonila na quarta posição (Mittal et al., 2014). Dentre os flavonoides, é que mais está presente na dieta humana, variando seu consumo diário entre 50 e 500mg (Deschner et al., 1991), e representando 95% do total dos flavonoides ingeridos (Nijveldt et al., 2001). Exemplos de alimentos ricos em quercetina são as cebolas, maçãs, chá e vinho tinto (Russo et al., 2012). A quercetina é considerada um forte antioxidante devido à sua capacidade de eliminar os radicais livres, provinda da presença de dois farmacóforos antioxidantes (grupo catecol no anel B e o grupo OH na posição 3 do anel A) (Heijnen et al., 2002), e de se ligar a íons de metal de transição (de Souza et al., 2004). Alguns estudos mostraram que quercetina inibe três aspectos da função de neutrófilos humanos *in vitro*, que são considerados por contribuir para o processo inflamatório: a liberação de enzimas lisossomais, a resposta à quimiotaxia e a produção de radicais livres (Tijburg et al., 1997; Rao et al., 2005). Em relação à sua ação antimicrobiana, no estudo de Jaisinghani et al. (2017), a quercetina teve concentração inibitória mínima para *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* na concentração de 20 µg/mL enquanto *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli* foram inibidos nas concentrações de 300 µg/mL e 400 µg/mL, respectivamente. Estudo mostrou que quercetina causa um aumento na permeabilidade da membrana bacteriana e uma dissipação do potencial de membrana bacteriana (Mirzoeva et al., 1997). Adicionalmente, pesquisadores têm

investigado o seu efeito na mineralização, tanto óssea quanto dentinária, uma vez que conseguiu promover a proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais de medula óssea de ratos em osteoblastos (Srivastava et al., 2013), induzir a diferenciação de células da polpa dentária humana e expressão gênica de DSPP (sialofosfoproteinase da dentina), uma proteína específica de odontoblastos, sugerindo atividade dentinogênica, além de atividade de ALP (fosfatase alcalina) (Kim et al., 2013), promover proliferação e diferenciação osteogênica e angiogênica em células tronco da medula óssea de ratos (Zhou et al., 2015).

A miricetina (3,5,7-trihidroxi-2-(3,4,5-trihidroxifenil)-4-cromenona) é um flavonol que contém hidroxilas nas posições dos carbonos 3, 5, 7, 3', 4' e 5' (Wollenweber, 1982). Encontra-se presente em diversos vegetais, bagas e frutas, chás e vinho tinto, principalmente na forma de glicosídeos, ao invés de agliconas livres (Canada, 1990; Koeppen e Herrmann, 1977). Atividades antimicrobianas, antiviróticas, antitrombóticas, e, antiateroscleróticas, bem como efeitos antioxidantes e pró-oxidantes foram relatados para a miricetina (Ong e Khoo, 1997). A miricetina exerce efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores, como evidenciado na supressão da síntese de TNF- α , IL-6 e IL-12 por células dendríticas estimuladas por LPS e macrófagos (Ko, 2012; Fu et al., 2013); na redução da secreção de citocinas e histaminas pró-inflamatórias por mastócitos (Park et al., 2008) e no aumento da produção de IL-10 anti-inflamatória por macrófagos (Ferreira et al., 2013). A inibição do fator nuclear de transcrição NF-kB também está intimamente relacionada ao seu efeito anti-inflamatório (Park et al., 2008; Ko, 2012; Fu et al., 2013). Cai e Wu (1996) mostraram que a miricetina apresentou efeito inibitório contra patógenos periodontais gram-negativos como *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* em baixa concentração (20 μ g/mL). Além disso, a miricetina também promoveu um efeito estimulatório na diferenciação celular em osteoblastos humanos, aumento na atividade da ALP e produção de osteocalcina (Hsu et al., 2007; Kuo et al., 2005), síntese de colágeno tipo I e mineralização óssea (Hsu et al., 2007). A miricetina também foi capaz de estimular a diferenciação osteogênica em células tronco da medula óssea, aumentando a atividade da ALP e mineralização óssea (Ying et al., 2014).

Derivados da quercetina que têm apresentado amplo potencial terapêutico são a taxifolina (tax), isoquercitrina (iso) e a rutina (rut). A taxifolina (ou

dihidroquercetina - (2R,3R)-2-(3,4-di-hidroxifenil)-3,5,7-tri-hidroxi-2,3-dihidrocromen-4-ona;) é um tipo de flavanonol que é amplamente distribuída nas cascas do gênero *Pinus* ou *Larix*, em sementes do gênero *Silybum* e encontrado em frutas, especialmente laranjas, uvas e toranjas (Weidmann et al., 2012). Difere da quercetina somente por apresentar ligação simples nos C2-C3 do anel C, ao invés de dupla ligação como a quercetina. Taxifolina tem apresentado ampla ação terapêutica, entre as quais, atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (Jeong et al. 2009), *Acinetobacter hemolyticus* (Chatzopoulou et al., 2010) e atividade antifúngica (Kanwal et al., 2010). Sobre o efeito anti-inflamatório da taxifolina, estudo avaliando a silimarina, um importante composto já licenciado, que apresenta em sua composição, a taxifolina, mostrou inibição de TNF- α e NF- κ B e a produção de citocinas inflamatórias por células-T (Wagoner et al., 2010). Satué e colaboradores (2013) observaram que osteoblastos tratados com o flavonoide taxifolina secretaram um nível maior de osteocalcina quando comparados aos controles. Além disso, baixas doses de taxifolina e quercitrina, derivado da quercetina, diminuíram a expressão do gene RANKL em osteoblastos, sugerindo uma inibição na formação de osteoclastos.

Os derivados isoquercitrina e a rutina diferem da quercetina somente pela presença de um ou dois grupamentos glicosídicos ligados ao anel C. Esses compostos têm mostrado em estudos *in vitro* e *in vivo* potenciais atividades antioxidante, anti-inflamatória, antialérgica e antiproliferativa, entre outras (Ganeshpurkar e Saluja; 2017; Wang et al., 2013). A rutina (quercetina-3-O-rutinoside) é um flavonol abundantemente encontrado em plantas como passiflora, trigo sarraceno, chás e maçã. Em revisão de Ganeshpurkar e Saluja (2017), o efeito inibitório da rutina foi relatado contra diversas espécies bacterianas como *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, entre outros. A rutina também suprimiu a atividade de citocinas inflamatórias, por meio da redução de TNF- α e IL-1 β em micróglia (Wang et al., 2012). No estudo de Srivastava e colaboradores (2013), a quercetina e a rutina induziram a diferenciação de osteoblastos em células estaminais mesenquimais isoladas da medula óssea de camundongos. A isoquercitrina (quercetin 3-O-beta-D-glucofuranoside) é um dos compostos bioativos da planta medicinal erva de São João (*Hypericum perforatum L*) sendo encontrada também em frutas, vegetais, cereais e várias bebidas derivadas como chás e vinhos. Juntamente com o polifosfato, um

polímero inorgânico natural, a isoquercitrina aumentou a capacidade de mineralização de células Saos-2, semelhantes a osteoblastos humanos (Wang et al., 2014).

Dois importantes derivados da miricetina são a ampelopsina (amp) e a epigallocatequina galato (EGCG). A ampelopsina (2,3-dihidrocromen-4-ona), também conhecida como dihidroximiricetina, é um tipo de flavanono, proveniente da planta *Ampelopsis grossedentata* (Weng et al., 2017). Difere da miricetina por apresentar a ligação simples nos carbonos C2-C3 no anel C, ao invés de dupla ligação como a miricetina. Numerosos estudos têm revelado que ampelopsina apresenta muitas atividades biológicas, tais como anticâncer, antioxidante, antimicrobiana, entre outras. Estudo relatou que ampelopsina suprimiu a resposta inflamatória aguda induzida por LPS, por meio do bloqueio do fator de NF- κ B em macrófagos (Qi et al., 2013). Também reduziu a produção de óxido nítrico e prostaglandina E₂, a expressão de iNOS e COX-2 em níveis de RNAm e proteína, além de citocinas como IL-1 β , IL-6 e TNF- α em células de micróglia (Weng et al., 2017). Zhang et al. (2016) demonstraram que a ampelopsina (0,1-50 μ M) não exibiu nenhum efeito citotóxico na proliferação, mas aumentou a atividade da fosfatase alcalina, expressão gênica específica de osteoblastos e deposição mineral.

O EGCG ((-)-cis-3,3',4',5,5',7-hexahidroxi-flavano-3-galato, epigallocatequina galato) possui esqueleto químico semelhante a miricetina nos anéis A e B, porém apresenta diferenças no anel C que conferem sua classificação como flavanol ou catequina. Essas diferenças são na ligação simples nos carbonos C2-C3, um H no C4 e um grupamento galato ligado ao anel C. O EGCG tem sido apontado como um flavonoide promissor na prevenção e tratamento de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes, doenças neurodegenerativas, entre outras (Huo et al., 2008). Além dessas aplicações, também apresentou atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*, tanto em células planctônicas como em biofilme, em baixas concentrações (Lee et al., 2015) e alguns periodontopatógenos (Shahzad et al., 2015). Com relação ao potencial de mineralização óssea do EGCG, observou-se um efeito estimulatório (5 μ M) de células tronco mesenquimais derivadas de medula óssea humana em osteoblastos, através do aumento da atividade da ALP, expressão de genes de osteoblastos e formação de nódulos de mineralização (Jin et al., 2014). Entretanto, em altas concentrações, o EGCG pode resultar em efeitos negativos em células derivadas do osso alveolar de humanos, já em concentrações mais baixas pode estimular a atividade de osteoblastos (Mah et al.,

2014). O EGCG também é capaz de atuar como um modulador anti-inflamatório em polpas inflamadas, inibindo a expressão de VEGF e COX-2 em células da polpa dentária (Nakanishi et al., 2015), a expressão de citocinas pró-inflamatórias e de moléculas de adesão (Nakanishi et al., 2010).

