

*Roberto Gerosa
*Gianluca Menegazzi
*Paolo Filippini
*Giacomo Cavalleri

*Università degli Studi di Verona
Istituto di Clinica Odontoiatrica
Direttore: Prof. Paolo Gotte
Cattedra di Odontoiatria Conservatrice
Titolare: Prof. Giacomo Cavalleri

Corrispondenza:
Dr. Roberto Gerosa
Clinica Odontoiatrica
Università degli Studi di Verona
37134 Verona - Via delle Menegonne
Tel. 045/8074251 - Fax 045/8202142

Citotossicità dell'eugenolo puro

Cytotoxicity of pure eugenol

RIASSUNTO

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare la citotossicità dell'eugenolo puro (EG) *in vitro*, mediante diluizioni scalari in soluzione alcoolica e determinare la concentrazione massima non citotossica.

L'EG non è solubile in soluzione acquosa ma in diversi solventi organici (ad esempio alcoli, DMSO, esano etc.).

Abbiamo utilizzato soluzioni di EG in alcool etilico, che in tal modo diventa solubile in soluzioni acquose in tutte le proporzioni.

Prima di utilizzare l'alcool etilico come solvente per l'EG, è stata valutata la citotossicità dell'alcool stesso mediante una curva dose-risposta da una concentrazione di 0,017 M a 1,7 M (conc. finale nel medium cellulare) (Fig. 1).

Di seguito sono state preparate concentrazioni scalari di EG in soluzione alcoolica da una concentrazione di 0,015 microM ad una soluzione di 974 microM (conc. finale) aggiungendo 20 microL (0,34 M conc. finale alcool etilico) di tale soluzione in 1 ml di medium cellulare (Fig. 2).

Dal lavoro sperimentale è emerso che:

- 1) l'EG puro (privo di contaminanti) è risultato essere citotossico per i fibroblasti gengivali umani come già descritto ampiamente in precedenza da numerosi autori (1-7).
- 2) ad una concentrazione inferiore a 2 microM, l'EG in soluzione alcoolica non è citotossico.

Parole chiave: Citotossicità. Eugenolo.

ABSTRACT

The aim of this study was to measure the cytotoxicity of pure eugenol (EG) in an *in vitro* study by diluting it to various concentrations with an alcohol solution and then determining the maximum non-cytotoxic concentration.

EG is non-soluble in water solutions, whereas it is in various organic solvents (for example, certain alcohols, DMSO, and hexane). We used a solution of EG and

ethylic alcohol, which is soluble in water solutions in any given proportion.

Before utilizing the ethylic alcohol as a solvent for the EG, the cytotoxicity of the alcohol itself was determined by using a dose-response curve for concentrations between 0,017 M and 1,7 M (final, conc. of cell medium) (Fig. 1).

Various-strength concentrations of EG in alcohol solutions were then prepared between 0,015 microM and 974 microM (final conc.), and 20 microL (0,34 M final conc. of ethylic alcohol) of this solution were added to 1 ml of the cell medium (Fig. 2).

From our experiment we found that:

- 1) pure EG (no contaminants) proved toxic for human gingival fibroblasts, which confirms results published previously by other authors (1-7)
- 2) EG in an alcohol solution at concentrations of less than 2 microM is non-cytotoxic.

This experiment makes it possible for the authors to continue an ongoing study (15) to assess the cytotoxicity of several widely sold endodontic cements and the interaction of their various components, one of which is EG.

In fact, by knowing the maximum non-cytotoxic concentration of eugenol, it would be possible to reduce the concentrations indicated by the manufacturers for mixing different endodontic cements (without modifying their properties), thereby obtaining reduced cytotoxicity.

A review of the methods used by manufacturers to determine the quantity of EG could then be proposed, which would greatly improve the biological requisites of these cements.

Key words: Cytotoxicity. Eugenol.

INTRODUZIONE

L'eugenolo (4-allil-2-metossifenolo) è un composto fenolico naturale usato per insaporire i cibi e come agente profumante.

L'EG è il componente principale dei chiodi di garofano ed è presente in molti estratti ed olii vegetali.

Per le sue proprietà analgesiche ed anestetiche, è comunemente utilizzato assieme all'ossido di zinco (ZnO) in diversi materiali odontoiatrici come cementi, paste per impronte e paste chirurgiche (8-11).

