

# lab.

## 3.../2002

LAB  
Editore D.I.P. Italia Srl  
Direttore Responsabile:  
Gennaro Salerno  
Redaz./Amministr.  
Cas. Post. 640 C.P.O.  
Sede Legale:  
Via Emilia Est, 25 41100 Modena  
Tel. 059/908255 Fax 059/908977  
Stampa: Centro Stampa  
delle Venezie - Padova

Marzo 2002  
Autoriz. Trib. Modena  
n° 1234 del 6/4/1995  
Iscrizione al Registro Nazionale  
della Stampa: n° 05969  
Iscrizione ROC n. 4908  
Sped. in abb. post. comma 20/B  
art.2 legge 23/12/96 n. 662  
sede di Bologna  
5 centesimi  
Abbonamento annuale: 0,78 euro  
Copia gratuita  
IVA assolta dall'editore  
Contiene IP

PERIODICO A DIFFUSIONE GRATUITA  
DI INFORMAZIONI SUL MONDO DEL LABORATORIO

La scheda per l'abbonamento  
gratuito e' a pagina 5...

## un avviso importante

**P**er questa volta riteniamo di dover utilizzare lo spazio a nostra disposizione per un avviso e, contemporaneamente, per fare le nostre scuse ad alcuni dei nostri lettori.

Per un problema tecnico che nel frattempo riteniamo sia stato risolto, diversi fax sono giunti in redazione in parte danneggiati, incompleti e comunque illeggibili.

Chi avesse inviato a Lab una scheda per l'abbonamento gratuito al mensile o un testo per la pubblicazione di una inserzione e non ottenesse quanto richiesto è pertanto vivamente invitato a rimandarci il suo messaggio.

Nel rinnovare le scuse per quanto dovuto a nostri problemi, rivolgiamo comunque l'invito a quanti si mettono in contatto con la redazione tramite fax a scrivere i loro messaggi nel modo più chiaro possibile, onde evitare sempre possibili errori e fraintendimenti.

## in questo numero:

*News & informazioni  
dal mondo delle aziende*

2

*Mucche o uomini pazzi?*

13

*Rilascio di metalli da amalgami dentali  
e valutazione della tossicità*

16

*Beni culturali: sarà la risonanza magnetica  
a svelarne lo stato di salute*

22

*Corsi, Congressi & Convegni*

23



# AHS

## ANGELANTONI KENDRO S.p.A.

Via E. Berlinguer 18 20040 - Cornate D'Adda (Mi)

Tel. 039 68271 - Fax 039 6827500

internet: [www.ahsi.it](http://www.ahsi.it) - e-mail: [info@ahsi.it](mailto:info@ahsi.it)

Freddo biomedicale - Centrifugazione - Termostatazione - Flusso laminare

# RILASCIO DI METALLI DA AMALGAMI DENTALI E VALUTAZIONE DELLA TOSSICITA'

L. Campanella<sup>a</sup>, R. Dragone<sup>b</sup>, C. Frazzolia, F. Romeo<sup>a</sup>

<sup>a</sup>) Dipartimento di Chimica Università di Roma "La Sapienza"

<sup>b</sup>) Istituto di Metodologie Inorganiche e dei Plasmi (I.M.I.P.) - CNR

P.le Aldo Moro, 5 - 00185 Roma

Tel.: +39 06 49913744

E-mail: luigi.campanella@uniroma1.it

**Riassunto:** l'amalgama d'argento è una lega metallica che ha la caratteristica di essere facilmente modellabile, di indurirsi completamente in circa due ore e di possedere una buona aderenza sul dente. Per queste caratteristiche il suo uso è diventato molto diffuso, in campo odontoiatrico, per le otturazioni dentali che sono necessarie nel trattamento delle carie. Ogni anno nel mondo l'amalgama dentale viene applicato in 500 milioni di casi di cui la maggior parte negli Stati Uniti e ciò a causa della percentuale elevatissima di persone che soffre di carie (in Italia circa il 98%). Attualmente l'amalgama dentale è costituita da argento, stagno, rame, zinco e mercurio. La comunità scientifica è concorde nel ritenere che un amalgama dentale emette continuamente vapori di mercurio, mentre poco si conosce nei confronti dei metalli, rilasciati dall'amalgama stesso, che possono essere ingeriti dal nostro organismo ed avere effetti tossici anche in conseguenza di una loro azione combi-

nata. Nei processi di rilascio da parte di un amalgama, la composizione della saliva ha un ruolo fondamentale, poiché, le sue caratteristiche possono variare molto fortemente da individuo a individuo a causa sia di stati patologici, sia di assunzione di farmaci e sia di abitudini personali.

Scopo di questo lavoro è stato di valutare il rilascio dei metalli, contenuti in un amalgama dentale, in presenza della saliva la cui composizione fosse analoga a quella presente in condizioni fisiologiche con l'aggiunta di sostanze chimiche che possono essere presenti a causa di alcune patologie (acido urico), o per cure mediche (farmaci), o per abitudini personali (nicotina, nei fumatori). Inoltre, sono state eseguite prove di rilascio a diversi pH, simulando quelli riscontrabili nella saliva ed anche sottoponendo l'amalgama, messo in acqua ad uno di questi pH e in una soluzione di acido urico, all'irraggiamento con microonde (pratica dentistica di steri-

lizzazione all'interno della bocca).

Infine, è stata valutata la tossicità dei metalli rilasciati dall'amalgama mediante test respirometrici con cellule di lievito immobilizzate in terreno agarizzato ed accoppiate ad un elettrodo di Clark.

Le soluzioni utilizzate per questi test sono state preparate, in concentrazioni tali da somministrare alle cellule di lievito esattamente gli stessi quantitativi di metalli ottenuti nelle prove di rilascio.