Dois compostos encontrados na própolis, substância resinosa produzida por abelhas, são a crisina, da classe das flavonas, e a pinocembrina, uma flavanona (Asawahame et al., 2014). A crisina apresenta destaque por suas propriedades antimicrobianas e indutoras de diferenciação celular. Esse composto induziu a diferenciação osteogênica na ausência de outros agentes osteogênicos de pré-osteoblastos MC3T3-E1. Também promoveu a expressão de fatores de transcrição e marcadores de formação óssea como colágeno tipo 1, osteocalcina e osteopontina, bem como aumentou a formação de nódulos mineralizados (Zeng et al., 2013). A pinocembrina exibiu um aumento na atividade da fosfatase alcalina e na formação de nódulos de mineralização em osteoblastos MC3T3-E1, além de aumentar a expressão de mRNA dos genes ALP e osteocalcina (Natsume et al., 2020).

Outro composto da classe dos flavonóis é o canferol, que se encontra principalmente na composição de maçãs, brócolis, morangos, feijões e chá (Somerset and Johannot, 2008). O canferol é conhecido por ser um importante anti-inflamatório natural, além de auxiliar no tratamento do câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (Devi et al., 2005). Guo et al. (2012) observaram que o canferol promoveu diferenciação osteogênica em osteoblastos de ratos. Em células humanas, o tratamento com canferol apresentou aumento na atividade da ALP, bem como mostrou efeito estimulatório na atividade de osteoblastos e efeito inibitório em osteoclastos (Prouillet et al., 2004; Yang et al., 2010).

Diante do que foi exposto, busca-se então encontrar o flavonoide ou a combinação deles que tenha tanto propriedades antimicrobianas quanto osteogênicas e que possa ser usado no tratamento de periodontite apical, promovendo assim a desinfecção dos canais radiculares e a regeneração tecidual natural.

2 OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* a citotoxicidade e efeito indutor de mineralização dos flavonoides quercetina, miricetina e seus derivados taxifolina, isoquercitrina, rutina, ampelopsina e EGCG, além de pinocembrina, crisina e canferol sobre células osteoblásticas humanas.

Hipóteses

Hipóteses alternativas (H1)

- 1) Os flavonoides, isolados ou combinados, não apresentarão citotoxicidade.
- 2) Os flavonoides, isolados ou combinados, irão induzir a atividade de fosfatase alcalina e a formação de nódulos de mineralização.

3 Material e Métodos

3.1 Delineamento do estudo - Flavonoides e controles

Os seguintes flavonoides foram avaliados neste estudo: Quercetina (#Q4951), Miricetina (#M6760), Taxifolina (#78666), Isoquercitrina (#17793), Rutina (#R5143), Ampelopsina (SM10295), EGCG (#E4143), Pinocebrina (#P5239), Crisina (#95082) e Canferol (#K0133) que foram obtidos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO/ USA). Os flavonoides quercetina e miricetina foram selecionados baseado no seu amplo potencial terapêutico. Em seguida, foram selecionados derivados desses flavonoides com o intuito de permitir um estudo da relação estrutura-atividade (REA) com vistas para o futuro planejamento de análogos sintéticos baseados nas melhores características dos naturais. As soluções estoques dos flavonoides foram preparadas e congeladas em dimetilsulfoxico (DMSO). Como controles, foram utilizados o hidróxido de cálcio PA (HC) (Biodinâmica, Ibiporã – PR/BR) dissolvido em solução salina (a 1mg/mL), meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contendo DMSO na concentração utilizada para o preparo dos flavonoides (até 5%) para os ensaios de resazurina e DMEM osteogênico (MO) suplementado com 50 µg/mL de ácido ascórbico, 10 nmol/L de beta glicerofosfato e 1,8 mmol/L de KH₂PO₄ para os ensaio de fosfatase alcalina e formação de nódulos mineralizados. Todos os compostos foram esterilizados por filtração em filtro de membrana de 0,22 µm e os ensaios foram realizados em triplicata, em três dias independentes. A **Figura 1** mostra as estruturas químicas dos flavonoides que foram selecionados para o presente estudo.

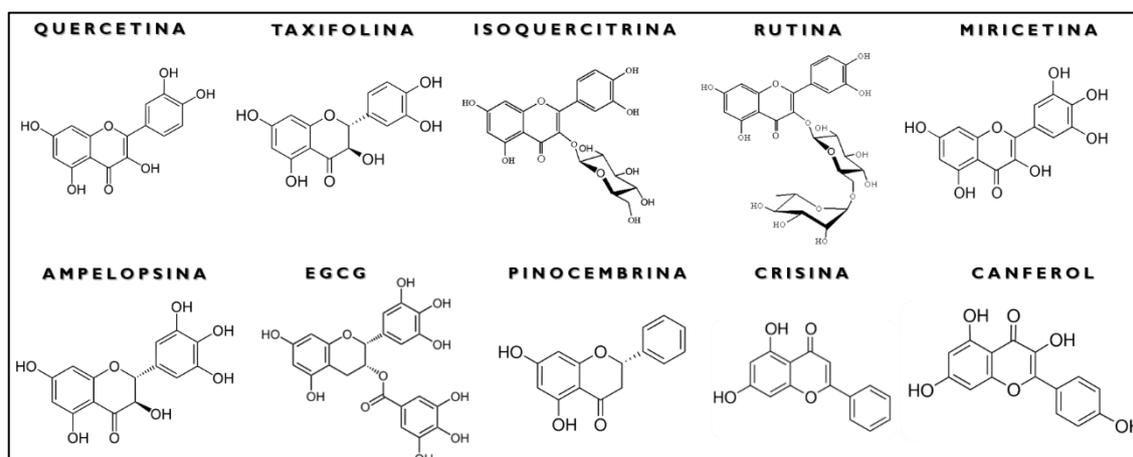


Figura 1. Estrutura química dos flavonoides selecionados para este estudo.

3.2 Avaliação do metabolismo celular por meio de ensaios de coloração de resazurina

Neste estudo foram avaliados osteoblastos humanos da linhagem Saos-2 (ATCC, Manassas, Va., USA). As células foram cultivadas em meio de cultura DMEM contendo soro fetal bovino (SFB) a 10 % (Gibco), 100 UI/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mmol/L de glutamina em estufa a 5 % de CO₂ a 37 °C. Para esse primeiro experimento, as células foram semeadas (3x10³ células/por poço) em placa de microtitulação de 96 poços e pré-incubadas por 48 h. Em seguida, elas foram expostas a concentrações decrescentes dos flavonoides isolados (100, 50 e 25 µM) ou combinados (50/50 µM e 25/25 µM) por 48 h, para ser avaliado o metabolismo celular por colorimetria com resazurina (Sigma-Aldrich). Este método permite determinar a respiração celular (mitocondrial), considerando a taxa metabólica das células, permitindo monitoramento contínuo das culturas. Então, no quinto dia, o meio de cultura foi aspirado e substituído por 170 µL de DMEM e 30 µL de solução de resazurina (70 µM) e as células foram incubadas a 37°C durante 4 h. Após a incubação, 100 µL do meio de cultura com solução de resazurina foi transferido para uma nova placa de microtitulação para leitura da absorbância a 570 e 600 nm no espectrofotômetro

Para os seguintes experimentos, o cultivo das células foi em placa de microtitulação de 48 poços (3x10² células/por poço), sendo elas subcultivadas a cada 2 dias. Novamente, foi feita a incubação das células em contato com os flavonoides (100, 50 e 25 µM) ou combinados (50/50 µM e 25/25 µM) por 48 h, agora seguindo posteriores trocas de meio até completarem 8 e 14 dias. O DMEM osteogênico foi adicionado aos poços a partir da primeira troca de meio após 48 h de tratamento. No respectivo dia de cada experimento (fosfatase alcalina ou nódulos mineralizados), o meio de cultura também foi aspirado e substituído por 270 µL de DMEM e 30 µL de solução de resazurina (70 µM). Após a incubação da placa a 37°C durante 4 h, 100 µL do meio de cultura com solução de resazurina foi transferido para uma nova placa de microtitulação para leitura da absorbância a 570 e 600 nm no espectrofotômetro (Biotek, Winooski, VT). Em seguida, foram realizados os testes de fosfatase alcalina (8 dias) e a formação de nódulos mineralizados (14 dias).

3.3 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

O ensaio de fosfatase alcalina foi realizado seguindo as instruções do fabricante do kit ALP (Labtest Diagnóstico S.A., Lagoa Santa, MG, Brasil) e absorbância foi medida a 590 nm com um espectrofotômetro (Synergy H1). A atividade de ALP foi calculada através de uma curva padrão utilizando concentrações conhecidas de enzima. Os dados finais de ALP (% em relação ao controle DMEM osteogênico) foram divididos pelos valores obtidos de viabilidade celular pelo método da resazurina (% em relação ao controle DMEM osteogênico) para a normalização dos resultados de ALP.

3.4 Formação de nódulos mineralizados

Após o tratamento com os flavonoides por 48 h e troca do meio DMEM osteogênico por 14 dias, posteriormente à análise da viabilidade celular com Resazurina, o meio de cultura foi aspirado, os poços lavados com PBS (tampão fosfato-salino) e a capacidade de formação de nódulos de mineralização foi avaliada por coloração com vermelho de alizarina S (Sigma-Aldrich), de acordo com Soares et al. (2014). Em resumo, 40 mmol/L de vermelho de alizarina S foi preparado em água destilada, ajustado à um pH de 4,2 com hidróxido de amônia e, em seguida, aplicado às células durante 20 minutos à temperatura ambiente com agitação suave. As células foram lavadas com água destilada e deixadas secando. Imagens da cultura corada com vermelho de alizarina S foram obtidas utilizando microscópio invertido e a intensidade da coloração foi analisada utilizando um programa de análise de imagem o programa Image J 1.48 (NIH, Bethesda, MA, USA). Após obtenção das imagens, 10% de cloreto de cetilpiridínio em PBS foi adicionado aos poços (500 µl) e deixados sob agitação por 15 min. 100 µL de cada poço foram transferidos para um leitor de microplacas e os valores obtidos através do comprimento de onda de 562 nm. Os resultados em valores absolutos foram convertidos em % considerando o controle DMEM osteogênico como 100%. Os dados finais de deposição de nódulos de mineralização (% em relação ao controle DMEM osteogênico) foram divididos pelos valores obtidos de viabilidade celular pelo método da resazurina (% em relação ao controle DMEM osteogênico) para a normalização dos resultados.