L'EG inoltre è utilizzato dalla medicina tradizionale nei disturbi gastrointestinali e nei casi di diarrea cronica.

Per questo suo ampio utilizzo, l'EG è stato ampiamente studiato, sia dal punto di vista farmacologico che tossicologico (1-5, 12, 13).

Alcuni lavori riportano che la dose letale (LD50) in topi e ratti è di 3000 e 2680 mg/kg rispettivamente (14).

L'EG è stato visto causare degenerazione della mucosa e dell'epitelio dello stomaco di ratto, inibire l'attività della prostaglandina-sintetasi e la migrazione delle cellule polimorfonucleate (14).

Alcuni ricercatori hanno inoltre dimostrato una azione citotossica su epatociti di ratto (6), danni al DNA con mutazioni ed alterazioni cromosomiali in ratti (12), effetti tossici su tessuto polmonare di coniglio (7).

Ma nonostante siano presenti in letteratura numerosi studi su questo composto poco si sa sui meccanismi di tossicità e delle sostanze intermedie che si formano durante il suo metabolismo. Di recente alcuni autori hanno supposto che l'EG possa essere ossidato a radicale fenolico (che può essere ridotto nuovamente a fenolo dal glutathione GSH) (6, 14).

Questo radicale fenolico potrebbe successivamente essere sottoposto ad una estensiva polimerizzazione che dà luogo ad un complesso materiale insolubile.

Quest'ultimo verrebbe poi assemblato per dare LIGNINA, polimero ampiamente utilizzato dalle piante.

Alternativamente, il radicale fenolico dell'EG potrebbe essere ulteriormente ossidato a metide-chinone.

Questo è un metabolita molto reattivo che si lega covalentemente alle proteine, interagisce con il glutathione ridotto ed è altamente citotossico (6, 14).

MATERIALI E METODI

I materiali utilizzati sono stati: eugenolo puro "SIGMA E 5504", alcool etilico e si è utilizzato il metodo per la quantificazione della sopravvivenza cellulare secondo i criteri di Ulf Landegren da noi ripresi (15, 16) (Reagenti utilizzati: Merck).

È noto che l'EG è un fenolo idrofobico e pertanto prima di iniziare la sperimentazione è stato necessario, per metterlo a contatto con le cellule che sono sommerse in un medium acquoso, solubilizzarlo con un adeguato solvente organico.

Per tale motivo è stato necessario valutare la citotossicità intrinseca del solvente prescelto mettendo a contatto con le cellule concentrazioni scalari di alcool etilico da 0,017 M a 1,7 M (conc. finale) (Fig. 1).

Successivamente sono state preparate concentrazioni scalari di EG puro diluito in alcool etilico, (alla conc. risultata non tossica nel precedente test); ad ogni pozzetto contenente cellule e medium sono stati aggiunti 20 microlitri di alcool contenenti varie conc. di EG e precisamente da 0,015 micromolare a 974 micromolare.

Come metodica di quantificazione della sopravvivenza cellulare, sono stati utilizzati, come precedentemente affermato, fibroblasti umani derivanti da frammenti biotipici gengivali sottoposti ad opportuni trattamenti e alla quantificazione della sopravvivenza cellulare secondo Ulf Landegren (15, 16).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Il grafico relativo alla citotossicità dell'alcool etilico dimostra che la vitalità cellulare rimane uguale al controllo 100% (cellule che non vengono messe a contatto con l'alcool etilico), fino ad una concentrazione di 40 microlitri di alcool per ml di medium acquoso per pozzetto pari a circa 0,68 M finale (Fig. 1).