## INTRODUZIONE

L'origine dell'amalgama risale al 1826 per opera di un francese di nome Taveau, il quale, con la sua "pasta d'argento", otturava i buchi nei denti. Nel 1833 quando l'utilizzo degli amalgami dentali si estese negli Stati Uniti, le persone curate con otturazioni manifestarono i primi disturbi sulla salute e ciò portò a una vera e propria battaglia intorno agli amalgami. Solo nel 1910

furono definite le formule delle leghe attualmente impiegate le quali contengono argento, stagno, rame, palladio, indio, zinco e il mercurio quale componente liquida. La presenza di questi metalli ha suscitato una notevole discussione nella comunità scientifica riguardo la tossicità dell'amalgama. Sono almeno tre le correnti di pensiero riguardanti la pericolosità dell'amalgama dentale:

- Una contraria all'uso dell'amalgama perché lo ritiene una fonte di estremo pericolo per l'uomo a causa del mercurio rilasciato in tutte le sue forme.

- Un'altra invece molto più ottimista, non individua nessun tipo di problema negli amalgami, tranne per le persone particolarmente sensibili agli agenti rilasciati. In questa classe di individui rientrerebbero i bambini, le persone con particolari allergie e le donne in gravidanza.

- Infine, la più moderata individua una parziale fonte di pericolo nell'utilizzo degli amalgami dentali che però diven-

**METTLER TOLEDO**

**D.T.O. SERVIZI**

**è l'agenzia per il Veneto ed il Friuli Venezia Giulia  
della Divisione Laboratorio **METTLER TOLEDO****

**[www.dtoservizi.it](http://www.dtoservizi.it)**

**D.T.O. SERVIZI srl**

viale Viareggio, 34/E • 30038 Spinea (Venezia)

☎ 041 997234 r.a. • fax 041 991727 • e-mail: [info@dtoservizi.it](mailto:info@dtoservizi.it)



ta secondaria se confrontata con gli enormi benefici che gli stessi portano attraverso il loro utilizzo.

E' estremamente difficile riuscire a capire a pieno il problema a causa delle enormi discrepanze riscontrabili in letteratura. Non a caso è interessante citare due passi, tratti da fonti diverse, per evidenziare al meglio la questione; il primo è tratto dal libro "Guida alla salute Naturale":

*" Il problema dell'amalgama è legato al mercurio ma non solo, esso è reso più complesso da altri cofattori di cui in questa inchiesta non si è voluto tenere conto per non allarmare troppo la popolazione".*

Il secondo passo è tratto dal resoconto di un'indagine svolta presso l'Istituto Superiore di Sanità (Roma) e l'Università di Brescia[1]:

*" Gli effetti tossicologici classici del mercurio sono stati descritti in gruppi professionalmente esposti per dosi molto maggiori rispetto a quelle ipotizzabili per gli amalgami;*

il rischio di effetti stocastici (derivanti da risposte mediate dal sistema immunitario) è stata proposta recentemente; tuttavia la dimostrazione di tali effetti nell'essere umano rimane tutt'altro che certa;

esiste sia il problema di sottogruppi di popolazione particolarmente suscettibili (bambini, donne in gravidanza, ecc.) da tutelare maggiormente sia quello di particolari situazioni che possono esporre a picchi di Hg anche importanti (applicazione e rimozione degli amalgami)."

L'unico punto sul quale convergono tutti gli studi effettuati è che l'amalgama dentale rilascia Hg, ma, le discrepanze tra i diversi ricercatori sono riferite al quantitativo di Hg e degli altri metalli e all'impatto che il rilascio può avere sull'organismo umano.

Alcuni paesi sono già intervenuti energeticamente contro l'uso degli amalgami, tra queste c'è il governo svedese, il quale ha stabilito di non rimborsare più le otturazioni dentali effettuate dopo il 01.01.1999, e la Germania la quale, attraverso una perizia effettuata nel paese su commissione del Tribunale di Francoforte, definisce così l'amalgama: *"... dalle otturazioni di amalgama deriva palesemente un rischio non irrilevante per la salute umana. L'amalgama può far ammalare, cioè esso è generalmente in grado di provocare disturbi sanitari in un numero rilevante di persone che lo utilizzano".*

Infine in Canada il problema dell'amalgama sembra molto diffuso e nei vari dossier trovati viene continuamente riscontrata una crescente relazione tra gli innumerevoli casi di sclerosi multipla e gli amalgami dentali stessi [2].

### Proprietà dell'amalgama

L'amalgama dentistica è una lega costituita da Hg, Ag, Sn, Cu e Zn. Gli studi della sua tossicità sono soprattutto correlati al Hg, mentre è necessario valutare l'effetto della possibile presenza anche degli altri metalli (da soli o in "pool").

Le fonti principali di esposizione al

mercurio per l'uomo sono industriali (raffinerie, discariche industriali, pesticidi ecc.), ambientali (inceneritori, amalgami dentali ecc.) e domestiche (batteri, amalgami dentali ecc.). Una delle caratteristiche prioritarie del Hg è di bioaccumularsi nei tessuti, nel sangue, negli organi e nei capelli; questa capacità rende il mercurio ancora più pericoloso in quanto, anche a dosi sotto la soglia di rischio ma con esposizione prolungata, non si può essere sicuri della sua atossicità. Poiché si trova nella bocca, l'amalgama dentale è una fonte di esposizione al Hg molto diretta, considerando anche la facilità con cui può arrivare nel flusso sanguigno, soprattutto nelle otturazioni che coinvolgono la zona laterale del dente dove c'è il contatto con la gengiva.

La tossicologia sperimentale individua

due rischi per la salute derivanti dall'esposizione al mercurio:

- Sul sistema nervoso centrale in seguito ad esposizione inalatoria

- Sul rene (nefrotossicità) in seguito ad ingestione

E' interessante a questo punto riportare i risultati di un lavoro svolto sugli amalgami dentali applicati sui topi[3]. Per valutare a pieno le interazioni degli amalgami su un organismo si sono presi due gruppi di topi. Sul primo gruppo sono state innestate sui denti quattro amalgami contenenti circa il 50% di Hg. Il secondo gruppo è stato sottoposto a una dieta a base di cibo standard addizionato di piccole quantità di amalgama (circa 8 mg al giorno). Scopo dello studio era proprio determinare gli organi di accumulo del Hg proveniente dagli innesti e del mer-

curio ingerito proveniente dalla dieta. Dopo due mesi i risultati hanno mostrato che la più alta concentrazione di Hg nei topi del primo gruppo si ha nel cervello, mentre la più alta concentrazione nei topi del secondo gruppo si ha nei reni. Queste concentrazioni erano notevolmente più alte rispetto a quelle riscontrate in topi sani studiati prima di questi test a dimostrazione che anche il mercurio proveniente dagli amalgami ha come principali organi bersaglio il rene e il cervello.

