Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

Incorporação de Chumbo Pós-Eruptiva em Esmalte de Dentes Decíduos e Correlação com Saliva e Plasma - Estudo Longitudinal

SORAYA CHEIER DIB GONÇALVES

Ribeirão Preto – SP
2012

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto

INCORPORAÇÃO DE CHUMBO PÓS-ERUPTIVA EM ESMALTE DE DENTES DECÍDUOS E CORRELAÇÃO COM SALIVA E PLASMA - ESTUDO LONGITUDINAL

SORAYA CHEIER DIB GONÇALVES

Ribeirão Preto – SP

2012

SORAYA CHEIER DIB GONÇALVES

INCORPORAÇÃO DE CHUMBO PÓS-ERUPTIVA EM ESMALTE DE DENTES DECÍDUOS E CORRELAÇÃO COM SALIVA E PLASMA - ESTUDO LONGITUDINAL

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo, para a obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de Odontopediatria.

VERSÃO CORRIGIDA

Orientadora: Profª. Drª. Raquel Fernanda Gerlach

Ribeirão Preto – SP

2012

Gonçalves, Soraya Cheier Dib
Incorporação de chumbo pós-eruptiva no esmalte de dentes decíduos e correlação com saliva e plasma -estudo longitudinal - Ribeirão Preto, 2012.
62 p. : il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Odontopediatria.
Orientadora: Gerlach, Raquel Fernanda.

Versão corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na biblioteca da unidade sede do programa.

1. chumbo. 2. esmalte dental. 3. dentes decíduos. 4. saliva. 5. plasma sanguíneo

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gonçalves, S.C.D. **Incorporação de chumbo pós - eruptiva em esmalte de dentes decíduos e sua correlação com saliva e plasma - Estudo longitudinal.** Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data da defesa: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr._____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr._____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr._____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr._____

Julgamento_____Assinatura_____

Prof. Dr._____

Julgamento_____Assinatura_____

DADOS CURRICULARES

SORAYA CHEIER DIB GONÇALVES

Nascimento 04/03/1977 - Brasília - DF

Filiação Aldimiro Gonçalves de Souza

Maria Lúcia Cheier Dib Gonçalves de Souza

1997-2001 Curso de Graduação

Faculdade de Odontologia da Universidade de

Uberaba – MG

2002 -2004 Especialização em Odontopediatria

Associação Odontológica de Ribeirão Preto/ SP

2005 -2007 Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria,

nível Mestrado da Faculdade de Odontologia

de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FORP/USP

2008-2012 Curso de pós Graduação em Odontopediatria,

nível Doutorado Faculdade de Odontologia

de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

FORP/USP

"É do buscar e não do achar que nasce o que eu não conhecia."

(Clarice Lispector)

DEDICO ESTE TRABALHO,

À minha querida filha Thaís Dib Américo, sinônimo de amor infinito. Você fez de mim uma pessoa mais forte que me faz resistir a todos os embates e tempestades com apenas um sorriso. Obrigada por fazer cada segundo da minha vida valer à pena.

Ao meu esposo Carlos Américo Alves: agradeço a Deus por ter uma pessoa maravilhosa como você ao meu lado. Cheguei até aqui porque contei com seu apoio, compreensão e incentivo. Sem você nada seria possível Obrigada por tudo, sempre.

À minha mãe, Maria Lúcia Dib que me ensinou a ter coragem em todas as circunstâncias da vida. Guardo para sempre os ensinamentos de sua sabedoria ímpar. Mãe você é e sempre será essa pessoa única, exclusiva, inigualável e genial.

Ao meu pai Aldimiro Gonçalves de Souza (*in memorian*) não tenho palavras para expressar minha saudade, mas sei que de onde estiver continuará guiando meus passos. Se cheguei até aqui foi porque você me deu alicerce. Deixo registrado meu amor eterno.

Aos meus irmãos Rossana e Neto, pelo carinho. Obrigada por fazerem parte da minha vida.