3.5 Análise dos resultados

Os dados foram analisados no programa estatístico SPSS 17.0 (IBM Inc, USA). Os valores dos dados apresentaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias pelo método de Shapiro-Wilk, e as variáveis foram submetidas à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparar entre os grupos e/ou concentrações ou teste de Dunnett para comparar entre cada grupo e o controle. Todas as análises foram adotadas considerando um nível de significância de 5%.

4 Resultados

4.1 Flavonoides isolados

4.1.1 Avaliação da viabilidade celular – Resazurina

As figuras (2, 3, 4) mostram os resultados da viabilidade celular obtidos pelo método da resazurina. No primeiro período do estudo avaliou-se o metabolismo celular nas primeiras 48 h após a exposição das células aos compostos, seguidas as análises no 8º e 14º dias de subcultivo. Nota-se que somente o flavonoide crisina a 100 µM manteve seu efeito citotóxico mesmo após 14 dias de avaliação. Os demais flavonoides e controle HC não causaram citotoxicidade em nenhuma concentração e tempos avaliados.

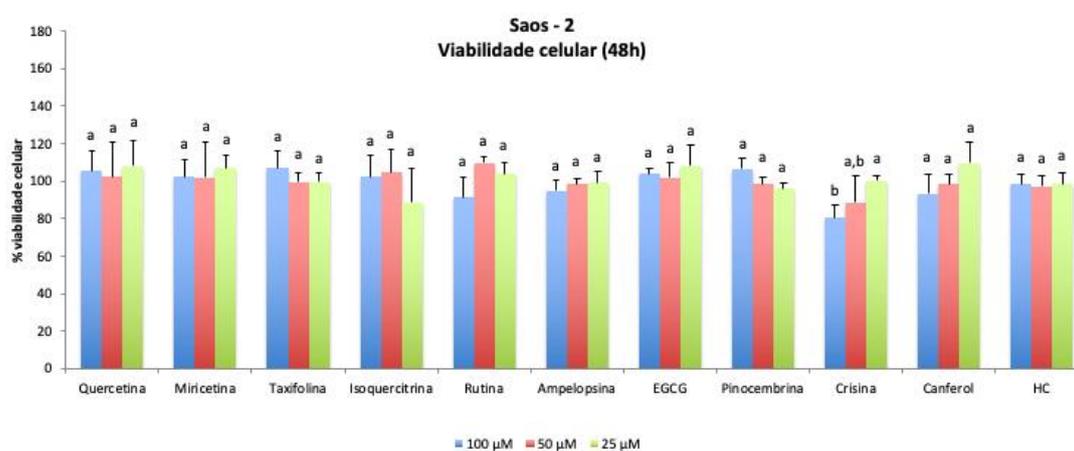


Figura 2. Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides isolados por 48 h, obtida por meio dos ensaios de resazurina. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). HC: hidróxido de cálcio.

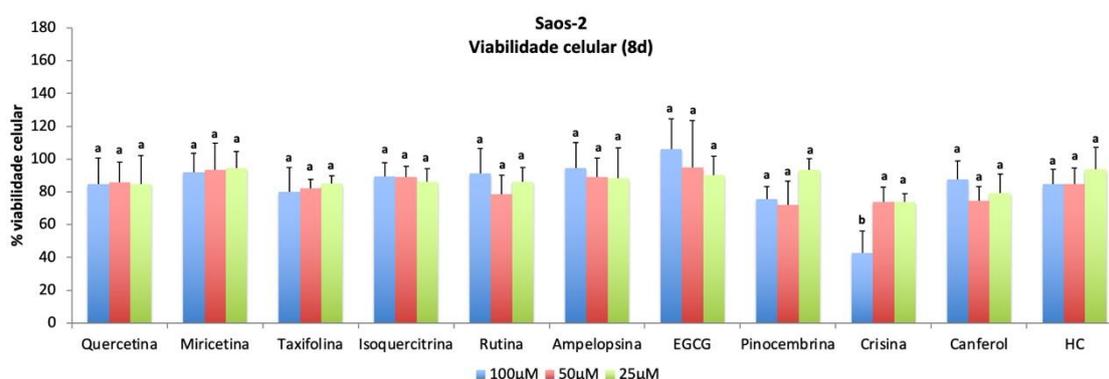


Figura 3. Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides isolados por 48 h e avaliação após 8 dias, obtida por meio dos ensaios de resazurina. ^aLetras

minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). HC: hidróxido de cálcio.

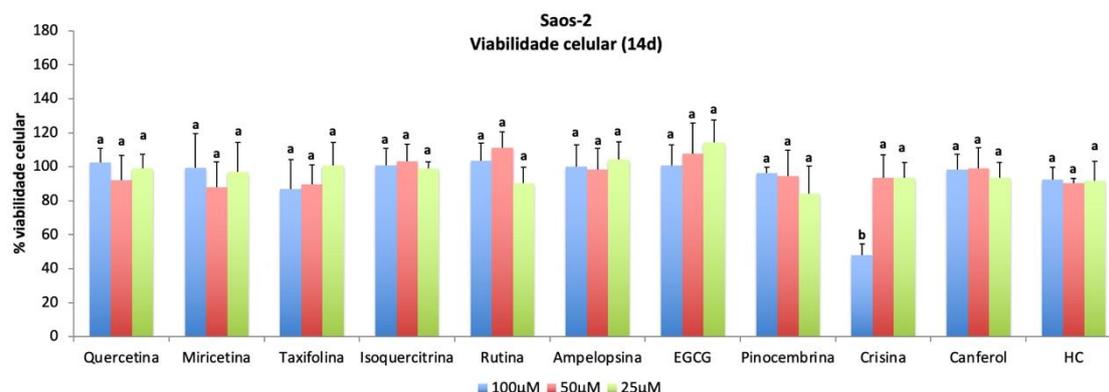


Figura 4. Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides isolados por 48 h e avaliação após 14 dias, obtida por meio dos ensaios de resazurina. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). HC: hidróxido de cálcio.

4.1.2 Atividade de fosfatase alcalina

A normalização dos resultados da atividade de ALP foi realizada pelos ensaios de viabilidade celular utilizando o método de resazurina. De acordo com a **Figura 5**, a taxifolina a 100 e 50 μM induziu maior atividade de ALP, seguida da isoquercitrina a 50 e 25 μM , rutina de 100 a 25 μM , ampelopsina de 100 a 25 μM e EGCG a 100 μM . A solução de hidróxido de cálcio também induziu a atividade de ALP, com diferença estatística entre os grupos 100, 50 e 25 μM quando comparados ao controle.

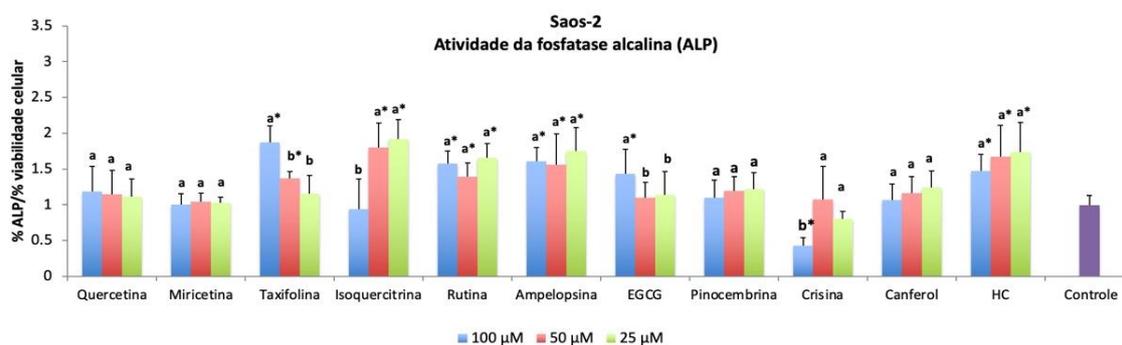


Figura 5. Atividade de fosfatase alcalina das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides isolados por 48 h e avaliação após 8 dias. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os

testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). *Diferença estatística entre cada grupo e o controle DMEM, segundo os testes de Dunnett ($p < 0,05$). HC: hidróxido de cálcio.

4.1.3 Formação de nódulos mineralizados

Os compostos que induziram maior deposição de nódulos de mineralização foram a ampelopsina de 100 a 25 μM , isoquercitrina 50 e 25 μM , rutina de 100 a 25 μM , pinocembrina a 25 μM e miricetina a 100 e 50 μM (**Figura 6**). O controle HC, em todas as concentrações testadas, também estimulou maior deposição de nódulos que controle DMEM osteogênico.