I problemi legati alle vie respiratorie sono importanti per le esposizioni occupazionali, compresa la preparazione degli amalgami dentistici. Poiché, però, molti studi effettuati su uomini e animali hanno dimostrato che gli amalgami dentali rilasciano continuamente vapori di Hg



segue a pag.18

Dopo quasi cinquant'anni di accresciuta presenza nel settore della Scienza applicata, il costante sforzo nella ricerca della qualità per offrire prodotti e servizi sempre efficienti ed efficaci ci ha spinto ad innovare e modernizzare ulteriormente la nostra struttura ed organizzazione aziendale. Anche il nostro marchio ha seguito questa importante evoluzione rinnovandosi nella sua veste grafica per divenire, nel segno della continuità, nuovo visibile testimone dell'impegno della international pbi.

una fonte unica di approvvigionamento per il laboratorio

il discorso va esteso a tutti.

L'esposizione orale al mercurio contenuto negli amalgami può avvenire o mediante ingestione o mediante assorbimento. Ad alte dosi il mercurio ingerito può provocare lesioni renali tubulari, mentre a dosi moderate l'alterazione renale è una glomerulonefrite, molto frequente soprattutto nelle prolungate esposizioni lavorative.

Il meccanismo attraverso il quale vapori di mercurio provenienti da un amalgama dentale arrivino nel cervello è ipotizzato che avvenga attraverso un trasporto diretto dal naso al cervello, così come avviene per altri metalli quali alluminio e cadmio [4]. Lo stesso interesse non è stato rivolto verso il Hg ingerito poiché, mentre c'è unanimità nell'affermare che un amalgama dentale rilascia continuamente vapori di Hg, non è altrettanto certo che vi sia anche un rilascio di sostanze ingeribili (se non a causa del deterioramento).

### Scopo della lavoro

Scopo del lavoro è stato di determinare il rilascio di metalli da parte di un amalgama dentale, e valutare la relativa tossicità, quando è sottoposto alle seguenti sollecitazioni:

-presenza di soluzioni a diverso pH in modo da simulare le variazioni realmente osservate nell'uomo;

-esposizione alle microonde in presenza di acqua a pH entro l'intervallo fisiologico e con una soluzione di acido urico;

-presenza della saliva artificiale addizionata con sostanze chimiche che possono essere presenti in certi stati patologici o per abitudini personali.

L'ipotesi iniziale è stata di ritenere che la composizione della saliva fosse tra le cause primarie nel rilascio dei metalli da un amalgama dentale. Infatti, le sue caratteristiche chimico fisiche (composizione, forza ionica, pH, temperatura ecc.) possono variare sia da un soggetto all'altro, sia in determinati stati patologici (presenza di acido urico) e per la cura degli stessi (presenza di sostanze provenienti da farmaci), sia in funzione dell'esposizione a vari agenti chimici dipendente dalle abitudini personali (es. la nicotina nei fumatori).

Per eseguire le prove di rilascio di metalli da parte di un amalgama dentale, ci siamo riferiti a un procedimento descritto in letteratura [5] e appresso riportato: l'amalgama fresca appena preparato veniva modellato manualmente per qualche secondo, dopo di che era lasciato per 90 ore a contatto con 12.5 ml di saliva artificiale (preparata come descritto più avanti nella parte sperimentale). Il sistema era mantenuto in leggera agitazione all'interno di un bagno termostato alla temperatura di  $37 \pm 0.5$  °C.

L'analisi dei metalli determinati nella soluzione dopo il contatto con l'amalgama era la seguente:

Metallo	Concentrazione (ppb)
Hg	$101 \pm 2$
Cu	$197 \pm 4$
Zn	$346 \pm 3$

Quindi, abbiamo eseguito prove di rilascio ponendo l'amalgama in soluzioni a diverso pH, al fine di valutare se il solo valore del pH potesse giustificare la quantità dei metalli riportati nella tabella sopra. E' stata anche irradiato, con le microonde, l'amalgama immerso in acqua a pH fisiologico e in una soluzione di acido urico. Successivamente abbiamo eseguito delle prove di rilascio dell'amalgama in presenza di una saliva artificiale opportunamente modificata, mediante l'aggiunta di sostanze chimiche, per simulare i casi sopra accennati. Inoltre, per verificare se la marca di fabbricazione dell'amalgama potesse influire nei processi di rilascio, diverse prove sono state eseguite con due differenti tipi dello stesso: Dispersalloy e Cavex Octight.

Tutte le prove di contatto, tra ciascuna soluzione e l'amalgama, sono state condotte alla temperatura di  $37 \pm 0.5$  °C. Per la determinazione di Ag, Zn, Cu e Sn, è stato utilizzata la spettrometria di emissione ottica a plasma induttivo (ICP-AES), mentre per il mercurio è stato utilizzato uno strumento specifico, AMA 254 della FKV, che esegue un pretrattamento del campione in modo da determinare l'Hg mediante l'analisi spettrofotometrica per assorbimento atomico. Per escludere la presenza dei cationi metallici, da noi investigati, nelle soluzioni utilizzate nelle prove di contatto con l'amalgama, è stata eseguita l'analisi sulle soluzioni prima del loro uso, il cui esito è stato negativo (non rilevati cationi metallici). Al fine di valutare la tossicità, una volta raccolti i dati riguardanti il rilascio dei metalli contenuti nell'amalgama, con il metodo respirometrico su cellule di lievito immobilizzate in terreno agarizzato[6], abbiamo effettuato prove d'inibizione dell'attività respiratoria con soluzioni preparate con le stesse concentrazioni dei metalli trovati nelle prove di rilascio.

Di seguito vengono riportati in dettaglio i parametri considerati nelle prove di rilascio:

- pH: è un parametro che varia fortemente nella bocca durante la giornata, spostandosi da un minimo di 5.30 a un massimo di 6.80, e quindi è stato testato il comportamento di un amalgama sottoposto al contatto soluzioni con diversi valori di pH ma entro i valori fisiologici.

