

Valutazione della tossicità di 4 eugenoli mediante uno studio in vitro

Evaluation of the toxicity of four different eugenols by an *in vitro* method

RIASSUNTO

Dopo aver valutato in un precedente lavoro (1) la citotossicità dell'eugenolo puro abbiamo utilizzato la stessa metodica sperimentale per testare la tossicità di 4 tipi di eugenolo rappresentati da: KERR, BIOSEAL, SIGMA ed EUSOL. Come solvente abbiamo utilizzato l'etanolo che permette all'eugenolo di essere solubile in soluzioni acquose a tutte le proporzioni. L'etanolo è citotossico a concentrazione superiore a 0,68 M. Sono state preparate concentrazioni scalari di EG in soluzione di 0,0015 µM ad una soluzione di 974 µM (concentrazione finale) aggiungendo 20 µL (concentrazione finale di etanolo) di tale soluzione in 1 ml di medium cellulare.

Come controllo abbiamo utilizzato PBS (phosphate buffered saline). Dal protocollo sperimentale è risultato che gli eugenoli Sigma ed Eusol iniziano ad essere tossici da 0,060 µM, l'eugenolo Bioseal da 0,0120 µM, infine l'eugenolo Kerr è tossico da 0,240 µM.

Parole chiave: Tossicità. Eugenolo.

ABSTRACT

Eugenol, a natural phenolic substance (4-allyl-2-methoxyphenol), is the main component of cloves. Together with zinc oxide (ZnO) it forms zinc eugenate through chelation. It is widely used as a flavouring in foods, in the preparation of medicines and as an additive to tobacco. It is also the main ingredient in dental materials such as endodontic cements, medicinal packs and poultices.

Numerous *in vitro* and *in vivo* studies have been conducted to assess the pharmacologic and toxic effects of eugenol. At the cellular level, eugenol inhibits cell migration, prostaglandin synthetase, cell respiration and mitochondrial activity. It causes a change in enzyme activity and an alteration of the cell membrane. In addition, eugenol stimulates the neutrophils which release super-

oxidizing free radicals produced through oxidant-mediated mechanisms and causes lung damage. The toxic effects of eugenol depend on its strength and the length of time that the cells are exposed to it. At a concentration of 10^{-3} over a long period of time, eugenol is both cito and neurotoxic. At concentrations of between 10^{-2} and 10^{-3} , it triggers the production of superoxidante by the neutrophils, which contributes to toxicity. At concentrations of between 10^{-4} and 10^{-5} , eugenol inhibits prostaglandin synthetase, thereby reducing inflammation; while at concentrations of between 10^{-3} and 10^{-4} , it reacts as a reversible vaso-dilator and inhibitor of cell respiration. Cells live indefinitely in concentrations below 10^{-4} .

Eugenol is the liquid component in ZOE-based endodontic cements. When eugenol mixes with ZnO, it forms zinc eugenate through chelation. The hardened product is fine zinc oxide granules with residual eugenol enclosed within the crystalline matrix of the zinc eugenate. The presence of water in tissue, or humid conditions, induces hydrolysis and the zinc eugenolate separates into $Zn(OH)_2$ and eugenol. *In vitro* experiments have shown that when water is present the release of eugenol from the zinc eugenate mixture is 1000 times greater and more rapid. According to the results of various other studies, residual eugenol in the new zinc eugenate mixture released through hydrolysis is responsible for the toxicity of endodontic cements.

Moreover, if HCO_3^- from the saliva and periapical tissue comes into contact with ZOE, it forms $ZnCO_3$ and eugenol. It has been confirmed that following the hardening of the ZOE, 5% of the eugenol remains free for more than 10 years. This contrasts with the results of other authors who have claimed that the percentage of eugenol released is quite low after a few days.

The aim of this study was to measure the cytotoxicity of four different eugenols: pure eugenol (SIGMA E 5504), eugenol KERR (USA Detroit), eugenol EUSOL (Ogna Pharma, Milan, Italy), eugenol BIOSEAL (Ogna Pharma, Milan, Italy), in an *in vitro* study by diluting them to various concentrations with an alcohol solution and determining the maximum non-cytotoxic concen-

tration. Human gingival fibroblasts were obtained from biopsy of normal attached gingival tissue from the lower molar region. The tissue were stored in 250 ml plastic culture flasks contained DME (Dulbecco's modified Eagle's medium). After 7 passages of the cellular expansion, the fibroblasts were transferred on to cluster well cell culture plates and stored at 37°C and 100% humidity. In order to determine the cytotoxicity a enzyme of cell degradation reacts with the chromogenic substrate to produce a yellow colour which measured spectrophotometrically at 405 nm. We tested solution of eugenol and ethylic alcohol, which is soluble in water solutions in any given proportion. The cytotoxicity of the ethylic alcohol itself was determined by using a dose-response curve for concentrations between 0,017 M and 1,7 M. Ethanol is toxic to 0,68 M. Various-strength concentrations of eugenol in alcohol solutions were then prepared between 0,015 µM and 974 µM, and 20 µL (0,34 M) of ethylic alcohol of this solution were added to 1 ml of the cell medium.

