UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PSICOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM PSICOBIOLOGIA

RENÊ SEABRA OLIEZER

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE METAIS NO ESMALTE EM DENTES DECÍDUOS
DE CRIANÇAS RESIDENTES EM REGIÕES DISTINTAS DA CIDADE DE
RIBEIRÃO PRETO – SP: RELAÇÕES NEUROTÓXICAS E ABERTURA DE
DADOS JUNTO ÀS COMUNIDADES ESCOLARES**

Ribeirão Preto

2020

RENÊ SEABRA OLIEZER

**ANÁLISE DA PRESENÇA DE METAIS NO ESMALTE EM DENTES DECÍDUOS
DE CRIANÇAS RESIDENTES EM REGIÕES DISTINTAS DA CIDADE DE
RIBEIRÃO PRETO – SP: RELAÇÕES NEUROTÓXICAS E ABERTURA DE
DADOS JUNTO ÀS COMUNIDADES ESCOLARES**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada ao Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Psicobiologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

Ribeirão Preto

2020

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.

Assinatura: _____ Data: __/__/__

Ficha catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Oliezer, Renê Seabra

Análise da presença de metais no esmalte em dentes decíduos de crianças residentes em regiões distintas da cidade de Ribeirão Preto – SP: relações neurotóxicas e abertura de dados junto às comunidades escolares. Ribeirão Preto, 2020.

92p.: il.; 30 cm

Tese (Mestrado em Ciências), Programa de Pós-graduação em Psicobiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP. Área de concentração: Psicobiologia.

Orientadora: Gerlach, Raquel Fernanda

Versão Corrigida

1. Toxicologia Ambiental. 2. Intoxicação por Metais Pesados. 3. Esmalte Dental. 4. Transtornos de Neurodesenvolvimento. 5. Saúde Pública.

OLIEZER, R. S. Análise da presença de metais no esmalte em dentes decíduos de crianças residentes em regiões distintas da cidade de Ribeirão Preto – SP: relações neurotóxicas e abertura de dados junto às comunidades escolares. 2019. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Departamento de Psicologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

Orientador: Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe, Angela, por ser meu maior exemplo de coragem, dedicação e amor. Ser a prova de que com determinação, persistência e paciência, tudo se torna possível. Obrigado por dedicar, todo segundo de sua vida, a mim e meus irmãos de forma incondicional.

AGRADECIMENTOS

Imenso agradecimento à **Prof^a. Dra^a. Raquel Fernanda Gerlach**, que aceitou o desafio de me orientar e, mesmo com suas diversas atribuições, se fez presente e otimista com os desafios que enfrentamos juntos durante esses dois anos. Obrigado por confiar em mim e muitas vezes ver qualidades que eu não enxergava.

Ao Laboratório de Histologia e Proteínas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto e todos os membros. Não é possível hoje finalizar um ciclo tão importante na minha vida sem agradecer as técnicas **Júnia Ramos** e **Patricia Adriana Basile** e a doutoranda **Larissa Dutra Bittencourt de Oliveira** que, com todo amor e dedicação, foram fundamentais para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao Laboratório de Toxicologia de Metais, do Departamento de Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, em especial ao **Prof. Dr. Fernando Barbosa** e à técnica **Vanessa Cristina de Oliveira Souza** por auxiliar nas análises que foram essenciais para a pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Frederico Barbosa Sousa** e seus alunos de pós-graduação por me receberem tão bem durante os dez dias que passei na Universidade Federal da Paraíba. Obrigado por somarem tanto aos meus conhecimentos sobre o esmalte dental.

Secretária **Renata Vicentini**, obrigado por toda atenção e dedicação em ajudar a todos do Programa de Psicobiologia da FFCLRP USP.

Agradeço à duas pessoas que me dão força e mostraram o que é amor incondicional: meus irmãos **Adriano Seabra Mariano** e **Lígia Seabra Mariano**. Eles são a prova de que as diferenças unidas se completam.

Agradeço aos meus pais, **Angela Seabra Mariano** e **Adriano Aparecido Mariano**, por todo apoio emocional e financeiro. Agradeço por me motivarem a não desistir e me fazer acreditar que meu futuro sempre pode ser melhor com minha dedicação e capacidade.

Meu marido **Tiago Querido Candido**, que suportou todo meu estresse sem, em momento algum, expressar nenhum sentimento negativo quanto ao meu trabalho.

Obrigado por todo esforço em tentar entender minha pesquisa e me ouvir falar de técnicas e termos que nunca ouviu antes.

Minhas tias **Iau (Aurea Seabra)** e **Eti (Margarete Seabra)** pelos almoços diários, que era uma pausa no meu dia para que eu pudesse relaxar e conversar sobre assuntos diversos da minha vida.

À toda minha família **Seabra** e **Mariano**, que sempre, com suas palavras, me motivaram a continuar e souberam reconhecer a importância que fazer pesquisa tem para mim.

Aos meus amigos **Guilherme da Costa Tonhão** e **Tatiana Andrião da Silva** por entenderem minha ausência em diversos períodos e mostrarem disposição em me ajudar.

Aos meus amigos de pós-graduação do Programa de Psicobiologia, **Bruna Yurie Takasaki Lara Resende** e **Pedro Antônio Lira Patrício**, pelo companheirismo nas disciplinas e no dia-a-dia.

Agradeço a **Jeanne Ramos Monteiro de Mello** pelas aventuras na busca dos dentes pelas escolas de Ribeirão Preto.

Obrigado a todas as **escolas, pais, crianças e profissionais da educação e saúde** que nos ajudaram com a campanha de coleta de dentes. Vocês foram essenciais para a realização deste projeto.

Ao apoio financeiro concedido pela **CAPES** - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil e do **CNPq** - Conselho Nacional e Tecnológico de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

Epígrafe

*“Não é o mais forte que sobrevive, nem o mais inteligente, mas o que
melhor se adapta as mudanças” (MEGGINSON, 1998).*

OLIEZER, R. S. Análise da presença de metais no esmalte em dentes decíduos de crianças residentes em regiões distintas da cidade de Ribeirão Preto – SP: relações neurotóxicas e abertura de dados junto às comunidades escolares. 2020. 92p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

RESUMO

Os metais são onipresentes na crosta terrestre. Muitos metais não essenciais estão no subsolo e fazem parte de recentes tecnologias (< 8.000 anos), caracterizando seu uso antrópico. A bioacumulação de metais, essenciais e não-essenciais, torna preocupante quanto aos efeitos tóxicos que podem surgir, principalmente quando afetam o sistema nervoso. Para a análise da exposição a metais, diversos biomarcadores podem ser utilizados. O esmalte dental é um excelente biomarcador que pode resistir à diversos fatores ambientais, possui fácil coleta, não é invasivo e de baixo custo. Este trabalho avaliou as concentrações de metais na superfície do esmalte dental de crianças em diferentes zonas da cidade. Foi realizada a microbiópsia para a extração de metais da superfície do esmalte dos dentes decíduos coletados nas quatro zonas da cidade de Ribeirão Preto – SP. A coleta dos dentes foi realizada por meio da campanha “Doe Seu Dentinho” realizada entre abril de 2018 e março de 2019. Microbiópsias (um ataque ácido superficial com HCl 1,6 N em glicerol a 70%) foram realizadas na superfície dos dentes selecionados aleatoriamente nas 4 zonas da cidade, com 10 dentes de cada de sexo por zona (n=4 x 20 dentes decíduos). Apenas dentes incisivos foram utilizados no processo de seleção aleatória. As amostras foram analisadas por meio do ICP-MS (Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry) para determinar as concentrações de Manganês, Zinco, Arsênio, Cádmio, Chumbo e Mercúrio. Os resultados foram expressos por grama de esmalte dental, uma vez que o Cálcio também já havia sido determinado. Nossos resultados são pioneiros para a presença de alguns metais no esmalte superficial determinados pelo ICP-MS. Os resultados sugerem que certas crianças possuem altos níveis de metal que não eram esperados, como no caso do Arsênio, Cádmio e Mercúrio. Em comparação com estudos anteriores de nosso grupo há 10 anos utilizando o mesmo método, os níveis de Chumbo no esmalte superficial foram menores. Houve uma correlação alta estatisticamente significativa para a concentração dos metais no esmalte superficial. Para a concentração de alguns metais, os meninos apresentaram maiores concentrações que as meninas. Concluindo, nossos resultados sugerem que outros metais tóxicos, além do Chumbo e do Cádmio, podem ser determinados no esmalte superficial por técnicas analíticas padrão-ouro e que as concentrações são altas para alguns deles. Assim, são necessários mais estudos para determinar quais são as concentrações associadas à toxicidade e quais as possíveis fontes de exposição em nossos ambientes urbanos.

Palavras-chave: Toxicologia Ambiental. Intoxicação por Metais Pesados. Esmalte Dental. Transtornos de Neurodesenvolvimento. Saúde Pública.

OLIEZER, R. S. Analysis of the presence of metals in deciduous teeth of children living in different regions of Ribeirão Preto – SP: neurotoxic relationships and *data disclosure* in school communities. 2020. 92p.

Dissertação (Mestrado em Ciências). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

ABSTRACT

Metals are ubiquitous on the Earth's crust. Many nonessential metals were not present in high level in our environment prior to technologic use of them (starting 8,000 years ago) as an anthropic use. The bioaccumulation of metals causes problems because of their toxic effects, particularly when they are neurotoxic. To be able to determine metals, many exposure biomarkers can be use. Dental enamel has the following advantages over some other biomarkers: it is stable over time, the sample collection is easy, the method is noninvasive, and the cost is low. This study aimed at evaluating the concentrations of several metals on the enamel surface of primary teeth collected at different areas of Ribeirao Preto, SP, Brazil. Tooth donation and collection was done based on a large campaign called "Doe Seu Dentinho" (Donate your little tooth) that took place between April 2018 and March 2019. Microbiopsies (a superficial etch with HCl in 70% glycerol) were done on the tooth surface on teeth randomly selected from the 4 districts of the city, with 10 boy- and girl teeth selected from each district (n=4 x 20 primary teeth). Only incisors were used in the process of random selection. Samples were then analyzed by ICP-MS for the presence of Manganese, Zinc, Arsenic, Cadmium, Lead and Mercury. Results were expressed as the amount of metals per gram of dental enamel, since calcium had also been determined. Our results are the first for the presence of some of these metals on the superficial enamel determined by ICP-MS. Results suggest that certain children have high levels of metal that we had not expected to be high, such as Arsenic, Cadmium and Mercury. In comparison to earlier studies of our group in our city 10 years ago and using the same methods, lead levels on superficial enamel were lower. There was a high and statistically significant correlation for the concentration of these metals on the superficial enamel. For all methods, boys always showed higher concentrations than girls ($p < 0,0001$). In conclusion, our results suggest that other toxic metals besides lead and cadmium can be determined on superficial enamel by golden standard analytical techniques, and that the concentrations seem to be high for some of them. Thus, more studies are needed to determine what are the concentrations associated with toxicity and what are the possible sources of exposure in our urban environments.

Keywords: Environmental Toxicology. Heavy Metal Poisoning. Dental Enamel. Neurodevelopmental Disorders. Public Health.

SUMÁRIO

1 Introdução.....	13
1.1 A presença ubíqua dos metais tóxicos.....	13
1.2 Histórico	13
1.3 Mecanismos de toxicidade	14
1.4 Neurotoxicidade	15
1.5 Classificação dos metais tóxicos.....	16
1.5.1 Arsênio (As)	17
1.5.2 Chumbo	17
1.5.3 Mercúrio (Hg)	20
1.5.4 Cádmio (Cd).....	20
1.5.5 Zinco (Zn).....	21
1.5.6 Manganês (Mn)	23
1.6 Esmalte Dental.....	24
1.7 <i>Data Disclosure</i>	26
2 Objetivos	28
2.1 Objetivo geral	28
2.2 Objetivos específicos	28
3 Material e Métodos	29
3.1 Aspectos éticos	29
3.2 Amostragem e Coleta dos Dentes	29
3.3 Biorrepositório de Dentes.....	30
3.4 Registro dos dados	30
3.5 Grupos Experimentais.....	31
3.6 Microbiópsia da superfície do esmalte dental	31
3.7 Preparo das soluções	34
3.7.1 Preparo do Glicerol a 70%	34

3.7.2 Preparo da solução para a microbiópsia	34
3.8 Procedimento da microbiópsia	34
3.9 Análise em Espectrometria de Massas em Plasma Indutivamente Acoplado ..	39
3.10 Análises estatísticas.....	40
4 Resultados	41
4.1 Análise sobre as zonas da cidade e sua divisão geográfica.	41
4.2 Estatística descritiva da campanha “Doe Seu Dentinho”	45
4.3 Concentração de metais neurotóxicos	48
4.4 Correlação entre a concentração dos metais.....	56
5 Discussão	59
6 Conclusões	63
Referências	64
ANEXOS	72
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da FORP/USP.....	73
ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	77
ANEXO C – Termo de Doação dos Dentes.....	79
ANEXO D – Cartaz da campanha “Doe Seu Dentinho”	80
ANEXO E – Folder, frente e verso, da campanha “Doe Seu Dentinho”	81
ANEXO F – Links para entrevistas de divulgação da pesquisa.....	82
ANEXO G – Grupos experimentais.....	83
ANEXO H – Gráficos de dispersão da Correlação de Spearman.....	84
ANEXO I – Concentração de metais por amostra.....	89

1 INTRODUÇÃO

1.1 A presença ubíqua dos metais tóxicos

A exposição humana aos metais é onipresente, mesmo que em baixas quantidades. Os metais sem função biológica conhecida e mais comumente encontrados no meio ambiente são o chumbo, o arsênio, o cádmio e o mercúrio, que têm efeitos nocivos ao funcionamento e desenvolvimento neurológico (ALMEIDA et al., 2007; JENKINS et al., 2004; NEEDLEMAN et al., 1989). A toxicologia de metais é um dos mais antigos ramos de estudos dentro da toxicologia (JÚNIOR et al., 2014), o que decorre do efeito muito danoso à saúde humana por parte destes metais tóxicos.

Os metais pesados podem contaminar o meio ambiente por meio da ação antropogênica ou natural. As principais formas de contaminação natural incluem a erosão, o intemperismo natural de rochas ricas em metais pesados e erupções vulcânicas. As causas pela ação do ser humano podem ser: pela mineração, descarte de diversos tipos de resíduos industriais, o constante (e cada vez mais comum) uso de praguicidas, esgoto, estruturas na área de construção civil e descarte indevido de equipamentos eletrônicos e baterias (JAISHANKAR et al., 2014).

1.2 Histórico

A toxicidade de alguns metais é bem descrita desde Hipócrates, há cerca de 2,5 mil anos. O chumbo, por exemplo, o mais antigo metal utilizado pelo ser humano, causa intoxicação (conhecido por saturnismo), desencadeou uma pandemia ao Império Romano e epidemias que duraram até meados do século XIX. Diversos artistas renascentistas, como os famosos Michelangelo e Caravaggio, sofreram com a intoxicação pelo que era chamada “loucura do pintor”, por suas consequências neurológicas (SEATON, 2014).

Além de causar intoxicações conhecidas desde o Império Romano, os primeiros registros de metais usados pela humanidade estão nas pinturas rupestres pré-históricas, passando pelos primeiros locais de mineração na Turquia entre 8.000 e 6.500 a.C (MONTES-SANTIAGO, 2013).

Desde o início da descrição da toxicidade de metais, sempre houve questões socioeconômicas envolvidas. Além disso, a questão ambiental também é

determinante na exposição a metais, uma vez que o local que os indivíduos moram, estudam e trabalham muitas vezes determina a exposição (LUCCHINI et al., 2019).

1.3 Mecanismos de toxicidade

Metais essenciais, que possuem funções biológicas no organismo, também podem ser prejudiciais ao neurodesenvolvimento quando ocorrer exposição a grandes quantidades ou quando a exposição for crônica, como no caso de Zinco e Manganês (VELTHORST et al., 2017).

Apesar disso, só recentemente se tem descrições mais detalhadas dos possíveis mecanismos moleculares que podem estar envolvidos na toxicidade aguda e crônica a metais tóxicos. Especialmente a toxicidade crônica a níveis mais baixos de metais é pouco conhecida. Em altos níveis, os metais tóxicos podem causar eventos diversos considerados prejudiciais ao organismo, por exemplo estresse oxidativo, disfunção das mitocôndrias, fragmentação do DNA, desregulação da autofagia e ativação da apoptose (GUNTER et al., 2010; SEO et al., 2014; WRIGHT; BACCARELLI, 2007; ZHANG et al., 2013).