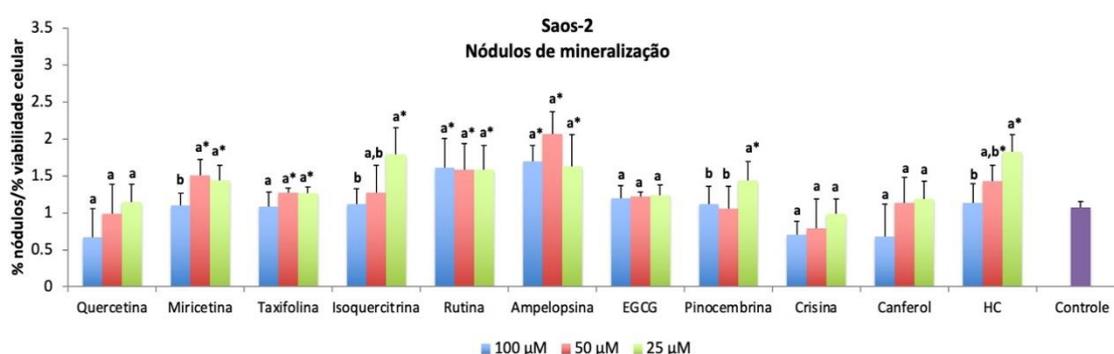


Figura 6. Quantificação dos nódulos de mineralização formados após tratamento com os flavonoides isolados por 48 h e avaliação após 14 dias. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). *Diferença estatística entre cada grupo e o controle DMEM, segundo os testes de Dunnett ($p < 0,05$). HC: hidróxido de cálcio.

Nas figuras a seguir, é possível observar os nódulos mineralizados corados com vermelho de alizarina. Observa-se grande quantidade de nódulos induzidos pela ampelopsina a 50 μM (9J), rutina a 50 μM (9H) e isoquercitrina 25 μM (9G), diferentemente do que é notado na figura 9 D/E referentes à taxifolina 50 μM e 25 μM .

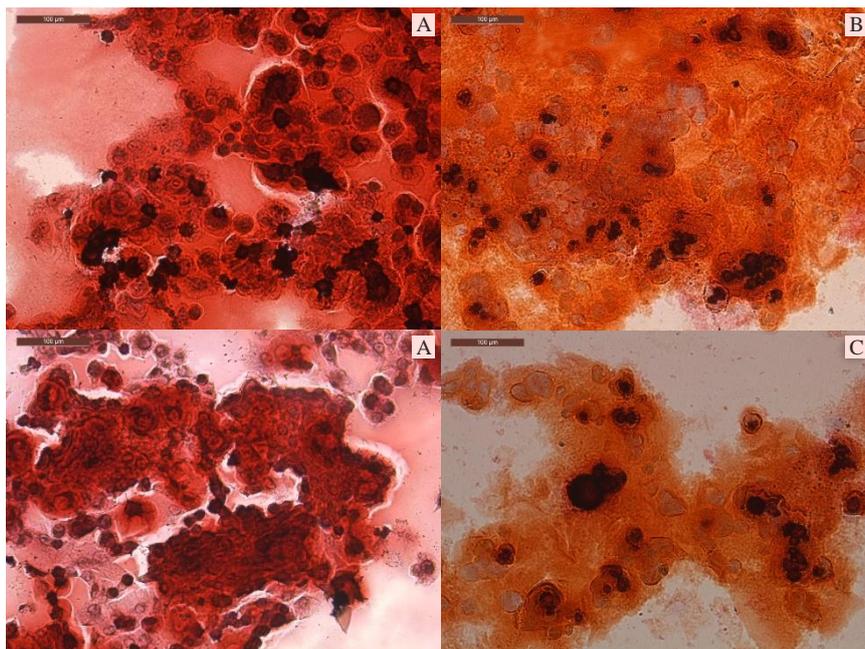


Figura 7. Imagens representativas da coloração de vermelho de alizarina S para os grupos controles DMEM osteogênico (A) e hidróxido de cálcio a 50 μM (B) e 25 μM (C).

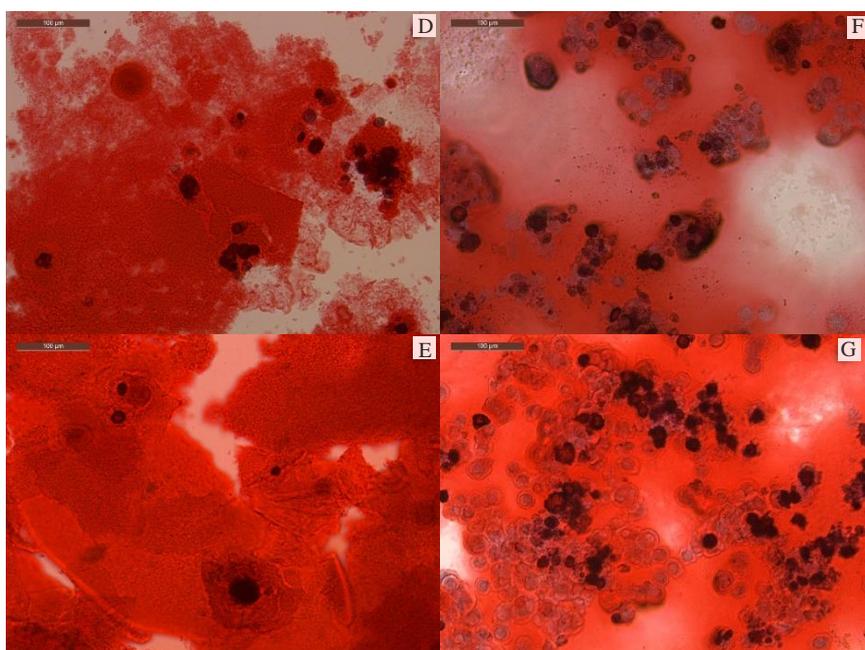


Figura 8. Imagens representativas da coloração de vermelho de alizarina S para os grupos Taxifolina a 50 μM (D) e 25 μM (E) e Isoquercitrina também a 50 μM (F) e 25 μM (G).

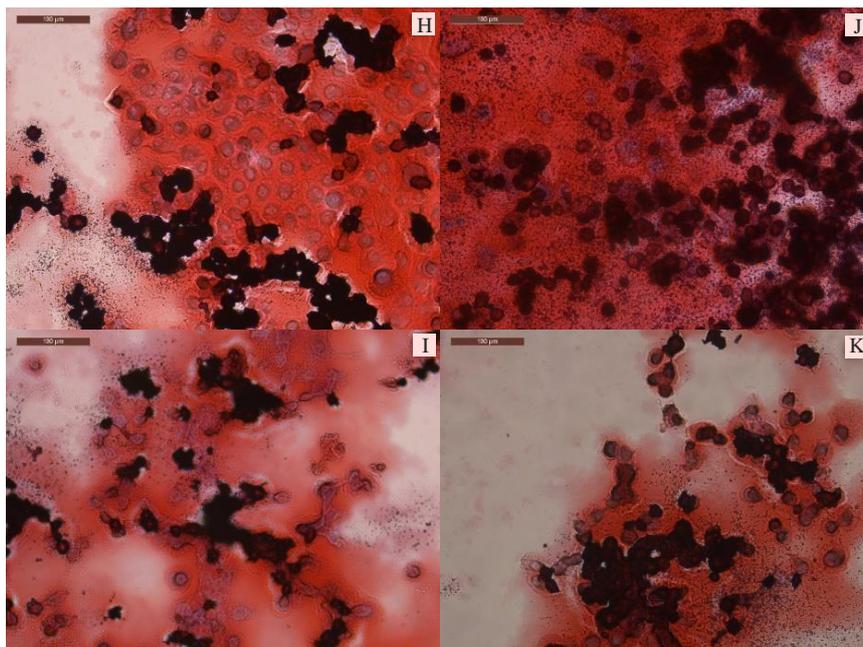


Figura 9. Imagens representativas da coloração de vermelho de alizarina S para os grupos Rutina a 50 μM (H) e 25 μM (I) e Ampelopsina também a 50 μM (J) e 25 μM (K).

4.2 Flavonoides combinados

4.2.1 Avaliação da viabilidade celular – Resazurina

Os critérios utilizados para selecionar os flavonoides taxifolina, isoquercitrina, ampelopsina e rutina a serem combinados foram a citocompatibilidade, a capacidade de induzir a atividade da fosfatase alcalina e a formação de nódulos mineralizados quando foram avaliados isoladamente.

Em relação a viabilidade celular, as células mantiveram sua viabilidade acima de 80%, quando submetidas à todas as combinações propostas em todos os períodos avaliados, 48 h, 8 dias e 14 dias e em ambas as concentrações, 50/50 μM e 25/25 μM .

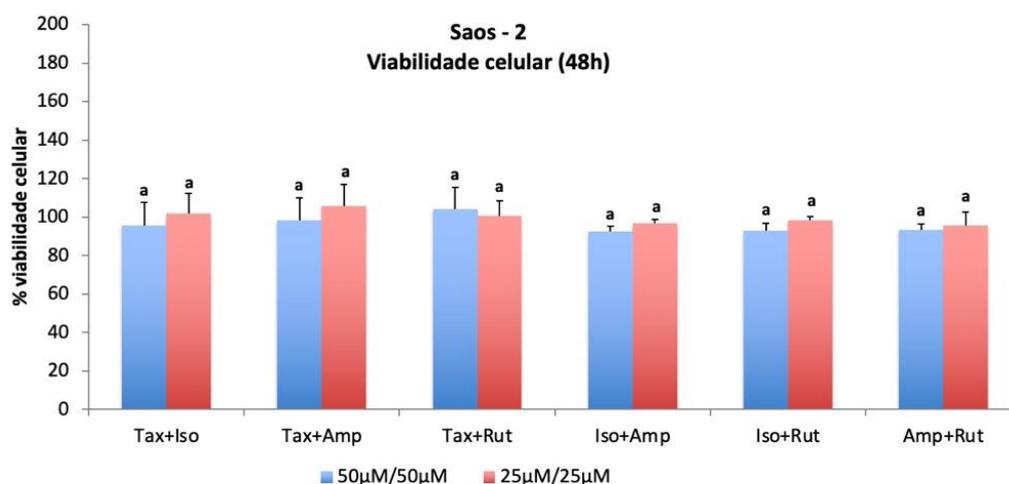


Figura 10. Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides combinados por 48 h, obtida por meio dos ensaios de resazurina. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada combinação isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Tax: taxifolina; Iso: isoquercitrina; Amp: ampelopsina; Rut: rutina.