- microonde (MW): vengono usate in campo dentistico per la cura delle carie, poiché, le alte temperature raggiunte con il loro utilizzo, servono da trattamento sterilizzante (uccisione di microrganismi quali batteri o virus presenti nella bocca) [7]. Per verificare la loro influenza sul rilascio, è stata irradiata con MW una soluzione a pH fisiologico e una di ac. urico entrambe contenenti l'amalgama dentale. Quindi, i risultati ottenuti sono stati confrontati con quelli trovati per le stesse soluzioni non irradiate.

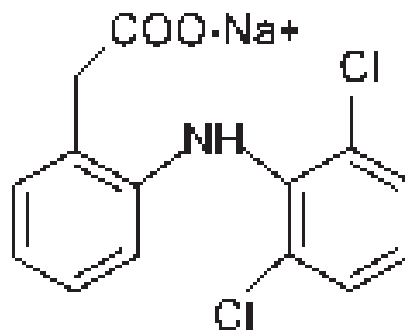
- acido urico: pur non essendo uno dei componenti della saliva, ha ricoperto

un ruolo molto importante nei nostri studi, dal momento che la saliva rappresenta una via di espulsione per questa sostanza. L'acido urico, infatti, viene prodotto dal nostro organismo ed è espulso per i due terzi attraverso le urine e il rimanente attraverso la saliva e le secrezioni intestinali [8]. E' noto che l'acido urico è in grado di formare complessi molto stabili in presenza di  $Zn^{2+}$  e soprattutto di  $Cu^{2+}$ , mentre non si conoscono dati certi rispetto alla sua capacità complessante nei confronti del mercurio.

La concentrazione media di acido urico nella saliva in condizioni normali è di circa  $10^{-4}$  moli/L, ma diventa molto più consistente in particolari categorie di individui come gli atleti e le persone sottoposte a diete, nei quali si è riscontrato un significativo aumento di questa sostanza nell'organismo. Nei malati di gotta, l'aumentata produzione endogena di acido urico accompagnata da una diminuita escrezione renale, possono far arrivare la concentrazione di questa sostanza nella saliva a circa  $10^{-3}$  moli/L che corrisponde a quella messa da noi nella saliva artificiale utilizzata per le prove di rilascio.

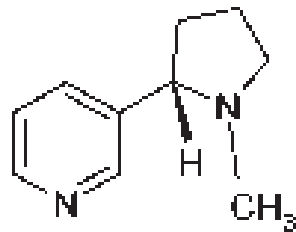
- farmaci: ipotizzando una possibile interazione delle sostanze contenute in essi con i metalli presenti nell'amalgama sono stati presi in considerazione il Vivin C e il Diclofenac, quali rappresentanti di due categorie di larga diffusione e utilizzo, cioè analgesici e antinfiammatori. Il VIVIN C è un farmaco analgesico antinfiammatorio e antipiretico molto utilizzato nella cura dell'influenza. Una compressa di questo farmaco è composta da acido acetilsalilico 0.330 g, acido ascorbico 0.200 g, quali principi attivi, e da glicina, acido citrico anidro, sodio idrogenocarbonato, sodio benzoato, come eccipienti. L'acido ascorbico è un buon complessante rispetto ad alcuni metalli contenuti in un amalgama dentale, quando sono ossidati, tra cui soprattutto  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Ag^{+}$ ; mentre l'acido acetilsalilico invece favorisce la dissoluzione solo di  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ .

Il DICLOFENAC è il principio attivo di un antinfiammatorio di cui è nota, dalla letteratura [9], la capacità complessante verso alcuni metalli, tra cui mercurio e zinco, con i quali forma dei complessi di formula  $MeL_2$ .



Infine, è stata considerata la nicotina che sicuramente può venire a contatto con l'amalgama, se presente, di un'ampia categoria di persone: i fumatori. La nicotina è un componente fondamentale delle sigarette (ognuna ne contiene circa 0.8 mg), pertanto è una sostanza chimica con la quale si viene facilmente a contatto. La nicotina pura è un liquido di colore marrone solubile in acqua sotto gli 80 °C; la sua formu-

la di struttura è la seguente:



Dalla letteratura [10,11] è emerso che questa sostanza forma piuttosto facilmente dei complessi con Zinco e Mercurio :

$Hg(Nic)X_2$  (X = Cl, Br, Nic = Nicotina);  $Zn(Nic)_2X_2$  (X = Cl, Br, Nic = Nicotina)

Da queste premesse, è possibile che i fumatori abbiano maggiore probabilità di intossicazione derivante dal rilascio di mercurio da un amalgama dentistica.

### Valutazione della tossicità dei metalli rilasciati dall'amalgama

La tossicità delle miscele di ioni dei metalli, ottenute dalle prove di rilascio dell'amalgama, è stata valutata mediante un biosensore a cellule di lievito (*Saccaromyces cerevisiae*) immobilizzate in terreno agarizzato ed accoppiate con l'elettrodo ad ossigeno di Clark [6].

Lo scopo di queste prove è stato lo studio degli effetti biologici correlati con l'attività respiratoria delle cellule di lievito, e causati dall'esposizione a soluzioni di ioni di metalli preparate con composizioni e concentrazioni eguali a quelle ottenute nelle prove di rilascio. La determinazione dell'entità di questi danni biologici prodotti sulle cellule di lievito è basata sull'ipotesi che tali danni siano correlabili alla diminuzione dell'attività respiratoria delle cellule stesse. Questa diminuzione si può esprimere mediante l'indice di inibizione respiratoria percentuale (IAR%), cioè il rapporto percentuale tra la diminuzione dell'ossigeno consumato dalle cellule dopo l'esposizione al tossico, rispetto alla diminuzione totale di ossigeno consumato dopo esposizione ad una sostanza (formalina) che inibisce irreversibilmente il 100% dell'attività respiratoria.

### PARTE SPERIMENTALE

#### Reagenti

D-Glucosio monoidrato per biochimica, Merck; agar per microbiologia, Sigma Aldrich; estratto di lievito in polvere per microbiologia, Merck; Diclofenac sodium salt, Sigma; Vivin C in compresse, Menarini; Acido Urico, Nicotina e Acido Lattico, Fluka; Acetone per HPLC, C. Erba; HCl ultrapuro, C.Erba; KCl, KSCN, NaOH gocce,  $NaHCO_3$  e  $NaH_2PO_4$ , ACS - per analisi della C.Erba.