From our experiment we found that: Sigma and Eusol eugenols proved toxic for uman gingival fibroblasts to 0,060 µM, Bioseal eugenol is toxic to 0,120 µM and Kerr eugenol is toxic to 0,240 µM (Fig. 1 e Tab. 1). Several authors claim that eugenol is responsible for the toxicity of endodontic cements and in any case they consider ZOE more highly toxic when just mixed and decreases over the time. There also other toxic component that play a role in cytotoxicity this makes it necessary to investigate further in order to understand wich component are toxic and a what concentration their action can be explicated.

The state of the art regarding the cytotoxicity of endodontic cements determined by *in vitro* methods is a large step forward in producing considerably inert endodontic sealers.

Key words: Toxicity. Eugenol.

INTRODUZIONE

L'eugenolo è largamente utilizzato nelle preparazioni medicali e come additivo nel tabacco, come agente profumante nei cibi e rappresenta il costituente principale di molti materiali dentali come: cementi endodontici, paste da medicazione e impacchi chirurgici.

L'eugenolo è un composto fenolico naturale (4-allil-2-metossifenolo); assieme all'ossido di zinco (ZnO) forma l'eugenato di zinco per reazione di chelazione. Per tale motivo sono stati realizzati numerosi studi *in vivo* ed *in vitro* (1-15) per valutare i suoi effetti farmacologici e tossici a livello sistemico e locale.

A livello cellulare l'eugenolo determina (2-4) inibizione della: migrazione cellulare, prostaglandina sintetasi (3), respirazione cellulare (4) e attività mitocondriale (2-4). Inoltre causa un'alterazione dell'attività enzimatica e dell'integrità della membrana cellulare (5). In aggiunta l'eugenolo stimola i neutrofili a rilasciare radicali liberi superossidanti prodotti da meccanismi mediati-ossidanti (6, 7).

Gli effetti tossici dell'eugenolo dipendono dalla concentrazione dello stesso e dal tempo di esposizione con le cellule. L'eugenolo alla concentrazione di 10^{-3} per un lungo tempo di esposizione è citotossico e neurotossico (6). Alla concentrazione tra 10^{-2} e 10^{-3} attiva la produzione di superossidanti dai neutrofili contribuendo alla tossicità dell'eugenolo (6, 7). A concentrazioni a 10^{-4} e 10^{-5} l'eugenolo è un inibitore della prostaglandina sintetasi e può perciò ridurre l'infiammazione (3-6), mentre tra 10^{-3} e 10^{-4} esso agisce come reversibile vasodilatatore ed inibitore della respirazione cellulare (4, 6). Le cellule vivono indefinitamente a concentrazioni di eugenolo a 10^{-4} (4, 6).

In Endodonzia l'eugenolo è il costituente liquido dei cementi endodontici a base di ZOE. Quando l'eugenolo è mescolato con ZnO si forma eugenato di zinco per reazione di chelazione. Il prodotto indurito consiste di granuli di polvere di ZnO ed eugenolo residuo inglobati nella matrice cristallina di eugenato di zinco. L'acqua presente nei tes-

suti o in condizione di umidità induce l'idrolisi dell'eugenato di zinco in $Zn(OH)_2$ ed eugenolo (6, 12, 13). Esperimenti *in vitro* hanno dimostrato che in presenza di acqua il rilascio di eugenolo dalla miscela di eugenato di zinco è 1000 volte più grande e più rapida (4, 6). Secondo i risultati degli studi di alcuni autori (1-6, 8-15) l'eugenolo che residua nella miscela fresca dell'eugenato di zinco e che viene rilasciato per idrolisi dello stesso è responsabile della tossicità dei cementi endodontici. Inoltre anche la presenza di HCO_3^- proveniente dalla saliva e dai tessuti periapicali se entra in contatto con lo ZOE determina la formazione di $ZnCO_3$ ed eugenolo (16). È stato affermato che dopo l'indurimento della miscela di ZOE il 5% di eugenolo rimane libero per più di 10 anni (12). Tale risultato contrasta con i risultati ottenuti da altri autori che affermano che la percentuale di eugenolo rilasciata è bassa già dopo pochi giorni (16). In questo lavoro abbiamo voluto valutare la citotossicità di 4 eugenoli per conoscere quale sia la loro concentrazione di massima tossicità utilizzando come solvente l'etanolo a concentrazione non tossica.