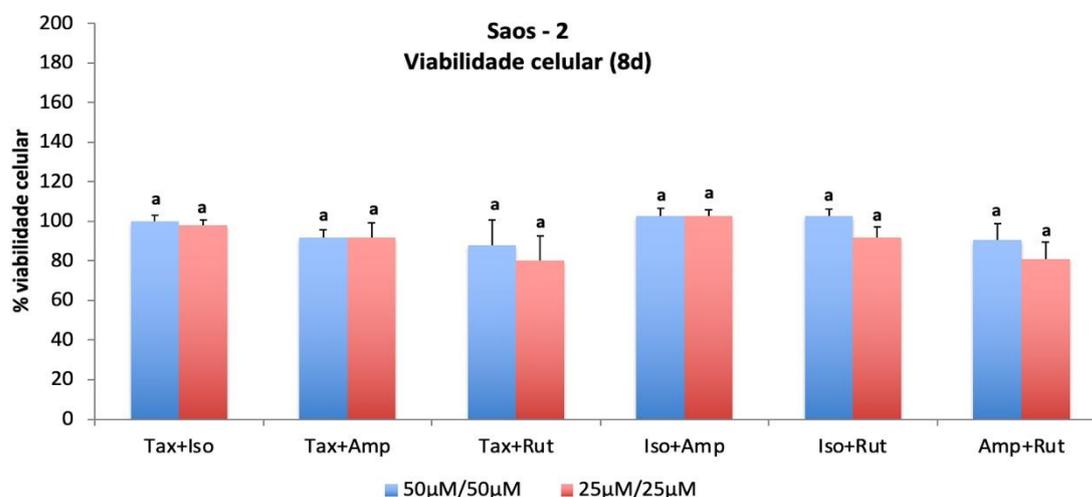


Figura 11. Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides combinados por 48 h e avaliação após 8 dias, obtida por meio dos ensaios de resazurina. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada combinação isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Tax: taxifolina; Iso: isoquercitrina; Amp: ampelopsina; Rut: rutina.

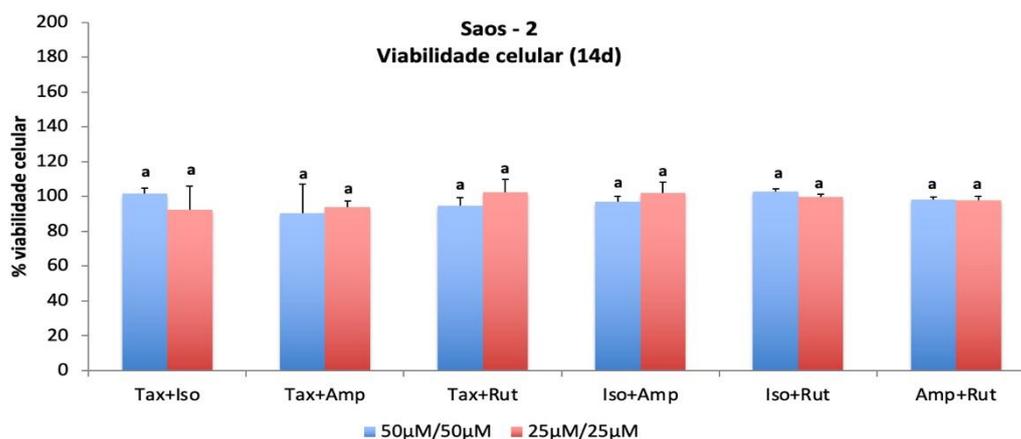


Figura 12. Viabilidade das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides combinados por 48 h e avaliação após 14 dias, obtida por meio dos ensaios de resazurina. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada combinação isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). Tax: taxifolina; Iso: isoquercitrina; Amp: ampelopsina; Rut: rutina.

4.2.2 Atividade de fosfatase alcalina (ALP)

As combinações que mais induziram ALP foram aquelas nas concentrações 25/25 µM de cada flavonoide. Além disso, notou-se que as combinações que apresentavam taxifolina foram as que exibiram maior indução de ALP, como Tax+Iso, Tax+Amp e Tax+Rut.

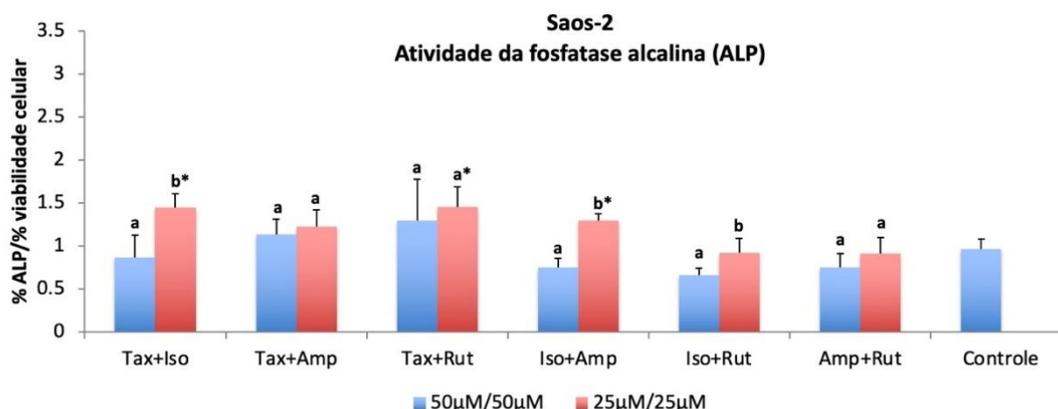


Figura 13. Atividade de fosfatase alcalina das células Saos-2 após tratamento com os flavonoides combinados por 48 h e avaliação após 8 dias. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente,

segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). *Diferença estatística entre cada grupo e o controle DMEM, segundo os testes de Dunnett ($p < 0,05$). Tax: taxifolina; Iso: isoquercitrina; Amp: ampelopsina; Rut: rutina.

4.2.3 Formação de nódulos mineralizados

Quanto à formação de nódulos mineralizados, os compostos combinados nas concentrações 25/25 μM de cada flavonoide estimularam as células Saos-2, sendo que as combinações Tax+Iso, Tax+Amp e a Tax+Rut tiveram melhores resultados. Esses resultados podem ser observados nas imagens da figura 15, em que os nódulos estão corados com vermelho de alizarina.

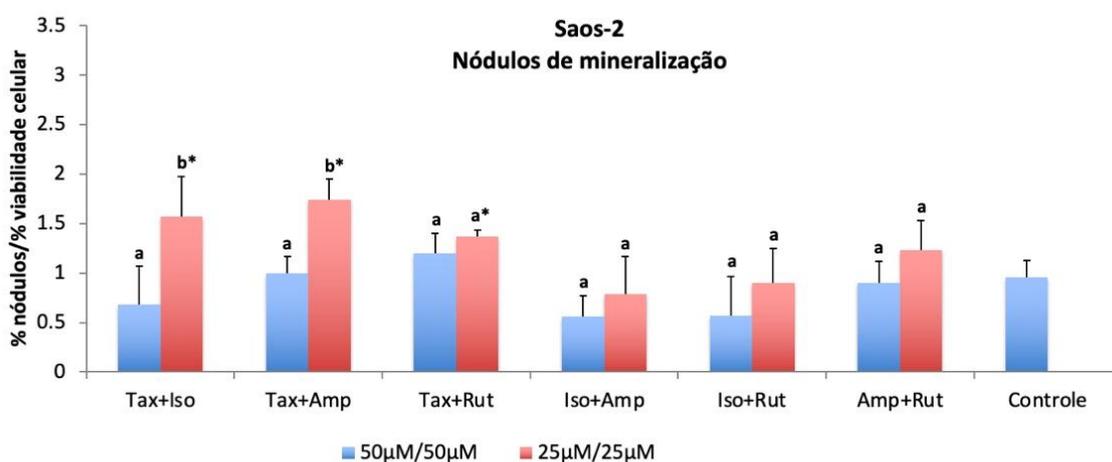


Figura 14. Quantificação dos nódulos de mineralização formados após tratamento com os flavonoides combinados por 48 h e avaliação após 14 dias. ^aLetras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre as concentrações, considerando cada composto isoladamente, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$). *Diferença estatística entre cada grupo e o controle DMEM, segundo os testes de Dunnett ($p < 0,05$). Tax: taxifolina; Iso: isoquercitrina; Amp: ampelopsina; Rut: rutina.

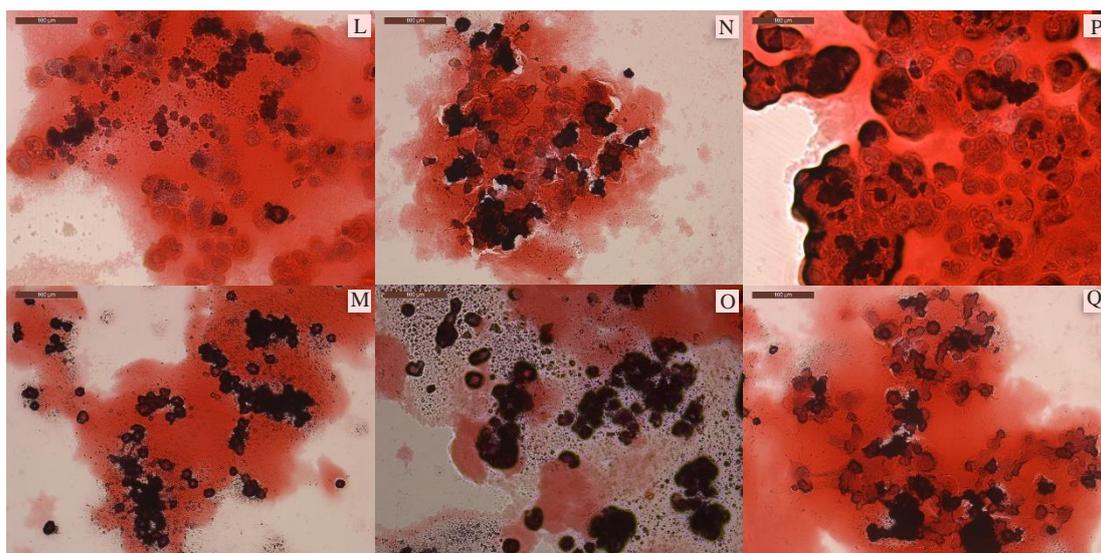


Figura 15. Imagens representativas da coloração de vermelho de alizarina S para os grupos: Tax+Iso 50/50 μM (L) e 25/25 μM (M); Tax+Amp 50/50 μM (N) e 25/25 μM (O); e Tax+Rut 50/50 μM (P) e 25/25 μM (Q). *Tax*: taxifolina; *Iso*: isoquercitrina; *Amp*: ampelopsina; *Rut*: rutina.