#### Materiali e strumenti

Piastre Petri diametro 10 cm; pipette tarate da: 10 e 25 mL  $\pm 0.5$ ; pipetta Gilson piptman F 200  $\mu l \pm 1.6$ ; bilancia analitica Sartorius Research; pH-metro ORION modello SA 720; elettrodo ORION modello 97-08-99.O2; registratore Amel modello 868; termostato



Haake; Forno a microonde Bosch; Analizzatore Automatico di Mercurio AMA 254, FKV; Spettrometro di Emissione Atomica a Plasma Induttivamente Accoppiato (ICP-AES), VISTA MP, Varian.

### Preparazione dell'amalgama

Un amalgama dentale è una lega costituita da una parte liquida, il Hg ( $\approx 50\%$ ), e una parte solida comprendente Ag, Sn, Cu e Zn. Ci sono anche altri tipi di amalgama con frazioni di In e Pd. La parte solida e quella liquida (Hg) sono contenute separate all'interno di una capsula nella quale vengono in contatto e mescolate all'atto della preparazione, mediante vibrazione per 5 secondi, con un apposito strumento in dotazione ai dentisti. Un agitatore all'interno della capsula provvede alla miscelazione di lega e mercurio (fase di triturazione) determinandone l'amalgamazione. L'amalgama così ottenuto può essere facilmente modellato sul dente e indurisce completamente in circa due ore.

### Preparazione della saliva artificiale

In letteratura [5] è descritta la ricetta per preparare la saliva artificiale che noi abbiamo utilizzato nelle prove e la cui composizione è riportata in tabella 1:

Sostanza	Concentrazione (moli/L)
KCl	$2.0 \times 10^{-2}$
KSCN	$5.3 \times 10^{-3}$
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	$1.4 \times 10^{-3}$
$\text{NaHCO}_3$	$1.5 \times 10^{-2}$
Acido lattico	$1.0 \times 10^{-2}$

Tab.1. Composizione della saliva

### Prove di rilascio

#### -Effetto del pH

Sono state eseguite prove di rilascio da parte di un amalgama dentale immerso in acqua distillata a pH 6.13. La soluzione è stata preparata aggiungendo all'acqua distillata HCl ultrapuro, diluito 1:10, e misurando il pH con un pHmetro. A questa soluzione (50 mL) è stato inserito un frammento di amalgama (del tipo Dispersalloy) completamente indurito e del peso di 46.6 mg. Per 26 giorni la soluzione contenente l'amalgama è stata agitata, con un magnetino, per simulare al meglio i movimenti salivari della bocca. Sono stati effettuati tre prelievi da 10 mL dopo 2, 7 e 26 giorni in modo da seguire l'evoluzione del rilascio di metalli nel tempo. Questo stesso procedimento è stato ripetuto sotto condizioni di pH più drastiche per valutare a pieno le caratteristiche di resistenza dell'amalgama. E' stato utilizzato un campione di amalgama indurito, dello stesso tipo rispetto al precedente (Dispersalloy) dal peso di 672 mg e immerso in acqua distillata (25mL) portata a pH=4.01 con HCl ultrapuro dil. 1:10.

Parallelamente a questa, abbiamo preparato una seconda soluzione acida (25mL), allo stesso pH (pH misurato 3.90) inserendovi un campione di amalgama indurito del secondo tipo (Cavex Octight). Le soluzioni prepara-

te e messe a contatto con gli amalgami sono state poste ad agitare un'ora al dì per 20 giorni.

#### -Effetto delle microonde

E' stata esposto un campione di amalgama alle microonde secondo le seguenti modalità:

20 mL dalla soluzione sopra descritta (pH 6.13, tempo di contatto 26gg.), con l'amalgama all'interno, sono stati irradiati in un forno a microonde ( $\lambda=2450\text{MHz}$ ) per 80 secondi a 90 W di potenza.

Inoltre, è stato provato l'effetto dell'acido urico associato all'esposizione alle microonde. A tale scopo è stata preparata una soluzione (100mL) di acido urico 0.18g/L disciolto con qualche goccia di NaOH circa  $10^{-2}\text{M}$ , essendo minore la sua solubilità solo con l'acqua (0.1 g/l). Poiché la prova di rilascio richiede un pH leggermente acido, paragonabile a quello della saliva, è stata aggiunta qualche goccia di HCl diluito cercando di evitare una riprecipitazione dell'acido urico (pH finale misurato 6.36). A 25 mL di questa soluzione è stato immerso un frammento di amalgama indurito del peso di 0.1176 g. La soluzione è stata agitata 1 ora al giorno per 25 giorni dopo di che ne sono stati prelevati 15 mL che sono

sottoposti all'analisi dei metalli. I 10 mL rimanenti, contenenti l'amalgama, sono stati irradiati all'interno del forno a microonde per 70 secondi a 180 W di potenza e poi è stata eseguita l'analisi del mercurio.

#### -Effetto della saliva artificiale addizionata di acido urico

Sono stati preparati 500 mL di saliva artificiale aggiungendo 89 mg di acido urico per una concentrazione in soluzione pari a  $1.06 \cdot 10^{-3}$  moli/L ed un pH di 6.70.

Da questi 500 mL sono state prelevate due aliquote di 12,5 mL che sono state utilizzate per effettuare le prove a 90 ore con l'amalgama fresco, proveniente da due diversi marchi di fabbricazione: il Dispersalloy e il Cavex Octight. In pratica dopo aver preparato gli amalgami freschi l'abbiamo posti in un contenitore chiuso con 12.5 mL di saliva artificiale e messo all'interno di una cella di vetro termostata a 37°C. Tramite un magnetino all'interno del contenitore, è stata garantita la leggera agitazione continua durante tutto l'arco delle 90 ore. Al termine delle 90 ore la soluzione finale è stata separata dall'amalgama. Nella soluzione, però, si era formato un precipitato bianco, probabilmente acido urico precipitato, che abbiamo solubilizzato a caldo ed aggiungendo qualche goccia di NaOH 1M. Quest'ultima operazione è stata eseguita prima dell'analisi poiché una parte dei metalli poteva essere adsorbita o inglobata all'interno del precipitato. La soluzione limpida ottenuta è stata poi analizzata.

