UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Fellipe Augusto Tocchini de Figueiredo

*Determinação de chumbo e massa de tíbias de
ratos Wistar machos expostos a 30 mg/l de
chumbo na água de beber desde o período
intrauterino até a idade de 28 e 60 dias.*

Ribeirão Preto

2012

Fellipe Augusto Tocchini de Figueiredo

Determinação de chumbo e massa de tíbias de ratos Wistar machos expostos a 30 mg/L de chumbo na água de beber desde o período intrauterino até a idade de 28 e 60 dias.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre, pelo curso de Pós-Graduação no Programa de Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Biologia Oral

Orientadora: Prof^a. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

Ribeirão Preto

2012

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Figueiredo, Fellipe Augusto Tocchini de Figueiredo

Caracterização dos elementos inorgânicos mais abundantes encontrados no osso de ratos expostos a quantidades excessivas de chumbo. Ribeirão Preto, 2012.

74 p. : il. ; 30 cm.

Versão Original da Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Oral.

1. Chumbo. 2. Osso. 3. Microscopia Eletrônica de Varredura. 4. EDS. 5. WDS.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fellipe Augusto Tocchini de Figueiredo

Determinação de chumbo e massa de tíbias de ratos Wistar machos expostos a 30 mg/L de chumbo na água de beber desde o período intrauterino até a idade de 28 e 60 dias.

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre, pelo curso de Pós-Graduação no Programa de Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Biologia Oral

Aprovada em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof.(a). Dr.(a).: _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho,

Aos meus pais: Que me deram todo o suporte, amor, carinho e me ensinaram a lutar pelo que é certo, sempre. Ao “seu Celso”, por me dar opções, puxões de orelha, dedicação e amor. À “dona Shirlene” que me ensinou a fazer tudo do jeito correto, sempre me disse que tudo daria certo e me deu um amor de mãe único, maravilhoso e indescritível.

À minha irmã fabi: Que me deu conselhos, amor, abraços forçados por mim e toda ancoragem para fazer valer o esforço, foi o meu espelho para conseguir terminar.

À minha Tipuia Ana Lúcia: Minha amiga, minha companheira, meu amor da minha vida, minha razão para trabalhar, me deu um norte, me deu e me dá suporte, muito amor, carinho e todas as outras coisas que são ótimas de ter no coração

As minhas primas, Giovanna e Tatiana que foram as pessoas que me inspiraram a fazer pós-graduação.

À minha amiga Junia Ramos, vulga “juju” pela ajuda em todas as horas, pelos ensinamentos em pesquisa e pelo exemplo de trabalho que sempre carregarei por toda a minha vida.

À minha orientadora Professora Raquel por acreditar em mim, só isso, pois me ajudar, me ensinar a trabalhar, a produzir ela o fez no total da humildade e carinho, mas acreditar em mim, como aluno, como explorador de ideias, ninguém nunca o fez antes, à ela agradeço e devo este trabalho.

À um senhor médico, que foi o primeiro a me dizer que eu deveria fazer pós-graduação, deveria pesquisar e deveria ler coisas novas e interessantes. A ele dedico a minha pós-graduação.

Ao meu amigo Conrado, sem ele o que seria de mim? Para quem eu viajaria na maionese? Eu consegui iniciar esse trabalho graças a ele, sempre brilhante, sempre ao meu lado, sempre me enchendo, ele tem parte fundamental deste trabalho.

À Deus, que me fez curioso, sem essa curiosidade não conseguiria conquistar meus objetivos.

Obrigado a todos que me esqueci nesse momento, pois eu não seria eu se não me esquecesse

Agradecimentos

Aos meus amigos e amigas: Bruna Kotake, Amanda(suplente), Professora Mamie, Professor João Paulo, Rodrigo, Gabi Bianca, Bruna, Professor Raphael, Aline, Alejandro, Élen e a todos os outros amigos que esqueci e fizeram parte dessa caminhada.

Agradeço à USP, pois sem a consciência de pesquisa, eu não chegaria onde cheguei com tantas oportunidades.

Agradeço à CNPQ e CAPES pela minha vida de pesquisa sempre com bolsa de estudos.

Ao Departamento de Morfologia Estomatologia e Fisiologia que me deu ótimos amigos e trabalhos.

RESUMO

O chumbo é um metal muito tóxico e que tem ampla distribuição pela sua grande utilidade. Mesmo a exposição a baixos níveis (que não causam sintomas de intoxicação aguda) de chumbo é associada a desordens cognitivas e neurológicas. O osso é considerado o melhor marcador de exposição a chumbo. No tecido ósseo, vários elementos estão presentes, e alguns deles poderiam ter sua concentração modificada pela exposição a chumbo. Testou-se a hipótese de que haja variações nos elementos Zn e Mg nas tíbias de animais expostos a chumbo (por técnica de química analítica convencional). Testou-se também se variações em microelementos poderiam ser detectadas por técnicas semiquantitativas nas tíbias de controles e animais expostos a chumbo. O objetivo deste projeto foi caracterizar em animais expostos ao chumbo desde a gestação e controles as concentrações deste elemento no osso (tíbia) de animais de 28 e 60 dias. Além do chumbo, investigamos também a concentração de 2 outros microelementos no osso: zinco e magnésio. As medidas quantitativas de chumbo foram feitas no sangue total coletado ao final dos períodos. As medidas quantitativas de chumbo, cálcio, zinco e magnésio foram realizadas a partir de soluções ácidas obtidas pela dissolução total do osso, sendo estas utilizadas para quantificar por Espectrometria de Absorção Atômica no modo chama ou com Forno e Grafite. Mandíbulas foram analisadas em Microscopia Eletrônica de Varredura e utilizando os acessórios Eletron Dispersive Spectroscopy para os elementos mais abundantes e Wavelength dispersive Spectroscopy para investigar por análise semiquantitativa os mais abundantes elementos inorgânicos no osso destes animais, como forma de verificar se há variações nestes microelementos nos animais expostos a chumbo em comparação com controles. Como o chumbo se concentra na superfície do esmalte, também analisou-se o esmalte de primeiros molares inferiores, a fim de verificar se era visto o sinal do elemento chumbo nestes dentes. Foram usados ratos Wistar machos de 28 e 60 dias divididos em 2 grupos: C 28D (n=5) e Pb 28D (n=5) e, C 60D (n=12) e Pb 60D (n=17). Em todas as medidas de chumbo dos grupos controle as concentrações obtidas foram próximas ao limite de detecção, e houve sempre diferença estatisticamente significativa ($P < 0.0001$) quando os controles foram comparados aos grupos expostos a chumbo. As concentrações de chumbo obtidas no sangue de animais do grupo Pb 28D foi de 8,0 ug/dl (± 1.1) e no grupo Pb 60D foi de 7,2 ug/dl (± 0.89). Houve diferença estatisticamente significativa entre as massas das tíbias (aferidas em balança e também a partir da quantidade de cálcio dissolvida em solução) do grupo C 60D (0,86 g $\pm 0,13$) e Pb 60D (0,61 g $\pm 0,11$) ($p = 0.0004$). As concentrações de chumbo detectadas nos ossos do grupo Pb 28D foi 8,02 ($\pm 1,12$) e no grupo Pb 60D foi de 43,3ug/g ($\pm 13,26$). Concentração de zinco no osso do grupo C 60D foi 0,22 mg/g e no grupo Pb 60D foi 0,22 mg/g ($p > 0.05$). A concentração de magnésio no osso do grupo C 60D foi de 4,89 mg/g $\pm 0,74$ e no grupo Pb 60D foi de 4,98mg/g $\pm 0,79$ ($p > 0.05$). Os microelementos mais abundantes detectados nas tíbias contralaterais por Microscopia Eletrônica de varredura por EDS/WDS foram cálcio, fósforo, carbono, oxigênio, magnésio, sódio e potássio, não tendo sido detectadas variações nestes elementos entre os grupos controle e expostos a chumbo de 60 dias. O chumbo foi detectado apenas na região cervical dos dentes molares por MEV-EDS, e, nesta posição, apenas na forma de óxido de chumbo (deposição extrínseca) que pode ser útil para fins forenses ou de determinação de contaminação desconhecida. As conclusões deste estudo são: Houve diferença

estatisticamente significativa entre as massas de osso do grupo Pb 60D e C 60D. Mesmo não havendo diferença entre as concentrações de chumbo no sangue total de animais de 28 e 60 dias, houve quantidade de chumbo 5 vezes maior nos animais Pb 60D. Não houve diferenças nas concentrações de zinco e magnésio entre controles e animais expostos a chumbo. Os microelementos mais abundantes detectados nas tibias contralaterais por Microscopia Eletrônica de varredura por EDS/WDS foram cálcio, fósforo, carbono, oxigênio, magnésio, sódio e potássio, não tendo sido detectadas variações semi-quantitativas nestes elementos. O chumbo não foi detectado nem nos grupos controle ou expostos por MEV, e nos molares só foi detectada no grupo exposto como uma deposição extrínseca.

Palavras-Chave: Chumbo, Zinco, Magnésio, Osso, Tibia, Molar, Espectometria de absorção atômica (EAA), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Electron Dispersive Spectroscopy (EDS) and Wavelength dispersive Spectroscopy (WDS).

ABSTRACT

Lead is a highly toxic metal that is ubiquitous due to its great usefulness. Exposure to even low levels of lead (which do not cause symptoms of acute poisoning) is associated with cognitive and neurological disorders. Bone is considered the best marker of exposure to lead. Several chemical elements are found in bone, and some of them may have a different concentration or distribution due to exposure to lead. We tested the hypothesis that there are variations in the elements zinc and magnesium in the tibia of animals exposed to lead (being those elements determined by a conventional analytic chemistry technique). It was also tested whether variations in microelements could be detected by semiquantitative microanalysis in tibias of controls and animals exposed to lead. The objective of this project was to determine the concentration of lead in bone (tibia) of animals exposed to lead from pregnancy to day 28 and day 60. Besides lead, zinc and magnesium were also determined. Lead was also determined in whole blood collected at the end of the 2 time points. Quantitative measurements of lead, calcium, zinc and magnesium have been made in solutions obtained by dissolution of the bone by Atomic Absorption Spectrometry using flame or Graphite Furnace. Tibias were analyzed by scanning electron microscopy using the accessories Electron Dispersive Spectroscopy and Wavelength dispersive Spectroscopy for semiquantitative analysis of inorganic elements in the bone and molars of these animals. Lower molars were also analyzed by these means. Male Wistar rats aged 28 and 60 days were used in these study. In both these ages there were animals in the control (C 28D, n = 5 and C 60D, n=12) and lead exposed group (Pb 28D, n = 5 and Pb 60D, n = 17). Lead concentrations found in control groups were close to the detection limit, and there was always statistically significant differences ($P < 0.0001$) when control groups were compared with those exposed to lead. Blood lead of groups Pb 28D and Pb 60D was 8.0 ug/dl (± 1.1) and 7.2 ug/dl (± 0.89), respectively. There was a statistically significant difference between the masses of the tibia (measured in balance and also from the amount of calcium dissolved in solution): C 60D showing 0.86 g (± 0.13 g) and 0.61 g (± 0.11) of the Pb 60D group ($p = 0.0004$). Lead concentrations increased five times when the Pb 28D group was compared with the Pb 60D (8.02 and 43.3 ug/g)($p < 0.0001$). Zinc concentrations were not different in the C 60D (0.22 mg/g) and in the Pb 60D group (0.22 mg/g)($p > 0.05$). Magnesium concentrations were 4.89 mg/g in the C 60D and 4.98 mg/g in the Pb 60D ($p > 0.05$). The most abundant trace elements detected in the contralateral tibiae by SEM-EDS/WDS were calcium, phosphorus, carbon, oxygen, magnesium, sodium and potassium and no variations in these elements were detected between the control and lead exposed groups. Lead was detected only in the cervical region of molar teeth of the lead exposed groups by SEM-EDS. This finding revealed lead in the lead oxide (extrinsic deposition) which may be useful for forensic purposes or for determining unknown contaminations. Conclusions: There was a statistically significant difference between the bone masses of the Pb 60D and C 60D groups. While there is no difference between lead concentrations in whole blood of animals 28 and 60 days, the amount of lead was 5 times higher in animals Pb 60D. There were no differences in the concentrations of zinc and magnesium between controls and lead exposed animals. The most abundant trace elements detected in the contralateral tibiae by SEM-EDS/WDS were calcium, phosphorus, carbon, oxygen, magnesium, sodium and potassium, and no semi-quantitative variations in these elements were detected in relation to exposure to lead. Lead was

not detected either in control or exposed groups by SEM, and in molars it was only detected in the exposed group as an extrinsic deposition.

Keywords: Lead, zinc, magnesium, Bone, tibia, molar, Atomic Absorption Spectrometry (AAS), Scanning Electron Microscope (SEM), Electron Dispersive Spectroscopy (EDS) and Wavelength dispersive Spectroscopy (WDS).

LISTA DE SIGLAS

BEC	=	Elétrons Retroespalhados
C 28D	=	Grupo Controle 28 dias
C 60D	=	Grupo Controle 60 dias
Ca	=	Cálcio
EDS	=	Eletron Dispersive Spectroscopy
EAA-FG	=	Espectrometria de absorção atômica por forno de grafite
EAA-CA	=	Espectrometria de absorção atômica por chama de acetileno
F-AAS	=	Flame Atomic Absorption Spectrometry
GF-AAS	=	Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry
g	=	Gramas
kV	=	Quilo volts
Kev	=	Quilo eletron-volt
L	=	Litros
MEV	=	Microscópio Eletrônico de Varredura
mg	=	miligramas
mg/g	=	miligramas por grama
mg/L	=	miligramas por litro
Mg	=	Magnésio
ml/min ou ml.Min ⁻¹	=	Mililitro por minuto
mm/min	=	milímetros por minuto
ml	=	Mililitro
Pb	=	Chumbo(Lead)
Pb 28D	=	Grupo exposto com 28 dias
Pb 60D	=	Grupo exposto com 60 dias
ug/L	=	micrograma por litro
ug/dl	=	micrograma por decilitro
SEM	=	Scanning Electron Microscope
s	=	Segundos
Zn	=	Zinco
WDS	=	Wavelength dispersive Spectroscopy

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 HIPÓTESE	20
3 OBJETIVOS	21
4 MATERIAIS E MÉTODOS	22
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
6 RESULTADOS.....	39
7 DISCUSSÃO	57
8 CONCLUSÕES	64
9 BIBLIOGRAFIA	65

1 INTRODUÇÃO

Toxicidade do Chumbo(Pb)

Diversos estudos relacionam problemas de saúde com altas concentrações de minerais industriais, elementos provindos de rios contaminados e descuidos com a água na rede pública de água.