A forma com que o indivíduo é exposto, seja ela aguda ou crônica, é um fator-chave para se compreender a exposição a metais, uma vez que é rara a exposição aguda, e os efeitos da exposição crônica, muitas vezes, são irreversíveis e mais comuns (KLASSEN e WATKINS, 2012).

Níveis altos de metais se acumulam em diversos tecidos, mineralizados ou não, e em diversos órgãos, incluindo-se o cérebro (a despeito da barreira hematoencefálica). A toxicidade induzida por metais e semi-metais envolvem diversos processos fisiológicos e toxicocinéticos que, muitas vezes, não são compreendidos. Cada metal possui características únicas e propriedades físico-químicas fundamentais para seus mecanismos de toxicidade e ação (TCHOUNWOU et al., 2012). Apesar das dificuldades em se compreender a toxicidade dos metais, Klaassen e Watkins (2012) propuseram o esquema geral, conforme Figura 1.

Figura 1 - Esquema da toxicidade dos metais.

Fonte: KLAASSEN e WATKINS (2012), modificado.

1.4 Neurotoxicidade

O sistema nervoso em desenvolvimento é mais sensível a xenobióticos quando comparado com o sistema já desenvolvido (COSTA, 2017). O neurodesenvolvimento se inicia com aproximadamente três semanas de gestação, continua na infância e adolescência, e perdura até o início da vida adulta. O período perinatal é, durante o período de neurodesenvolvimento, o período mais suscetível pois diversos eventos são coordenados para que ocorra proliferação, diferenciação e migração celular no sistema nervoso central (RODIER, 1994).

As complexas e rápidas mudanças que ocorrem durante o período gestacional, perinatal e neonatal, fazem do sistema nervoso um importante alvo para que contaminantes acarretem impactos e alterações permanentes (RAUH e MARGOLIS, 2016).

Neurotoxicidade pode ser definida como quaisquer alterações químicas, estruturais ou funcionais do sistema nervoso, seja central ou periférico, causadas por substâncias químicas (LADEFOGED et al, 1995). Pode-se atribuir alterações cognitivas, distúrbios de memória, mudanças de humor ou início de transtornos

psiquiátricos a tais alterações neurofisiológicas causadas pela exposição a diversos metais e semi-metais (CABAN-HOLT et al., 2005; MASON e MATHEWS, 2013).

A neurodegeneração ocorre em consequência dos efeitos que alteram as neurotransmissões, que gera déficits cognitivos, distúrbios relacionados ao movimento, aprendizagem e memória. A neurotoxicidade causada por metais tem sido associada à diversas doenças neurológicas, como Doença de Alzheimer (DA), Esclerose Lateral Amiotrófica (ELA), Doença de Guillain-Barré (DGB), Doença de Huntington (DH), Manganismo, Esclerose Múltipla, Doença de Parkinson (DP) e Doença do Espectro Autista (AUTHIER et al., 2001; DESAI; KALER, 2008; OKUDA et al., 1997; TOMLJENOVIC, 2013).

1.5 Classificação dos metais tóxicos

Nos Estados Unidos da América (EUA), a *Agency For Toxic Substances Disease Registry* (ATSDR) é a agência responsável por classificar os agentes tóxicos de acordo com seu perigo e risco para a saúde humana. De acordo com a agência o Arsênio (As), Chumbo (Pb), Mercúrio (Hg) e o Cádmio (Cd) estão entre os dez primeiros quanto ao seu risco de toxicidade e nocividade, assim como o Zinco (Zn) e Manganês (Mn) entre os principais metais que aparecem na classificação de 2017 (ATSDR, 2017), como mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação da ATSDR conforme agentes tóxicos mais nocivos e com maior risco para a saúde humana de 1991 e de 2013 a 2017.

CLASSIFICAÇÃO ATSDR				
	1991	2013	2015	2017
Arsênio (As)	2º	1º	1º	1º
Chumbo (Pb)	1º	2º	2º	2º
Mercúrio (Hg)	3º	3º	3º	3º
Cádmio (Cd)	6º	7º	7º	7º
Zinco (Zn)	53º	75º	75º	75º
Manganês (Mn)	43º	139º	139º	140º

Fonte: ATSDR (2017).

É crescente o número de relatos e pesquisas sobre a influência de substâncias tóxicas ao ser humano e ao meio ambiente que resultam na neurotoxicidade. As crianças que são expostas, principalmente de forma crônica, a diversos metais apresentam dificuldades cognitivas e comportamentais, resultando assim em dificuldade de aprendizagem durante sua vida letiva e ao isolamento social (LIU et al., 2014).

Os efeitos e mecanismos de toxicidade dos principais metais neurotóxicos, assim como suas principais características, são descritos a seguir:

1.5.1 Arsênio (As)

O As é o 52º elemento mais abundante na atmosfera, o 20º mais presente em forma inorgânica e mais de 200 milhões de pessoas se expõem de forma crônica. Diversas são as fontes de exposição humana ao As, principalmente a água, o que faz com que a população, no geral, esteja exposta a este metal (PRAKASH et al., 2016).

As atividades antropogênicas, como a mineração, a incineração de resíduos, o uso de conservantes de madeira, o uso progressivo de praguicidas e queima de carvão, são as maiores fontes de poluição e contaminação ambiental do As (ORLOFF et al., 2009).

Pesquisas sugerem que a exposição ao As causa estresse oxidativo em mitocôndrias, desequilíbrios do Ca^{2+} intracelular, disfunções na produção de adenosina trifosfato (ATP), alterações no potencial de membrana, alterações morfológicas do citoesqueleto e a morte de neurônios. Os principais sintomas relatados por pessoas expostas são a neuropatia periférica e deficiências cognitivas e de memória (AUNG et al., 2016; KILBURN, 1997; PRAKASH et al., 2016).

O uso de praguicidas é crescente, tanto no Brasil quanto em diversos outros países do mundo, assim como a necessidade de novas pesquisas sobre a contaminação da água, do solo e do ar pelo As.

1.5.2 Chumbo (Pb)

O Pb é um metal sem funções em processos biológicos no corpo humano e é onipresente na atmosfera, poluindo diversos ecossistemas (AIZENMAN et al., 2015; MASON et al., 2014). As principais formas de exposição ao Pb em humanos são a

inalação e a ingestão. O Pb se acumula nos eritrócitos após o processo de absorção por um período relativamente curto (cerca de 1 mês) e finalmente nos ossos. A afinidade principal do Pb no organismo humano é com o sistema nervoso, sendo as crianças mais sensíveis. O hipocampo, região do sistema nervoso central, é responsável pelos processos de atenção e de memória, que são processos necessários para a aprendizagem, e a região onde ocorre o maior acúmulo deste metal, embora ele possa se acumular também em outras regiões (CONCEPCIÓN et al., 2012; MASON et al., 2014). A intoxicação por Pb possui diversas variáveis individuais que devem ser levadas em conta: idade e sexo (THEPPEANG et al., 2008), fatores socioeconômicos (QUINN, 1985), região de residência (KHODER et al.; 2010), ocupação, hobbies (NEEDLEMAN, 2004), e dieta (JOHNSON e TENUTA, 1979).

Assim como os diversos elementos que possuem afinidade com tecidos mineralizados, o Pb, após o processo de absorção, é incorporado em ossos e dentes, onde pode permanecer por diversos anos. Nos ossos, ele pode retornar à circulação sanguínea por diversos fatores. O tempo de permanência do metal no corpo depende da toxicocinética, principalmente por se acumular nos ossos, que são tecidos que passam pelo processo de remodelação¹. Depende também em quais tipos de ossos ele se acumulou antes de retornar para a circulação sanguínea: ossos compactos liberam de forma mais lenta e ossos esponjosos de¹ forma mais rápida (O'FLAHERTY, 1995; RABINOWITZ, 1991). Além disso, o retorno do Pb para a circulação sanguínea varia com a idade, já que a remodelação óssea é um processo comum na terceira idade e em diversas patologias, período gestacional e crescimento (BRITO et al., 2005).

Assim como os ossos, os dentes, por serem mineralizados, possuem a capacidade de acumular Pb por longos períodos. Pesquisadores já relataram que os dentes são os melhores biomarcadores de exposição quando comparados com os ossos, pois os dentes não passam pelo processo de remodelação (MANEAKRICHTEN et al., 1991) e os dentes decíduos são muito mais fáceis de coletar e analisar, pois a esfoliação ocorre de forma natural a partir dos 6 anos de idade. Por serem extremamente estáveis, eles se mantêm preservados por milhares de anos (BARBOSA et al., 2005). O esmalte dental contém mais Pb acumulado nos primeiros

¹ Processo contínuo do tecido ósseo no qual ocorre uma reabsorção de parte do tecido e sua substituição. Diversos fatores fisiológicos podem influenciar o processo, como crescimento, gestação e patologias (HILL e ORTH, 1998; MEGHJI, 1992).

micrômetros de sua superfície (quando comparado à dentina, outro tecido mineralizado que forma a estrutura do dente). Entretanto, na porção do meio do esmalte os níveis de chumbo também são muito baixos, até mesmo menores do que na dentina (BARBOSA et al., 2005).

Apesar de a maior parte do Pb estar presente na superfície do esmalte, os dentes são capazes de fornecer informações valiosas sobre a exposição em diferentes fases da vida. O esmalte dos dentes decíduos e parte dos dentes permanentes são formados durante a vida uterina, ou seja, podem fornecer informações da exposição pré-natal que são essenciais para relacionar a exposição com diversas doenças, principalmente neurotóxicas (BARBOSA et al., 2005).

As crianças são muito mais suscetíveis aos efeitos nocivos do Pb principalmente porque a quantidade do metal presente em ossos e dentes de adultos chega a 94%, enquanto em crianças é de apenas 70%. Graças à fase de desenvolvimento e crescimento das crianças, elas estão em constante remodelação óssea, o que faz com que a maior carga do metal esteja principalmente na circulação sanguínea e diversos tecidos (BARRY, 1981; O'FLAHERTY, 1995).

Os efeitos diretos do Pb no sistema nervoso podem ser classificados de duas formas diferentes: morfológicos ou farmacológicos (GOYER, 1996). Dentre os efeitos morfológicos, ocorrem alterações no neurodesenvolvimento, particularmente no período pré-natal e durante a infância, principalmente no período de neurodiferenciação (SILBERGELD, 1992). Neste caso, ele interfere nas sinapses que leva a uma diminuição da produção de ácido siálico e diferenciação prematura das células da glia (COOKMAN et al.; 1987). O Pb apresenta efeitos neurotóxicos diferentes quando a exposição ocorre durante a infância ou na vida adulta. Nos adultos causa mielinopatia, o que leva a diminuição da condução nervosa em neurônios motores, com possibilidade de reversão após o fim da exposição ao metal (POWELL et al.; 1982). Em crianças ocorrem alterações neurocomportamentais, diminuição do desempenho escolar, de atenção e de QI (LANPHEAR et al., 2005; NEEDLEMAN et al., 1989).

Os fetos podem se expor ao Pb por meio do contato materno e pela capacidade do metal de atravessar a membrana placentária de forma livre pela necessidade de, durante a gravidez, o organismo demandar uma maior quantidade de cálcio, resultando em remodelação óssea da mãe e a liberação do Pb acumulado nos ossos para a corrente sanguínea (GOYER, 1990; ROTHENBURG et al., 1994).

1.5.3 Mercúrio (Hg)

O Hg é encontrado na atmosfera principalmente por fontes antropogênicas, como resíduos industriais e mineração, ou por fontes naturais, como erupções vulcânicas e incêndios florestais (LI e TSE, 2015). É um metal altamente tóxico que ameaça de forma direta o neurodesenvolvimento infantil, tanto em período fetal quanto em suas primeiras infâncias. No meio ambiente, o Hg pode ser encontrado em diferentes formas: metálico, ou elementar, inorgânico, como o cloreto de mercúrio (HgCl_2), ou orgânico, como o metilmercúrio (CH_3Hg^+) (DADAR et al., 2019; WHO, 2006).

A capacidade nociva da exposição ao Hg é bem conhecida, principalmente em sua forma orgânica, o Metilmercúrio (MeHg). A exposição ao MeHg afeta o neurodesenvolvimento, principalmente deficiências sensoriais, cognitivas e motoras (NASCIMENTO et al., 2008). Ele possui alta afinidade com o Enxofre (S) e, assim, pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) por sua capacidade de ligação com grupos tiol de proteínas. Dentro das células, o Hg, é oxidado para o íon Hg^{2+} , que é mantido nas células cerebrais por anos. Isso explica diversos sintomas da intoxicação crônica ao metal, tais como a depressão, ansiedade, insônia, tremores e os déficits cognitivos (ASCHNER e ASCHNER, 1990; KERPER et al.; 1992).

Diversos estudos atuais de expossoma com coortes, na Europa, indicam o quanto a exposição ao Hg é prejudicial ao desenvolvimento cognitivo e social de crianças, afetando mais as crianças do sexo masculino (CALAMANDREI et al., 2019).

Quando a exposição ao Hg ocorre de forma excessiva durante a gestação, sua capacidade de atravessar a membrana placentária faz com que sua concentração no cordão umbilical seja maior que no sangue materno (CAETANO et al., 2019). A exposição fetal ao mercúrio pode causar danos irreversíveis ao desenvolvimento do sistema nervoso da criança (SANTOS et al., 2016).

1.5.4 Cádmio (Cd)

Os primeiros relatos do uso do Cd pelo ser humano foram durante a Primeira Guerra Mundial como substituto da lata utilizada pelos guerrilheiros e como pigmento nas indústrias. Atualmente ele é muito utilizado em baterias recarregáveis ou alcalinas, produção de ligas, estabilizador de plástico e no tabaco (JAISHANKAR et al., 2014).

O Cd é um metal muito utilizado na indústria siderúrgica, de plásticos e como componente em diversos tipos de baterias, principalmente por sua alta durabilidade. As principais formas de exposição diária são a inalação da fumaça do cigarro, alimentos (alguns crustáceos e diversas carnes) e água contaminada. Não existem funções conhecidas do Cádmio em nenhum tipo de organismo, porém diversos efeitos nocivos já são relatados, principalmente a morte celular por apoptose (ABERNETHY et al., 2010; LUPARELLO et al.; 2011).

A exposição crônica ao Cd interfere de forma drástica com as funções consideradas normais do sistema nervoso e, assim como outros diversos metais, recém-nascidos e crianças são mais prejudicadas que adultos (WANG e DU, 2013). Causa também alterações epigenéticas, o que é um possível fator etiológico adquirido de doenças neurodegenerativas, como Doença de Alzheimer (DA) e Doença de Parkinson (DP) (JIANG et al., 2007; LUPARELLO et al., 2011; MARTINEZ-ZAMUDIO e HA, 2011; OKUDA et al., 1997; WANG et al., 2012). A exposição crônica é ainda mais preocupante pois, além de se acumular com facilidade em tecidos mineralizados e no cérebro, sua meia-vida biológica é estimada entre 20 e 30 anos, possuindo ainda baixa taxa de eliminação. Além destes fatores, consta que a sua presença na atmosfera é crescente (RANI et al., 2014). A capacidade do Cd de atravessar a BHE e a membrana placentária faz com que mulheres em período gestacional que se expõem acabam expondo o feto. Relatos indicam que baixo peso e parto prematuro são comuns quando ocorre a exposição fetal (HENSON e CHEDRESE, 2004).

Apesar da exposição individual a cada metal já produzir diversos efeitos nocivos ao sistema nervoso, a exposição sinérgica, ou coexposição, principalmente ao Pb, As e Hg, causa diminuição dos comprimentos e das ramificações dendríticas e perturbação na homeostase sináptica. Mesmo que a exposição individual aos metais citados esteja abaixo do considerado tóxico, em coexposição tais efeitos nocivos são relatados (ZHOU et al., 2018).

1.5.5 Zinco (Zn)

As primeiras pesquisas das concentrações de Zn na superfície do esmalte dental variavam de 130 a 280 ppm (partes por milhão) (CRUICKSHANK, 1937). Após aproximadamente 30 anos das primeiras pesquisas, nos anos 1960, a concentração

variava entre 430 e 2100 ppm em dentes decíduos, indicando um grande aumento da concentração (BRUDEVOLD et al., 1963).

A questão do aparente aumento de Zn e outros metais em dentes pode ser real, mas aguarda um maior número de pesquisas atuais. O aumento descrito nas décadas de 1960 e anteriores não pode ser considerado definitivo ou real, em função do pequeno número de estudos e das questões técnicas seríssimas que envolveram as medidas de metais nas décadas anteriores aos trabalhos clássicos Clair Patterson (DAVIDSON, 1999), que levaram ao estabelecimento das técnicas de determinação de metais e pré-preparo de tubos e soluções em salas “limpas”.