Aos meus queridos sobrinhos Bruno e Victor, Vocês sempre serão essas criaturas lindas que Deus escolheu para abençoar minha família.

À Dinda Lázara Celina, minha segunda mãe. Expresso minha eterna gratidão pela sua dedicação e sua bondade que faz de você esta pessoa especial e maravilhosa.

À Silvani dos Reis, não poderia me esquecer desta pessoa que é para mim como uma irmã. Obrigada sempre.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo exercício da tolerância; pela força da paciência; pelo amigo que me socorre; pelo adversário que me instrui; pelos estímulos com que me conduzes; pelas provações com que me esclareces; pelas dificuldades com que me controlas; por todas as bênçãos de amor que me proporcionas, Obrigada meu Deus. (Chico Xavier).

À Profª Drª Raquel Fernanda Gerlach (orientadora) Agradeço pela oportunidade de ter convivido por esses quatro anos com uma pessoa abençoada quatro vezes. Você fez parte de etapa importante do o meu aprendizado e amadurecimento. Este doutorado me proporcionou vivenciar outras formas de conhecimento ampliando meus horizontes. Obrigada pela paciência infinita e tolerância principalmente nos momentos mais estressantes. Sei que vou levar muitas coisas boas de tudo que aprendi com você. Descobri que quando paramos de apreender e progredir começamos morrer realmente.

À Sofia, Cecília, Natália e Felipe por terem muitas vezes a mãe ausente para poder me ajudar. Obrigada por terem colaborado para os resultados desta pesquisa

À Junia Ramos, pessoa maravilhosa que tive a honra de poder contar com sua colaboração. Obrigada por me atender prontamente. Pude apreender muitas coisas ao teu lado e nunca vou me esquecer da frase: "Calma, amanhã é outro dia".

Ao Fellipe Augusto Tocchini de Figueiredo, Pela dosagem de chumbo nas amostras, e pelos ensinamentos na parte laboratorial. Agradeço também pela amizade e paciência.

Aos Colegas de Laboratório **Aline, Alejandro, César, Conrado, Ellen, Raquel Carros, Regina** pela convivência agradável.

À Karina Alessandra M. Grecca Pieronni , pelo auxílio na coleta das amostras e pela amizade.

À Dra. Walkíria Aparecida Fonseca Orlando por ter tido a oportunidade de conhecê-la e pela imensa colaboração com os pacientes.

À diretora da Creche Carochinha **Regina Célia da Silva Marques Teles** pela boa vontade e acolhimento.

Às funcionárias da Creche Carochinha **Marlene e Judith**, pessoas bacanas que pude contar com o imenso auxílio durante as coletas das amostras.

Aos colegas, **Carolina Paes Torres, Cristhiane Ristum Bagatin Rossi, Jaciara Miranda Gomes da Silva, Regina Aparecida Segatto Saiani, Fabrício Kitazono de Carvalho, Maristela Soares Swerts Pereira, Rodrigo Teixeira Macri** *"As pessoas entram na nossa vida por acaso, mas não é por acaso que elas permanecem". Obrigada a cada uma de vocês que entraram e permaneceram na minha vida de modo especial.*

Ao Richard Honorato Oliveira, obrigada pela amizade e contribuição na parte gráfica deste trabalho.

Às colegas **Cristina Bueno Brandão,** pela imensa ajuda com os pacientes, e **Cíntia Almeida** por colaborar nas coletas do seu filho. Obrigada de coração.