Nos EUA, estudo aponta que aproximadamente 434.000 crianças com menos de 6 anos de idade, possuíam níveis iguais ou maiores que 10 ug/dL, que até esse momento era considerado alta contaminação (Meyer, Pivetz *et al.*, 2003), hoje é considerado que 5ug/dl como um dado limítrofe (Cdc, 2012), por se tratar de um país em que as crianças faziam exames para verificação da contaminação pelo chumbo no sangue anualmente.

Considerando que a presença de mercúrio no corpo humano induz o aumento de risco desenvolvimento de doença cardiovascular (Boffetta, Sallsten *et al.*, 2001); (Guallar, Sanz-Gallardo *et al.*, 2002); (Salonen, Seppanen *et al.*, 2000); (Virtanen, Voutilainen *et al.*, 2005) e que a sua presença causa defeitos deletérios em humanos (Clarkson e Magos, 2006); (Mergler, Anderson *et al.*, 2007), recentemente um estudo relaciona a presença de mercúrio com aumento das concentrações de MMP-2 e MMP-9 (MMP-Metaloproteinases) relacionando com os problemas cardiovasculares inerentes (Jacob-Ferreira, Passos *et al.*, 2009).

Em estudo realizado na faculdade de odontologia de ribeirão preto, sugere que o C⁻¹³⁰⁶T interage com mercúrio e afeta os níveis de MMP-2 e TIMP-2/MMP-2 (Jacob-Ferreira, Lacchini *et al.*, 2011).

Exposição a Flúor

Considerando que a exposição ao flúor gera alterações nas matrizes minerais dos ossos e dentes, é de se esperar que o chumbo cause alguma alteração, uma vez que é incorporado a este tecido, então podemos considerar quando um dente está envolvido com o quadro de fluorose moderada, o problema se restringe à estética. Entre as características mais marcantes da fluorose do esmalte estão os defeitos de transluzidez e alteração da dureza do esmalte dentário, este último

responsável pela perda estrutural. O mecanismo que leva ao desenvolvimento dos defeitos de esmalte sob excesso de flúor durante a fase de formação do esmalte (amelogênese) não é totalmente compreendido, mas o achado bioquímico mais bem caracterizado é o aumento do conteúdo proteico na matriz do esmalte durante a fase de maturação (Denbesten e Crenshaw, 1987).

Recentemente tem sido estabelecido por vários estudos que há aumento do conteúdo protéico no esmalte maduro (Porto, Merzel *et al.*, 2009). Além disso, os defeitos de esmalte decorrentes do excesso de flúor em sua composição causam uma diminuição de sua mineralização (Porto, Merzel *et al.*, 2009).

Mas além da exposição ao flúor, muitos outros insultos levam à formação de defeitos do esmalte por interferirem na amelogênese normal. Uma das principais razões para o esmalte ser tão suscetível a pequenos defeitos é o fato de a amelogenese ser um dos processos de formação mais longos ocorridos no corpo humano (Smith, 1998). Uma das agressões mais conhecidas sobre a mineralização do esmalte ocorre pela exposição a dioxinas (Alaluusua e Lukinmaa, 2006), hipovitaminose da vitamina A e febre na infância (Chachra, Turner *et al.*, 1999; Avery, 2001) e elevadas doses de íon fluor podem causar fluorose esquelética, resultando em fraturas ósseas (Boivin, Chavassieux *et al.*, 1989), além de toxicidade renal (Zager e Iwata, 1997), toxicidade às células epiteliais do pulmão (Thrane, Refsnes *et al.*, 2001) e defeitos teratogênicos (Ghosh, Das Sarkar *et al.*, 2002).

Exposição ao Chumbo e acúmulo de Chumbo em tecidos mineralizados

O chumbo permanece nos ossos por 27 anos (Rabinowitz, Wetherill *et al.*, 1976) e durante a sua distribuição, o chumbo segue a via metabólica do cálcio e se acumula nos ossos e dentes (O'flaherty, 1995). O estoque de chumbo nos tecidos calcificados depende do turnover ou remodelação óssea que acontece nesse tecido e isso depende do tipo de osso, que pode ser cortical (baixo turnover) ou trabecular (alto turnover) (O'flaherty, 1995).

O chumbo causa alterações bioquímicas e neurológicas substanciais, tais quais como retardo mental, convulsões, paralisia cerebral e hiperatividade (Shapiro, Mitchell *et al.*, 1975); (Who, 2012); (Rosin, 2009). As crianças são mais sensíveis a exposição deste metal (Cleymaet, Bottenberg *et al.*, 1991); (Ong e Lee, 1980); (Jarup, 2003).

A dentina de dentes de leite foi um dos biomarcadores de exposição a chumbo mais importantes(Rabinowitz, Wetherill *et al.*, 1976);(Needleman, Gunnoe *et al.*, 1979), pois foi com a dentina que se conseguiu aferir a exposição passada a baixas doses de chumbo e provar que havia comprometimento da função cognitiva e do comportamento de crianças mesmo em concentrações de chumbo no sangue que não estão associados a sintomas de intoxicação aguda(Gerlach, 2009).

Todos os seres humanos têm chumbo em seus organismos como resultado da exposição às fontes exógenas(Saryan L.A., 1994). No entanto, este metal não possui nenhuma função fisiológica conhecida no organismo, e seus efeitos tóxicos sobre os homens e animais já são conhecidos há muito tempo por afetarem praticamente todos os órgãos e sistemas do corpo humano(Xie, Chiba *et al.*, 1998).

Exposição ambiental a baixos níveis de chumbo tem sido associada com déficit subclínico na função cognitiva em crianças pequenas(Needleman, Gunnoe *et al.*, 1979) e em adolescentes(Needleman e Bellinger, 1991), bem como com inúmeras outras doenças prevalentes na sociedades industrializadas, tais como distúrbio de déficit de atenção(Braun, Kahn *et al.*, 2006), o comportamento delinquente (Dietrich, Ris *et al.*, 2001; Needleman, Mcfarland *et al.*, 2002);(Wright, Dietrich *et al.*, 2008), deficiência auditiva (Rothenberg, Poblano *et al.*, 2000), abortos espontâneos(Borja-Aburto, Hertz-Picciotto *et al.*, 1999) e hipertensão (Navas-Acien, Guallar *et al.*, 2007). Curiosamente, uma forte associação foi descrita entre os níveis de chumbo no sangue de crianças em idade pré-escolar e os índices de criminalidade em muitos países (Nevin, 2007). Juntos, estes resultados indicam que a exposição a altos níveis de chumbo é um dos mais sérios problemas de saúde pública. Na cidade do México, foram realizadas medidas de chumbo no osso pelo método de fluorescência, para saber a quantidade de chumbo por ug/g em osso tibial cortical e a quantidade de chumbo em sangue do cordão umbilical por absorção atômica, concluindo que em meninas, mas não em meninos as pressões arteriais são modificadas pelo chumbo(Zhang, Hu *et al.*, 2012)

A sequência de sintomas e sinais decorrentes da ação do metal sobre o SNC deve ser vista como possibilidades de ocorrência dependendo sempre da duração da exposição e da concentração de Pb no ambiente.

O chumbo quando inalado é completamente absorvido. Já a absorção gastrointestinal em adultos está em torno de 10 a 15%, e armazenam cerca de 5%

do que é absorvido, em crianças está em torno de 41,5% e retém 38,1% (Ziegler, Edwards *et al.*, 1978).

O diagnóstico pode ser complementado com outros testes que são pelo aumento de ácido deltaminolevulínico na urina (ALA-U), aumento da dosagem de coproporfobilinogênio na urina (CPU), aumento de protoporfirina IX, dosada na forma livre (EP) ou na forma zincada (ZPP), e diminuição na atividade da ácido deltaminolevulínico desidratase (ALA-D)(De Capitani, 2009),(Paoliello, De Capitani *et al.*, 2002). A confirmação definitiva do diagnóstico se dá pela dosagem de algum parâmetro de dose interna, como chumbo no sangue (plumbemia) ou na urina (plumbúria) (De Capitani, 2009).

Após sua absorção, o chumbo passa a ser distribuído por todo o organismo, através da corrente sanguínea. A maior parte dele, cerca de 95% do chumbo absorvido, se liga aos eritrócitos e pode se depositar nos tecidos moles ou duros, ou ainda ser excretado(Rabinowitz, 1991); (Ong e Lee, 1980).

O tratamento para a intoxicação aguda (recomendado quando as concentrações de chumbo no sangue total são $> 60 \text{ ug/dL}$) está baseado no emprego de agentes medicamentosos comerciais como dimercaprol (BAL), do versenato de cálcio (EDTACaNa_2) e da D-penicilamina, entretanto os quelantes mais eficazes são o EDTACaNa_2 por via parenteral e o ácido dimercapto succínico (DMSA) por via oral (De Capitani, 2009). Estes agentes quelantes tem vários efeitos colaterais indesejáveis que limitam muito o seu uso.

Quando os indivíduos são expostos a concentrações inferiores a 60 ug/dL no sangue total, o tratamento é afastar a fonte de exposição, não estando indicado qualquer outro medicamento(De Capitani, 2009).

Entretanto, deveria ser buscada uma nova alternativa para reduzir as concentrações de chumbo no corpo de escolares quando estes estão expostos a concentrações associadas a perdas cognitivas, mas que não tem recomendação de tratamento com EDTACaNa_2 ou suxinato (concentrações de chumbo no sangue entre 10 ug/dL e 60 ug/dL). Isso pode ser ainda mais importante ao levar em conta que em crianças a remodelação dos ossos torna biodisponível o chumbo que estava estocado no osso. Quando os níveis de chumbo aumentam no sangue, seria o momento de proteger outros órgãos como o cérebro, por exemplo, de altas concentrações de chumbo. Além disso, após o remodelamento, seria possível

diminuir a nova deposição de chumbo em osso neoformado, caso se tivesse uma droga pouco tóxica que aumentasse a excreção do chumbo.

O sangue não é considerado como um biomarcador confiável para exposições a chumbo porque este mineral em corrente sanguínea tem a sua concentração diminuída num período de 40 dias após a exposição, ficando acumulado nos tecidos mineralizados (Barbosa, Tanus-Santos *et al.*, 2005). A dentina de dentes de leite foi um dos biomarcadores de exposição passada mais importantes (Rabinowitz, Wetherill *et al.*, 1974; Needleman, Gunnoe *et al.*, 1979). A vantagem do uso da dentina é que ela traz uma informação parecida com a da concentração de chumbo no osso.

Em humanos, para intervenções não invasivas, este método é o mais indicado de quantificação de chumbo (De Almeida, De Souza Guerra *et al.*, 2008). Tem sido demonstrado que a concentração superficial de chumbo do esmalte está relacionada com a exposição ambiental do indivíduo ao chumbo (Gomes, Rosario De Sousa Mda *et al.*, 2004), e o esmalte tem sido proposto como um biomarcador de exposição ao chumbo.

Animais expostos com chumbo e fluoretos apresentam 3,4 vezes mais chumbo no sangue e 3,1 vezes mais chumbo nos ossos comparados com os animais expostos apenas com chumbo (Sawan, Leite *et al.*, 2010). Desde que foi demonstrado que o chumbo inibe as proteinases do esmalte *in vitro* (Gerlach, De Souza *et al.*, 2000) e provoca o atraso da mineralização demonstrado em dentes (Gerlach, Cury *et al.*, 2002), foi formulada a hipótese de que o chumbo está relacionado com a fluorose dental.

Existem três principais etapas do ciclo de vida ameloblasto que são de secreção, transição e maturação, que correspondem a etapas distintas de desenvolvimento do esmalte.

Durante a fase de secreção, os ameloblastos são altos e colunares, e eles secretam grandes quantidades de proteínas que formam uma matriz no qual fitas de esmalte fino de hidroxiapatita cristalizam. Uma vez que as fitas de esmalte atinjam o seu comprimento total, os ameloblastos entram na fase de transição, quando há a diminuição de sua estatura, redução do complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso.

Durante a fase de maturação, os ameloblastos secretam KLK4 (Simmer, Fukae *et al.*, 1998) para ajudar a degradar as proteínas do esmalte, que são então

reabsorvidas do esmalte em maturação. É durante o estágio de maturação do esmalte que as fitas crescem em largura e espessura para formar esmalte endurecido maduro. O esmalte normal tem 96% de composto mineral e 4% teor de matéria orgânica (Robinson, Kirkham *et al.*, 1988).

Exposição ao Chumbo e ao Flúor

Estudos mostram uma interação entre chumbo e flúor, dois elementos que se acumulam em tecidos mineralizados e são capazes de substituir o cálcio e a hidroxila na estrutura da hidroxiapatita, respectivamente (Verbeeck, Lassuyt *et al.*, 1981).

Portanto, diversos estudos demonstram claramente que a fluorose óssea causa muitos danos à resistência óssea, alterando a sua mineralização e a sua remodelação. Porém, são caracterizadas possíveis variações em outros elementos minerais no osso de ratos, particularmente quando o animal estiver exposto a flúor e, simultaneamente, a chumbo.