O Zn é o segundo metal mais encontrado no corpo humano e é considerado um metal essencial, pois está associado a diversos processos biológicos. A sinalização celular e neurotransmissão são exemplos de tais processos. Tanto a deficiência quanto o excesso deste metal podem ser nocivos ao organismo. O déficit pode afetar a capacidade de aprendizagem e de memória e causar depressão, o que afeta diretamente o neurodesenvolvimento (SWARDFAGER et al., 2013). Quando em excesso, o Zn é captado pelas mitocôndrias, o que gera uma disfunção, suprime a absorção de Cobre (Cu) e Ferro (Fe), e perturba as atividades de enzimas metabólicas resultando na morte neuronal por meio do apoptose. A desregulação homeostática do Zn está associada a DA, traumas cerebrais, isquemias, epilepsia e diversos tipos de demências (FRAZZINI et al., 2006; MIZUNO e KAWAHARA, 2013; WRIGHT e BACCARELLI, 2007). A maior parte do Zn no sistema nervoso está nos neurônios, ligados a proteínas. Porém, o Zn está presente também nas vesículas pré-sinápticas de neurônios glutamatérgicos (MORRIS e LEVENSON, 2017).

O Zn está localizado em neurônios e fendas pré-sinápticas de estruturas nodais que estão relacionadas com diversas funções e processos cognitivos, comportamentais e emocionais, como memória, funções psicomotoras, atenção e funções executivas. Por isso ele é considerado um metal neurotóxico que pode levar o indivíduo a déficits cognitivos e até mesmo sintomas de depressão (MILLAN et al., 2012; SENSI et al., 2009; SWARDFAGER et al., 2013).

Por ser um metal de transição de importância para o sistema nervoso, o Zn atravessa a membrana placentária com muita facilidade e, por isso, sua concentração é maior no cordão umbilical quando comparado com o soro sanguíneo da mãe (ROSSIPAL et al., 2000).

1.5.6 Manganês (Mn)

O Mn é o quinto metal mais abundante na crosta terrestre e assim como o Zn, um metal essencial para diversas funções, principalmente por seu papel homeostático e de desenvolvimento celular (BJØRKLUND et al., 2017; PRAKASH et al., 2016). Ele pode ser encontrado de forma onipresente no ambiente, porém em certas áreas geográficas sua concentração na água e no solo pode ser maior devido a ações antropogênicas ou naturais (BOUCHARD et al., 2018).

Diversas ações humanas estão relacionadas com a contaminação ambiental do Mn, principalmente em processos industriais, como produção de ferro inoxidável e ligas de alumínio, melhorias na eficiência de combustíveis e o uso de praguicidas, mais especificamente de fungicidas (ASCHNER et al., 2006; BLANC, 2018). O Mn nos combustíveis, especialmente na gasolina, é encontrado como Metilciclopentadienil Manganês Tricarbonil (MMT), que surgiu como um substituinte ao Pb, o que aumentou a presença deste metal no ar mesmo sua presença no combustível sendo baixa (GRAHAM et al., 2005).

O consumo de água contaminada é considerado um dos fatores mais preocupantes quanto à exposição ao Mn (WASSERMAN et al., 2006). O uso da soja em diversos alimentos infantis, como papinhas prontas e industrializadas, também foi sugerido como uma das vias de exposição para o excesso de Mn, o que pode levar disfunções neurológicas leves durante os estágios fundamentais do neurodesenvolvimento (KARKI et al., 2015; WILLIAMS et al., 2000).

A intoxicação por Mn é diretamente associada a doenças neurodegenerativas, principalmente pelo fato da alimentação ser a fonte fundamental de contaminação (CHEN et al., 2015; MICHALKE e FERNSEBNER, 2014; PARK, 2013). O Mn presente na dieta ou na água atravessa a barreira hematoencefálica para se acumular no sistema nervoso central (BJØRKLUND et al., 2017). A exposição excessiva e crônica a este metal produz efeitos tóxicos, particularmente pelo fato dele se acumular no cérebro, principalmente nos gânglios da base (BOUCHARD et al., 2018).

No Brasil, estudos já revelaram que a presença de Mn no ar, que causou intoxicação crônica em crianças, diminui de forma significativa o QI e o desempenho neuropsicológico, que foram avaliados por meio de diversos testes de atenção, flexibilidade cognitiva e memória de trabalho verbal e visual (CARVALHO et al., 2014).

A exposição fetal ao Mn está, também, diretamente relacionada com maiores escores Z do peso da crianças ao nascer, que indicam grandes diferenças de peso ao nascer e que estão associadas também ao sexo biológico da criança, sendo o sexo masculino mais afetado (CASSIDY-BUSHROW et al., 2019). A exposição de crianças também é mais preocupante pelo fato de terem seus mecanismos homeostáticos subdesenvolvidos, no qual baixas doses podem afetar de forma mais agressiva o sistema nervoso que ainda está em desenvolvimento (ZONI e LUCCHINI, 2013).

A preocupação com a coexposição ao Mn e As é crescente entre os pesquisadores, pois a cada ano a contaminação de poços de água potável, mesmo os domésticos, é crescente (WASSERMAN et al., 2007, 2016).

A coexposição entre Mn e Pb durante o período pré e perinatal faz com que os déficits cognitivos, principalmente a linguagem da criança, sejam maiores quando comparados a exposição isolada dos dois metais (LIN et al., 2013).

1.6 Esmalte Dental

O esmalte dental é o tecido mais cristalino, denso e duro do corpo, em que sua dureza pode ser até cinco vezes maior que dos ossos. Isso se deve ao seu alto teor de mineralização, que pode chegar a 96% de sua composição, e baixo teor proteico, menos de 1%. É o único tecido calcificado de origem epitelial em vertebrados. Quando comparado a outros tecidos mineralizados que contêm entre 65 e 70% de material orgânico, o esmalte se destaca por possuir 85% de seu volume e 95% de seu peso composto por cristais de hidroxiapatita ($[\text{Ca}_{10} (\text{PO}_4)_6 (\text{OH})_2]_n$), dispostos de forma altamente organizada (HU et al., 2015; LACRUZ et al., 2017; YAMAGUTI e CABRAL, 2019).

O esmalte é composto de uma fase orgânica e uma inorgânica (Tabela 2). A primeira é composta de diversas proteínas, como amelogenina, ameloblastina, enamulina e tuftelina. Existem também pequenas quantidades de proteoglicanos e lipídeos (BELCOURT e GILLMETH, 1979; EGGERT et al., 1973; GLIMCHER et al., 1964). A fase inorgânica é composta de nanocristais compactados feitos de Apatita de Fosfato de Cálcio com uma pequena quantidade de oligoelementos incorporados (Tabela 3) (SPRAWSON e BURY, 1928). A dureza do esmalte é afetada conforme a organização e o tamanho dos cristais de apatita e suas propriedades ópticas (EIMAR et al., 2011, 2012; JIANG et al., 2005).

Tabela 2 - Composição aproximada dos dentes (% em peso seco).

Composição	Cimento	Dentina	Esmalte
Inorgânica	70%	75%	95%
Orgânica	22%	20%	1%
Água	8%	5%	4%

Fonte: ROBINSON et al., 1995.

Tabela 3 - Principais elementos inorgânicos do esmalte dental em %.

Principais elementos em %			
Ca	P	H₂O	CO₃
37%	18%	3%	2,5%

Fonte: ROBINSON et al., 1995.

Os tecidos duros mineralizados dos mamíferos, como os dentes decíduos, permanentes e ossos, possuem como componente estrutural a hidroxiapatita. Durante o processo de mineralização, os dentes conseguem acumular diversos elementos químicos pela afinidade com a hidroxiapatita, sejam eles essenciais e fisiológicos ou tóxicos, como o Chumbo e o Cádmio (FISCHER e WIECHU, 2009).

Tanto a dentina quanto o esmalte são tecidos dentais que possuem a capacidade de acumular metais e diversas outras substâncias (RABINOWITZ et al., 1993). O processo de formação dos dentes é complexo e muito bem orquestrado. Ocorrem induções recíprocas entre o tecido ectoderme da cavidade oral e o ectomesênquima da crista neural, no qual surgem diversos elementos dentários. Porém é do tecido ectoderme que surgem os ameloblastos, células responsáveis por secretar o esmalte dental (SOM e MILETICH, 2018).

Diferente de outros tecidos mineralizados, como os ossos, nos quais os minerais são depositados em uma matriz orgânica, no processo de maturação o esmalte perde a maior parte da água e das proteínas, se tornando assim o tecido mais mineralizado presente nos mamíferos. Por esse processo de mineralização, o esmalte não passa pelo processo de remodelamento. Com isso, as substâncias nas quais o esmalte entra em contato durante a amelogênese, nome dado ao processo de sua formação, ficam presentes de forma permanente no tecido (GERLACH et al., 2002).

Identificar a presença de metais pesados utilizando o esmalte dental como biomarcador mostra o quanto a intoxicação pode desencadear problemas de saúde pública (OLIVEIRA et al., 2017).

O uso do esmalte dental como biomarcador da exposição a metais é promissor e atende as necessidades para pesquisas pois podem ser facilmente coletados, principalmente os dentes decíduos, que esfoliam de forma natural e apresentam a mesma estrutura fundamental que os ossos, a hidroxiapatita, portanto têm a mesma afinidade metálica e, por fim, seu remodelamento é lento, diferente dos ossos e outros tecidos que podem acumular metais (RABINOWITZ et al., 1993). Além disso, a dinâmica existente entre os metais e a hidroxiapatita é maior em dentes decíduos, o que justifica maior acúmulo dos metais (FISCHER e WIECHU, 2009).

A relação existente entre metais e a neurotoxicidade é de extrema relevância, sendo atualmente um alerta da Organização Mundial da Saúde (OMS), e pode contribuir de forma significativa para o entendimento de alterações neurológicas e cognitivas.

A cidade de Ribeirão Preto possui diversos polos industriais e regiões onde a população sofre com a falta de saneamento básico, que podem influenciar de forma direta a contaminação da água, do solo ou do ar por metais pesados neurotóxicos.

1.7 Data Disclosure

O *Data Disclosure* (abertura de dados) atualmente é muito utilizado por revistas e periódicos para facilitar a replicação de informações e o uso deste método para levar informações junto à comunidade é pouco realizado, ainda mais quando se trata de pesquisas que envolvem a relação entre metais e neurotoxicidade. Diferente da divulgação científica, o *Data Disclosure* trabalha diretamente com a comunidade, levando até eles informações sobre as pesquisas realizadas com linguagem mais acessível a todos. Tal método pode levar até a população informações que facilitam o entendimento de pesquisas diversas, além de auxiliar as famílias quanto as principais formas de exposição aos contaminantes e prevenir, visando a melhoria da qualidade de vida da comunidade.

É importante que o compartilhamento de informações científicas com a população seja realizado de forma simples e com linguagem menos técnica para que todos possam compreender o que está sendo divulgado. Além disso, a forma com a

qual a população terá acesso às informações são de extrema importância para a eficiência do *data disclosure*, uma vez que não são todas as pessoas que possuem facilidade para acessar diversos tipos de informações, mesmo na atual era digital.

A realização de visitas em escolas, hospitais e até mesmo áreas de acesso público, como parques e praças, levando tais informações é uma necessidade, uma vez que as pesquisas são realizadas para que toda a população tenha conhecimento.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Relacionar a presença de metais neurotóxicos, que têm sido associados a problemas de cognição e comportamento, em dentes decíduos de crianças residentes em Ribeirão Preto, SP, com a região da cidade em que o dente foi coletado.

2.2 Objetivos específicos

- I. Correlacionar os níveis de metais presentes no esmalte dental com a região onde a criança estuda.
- II. Fazer a análise em subgrupos.
- III. Por meio da divisão da cidade de Ribeirão Preto em zonas, mapear onde ocorre a maior exposição e a que metais a população de dada região mais está exposta.
- IV. Relacionar as regiões com a possível presença de indústrias, empresas ou outras formas de contaminação do ar, água e solo, como presença de áreas de descarte de lixo urbano.
- V. Desenvolver estratégias de *data disclosure* para divulgar de forma coletiva (sem divulgar o nome das crianças) os resultados gerais da pesquisa nas comunidades escolares, ou seja, em escolas, o que permite às crianças, pais, professores e outros profissionais da educação e saúde, conhecer e observar a variação da presença de metais em diferentes zonas da cidade. Com essa divulgação, atingir pais, alunos e profissionais da educação e saúde, conscientizando-os do quanto o meio ambiente contaminado pode ser nocivo ao desenvolvimento infantil.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP, tendo sido aprovado em abril de 2018, conforme registro CAAE nº 82840018.8.0000.5419 (Anexo A).

3.2 Amostragem e Coleta dos Dentes

A amostra foi composta de 80 dentes decíduos de crianças com entre 6 e 9 anos coletados durante o ano de 2018 por meio da campanha “Doe Seu Dentinho” realizado em escolas públicas, tanto estaduais quanto municipais, e particulares, todas com aprovação da Secretaria Municipal da Educação e Diretoria Estadual de Ensino.

Para a realização da campanha foram contactadas 88 escolas (aproximadamente 50% das escolas da cidade), onde 29 permitiram que a campanha fosse desenvolvida com seus alunos. Por meio da campanha, as informações resumidas do projeto foram apresentadas aos alunos, pais e profissionais da educação, com ênfase na importância que os dentes de leite podem ter para a realização de trabalho de toxicologia.

Foram entregues duas cópias do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) e uma o Termo de Doação de Dentes (Anexos B e C), para a criação de um biorrepositório. Além disso, um tubo Eppendorf® de 2ml com uma etiqueta de identificação também foi entregue para que, no ato da doação do(s) dente(s), o aluno entregue ao professor ou diretamente para os pesquisadores o tubo devidamente identificado, o TCLE e o Termo de Doação de Dentes devidamente preenchidos e assinados.

Além da campanha realizada diretamente em escolas, foram utilizadas diversas mídias sociais: redes sociais (Facebook e Instagram), materiais impressos (Anexos D e E), reportagens em duas emissoras de TV (Anexo F) e rádio (Rádio USP e THATI), com o objetivo de reforçar e atingir o maior público possível.

3.3 Biorrepositório de Dentes

Todos os dentes coletados nas escolas da cidade formaram um biorrepositório de dentes (Figura 2). Os dentes de cada criança foram armazenados nos tubos Eppendorf® (Eppendorf® International, Hamburg, Alemanha) com as seguintes informações: nome completo da criança, data de nascimento, turma escolar, escola e nome da mãe. Os tubos foram armazenados em racks, em ordem crescente da doação por zona da cidade. Os dentes utilizados para a realização da pesquisa foram devolvidos à sua respectiva posição no biorrepositório e não serão, em hipótese alguma, descartados.

3.4 Registro dos dados

O registro dos dentes coletados foi realizado em uma planilha no software Microsoft Office Excel® em computador e no tubo, com uma etiqueta na lateral e na tampa para que a identificação fosse facilitada em outras pesquisas. O biorrepositório está sob responsabilidade de Prof^a Dr^a Raquel Fernanda Gerlach. As racks estão armazenadas em um armário com chave no Laboratório de Proteínas e Histologia do Departamento de Biologia Básica e Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP. Os documentos referentes à doação dos dentes estão armazenados em pastas juntos aos dentes (Figura 3), em ordem de doação (conforme o número de identificação das crianças).

Figura 2 - Biorrepositório de dentes decíduos coletados divididos por zona da cidade.

Fonte: Próprio autor

Figura 3 - Termos de consentimento livre e esclarecidos arquivados

Fonte: Próprio autor

3.5 Grupos Experimentais

Para a realização do estudo foram formados quatro grupos referentes as regiões da cidade nas quais as crianças estudam, sendo elas Zona Norte (ZN), Zona Sul (ZS), Zona Leste (ZL) e Zona Oeste (ZO). Cada um destes grupos foi composto de vinte dentes decíduos doados, sendo dez de cada sexo biológico (Anexo G). A escolha dos dentes foi feita de forma aleatória, por meio de sorteio, a partir do sexo e da região onde a criança estuda.

3.6 Microbiópsia da superfície do esmalte dental

Para a extração dos metais da superfície do esmalte dental foi realizada a técnica de microbiópsia. Os dentes sorteados foram retirados do biorrepositório e passaram por uma profilaxia em ultrassom. Foram colocados em tubos Eppendorf® limpos com água MilliQ (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha), no equipamento de ultrassom (Unique UltraCleaner 1400, Indaiatuba, São Paulo, Brasil) em 3 sessões de 10 minutos. Após a profilaxia, os dentes foram secos com gaze dentro da Capela de Fluxo Laminar (Pachane PA400 ECO, Piracicaba, São Paulo, Brasil).