MATERIALI E METODI

In questo protocollo sperimentale abbiamo valutato i seguenti materiali: eugenolo puro (Sigma E 5504), eugenolo Kerr (USA Detroit), eugenolo Eusol (Ogna Pharma, Milano - Italia), eugenolo Bioseal (Ogna Pharma, Milano - Italia) ed etanolo. Essendo l'eugenolo un fenolo idrofobico poco solubile in un medium acquoso è stato necessario solubilizzarlo con un solvente organico rappresentato nel nostro lavoro dall'etanolo.

Abbiamo utilizzato fibroblasti gengivali umani derivanti da frammenti biotipici gengivali lasciati incubare in flasche da 25 cm³ con medium DME (Dulbecco's modified Eagle's medium, terreno di coltura) contenente: 25 mM di Hepes (soluzione tampone), 2% di glutamina, 0,11 gr/L di acido piruvico, 0,05 mg/L di Gentamicina (Sigma G 1272), 2,5 mg/L di Amphotericina B, 1 gr/L di glucosio, 10% di FCS, 3,7 gr/L di

$NaHCO_3$. I fibroblasti vengono selezionati con tripsina nel corso dei vari passaggi di distacco cellulare. Raggiunta la confluenza (VII passaggio), i fibroblasti sono trasferiti in piastre da 24 pozzetti ad una concentrazione di $10E+3$ cell/ml/pozzetto (area 2 cm²) in medium. Abbiamo valutato la citotossicità intrinseca del solvente prescelto mettendo a contatto con le cellule concentrazioni scalari di alcool etilico da 0,017 M a 1,75 M.

Successivamente sono state poste nei pozzetti a contatto con le cellule 20 µL di etanolo (concentrazione risultata non citotossica) con diluizioni scalari di eugenolo precisamente da 0,015 µM a 974 µM e sono state incubate a 37°C, 100% umidità per 24/48 ore.

Per valutare la citotossicità abbiamo utilizzato il metodo per la quantificazione della sopravvivenza cellulare secondo i criteri di Ulf Landegren (17) (Reagenti utilizzati: Merck).

RISULTATI

I vari test sono stati eseguiti con una concentrazione alcoolica pari a 0,34M la quale nel precedente studio (1) aveva mostrato una sopravvivenza cellulare pari al 100%, vale a dire 20 microlitri/ml medium pozzetto.

I risultati dimostrano la sopravvivenza cellulare dei fibroblasti gengivali umani dopo 24 h di incubazione con le soluzioni alcooliche (0,68 M) contenenti concentrazioni scalari crescenti dei 4 tipi di eugenolo (Tab. 1 e Fig. 1). L'eugenolo Sigma inizia ad essere tossico a valori superiori a 0,030 µM (100% cellule vitali) mostrando una graduale diminuzione della vitalità fino a valori di 0,940 µM (69,1% cellule vitali); successivamente a 1,870 µM c'è una brusca caduta della vitalità cellulare (1,5% cellule vitali). L'eugenolo Eusol e quello di Kerr presentano un comportamento analogo all'eugenolo Sigma. I valori dell'eugenolo Bioseal invece nel range tra 0,015-0,470 µM presentano valori compresi tra 89,7-82,1% di cellule vitali seguiti da una brusca caduta della vitalità cellulare a 0,940 µM (1,4% di cellule vitali).

Roberto Gerosa

Università degli Studi di Verona
Istituto di Clinica Odontoiatrica
Direttore: Prof. Paolo Gatto
Cattedra di Odontoiatria Conservativa
Titolare: Prof. Giovanni Carallini

Correspondence:
Dr. Roberto Gerosa
Piazzetta A. Manzoni di via S. Zaccaria 7, 2° piano
37139 Verona - Via delle Monégone
Tel. 045/8074207 - Fax 045/8072142