Isso porque chumbo e flúor são elementos com elevada afinidade com o osso e já foi descrito que maiores níveis de chumbo não encontrados no osso quando os animais são expostos a chumbo e flúor (Sawan, Leite *et al.*, 2010).

Quanto ao esmalte dental, em estudo com modelo experimental animal, avaliou-se a presença de fluorose dental em água previamente tratada com flúor 100ppm e chumbo 30ppm o que sugere que ocorre um maior agravamento do quadro de fluorose dental quando ambos estão presentes, apresentando maior quantidade de defeitos de esmalte em comparação com o grupo exposto apenas a flúor (Leite, Sawan *et al.*, 2011).

No mesmo estudo, a grande disponibilidade de chumbo no sangue em comparação aos outros grupos do estudo, indicaram que ocorre a sua maior disponibilidade para ser incorporado aos tecidos mineralizados.

Saúde Humana e a exposição ao Chumbo

O chumbo pode influenciar o desenvolvimento dos dentes por substituir o cálcio e com isso tornas um dente menos resistente diante a um ataque ácido. (Simons, 1986). Além disso em estudo, chumbo presente em dentina de dentes

extraídos previamente a uma análise de QI e questionário educativo relacionou a presença desse metal com déficit cognitivo em escolares (Needleman, Gunnoe *et al.*, 1979).

Foi demonstrado que hipoplasia de esmalte foi observada em crianças expostas a níveis aumentados de chumbo (Lawson, Stout *et al.*, 1971).

A sintomatologia sistêmica é marcada por cólica abdominal, sintomas gerais de fraqueza, fadiga, mialgia generalizada (ou mais localizada nas panturrilhas), inapetência, problemas gástricos, perda da libido, relacionando com alguns achados hematológicos, como diminuição nos níveis de hematócrito e hemoglobina, e presença de pontilhado basófilo nas hemácias, corroboram uma hipótese diagnóstica de exposição ao chumbo. Além disso, encefalopatias podem ser relacionados com este quadro de exposição ao chumbo (De Capitani, 2009)

A confirmação definitiva do diagnóstico se dá pela dosagem de algum parâmetro de dose interna, como chumbo no sangue (plumbemia) ou na urina (plumbúria) (De Capitani, 2009)

Outros elementos minerais disponíveis no osso

O osso é composto por hidroxiapatite ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) depositada sobre uma matriz proteica formada majoritariamente por colágeno, a porção mineral dos ossos são depositadas em cristais, com isso em mente temos de 60% a 65% de porção mineral nos ossos e de 30% a 35% de porção orgânica. (Keene, Knowlton *et al.*, 2004).

É considerado que 1g de porção mineral dos ossos tenha mais de 100m² de área e isso atesta que o osso seja capaz de realizar grandes trocas de íons com o líquido intersticial (Omnell, 1957), o que faz dos ossos um grande arcabouço para acúmulos minerais, além de ser um ótimo marcador para exposições a minerais.

Diversos estudos mensuram quantidades minerais em ossos, para saber suas interações conforme dietas e exposições a contaminantes minerais, em estudo foram realizadas medidas para Ca (mais abundante nos ossos), P (segundo mais abundante nos ossos), Na e K (Agha, Knowles *et al.*, 1958), em outro estudo foram feitas as devidas proporções entre os elementos metais mais abundantes nos ossos, no caso o Ca, P, Zn e Mg, com a conclusão que o Zinco é um metal que interfere no metabolismo do cálcio e fósforo na proporção que o animal é exposto a uma maior

quantidade de zinco em sua dieta (Stewart e Magee, 1964). É de conhecimento dos pesquisadores na área de ossos que o alcoolismo crônico promove a osteoporose (Oppenheim, 1977; George, Ganesh *et al.*, 2009; Malik, Gasser *et al.*, 2009), além disso, o metabolismo é modificado de tal forma que ocorre o decréscimo de manganês quando se tem alcoolismo em contrapartida não é relatada diferenças nas concentrações de Cobre (Gonzalez-Perez, Gonzalez-Reimers *et al.*, 2012). Em outro estudo há uma relação entre altas concentrações de manganês e chumbo em crianças da cidade do México, correlacionando com o deficit mental e psicomotor (Claus Henn, Schnaas *et al.*, 2012). Este último estudo mostra que mesmo em humanos as associações entre minerais já estão sendo estudadas, e que elas provavelmente ocorrem, mas há pouquíssimos trabalhos sobre isso.

Tendo em vista as possíveis interações entre os elementos orgânicos apontados, e o fato de a exposição a chumbo ser um problema de saúde pública.

2 HIPÓTESE

Testou-se a hipótese de que haja variações nos elementos Zn e Mg nas tíbias de animais expostos a chumbo (por técnica de química analítica convencional). Testou-se também se variações em microelementos poderiam ser detectadas por técnicas semiquantitativas nas tíbias de controles e animais expostos a chumbo.

3 OBJETIVOS

- 1- Determinar as concentrações de chumbo no sangue de animais controles e expostos a chumbo com idades de 28 e 60 dias pelo método de EAA-FG.
- 2- Quantificar as concentrações de chumbo nos ossos dos grupos C 28D, C60D, Pb 28D e Pb 60D por EAA-FG.
- 3- Quantificar os microelementos Zinco, magnésio, cálcio e chumbo nas amostras de tíbia por EAA-CA.
- 4- Pesar os ossos e discutir sobre suas diferenças entre os grupos C 60D e Pb 60D.
- 5- Determinar os microelementos mais abundantes nos tibias contralaterais por MEV-EDS e, posteriormente por WDS.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Campus da USP de Ribeirão Preto, protocolo 07.1.346.53.3 .

Vinte e oito ratos Wistar em torno de 200 g, foram obtidos a partir da colônia da Universidade. Os ratos foram divididos aleatoriamente em 4 grupos de 6 ratos machos e uma fêmea forçando assim o acasalamento, que terá início ao mesmo tempo em que os animais receberão diferentes tratamentos de água. Espera-se que esta etapa dure em torno de 3 semanas máximo.

A alimentação foi fornecida *ad libitum* e os animais foram mantidos em 12 h ciclo claro / escuro.

As concentrações de Pb na ração usada para alimentação dos animais tem concentrações menores do que 0,1 mg/kg, para tanto isso não influenciou em grandes diferenças nas análises estatísticas.

Foram mantidos no máximo 12 filhotes com a mãe até o desmame e então foram separados os machos das fêmeas, e alojadas em uma gaiola separada até o fim do período de desmame. Depois, os ratos foram desmamados, eles receberam a mesma solução de água potável dada às mães até o final do estudo.

Devemos ressaltar que cada gaiola teve no máximo 4 filhotes que foram alojados em gaiolas após o desmame, gaiolas de plástico com grade superior em aço inoxidável cujas dimensões serão 41cm-34cm-16cm (altura), dando 1394cm² espaço. Todos os animais foram avaliados diariamente para a saúde, alimentação e água, e gaiolas limpas. A água foi fornecida *ad libitum* através de garrafa de vidro, rolha e tubo com canula. Três vezes por semana e estas garrafas serão limpas com água e sabão abundante lavagem com água da torneira. Os animais controle receberão água contendo máximo 0,05mg/l de chumbo.

Os animais do grupo exposto de chumbo (Grupo: Pb) receberam água contendo 30 mg / L de chumbo, mais aproximadamente 0.05492g de acetato de chumbo CH₃COO(Pb)2.3H₂O para cada 1 litro de água deionizada, ou seja, 30 mg/L de chumbo e o grupo sem exposição ao chumbo foi chamado de Grupo Controle(Grupo: C).

Ratos de 2 idades foram analisados neste estudo: de 28 dias e 60 dias de idade. Para facilitar a identificação dos grupos, nomeamos os grupos da seguinte

maneira C 28D, designando grupo controle(C) 28 dias de vida(28D), assim temos também o C 60D, designando o grupo controle(C) 60 dias de vida(60D), temos também os grupos expostos a chumbo(Pb) por 28 dias(28D) desde a gestação e 60 dias(60D), portando temos os seguintes grupos no estudo. C 28D, C 60D, Pb 28D e Pb 60D.

A anestesia foi com ketamina 100 mg/kg e xilazina 10 mg/kg por via intraperitoneal. Em seguida, foi retirado o sangue total e logo em seguida os ratos foram sacrificados com uma overdose de anestesia e as duas tíbias e mandíbulas de cada animal coletados no post-mortem, as tíbias foram pesadas em balança analítica e seus pesos foram guardados para posterior análise. Além das tíbias, foram coletados sangue, mandíbulas, cérebro, rim, fígado, glândulas salivares, plasma e coração, mas para o presente estudo, somente utilizamos as amostras de tecidos mineralizados e sangue.

Microanálise com MEV “Eletron Dispersive Spectroscopy”(EDS) e “Wavelength Dispersive Spectroscopy” (WDS).

Este tipo de análise não causa danifica as amostras de ossos (Vermeij, Zoon *et al.*, 2012).

As tíbias foram preparadas para a microanálise de elementos químicos por MEV-EDS e WDS que foram analisados no Microscópio JEOL SEM D5M960 (Imagem 1) do Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de biologia celular e bioagentes patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP).

Para melhor quantificação de cada elemento, devemos calibrar o equipamento e isso deve ser feito a cada 6 meses de uso extenso, como o equipamento está novo e nunca foram feitas análises nele depois da calibração inicial, resolvemos usar a calibração de Janeiro de 2012.

Imagem 1: Microscópio eletrônico de varredura JEOL SEM D5M960 na FMRP-USP.

Análise das amostras

As tíbias foram cortadas em motor de implante sob irrigação com água deionizada da Dentscler Multcler Torque(Dentscler industria de aparelhos Odontológicos Ltda. Ribeirão Preto, SP, Brasil) sob torque de $20\text{N}/\text{cm}^2$ e 1030rpm. Inicialmente foi feito um corte central no osso tibial seguido de um corte longitudinal, seguido com polimento das amostras com lixas d'água de granulação decrescente, iniciando-se com a de maior granulação (360) para a de menor granulação (2000). Entre as lixas, as amostras foram lavadas em água milliQ em ultrasson odontológico, por 15 minutos num ciclo de 60Hz aproximadamente. Após o polimento as amostras foram secas a vácuo, incluídas em resina e recobertas por carbono, os resultados não foram satisfatórios.

Então, as tíbias foram cortadas conforme descrito acima, porém não foram tratadas ou incluídas, as amostras foram levadas para exposição no MEV-EDS/WDS(Imagem 2) e não foram encontradas exposições ao chumbo nas

amostras. Resolvemos analisar as mandíbulas destes ratos, somente por EDS, realizamos a análise da superfície vestibular dos primeiros molares de 3 amostras expostas ao chumbo e 2 amostras controle, os resultados foram promissores, uma vez que conseguimos ver claramente a presença de chumbo na superfície dental. Então realizamos um corte utilizando um equipamento da Struers accutom-5 (Kobenhaven, Reino da Dinamarca). Realizamos um corte vestibulo-lingual com irrigação abundante e 0,005 mm/min de profundidade de corte(chamado “Feed speed”) para que não houvesse grande deformação da amostra e não conseguimos ter os mesmos resultados, portanto realizamos análise somente da superfície dental vestibular do primeiro molar inferior dos ratos wistar.

Figura 2: MEV com EDS do lado esquerdo e WDS do lado direito.

Metodologia de análise no MEV-EDS/WDS

Uma análise ideal para quantificação dos principais elementos presentes nas amostras (quando não se tem ideia do que é composta amostra) deve ser executada com aproximadamente 10mm de distância entre o emissor e a amostra(WD), com 15 a 25 kV de emissão, gerando uma exposição adequada e uma profundidade que gire em torno de 10um, uma vez que quanto mais aumentamos a voltagem, maior o

poder de penetração do feixe, para que a amostra emita os raios-x necessários para permitir a detecção dos elementos presentes, para que tivéssemos uma boa quantificação deixamos o Spot Size que é o diâmetro do feixe entre 69 e 80nm. Quando temos uma noção geral dos elementos, podemos partir para uma análise por WDS para confirmação do traço de metal na amostra. No caso procuramos o chumbo.

É necessário que o elétron salte de camadas para que os átomos sejam detectados pelos detectores, os valores padrões para os elétrons do chumbo saírem de camada $M\alpha$ são de 2,34Kev(Goodhew J. P., 1999) e para a camada $K\alpha$ é de 10,55Kev(Goodhew J. P., 1999).

Este Microscópio Eletrônico de varredura possui 2 tipos de acessórios, o EDS e o WDS, para este projeto foi utilizado inicialmente o EDS que gera uma análise multielementar, seguido com WDS pelo baixo limite de detecção deste acessório, sabendo que o MEV é um equipamento muito vantajoso para uma análise por imagem, porém ser pobre para uma análise mineral, o MEV possui estes acessórios de detecção de Raios X que funcionam conforme descrito a seguir. A interação do feixe primário de átomos com a amostra causa transições de elétrons para orbitais mais externos, e, na volta destes para os orbitais originais, a diferença de energia é liberada na forma de raios X. Estes raios X emitidos tem uma energia característica e portanto estas energias podem ser usadas para determinar com muita precisão cada elemento presente na amostra. Este é o princípio da análise multielementar de microelementos (ou microanálise) feita com o EDS, um acessório do MEV.

Análise de MEV-EDS gera uma análise extremamente rápida e multielementar, necessária para quantificação dos elementos mais abundantes (Vermeij, Zoon *et al.*, 2012) presentes nos ossos.

A análise de MEV-WDS gera uma análise relativamente rápida 3 (porém mais lenta que o EDS) dos principais elementos presentes na amostra, porém essa análise deve ser feita separadamente para cada elemento a ser detectado e utiliza a área sob o pico característico de cada energia (que representa cada elemento)(Vermeij, Zoon *et al.*, 2012).