Os materiais utilizados para o preparo dos dentes decíduos foram todos limpos com Ácido Nítrico (HNO_3) antes de entrarem na capela de fluxo laminar.

Materiais utilizados para o procedimento são listados nas figuras que seguem. Na figura 4, alicate perfurador de dique de borracha Wilcos Stainless; tesoura reta Erwin Guth® 14cm e pinça algodão Wilcox Stainless 15cm; na figura 5, fita Mágica® Scotch® 3M® 19mm x 20m; na figura 6, micropipetas monocalal automáticas de 10 - 200ul Eppendorf® Research Plus e 0,5 - 10ul HTL; na figura 7, ponteiras Ultracomicro Universal 0,5 – 2ul pré- esterilizado Axygen Scientific Inc. e epT.I.P.S.® 2 – 200ul Eppendorf® AG; e nas figuras 8 e 9, tubos Falcon® de 50ml 30 x 115mm;

Figura 5 - Tesoura reta, pinça algodão e alicate perfurador de dique de borracha.

Fonte: Próprio autor.

Figura 4 - Fita Mágica Scotch 3M 19mmx20m.

Fonte: Próprio autor.

Figura 6 - Micropipetas monocanal automáticas.

Fonte: Próprio autor.

Figura 7 - Ponteira universal de 0,5 a 2 μ L, à esquerda, e ponteira ep.T.I.P.S. de 2 a 200 μ L, à direita.

Fonte: Próprio autor.

Figura 9 - Tubo Falcon contendo a substância para microbiópsia.

Fonte: Próprio autor.

Figura 8 - Tubo Falcon contendo Ácido Nítrico a 10%.

Fonte: Próprio autor.

3.7 Preparo das soluções

3.7.1 Preparo do Glicerol a 70%

Foram preparados 50 ml contendo 17,6 ml de Glicerol a 99% (v/v) e adicionado a 3,64 ml de Água Milli-Q.

3.7.2 Preparo da solução para a microbiópsia

Foram preparados 52 ml de solução para a realização do ataque ácido da microbiópsia contendo 21,24 ml de glicerol a 70%, preparado anteriormente e 30,76 ml de Ácido Clorídrico (HCl) bidestilado. Após o preparo obtivemos a quantidade de 52 ml de HCl a 1,6N em Glicerol a 70%.

3.8 Procedimento da microbiópsia

- I. Em tubos Eppendorf® livres de metais foram acrescentados 200 microlitros (μL) de água MilliQ (Figura 10).
- II. Foram preparadas Fitas Mágicas® Scotch® 3M® em pequenos quadrados (aproximadamente 1cm^2) e com o auxílio do perfurador de dique de borracha foi feita uma abertura no centro da fita (Figuras 11, 12 e 13).
- III. Com o auxílio da pinça de algodão, foi colocada a fita perfurada na face vestibular do dente incisivo (Figura 14), sem que tivesse contato da pinça com a região onde ocorreu a microbiópsia.
- IV. Foram colocados 5 μL da solução para microbiópsia na perfuração (Figura 15 e 16) por 20 segundos (Figura 17) e sugados novamente com a pipeta (Figura 18).
- V. Foi colocada a solução em um dos tubos Eppendorf® com 200 μL de água Milli-Q (volume final de aproximadamente 205 μL), identificado com o número da criança (Figura 19).
- VI. Os tubos foram identificados o código já cadastrado das crianças.

Foi realizada a coleta de uma segunda microbiópsia para futuras análises:

- I. Com o auxílio de outra ponteira, foram colocados outros 5 μ L da solução para microbiópsia por 10 segundos na perfuração e sugados novamente na pipeta.
- II. Foi colocado em outro tubo Eppendorf® com 200 μ L de água MilliQ.
- III. Foram aplicados na perfuração 5 μ L de água Milli-Q, sugados novamente na pipeta e colocados no segundo tubo utilizado (volume final de aproximadamente 210 μ L), identificado com o número da criança “B”.

Figura 10 - Adição de 200 μ L de Água Mili-Q em tudo de 2ml.

Fonte: Próprio autor.

Figura 11 - Preparo da perfuração da fita

Fonte: Próprio autor.

Figura 12 - Fita mágica no processo de perfuração pelo alicate na região central.

Fonte: Próprio autor.

Figura 13 - Fita Mágica 3M já perfurada na região central.

Fonte: Próprio autor.

Figura 14 - Fita Mágica 3M sendo colada na superfície vestibular do dente decíduo.

Fonte: Próprio autor.

Figura 15 - Adição da solução para a microbiópsia na perfuração da fita na superfície vestibulares do dente

Fonte: Próprio autor.

Figura 16 - Ponteira adicionando 5uL da solução para microbiópsia na superfície do dente decíduo.

Fonte: Próprio autor.

Figura 17 - Gota da solução que é formada na perfuração da Fita Mágica 3M, em contato com a superfície vestibular do dente.

Fonte: Próprio autor.

Figura 18 - Pipeta sendo utilizada para sugar a microbiópsia após 20 segundos.

Fonte: Próprio autor.

Figura 19 - Adição da solução após a microbiópsia em seu respectivo tubo Eppendorf com 200uL de H₂O Milli-Q.

Fonte: Próprio autor.

Figura 20 - Lavagem do dente com Água Milli-Q após o processo de microbiópsia.

Fonte: Próprio autor.

Figura 21 - Secagem do dente após lavagem para armazenamento no biorrepositório.

Fonte: Próprio autor.

3.9 Análise em Espectrometria de Massas em Plasma Indutivamente Acoplado

A análise da presença de metais da superfície do esmalte dos dentes decíduos foi realizada no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP) sob supervisão do Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior com o auxílio do equipamento de Espectrometria de Massas em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS, *Inductively Coupled Plasma – Mass Spectrometry*, Nexlon, Perkin Elmer, Norwalk, CT, EUA).

As análises de Cálcio (Ca) e Hg foram realizadas em solução monoelementar, ou seja, análise realizada separadamente das outras, enquanto Mn, Zn, As, Pb e Cd foram em solução multielementar.

As curvas de calibração do equipamento foram de 20 a 200 ppm para Cálcio, 2 a 20 ppb para Manganês, Arsênio, Cádmio, Chumbo e Mercúrio e 50 a 200 ppb para Zinco, já que o mesmo é presente em maior abundância no organismo.

Figura 22. ICP-MS Nexlon Perkin Elmer utilizado para as análises

Fonte: Perkin Elmer, disponível em <<https://www.perkinelmer.com/category/icp-mass-spectrometry-icp-ms-instruments>>

3.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *Minitab® Statistical Software*, onde foi avaliada a distribuição dos grupos e feita as correlações devidamente indicadas a cada um deles.

Referente à campanha “Doe Seu Dentinho”, foram realizadas análises descritivas.

Para as análises dos grupos quanto a concentração de metais foi realizada inicialmente o teste de normalidade para se saber se as amostras possuem distribuição normal. Análises descritivas também foram atribuídas aos grupos.

A análise da diferença na concentração dos metais nas zonas da cidade e por sexo foi realizada com o teste não-paramétrico bicaudal de Mann-Whitney e para a correlação entre os metais na cidade foi utilizada a Correlação de Spearman.

4 RESULTADOS

4.1 Análise sobre as zonas da cidade e sua divisão geográfica.

A cidade de Ribeirão Preto – SP foi dividida em 4 zonas principais conforme a divisão geográfica da cidade, incluindo o distrito de Bonfim Paulista. A divisão foi realizada para facilitar a comparação da concentração de metais encontrada nos dentes decíduos das crianças estudantes em cada região.

Figura 23 - Divisão de Ribeirão Preto – SP conforme suas zonas regionais.

Fonte: Prefeitura Municipal de Ribeirão Preto, disponível em
<https://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/porta/planejamento/mapas-do-municipio>

Assim, como a cidade foi dividida em regiões, sabe-se que a presença de indústrias de diversas categorias que podem influenciar na presença de metais no ar, solo e água. A lei nº 3928 de 10 de junho de 1981 classifica as indústrias da cidade em quatro diferentes grupos, conforme o Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação das indústrias da cidade de Ribeirão Preto - SP conforme sua nocividade e perigo para a população.

Classificação das indústrias conforme sua nocividade	
Grupo I: Perigosas (GI)	Riscos de explosões, incêndios, trepidações e produção de gases, poeiras, exalações e resíduos danosos à saúde.
Grupo II: Nocivas (GII)	Produção de gases, poeiras, exalações e resíduos prejudiciais à saúde.
Grupo III: Incômodas (GIII)	Ruídos, trepidações, gases, poeiras e exalações.
Grupo IV: Inócuas (GIV)	Não causam incômodo ou ameaça à saúde.

Fonte: Ribeirão Preto, 1981

Além da citada lei classificar as indústrias, ela também distribui as principais zonas industriais da cidade em quatro zonas, conforme os grupos de indústrias localizados nelas:

- I. Zonas Industriais Mistas;
 - a. ZIM.1: Vila Virgínia (ZS);
 - b. ZIM.2: Lagoinha (ZL);
 - c. ZIM.3: Jardim Aeroporto e Parque Industrial Tanquinho (ZN);
 - d. ZIM.4: Jardim Jandaia (ZN);
- II. Zonas Industriais Exigentes;
 - a. ZIE.1: Parque Industrial Coronel Quito Junqueira (ZN);
- III. Zonas Industriais Marginais;
 - a. ZIMA.1: Via Anhanguera – SP 330 (ZL);
 - b. ZIMA.2: Via Serrana – SP 333 (ZL);
 - c. ZIMA.3: Anel Viário – Contorno Norte (ZN);
 - d. ZIMA.4: Guataparã – SP 255 (ZS);
- IV. Distrito Industrial de Ribeirão Preto;
 - a. Distrito Industrial de Ribeirão Preto (ZN).

Cada grupo de indústria pode se instalar somente em zonas específicas da cidade. O grupo GI pode se instalar somente no DIRP e ZIMA.4; o GII, somente ZIE.1, ZIMA.4 e o DIRP; O GIII, somente zonas industriais (mistas, exigentes e marginais) e o DIRP; e o GIV, qualquer região urbana da cidade.

O mapa cartográfico (Figura 24) ilustra de forma mais compreensível a localização de cada zona industrial da cidade conforme a legislação citada. As cores são representações da região onde a zona industrial é localizada (vermelho – zona norte, azul – zona sul, verde – zona leste, não existe zona industrial na zona oeste).

A contaminação por metais pesados é um fator diretamente associado as condições socioeconômicas. É visível, ao se conhecer a cidade, que a diferença existente entre as zonas é maior que apenas geográfica. A desigualdade social é nitidamente vista, principalmente quando comparada a zona norte ao restante da cidade, assim como sua distribuição industrial.

Figura 24 - Mapa cartográfico da cidade com a localização das principais zonas industriais.

Fonte: Prefeitura da Cidade de Ribeirão Preto, disponível em
<<https://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/geoprocessamento/q28/ol/q2803001ol.php>>

4.2 Estatística descritiva da campanha “Doe Seu Dentinho”

Para a realização da campanha “Doe Seu Dentinho” foram feitos contatos com um total de 88 escolas, pessoalmente, por meio telefônico ou e-mail. Dentre elas, a diretoria e/ou coordenação de 29 permitiram que a campanha fosse realizada com seus alunos e profissionais. Como resultados da campanha um total de 507 dentes decíduos foram coletados, pois muitas doaram mais de um dente. Os gráficos que seguem são referentes as análises descritivas da campanha de coleta de dentes realizada entre maio de 2018 e de março de 2019.

As participantes da campanha foram divididas entre públicas e particulares, onde 55% foram de escolas públicas e 45% escolas particulares. Quando relacionado à quantidade de crianças participantes, 44,7% são de escolas públicas e 55,3% de particulares. Do total de dentes doados, 221 (43,6%) são de escolas públicas e 286 (56,4%) de escolas particulares.

Conforme o gráfico A (Gráficos 1), a quantidade de escolas públicas e particulares participantes de acordo com a região onde está localizada, somente na zona sul é vista uma diferença entre as doações.

O gráfico B (Gráficos 1) indica a relação entre o total de crianças participantes por região e sexo biológico das mesmas. Pouco foi a diferença entre o sexo masculino e feminino, exceto na zona norte onde do total de 63 crianças, 24 são do sexo masculino e 39 do sexo feminino.

O total de crianças participantes por região é indicado no gráfico C (Gráficos 1). As zonas norte, sul e oeste tiveram uma quantidade de crianças aproximada, respectivamente 63, 55 e 44, conforme Gráfico D (Gráficos 1). Diferente da zona leste, onde 101 crianças participaram. A diferença entre a participação das crianças conforme a zona em que estudam, com o destaque da zona leste, se dá por diversos fatores. A região leste possui uma maior distribuição geográfica, possuindo assim um maior número de escolas. Além disso, tivemos o empenho de uma escola particular da região para que o maior número de crianças participasse da campanha doando o maior número de dentes possível.

A quantidade de dentes doados possui relação direta com a quantidade de crianças participantes de cada zona, exceto na zona norte, onde do total de 63 crianças, 111 dentes foram doados. Diferente das outras regiões, onde na zona sul 109 dentes foram doados por 63 crianças, zona leste 201 dentes de 101 crianças e

zona oeste 86 dentes de 44 crianças. Tal diferença pode estar relacionada com a atenção das famílias para com a escola onde seus filhos estudam.

Os gráficos E e F (Gráficos 1) indicam a quantidade de dentes doados por sexo biológico por região e por tipo de escola, pública e privada. É possível observar que nas escolas privadas não existem grandes diferenças entre a quantidade de dentes doados por sexo, diferentes das escolas públicas. Nas escolas públicas, na zona leste a quantidade de doadores do sexo masculino foi maior que feminino, onde do total de 59 dentes doados, 38 são do sexo masculino e 21 do sexo feminino; e na zona oeste, mais doadores do sexo feminino, do total de 24 dentes doados, 8 são do sexo masculino e 16 do sexo feminino.

Gráficos 1 - Análise descritiva da campanha "Doe Seu Dentinho".

Fonte: Próprio autor.

4.3 Concentração de metais neurotóxicos

Após a análise por ICP-MS no Laboratório de Toxicologia e essencialidade de Metais, os dados obtidos foram apresentados em mg/g para o Cálcio (Ca) e em µg/g para os metais (Mn, Zn, As, Cd, Pb e Hg).

Para que a concentração dos metais na superfície do esmalte dental fosse apresentada, foi necessário inicialmente saber a massa de esmalte obtida por meio da microbiópsia. Para isso a medida de Ca em ppm obtida foi utilizada para saber a massa total. Sabe-se que 37% do esmalte dental é formado por Ca (BRUDEVOLD et al., 1956), conforme citado anteriormente, então por meio da quantidade obtida por ICP-MS, foi possível calcular a massa total do esmalte.

Sabendo-se a massa do esmalte obtida por meio da microbiópsia, para se calcular a concentração do metal em µg/g (exceto Zn, expresso em mg/g) foi realizada a razão entre a quantidade obtida do metal pela massa do esmalte.

Assim, foi possível identificar a concentração do metal na superfície do esmalte dental das crianças. A identificação foi realizada de forma individual, sendo a massa do esmalte dental de cada criança analisada (Anexo I).

O teste de normalidade foi aplicado com o auxílio do *Minitab® Statistical Software*, indicando que não existe distribuição normal para nenhum dos resultados obtidos, utilizando assim de análises não-paramétricas bicaudais. Além disso, o software foi utilizado para a análise estatística de correlação entre os metais e entre os metais e a média de nota dos alunos.

As análises estatísticas descritivas das concentrações de metais na superfície do esmalte dental das crianças é mostrado, referente à toda cidade de Ribeirão Preto, na Tabela 4.

Tabela 4 - Estatísticas descritivas da concentração (em µg/g de esmalte) dos metais na cidade de Ribeirão Preto.

Variável	N	Média	DesvPad	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Mn	80	79,7	77,9	14,8	31,7	48,5	89,4	387,5
Zn	80	3.829,0	2.757,0	1.127,0	2.444,0	3.005,0	4.097,0	17.494,0
As	80	751,0	1180,0	50,0	317,0	476,0	727,0	8.522,0
Cd	80	5,4	7,8	0,5	1,5	2,4	5,1	40,9
Pb	80	110,7	103,8	20,5	43,6	78,4	130,4	513,5
Hg	80	28,9	60,3	3,7	8,3	13,1	21,5	435,3

Fonte: Próprio autor.