Aumentando la concentrazione si inizia ad osservare una diminuzione significativa

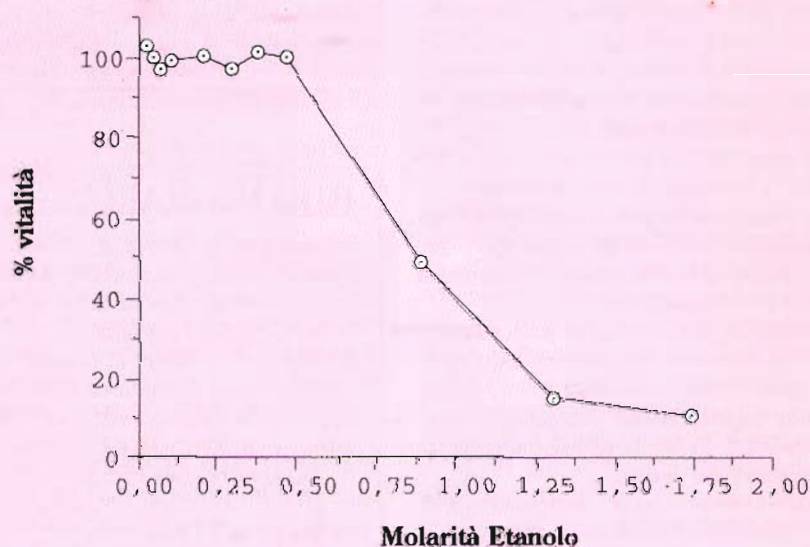


Fig. 1 - Grafico relativo alla citotossicità dell'alcool etilico.

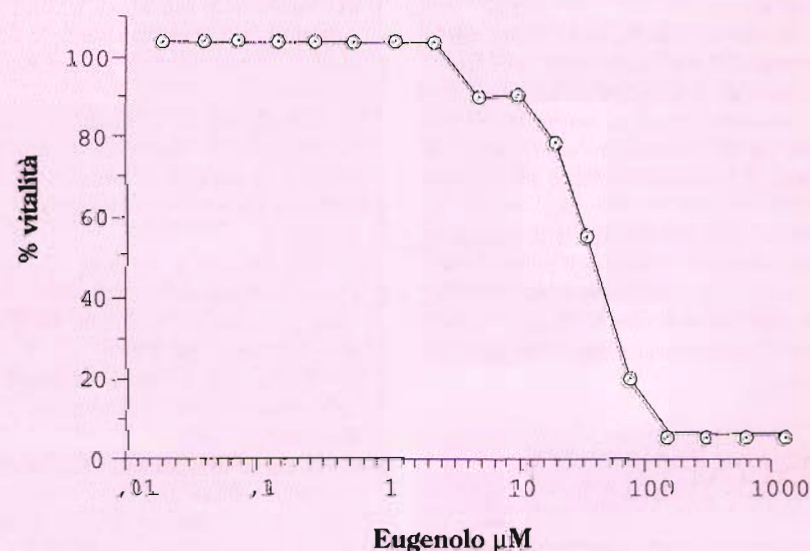


Fig. 2 - Grafico relativo alla citotossicità dell'eugenolo.

della sopravvivenza cellulare.

Per sicurezza i vari test sono stati eseguiti con una concentrazione alcoolica (sopravvivenza 100%) pari a 0,34 M finale, vale a dire 20 microlitri/ml medium pozzetto.

Il grafico dell'EG mostra che dopo 24 ore di

incubazione delle soluzioni alcooliche contenenti concentrazioni crescenti di EG con le cellule, la sopravvivenza al 100% viene conservata fino ad una concentrazione di 1,9 mM di EG libero nel medium cellulare (Fig. 2).

Le conclusioni sono quindi le seguenti:

1. L'EG puro (privo di altre molecole contaminanti e con il solvente a concentrazione sicuramente non lesive), è con certezza citotossico come ampiamente dimostrato da altri autori in precedenza.

2. Ad una concentrazione superiore a 1,9 mM di EG inizia la citotossicità cellulare.

Questi risultati sono però in disaccordo con le conclusioni di Maseki e coll. (17) per quanto riguarda la mancata correlazione tra quantità di EG e citotossicità.

Maseki ha dosato mediante gas-cromatografia l'EG rilasciato dai cementi dopo 1-2 fino a 6 settimane e ha assistito (come c'è peraltro da aspettarsi) ad una diminuzione progressiva del rilascio di EG dai cementi con il passare del tempo.

Al contrario però trova un aumento della citotossicità cellulare man mano che aumentano le settimane di incubazione dei cementi senza trovare una spiegazione plausibile a tale fenomeno (da segnalare però che sono state utilizzate cellule diverse dai fibroblasti gengivali umani).