Inicialmente o objetivo destas análises será gerar mapas com resolução espacial da distribuição de cálcio, magnésio, zinco, chumbo, manganês e outros elementos nestes ossos(figura 3- imagem da área e figura 4- mapa dos elementos). Como o perfil dos picos(figura 5) somente será conhecido durante as análises,

alguns destes elementos descritos acima (e que encontramos na literatura) podem não ser encontrados nas nossas amostras em quantidades detectáveis (pois o método é sujeito a variações devido à energia dos átomos que fazem a colisão e os padrões usados durante a análise).

Os mapas serão gerados pelos Softwares Aztec para EDS (Oxford, Scotts Valley, California, USA) e INCA para WDS (Oxford, Scotts Valley, California, USA), no presente trabalho não usamos os resultados do INCA, as imagens foram geradas pelo Aztec com cores, informação e presença de quantidades dos elementos mais abundantes. A partir destes mapas escolhemos os principais elementos minerais que iremos determinar nas análises quantitativas do osso dissolvido usando Espectrometria de Absorção Atômica.

Figura 3: (Electron Image 2): Imagem cervical por microscopia eletrônica de varredura com o acessório Eletron Dispersive Waveleght(EDS) ativado no software Aztec, na imagem vemos na area superior a região cervical do dente e inferior o osso com tecidos organicos. O EDS cria uma imagem de baixa qualidade, uma vez que é privilegiado as analises quimicas do dente (Aumento 150x, Distância emissor e amostra WD=10mm e voltagem 15kV).

Figura 4: (EDS layered image 4): Exemplo de imagem por microscopia eletrônica de varredura com o acessório Eletron Dispersive Waveleght(EDS) ativado no software Aztec, com a função “map sum” ativada, demonstrando as regiões coloridas com o qual há a presença dos átomos em destaque, na região superior(mais clara) temos o dente, na região inferior(mais escura) temos o osso com muita matéria orgânica. O EDS propicia uma baixa qualidade da imagem, uma vez que é privilegiado as análises químicas.(Aumento 150x, Distância emissor e amostra WD=10mm e voltagem 15kV)

Figura 5: Exemplo dos picos vindo de uma amostra controle, relatório do aparelho da Oxford Instruments do software Aztec.

Análises Químicas

Toda a vidraria e plásticos utilizados foram adequadamente limpos com soluções de ácido nítrico, para evitar contaminações.

O chumbo foi determinado por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite AA600(Perkin Elmer, USA) (Imagem 6), O gás inerte de proteção e purga, foi o argônio com pureza de 99,999% (White Martins, São Paulo, Brasil) no Laboratório de Metais, do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da FORP/USP. Este laboratório foi recentemente implantado (Proc. FAPESP 2008/57491-8). Com forno de grafite Zeeman conforme Figura 7.

Figura 6: AA600 no Laboratório de Metais da FORP.

Figura 7: Forno de grafite Zeeman

Para as análises devemos considerar que para a quantificação o aparelho possui uns limites de detecção e quantificação. Para o calculo do limite de detecção: LOD = limit of detection: concentração que, acima dela, pode afirmar que há o analito em questão, porém não pode afirmar que a concentração medida corresponde à real.

LOQ = limit of quantification: concentração que, acima dela, pode afirma que a concentração mensurada corresponde à concentração real.

Cálculo para ambos:

LOD: é realizada no mínimo 10 medidas do branco e, dos valores absolutos de sinal de absorvância obtidos, tira-se o desvio-padrão destas. Com este valor em mãos, por recomendação da IUPAC, multiplica-se este valor por 3 e então divide-se pela inclinação da reta de calibração obtida durante as análises.

LOQ: é realizado o mesmo procedimento, porém o valor é multiplicado por 10, ao invés de 3.

Para o presente trabalho temos os seguintes limites. LOD: $0,4 \mu\text{g L}^{-1}$ e LOQ: $1,2 \mu\text{g L}^{-1}$.

O cálcio, magnésio e zinco foram determinado por Espectrometria de Absorção Atômica com chama AA400(Perkin Elmer, USA) (Figura 8) no laboratório de metais, no mesmo departamento.

Figura 8: AA400 no Laboratório de Metais da FORP.

Sangue Total

O sangue foi coletado da seguinte forma: as seringas de plástico foram previamente descontaminadas em ácido nítrico, logo em seguida, as agulhas, a seringa e o falcon BDLINE livre de metais foram embebidos em heparina sódica 5.000 U.I/ml e após a preparação para coleta, o sangue foi coletado partir da aorta abdominal(em média 8 ml foram coletados). Logo após a coleta, foram estocados em freezer -20 graus celsius.

As amostras de sangue foram manipuladas o mínimo possível e a análise por espectrometria de massa com forno de grafite, seguindo-se uma metodologia preconizada por (Parsons e Slavin, 1993).

Conforme descrito nesta técnica, são usados um modificador, um padrão de chumbo e amostras de referência. O branco, parte importante da análise e delimitação do limite de detecção e quantificação, será o modificador. O modificador é composto por 0,2% $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, 0,5% Triton X-100 e 0,2% HNO_3 , sendo que este é o diluente da amostra.

Inicialmente é realizada uma calibração, conforme tabela. Padrão de chumbo em 5 concentrações conhecidas, sendo base para a máquina quantificar que o sinal das amostras é condizente com uma concentração de chumbo conhecida.

Foi utilizado o padrão certificado NIST 955c level 2 caprine blood para garantir a fidelidade dos dados obtidos. Este padrão certificado foi dosado da mesma maneira que as amostras e quantificado a cada 15 amostras.

Tabela referente aos parâmetros para a curva de calibração.

Solução	Concentração	Stock	Diluente
Branco(Modificador)	Nada	12ul	0
Padrão 1	10ug/l	2ul	10ul
Padrão 2	20ug/l	4ul	8ul
Padrão 3	30ug/l	6ul	6ul
Padrão 4	40ug/l	8ul	4ul
Padrão 5	60ug/l	12ul	0

As amostras foram diluídas na proporção de 1:10 inicialmente, sendo exatamente 50uL de amostra para 450uL de modificador em copos de 1ml, com o qual o amostrador AS 800 Perkin Elmer, automatizado para pipetar alíquotas de 12uL para o tubo de grafite.

As amostras são pipetadas diretamente no tubo de grafite à 100 Graus Celsius, sem “extra-cleenout”. E o programa Win32 da Perkin Elmer(USA) foi programado para realizar a análise.

Tabela referente ao programa de atomização do chumbo para procura de traços deste elemento em amostras de sangue.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de Rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de Ar (ml.Min⁻¹)
Secagem	130	10	5	250
Secagem	200	5	5	250
Pirolise	700	1	15	250
Atomização	1700	0	3	0
Limpeza	2400	1	2	250

Ossos

Uma das tíbia foi digerida em um forno especializado em digestão de amostras, Microwave Digestion System: Multiwave 3000 (Anton Paar, Österreich) (Figura 9), com o qual possui camisas de teflon puro (Figura 10), previamente descontaminadas em ácido nítrico bidestilado à 3%, as tíbias foram incluídas nestas camisas e logo em seguida dissolvidas em 4,5ml ácido nítrico bidestilado ultrapuro e 0,5ml de água oxigenada, logo em seguida seguiu-se um programa de digestão conforme a tabela 4.

Figura 9: Miltiwave 3000, usado para a digestão das amostras.

Figura 10: Camisa de teflon

Tabela referente ao programa de digestão sob pressão e temperatura no forno Multiwave 3000.

Fases	Potência	Rampa	Manutenção	Ventilação
Digestão	0 à 600 Watts	15minutos	1 minuto	Nível 1
Digestão	600 Watts à 0	10minutos	0	Nível 1
Desaquecimento	0	0	0	Nível 3

Logo em seguida é realizada a calibração do GF-AAS, para a calibração, utiliza-se o branco H_2O Miliq, o padrão de chumbo e o modificador de paládio, este ultimo é composto por 100ul de magnésio e 1ml de paládio, completados para 10ml de H_2O Miliq.

Para a reta de calibração a maquina irá realizar o seguinte programa para quantificação de chumbo nas amostras.

Tabela referente ao programa de atomização do chumbo para procura de traços deste elemento em amostras de osso.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo de Rampa (s)	Tempo de permanência (s)	Fluxo de Ar (ml.Min ⁻¹)
Secagem	130	10	5	250
Secagem	200	5	5	250
Pirolise	700	1	15	250
Atomização	1700	0	3	0
Limpeza	2400	1	2	250

Analise de Fósforo

Foi assumido que o total de massa de fosfato em esmalte, dentina e osso é de 17%, 15,97% e 13,5%, respectivamente (Bezerra De Menezes, Volpato *et al.*, 2003).

A analise de fósforo é executada para que se possa estimar a massa de tecido mineralizado, e assim se possa expressar a concentração de chumbo como

quantidade de chumbo por massa de tecido mineralizado. A técnica da quantificação de fósforo é o método colorimétrico estabelecida por (Fiske Ch, 1925). Nós utilizamos um Leitor colorimétrico sob o comprimento de onda de 660nm para a visualização exata do espectro em uma placa de ELIZA.

São necessárias as seguintes soluções, Padrão de Fósforo 3%, Acido Mobilidico 5%, Reativo Redutor e água miliQ, ao todo são 300ul de solução em cada pocinho da placa.

Esta metodologia é amplamente utilizada para medição de fósforos, porém conforme descrito em estudo(Willard, 1943) com a presença de peróxidos em solução, há a necessidade de destruí-lo, uma vez que este gera interferências. Como as soluções do grupo 60 dias tem o peróxido de hidrogênio presente, então é necessário que haja uma destruição desse peróxido para assim termos uma boa análise colorimétrica. A destruição do peróxido pode ser feita realizando um aquecimento controlado de 74 graus Celsius por 5 minutos, método esse testado e os resultados não foram aceitáveis, então optamos por um análise alternativa, análise de cálcio para os ossos de 60 dias.

Análise de Cálcio em ossos

A análise de cálcio é executada em uma equipamento de absorção atômica por chama(AAS400 Perkin Elmer, Norwalk,USA). Foi utilizado o programa com 10l/min de oxidante misturado com 2,5l/min de acetileno, para um chama ideal de aproximadamente 2700 graus célsius, com lâmpada de Ca operando a 10mA. Conforme figura 11, demonstrando a chama do aparelho durante a análise.

Figura 11: Mostrando a chama do AA400 durante a análise de Cálcio(não difere muito durante a análise do Magnésio e Zinco).

A calibração ideal responde a um slope de 0,9995% no mínimo para corresponder a uma boa quantificação.

Há de se saber que o Lantânio é o catalisador necessário para este tipo de amostra, uma vez que o Fósforo é muito presente em amostras digeridas de ossos, cerca de 13,5% é fosfato(Bezerra De Menezes, Volpato *et al.*, 2003) e este elemento interfere no sinal do espectrômetro quando quantificamos cálcio. Portanto o Lantânio captura o fosfato na proporção de 0,1 a 1% em solução.

O comprimento de onda da lâmpada (Perkin Elmer, Norwalk,USA) para medir cálcio é de 422.67nm com nível de corrente igual a 15mA.

Falcons de 50ml foram usados. Para os padrões, adotamos o seguinte parâmetro, para 5mg/l de padrão concentrado, pipetamos 150ul de padrão para 29,8ml de água miliQ+ 50uL de Lantânio para que tivéssemos 5mg/L de cálcio diluído, portanto para 4, 3, 2 e 1 mg/l realizamos a proporção.

Para as amostras foi utilizada uma diluição de 1:10.000, considerando que a solução final corresponde a 5ml, pois a maquina realiza a sucção de 3ml em média. Para as análises considerou-se que o cálcio corresponde a 37,6% do total de osso

(Ammerman, Loaiza *et al.*, 1974), portanto o resultado mensurado nesta etapa foi colocado com este tipo de referencial.

Análise do magnésio

A análise de cálcio é executada em uma equipamento de absorção atômica por chama (AAS400 Perkin Elmer, Norwalk,USA) (foto2). Foi utilizado o programa com 10 l/min de oxidante misturado com 2,5 l/min de acetileno, para um chama ideal de aproximadamente 2700 graus célsius, com lâmpada (Perkin Elmer, Norwalk,USA) de Magnésio operando a 6mA.

Análise do Zinco

A análise de cálcio é executada em uma equipamento de absorção atômica por chama(AAS400 Perkin Elmer, Norwalk,USA) (foto2). Foi utilizado o programa com 10l/min de oxidante misturado com 2,5l/min de acetileno, para um chama ideal de aproximadamente 2700 graus célsius, com lâmpada de Zinco (Perkin Elmer, Norwalk,USA) operando a 15mA.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Inicialmente testamos se as amostras apresentaram ou não distribuição normal. Sendo normal a distribuição dos dados, a estatística paramétrica foi utilizada para verificar se havia diferença significativa entre os grupos. As comparações para cada um dos parâmetros testados foram feitas entre controle e grupo exposto a chumbo aos 28 dias e entre controle e grupo exposto a chumbo aos 60 dias, utilizando-se o teste t de student como teste paramétrico ou o Mann-Whitney como teste não paramétrico, sempre não pareados. Foi testado também se havia diferença na concentração de chumbo no sangue e nos ossos nas amostras coletadas com 28 e 60 dias, sendo para esta comparação utilizado o teste t de Student não pareado. O nível de significância aceito foi de 5%. Não será aplicada a correção de Bonferroni, que é a divisão do nível de significância pelo número de elementos testados.

6 RESULTADOS

Sangue Total

Realizamos determinação de chumbo por EAA-FG das amostras de sangue obtidas através da punção da artéria aorta abdominal enquanto o animal estava sedado, momentos antes da indução da morte.