As análises estatísticas descritivas também foram realizadas para a concentração de cada metal por zona da cidade. A Tabela 5 mostra a concentração de Manganês; a Tabela 6 de Zinco; a Tabela 7 de Arsênio; a Tabela 8 de Cádmio; a Tabela 9 de Chumbo; e a Tabela 10 de Mercúrio.

Tabela 5 - Estatísticas descritivas da concentração (em µg/g) de Manganês por zonas de Ribeirão Preto.

Zona	N	Média	DesvPad	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Norte	20	86,5	82,0	25,5	32,5	69,2	88,0	387,5
Sul	20	74,4	77,1	19,8	36,2	44,7	90,7	343,3
Leste	20	101,8	89,1	21,7	33,7	70,6	138,4	385,2
Oeste	20	56,1	58,8	14,8	26,5	33,2	61,3	258,1

Fonte: Próprio autor.

Tabela 6 - Estatísticas descritivas da concentração (em µg/g) de Zinco por zonas de Ribeirão Preto.

Zona	N	Média	DesvPad	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Norte	20	3.579	2.003	2.165	2.385	2.966	3,983	10.861
Sul	20	3.851	3.340	1.915	2.499	2.987	3,648	17.494
Leste	20	4.703	3.168	2.383	2.601	3.241	5,052	13.307
Oeste	20	3.182	2.257	1.127	1.691	2.647	3,361	11.076

Fonte: Próprio autor.

Tabela 7 - Estatísticas descritivas da concentração (em µg/g) de Arsênio por zonas de Ribeirão Preto.

Zona	N	Média	DesvPad	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Norte	20	890	1263	238	321	553	846	6004
Sul	20	934	1797	255	372	527	630	8522
Leste	20	703	762	153	289	478	803	3396
Oeste	20	479	497	50	169	324	648	2083

Fonte: Próprio autor.

Tabela 8 - Estatísticas descritivas da concentração (em µg/g) de Cádmio por zonas de Ribeirão Preto.

Zona	N	Média	DesvPad	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Norte	20	7,3	10,2	0,1	1,8	2,7	8,1	40,9
Sul	20	7,2	9,9	0,8	1,6	2,4	11,2	36,0
Leste	20	4,3	4,0	1,0	2,2	2,7	4,8	17,6
Oeste	20	2,9	3,6	0,5	0,9	1,5	3,1	15,4

Fonte: Próprio autor.

Tabela 9 - Estatísticas descritivas da concentração (em µg/g) de Chumbo por zonas de Ribeirão Preto.

Zona	N	Média	DesvPad	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Norte	20	129,4	122,5	28,8	44,6	93,7	145,2	447,7
Sul	20	103,1	110,2	27,8	37,3	53,6	101,9	437,5
Leste	20	113,5	107,2	29,5	50,1	88,0	149,8	513,5
Oeste	20	96,9	74,4	20,5	38,5	81,1	123,6	344,3

Fonte: Próprio autor.

Tabela 10 - Estatísticas descritivas da concentração (em µg/g) de Mercúrio por zonas de Ribeirão Preto.

Zona	N	Média	DesvPad	Mínimo	Q1	Mediana	Q3	Máximo
Norte	20	34,9	57,5	7,0	8,4	16,4	27,1	257,7
Sul	20	35,7	94,3	6,9	9,3	12,7	18,1	435,3
Leste	20	29,9	46,9	6,3	7,6	15,9	25,7	208,1
Oeste	20	15,4	21,5	3,7	5,8	8,6	14,7	101,5

Fonte: Próprio autor.

Os Gráficos 2 ilustram por meio de gráficos em *box plot* (diagrama de caixa) a relação entre a concentração de metais encontrada por zona. Os gráficos facilitam a visualização da mediana, do quartil 1 e 3 e valor mínimo e máximo encontrados.

Os gráficos *box plot* referentes as concentrações encontradas na cidade de Ribeirão Preto são apresentados nos Gráficos 3. Observa-se em todos os gráficos (Gráficos 2 e 3) a presença de diversos *outliers*, que no caso são crianças nas quais as concentrações encontradas são discrepantes.

Gráficos 2 - Box plot das concentrações dos metais (em $\mu\text{g/g}$) por região (exceto Zn, em mg/g).

Fonte: Próprio autor.

Gráficos 3 - *Box plot* das concentrações dos metais em $\mu\text{g/g}$ na cidade de Ribeirão Preto (exceto Zn, em mg/g).

Fonte: Próprio autor.

Para a análise da diferença existente na concentração de metais entre as regiões foi utilizado o teste não-paramétrico bicaudal de Mann-Whitney. É possível verificar a diferença da mediana entre algumas regiões da cidade, onde $p < 0,05$ indica significância. A diferença entre as concentrações encontradas na ZO em comparação com as outras zonas da cidade são significantes para Mn, na ZN ($p < 0,047$) e ZL ($p < 0,034$); Cd, na ZN ($p < 0,029$) e ZL ($p < 0,019$); Zn, na ZL ($p < 0,044$); As, na ZS ($p < 0,022$); e Hg na zona ZN ($p < 0,024$) e ZS ($p < 0,032$), conforme Tabela 11.

Tabela 11 - Diferença da concentração de metais nos dentes decíduos por região da cidade.

Manganês				Cádmio			
	ZN	ZS	ZL		ZN	ZS	ZL
ZS	0,351			ZS	0,598		
ZL	0,756	0,273		ZL	0,818	0,617	
ZO	0,047*	0,14	0,034*	ZO	0,029*	0,126	0,019*
Zinco				Chumbo			
	ZN	ZS	ZL		ZN	ZS	ZL
ZS	0,86			ZS	0,273		
ZL	0,148	0,262		ZL	0,968	0,298	
ZO	0,208	0,229	0,044*	ZO	0,561	0,473	0,695
Arsênio				Mercúrio			
	ZN	ZS	ZL		ZN	ZS	ZL
ZS	0,925			ZS	0,617		
ZL	0,457	0,409		ZL	0,617	0,715	
ZO	0,047	0,022*	0,114	ZO	0,024*	0,032*	0,057

Fonte: Próprio autor.

Não existe diferença significativa nas concentrações de Chumbo encontradas nas diferentes zonas da cidade. Estes dados não indicam apenas que existe uma concentração semelhante entre as zonas, mas que a contaminação pelo metal é onipresente na cidade.

Os Gráficos 4 e a Tabela 12 indicam onde existe diferença significativa, onde $p < 0,05$, entre a concentração de metais nos dentes de crianças do sexo masculino e feminino. Não é significativa a diferença apenas entre a concentração de Zinco e Cádmio.

Gráficos 4 - Gráficos em barra com a diferença entre as concentrações dos metais em ppb (exceto Zn, em ppm) analisados entre crianças do sexo masculino e feminino.

Fonte: Próprio autor.

Tabela 12 - Mediana das concentrações dos metais em µg/g (exceto Zn, em ppm) por sexo biológico.

Metal	Masculino	Feminino	p-value
Manganês	63,2	44,1	0,027*
Zinco	2,8	3,1	0,958
Arsênio	573,7	367,0	0,045*
Cádmio	2,5	2,4	0,51
Chumbo	76,9	81,9	<0,000*
Mercúrio	17,2	8,9	<0,000*

Fonte: Próprio autor.

Tabela 13 - Diferença da mediana entre as concentrações dos metais em crianças do sexo masculino e feminino por região da cidade.

Manganês (µg/g)				Cádmio (µg/g)			
	Masculino	Feminino	p-value		Masculino	Feminino	p-value
Zona Norte	78,93	64,17	0,273	Zona Norte	4,95	5,03	0,678
Zona Sul	33,20	13,31	0,045*	Zona Sul	3,05	1,75	0,623
Zona Leste	58,46	41,43	0,064	Zona Leste	2,67	2,28	0,273
Zona Oeste	64,75	37,29	0,85	Zona Oeste	2,46	1,52	0,85

Zinco (mg/g)				Chumbo (µg/g)			
	Masculino	Feminino	p-value		Masculino	Feminino	p-value
Zona Norte	3,47	3,01	0,345	Zona Norte	93,74	52,78	0,571
Zona Sul	37,72	2,03	0,734	Zona Sul	105,37	65,64	0,734
Zona Leste	2,63	29,87	0,473	Zona Leste	81,52	59,04	0,307
Zona Oeste	3,24	3,29	0,076	Zona Oeste	69,88	113,38	0,212

Arsênio (µg/g)				Mercúrio (µg/g)			
	Masculino	Feminino	p-value		Masculino	Feminino	p-value
Zona Norte	744,49	590,45	0,045*	Zona Norte	22,80	16,59	0,011*
Zona Sul	573,66	262,61	0,089	Zona Sul	24,66	9,90	0,009*
Zona Leste	349,17	429,03	0,001*	Zona Leste	8,49	10,23	0,026*
Zona Oeste	373,22	329,30	0,678	Zona Oeste	9,53	7,61	0,623

Fonte: Próprio autor.

Os grupos formados para a análise da concentração dos metais no esmalte dental eram divididos por zona da cidade e o sexo biológico das crianças, resultando em 8 grupos. A Tabela 13 indica o resultado da análise da diferença das medianas entre as concentrações de tais grupos (Anexo G). A diferença significativa entre os sexos das crianças por zona da cidade é vista na concentração de Manganês da zona sul; de Arsênio das zonas norte e leste; e de Mercúrio das zonas norte, sul e leste.

4.4 Correlação entre a concentração dos metais.

Muitas vezes é possível verificar uma correlação entre a exposição de diversos metais, assim como a coexposição pode levar a efeito aditivo ou sinérgico, tornando sua toxicidade maior.

A análise estatística utilizada para verificar a correlação foi a Correlação de Spearman, uma vez que os dados não mostraram distribuição normal. Os gráficos de dispersão estão disponíveis como Anexo H. A Tabela 14 indica a correlação entre a concentração dos metais na cidade de Ribeirão Preto, onde $p < 0,05$ indica significância na correlação.

Tabela 14 - Correlação de Spearman das concentrações encontradas em Ribeirão Preto.

	Manganês	Zinco	Arsênio	Cádmio	Chumbo
Zinco	0,61 $p < 0,001^*$				
Arsênio	0,662 $p < 0,001^*$	0,631 $p < 0,001^*$			
Cádmio	0,668 $p < 0,001^*$	0,612 $p < 0,001^*$	0,625 $p < 0,001^*$		
Chumbo	0,573 $p < 0,001^*$	0,53 $p < 0,001^*$	0,523 $p < 0,001^*$	0,613 $p < 0,001^*$	
Mercúrio	0,751 $p < 0,001^*$	0,691 $p < 0,001^*$	0,855 $p < 0,001^*$	0,728 $p < 0,001^*$	0,505 $p < 0,001^*$

Fonte: Próprio autor.

As tabelas que seguem (Tabelas de 15 a 18) indicam a correlação entre as concentrações dos metais por zona da cidade, onde $p < 0,05$ indica significância da correlação. Avaliar a correlação entre as concentrações nas zonas da cidade é fundamental para se compreender a quais metais as crianças da região estão mais expostas.

Tabela 15 - Correlação de Spearman das concentrações encontradas na zona norte.

	Manganês	Zinco	Arsênio	Cádmio	Chumbo
Zinco	0,647 $p=0,002^*$				
Arsênio	0,719 $p<0,001^*$	0,785 $p<0,001^*$			
Cádmio	0,492 $p=0,028^*$	0,556 $p=0,011^*$	0,478 $p=0,033^*$		
Chumbo	0,632 $p=0,003^*$	0,489 $p=0,029^*$	0,573 $p=0,008^*$	0,561 $p=0,010^*$	
Mercúrio	0,558 $p=0,011^*$	0,827 $p<0,001^*$	0,892 $p<0,001^*$	0,561 $p=0,010^*$	0,442 $p=0,051$

Fonte: Próprio autor.

Tabela 16 - Correlação de Spearman das concentrações encontradas na zona sul.

	Manganês	Zinco	Arsênio	Cádmio	Chumbo
Zinco	0,507 $p=0,023^*$				
Arsênio	0,611 $p=0,004^*$	0,537 $p=0,015^*$			
Cádmio	0,577 $p=0,008^*$	0,335 $p=0,148$	0,504 $p=0,024^*$		
Chumbo	0,49 $p=0,028^*$	0,546 $p=0,013^*$	0,337 $p=0,146$	0,8 $p<0,001^*$	
Mercúrio	0,755 $p<0,001^*$	0,498 $p=0,026^*$	0,91 $p<0,001^*$	0,579 $p=0,007^*$	0,379 $p=0,099$

Fonte: Próprio autor.

Tabela 17 - Correlação de Spearman das concentrações encontradas na zona leste.

	Manganês	Zinco	Arsênio	Cádmio	Chumbo
Zinco	0,484 $p=0,031^*$				
Arsênio	0,621 $p=0,003^*$	0,331 $p=0,154$			
Cádmio	0,798 $p<0,001^*$	0,702 $p=0,001^*$	0,559 $p=0,010^*$		
Chumbo	0,552 $p=0,012^*$	0,379 $p=0,099$	0,469 $p=0,037^*$	0,639 $p=0,002^*$	
Mercúrio	0,856 $p<0,001^*$	0,68 $p=0,001^*$	0,666 $p=0,001^*$	0,809 $p<0,001^*$	0,561 $p=0,010^*$

Fonte: Próprio autor.

Tabela 18 - Correlação de Spearman das concentrações encontradas na zona oeste.

	Manganês	Zinco	Arsênio	Cádmio	Chumbo
Zinco	0,678 <i>p=0,001*</i>				
Arsênio	0,513 <i>p=0,021*</i>	0,66 <i>p=0,002*</i>			
Cádmio	0,776 <i>p<0,001*</i>	0,731 <i>p<0,001*</i>	0,65 <i>p=0,002*</i>		
Chumbo	0,492 <i>p=0,028*</i>	0,547 <i>p=0,012*</i>	0,657 <i>p=0,002*</i>	0,659 <i>p=0,002*</i>	
Mercúrio	0,728 <i>p<0,001*</i>	0,687 <i>p=0,001*</i>	0,811 <i>p<0,001*</i>	0,866 <i>p=0,002*</i>	0,605 <i>p=0,005*</i>

Fonte: Próprio autor.

5 DISCUSSÃO

Nossos estudos são pioneiros nos estudos da concentração de metais na superfície do esmalte dental de crianças de Ribeirão Preto – SP, principalmente quanto ao Arsênio e Mercúrio.

Pesquisas anteriores realizadas na análise da concentração de Chumbo em dentes decíduos e permanentes de crianças, confirmam nossos achados de que crianças do sexo masculino estão mais suscetíveis à exposição quando comparadas com do sexo feminino (ALMEIDA et al., 2011). As diferenças nas concentrações dos metais Manganês, Arsênio, Chumbo e Mercúrio em crianças do sexo masculino e feminino é justificada pelo fato de o metabolismo e os diferentes hábitos, como brincar na rua, deixam os meninos mais suscetíveis à absorção ou exposição (SHAH et al., 2011).

Contradizendo os achados de Bauer (2017), que indicou que não existem diferenças significativas na exposição ao Manganês entre crianças do sexo masculino e feminino, nossa pesquisa indica que os meninos estão mais suscetíveis à tal exposição ($p=0,027$).

Pesquisadores da Polônia fizeram uma correlação entre a concentração de diversos metais em dentes decíduos e permanentes em indivíduos saudáveis e chegaram à conclusão de que o Chumbo, o Manganês e o Zinco são encontrados em quantidades significativamente diferentes entre os dentes decíduos e permanentes, diferentes do Cádmio, que é encontrado em quantidades semelhantes (FISCHER e WIECHU, 2009). Contradizendo tais achados, pesquisas indicam uma correlação significativa entre a presença de Chumbo em dentes decíduos e permanentes dos mesmos indivíduos (ALMEIDA et al., 2011), o que nos leva a crer que as crianças com alta quantidade de Chumbo nos dentes decíduos continuarão expostas, mais uma vez relevando a importância do *data disclosure* com a população.

Os dentes decíduos analisados durante a pesquisa foram dentes incisivos, porém eles não foram identificados como superiores, da maxila, ou inferiores, da mandíbula. Já que estudos não observaram diferença significativa entre a concentração de metais neurotóxicos nos dentes decíduos do maxilar e da mandíbula (FISCHER e WIECHU, 2009). Tais informações colaboram ainda mais com a coleta de dentes decíduos para pesquisas que envolvem metais neurotóxicos, o que facilita

a metodologia, uma vez que não há a necessidade da diferenciação entre dentes superiores e inferiores.