#### -Effetto della saliva artificiale addizionata di farmaci

Alla saliva artificiale (250 mL) sono state aggiunte 2 compresse di Vivin C e il pH finale è risultato pari a 6.38. Su un'altra eguale porzione di saliva artificiale sono stati aggiunti 790 mg ( $10^{-2}$  moli/L) di Diclofenac e il pH finale è risultato pari a 6.85.

Dopo le 90 ore le soluzioni sono state separate dagli amalgami. Mentre la soluzione contenente il modello di amalgama della Cavex era perfettamente limpida, quella proveniente dal contatto con il Dispersalloy conteneva un precipitato bianco. Questo precipitato, probabilmente di natura organica, era insolubile in acqua e pertanto è stato separato dalla soluzione mediante centrifugazione per 15 minuti a 5000 giri/minuto e poi sciolto con 12.5 mL di acetone.

In pratica alla fine sono state analizzate due soluzioni: una prima derivante dalla prova di contatto (90 ore) dell'amalgama Dispersalloy con la saliva artificiale addizionata di Diclofenac; una seconda con uguale protocollo sperimentale, ma utilizzando l'amalgama della seconda marca (Cavex Octight), e previa solubilizzazione del precipitato stesso in acetone.

#### -Effetto della saliva artificiale addizionata di nicotina

La saliva artificiale è stata preparata con la ricetta base. Il campione da 12.5 mL che viene utilizzato nelle prove di contatto a 90 ore, è stato preparato addizionando 6 mL ( $d^{20}=1.010$ ) di nico-

tina a 6.5 mL di saliva artificiale. Gli amalgami utilizzati sono stati quelli, già induriti, utilizzati nelle prove precedenti.

### Prove di tossicità

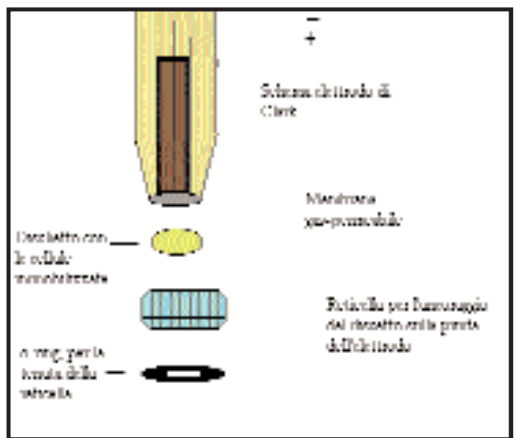


FIGURA 1: Schema dell'assemblaggio del biosensore

Sono state preparate soluzioni di ioni metallici, con eguali composizioni e concentrazioni di quelle ottenute dalle prove di rilascio dell'amalgama descritte in precedenza, che poi sono state somministrate alle cellule di lievito.







Dopo avere eseguito l'assemblaggio (fig 1), il biosensore viene immerso in 20 mL di glucosio circa 0.5 moli/L e si attende la stabilizzazione del valore di concentrazione di ossigeno misurato (nell'intervallo 0.5-2.5 ppm). Dopodiché si aggiunge la soluzione contenente gli ioni metallici in modo tale da raggiungere una concentrazione finale, nella cella di misura, pari a quella riscontrata nelle prove di rilascio dell'amalgama. Se quest'aggiunta causa una risalita della con-

 segue a pag. 20

## La purificazione resa facile ed economica !!!!!!!!!



*Purificate da 100 mg a 10 grammi di campione in modo rapido, efficiente ed economico usando JaiFlash il cromatografo per Cromatografia Flash della Gyan S.r.l.*

-  Usa cartucce pre-impaccate riutilizzabili di diversi diametri e lunghezze
-  Separazioni in 20 - 30 minuti
-  Riduce drasticamente il consumo di solventi
-  Riduce i tempi di purificazione
-  Aumenta la riproducibilità
-  Eliminate le colonne in vetro ed il lavoro ad esse legato.

Per preventivi e/o dimostrazioni contattate:



Alfattech S.p.A. Via Scarsellini 97 - 16149 Genova  
Tel. 010 46.99.369 Fax 010 46.99.377  
[info@alfatechspa.com](mailto:info@alfatechspa.com)



centrazione di ossigeno misurato (tratto ascendente della curva respirometrica) ciò è indice dell'inibizione respiratoria esercitata dalla tossicità del pool di metalli sui lieviti. Quando la curva raggiunge nuovamente un plateau (stato stazionario) si aggiungono alla soluzione 300-400 µl di formalina, che ha la funzione di inibire completamente la respirazione di tutte le cellule. Il fattore d'inibizione che poi viene usato come indice di tossicità sarà dato dalla seguente relazione:

$$IAR \% = (\Delta ppm(O_2)c / \Delta ppm(O_2)r) \times 100\%$$

dove Δppm (O<sub>2</sub>)c è il salto dovuto all'introduzione in soluzione del campione in esame e Δppm(O<sub>2</sub>)r è il salto totale dovuto al tossico di riferimento (formalina). Ovviamente tanto più sarà alto l'indice di inibizione %, tanto più sarà tossica la sostanza posta ad interagire con i lieviti.

Risultati e discussione

pH e Microonde  
L'analisi del mercurio, nelle soluzioni preparate al pH fisiologico della saliva e messe a contatto con l'amalgama dentale per 2, 7 e 26 giorni, hanno dato i risultati riportati in tab. 2  
Mentre, non si è evidenziata la presenza degli altri ioni metallici o comunque era sotto il limite di rivelabilità dello strumento. Questi valori sono molto più bassi di quelli riportati per le prove di contatto con la saliva artificiale e descritte in letteratura, vedi sopra. Quindi, il solo valore del pH, nelle condizioni sperimentali adottate, non è il maggior responsabile del rilascio di metalli da parte di un amalgama. Non si può, però, escludere un suo effetto di potenziamento dell'azione di rilascio promossa da altre sostanze presenti nella saliva.  
L'analisi dei metalli effettuata sulla soluzione proveniente dalla prova di esposizione alle microonde (MW), in presenza dell'amalgama e dopo che questo era stato a contatto per 26 gg con una soluzione a pH fisiologico, non ha evidenziato il rilascio di metalli (tutti i valori sono al di sotto del limite di rivelabilità), tranne che per il mercurio (Hg=3.50 ppb). Quindi non si è evidenziata un'influenza significativa delle microonde sul rilascio dei metalli da parte di un amalgama dentale.  
Per quanto riguarda l'analisi delle soluzioni a pH 4, provenienti dalle prove di contatto con gli amalgami delle due marche, sono stati ottenuti i risultati riportati in Tab. 3.  
Dai risultati riportati si può osservare che l'amalgama non rilascia in modo apprezzabile alle condizioni di pH fisiologico della saliva (pH compreso tra 5.30 e 6.80), mentre in condizioni più drastiche di pH si ottengono dei risultati che pur essendo piuttosto bassi (soprattutto per il mercurio), mostrano il differente comportamento dei due tipi di amalgama (maggiore rilascio di metalli per il Dispersalloy).