Os valores de chumbo determinados no sangue dos animais de 28 e 60 dias deste estudo apresentaram distribuição normal. Os valores obtidos para os animais de 28 dias resultaram na média de 0,6 ug/dl (± 0.05 ; n=8) para o grupo C 28D e para o grupo Pb 28D (n=5) os valores apresentaram média de 8,0 ug/dl (± 1.1). Para o grupo C 60D, a média dos valores de chumbo no sangue foi de 0.6 ug/dl (± 0.05 ; n=13) e no grupo Pb 60D a média foi de 7,2 ug/dl (± 0.89 ; n=16). O teste t de Student não pareado foi utilizado para a comparação entre grupo controle e exposto a chumbo em cada um dos tempos. As diferenças foram estatisticamente significantes ($P < 0.0001$) tanto entre o grupo C 28D e Pb 28D quanto entre o grupo C 60D e grupo Pb 60D.

A seguir são apresentados os gráficos com os resultados de chumbo nas amostras de sangue (Figuras 12 e 13). As quantificações das amostras estão em ug/dl.

Figura 12: Concentração de chumbo no sangue total (ug/dL) de animais de 28 dias. C 28D (n= 8) e Pb 28D (n=5). * $P < 0,0001$ em comparação com C 28D.

Figura 13: Concentração de chumbo no sangue total (ug/dL) de animais de 60 dias. C 60D (n= 13) e Pb 60D (n=16). * $P < 0,0001$ em comparação com C 28D.

Realizamos ainda a comparação para saber se havia diferença nos valores de chumbo no sangue total entre os animais de idades diferentes (Pb 28D em comparação a Pb 60D). Não houve diferença estatisticamente significante ($p=0,63$) e o teste utilizado foi o teste t de Student não pareado.

Figura 14: Comparação da concentração de chumbo no sangue total de animais do grupo Pb 28D e Pb 60D ($P=0,63$).

Concentrações de Chumbo em amostras de tíbias por EAA-FG

Foi realizada análise química por EAA-FG conforme descrito anteriormente nos materiais e métodos.

Nas amostras de tíbias os animais dos grupos controles apresentaram resultados muito baixos, aproximando-se do LoD em todas as amostras. Os resultados estão apresentados em ug/g (Figuras 15, 16 e 17).

Houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos C 28D e Pb 28D ($p=0,0002$)(Figura 15). A média, desvio padrão e n são de $0,9 \pm 0,075$ e $n=5$; e $8,02 \pm 1,12$ e $n=5$ para estes 2 grupos, respectivamente.

Figura 15: Concentração de chumbo nas tíbias (ug/g) de animais de 28 dias. C 28D ($n= 5$) e Pb 28D ($n=5$). Teste t de Student não pareado, * $P=0,002$ em comparação com C 28D.

Nos grupos Pb 60D e C 60D os valores de chumbo nas tíbias também apresentaram distribuição normal. Houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo C 60D (média de $1,37 \text{ ug/g} \pm 0,29$, $n= 13$) e o grupo Pb 60D (média de $43,3 \text{ ug/g} \pm 13,26$, $n=18$) ($P<0.0001$)(Figura 16).

Figura 16: Concentração de chumbo nas tíbias (ug/g) de animais de 28 dias. C 60D (n= 13) e Pb 60D (n=18). Teste t de student não pareado, * $p < 0,0001$ Pb 60D em comparação com C 60D.

Os ratos dos grupos Pb 28D e Pb 60D apresentaram resultados muito mais altos de chumbo na tíbia, comprovando que os animais realmente foram expostos a níveis de chumbo na água que causaram contaminação de todo o organismo e acúmulo no tecido ósseo.

Quando foi feita a comparação entre os valores de chumbo determinados nas tíbias de animais expostos de 28 e de 60 dias, foi notado um grande incremento no grupo exposto por mais tempo. As concentrações de chumbo nos ossos dos grupos Pb 28D foram $8,03 (\pm 1,12 \text{ n}=5)$ e $43,30 (\pm 3,125 \text{ n}=18)$ para o grupo Pb 60D. Portanto há 5,4 vezes mais chumbo (ug/g) no grupo Pb 60D quando o comparamos com o grupo de ratos mais novos. Havendo distribuição normal, utilizamos o teste t não pareado, que demonstrou haver diferença estatisticamente significativa nos valores de chumbo apresentados por estes 2 grupos de animais expostos ($P < 0.0001$) (Figura 17).

Figura 17: Resultados de cálcio em tíbias expressos em ug/g de osso. Os grupos Pb 28D(n=5) e Pb 60D(n=18). A distribuição dos dados foi normal. Teste t de Student não pareado * $p < 0.0001$, Pb 60D em comparação com Pb 28D.

Amostras de tíbia com quantificações dos minerais mais abundantes

Foi realizada a quantificação de cálcio, magnésio e zinco nos grupos Pb 60D e C 60D. Nas figuras 18, 19 e 20 temos as comparações entre os grupos.

Quantificações de cálcio

Ratos de 60 dias tiveram suas tíbias digeridas em 4,5ml ácido ultrapuro com 0,5ml de água oxigenada e as seguintes amostras foram posteriormente diluídas em água deionizada ultrapura e levadas ao laboratório para quantificação no equipamento de absorção atômica por chama de acetileno (conforme materiais e métodos) e seus valores estatísticos foram obtidos em mg por peso do osso.

Os resultados para cálcio nas amostras do grupo Pb 60D e C 60D não foram diferentes estatisticamente, com média de 300,1 ($\pm 8,67$ n=15) para o grupo Pb 60D e 298,8 ($\pm 13,9$ n=11) para C 60D ($p=0,93$).

Figura 18: Resultados de Cálcio em tíbias expressos em mg/g de osso. Amostras de animais Pb 60D (n= 15) e C 60D (n=11). Teste t de Student não pareado ($p=0,93$).

Foi realizada análise de zinco nas amostras C 60D e Pb 60D, sendo a mediana 0,22 mg/g para o grupo Pb 60D e 0,22 mg/g para o grupo C 60D. Como os resultados não apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste de Mann Whitney ($p=0,62$), com ausência de diferenças estatisticamente significantes.

Figura 19: Resultados de Zinco em tíbias expressos em mg/g de osso. Amostras de animais Pb 60D(n= 17) e C 60D (n=12). teste de Mann Whitney ($p=0,0803$).

As análises de magnésio mostraram concentrações de 4,89 mg/g ($\pm 0,74$ n=12) no grupo C 60D e 4,98mg/g ($\pm 0,79$ n=17) no grupo Pb 60D. Foi realizado o teste de Mann Whitney, com o qual concluiu-se não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p=0,08$).

Figura 20: Concentração de Magnésio em tíbias expressos em mg/g de osso. No grupo Pb 60D (n= 17) e C 60D (n=12). Teste Mann Whitney ($p=0,08$).

Peso dos ossos ratos

Antes das quantificações químicas e análises no MEV, realizamos a pesagem das amostras das tíbias dos grupos C 60D e Pb 60D, com isso temos os dados referentes aos pesos dos ossos destes animais (Figura 21).

O grupo C 60D obteve a média de 0,86g ($\pm 0,13$, n=12) e Pb 60D, média de 0,61g ($\pm 0,11$ n=17). A comparação entre os grupos de distribuição não normal foi feita utilizando-se o teste de Mann Whitney, que mostrou ser estatisticamente significativa a diferença entre os grupos ($p=0,0004$). Uma imagem ilustrativa de tíbias de animais de 60 dias é apresentada na Figura 22. Os operadores notaram, além da visível diferença de tamanho, objetivamente aferida como massa óssea a partir da pesagem, que os ossos dos animais expostos a chumbo eram muito mais frágeis e friáveis, tendo que haver cuidado redobrado na manipulação dos animais para não fraturá-los no momento da coleta.

Figura 21: Peso das tíbias expressos em gramas (g) dos grupos C 60D(n=12) e Pb 60D(n=17). Teste de Mann Whitney (*p=0,0004) Pb 60D em comparação com C 60D.

Figura 22: Imagem de 2 tíbias, correspondentes a um animal exposto (esquerda) e um controle (direita). As tíbias foram removidas e limpas, sendo a seguir pesadas. A imagem ilustra o achado de diferença de tamanho e fragilidade percebida pelos operadores no momento da retirada dos ossos. A tíbia da esquerda (grupo Pb 60D) pesou 679,8 mg e a da direita (grupo C 60D) pesou 917,4mg.

Uso EDS e WDS no MEV para a quantificação dos elementos químicos em tíbias

As amostras foram seccionadas pela metade e esta metade foi seccionada no sentido longitudinal para que se pudesse fazer a quantificação interna. Após o corte as amostras foram secas em vácuo e posteriormente fixadas em placa com a fita dupla face para análise no MEV-EDS. As amostras foram expostas a 15Kv, a 11mm de distância de trabalho e “Spot Size” (diâmetro do feixe que incide sobre amostra) de 74 (grau de abertura para diâmetro do feixe, feito pelo software da Jeol), o dead time (tempo gasto para o processamento dos raios-X) para amostra esteve entre 20 e 30%. Não obtivemos quantificação de chumbo.

A seguir as amostras foram expostas aos mesmos parâmetros acima, mas com uma exceção: não foi realizado a cobertura, nem qualquer tratamento pós-secagem à vácuo, novamente não obtivemos resultados para chumbo, tentamos então o WDS, com o mesmo resultado anterior.

Incluímos as amostras de tíbias também em resina e logo em seguida fizemos a cobertura com grafite, Fizemos análise por WDS com o protocolo de 25kV, Alto vácuo(“High vaccum”) com 10mm de distância entre a amostra e o emissor de elétrons e spot size de 75. Não foi possível detectar chumbo, pois aparentemente houve a ocorrência de ruído, o mais intrigante foi constado a presença de Flúor nos ossos dos ratos expostos ao chumbo quando realizamos análise por WDS, sendo que obviamente o Flúor estaria em uma concentração menor que o chumbo nos ossos, sugerindo que contaminantes da resina estivessem promovendo sinais maiores do que os elementos presentes na amostra.

Por isso desconsideramos a análise com o uso de materiais de inclusão para quantificação de chumbo em tíbias.

Logo em seguida realizamos análise dos ossos com cortes utilizando o motor de implante conforme descrito nos materiais e métodos, para verificar se seria possível fazer a detecção do chumbo na parte interna. Tentamos 15kV e não conseguimos obter chumbo por EDS (em Low Vaccum), nem por WDS (em High Vaccum). Talvez seja pelo fato do EDS ter um limite de detecção muito alto, cerca de 0,2 a 1% dos minerais da amostra (Vermeij, Zoon et al. 2012) ou seja, dependendo do mineral é necessário que amostra tenha uma porcentagem maior do

metal. O WDS também foi testado, mas não tivemos sucesso na quantificação de chumbo também.

Portanto resolvemos concentrar os nossos esforços para encontrar chumbo nas amostras de dentes, uma vez que já sabíamos que o esmalte concentra centenas e milhares de ppm de chumbo na sua superfície, ao passo que na superfície óssea (parte externa do osso cortical (Sawan, Leite *et al.*, 2010)) o chumbo em animais expostos tem concentrações da ordem de dezenas de ppm. Então resolvemos analisar as hemimandíbulas, focando nos primeiros molares inferiores, realizamos os mesmos parâmetros descritos anteriormente e obtivemos resultados promissores (pelo menos do ponto de vista da detecção de chumbo) quando analisamos a superfície vestibular do primeiro molar.

Obtivemos sinal de chumbo em todos os dentes molares de animais expostos, sem qualquer tratamento, ao utilizar o EDS a 15kV, com WD de 10mm de distância entre amostra e emissor de elétrons com aumento por volta de 200x e Spot size de 69 a 80. Este sinal deixou de ser visto quando se analisaram dentes cortados ao meio, para verificar a parte interna do esmalte (em cortes da hemimandíbulas no sentido vestibulo-lingual).

A seguir, temos as imagens fotografadas a partir do MEV da superfície dental vestibular e parte da mandíbula (Figuras 23 e 24). As imagens dos animais controle não apresentaram chumbo, e a anatomia dos dentes era normal (Figura 23). Nos animais expostos a chumbo verificou-se em todos os dentes de todos os animais analisados a presença de depósitos com aparência mais clara nas imagens. Na Figura 24 este depósito está indicado pela seta preta. Sabe-se que a cor mais clara indica presença de elementos de maior massa atômica em BEC. A distribuição destes depósitos foi sempre junto à margem gengival dos dentes somente de animais expostos. Isso sugeriu que se tratasse de depósitos extrínsecos de chumbo, uma vez que a massa deste elemento é muito maior do que a dos demais presentes no dente e osso. Além disso, é um achado conhecido (de milênios) a linha de chumbo junto à margem gengival de pessoas e animais expostos. Assim, a análise microanálise desta região foi feita, para se confirmar se haveria quantidade maior de chumbo, e quais os outros elementos presentes naqueles depósitos.

Figura 23: Imagem representativa de molares de ratos do grupo C 60D0, obtida com elétrons retroespalhados (BEC) em baixo vácuo. Amostras preparadas sem cobertura de ouro ou carbono. Anatomia dos molares apresenta-se normal para a idade.

Amostras de mandíbulas (n=2 do grupo C 60D e n=3 do grupo Pb 60D) foram analisadas em microscopia eletrônica de varredura com EDS acoplado, foram detectadas e analisadas quantidades de alguns minerais mais abundantes, estes expressos em “intensidade de raios X” detectados.

Os resultados foram gerados no software Aztec, com isso obtivemos as proporções dos principais minerais presentes nas superfícies das amostras.

Figura 24: Imagem representativa de molares de ratos do grupo Pb 60D, obtida com elétrons retroespalhados (BEC) em baixo vácuo. Amostras preparadas sem cobertura de ouro ou carbono. Anatomia dos molares apresenta-se normal para a idade. A seta preta indica o material que nestas condições se apresenta claro (indicando presença de elementos de maior massa atômica em BEC) e a distribuição destes depósitos foi sempre junto à margem gengival dos dentes somente de animais expostos.

Apresentamos a seguir gráficos representativos das quantificações de cálcio, magnésio e carbono por EDS-MEV (Figura 25). No grupo C 60D não foi detectado chumbo.