5 DISCUSSÃO

Em relação a viabilidade celular, a maioria dos compostos não foi citotóxica nas concentrações testadas (viabilidade acima de 80%, conforme Normas ISO 10993-12-2012). Entretanto, o único composto que apresentou menor porcentagem de viabilidade celular foi a crisina, mantendo seu efeito citotóxico até 14 dias. De modo contrário, Zeng et al. (2013) trataram células MC3T3-E1 com crisina até 100 μM por até 96 h e não observaram efeito citotóxico pelo método da enzima LDH (desidrogenase láctica).

A isoquercitrina não afetou significativamente a viabilidade de Saos-2 e suas concentrações mais baixas 25 e 50 μM estimularam a atividade de ALP e a deposição de nódulos de mineralização. No trabalho de Wang e colaboradores (2014), este composto a 1 e 3 μM induziu uma mineralização significativa em células Saos-2 através do ensaio com o corante de alizarina. E também, em concentrações menores (0,1 e 0,3 μM), juntamente com o polímero polyP (3, 10, 30 e 100 μM), potencializou o efeito deste último na deposição de nódulos pelos osteoblastos. No estudo de Li et al. (2019), a isoquercitrina também induziu a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais derivadas da medula óssea, promoveu a proliferação celular, atividade de ALP e formação de nódulos de mineralização na faixa de concentração de 0,01 a 1 μM de osteoblastos. O comportamento positivo desse flavonoide ao modular a formação mineral por células osteoblásticas deve-se à ativação do fator de transcrição de ativação 6 e do homólogo oncogene Ets 1 (Wang et al., 2014) e além de desempenhar um papel ativo na diferenciação osteogênica de osteoblastos e células-tronco mesenquimais da medula óssea humana (hBMSCs) via RUNX2 ou via BMP (Li et al., 2019).

No presente estudo, a taxifolina apresentou o melhor efeito sobre a atividade de ALP nas concentrações de 100 e 50 μM e efeito positivo sobre a deposição de nódulos de mineralização pelas células Saos-2. Os estudos que avaliaram o potencial estimulador da taxifolina na diferenciação osteoblástica em meio osteogênico utilizaram concentrações semelhantes às do presente estudo e também não mostraram citotoxicidade (Satué et al., 2013; Wang et al., 2017). Em estudo de Wang et al. (2017), o tratamento com taxifolina aumentou a diferenciação osteogênica de hBMSCs sem apresentar citotoxicidade, além de estimular a atividade da fosfatase alcalina nas

concentrações 50 e 100 μM e a produção de nódulos mineralizados, como no presente estudo. Os autores sugeriram que o efeito osteogênico da taxifolina está relacionado à supressão da via de sinalização do NF- $\text{K}\beta$. A via de sinalização do NF- $\text{K}\beta$ é ativada quando RANKL - uma citocina expressa em osteoblastos - é ligada a um receptor RANK, expresso em células progenitoras de osteoclastos. A ativação da via de sinalização do NF- $\text{K}\beta$ pode promover a indução de genes de diferenciação de osteoclastos, sobrevivida prolongada dos osteoclastos, aumento da reabsorção óssea, diminuição da diferenciação osteogênica e formação óssea. A ligação entre RANK e RANKL pode ser bloqueada pela osteoprotegerina quando se liga a RANKL, regulando a formação de osteoclastos e, conseqüentemente, diminuindo a progressão da lesão (Krum et al., 2010).

Também pode-se observar neste estudo que a quercetina e alguns derivados como miricetina, canferol e outros flavonoides como crisina e pinocembrina não diferiram do controle DMEM quanto à atividade de ALP. De modo diferente, no trabalho de Prouillet e colaboradores (2004), osteoblastos humanos da linhagem MG-63 foram tratados com quercetina e canferol a 50 μM e ambos os compostos aumentaram a atividade de ALP 1,5 e 1,7 vezes quando comparados com os grupos controles, de maneira tempo e dose dependentes, após 48 horas de tratamento. Os autores sugerem que os efeitos estimuladores destes flavonoides podem ser atribuídos à interação entre eles e o receptor de estrogênio, apresentando naturalmente ação positiva contra a perda óssea.

Por ser considerada um marcador precoce de diferenciação de células osteoblásticas, a atividade de ALP geralmente é aumentada no estágio de diferenciação e diminui durante a progressão da mineralização (Aubin, 2001). E então quando atinge o processo de formação de nódulos mineralizados, ocorre a proliferação das células, o desenvolvimento da matriz extracelular e a mineralização, que são as três principais fases do desenvolvimento (Aubin, 1998). Neste estudo, o composto EGCG induziu a atividade de ALP a 100 μM , entretanto nessa mesma concentração não diferiu do controle quanto à indução de nódulos mineralizados. Embora, em nosso estudo não tenhamos verificado essa correlação entre ALP e nódulos para o composto EGCG, no trabalho de Vali e colaboradores (2007), após 2 e 8 dias de tratamento com 5 μM de EGCG, as células Saos-2 apresentaram aumento significativo na atividade de ALP. Também foram formados nódulos de mineralização mesmo com a baixa concentração

de 1 μM de EGCG no 17º dia após o plantio das células. Possivelmente, EGCG tenha melhor efeito sobre a mineralização em concentrações abaixo das testadas no presente estudo.

Quanto à formação de nódulos mineralizados, os compostos miricetina, taxifolina, isoquercitrina, rutina, ampelopsina e a pinocembrina, em concentrações variadas, tiveram efeito superior ao controle meio osteogênico. No estudo de Huang e colaboradores (2013), o efeito de diferentes flavonoides foi avaliado sobre a diferenciação e proliferação de as células primárias de medula óssea de camundongo em osteoblastos. Um dos tratamentos foi a ampelopsina, que nas concentrações de 10, 15 e 20 μM , aumentou 1,1, 1,9 e 2,8 vezes a atividade de ALP quando comparada ao grupo controle. Além disso, a ampelopsina também estimulou maior deposição de nódulos de mineralização quando comparada ao controle, quando avaliada pelo ensaio de vermelho de alizarina. Em outro estudo, a ampelopsina foi avaliada em apenas duas concentrações, 0,1 e 50 μM , quanto à diferenciação osteogênica das células-tronco mesenquimais ósseas. Mesmo apresentando grande diferença entre as concentrações, ambos os valores aumentaram a atividade de ALP no sétimo dia de tratamento e a deposição de nódulos de mineralização quando comparados ao grupo controle (Zhang et al., 2016). A rutina também foi avaliada nas concentrações 25 e 50 μM e levou à maior deposição mineral e à maior atividade de fosfatase alcalina pelas células Saos-2 (Nash et al., 2016). Esse mesmo flavonoide, no trabalho de Liu e colaboradores (2021), a uma concentração de 0,1 mmol / L, induziu atividade da enzima ALP e formação de nódulos em células precursoras de osteoblastos de camundongo MC3T3-E1.

No nosso trabalho, ao combinar os compostos, estes se mantiveram citocompatíveis em relação à viabilidade celular. O comportamento deles isolados refletiu nos ensaios de fosfatase alcalina e de nódulos mineralizados das combinações, sendo as menores concentrações mais efetivas, ou seja, 25/25 μM . Outro ponto a se destacar quanto a esses dois últimos ensaios, foi o fato das melhores concentrações conter a taxifolina. Por isso, mesmo que os resultados das combinações sejam semelhantes aos compostos isolados nas menores concentrações, acredita-se que seja uma vantagem a união desses flavonoides, pois assim é possível, em um aspecto mais amplo e sistêmico, somar as melhores propriedades individuais de cada composto.

Na literatura ainda não foram descritos estudos em células osteoblásticas

utilizando as mesmas combinações aqui relatadas, entretanto alguns trabalhos testaram flavonoides combinados em outras metodologias e temáticas. No trabalho de Tang e colaboradores (2010), o EGCG isolado ou em combinação com a quercetina inibiu a invasão, migração e transição epitélio-mesenquimal de células-tronco tumorais em estudo *in vitro* de linhagem de células de câncer de próstata humano. Além disso, outro estudo mostrou que a quercetina juntamente com o extrato de chá verde, vitamina C, aminoácidos e outros micronutrientes apresentaram efeito anticâncer (Niedzwiecki et al., 2016).

Os mecanismos de ação dos flavonoides sobre a formação óssea ainda não foram completamente esclarecidos. Há indícios que a ativação de canais de cálcio dos osteoblastos influencia o transporte de sinal celular (Jorgensen et al., 2003), a reabsorção óssea (Ritchie et al., 1994) e a proliferação celular (Riddle et al., 2006). A vitamina D (Bergh et al., 2006), o hormônio da paratireóide (Li et al., 1997) e outros agentes reguladores podem intermediar as trocas de Ca^{2+} nos canais de cálcio do tipo L como o CaV1.2, no interior dos osteoblastos. Saponara et al. (2011) avaliou diversos flavonoides e 24 deles foram ativadores ou desativadores da corrente do canal CaV1.2, medida em miócitos da artéria da cauda de rato. Estudo recente de Chan e colaboradores (2020), por meio da relação quantitativa estrutura-atividade, confirmou e validou a capacidade de formação óssea dos flavonóides através da ativação e inibição osteoblástica do canal de cálcio controlado por voltagem (CaV).