A Tabela 4 indica as diferenças entre as regiões quanto aos metais. É visível que a zona oeste possui uma menor concentração de metais na superfície do esmalte dental das crianças. A zona oeste não possui nenhuma zona industrial, conforme Figura 24. As regiões onde há a presença de uma maior concentração de metais são as que possuem zonas industriais, incluindo zonas do Grupo I e Grupos II (perigosas e nocivas, respectivamente). Sendo assim, a alta concentração destes metais nas crianças nas devidas regiões pode estar relacionada com a quantidade de indústrias nocivas, perigosas e incômodas, que podem liberar gases, poeiras e resíduos danosos à saúde, além dos riscos de explosões e incêndios (Quadro 1).

Com exceção da zona oeste, as outras zonas da cidade possuem altas concentrações de diversos metais. A zona norte possui uma grande concentração de Arsênio, Cádmio, Chumbo e Mercúrio; a zona sul de Arsênio, Cádmio e Mercúrio; e a zona leste de Manganês, Zinco e Chumbo.

A concentração de chumbo obtida é pouco abaixo das encontradas por Oliveira et al., 2017, analisadas nas regiões de Cubatão e Bertioga, ambas na região da baixada santista do Estado de São Paulo. A região de Cubatão é considerada uma das mais contaminadas por diversas substâncias do Estado, incluindo metais. A média nesta pesquisa na cidade de Ribeirão Preto é 110,7 µg/g, enquanto na região da baixada santista é de 168,8 µg/g (OLIVEIRA et al., 2017). Além do Chumbo, as concentrações de Cádmio também foram estudadas por Oliveira, 2017. A concentração média de Cádmio na baixada santista é de 12,2 µg/g, enquanto em Ribeirão Preto mostrou-se uma média de 5,4 µg/g. Apesar das concentrações encontradas no presente estudo estarem abaixo de Cubatão e Bertioga, a presença, mesmo que baixa, destes metais no esmalte dental é preocupante, pois tanto o Chumbo quanto o Cádmio são metais pesados não essenciais e que podem ser, além de neurotóxicos, carcinogênicos e causar diversas patologias nos sistemas respiratório, renal e hepático.

Segundo Almeida et al. (2011), a quantidade de metais, principalmente Chumbo, obtidos do esmalte dental por meio da primeira microbiópsia, método utilizado neste estudo, é maior quando comparado com a segunda microbiópsia. Confirmando os resultados obtidos com a primeira microbiópsia deste estudo.

Baseando-se em pesquisas anteriores, os níveis em que o Chumbo nos dentes é considerado alto são maiores que 396 µg/g (NEEDLEMAN et al., 1989). Os resultados obtidos em nossos estudos indicam que grande parte das crianças da cidade estão expostas a um alto índice de Chumbo, o que nos leva a considerar que as crianças de Ribeirão Preto possuem uma concentração maior que o considerado seguro em todas as zonas.

Outra pesquisa realizada na Polônia analisou a presença de Chumbo em dentes e a relação com a idade dos indivíduos participantes. A concentração do metal aumentou com o passar dos anos, principalmente pelo fato da capacidade do esmalte dental acumular substâncias, assim como outros tecidos mineralizados do corpo (FISCHER e WIECHUŁA, 2016). Tal informação aumenta a necessidade do desenvolvimento de medidas preventivas à exposição nas zonas da cidade onde as crianças estão mais contaminadas, no caso zonas norte e leste. A divulgação dos dados obtidos por meio de nossos estudos para a população geral, fora da comunidade escolar, auxiliará a conscientização sobre as contaminações e os efeitos nocivos dos metais. Levar as informações sobre a contaminação das crianças para a TV, rádio, jornais e diretamente nas escolas é fundamental para que isso aconteça.

Quando se pensa em utilizar o esmalte dental como biomarcador de exposição a metais ou diversas outras substâncias exógenas, é necessário entender que o processo de mineralização nos tecidos biológicos ocorre em diferentes velocidades (ALMEIDA et al., 2009; RENZ et al., 1997). Sendo assim, os resultados obtidos com a microbiópsia da superfície do esmalte dental permitiram compreender a quais metais as crianças estão expostas tanto atualmente quanto há anos. Almeida, 2011, correlacionou a presença de Chumbo no esmalte dental e no soro sanguíneo, observando uma relação significativa de exposição recente ao metal, uma vez que a meia-vida biológica no sangue é de aproximadamente 35 dias.

Existe muita resistência por parte das escolas em receber diversas pesquisas que podem ser benéficas para a saúde e a educação das crianças da região. Do total de escolas da cidade, foram sorteadas 88 (50% do total) para que o contato e a proposta de levar a campanha fosse apresentada. Apenas 29 escolas permitiram que a campanha fosse realizada, sendo a maioria na zona leste da cidade (Gráficos 1). Além disso, diversas escolas marcaram reuniões com diretores e coordenadores que deixaram de nos receber, fazendo com que parte do trabalho que seria desenvolvido não fosse realizado.

A criação de um biorrepositório com os dentes coletados é de suma importância para que novas pesquisas sejam desenvolvidas com as mesmas amostras, uma vez que ainda se tem muito a explorar. O esmalte dental é um excelente biomarcador para diversas substâncias exógenas, como metais e praguicidas, e endógenas, como proteínas e peptídeos. O processo de microbiópsia não causa desmineralização profunda do esmalte dental em dentes decíduos, o que garante que a extração dos metais foi realizada somente na superfície do esmalte dental conforme proposto pela pesquisa e não houve nenhum tipo de processo invasivo ou que causasse alguma alteração na estrutura da amostra (ALMEIDA et al., 2009).

Ainda são necessários muitos estudos para se conhecer e compreender sobre a concentração de alguns metais na superfície do esmalte dental, como o Mercúrio e o Arsênio. Pouco se tem sobre trabalhos na bibliografia pesquisada, porém são metais não essenciais e tóxicos que mesmo em baixa quantidade causam efeitos nocivos à saúde das crianças.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que os níveis das concentrações de metais encontrados no esmalte superficial dos dentes decíduos de crianças é um reflexo da exposição à diversos tipos de contaminantes, principalmente industriais. As regiões da cidade com maiores números de zonas e distritos industriais são as quais as crianças estão mais expostas. Crianças do sexo masculino são mais suscetíveis à exposição devido aos seus diferentes hábitos no dia-a-dia. A participação das escolas em campanhas e pesquisas que visam melhorar a educação é de suma importância, porém um desafio para os pesquisadores. A finalização destes estudos possibilitará que entre fevereiro e junho de 2020 seja realizada a divulgação dos dados obtidos para a comunidade escolar. A divulgação será feita por meio de palestras, folhetos explicativos e mídia social. A divulgação dos dados por meio do *data disclosure* (ou *open data*) é de extrema importância para a conscientização da população quanto à contaminação por metais pesados.

REFERÊNCIAS

- ABERNATHY, C. O.; CALDERON, R. L.; CHAPPELL, W. R. **Arsenic: Exposure and Health Effects**. Hong Kong:Chapman & Hall, 1997.
- ABERNETHY, D. R. et al. Metal impurities in food and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 27, n. 5, p. 750–755, 2010.
- AIZENMAN, E.; MASTROBERARDINO, P. G. Metals and neurodegeneration. **Neurobiology of Disease**, v. 81, n. 1, p. 1–3, 2015.
- ALMEIDA, G. R. C. De et al. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. **Environmental Research**, v. 104, n. 3, p. 337–345, 2007.
- ALMEIDA, G. R. C. et al. Analysis of enamel microbiopsies in shed primary teeth by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Polarizing Microscopy (PM). **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 18, p. 5169–5175, 2009.
- ALMEIDA, G. R. C. et al. Lead contents in the surface enamel of primary and permanent teeth, whole blood, serum, and saliva of 6- to 8-year-old children. **Science of the Total Environment**, v. 409, n. 10, p. 1799–1805, 2011.
- ASCHNER, M.; ASCHNER, J. L. Mercury neurotoxicity: Mechanisms of blood-brain barrier transport. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 14, n. 2, p. 169–176, 1990.
- ASCHNER, M.; LUKEY, B.; TREMBLAY, A. The Manganese Health Research Program (MHRP): Status report and future research needs and directions. **NeuroToxicology**, v. 27, n. 5, p. 733–736, 2006.
- AUNG, K. H. et al. Role of Environmental Chemical Insult in Neuronal Cell Death and Cytoskeleton Damage. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 38, n. 8, p. 1109–1112, 2016.
- AUTHIER, F. et al. Central nervous system disease in patients with macrophagic myofasciitis. **Brain**, v. 124, p. 974–983, 2001.
- BARBOSA, F. et al. A Critical Review of Biomarkers Used for Monitoring Human Exposure to Lead: Advantages, Limitations, and Future Needs. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 12, p. 1669–1674, 2005.
- BARRY, P. S. I. Concentrations of lead in the tissues of children. **British Journal of Industrial Medicine**, v. 38, n. 1, p. 61–71, 1981.
- BELCOURT, A.; GILLMETH, S. EDTA Soluble Protein of Human Mature Normal Enamel. **Calcified Tissue International**, v. 231, p. 227–231, 1979.
- BJØRKLUND, G.; CHARTRAND, M. S.; AASETH, J. Manganese exposure and neurotoxic effects in children. **Environmental Research**, v. 155, n. February, p. 380–384, 2017.
- BLANC, P. D. The early history of manganese and the recognition of its neurotoxicity, 1837–1936. **NeuroToxicology**, v. 64, p. 5–11, 2018.
- BOUCHARD, M. F. et al. Low level exposure to manganese from drinking water and

cognition in school-age children. **Neurotoxicology**, v. 64, p. 110–117, 2018.

BRITO, J. A. A. et al. Grid search: An innovative method for the estimation of the rates of lead exchange between body compartments. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 7, n. 3, p. 241–247, 2005.

BRUDEVOLD, F., GARDNER, D. E., SMITH, F. A. The distribution of the fluoride in human enamel. **Journal of Dental Research**, v. 35, n. 3, p. 420–429, 1956.

BRUDEVOLD, F. et al. A study of zinc in human teeth. **Archives of Oral Biology**, v. 8, n. 2, p. 135–144, 1963.

CABAN-HOLT, A. et al. Neurodegenerative Memory Disorders : A Potential Role of Environmental Toxins. **Neurologic Clinics**, v. 23, p. 485–521, 2005.

CAETANO, T. et al. Risk assessment of methylmercury in pregnant women and newborns in the island of Madeira (Portugal) using exposure biomarkers and food-frequency questionnaires. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 82, n. 14, p. 833–844, 2019.

CALAMANDREI, G. et al. Pregnancy exposome and child psychomotor development in three European birth cohorts. **Environmental Research**, p. 1–10, 2019.

CARVALHO, C. F. et al. Elevated airborne manganese and low executive function in school-aged children in Brazil. **NeuroToxicology**, v. 45, p. 301–308, 2014.

CASSIDY-BUSHROW, A. E. et al. In utero metal exposures measured in deciduous teeth and birth outcomes in a racially-diverse urban cohort. **Environmental Research**, v. 171, p. 444–451, 2019.

CHEN, P. et al. Manganese homeostasis in the nervous system. **Journal of Neurochemistry**, v. 134, n. 4, p. 601–610, 2015.

CONCEPCIÓN, N.-R.; MÉNDEZ-ARMENTA, M.; RÍOS, C. Lead neurotoxicity: effects on brain nitric oxide synthase. **J Mol Hist**, v. 43, p. 553–563, 2012.

COOKMAN, G. R.; KING, W.; REGAN, C. M. Chronic Low-Level Lead Exposure Impairs Embryonic to Adult Conversion of the Neural Cell Adhesion Molecule. **Journal of Neurochemistry**, v. 49, n. 2, p. 399–403, 1987.

COSTA, L. G. Overview of Neurotoxicology. **Current Protocols in Toxicology**, v. 74, p. 11.1.1–11.1.11, 2017.

CRUICKSHANK, D. B. The Natural occurrence of zinc in teeth: some general considerations. **British Dental Journal**, v. 63, p. 395–399, 1937.

DADAR, M. et al. Neurotoxic effects of mercury exposure in dental personnel. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 124, p. 568–574, 2019.

DAVIDSON, I. C. **Clean Hands: Clair Patterson's crusade against environmental lead contamination**. Commack: Nova Science, 1999.

DESAI, V.; KALER, S. G. Role of copper in human neurological disorders. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 88, p. 855–858, 2008.

EGGERT, B. F. M.; ALLEN, G. A.; BURGESS, R. C. Amelogenins. Purification and Partial Characterization of Proteins From Developing Bovine Dental Enamel.

Biochemistry, v. 131, n. 3, p. 471–484, 1973.

EIMAR, H. et al. The role of enamel crystallography on tooth shade. **Journal of Dentistry**, v. 39, n. 3, p. e3–e10, 2011.

EIMAR, H. et al. Regulation of enamel hardness by its crystallographic dimensions. **Acta Biomaterialia**, v. 8, n. 9, p. 3400–3410, 2012.

FISCHER, A.; WIECHU, D. Concentrations of Metals in Maxilla and Mandible Deciduous and Permanent Human Teeth. **Biol Trace Elem Res**, v. 132, n. 1–3, p. 19–26, 2009.

FISCHER, A.; WIECHUŁA, D. Age-Dependent Changes in Pb Concentration in Human Teeth. **Biological Trace Element Research**, v. 173, n. 1, p. 47–54, 2016.

FRANKLIN, U. B.; BERLIN, D.-; GUTENBERG-UNIVERSITÄT, J. Incremental Lines in Root Cementum of Human Teeth: An Approach to Their Ultrastructural Nature by Microscopy. **Indian Journal of Dental Research**, v. 11, n. 4, p. 472–477, 1997.

FRAZZINI, V. et al. Oxidative stress and brain aging: Is zinc the link? **Biogerontology**, v. 7, n. 5–6, p. 307–314, 2006.

GERLACH, R. F. et al. Effect of lead on dental enamel formation. **Toxicology**, v. 175, n. 1–3, p. 27–34, 2002.

GLIMCHER, M. J.; FRIBERG, U. A.; LEVINE, P. T. The isolation and amino acid composition of the enamel proteins of erupted bovine teeth. **The Biochemical journal**, v. 93, n. 1, p. 202–210, 1964.

GOYER, R. A. Transplacental transport of lead. **Environmental Health Perspectives**, v. 89, p. 101–105, 1990.

GOYER, R. A. Results of lead research: Prenatal exposure and neurological consequences. **Environmental Health Perspectives**, v. 104, n. 10, p. 1050–1054, 1996.

GRAHAM, L. A. et al. Manganese(I) poly(mercaptoimidazolyl)borate complexes: spectroscopic and structural characterization of Mn... H–B interactions in solution and in the solid state. **Dalton Transactions**, n. 1, p. 171–180, 2005.

GUNTER, T. E. et al. An analysis of the effects of Mn²⁺ on oxidative phosphorylation in liver, brain, and heart mitochondria using state 3 oxidation rate assays. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 249, n. 1, p. 65–75, 2010.

HENSON, M. C.; CHEDRESE, P. J. Endocrine Disruption by Cadmium, a Common Environmental Toxicant with Paradoxical Effects on Reproduction. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 91, p. 383–393, 2004.

HILL, P. A.; ORTH, M. Bone remodeling. **Br J Orthod**, v. 25, n. 2, p. 101–7, 1998.

HU, S.; PARKER, J.; WRIGHT, J. T. Towards unraveling the human tooth transcriptome: The dentome. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–13, 2015.

JAISHANKAR, M. et al. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 7, n. 2, p. 60–72, 2014.

JENKINS, S. M.; EHMAN, K.; BARONE, S. Structure-activity comparison of organotin

species: Dibutyltin is a developmental neurotoxicant in vitro and in vivo.

Developmental Brain Research, v. 151, n. 1–2, p. 1–12, 2004.

JIANG, H. et al. Ordering of self-assembled nanobiominerals in correlation to mechanical properties of hard tissues. **Applied Physics Letters**, v. 86, n. 16, p. 1–3, 2005.

JIANG, L. F. et al. Impacts of Cd(II) on the conformation and self-aggregation of Alzheimer's tau fragment corresponding to the third repeat of microtubule-binding domain. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1774, n. 11, p. 1414–1421, 2007.

JOHNSON, N. E.; TENUTA, K. Diets and lead blood levels of children who practice pica. **Environmental Research**, v. 18, n. 2, p. 369–376, 1979.

JÚNIOR, F. B. et al. Toxicology of metals and metalloids. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 2–4, 2014.