Figura 25: Resultados representativos das análises por MEV-EDS em duas regiões anatômicas dos 1os molares inferiores de 3 animais do grupo Pb 60D em comparação com 2 animais do grupo C 60D. Os elementos analisados foram cálcio, magnésio e carbono. A estatística não é apresentada em função do n ser muito baixo. Os resultados mostram nitidamente a menor quantidade de carbono na região incisal (D) e maior quantidade na região cervical (C), de ambos os grupos. Isso faz sentido, uma vez que o carbono é um elemento orgânico, e na região cervical o material orgânico está presente em quantidade muito maior, em decorrência da presença de tecido ósseo.

Molares dos ratos expostos a chumbo por 60 dias, análise das imagens

Fizemos algumas imagens dos molares de ratos (Pb 60D) para ilustrar os resultados dos principais minerais presentes na superfície do dente. No caso do equipamento disponível no Laboratório de Microscopia Eletrônica da FMRP, os resultados aparecem como imagens coloridas e cada cor corresponde a um mineral detectado.

Para amostra de região cervical, elegemos uma das 3 amostras para analisá-la como amostra representativa e que exemplifica os mapas encontrados. Depois, temos a imagem 26 com as regiões mais esbranquiçadas correspondentes ao óxido de chumbo acumulado na superfície dental, com isso em mente, também temos os mapas dos elementos misturados na figura 27, além dos espectros separados na figuras 28 e 29.

Figura 26: Imagem de mandíbula, região cervical de dente primeiro molar de rato exposto ao chumbo por 60 dias, presença de “placas” brancas na superfície da amostra do primeiro molar (Aumento 150x, 15kV e WD=12mm)

Figura 27: Imagem gerada pelo Aztec de mandíbula, região cervical de dente primeiro molar exposto por 60 dias ao chumbo no modo “map sum” com a quantificação por cor dos principais elemento. Nota-se a presença de uma região mais clara, ela ocorre pois o programa realiza a análise em 2 etapas, a primeira ele pigmenta a imagem, por assim dizer, seguido de uma segunda etapa de mistura das cores de modo a incrementar a imagem com os pixels. (Aumento 150x, 15kV e WD=12mm)

Figura 28: Imagens geradas pelo programa Aztec de dente primeiro molar com o qual é quantificado e isolado os pixels correspondentes aos elementos Carbono(C) e Magnésio, nota-se um distorção dos elementos na superfície da amostra.(Aumento 150x, 15kV e WD=12mm)

Figura 29: Nestas imagens temos uma clara distribuição regional dos elementos quantificados da região cervical do primeiro molar de ratos expostos por chumbo por 60 dias, pois fica claro que o onde há maior quantidade de cálcio, não há grandes quantidades de chumbo e onde há grandes quantidades de chumbo (óxido de chumbo em laranja), há menos quantidades de cálcio (região em cor escura). Este tipo de análise separada, facilita a elucidação da região mais contaminada na superfície dental.(Aumento 150x, 15kV e WD=12mm)

Nota-se que as imagens de 30 e 33 demonstram a mesma região, com análises diferentes.

Para amostra de região incisal, elegemos uma das 3 amostras para analisa-la como amostra representativa e que exemplifica os mapas encontrados. Depois, temos a imagem 30 com as regiões mais esbranquiçadas correspondentes ao óxido de chumbo acumulado na superfície dental, com isso em mente, também temos os mapas dos elementos misturados na imagem 31, além dos espectros separados na imagem 32 e 33 .

Figura 30: Aumento 150x, 15kV e WD=12mm. Mesma explicação da figura 26, com uma duas exceções, a menor presença dessa zona esbranquiçada e região incisal em destaque.

Figura 31: Aumento 150x, 15kV e WD=12mm. Mesma explicação da figura 27, com exceção da região em destaque ser a região incisal.

Figura 32: Aumento 150x, 15kV e WD=12mm, mesma explicação da figura 28, com exceção da região em destaque ser a região incisal.

Figura 33: Aumento 150x, 15kV e WD=12mm, mesma explicação da figura 29, com exceção da região em destaque ser a região incisal.

7 DISCUSSÃO

Observações referentes ao comportamento dos animais

Conforme tratávamos os animais, ficou claro que os ratos expostos a 30ppm de chumbo possuíam um nível de estresse e desvio comportamental maior que os controles. Durante o desmame, os filhotes expostos tinham um nível de medo de aproximação à gaiola muito maior que os controles e, quando eram tratados em suas gaiolas, os ratos expostos demonstravam alto nível de agressividade.

Durante os procedimentos de anestesia, era praticamente impossível anestesiá-los sem a ajuda de um segundo indivíduo, pois eles tendiam a nos atacar durante o procedimento de anestesia.

Análises químicas: medidas de chumbo no sangue

Todas as análises químicas realizadas neste protocolo foram feitas por EAA-FG. Os resultados ficaram dentro do esperado, conforme discutiremos abaixo. Além disso, é importante frisar que nossas análises incluíram o uso de material certificado (NIST 955c amostra sangue caprino com diversos microelementos, com 5 níveis de chumbo). Este material certificado foi passado a cada 15 amostras e foi muito importante para a confiabilidade dos resultados. Infelizmente não há ainda (ao que sabemos) material certificado para osso. A baixa concentração de chumbo detectada nos grupos controle era de se esperar em face do limite de detecção (LoD) de chumbo por EAA-FG, que é em torno de 0,5 ug/dL. Entretanto, para os grupos expostos, acreditamos que não tenhamos tido problemas com a detecção de chumbo. Nestes grupos, a concentração de chumbo no sangue total foi de 8,0 ug/dl (± 1.1) no grupo Pb 28D e foi de 7,2 ug/dl (± 0.89) no grupo Pb 60D. Estes resultados indicam que houve uma exposição nítida ao chumbo, mas que não há diferença neste marcador de exposição (sangue total) entre os 2 períodos. Isso pode ser verdade, uma vez que se sabe que o sangue tem suas limitações como marcador de exposição a chumbo (Gerlach, 2009). Estes resultados reproduzem aparentemente o grau de exposição de outro estudo de nosso grupo utilizando animais machos que receberam 30 ppm de chumbo por 8 semanas a partir do peso

de 200 g (normalmente eles atingem este peso com ~60 dias). Neste estudo a média de chumbo no sangue foi de 7,6 ug/dl (Rizzi, Castro *et al.*, 2009).

Já em comparação com o protocolo (Sawan, Leite *et al.*, 2010), ratas fêmeas expostas pela água de beber a 30 ppm de chumbo por 81 dias apresentaram médias de chumbo no sangue de 22.6 ug/dl (± 8.5), ou seja, quase 3 vezes o valor obtido nos 2 grupos do presente estudo. Acreditamos que o tempo prolongado do protocolo (pelo fato de incluir o tempo de acasalamento, nascimento etc) possam ter contribuído para algum descuido na água utilizada para tratar os animais, que talvez explique no outro protocolo termos encontrados níveis tão altos de chumbo para o mesmo grau de exposição a partir da água de beber. Além disso, o fato de serem animais machos neste protocolo e naquele serem fêmeas também poderia explicar parte da diferença verificada nas médias de chumbo no sangue total.

A medida de chumbo no sangue total é a principal forma de aferir a exposição recente ao chumbo. Em termos de toxicologia experimental, muitos protocolos utilizam exposições a concentrações mais elevadas (normalmente na água de beber), como no estudo de (Conti, Terrizzi *et al.*, 2012), em que ratas fêmeas receberam 1000 ppm de acetato chumbo por 90 dias a animais de 21 dias, administrado na água de beber, e os resultados das médias de sangue no grupo exposto foram de 48.28ug/dl (± 8.54) e no grupo controle 3.17ug/dl (± 1.42). Citamos este trabalho aqui apenas para ilustrar o grau de exposição e as concentrações observadas no sangue.

Analises químicas: medidas de chumbo nas tíbias

Nas amostras de 28 dias foram realizadas as analises conforme o artigo (Sawan, Leite *et al.*, 2010), porém com algumas modificações na metodologia, as amostras são digeridas em ácido nítrico bidestilado (5ml) para digestão total da tíbia. Em seguida foram realizadas analises pelo método colorimétrico (Fiske Ch, 1925) para determinação de fósforo. Já nas amostras de 60 dias foi utilizado um método de digestão químico no qual a porção mineralizada do osso é digerida pelo ácido nítrico bidestilado e a porção de tecidos moles (medula e parte orgânica em geral) é oxidada pela água oxigenada, com isso tivemos amostras mais homogêneas, portanto foram usados 4,5ml de ácido nítrico bidestilado + 0,5ml de água oxigenada. Porém foi impossível realizar o método colorimétrico (Fiske Ch, 1925) pois conforme

o estudo (Willard, 1943), a presença de óxidos impossibilita a leitura colorimétrica. Por este motivo, nas amostras de 60 dias foi determinado o cálcio por EAA ao invés do fósforo. Sendo o fósforo ou o cálcio determinado de forma confiável, pode-se estimar a massa total de osso presente na amostra, o que foi feito, permitindo a expressão dos valores de chumbo e outros elementos como massa por grama de osso.

A concentração de chumbo no osso do grupo Pb 28D foi $8,02 \pm 1,12$ e no grupo Pb 60D foi de $43,3 \mu\text{g/g} \pm 13,26$. Nos grupos controle as concentrações de chumbo foram próximas ao limite de detecção. Este incremento de 5 vezes pode ser esperado, uma vez que se sabe que o tecido ósseo nesta idade está sofrendo remodelamento pelo crescimento dos animais (28 e 60 dias) e durante este processo o osso incorpora chumbo. O osso é o melhor marcador de exposição a chumbo (Gerlach, 2009). Provavelmente esta diferença realmente reflita a severidade da exposição, e mostra que se somente se observasse o sangue esta diferença no acúmulo no animal teria passado sem ser percebida.

Já é bem conhecido na literatura sobre toxicologia e distribuição de chumbo nos tecidos que chumbo permanece nos ossos por longos períodos, chegando a 27 anos em humanos (Rabinowitz, Wetherill *et al.*, 1976). Para os ossos, no mesmo estudo citado acima (Conti, Terrizzi *et al.*, 2012), a concentração de chumbo nos ossos (determinado nas cinzas de ossos) foram na média de $632.29 \text{ mg/g} \pm 94.23$. Estes valores bem mais altos (embora não estejamos aqui citando as centenas de outros trabalhos que existem na literatura com medidas de chumbo em osso como marcador do grau de exposição) indicam uma verdade já aceita: que a quantidade de chumbo nos ossos é a melhor medida diretamente relacionada ao grau de exposição (Hamilton and O'Flaherty 1994) (Mahaffey, Goyer *et al.*, 1973; O'flaherty, 1995).

A concentração de zinco no osso do grupo C 60D foi $0,22 \text{ mg/g}$ e no grupo Pb 60D foi $0,22 \text{ mg/g}$. A concentração de magnésio no osso do grupo C 60D foi de $4,89 \text{ mg/g} \pm 0,74$ e no grupo Pb 60D foi de $4,98 \text{ mg/g} \pm 0,79$. Estes são 2 dos microelementos mais abundantes presentes nos ossos de animais, e suas concentrações não sofreram alterações em decorrência da exposição a chumbo. Estes elementos foram medidos pela técnica de EAA-CA, que é uma das técnicas de química analítica aceitas para se obter excelentes medidas destes elementos. Fundamental para expressar suas concentrações é a medida de cálcio ou fósforo, e

no caso foi feita a medida de cálcio também por EAA modo chama. Assim, pode-se dizer que os resultados de concentrações de zinco e de magnésio mostram não haver diferenças nestes elementos no grupo exposto a chumbo, refutando a hipótese deste projeto.

O estudo de outros microelementos em toxicologia é algo que é relativamente recente. Normalmente se observam as concentrações apenas do elemento em estudo e ao qual os animais estão expostos. Entretanto, muitos estudos recentes mostram que poderia haver uma interação entre elementos, o que pode ocorrer em vários níveis (nível de absorção intestinal, excreção renal, proteínas protetoras (“scavengers”) ou canais/trocadoras que aumentam em animais intoxicados e que reconhecem diversos metais de mesma valência, sendo pois inespecíficas etc). Entre os artigos recentes que mostram este fato existe um artigo nosso, em que expusemos animais a flúor e chumbo, mostrando que a concentração de chumbo em todos os tecidos mineralizados aumenta (Sawan, Leite *et al.*, 2010; Leite, Sawan *et al.*, 2011). Outro estudo a nível populacional na principal revista de toxicologia do mundo mostra uma aparente interação nas concentrações plasmáticas de chumbo e manganês (Henn *et al.*, 2012).

Este é um estudo inicial, e a escolha de verificar zinco e magnésio se deu em decorrência de termos confirmado por microanálise de fluorescência de raioX que zinco e magnésio tem a mesma distribuição superficial no esmalte, exatamente como flúor e o chumbo (De Souza Guerra, Fernanda Gerlach *et al.*, 2010). Esta mesma distribuição pode ser uma indicação de que eles são transportados e tem comportamentos parecidos, o que motivou a nossa hipótese. Entretanto, é importante lembrar que este é um estudo bastante inicial em tecido ósseo, e que há poucos trabalhos na literatura sobre isso, especialmente utilizando técnicas analíticas aceitas como padrão ouro para medidas elementares.

Interessante notar que o manganês é citado como possível metal que aumentaria a severidade dos efeitos do chumbo em populações (Gonzalez-Perez, Gonzalez-Reimers *et al.*, 2012), uma vez que a associação da elevação deste e de chumbo em amostras de sangue de crianças com diminuição no índice de neurodesenvolvimento (acessado com a escala Bailey) a intervalos de 6 meses dos 12 aos 36 meses. Desta forma, o manganês poderia ser um próximo elemento a ser analisado nestas mesmas amostras. Devido ao tempo curto do Mestrado, nesta análise nos restringimos à hipótese inicialmente proposta e às análises

semiquantitativas por MEV-EDS e WDS que esperávamos, fossem justamente mostrar alguma variação inicial em microelementos, que deveria depois ser confirmada por métodos analíticos aceitos.