Valutazione della tossicità di 4 eugenoli mediante uno studio *in vitro*

Evaluation of the toxicity of four different eugenols by an *in vitro* method

DISCUSSIONE

Dal protocollo sperimentale di questo lavoro è risultato che tutti e 4 gli eugenoli sono citotossici. Questo dato è in accordo con quelli di numerosi studi di altri autori (1-6, 8-13). Diluendo a concentrazioni scalari ogni eugenolo con etanolo alla concentrazione di 0,68 M (dimostratosi non tossica) essi cominciano ad essere leggermente tossici a valori superiori tra 0,030-0,0120 μ M. Mentre risultano essere fortemente tossici a 0,1870 μ M per gli eugenoli Sigma, Eusol e Kerr; l'eugenolo Bioseal invece si è mostrato fortemente tossico a 0,940 μ M. Questo risultato è in accordo con quello ottenuto da Goe-rig (11) il quale non ha trovato differenze di tossicità tra l'eugenolo puro e miscele varie di olio di garofano e inoltre conferma i risultati ottenuti da Hume (6) che afferma che la tossicità dell'eugenolo dipende dalla sua concentrazione e dal tempo di esposizione con le cellule. I risultati del nostro lavoro hanno mostrato che tutti e 4 gli eugenoli presentano una tossicità simile.

La miscela fresca di eugenato di zinco libera una percentuale significativa di eugenolo che decresce con l'indurimento del cemento. Dallo studio di Morse et al (9) è riportato che dopo l'indurimento del cemento a base di ZOE il 5% di eugenolo viene rilasciato per un periodo di 10 anni. Il rilascio di eugenolo è influenzato dalla presenza di acqua e carbonato (6, 8).

Alcuni autori affermano che l'eugenolo rappresenta il principale responsabile della tossicità dei cementi endodontici a base di ZOE (4, 6, 8, 11-13). Meryon (12) ha mostrato che la citotossicità dei cementi ZOE miscelati è direttamente proporzionale alla percentuale di eugenolo rilasciato. Alcuni autori (13, 14, 16) invece affermano che la percentuale di eugenolo rilasciato è probabilmente bassa e non rappresenta il principale componente tossico del cemento endodontico. Essi (16) hanno dosato mediante gas-cromatografia l'eugenolo rilasciato dai cementi dopo 1-2 fino a 6 settimane ed hanno assistito, con il passare del tempo, ad una diminuzione progressiva del rilascio di eugenolo dai cementi non direttamente pro-

Tab. 1 - Percentuale di fibroblasti vitali dopo essere stati posti a contatto con 4 diversi eugenoli per 24 h.

Tab. 1 - Results of the toxicity of four eugenols diluted by concentrations ethanol (0,68 M) and placed in contact of gingival fibroblasts for 24 h.

% di vitalità cellulare				
eugenolo μ M	eugenolo Sigma	eugenolo Eusol	eugenolo Bioseal	eugenolo Kerr
0,015	100,00	100,00	89,70	95,00
0,030	100,00	100,00	88,20	96,70
0,060	94,50	90,10	94,60	97,50
0,120	88,90	89,30	88,90	97,60
0,230	90,70	80,10	85,70	82,60
0,470	82,10	65,60	82,10	72,00
0,940	69,10	48,00	1,40	58,80
1,870	1,50	0,50	0,80	3,50
3,750	0,00	0,00	0,00	0,00
7,500	0,00	0,00	0,00	0,00
30,00	0,00	0,00	0,00	0,00

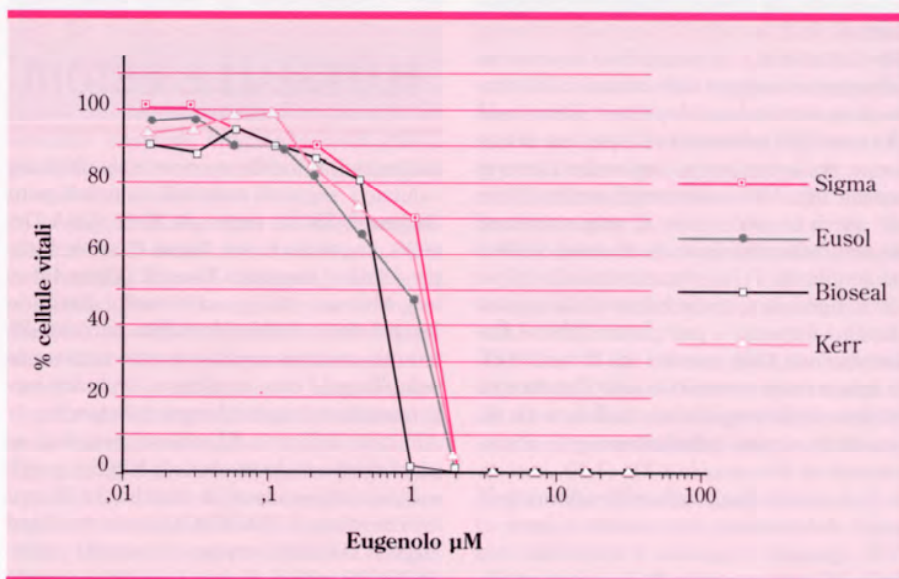


Fig. 1 - Andamento della curva di tossicità di 4 diversi eugenoli diluiti a concentrazioni scalari di etanolo (0,68 M) e posti a contatto per 24 h con fibroblasti gengivali umani.