Mais estudos são necessários para identificar os principais mecanismos de ação dos flavonoides isolados e combinados, incluindo ensaios de expressão de genes envolvidos na mineralização óssea, além de buscar alternativas de veículos para a aplicação clínica futura desses compostos.

6 Conclusão

Sugere-se que os flavonoides, taxifolina (50 μM), isoquercitrina (50 e 25 μM), rutina (100, 50 e 25 μM) e ampelopsina (100, 50 e 25 μM), e combinações de taxifolina, demonstraram efeito bioestimulador e indutor de mineralização em células Saos-2, podendo ser consideradas substâncias biotivas promissoras capazes de estimular osteoblastos a realizarem neoformação óssea.

Referências bibliográficas

1. Asawahame C, Sutjarittangtham K, Eitssayeam S, Tragoolpua Y, Sirithunyalug B, Sirithunyalug J. Antibacterial Activity and Inhibition of Adherence of *Streptococcus mutans* by Propolis Electrospun Fibers. AAPS PharmSciTech. 2014 Sep 23.
2. Aubin JE. Advances in the osteoblast lineage. Biochem Cell Biol. 1998;76(6):899-910.
3. Aubin JE. Regulation of osteoblast formation and function. Rev Endocr Metab Disord. 2001 Jan;2(1):81-94.
4. Bahuguna R, Jain A, Khan SA, Arvind MS. Role of odanacatib in reducing bone loss due to endodontic disease: An overview. J Int Soc Prev Community Dent. 2016 Dec;6(Suppl 3):S175-S181.
5. Bergh JJ, Shao Y, Puente E, Duncan RL, Farach-Carson MC. Osteoblast Ca(2+) permeability and voltage-sensitive Ca(2+) channel expression is temporally regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) Am J Physiol Cell Physiol. 2006;290(3):C822-C831.
6. Burmester A, Luthringer B, Willumeit R, Feyerabend F. Comparison of the reaction of bone-derived cells to enhanced MgCl₂-salt concentrations. Biomaterials. 2014;4:e967616.
7. Cai L, Wu CD. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. J Nat Prod. 1996 Oct;59(10):987-90.
8. Canada AT, Giannella E, Nguyen TD, Mason RP. The production of reactive oxygen species by dietary flavonols. Free Radic Biol Med. 1990;9(5):441-9.
9. Chan K, Leung HCM, Tsoi JK. Predictive QSAR model confirms flavonoids in Chinese medicine can activate voltage-gated calcium (CaV) channel in osteogenesis. Chin Med. 2020 Mar 31;15:31.
10. Chatzopoulou A, Karioti A, Gousiadou C, Lax Vivancos V, Kyriazopoulos P, Golegou S, Skaltsa H. Depsides and other polar constituents from *Origanum dictamnus* L. and their *in vitro* antimicrobial activity in clinical strains. J Agric Food Chem. 2010 May 26;58(10):6064-8.
11. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2005 Nov;26(5):343-56.

-
12. de Souza RF, De Giovani WF. Antioxidant properties of complexes of flavonoids with metal ions. *Redox Rep.* 2004;9(2):97-104.
 13. Deschner EE, Ruperto J, Wong G, Newmark HL. Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. *Carcinogenesis.* 1991 Jul;12(7):1193-6.
 14. Devi KP, Malar DS, Nabavi SF, Sureda A, Xiao J, Nabavi SM, Daglia M. Kaempferol and inflammation: From chemistry to medicine. *Pharmacol Res.* 2005;99:1-10.
 15. Ferreira LC, Grabe-Guimarães A, de Paula CA, Michel MC, Guimarães RG, Rezende SA, de Souza Filho JD, Saúde-Guimarães DA. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*. *J Ethnopharmacol.* 2013 Jan 9;145(1):100-8.
 16. Fu RH, Liu SP, Chu CL, Lin YH, Ho YC, Chiu SC, Lin WY, Shyu WC, Lin SZ. Myricetin attenuates lipopolysaccharide-stimulated activation of mouse bone marrow-derived dendritic cells through suppression of IKK/NF- κ B and MAPK signalling pathways. *J Sci Food Agric.* 2013 Jan 15;93(1):76-84.
 17. Ganeshpurkar A, Saluja AK. The Pharmacological Potential of Rutin. *Saudi Pharm J.* 2017 Feb;25(2):149-164.
 18. Guo A, Choi R, Zheng K, Chen V, Dong T, Wang Z-T, et al. Kaempferol as a flavonoid induces osteoblastic differentiation via estrogen receptor signaling. *Chin Med [Internet].* BioMed Central Ltd; 2012;7(1):10.
 19. Heijnen CG, Haenen GR, Oostveen RM, Stalpers EM, Bast A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. *Free Radic Res.* 2002 May;36(5):575-81.
 20. Holland R, Gomes JE Filho, Cintra LTA, Queiroz ÍOA, Estrela C. Factors affecting the periapical healing process of endodontically treated teeth. *J Appl Oral Sci.* 2017 Sep-Oct;25(5):465-476.
 21. Hsu Y-L, Chang J-K, Tsai C-H, Chien T-TC, Kuo P-L. Myricetin induces human osteoblast differentiation through bone morphogenetic protein-2/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Biochem Pharmacol.* 2007;73(4):504–14.
 22. Huang YL, Liu YW, Huang YJ, Chiou WF. A Special Ingredient (VtR) Containing Oligostilbenes Isolated from *Vitis thunbergii* Prevents Bone Loss in Ovariectomized Mice: *In Vitro* and *In Vivo* Study. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:409421.

-
23. Huo C, Wan SB, Lam WH, Li L, Wang Z, Landis-Piwowar KR, Chen D, Dou QP, Chan TH. The challenge of developing green tea polyphenols as therapeutic agents. *Inflammopharmacology*. 2008;16(5):248-52.
 24. International Standards Organization: ISO 10993-12:2012. Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity. 2ed. G eneve: ISO; 2012.
 25. Jaisinghani RN. Antibacterial properties of quercetin. *Microbiology research*. 2017 v. 8, n. 1.
 26. Jeong KW, Lee JY, Kang DI, Lee JU, Shin SY, Kim Y. Screening of flavonoids as candidate antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *J Nat Prod*. 2009 Apr;72(4):719-24.
 27. Jin P, Wu H, Xu G, Zheng L, Zhao J. Epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as a pro-osteogenic agent to enhance osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells from human bone marrow: an *in vitro* study. *Cell Tissue Res*. 2014;356(2):381–90.
 28. Jorgensen NR, Teilmann SC, Henriksen Z, Civitelli R, Sorensen OH, Steinberg TH. Activation of L-type calcium channels is required for gap junction-mediated intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Biol Chem*. 2003;278(6):4082–4086.
 29. Kanwal Q, Hussain I, Latif Siddiqui H, Javaid A. Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Nat Prod Res*. 2010 Dec;24(20):1907-14.
 30. Karygianni L, Wiedmann-Al-Ahmad M, Finkenzeller G, Sauerbier S, Wolkewitz M, Hellwig E, Al-Ahmad A. *Enterococcus faecalis* affects the proliferation and differentiation of ovine osteoblast-like cells. *Clin Oral Investig*. 2012 Jun;16(3):879-87.
 31. Kim JG, Son KM, Park HC, Zhu T, Kwon JH, Yang HC. Stimulating effects of quercetin and phenamil on differentiation of human dental pulp cells. *Eur J Oral Sci*. 2013;121(6):559–65.
 32. Ko SY. Myricetin suppresses LPS-induced MMP expression in human gingival fibroblasts and inhibits osteoclastogenesis by downregulating NFATc1 in RANKL-induced RAW 264.7 cells. *Arch Oral Biol*. 2012 Dec;57(12):1623-32.

-
33. Koeppen BH, Herrmann K. Flavonoid glycosides and hydroxycinnamic acid esters of blackcurrants (*Ribes nigrum*). Phenolics of fruits 9. Z Lebensm Unters Forsch. 1977 Aug 31;164(4):263-8.
 34. Krum SA, Chang J, Miranda-Carboni G, Wang CY. Novel functions for NFκB: inhibition of bone formation. Nat Rev Rheumatol. 2010 Oct;6(10):607-11.
 35. Kuo PL. Myricetin inhibits the induction of anti-Fas IgM, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta- mediated apoptosis by Fas pathway inhibition in human osteoblastic cell line MG-63. Life Sci. 2005;77(23):2964-76.
 36. Lee P, Tan KS. Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. Arch Oral Biol. 2015;60(3):393-9.
 37. Li J, Wang X, Wang Y, Lu C, Zheng D, Zhang J. Isoquercitrin, a flavonoid glucoside, exerts a positive effect on osteogenesis *in vitro* and *in vivo*. Chem Biol Interact. 2019 Jan 5;297:85-94.
 38. Li M, Zhang C, Li X, Lv Z, Chen Y, Zhao J. Isoquercitrin promotes the osteogenic differentiation of osteoblasts and BMSCs via the RUNX2 or BMP pathway. Connect Tissue Res. 2019 Mar;60(2):189-199.
 39. Li W, Duncan RL, Karin NJ, Farach-Carson MC. 1,25 (OH)₂D₃ enhances PTH-induced Ca²⁺ transients in preosteoblasts by activating L-type Ca²⁺ channels. Am J Physiol. 1997;273(3 Pt 1):E599-E605.
 40. Liu XW, Ma B, Zi Y, Xiang LB, Han TY. Effects of rutin on osteoblast MC3T3-E1 differentiation, ALP activity and Runx2 protein expression. Eur J Histochem. 2021 Jan 20;65(1):3195. doi: 10.4081/ejh.2021.3195.
 41. Mah Y-J, Song JS, Kim S-O, Lee J-H, Jeon M, Jung U-W, et al. The effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) on human alveolar bone cells both *in vitro* and *in vivo*. Arch Oral Biol. 2014;59(5):539-49.
 42. Mirzoeva OK, Grishanin RN, Calder PC. Antimicrobial action of propolis and some of its components: the effects on growth, membrane potential and motility of bacteria. Microbiol Res. 1997 Sep;152(3):239-46.
 43. Mittal AK, Kumar S, Banerjee UC. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. J Colloid Interface Sci. 2014 Oct 1;431:194-9.