Acido Urico e microonde

La prima soluzione analizzata, contenente acido urico, è stata quella prove-

niente dalla prova di contatto con un frammento di amalgama già indurito per 26 giorni. I risultati ottenuti sono quelli riportati in Tab. 4.  
Questi risultati, considerando l'elevato periodo di contatto dell'amalgama con la soluzione, mostrano che l'amalgama indurito posto in una soluzione contenente acido urico non rilascia in modo apprezzabile.  
L'analisi della stessa soluzione irradiata dalle microonde non ha portato a risultati differenti da quelli sopra descritti sull'effetto delle MW sul rilascio a pH fisiologico in cui non è riscontrabile un'influenza significativa delle microonde sul rilascio degli amalgami dentali.  
Per quanto riguarda l'analisi delle soluzioni, contenenti la saliva artificiale addizionata con acido urico, provenienti dalle prove di contatto (90ore) con i due tipi di amalgami preparati freschi sono stati ottenuti i risultati di Tab. 5.  
In questo caso, soprattutto per il modello di amalgama Dispersalloy abbiamo ottenuto dei risultati di rilascio molto elevati per i metalli della lega a parte il mercurio, per il quale abbiamo ottenuto dei valori simili a quelli riportati in letteratura in presenza di saliva artificiale senza acido urico.  
Inoltre, si può osservare che, come nel caso delle prove a pH 4, c'è un differente rilascio di metalli da parte dei due tipi di amalgama, con una evidente prevalenza del modello Dispersalloy. Infine, si evidenzia un minore rilascio di acido urico in soluzione rispetto a quando è presente nella saliva artificiale, che però può dipendere anche dalla differenza di indurimento dell'amalgama; infatti, l'amalgama fresco sembra rilasci maggiormente di quello indurito.  
Farmaci  
L'analisi delle soluzioni, provenienti dalle prove di contatto tra la saliva artificiale addizionata di Vivin C e i due tipi di amalgama già indurito, hanno dato i risultati di Tab. 6.  
Per l'amalgama del tipo Cavex Octight abbiamo ottenuto dei risultati di rilascio elevati per lo stagno e per il rame, mentre per mercurio e zinco i valori ottenuti non sono trascurabili se si tiene conto del fatto che l'amalgama non era fresco e quindi rilasciava di meno. Ancora una volta i valori ottenuti dal rilascio del Dispersalloy sono stati maggiori rispetto al modello Cavex Octight. Lo stesso mercurio è stato rilasciato in quantità piuttosto elevate, anche in considerazione che l'amalgama utilizzato non era fresco. Risulta piuttosto evidente dai risultati ottenuti che le sostanze presenti nelle compresse di VIVIN C sono in grado di solubilizza-

gg di contatto	Rilascio Hg (ppb) "Dispersalloy" (%RSD ≤ 2%)
2	1.71
7	2.34
26	3.48

Tab. 2 Risultati dell'effetto del pH fisiologico sul rilascio di Hg da un amalgama

Metalli analizzati	Rilascio "Cavex Octight" (ppb)	Rilascio (ppb)"Dispersalloy" (%RSD < 2%)
Ag	0	0
Cu	22	149
Zn	34	198
Sn	20.44	0
Hg	1.4	12.4

Tab. 3 Risultati dell'effetto del pH=4 sul rilascio di due tipi di amalgama

Metalli analizzati	Rilascio (ppb)"Dispersalloy" (%RSD ≤ 2%)
Ag	0
Cu	20
Zn	34
Sn	18
Hg	15.1

Tab. 4 Risultati dell'effetto dell'acido urico sul rilascio di un amalgama

Metalli analizzati	Rilascio "Cavex Octight" (ppb)	Rilascio (ppb) "Dispersalloy" (%RSD < 2%)
Ag	43	80
Cu	70	209
Zn	340	4080
Sn	104	212
Hg	78.4	80.4

Tab. 5 Risultati dell'effetto dell'acido urico, addizionato alla saliva artificiale, sul rilascio di due tipi di amalgama

Metalli analizzati	Rilascio "Cavex Octight" (ppb)	Rilascio (ppb) Dispersalloy (%RSD ≤ 2%)
Ag	0	0
Cu	261	0
Sn	814.5	1439
Zn	105	2730
Hg	34.8	84.8

Tab. 6 Risultati dell'effetto del VIVIN C, addizionato alla saliva artificiale, sul rilascio di due tipi di amalgama

re una parte dei metalli contenuti nell'amalgama indipendentemente dal modello che viene studiato.  
Dalle prove con il DICLOFENAC sono stati ottenuti i risultati riportati in Tab. 7.  
Anche questa prova è risultata indicati-

va rispetto al differente comportamento dei due tipi di amalgami dentistici. I valori trovati per il modello Dispersalloy sono molto più elevati di quelli riportati in letteratura in cui si utilizzava un amalgama fresco. Ciò lascia intendere che il DICLOFENAC può

Metalli analizzati	Rilascio "Cavex Octight" (ppb)	Rilascio (ppb) "Dispersalloy" (%RSD ≤ 2%)
Ag	0	96
Cu	0	30
Zn	0	119
Sn	59	174
Hg	63.6	619.5

Tab. 7 Risultati dell'effetto del DICLOFENAC, addizionato alla saliva artificiale, sul rilascio di due tipi di amalgama