Fig. 1 - Toxicity of four eugenols diluted by concentrations of ethanol (0,68 M) and placed in contact of gingival fibroblasts for 24 h.

porzionale al decrescere della tossicità dei cementi endodontici e hanno dimostrato che altri componenti del cemento in appropriate concentrazioni sono tossici tra cui: Zn^{++} (13), ZnO (14), bismuto, sodio borato, argento, benzil alcool, resine e vari altri additivi (18).

L'eugenolo puro risulta quindi citotossico e rappresenta uno dei principali responsabili della tossicità dei cementi a base di ZOE la quale è severa quando il cemento è appena miscelato e decresce col passare del tempo. Ci sono anche altri componenti tossici che entrano in gioco influenzando la citotossicità. Per questo sono necessari ulteriori studi di approfondimento per conoscere tutti i componenti responsabili della tossicità di un cemento endodontico ed a quale concentrazione esplicano la loro azione.

CONCLUSIONI

Alla luce della presente ricerca gli autori intendono proseguire questo lavoro, rivalutando la citotossicità di alcuni cementi endodontici di vasta commercializzazione a base di ZOE miscelandoli con l'eugenolo della stessa casa produttrice diluito con l'alcool etilico.

BIBLIOGRAFIA

- 1 - Gerosa R, Menegazzi G, Filippini P, Cavalleri G. Citotossicità dell'eugenolo puro. *G It Endo* 1994; 8: 106-8
- 2 - Thompson D, Costantin-Teodosius D, Moldeus P. Metabolism and cytotoxicity of eugenol in isolated rat hepatocytes. *Chem Biol Interactions* 1991; 77: 137-47
- 3 - Dewhirst FE. Structure-activity relationships for inhibition of prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds. *Prostaglandins* 1980; 20: 209-22
- 4 - 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
- 5 - Lindqvist L, Otteskog P. Eugenol: liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. *Scand J Dent* 1981; 89: 552-6
- 6 - Hume WR. *In vitro* studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and oxide-eugenol. *Int J Endodon* 1988; 21: 130-4
- 7 - McDonald SW, Heffner JE. Eugenol causes oxidant-mediated edema in isolated perfused rabbit lungs. *Am Rev Respir Dis* 1991; 143: 803-9
- 8 - Wilson AD, Clinton DJ, Miller RP. Zinc Oxide-eugenol cements: IV microstructure and hydrolysis. *J Dent Res* 1973; 52: 253-60
- 9 - Morse DR, Wilcko JM, Pullon PA, Furst ML, Passo SA. A comparative tissue toxicity evaluation of the liquid components of gutta-percha root canal sealers. *J of Endodon* 1981; 7: 545-50
- 10 - Erasquin H, Muruzabal M. Root canal fillings with zinc oxide-eugenol cement in the rat molar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1967; 24: 547-58
- 11 - Goerig AC, et al. The pulpal response to ZOE with stock eugenol versus ZOE with purified. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980; 50: 557-62
- 12 - Meryon SD, Johnson SG, Smith AJ. Eugenol release and the cytotoxicity of different zinc oxide-eugenol combination. *J Dent Res* 1988; 16: 66-70
- 13 - Molnar EJ. Residual eugenol from zinc oxide-eugenol compounds. *J Dent Res* 1967; 46: 645-9
- 14 - Fujisawa S, Masuhara E. Binding of eugenol and O-ethoxybenzoic acid to bovine serum albumin. *J Den Res* 1981; 60: 860-4
- 15 - Nielsen TH. The ability of 39 liquid chelating agents to form cements with metal oxides, respecting their usability as root filling materials. *Acta Odontol Scand* 1963; 21: 159-74
- 16 - 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
- 17 - 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
- 18 - Robinson FR, Johnson MT. Histopathological studies of tissue reactions to various metals implanted in cat brains. Aeronautical systems division technical report 61-397, 196. Wright Patterson Air Force Base, OH: US Government Press. 2: 1-13