A importância de se investir no estudo de novas técnicas e na associação destas com as técnicas “padrão ouro” de química analítica para determinação de microelementos em osso é também reforçada pelo fato de termos encontrado uma diminuição muito grande (~25%) na massa de osso do grupo Pb 60D em relação ao grupo C 60D ($p < 0.0004$). Se a massa de osso diminui tanto, é muito importante saber qualitativamente como é este osso, pois os microelementos podem indiretamente determinar o crescimento ósseo e corporal, pois muitos destes microelementos são co-fatores enzimáticos e assim podem interferir de forma muito importante no crescimento ósseo e do corpo todo.

Neste estudo, não realizamos ensaios mecânicos com as tíbias, porém os pesquisadores observaram que precisavam ter muito mais cuidado com a manipulação das tíbias do grupo Pb 60D ao remover o tecido mole, pois estas eram muito mais friáveis do que o C 60D. Isso está de acordo com o estudo de Conti et al.(2012), que demonstrou haver diminuição de força e resistência nos ossos dos animais expostos ao chumbo, em comparação com ossos controles.

Já foi mostrado que a exposição ao chumbo causa diferenças significantes no crescimento e resistência ósseo durante o período da puberdade (Ronis, Aronson *et al.*, 2001). Outro estudo mostrou associação entre exposição a maiores níveis de chumbo (medido no sangue) com diminuição da altura, e estes autores sugerem que isso levaria a uma predisposição a osteoporose (Campbell, Rosier *et al.*, 2004). (Conti, Terrizzi *et al.*, 2012) mostram que o peso corporal de ratos expostos a chumbo 1000 ppm foi em média de 279.45g (± 17.06) e controle 308.35 (± 16.4), portanto o peso corporal dos ratos expostos foi menor, assim como o peso do fêmur destes animais que no grupo exposto foi média de 0.89g (± 0.08) e 0.95g (± 0.08). Em nosso estudo encontramos também a diminuição do peso da tíbia, que teve a média de 0,61g ($\pm 0,11$) no grupo Pb 60D e 0,86g ($\pm 0,13$) no grupo C 60D. Portanto, comprovamos novamente neste estudo, mas com nível de exposição muito mais baixo do que aquele do trabalho de Conti et al.(2012), que a exposição a chumbo causa problemas severos ao crescimento ósseo.

Os microelementos mais abundantes detectados nas tíbias contralaterais por Microscopia Eletrônica de varredura por EDS/WDS foram cálcio, fósforo, carbono,

oxigênio, magnésio, sódio e potássio, não tendo sido detectadas variações semi-quantitativas nestes elementos. O chumbo não foi detectado nos grupos controle. O chumbo foi detectado apenas nos dentes molares por MEV-EDS apenas na forma de óxido de chumbo (deposição extrínseca) que pode ser útil para fins forenses ou de determinação de contaminação desconhecida por este método, mas o método não é adequado para qualificar a exposição a chumbo em dentes ou ossos. Possíveis motivos para não termos detectado chumbo seriam os limites de detecção (altos) do aparelho a partir dos padrões usados ou alguma limitação da técnica de microscopia, que está sendo usada para microanálise com MEV-EDS e WDS a partir deste mês de Outubro de 2012.

A microscopia eletrônica de varredura com análise por EDS vem sendo usada em trabalhos forenses com amostras discriminantes de solo (Cengiz, Cengiz Karaca *et al.*, 2004), além da quantificação de chumbo e outros elementos em amostras de ossos alvejados por disparos de balas em baixa velocidade, com intuito da utilização da qualidade de imagem dos modernos microscópios eletrônicos de varredura com a possibilidade de analisar seus principais componentes (Kieser, Tahere *et al.*, 2011). É provável que para quantificarmos chumbo em amostras de ossos, seja necessário que tenha uma grande contaminação de chumbo na amostra e que esta técnica seja limitada para traços de chumbo em amostras de tíbias em ratos expostos a 30ppm de acetato de chumbo por 60 dias. O mesmo não pode ser dito para as amostras de dentes molares de ratos do grupo Pb 60D, pois com a presença de um grande depósito do óxido de chumbo na superfície dental destes animais, foi possível a quantificação de chumbo nas amostras de mandíbula, sem isso não seria possível quantificar chumbo em amostras mineralizadas dos animais deste estudo, ilustrando a limitação dessa técnica mais uma vez.

As imagens do MEV, mostram claramente os depósitos extrínsecos de chumbo nos dentes molares do grupo Pb 60D, a função “Map sum” do Aztec para EDS, nos dá a distribuição espacial do chumbo na superfície dental (Figura 29 e 33), então podemos mostrar que enquanto temos a presença do óxido de chumbo, não temos a presença de cálcio em grande quantidade e vice-versa, isso faz com que as amostras controle tenham maior quantidade de cálcio, uma vez que extrinsecamente existe uma “barreira” que impede a penetração dos elétrons na amostra. O mesmo não podemos dizer com o Carbono e magnésio (Figura 28 e 32) que estão presentes em toda extensão da amostra. Já foi demonstrado em estudo (Sawan,

Leite *et al.*, 2010) que biópsia em esmalte são métodos muito eficazes na quantificação de chumbo na superfície dental, pois é justamente na superfície que esta está depositado, e assim obtem-se uma amostra muito “simples” para análise química, pois ela contém basicamente altas concentrações de cálcio e fósforo, e os microelementos que estão na superfície do esmalte.

8 CONCLUSÕES

1- A concentração de chumbo obtida no sangue de animais do grupo Pb 28D foi de 8,0 ug/dl (± 1.1) e no grupo Pb 60D foi de 7,2 ug/dl (± 0.89). Nos grupos controle as concentrações de chumbo foram próximas ao limite de detecção.

2- A concentração de chumbo no osso do grupo Pb 28D foi $8,02 \pm 1,12$ e no grupo Pb 60D foi de $43,3\text{ug/g} \pm 13,26$. Nos grupos controle as concentrações de chumbo foram próximas ao limite de detecção.

3- A concentração de zinco no osso do grupo C 60D foi 0,22 mg/g e no grupo Pb 60D foi 0,22 mg/g. A concentração de magnésio no osso do grupo C 60D foi de 4,89 mg/g $\pm 0,74$ e no grupo Pb 60D foi de $4,98\text{mg/g} \pm 0,79$, não sendo as diferenças entre os grupos expostos e controles estatisticamente significantes.

4- Houve diferença estatisticamente significativa entre as massas de osso do grupo Pb 60D em comparação com C 60D ($p < 0.0004$).

5- a. Os microelementos mais abundantes detectados nas tibias contralaterais por Microscopia Eletrônica de varredura por EDS/WDS foram cálcio, fósforo, carbono, oxigênio, magnésio, sódio e potássio, não tendo sido detectadas variações semi-quantitativas nestes elementos. O chumbo não foi detectado nos grupos controle.

b. O chumbo foi detectado apenas nos dentes molares por MEV-EDS apenas na forma de óxido de chumbo (deposição extrínseca) que pode ser útil para fins forenses ou de determinação de contaminação desconhecida por este método, mas o método não é adequado para qualificar a exposição a chumbo em dentes ou ossos.

9 BIBLIOGRAFIA

AGNA, J. W.; KNOWLES, H. C., JR.; ALVERSON, G. The mineral content of normal human bone. **J Clin Invest**, v. 37, n. 10, p. 1357-61, Oct 1958. ISSN 0021-9738 (Print)
0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13575536> >.

ALALUUSUA, S.; LUKINMAA, P. L. Developmental dental toxicity of dioxin and related compounds--a review. **Int Dent J**, v. 56, n. 6, p. 323-31, Dec 2006. ISSN 0020-6539 (Print)
0020-6539 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17243464> >.

AMMERMAN, C. B. et al. Mineral composition of tissues from beef cattle under grazing conditions in Panama. **J Anim Sci**, v. 38, n. 1, p. 158-62, Jan 1974. ISSN 0021-8812 (Print)
0021-8812 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4812283> >.

AVERY, J. **Oral Development and Histology**. Thieme, 2001. ISBN 9781588900289. Disponível em: < <http://books.google.com.br/books?id=nMPXtw25V5MC> >.

BARBOSA, F., JR. et al. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 12, p. 1669-74, Dec 2005. ISSN 0091-6765 (Print)
0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16330345> >.

BEZERRA DE MENEZES, L. M. et al. Bone as a biomarker of acute fluoride toxicity. **Forensic Sci Int**, v. 137, n. 2-3, p. 209-14, Nov 26 2003. ISSN 0379-0738 (Print)
0379-0738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14609659> >.

BOFFETTA, P. et al. Mortality from cardiovascular diseases and exposure to inorganic mercury. **Occup Environ Med**, v. 58, n. 7, p. 461-6, Jul 2001. ISSN 1351-0711 (Print)
1351-0711 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11404451> >.

BOIVIN, G. et al. Skeletal fluorosis: histomorphometric analysis of bone changes and bone fluoride content in 29 patients. **Bone**, v. 10, n. 2, p. 89-99, 1989. ISSN 8756-3282 (Print)
1873-2763 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2765315> >.

BORJA-ABURTO, V. H. et al. Blood lead levels measured prospectively and risk of spontaneous abortion. **Am J Epidemiol**, v. 150, n. 6, p. 590-7, Sep 15 1999. ISSN 0002-9262 (Print)
0002-9262 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10489998> >.

BRAUN, J. M. et al. Exposures to environmental toxicants and attention deficit hyperactivity disorder in U.S. children. **Environ Health Perspect**, v. 114, n. 12, p. 1904-9, Dec 2006. ISSN 0091-6765 (Print)
0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17185283> >.

CAMPBELL, J. R. et al. The association between environmental lead exposure and bone density in children. **Environ Health Perspect**, v. 112, n. 11, p. 1200-3, Aug 2004. ISSN 0091-6765 (Print)
0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15289167> >.

CDC. Low Level Lead Exposure Harms Children: A Renewed Call for Primary Prevention. CDC 2012.

CENGIZ, S. et al. SEM-EDS analysis and discrimination of forensic soil. **Forensic Sci Int**, v. 141, n. 1, p. 33-7, Apr 20 2004. ISSN 0379-0738 (Print)
0379-0738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15066711> >.

CHACHRA, D. et al. The effect of fluoride treatment on bone mineral in rabbits. **Calcif Tissue Int**, v. 64, n. 4, p. 345-51, Apr 1999. ISSN 0171-967X (Print)
0171-967X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10089229> >.

CLARKSON, T. W.; MAGOS, L. The toxicology of mercury and its chemical compounds. **Crit Rev Toxicol**, v. 36, n. 8, p. 609-62, Sep 2006. ISSN 1040-8444 (Print)
1040-8444 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16973445> >.

CLAUS HENN, B. et al. Associations of early childhood manganese and lead coexposure with neurodevelopment. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 1, p. 126-31, Jan 2012. ISSN 1552-9924 (Electronic)
0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21885384> >.

CLEYMAET, R. et al. In vivo use of a dual acid etch biopsy for the evaluation of lead profiles in human surface enamel. **Caries Res**, v. 25, n. 4, p. 256-63, 1991. ISSN 0008-6568 (Print)
0008-6568 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1913763> >.

CONTI, M. I. et al. Effects of lead exposure on growth and bone biology in growing rats exposed to simulated high altitude. **Bull Environ Contam Toxicol**, v. 88, n. 6, p. 1033-7, Jun 2012. ISSN 1432-0800 (Electronic) 0007-4861 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22456729> >.

DE ALMEIDA, G. R. et al. A plateau detected in lead accumulation in subsurface deciduous enamel from individuals exposed to lead may be useful to identify children and regions exposed to higher levels of lead. **Environ Res**, v. 107, n. 2, p. 264-70, Jun 2008. ISSN 1096-0953 (Electronic) 0013-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18304525> >.

DE CAPITANI, E. M. Diagnóstico e tratamento da intoxicação por chumbo em crianças e adultos. **Medicina (USP.FMRP)**, v. 42, 2009. Disponível em: < http://www.fmrp.usp.br/revista/2009/vol42n3/Simp7_Diagnostico_e_tratamento_intoxicacao_%20por_chumbo.pdf >.

DE SOUZA GUERRA, C. et al. X-ray fluorescence with synchrotron radiation to elemental analysis of lead and calcium content of primary teeth. **Appl Radiat Isot**, v. 68, n. 1, p. 71-5, Jan 2010. ISSN 1872-9800 (Electronic) 0969-8043 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19744862> >.

DENBESTEN, P. K.; CRENSHAW, M. A. Studies on the changes in developing enamel caused by ingestion of high levels of fluoride in the rat. **Adv Dent Res**, v. 1, n. 2, p. 176-80, Dec 1987. ISSN 0895-9374 (Print) 0895-9374 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3504167> >.

DIETRICH, K. N. et al. Early exposure to lead and juvenile delinquency. **Neurotoxicol Teratol**, v. 23, n. 6, p. 511-8, Nov-Dec 2001. ISSN 0892-0362 (Print) 0892-0362 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792521> >.

FISKE CH, S. Y. The colorimetric determination of phosphorus. **J Biol Chem**, v. 66, p. 375-400, 1925.

GEORGE, J. et al. Bone mineral density and disorders of mineral metabolism in chronic liver disease. **World J Gastroenterol**, v. 15, n. 28, p. 3516-22, Jul 28 2009. ISSN 1007-9327 (Print) 1007-9327 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19630107> >.

GERLACH, R. F. et al. Effect of lead on dental enamel formation. **Toxicology**, v. 175, n. 1-3, p. 27-34, Jun 14 2002. ISSN 0300-483X (Print) 0300-483X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12049833> >.

GERLACH, R. F. et al. Fluoride effect on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. **Eur J Oral Sci**, v. 108, n. 1, p. 48-53, Feb 2000. ISSN 0909-8836 (Print) 0909-8836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706477> >.