Pertanto Maseki afferma che c'è una correlazione negativa tra diminuzione dell'EG ed aumento della citotossicità ed imputa il fatto ad altre sostanze, quali ad esempio vari altri componenti che potrebbero essere rilasciati dai cementi contenenti ossido di zinco-eugenolo.

E da notare, per quanto riguarda l'ossido di zinco (sostanza pura) che agli autori, in precedenti test, è risultato essere non citotossico fino alla massima concentrazione solubile, avendo inoltre un bassissimo prodotto di solubilità.

CONCLUSIONI

La presente ricerca consentirà agli autori di proseguire il lavoro iniziato precedentemente (15), volendo gli stessi valutare la citotossicità di alcuni cementi endodontici di vasta commercializzazione e dell'interazione dei loro vari costituenti tra i quali compare l'EG.

Infatti, conoscendo la concentrazione massima non citotossica di EG, si potrà verifica-

re la possibilità di ridurre le concentrazioni indicate dalle case produttrici per la miscelazione dei vari cementi (senza alterarne le proprietà) ed osservando una eventuale diminuzione della loro citotossicità.

Se ciò si rivelasse tale si potrà proporre una revisione critica dei metodi di quantificazione delle dosi di EG fino ad oggi adottati dalle case produttrici, potendo così migliorare i requisiti biologici di questi cementi.

BIBLIOGRAFIA

1 - Lindqvist L, Otteskog P. Eugenol: liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. *Scand Dent J* 1981; 89: 552-6

2 - Hume WR. Effect of eugenol on respiration and division in human pulp mouse fibroblast, and liver cells *in vitro*. *J Dent Res* 1984; 63: 1262-5

3 - Barkin ME, Boyd JP, Cohen S. Acute allergic reaction to eugenol. *Oral Surg* 1984; 57: 441-2

4 - Vishteh A, Thomas I, Imamura T. Eugenol modulation of the immune response in mice. *Immunopharmacology* 1986; 12: 187-92

5 - Fujisawa S, Masuhara E. Binding of eugenol and O-ethoxybenzoic acid to bovine serum albumin. *J Dent Res* 1981; 60: 860-4

6 - Thompson D, Costantin-Teodosius D, Moldeus P. Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interactions* 1991; 77: 137-47

7 - Mc Donald J, Heffner E. Eugenol causes oxidant-mediated edema in isolated perfused rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 806-9

8 - Molnar EJ. Residual eugenol from zinc oxide-eugenol compounds. *J Dent Res* 1967; 46: 645-9

9 - Meryon SD, Johnson SG, Smith AJ. Eugenol release and the cytotoxicity of different zinc oxide-eugenol combination. *J Dent Res* 1988; 16: 66-70

10 - Erasquin H, Muruzabal M. Root canal fillings with zinc oxide-eugenol cement in the rat molar. *Oral Surg* 1967; 24: 547-58

11 - Watts A, Paterson RC. Pulpar response to a zinc oxide-eugenol cement. *Int Endod J* 1987; 20: 82-6

12 - Maura A, Pino A, Ricci R. Negative evidence *in vivo* of DNA-damaging, mutagenic and chromosomal effects of eugenol. *Mutation Research* 1989; 227: 125-9

13 - Phillips DH. Further evidence that eugenol does not bind to dna *in vivo*. *Mutation Research* 1990; 245: 23-6

14 - Thompson D, Norbeck K, Olsson LI, Constantin-Teodosius D, Van der Zee J, Moldeus P. Peroxidase-catalyzed oxidation of eugenol: formation of the cytotoxic metabolite. *J Biol Chem* 1989; 264: 1016-21

15 - Gerosa R, Borin M, Menegazzi G, Faccioni F, Cavalleri G. Un metodo di valutazione della citotossicità relativa dei materiali da otturazione canalare su colture di fibroblasti umani. *G It Endo* 1993; 7: 128-32

16 - Landegren U. Measurement of cell number by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods* 1984; 67: 379-88

17 - Maseki T, Nakata K, Kohsaka T, Kobayashi F, Hirano S, Nakamura H. Lack of correlation between the amount of eugenol released from zinc oxide-eugenol sealer and cytotoxicity of the sealer. *J Endodon* 1991; 17: 76-9