-
44. Nakanishi T, Mukai K, Hosokawa Y, Takegawa D, Matsuo T. Catechins inhibit vascular endothelial growth factor production and cyclooxygenase-2 expression in human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2015;48(3):277–82.
 45. Nakanishi T, Mukai K, Yumoto H, Hirao K, Hosokawa Y, Matsuo T. Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *Eur J Oral Sci.* 2010;118(2):145–50.
 46. Nash LA, Peters SJ, Sullivan PJ, Ward WE. Supraphysiological levels of quercetin glycosides are required to alter mineralization in Saos-2 cells. *Int J Environ Res Public Health.* 2016 Apr 29;13(5):460.
 47. Natsume N, Yonezawa T, Woo JT, Teruya T. Effect of pinocembrin isolated from *Alpinia zerumbet* on osteoblast differentiation. *Cytotechnology.* 2020 Oct 7.
 48. Niedzwiecki A, Roomi MW, Kalinovsky T, Rath M. Anticancer efficacy of polyphenols and their combinations. *Nutrients.* 2016 Sep 9;8(9):552.
 49. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PA. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001 Oct;74(4):418-25.
 50. Nishiya Y, Kosaka N, Uchii M, Sugimoto S. A potent 1,4-dihydropyridine L-type calcium channel blocker, benidipine, promotes osteoblast differentiation. *Calcif Tissue Int.* 2002;70(1):30–39.
 51. Ong KC, Khoo HE. Biological effects of myricetin. *Gen Pharmacol.* 1997 Aug;29(2):121-6.
 52. Park HH, Lee S, Son HY, Park SB, Kim MS, Choi EJ, Singh TS, Ha JH, Lee MG, Kim JE, Hyun MC, Kwon TK, Kim YH, Kim SH. Flavonoids inhibit histamine release and expression of proinflammatory cytokines in mast cells. *Arch Pharm Res.* 2008 Oct;31(10):1303-11.
 53. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod.* 2000 Jul;63(7):1035-42.
 54. Pilsakova L, Riečanský I, Jagla F. The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol Res* 2010;59:651–64.
 55. Prouillet C, Mazière JC, Mazière C, Wattel A, Brazier M, Kamel S. Stimulatory effect of naturally occurring flavonols quercetin and kaempferol on alkaline phosphatase activity in MG-63 human osteoblasts through ERK and estrogen receptor pathway. *Biochem Pharmacol.* 2004 Apr 1;67(7):1307-13.

-
56. Qi Z, Yin F, Lu L, Shen L, Qi S, Lan L, Luo L, Yin Z. Baicalein reduces lipopolysaccharide-induced inflammation via suppressing JAK/STATs activation and ROS production. *Inflamm Res*. 2013 Sep;62(9):845-55.
 57. Rao YK, Fang SH, Tzeng YM. Inhibitory effects of the flavonoids isolated from *Waltheria indica* on the production of NO, TNF-alpha and IL-12 in activated macrophages. *Biol Pharm Bull*. 2005 May;28(5):912-5.
 58. Riddle RC, Taylor AF, Genetos DC, Donahue HJ. MAP kinase and calcium signaling mediate fluid flow-induced human mesenchymal stem cell proliferation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(3):C776–C784.
 59. Ritchie CK, Maercklein PB, Fitzpatrick LA. Direct effect of calcium-channel antagonists on osteoclast function—alterations in bone-resorption and intracellular calcium concentrations. *Endocrinology*. 1994;135(3):996–1003.
 60. Russo M, Spagnuolo C, Tedesco I, Bilotto S, Russo GL. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: facts and fancies. *Biochem Pharmacol*. 2012 Jan 1;83(1):6-15.
 61. Saponara S, Carosati E, Mugnai P, Sgaragli G, Fusi F. The flavonoid scaffold as a template for the design of modulators of the vascular Ca(v)1.2 channels. *Br J Pharmacol*. 2011;164(6):1684–1697.
 62. Satué M, Arriero Mdel M, Monjo M, Ramis JM. Quercitrin and taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. *Biochem Pharmacol*. 2013 Nov 15;86(10):1476-86.
 63. Seibel MJ. Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev*. 2005 Nov;26(4):97-122.
 64. Shahzad M, Millhouse E, Culshaw S, Edwards C a, Ramage G, Combet E. Selected dietary (poly) phenols inhibit periodontal pathogen growth and biofilm formation. 2015;6(3):719–29.
 65. Siqueira JF Jr, Guimarães-Pinto T, Rôças IN. Effects of chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite and intracanal medication with calcium hydroxide on cultivable bacteria in infected root canals. *J Endod*. 2007 Jul;33(7):800-5.
 66. Soares DG, Marcomini N, Basso FG, Pansani TN, Hebling J, de Souza Costa CA. Indirect cytocompatibility of a low-concentration hydrogen peroxide bleaching gel to odontoblast-like cells. *IntEndod J*. 2014 Dec 30.

-
67. Somerset SM, Johannot L. Dietary flavonoid sources in Australian adults. *Nutr Cancer*. 2008;60(4):442-9.
 68. Srivastava S, Bankar R, Roy P. Assessment of the role of flavonoids for inducing osteoblast differentiation in isolated mouse bone marrow derived mesenchymal stem cells. *Phytomedicine*. 2013 Jun 15;20(8-9):683-90.
 69. Tang SN, Singh C, Nall D, Meeker D, Shankar S, Srivastava RK. The dietary bioflavonoid quercetin synergizes with epigallocatechin gallate (EGCG) to inhibit prostate cancer stem cell characteristics, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition. *J Mol Signal*. 2010 Aug 18;5:14.
 70. Tijburg LB, Mattern T, Folts JD, Weisgerber UM, Katan MB. Tea flavonoids and cardiovascular disease: a review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 1997 Dec;37(8):771-85.
 71. Tripoli E, Guardia MA, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M 2007. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 104: 466-479.
 72. Vali B, Rao LG, El-Soheily A. Epigallocatechin-3-gallate increases the formation of mineralized bone nodules by human osteoblast-like cells. *J Nutr Biochem*. 2007 May;18(5):341-7.
 73. Wagoner J, Negash A, Kane OJ, Martinez LE, Nahmias Y, Bourne N, Owen DM, Grove J, Brimacombe C, McKeating JA, Pécheur EI, Graf TN, Oberlies NH, Lohmann V, Cao F, Tavis JE, Polyak SJ. Multiple effects of silymarin on the hepatitis C virus lifecycle. *Hepatology*. 2010 Jun;51(6):1912-21.
 74. Wang J, Sun GX, Yu L, Wu FA, Guo XJ. Enhancement of the selective enzymatic biotransformation of rutin to isoquercitrin using an ionic liquid as a co-solvent. *Bioresour Technol*. 2013 Jan;128:156-63.
 75. Wang SW, Wang YJ, Su YJ, Zhou WW, Yang SG, Zhang R, Zhao M, Li YN, Zhang ZP, Zhan DW, Liu RT. Rutin inhibits β -amyloid aggregation and cytotoxicity, attenuates oxidative stress, and decreases the production of nitric oxide and proinflammatory cytokines. *Neurotoxicology*. 2012 Jun;33(3):482-90.
 76. Wang X, Schröder HC, Feng Q, Diehl-Seifert B, Grebenjuk VA, Müller WE. Isoquercitrin and polyphosphate co-enhance mineralization of human osteoblast-like SaOS-2 cells via separate activation of two RUNX2 cofactors AFT6 and Ets1. *Biochem Pharmacol*. 2014 Jun 1;89(3):413-21.

-
77. Wang YJ, Zhang HQ, Han HL, Zou, YY, Gao QL, Yang GT. Taxifolin enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells partially via NF- κ B pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, 2017;490, 36-43.
 78. Weidmann AE. Dihydroquercetin: More than just an impurity? *Eur J Pharmacol*. 2012 Jun 5;684(1-3):19-26.
 79. Weng L, Zhang H, Li X, Zhan H, Chen F, Han L, Xu Y, Cao X. Ampelopsin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory response through the inhibition of the NF- κ B and JAK2/STAT3 signaling pathways in microglia. *Int Immunopharmacol*. 2017 Mar;44:1-8.
 80. Wollenweber E. Flavones and flavonols. *The Flavonoids: Advances in Research*. 1982 pp. 189-259.
 81. Yang L, Takai H, Utsunomiya T, Li X, Li Z, Wang Z, et al. Kaempferol stimulates bone sialoprotein gene transcription and new bone formation. *J Cell Biochem*. 2010;110(6):1342–55
 82. Ying X, Chen X, Feng Y, Xu HZ, Chen H, Yu K, et al. Myricetin enhances osteogenic differentiation through the activation of canonical Wnt/ β -catenin signaling in human bone marrow stromal cells. *Eur J Pharmacol*; 2014;738:22–30.
 83. Zeng W, Yan Y, Zhang F, Zhang C, Liang W. Chrysin promotes osteogenic differentiation via ERK/MAPK activation. *Protein Cell*. 2013 Jul;4(7):539-47.
 84. Zhang W, Wang S, Yin H, Chen E, Xue D, Zheng Q, Gao X, Pan Z. Dihydromyricetin enhances the osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells *in vitro* partially via the activation of Wnt/ β -catenin signaling pathway. *Fundam Clin Pharmacol*. 2016 Dec;30(6):596-606.