KARKI, P. et al. Role of transcription factor yin yang 1 in manganese-induced reduction of astrocytic glutamate transporters: Putative mechanism for manganese-induced neurotoxicity. **Neurochemistry International**, v. 88, p. 53–59, 2015.

KERPER, L. E.; BALLATORI, N.; CLARKSON, T. W. Methylmercury transport across the blood-brain barrier by an amino acid carrier. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 262, n. 5, p. 31–5, 1992.

KHODER, M. I.; HASSAN, S. K.; EL-ABSSAWY, A. A. An evaluation of loading rate of dust, Pb, Cd, and Ni and metals mass concentration in the settled surface dust in domestic houses and factors affecting them. **Indoor and Built Environment**, v. 19, n. 3, p. 391–399, 2010.

LACRUZ, R. S. et al. Dental enamel formation and implications for oral health and disease. **Physiological Reviews**, v. 97, n. 3, p. 939–993, 2017.

LANPHEAR, B. P. et al. Low-level environmental lead exposure and children's intellectual function: An international pooled analysis. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 7, p. 894–899, 2005.

LI, W. C.; TSE, H. F. Health risk and significance of mercury in the environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 1, p. 192–201, 2015.

LIN, C. C. et al. In utero exposure to environmental lead and manganese and neurodevelopment at 2 years of age. **Environmental Research**, v. 123, p. 52–57, 2013.

LUCCHINI, R. G. et al. Neurocognitive impact of metal exposure and social stressors among schoolchildren in Taranto, Italy. **Environmental Health**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2019.

LUPARELLO, C.; SIRCHIA, R.; LONGO, A. Cadmium as a transcriptional modulator in human cells. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 75–82, 2011.

MANEA-KRICHTEN, M. et al. Comparative increases of lead and barium with age in human tooth enamel, rib and ulna. **Science of the Total Environment**, v. 107 (C), p. 179–203, 1991.

MARTINEZ-ZAMUDIO, R.; HA, H. C. Environmental epigenetics in metal exposure.

Epigenetics, v. 6, n. 7, p. 820–827, 2011.

MASON, L. H. et al. Pb neurotoxicity: Neuropsychological effects of lead toxicity. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–8, 2014.

MEGHJI, S. Bone remodeling. **Br Dent J**, v. 172, n. 6, p. 235–42, 1992.

MICHALKE, B.; FERNSEBNER, K. New insights into manganese toxicity and speciation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 28, n. 2, p. 106–116, 2014.

MILLAN, M. J. et al. Cognitive dysfunction in psychiatric disorders : characteristics , causes and the quest for improved therapy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 11, p. 141–168, 2012.

MIZUNO, D.; KAWAHARA, M. The molecular mechanisms of zinc neurotoxicity and the pathogenesis of vascular type senile dementia. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 11, p. 22067–22081, 2013.

MONTES-SANTIAGO, J. **The lead-poisoned genius: Saturnism in famous artists across five centuries**. 1. ed.: Elsevier B.V., 2013.

MORRIS, D. R.; LEVENSON, C. W. Neurotoxicity of Zinc. **Advances in Neurobiology**, v. 18, p. 303–312, 2017.

NASCIMENTO, J. L. M. et al. Methylmercury neurotoxicity & antioxidant defenses. **Indian Journal of Medical Research**, v. 128, n. 4, p. 373–382, 2008.

NEEDLEMAN, H. Lead Poisoning. **Annual Review of Medicine**, v. 55, n. 1, p. 209–22, 2004.

NEEDLEMAN, H. L. et al. Déficits in Psychologic and Classroom Performance of Children With Elevated Dentine Lead Levels. **N Engl J Med**, v. 320, n. 21, p. 1361–1367, 1989.

O'FLAHERTY, E. J. Physiologically based models for Bone-Seeking elements. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 131, n. 2, p. 297–308, 1995.

OKUDA, B. et al. Parkinsonism after acute cadmium poisoning. **Clinical Neurology and Neurosurgery**, v. 99, n. 4, p. 263–265, 1997.

OLIVEIRA, V. L. F. et al. Dental enamel as biomarker for environmental contaminants in relevant industrialized estuary areas in São Paulo, Brazil. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 16, p. 14080–14090, 2017.

ORLOFF, K.; MISTRY, K.; METCALF, S. Biomonitoring for environmental exposures to arsenic. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews**, v. 12, n. 7, p. 509–524, 2009.

PARK, R. M. Neurobehavioral deficits and parkinsonism in occupations with manganese exposure: A review of methodological issues in the epidemiological literature. **Safety and Health at Work**, v. 4, n. 3, p. 123–135, 2013.

POWELL, H. C.; NYERS, R. R.; LAMPERT, P. W. Changes in Schwann cells and vessels in lead neuropathy. **American Journal of Pathology**, v. 109, n. 2, p. 193–205, 1982.

- PRAKASH, C.; SONI, M.; KUMAR, V. Mitochondrial oxidative stress and dysfunction in arsenic neurotoxicity: A review. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 2, p. 179–188, 2016.
- QUINN, M. J. Factors affecting blood lead concentrations in the UK: Results of the EEC blood lead surveys, 1979 - 1981. **International Journal of Epidemiology**, v. 14, n. 3, p. 420–431, 1985.
- RABINOWITZ, M. B. Toxicokinetics of bone lead. **Environmental Health Perspectives**, v. 91, n. 5, p. 33–37, 1991.
- RABINOWITZ, M. B.; LEVITON, A.; BELLINGER, D. Relationships between serial blood lead levels and exfoliated tooth dentin lead levels: Models of tooth lead kinetics. **Calcified Tissue International**, v. 53, n. 5, p. 338–341, 1993.
- RANI, A. et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity : a review. **International Journal of Environmental Health Research**, v. 24, n. 4, p. 378–399, 2014.
- RAUH, V. A.; MARGOLIS, A. E. Research Review: Environmental exposures, neurodevelopment, and child mental health – new paradigms for the study of brain and behavioral effects. **Journal of Child Psychology and Psychiatry and Allied Disciplines**, v. 57, n. 7, p. 775–793, 2016.
- RIBEIRÃO PRETO. Prefeitura Municipal. Lei Municipal nº3928, de 10 de junho de 1981. Institui o zoneamento industrial do município de Ribeirão Preto. Disponível em < <http://www.ribeiraopreto.sp.gov.br/J321/pesquisa.xhtml?lei=20625>>. Acesso em: 19 nov. 2019.
- RODIER, P. M. Vulnerable periods and processes during central nervous system development. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 2, p. 121–124, 1994.
- ROSSIPAL, E.; KRACHLER, M.; LI, F. Investigation of the transport of trace elements across barriers in humans: studies of placental and mammary transfer. **Journal of Trace and Microprobe Techniques**, v. 18, n. 4, p. 1190–1195, 2000.
- ROTHENBURG, S. J. et al. Changes in serial blood lead levels during pregnancy. **Environmental Health Perspectives**, v. 102, n. 10, p. 876–880, 1994.
- SANTOS, A. et al. Methylmercury and brain development: A review of recent literature. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 38, p. 99–107, 2016.
- SEATON, A. Saturnism: An old story of poisoning. **Qjm**, v. 107, n. 6, p. 501–502, 2014.
- SENSI, S. L. et al. Zinc in the physiology and pathology of the CNS. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 10, p. 780–791, 2009.
- SEO, Y. A.; LI, Y.; WESSLING-RESNICK, M. Iron depletion increases manganese uptake and potentiates apoptosis through ER stress. **Neurotoxicology**, v. 38, p. 67–73, 2014.
- SHAH, F. et al. The influence of environmental exposure on lead concentrations in scalp hair of children in Pakistan. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 727–732, 2011.

SILBERGELD, E. K. Mechanisms of Lead Neurotoxicity, or Looking the Lamppost. **FASEB Journal**, v. 17, p. 3201–3206, 1992.

SOM, P. M.; MILETICH, I. Review of the Embryology of the Teeth. **Neurographics**, v. 8, n. 5, p. 369–393, 2018.

SPRAWSON, E. BURY, F. On the Chemical Evidences of the Organic Content of Human Enamel. **Royal Society**, v. 102, n. 719, p. 419–426, 1928.

SWARDFAGER, W. et al. Potential roles of zinc in the pathophysiology and treatment of major depressive disorder. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 37, n. 5, p. 911–929, 2013.

TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy Metals Toxicity and the Environment. v. 101, p. 1–30, 2012.

THEPPEANG, K. et al. Gender and race/ethnicity differences in lead dose biomarkers. **American Journal of Public Health**, v. 98, n. 7, p. 1248–1255, 2008.

TOMLJENOVIC, C. A. S. L. Aluminum in the central nervous system (CNS): toxicity in humans and animals, vaccine adjuvants, and autoimmunity. **Immunol Res**, v. 56, p. 304–316, 2013.

VELTHORST, E. et al. New Research Strategy for Measuring Pre- and Postnatal Metal Dysregulation in Psychotic Disorders. **Schizophrenia Bulletin**, v. 43, n. 6, p. 1153–1157, 2017.

WANG, B. et al. Cadmium and Its Epigenetic Effects. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 16, p. 2611–2620, 2012.

WANG, B.; DU, Y. Cadmium and Its Neurotoxic Effects. **Hindawi Publishing Corporation**, p. 1–12, 2013.

WASSERMAN, G. A. et al. Water manganese exposure and children's intellectual function in Araihaazar, Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 1, p. 124–129, 2006.

WASSERMAN, G. A. et al. Water arsenic exposure and intellectual function in 6-year-old children in Araihaazar, Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**, v. 115, n. 2, p. 285–289, 2007.

WASSERMAN, G. A. et al. Child intelligence and reductions in water arsenic and manganese: A two-year follow-up study in Bangladesh. **Environmental Health Perspectives**, v. 124, n. 7, p. 1114–1120, 2016.

WHO. Exposure to Mercury: A major public health concern. **Preventing Disease Through Healthy Environments**, p. 1–4, 2006.

WILLIAMS, M. et al. Toxicological Profile for Manganese. **Agency for Toxic Substances and Disease Registry**, n. September, p. 504, 2000.

WRIGHT, R. O.; BACCARELLI, A. Metals and Neurotoxicology. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2809–2813, 2007.

YAMAGUTI, P. M.; CABRAL, R. N. Developmental Defects of Enamel. **Pediatric Restorative Dentistry**, v. 2, p. 93–116, 2019.

ZHANG, J. et al. The Role of Autophagy Dysregulation in Manganese-Induced Dopaminergic Neurodegeneration. **Neurotoxicity Research**, v. 24, p. 478–490, 2013.

ZHOU, F. et al. Lead, cadmium, arsenic, and mercury combined exposure disrupted synaptic homeostasis through activating the Snk-SPAR pathway. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 163, p. 674–684, 2018.

ZONI, S.; LUCCHINI, R. G. Manganese exposure : cognitive , motor and behavioral effects on children : a review of recent findings. **Current Opinion in Pediatrics**, v. 25, n. 2, p. 255–260, 2013.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em pesquisa da FORP/USP;

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

ANEXO C – Termo de Doação dos Dentes;

ANEXO D – Cartaz da campanha “Doe Seu Dentinho”;

ANEXO E – Folder, frente e verso, da campanha “Doe Seu Dentinho”;

ANEXO F – Links para entrevistas de divulgação da pesquisa;

ANEXO G – Grupos experimentais;

ANEXO H – Gráficos de dispersão da Correlação de Spearman;

ANEXO I – Concentração de metais por amostra.

ANEXO A

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: "Análise da presença de metais no esmalte em dentes decíduos de crianças residentes em regiões distintas da cidade de Ribeirão Preto - SP: relações neurotóxicas e abertura de dados junto às comunidades escolares".

Pesquisador: Raquel Fernanda Gerlach

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 82840018.8.0000.5419

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.626.263

Apresentação do Projeto:

Os metais essenciais são onipresentes na crosta terrestre. Muitos metais não essenciais estão no subsolo e fazem parte de recentes tecnologias (<8.000 anos), caracterizando seu uso antrópico. A bioacumulação de metais não-essenciais torna preocupante quanto aos efeitos tóxicos que podem surgir, principalmente quando afetam o sistema nervoso.

A exposição a eles está associada a doenças neurológicas, de neurodesenvolvimento e também cognitivas, como de aprendizagem e emocionais. A influência destes metais em alterações estruturais e funcionais do sistema nervoso é a chamada neurotoxicidade.

A neurotoxicidade de metais no desenvolvimento fetal e infantil cresceu rapidamente (aumentando para níveis sem precedentes!). A Organização Mundial da Saúde (2006) reconhece que, de todas as doenças globais, mais de 11% são neurológicas e sabe-se também da influência dos metais na sua indução. O esmalte dos dentes decíduos (de leite) acumula certos metais, sendo assim um biomarcador confiável. O atual projeto visa analisar a quantidade de metais nos dentes decíduos das crianças da Coorte BRISA. A Coorte BRISA registrou 7568 crianças nascidas em Ribeirão Preto – SP em 2010. Um outro objetivo deste projeto é desenvolver uma estratégia de data disclosure e divulgar os dados obtidos da quantidade de metais encontrados nos dentes das crianças para as próprias crianças, seu pais, professores e comunidade. Isso permitirá discutir a toxicidade dos metais e a conscientização da possibilidade de prevenção à exposição em áreas urbanas.

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 2.626.263

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Correlacionar os níveis de metais nos dentes com a região da cidade onde a criança reside. Fazer a análise em subgrupo uma vez que será difícil analisar em todos os dentes coletados na cidade de Ribeirão Preto - SP.

Desenvolver as estratégias de data disclosure para divulgar de forma coletiva (sem divulgar nomes de crianças) os resultados de metais nas comunidades, possivelmente nas escolas, permitindo a crianças, pais e professores observar a variação de metais e outras variáveis em dentes de diferentes partes da cidade e comparar com os valores (a média e a mediana) das crianças da comunidade ou escola.

Discutir sobre o assunto e sobre as possíveis formas de prevenção de exposição à metais.

Objetivo Secundário:

Através das estratégias de data disclosure mostrar, com uso de simples experimentos, a quantidade de alguns metais neurotóxicos presentes no esmalte dos dentes de leite de crianças participante da Coorte BRISA com foco de atingir pais, alunos e profissionais da educação.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos pois, os dentes que serão utilizados são dentes decíduos, que caem de forma natural entre os 6 e 12 anos das crianças.

Benefícios:

Relacionar as regiões da cidade com mais índice de contaminação por diferentes metais neurotóxicos.- Abrir para a comunidade escolar, que inclui alunos, professores e pais, os dados da pesquisa, alertando sobre as influências da intoxicação por metais.

Conscientizar a comunidade científica da importância da abertura de dados junto à comunidade.

Permitir que os pais de crianças com altos níveis de Chumbo possam avaliar a quantidade deste metal em casa.

Conscientizar sobre os principais efeitos neurotóxicos de cada metal analisado.

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

USP - FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA USP - FORP/USP

Continuação do Parecer: 2.626.263

Mostrar através de prática em escolas que os dentes possuem a capacidade de mineralizar elemento químicos e que por isso podem ser usados em pesquisas e até áreas forense e paleontológicas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto visa analisar a quantidade de metais nos dentes deciduos de 7568 crianças da Coorte BRISA, nascidas em Ribeirão Preto – SP em 2010.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As recomendações do parecer anterior foram todas atendidas.

O Termo de Doação de Dentes de Leite foi adequado, enfatizando que os dentes serão doados para o Biobanco de Dentes Humanos da FORP/USP.

No Projeto de Pesquisa adicionado na Plataforma Brasil, foi corrigido o termo formação de um Biobanco de dentes para Biorrepositório.

Recomendações:

Aprovado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado conforme deliberado na 215ª Reunião Ordinária do CEP/FORP de 23/04/2018.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1057320.pdf	23/03/2018 10:09:55		Aceito
Outros	Doacao.pdf	23/03/2018 10:08:17	Raquel Femanda Gerlach	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	02/03/2018 13:47:29	Raquel Femanda Gerlach	Aceito
Outros	Citacao.pdf	01/02/2018 13:34:02	Raquel Femanda Gerlach	Aceito
Folha de Rosto	Folha.pdf	01/02/2018 13:31:27	Raquel Femanda Gerlach	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLE.pdf	01/02/2018 13:30:29	Raquel Femanda Gerlach	Aceito

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@fop.usp.br

**USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO
PRETO DA USP - FORP/USP**

Continuação do Parecer: 2.626.263

Ausência	TCLE.pdf	01/02/2018 13:30:29	Raquel Femanda Gerlach	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuência.pdf	01/02/2018 13:30:08	Raquel Femanda Gerlach	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Biobanco.pdf	01/02/2018 13:28:54	Raquel Femanda Gerlach	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	01/02/2018 13:28:29	Raquel Femanda Gerlach	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	01/02/2018 13:27:44	Raquel Femanda Gerlach	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 27 de Abril de 2018

Assinado por:
Simone Cecilio Hallak Regalo
(Coordenador)

Endereço: Avenida do Café s/nº

Bairro: Monte Alegre

CEP: 14.040-904

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3315-0493

Fax: (16)3315-4102

E-mail: cep@forp.usp.br

ANEXO B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa convidam _____
 _____ (nome da criança), filho de
 _____ (nome da mãe) a participar do estudo “Análise da
 presença de metais no esmalte em dentes decíduos de crianças residentes em regiões distintas da cidade de
 Ribeirão Preto – SP: relações neurotóxicas e abertura de dados junto às comunidades escolares”.