Metallo analizzato	Rilascio "Cavex Octight" (ppb)	Rilascio (ppb) "Dispersalloy" (%RSD ≤ 2%)
Hg	94.8	90.4

Tab. 8 Risultati dell'effetto della NICOTINA, addizionato alla saliva artificiale, sul rilascio di due tipi di amalgama

Tipo di amalgama	Riferimento delle prove di rilascio	Concentrazione metalli somministrati alle cellule (ppb)	Durata media di una misura (minuti)	Indice di IAR %
Cavex Octight	VIVIN C	Ag = 0 Cu = 261.11 Zn = 814.5 Sn = 105.2 Hg = 34.80	150	7 ± 7
Dispersalloy	VIVIN C	Ag = 0 Cu = 0 Zn = 1439 Sn = 2730 Hg = 84.80	150	15 ± 4
	Acido urico	Ag = 0 Cu = 20.24 Zn = 34.41 Sn = 18.14 Hg = 15.14	150	12 ± 5
	DICLOFENAC	Ag = 96.35 Cu = 29.73 Zn = 119.11 Sn = 173.84 Hg = 619.45	180	48 ± 9

interagire con alcuni tipi di amalgami molto fortemente, potenziando l'ingestione di mercurio.

Nicotina

L'analisi del mercurio nella soluzione proveniente dalla prova di contatto a 90 ore, condotta con l'impiego della saliva artificiale addizionata di nicotina, ha dato i risultati di Tab. 8. Dai risultati riportati in tabella emerge come in questa analisi i due tipi di amalgami si sono comportati nello stesso modo per quanto riguarda il rilascio di mercurio. Le quantità trovate sono circa uguali a quelle rilasciate da un amalgama

fresco. Nonostante ciò, il rilascio sembra piuttosto basso considerando l'elevata affinità della nicotina per il mercurio (reazione acido/base di Lewis).

Valutazione della tossicità (misure respirometriche)

Sono state somministrate alle cellule di lievito soluzioni contenenti le stesse concentrazioni di metalli sulla base dei risultati ottenuti nelle diverse prove di rilascio. Di queste prove abbiamo preso in considerazione solo quelle che hanno mostrato una più alta concentrazione di metalli rilasciati. Nella tabel-

la riassuntiva pubblicata qui sopra vengono riportati i risultati ottenuti dalle prove di tossicità sui lieviti. Dai risultati ottenuti si evidenzia che, come atteso, la tossicità è maggiore all'aumentare della concentrazione dei metalli pesanti, ma non è possibile distinguere l'effetto sulla respirazione di un singolo metallo del "pool", in quanto il metodo respirometrico valuta la tossicità integrale. E' da tenere conto che le concentrazioni dei metalli rilasciati dall'amalgama sono state ottenute per tempi di contatto relativamente brevi. Inoltre, anche le prove di tossicità hanno avuto tempi relativamente brevi di esposizione delle cellule al tossico; nel caso

dell'uomo bisogna tenere presente la possibilità che i metalli possono bioaccumularsi nei tessuti.

CONCLUSIONI

Questo lavoro è stato svolto al fine di verificare se un amalgama dentale rilasci i metalli pesanti contenuti in esso, così da costituire una pericolosa fonte di esposizione per l'uomo. Dai risultati ottenuti emerge come il rilascio dei metalli da un amalgama dentale, è favorito dalla presenza nella saliva di sostanze chimiche assunte attraverso trattamenti farmacologici (Es: VIVIN C, Diclofenac) o per stati patologici (acido urico) o per abitudini personali (nicotina). Mentre, per quanto riguarda sia l'effetto delle microonde e sia del pH entro i valori fisiologici (5.3 – 6.8), ma senza la presenza della saliva artificiale, si può osservare che i risultati ottenuti non mostrano un significativo rilascio. Dalla valutazione della tossicità mediante i test respirometrici, si può concludere che il rischio da esposizione ai metalli pesanti, presenti in un amalgama dentale, è effettivamente esistente e non deve essere sottovalutato, soprattutto se si considera la possibilità di utilizzare altri materiali nelle otturazioni dentarie che sembrano essere più sicuri dal punto di vista del rischio per l'uomo.

Bibliografia

[1] Carere A, Apostoli P. (1999) "Mercurio inorganico e amalgami usati in odontoiatria". Relazione svolta all'Istituto Superiore di Sanità  
[2] Bangsi D, Ghadirian P. (1998) "Dental amalgam and multiple sclerosis: a case control study in Montreal, Canada". International Journal of Epidemiology 27, 667-671.  
[3] Galic N, Prester L. (1999) "Dental amalgam mercury exposure in rats". Biometals 12, 227-231.  
[4] Stortebecker P. (1989) "Mercury poisoning from dental amalgam through a direct nose-brain transport". Lancet 1, 1207.  
[5] Sanna G et al. (1999) "Determinazione di ioni metallici rilasciati da amalgami dentali mediante tecniche voltammetriche di ridissoluzione anodica". XV Convegno Nazionale, Divisione Chimica Analitica, Società Chimica Italiana. 27 settembre –1 ottobre 1999, Addaura-Mondello (PA).  
[6] L. Campanella, R. Dragone, G. Favero, (1999) "Patent N° RM 99A000370".  
[7] Nikawa Y, Kawai K. (1999) "Dental caries heating using Microwaves". 7th International Conference on Microwave and High Frequency Heating.  
[8] Owen-Smith B, Quiney J. (1998) "Salivary urate in gout, exercise, and diurnal variation". Lancet 351, 1932.  
[9] Kovala-Demertzi D, Terzis A. (1993) "Metal complexes of the anti-inflammatory drug sodium [2-[(2,6-dichlorophenyl)amino]phenyl]acetate (diclofenac sodium). Molecular and crystal structure of cadmium diclofenac". Polyhedron 12, 1361-70.  
[10] Muralidharan S, Udupa M. (1988) "Nicotine complexes of zinc(II) cadmium(II) and mercury(II)". Indian J. Chem. 27, 76-7.  
[11] Munir C, Zaidi I. (1994) "Zinc, cadmium and mercury as extractants of nicotine from tobacco leaves". Main group Met. Chem. 17, 673-7.