GERLACH, R. F. G., S. C. D. ; GUERRA CS. Biomarcadores de Exposição a Chumbo. v. v42, p. 237-246, 2009 2009.

GHOSH, D. et al. Testicular toxicity in sodium fluoride treated rats: association with oxidative stress. **Reprod Toxicol**, v. 16, n. 4, p. 385-90, Jul-Aug 2002. ISSN 0890-6238 (Print) 0890-6238 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12220599> >.

GOMES, V. E. et al. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. **Sci Total Environ**, v. 320, n. 1, p. 25-35, Mar 5 2004. ISSN 0048-9697 (Print) 0048-9697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14987924> >.

GONZALEZ-PEREZ, J. M. et al. Relative and combined effects of ethanol and protein deficiency on bone manganese and copper. **Biol Trace Elem Res**, v. 147, n. 1-3, p. 226-32, Jun 2012. ISSN 1559-0720 (Electronic) 0163-4984 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22190260> >.

GOODHEW J. P., H., J., BEANLAND, R. **Electron Microscopy and Analysis**. 3rd. New York and London: 1999.

GUALLAR, E. et al. Mercury, fish oils, and the risk of myocardial infarction. **N Engl J Med**, v. 347, n. 22, p. 1747-54, Nov 28 2002. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12456850> >.

JACOB-FERREIRA, A. L. et al. A common matrix metalloproteinase (MMP)-2 polymorphism affects plasma MMP-2 levels in subjects environmentally exposed to mercury. **Sci Total Environ**, v. 409, n. 20, p. 4242-6, Sep 15 2011. ISSN 1879-1026 (Electronic) 0048-9697 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21794897> >.

JACOB-FERREIRA, A. L. et al. Mercury Exposure Increases Circulating Net Matrix Metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 Activities. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 105, n. 4, p. 281-288, Oct 2009. ISSN 1742-7843 (Electronic) 1742-7835 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19594729> >.

JARUP, L. Hazards of heavy metal contamination. **Br Med Bull**, v. 68, p. 167-82, 2003. ISSN 0007-1420 (Print)
0007-1420 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14757716> >.

KEENE, B. E. et al. Measures of bone mineral content in mature dairy cows. **J Dairy Sci**, v. 87, n. 11, p. 3816-25, Nov 2004. ISSN 0022-0302 (Print)
0022-0302 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15483166> >.

KIESER, J. A. et al. Morphoscopic analysis of experimentally produced bony wounds from low-velocity ballistic impact. **Forensic Sci Med Pathol**, v. 7, n. 4, p. 322-32, Dec 2011. ISSN 1556-2891 (Electronic)
1547-769X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21533860> >.

LAWSON, B. F. et al. The incidence of enamel hypoplasia associated with chronic pediatric lead poisoning. **S C Dent J**, v. 29, n. 11, p. 5-10, Nov 1971. ISSN 0049-1489 (Print)
0049-1489 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5290477> >.

LEITE, G. A. et al. Exposure to lead exacerbates dental fluorosis. **Arch Oral Biol**, v. 56, n. 7, p. 695-702, Jul 2011. ISSN 1879-1506 (Electronic)
0003-9969 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21269604> >.

MAHAFFEY, K. R.; GOYER, R.; HASEMAN, J. K. Dose-response to lead ingestion in rats fed low dietary calcium. **J Lab Clin Med**, v. 82, n. 1, p. 92-100, Jul 1973. ISSN 0022-2143 (Print)
0022-2143 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4352267> >.

MALIK, P. et al. Low bone mineral density and impaired bone metabolism in young alcoholic patients without liver cirrhosis: a cross-sectional study. **Alcohol Clin Exp Res**, v. 33, n. 2, p. 375-81, Feb 2009. ISSN 1530-0277 (Electronic)
0145-6008 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19053976> >.

MERGLER, D. et al. Methylmercury exposure and health effects in humans: a worldwide concern. **Ambio**, v. 36, n. 1, p. 3-11, Feb 2007. ISSN 0044-7447 (Print)
0044-7447 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17408186> >.

MEYER, P. A. et al. Surveillance for elevated blood lead levels among children--United States, 1997-2001. **MMWR Surveill Summ**, v. 52, n. 10, p. 1-21, Sep 12 2003. ISSN 1545-8636 (Electronic)
0892-3787 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14532866> >.

NAVAS-ACIEN, A. et al. Lead exposure and cardiovascular disease--a systematic review. **Environ Health Perspect**, v. 115, n. 3, p. 472-82, Mar 2007. ISSN 0091-6765 (Print)
0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17431501> >.

NEEDLEMAN, H. L.; BELLINGER, D. The health effects of low level exposure to lead. **Annu Rev Public Health**, v. 12, p. 111-40, 1991. ISSN 0163-7525 (Print)
0163-7525 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1828669> >.

NEEDLEMAN, H. L. et al. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. **N Engl J Med**, v. 300, n. 13, p. 689-95, Mar 29 1979. ISSN 0028-4793 (Print)
0028-4793 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/763299> >.

NEEDLEMAN, H. L. et al. Bone lead levels in adjudicated delinquents. A case control study. **Neurotoxicol Teratol**, v. 24, n. 6, p. 711-7, Nov-Dec 2002. ISSN 0892-0362 (Print)
0892-0362 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12460653> >.

NEVIN, R. Understanding international crime trends: the legacy of preschool lead exposure. **Environ Res**, v. 104, n. 3, p. 315-36, Jul 2007. ISSN 0013-9351 (Print)
0013-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17451672> >.

O'FLAHERTY, E. J. Physiologically based models for bone-seeking elements. V. Lead absorption and disposition in childhood. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 131, n. 2, p. 297-308, Apr 1995. ISSN 0041-008X (Print)
0041-008X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7716770> >.

OMNELL, K. A. Quantitative roentgenologic studies on changes in mineral content of bone in vivo. **Acta radiol**, v. 48, n. Suppl 148, p. 1-86, 1957. ISSN 0001-6926 (Print)
0001-6926 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13469573> >.

ONG, C. N.; LEE, W. R. High affinity of lead for fetal haemoglobin. **Br J Ind Med**, v. 37, n. 3, p. 292-8, Aug 1980. ISSN 0007-1072 (Print)
0007-1072 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6158989> >.

OPPENHEIM, W. L. The "battered alcoholic syndrome". **J Trauma**, v. 17, n. 11, p. 850-6, Nov 1977. ISSN 0022-5282 (Print)
0022-5282 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/915961> >.

PAOLIELLO, M. M. et al. Exposure of children to lead and cadmium from a mining area of Brazil. **Environ Res**, v. 88, n. 2, p. 120-8, Feb 2002. ISSN 0013-9351 (Print) 0013-9351 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11908937> >.

PARSONS, P. J.; SLAVIN, W. A rapid Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometric method for the determination of lead in blood. **Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy**, v. 48, n. 6-7, p. 925-939, 1993. ISSN 0584-8547. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/058485479380094B> >. Acesso em: 1993/6//.

PORTO, I. M. et al. Enamel mineralization in the absence of maturation stage ameloblasts. **Arch Oral Biol**, v. 54, n. 4, p. 313-21, Apr 2009. ISSN 1879-1506 (Electronic) 0003-9969 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19217611> >.

RABINOWITZ, M.; WETHERILL, G. W.; KOPPLE, J. D. Studies of human lead metabolism by use of stable isotope tracers. **Environ Health Perspect**, v. 7, p. 145-53, May 1974. ISSN 0091-6765 (Print) 0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4831137> >.

RABINOWITZ, M. B. Toxicokinetics of bone lead. **Environ Health Perspect**, v. 91, p. 33-7, Feb 1991. ISSN 0091-6765 (Print) 0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2040248> >.

RABINOWITZ, M. B.; WETHERILL, G. W.; KOPPLE, J. D. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. **J Clin Invest**, v. 58, n. 2, p. 260-70, Aug 1976. ISSN 0021-9738 (Print) 0021-9738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/783195> >.

RIZZI, E. et al. Evidence of early involvement of matrix metalloproteinase-2 in lead-induced hypertension. **Arch Toxicol**, v. 83, n. 5, p. 439-49, May 2009. ISSN 1432-0738 (Electronic) 0340-5761 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18836702> >.

ROBINSON, C.; KIRKHAM, J.; HALLSWORTH, A. S. Volume distribution and concentration of protein, mineral and water in developing bovine enamel. **Arch Oral Biol**, v. 33, n. 3, p. 159-62, 1988. ISSN 0003-9969 (Print) 0003-9969 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3178535> >.

RONIS, M. J. et al. Skeletal effects of developmental lead exposure in rats. **Toxicol Sci**, v. 62, n. 2, p. 321-9, Aug 2001. ISSN 1096-6080 (Print) 1096-0929 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452145> >.

ROSIN, A. The long-term consequences of exposure to lead. **Isr Med Assoc J**, v. 11, n. 11, p. 689-94, Nov 2009. ISSN 1565-1088 (Print). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20108558> >.

ROTHENBERG, S. J.; POBLANO, A.; SCHNAAS, L. Brainstem auditory evoked response at five years and prenatal and postnatal blood lead. **Neurotoxicol Teratol**, v. 22, n. 4, p. 503-10, Jul-Aug 2000. ISSN 0892-0362 (Print) 0892-0362 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10974588> >.

SALONEN, J. T. et al. Mercury accumulation and accelerated progression of carotid atherosclerosis: a population-based prospective 4-year follow-up study in men in eastern Finland. **Atherosclerosis**, v. 148, n. 2, p. 265-73, Feb 2000. ISSN 0021-9150 (Print) 0021-9150 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10657561> >.

SARYAN L.A., Z. C. **Lead and its compounds**. 1994.

SAWAN, R. M. et al. Fluoride increases lead concentrations in whole blood and in calcified tissues from lead-exposed rats. **Toxicology**, v. 271, n. 1-2, p. 21-6, Apr 30 2010. ISSN 1879-3185 (Electronic) 0300-483X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20188782> >.

SHAPIRO, I. M. et al. The lead content of teeth. Evidence establishing new minimal levels of exposure in a living preindustrialized human population. **Arch Environ Health**, v. 30, n. 10, p. 483-6, Oct 1975. ISSN 0003-9896 (Print) 0003-9896 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1180570> >.

SIMMER, J. P. et al. Purification, characterization, and cloning of enamel matrix serine proteinase 1. **J Dent Res**, v. 77, n. 2, p. 377-86, Feb 1998. ISSN 0022-0345 (Print) 0022-0345 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9465170> >.

SIMONS, T. J. Passive transport and binding of lead by human red blood cells. **J Physiol**, v. 378, p. 267-86, Sep 1986. ISSN 0022-3751 (Print) 0022-3751 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3795106> >.

SMITH, C. E. Cellular and chemical events during enamel maturation. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, n. 2, p. 128-61, 1998. ISSN 1045-4411 (Print) 1045-4411 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603233> >.

STEWART, A. K.; MAGEE, A. C. Effect of Zinc Toxicity on Calcium, Phosphorus and Magnesium Metabolism of Young Rats. **J Nutr**, v. 82, p. 287-95, Feb 1964. ISSN 0022-3166 (Print)
0022-3166 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14135583> >.

THRANE, E. V. et al. Fluoride-induced apoptosis in epithelial lung cells involves activation of MAP kinases p38 and possibly JNK. **Toxicol Sci**, v. 61, n. 1, p. 83-91, May 2001. ISSN 1096-6080 (Print)
1096-0929 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294978> >.

VERBEECK, R. M. et al. Lattice parameters and cation distribution of solid solutions of calcium and lead hydroxyapatite. **Calcif Tissue Int**, v. 33, n. 3, p. 243-7, 1981. ISSN 0171-967X (Print)
0171-967X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6268259> >.

VERMEIJ, E. J. et al. Analysis of microtraces in invasive traumas using SEM/EDS. **Forensic Sci Int**, v. 214, n. 1-3, p. 96-104, Jan 10 2012. ISSN 1872-6283 (Electronic)
0379-0738 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21871744> >.

VIRTANEN, J. K. et al. Mercury, fish oils, and risk of acute coronary events and cardiovascular disease, coronary heart disease, and all-cause mortality in men in eastern Finland. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 25, n. 1, p. 228-33, Jan 2005. ISSN 1524-4636 (Electronic)
1079-5642 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15539625> >.

WHO. **Action is needed on chemicals of major public health concern.** World Health Organization 2012.

WILLARD, H. H., AND DIEHI, H. **Advanced Quantitative Analysis.** Van Nostrand, New York, 1943.

WRIGHT, J. P. et al. Association of prenatal and childhood blood lead concentrations with criminal arrests in early adulthood. **PLoS Med**, v. 5, n. 5, p. e101, May 27 2008. ISSN 1549-1676 (Electronic)
1549-1277 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18507497> >.

XIE, Y. et al. Studies on lead-binding protein and interaction between lead and selenium in the human erythrocytes. **Ind Health**, v. 36, n. 3, p. 234-9, Jul 1998. ISSN 0019-8366 (Print)
0019-8366 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9701901> >.

ZAGER, R. A.; IWATA, M. Inorganic fluoride. Divergent effects on human proximal tubular cell viability. **Am J Pathol**, v. 150, n. 2, p. 735-45, Feb 1997. ISSN 0002-9440 (Print)
0002-9440 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9033286> >.

ZHANG, A. et al. Association between prenatal lead exposure and blood pressure in children. **Environ Health Perspect**, v. 120, n. 3, p. 445-50, Mar 2012. ISSN 1552-9924 (Electronic)
0091-6765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21947582>
<http://ehp03.niehs.nih.gov/article/fetchObjectAttachment.action;jsessionid=386E82CA8C3A9B52312886B435EF7095?uri=info%3Adoi%2F10.1289%2Fehp.1103736&representation=PDF> >.

ZIEGLER, E. E. et al. Absorption and retention of lead by infants. **Pediatr Res**, v. 12, n. 1, p. 29-34, Jan 1978. ISSN 0031-3998 (Print)
0031-3998 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/643372> >.