Assino este termo de consentimento livre e esclarecido como responsável pela criança sendo
 _____ (pai, mãe, avó, guardião, etc), e desta forma autorizo que o menor sob minha
 responsabilidade participe da pesquisa.

Justificativa: Para haver melhora no desenvolvimento das crianças, médicos, biólogos, dentistas, psicólogos, fonoaudiólogos, entre outros profissionais da saúde, realizam pesquisas sobre a saúde nos primeiros anos. Esse é o caso de nossa pesquisa, que visa saber a que agentes tóxicos a criança estava exposta no período pré-natal e ao nascer. Esta pesquisa é muito importante e se justifica porque se conhecermos os metais que podem influenciar no desenvolvimento nesses períodos, será possível atuar para proteger as crianças, prevenindo várias doenças que podem afetar seu aprendizado e desenvolvimento.

Objetivo: Avaliar os dentes de leite quanto a sua composição e sua possível relação com a presença de metais, comparando mais tarde os dados obtidos no dente com o desenvolvimento infantil verificado no estudo BRISA e também discutir resultados obtidos com as comunidades escolares.

Procedimento: Já no início desse estudo os pais e as crianças serão convidados a guardar os dentes de leite que forem perdidos naturalmente pela criança e posteriormente doá-los mediante um Termo de Doação de Dentes para o Biobanco da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP). Visto que toda criança perde 20 dentes de leite a partir dos cinco anos de idade, alguns destes dentes serão doados para o nosso estudo, sendo a seguir analisados para ver a presença de metais. No lugar dos dentes de leite nascem outros dentes, chamados permanentes.

Riscos: Não haverá utilização de qualquer tipo de procedimento que traga riscos aos participantes, pois pedimos a doação de dentes de leite que caem “sozinhos” (naturalmente, sem interferência de um profissional, na maioria dos casos), ou seja, anula qualquer possível risco à saúde do doador participante.

Benefícios: Os benefícios aos participantes do estudo serão saber se eles, crianças, foram expostos a níveis altos de metais durante o período de gestação e no nascimento. Se isso tiver ocorrido, poderemos fazer orientações sobre como lidar melhor com a situação e, se necessário, fazer encaminhamentos a profissionais que possam ajudar.

Esclarecimentos antes e durante a pesquisa sobre a metodologia: os pesquisadores prestam todos os esclarecimentos antes do início da pesquisa e podem ser chamados a qualquer momento, por telefone, e-mail ou pessoalmente, para prestar esclarecimentos sobre a pesquisa.

Liberdade de recusar ou retirar consentimento sem penalização: a criança e/ou seu responsável tem total liberdade para a qualquer momento DEIXAR de participar da pesquisa. Não há nenhuma punição para quem não quiser mais participar.

Garantia de sigilo e privacidade: esta pesquisa é científica e poderá ser publicada em jornais, revistas ou/e congressos científicos no país e no exterior, mantendo-se o SIGILO e respeitando-se o código de Defesa do Menor e do Adolescente. Isso quer dizer que o nome da criança ou o de seus responsáveis não será divulgado. Por se tratar de doação de dentes de leite já caídos não haverá nenhum gasto do participante, portanto não se faz necessário nenhum tipo de **ressarcimento**, uma vez que os sujeitos da pesquisa só doaram seus dentes e os pais/responsáveis deram autorização para uso dos dentes e dos dados de nascimento e seguimento da criança, que foram coletados no estudo BRISA, da FMRP no ano de 2010. Por se tratar da coleta de dentes de leite já caídos sem riscos à saúde, o risco de danos ao doador participante é muito baixo, porém há possibilidade de **indenização** diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Estou ciente de que esta pesquisa tem como responsável a Profª. Dra. Raquel Fernanda Gerlach (rfgerlach@forp.usp.br) telefone (16) 3315 4014 (FORP USP) e o pesquisador Renê Seabra Oliezer (reneseabrao@hotmail.com) telefone (16) 99153 7416/ 99708 6714 (FFCLRP /USP). Em caso de **insatisfações ou reclamações**, o participante poderá entrar em contato com o CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) da Faculdade de Odontologia da USP – Ribeirão Preto, sendo que seu nome será mantido em anonimato através do endereço: Av. do Café, sn, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP, bairro Monte Alegre, Ribeirão Preto, CEP: 14.040-904 ou telefones (16) 3315-0493 ou E-mail: cep@forp.usp.br. Horários de atendimento: segunda à sexta-feira das 13:30h as 17:30h (exceto feriados e pontos facultativos)

Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo e as dúvidas que tive foram respondidas pelos pesquisadores.

Este termo possui duas vias de igual teor, sendo que uma ficará sob a posse do doador participante.

_____, _____ de _____ de 2018.

Nome do pai/mãe/responsáveis

Pesquisador Renê Seabra Oliezer (assinatura, nome e CPF)

Prof. Dra. Raquel F. Gerlach (assinatura, nome e CPF)

ANEXO C***TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES DE LEITE***

Eu, _____, responsável por _____, nascido em _____, estou ciente da doação de _____ dentes de leite para o Biobanco de dentes humanos da FORP/USP para a realização da pesquisa “Análise da presença de metais no esmalte em dentes decíduos de crianças residentes em regiões distintas da cidade de Ribeirão Preto – SP: relações neurotóxicas e abertura de dados junto às comunidades escolares” realizada pelo Departamento de Psicobiologia da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP/USP) em parceria com a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP).

_____, _____ de _____ de 2018.

Nome e assinatura do responsável

Pesquisador Renê Seabra Oliezer (assinatura e CPF)

Prof. Dra. Raquel Fernanda Gerlach (assinatura e CPF)

ANEXO D

Campanha Doe Seu Dentinho

Para doar: leve seu dentinho para seu professor na escola!

Com 5 ou 6 anos as crianças começam a perder seus dentes de leite. Esses dentes podem revelar a exposição da criança a metais, principalmente ao Chumbo

Precisamos de uma grande quantidade de dentes de leite e da colaboração de todos os PAIS, PROFESSORES E CRIANÇAS para nossos estudos!

Departamento de Psicobiologia da FFCLRP/USP em Parceria com a FORP/USP e FMRP/USP

ANEXO E

Campanha Doe Seu Dentinho

Precisamos de dentes de leite de crianças nascidas em 2010 e 2011

Precisamos de uma grande quantidade de dentes de leite e da colaboração de todos os PAIS, PROFESSORES E CRIANÇAS, para nossas pesquisas!

Departamento de Psicobiologia da FFCLRP/USP em Parceria com a FORP/USP e FMRP/USP

Com 5 ou 6 anos, as crianças começam a perder seus dentes de leite.

Esses dentinhos podem revelar a exposição da criança a metais, como o Chumbo.

Para doar seu Dentinho de Leite como estes...

Basta levá-los até sua professora!

COLABORE

Acompanhem-nos através de nossa página:

facebook.com/doeseudentinho

Para quaisquer dúvidas:

reneseabra@usp.br e jeannemelo@usp.br

ANEXO F

Reportagem à Emissora EPTV:

<<https://globoplay.globo.com/v/6770774/>>

Reportagem à Emissora Record:

< <https://www.facebook.com/watch/?t=16&v=2211780425723677>>

ANEXO G

	Amostra	Sexo	Região	Escola		Amostra	Sexo	Região	Escola
Grupo 1	1	Masc	Norte	Pública	Grupo 5	41	Fem	Norte	Pública
	2	Masc	Norte	Pública		42	Fem	Norte	Pública
	3	Masc	Norte	Pública		43	Fem	Norte	Pública
	4	Masc	Norte	Pública		44	Fem	Norte	Pública
	5	Masc	Norte	Pública		45	Fem	Norte	Pública
	6	Masc	Norte	Particular		46	Fem	Norte	Particular
	7	Masc	Norte	Particular		47	Fem	Norte	Particular
	8	Masc	Norte	Particular		48	Fem	Norte	Particular
	9	Masc	Norte	Particular		49	Fem	Norte	Particular
	10	Masc	Norte	Particular		50	Fem	Norte	Particular
Grupo 2	11	Masc	Sul	Pública	Grupo 6	51	Fem	Sul	Pública
	12	Masc	Sul	Pública		52	Fem	Sul	Pública
	13	Masc	Sul	Pública		53	Fem	Sul	Pública
	14	Masc	Sul	Pública		54	Fem	Sul	Pública
	15	Masc	Sul	Pública		55	Fem	Sul	Pública
	16	Masc	Sul	Pública		56	Fem	Sul	Pública
	17	Masc	Sul	Particular		57	Fem	Sul	Pública
	18	Masc	Sul	Particular		58	Fem	Sul	Particular
	19	Masc	Sul	Particular		59	Fem	Sul	Particular
	20	Masc	Sul	Particular		60	Fem	Sul	Particular
Grupo 3	21	Masc	Leste	Pública	Grupo 7	61	Fem	Leste	Pública
	22	Masc	Leste	Pública		62	Fem	Leste	Pública
	23	Masc	Leste	Pública		63	Fem	Leste	Pública
	24	Masc	Leste	Pública		64	Fem	Leste	Pública
	25	Masc	Leste	Pública		65	Fem	Leste	Pública
	26	Masc	Leste	Particular		66	Fem	Leste	Particular
	27	Masc	Leste	Particular		67	Fem	Leste	Particular
	28	Masc	Leste	Particular		68	Fem	Leste	Particular
	29	Masc	Leste	Particular		69	Fem	Leste	Particular
	30	Masc	Leste	Particular		70	Fem	Leste	Particular
Grupo 4	31	Masc	Oeste	Pública	Grupo 8	71	Fem	Oeste	Pública
	32	Masc	Oeste	Pública		72	Fem	Oeste	Pública
	33	Masc	Oeste	Pública		73	Fem	Oeste	Pública
	34	Masc	Oeste	Pública		74	Fem	Oeste	Particular
	35	Masc	Oeste	Pública		75	Fem	Oeste	Particular
	36	Masc	Oeste	Particular		76	Fem	Oeste	Particular
	37	Masc	Oeste	Particular		77	Fem	Oeste	Particular
	38	Masc	Oeste	Particular		78	Fem	Oeste	Particular
	39	Masc	Oeste	Particular		79	Fem	Oeste	Particular
	40	Masc	Oeste	Particular		80	Fem	Oeste	Particular

ANEXO H

Matriz de Dispersão - Zona Norte
Correlação de Spearman

Matriz de Dispersão - Zona Sul
Correlação de Spearman

Matriz de Dispersão - Zona Leste
Correlação de Spearman

Matriz de Dispersão - Zona Oeste

Correlação de Spearman

ANEXO I

Amostra	Manganês	Zinco	Arsênio	Cádmio	Chumbo	Mercúrio
1	30,54	2,38	237,95	8,21	29,15	13,05
2	153,95	3,61	1300,79	40,99	227,77	45,56
3	387,49	10,86	6004,33	29,04	434,29	257,70
4	36,24	2,16	500,68	0,99	43,65	17,03
5	25,49	2,44	606,23	2,17	47,38	18,17
6	78,41	4,11	754,46	9,28	247,58	27,72
7	79,45	3,44	734,54	1,54	94,03	20,76
8	61,88	3,51	876,65	1,83	93,47	24,85
9	140,74	2,63	421,10	2,38	149,86	11,74
10	90,87	5,00	1725,03	7,54	84,23	107,21
11	69,66	2,72	541,10	26,96	54,00	18,28
12	58,68	3,52	623,07	18,77	78,46	27,35
13	205,49	5,79	1097,90	7,77	293,85	36,75
14	38,98	3,29	325,00	0,81	51,56	8,94
15	112,65	4,52	576,05	2,31	46,86	17,41
16	42,81	2,43	485,33	1,05	30,74	13,17
17	46,67	2,45	658,31	15,35	61,62	15,78
18	343,27	17,49	8521,67	36,03	437,46	435,30
19	32,42	2,69	604,85	1,48	35,71	15,78
20	97,75	1,92	469,60	0,98	27,76	12,32
21	128,06	3,05	873,67	2,61	214,04	26,93
22	37,27	2,50	192,12	1,04	98,74	6,48
23	385,25	13,31	1991,12	17,64	513,45	208,15
24	138,19	4,49	592,56	2,40	34,02	26,78
25	85,14	7,27	573,81	6,34	112,01	22,54
26	225,32	5,21	339,72	4,99	145,87	45,12
27	25,43	2,64	217,97	1,69	43,03	13,11
28	37,63	2,76	533,89	2,87	66,16	14,36
29	188,67	9,79	3395,68	12,34	151,07	100,06
30	138,50	2,59	573,51	3,25	64,63	15,46
31	31,81	1,63	196,79	0,81	32,43	6,87
32	34,38	1,88	328,43	1,50	133,13	8,46
33	258,07	4,65	1204,85	5,11	116,60	31,17
34	38,06	3,34	1080,22	3,02	78,77	26,60
35	20,33	1,55	433,19	1,03	75,36	11,08
36	32,02	2,63	98,49	3,68	55,93	9,08
37	64,54	2,81	481,56	2,19	53,01	14,33
38	31,67	1,13	78,87	0,69	83,42	4,03
39	45,69	2,12	126,12	2,02	36,84	10,73
40	25,27	1,36	166,16	1,26	35,39	4,68
41	63,60	5,96	737,23	12,97	127,51	54,39
42	31,24	2,54	316,22	2,24	62,38	8,36
43	76,13	2,74	380,52	2,73	36,29	10,61
44	74,75	3,32	650,47	7,76	447,73	15,87
45	28,96	2,25	335,62	2,63	51,14	8,28
46	164,87	4,53	997,23	7,00	100,66	25,38
47	53,32	2,39	301,45	1,46	28,82	7,04

48	77,88	2,23	362,72	2,77	106,13	7,86
49	29,48	3,19	278,30	1,66	43,62	8,63
50	44,21	2,29	286,15	1,87	131,38	7,09
51	41,45	1,95	255,10	2,72	85,38	8,30
52	19,80	2,66	358,32	1,97	42,24	8,73
53	47,63	2,88	535,21	2,06	52,60	12,21
54	41,87	3,09	371,26	2,50	226,52	10,11
55	41,41	3,69	632,94	1,84	53,12	14,49
56	22,56	2,33	518,37	2,02	35,43	11,90
57	35,23	2,79	344,63	4,17	107,44	9,05
58	22,70	3,24	374,30	0,91	30,00	6,88
59	118,08	4,25	900,23	12,44	247,07	21,13
60	49,44	3,32	483,70	2,67	64,97	10,36
61	71,98	2,38	422,59	2,29	99,84	9,63
62	149,16	2,58	889,81	4,69	78,38	18,10
63	61,82	3,88	346,08	3,86	159,20	9,44
64	21,75	2,46	279,74	2,24	49,84	6,36
65	119,30	11,06	153,38	4,83	97,54	18,43
66	32,45	3,34	235,19	2,37	29,52	6,52
67	67,68	4,57	1147,09	4,56	162,49	21,64
68	30,59	3,14	400,37	1,57	61,38	6,28
69	69,18	4,07	574,92	2,55	50,79	16,26
70	21,68	2,96	318,29	1,52	38,10	6,96
71	51,47	6,31	803,60	3,01	149,29	14,87
72	17,45	1,46	177,64	0,89	43,51	5,46
73	43,98	3,31	49,93	0,90	31,81	4,79
74	84,23	4,49	704,01	9,90	192,67	20,48
75	171,30	11,08	2083,14	15,45	344,30	101,45
76	70,70	2,66	417,35	3,09	117,90	8,80
77	25,07	3,27	338,13	1,52	102,20	7,11
78	30,61	3,37	320,47	1,49	108,88	7,57
79	30,38	2,51	307,07	1,54	125,44	7,66
80	14,83	2,08	183,32	0,52	20,47	3,73