Aos docentes do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: Profª Drª **Sada Assed**, Profª Drª **Aldevina Campos de Freitas**; Profª Drª **Alexandra Mussolino de Queiroz**; Profª Drª **Kranya Victoria Díaz Serrano**; Profª Drª **Léa Assed Bezerra da Silva**; Profª Drª **Maria Cristina Borsatto**; Prof. Dr. **Paulo Nelson Filho**; Profª Drª **Maria Conceição Pereira Saraiva**; Profª Drª **Maria Bernardete Sasso Stuani**; Profª Drª **Mirian Aiko Nakame Matsumoto**; Prof. Dr. **Adilson Thomazinho**; Prof. Dr. **José Tarcísio de Lima Ferreira, Adelvina Campos Freitas** ,Prof. Dra. **Raquel Assed Bezerra da Silva** e Profª Drª **Andiara de Rossi**. *Tenho um carinho especial por cada um de vocês. Não tem preço nem palavras que possam agradecer o papel que vocês desempenharam na minha formação.*

Aos Professores, Pacientes e Funcionários da Clínica de Pacientes Portadores de Necessidades Especiais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, especialmente à **Profª. Drª Maria Cristina Borsatto**, exemplo de dedicação, carinho, amor e respeito com os pacientes e alunos.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil, Odontologia Preventiva e Social da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: **Benedita Viana Rodrigues, Carmo Eurípedes Terra Barreto, Fátima Aparecida Jacinto Daniel, Fátima Aparecida Rizóli, Francisco Wanderley de Paula e Silva, Carolina Paes Torres, José Aparecido Neves do Nascimento, Kleber Barbosa Rita, Micheli Cristina Leite Rovanholo, Renata Aparecida Fernandes Rodrigues e Vera Ribeiro do Nascimento, Filomena Leli Placciti, Matheus Morelli Zanela**

Às amigas **Miriane Martins Bittencourt e Tábata Larissa Santos Pólvora**. Obrigada por estender a mão quando precisei da ajuda de vocês.

Aos Funcionários Vera Ribeiro do Nascimento e José Aparecido Neves do Nascimento, por serem pessoas na qual eu sempre contei em tudo o que precisei. Vocês fazem toda a diferença. Obrigada pela boa vontade que vocês sempre tiveram comigo.

Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: **Isabel Cristina Galino Sola e Regiane Cristina Moi Sacilotto,** pessoas competentes e prestativas. Muito Obrigada.

Ao Departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da Universidade de São Paulo/ Campus Ribeirão Preto, especialmente à **Profa. Márcia Andréia Mesquita Veiga** e **Flávio Nakadi** , pela ajuda na parte laboratorial .

Ao Departamento de Análises Clínicas, toxicológicas e bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da USP-RP pela dosagem de chumbo nas amostras.

Ao Professor **Rafael Rosales** pelo cálculo matemático dos resultados.

À Prefeitura Municipal de Sertãozinho, em especial ao coordenador de saúde Paulo Siqueira pela compreensão e apoio.

A todos os pacientes que participaram desta pesquisa, pela imensa colaboração.

À FAPESP (FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO), pela concessão da bolsa de estudo e a cobertura financeira deste projeto.

SUMÁRIO

Resumo
Abstract
Introdução..... 15
Proposição 23
Material e Método..... 25
Resultados 38
Discussão..... 45
Conclusão..... 50
Referências Bibliográficas..... 52
Anexos 58

RESUMO

Gonçalves, S.C.D. **Incorporação de chumbo pós - eruptiva em esmalte de dentes decíduos e sua correlação com saliva e plasma - Estudo longitudinal** (Tese). Ribeirão Preto: FORP – Univ. de São Paulo, 2012.

A exposição ambiental ao chumbo é uma das questões mais sérias de contaminação de populações do ponto de vista de saúde pública. Mesmo em pequenas quantidades, o chumbo causa mudanças bioquímicas e neurológicas, convulsões e hiperatividade. No Brasil, não existe programa nacional para detecção de crianças contaminadas por este metal, as quais são mais sensíveis aos efeitos deletérios resultantes da exposição crônica a baixas concentrações de chumbo. A maioria dos trabalhos que comprovaram a associação entre exposição ambiental a chumbo no passado e problemas no desenvolvimento neurológico utilizou dentina de dentes decíduos como tecido marcador de exposição. Trabalhos do nosso grupo indicam que o esmalte superficial de dentes decíduos seria um bom marcador cumulativo da exposição passada ao chumbo, sendo que esse tecido apresenta consideráveis vantagens do ponto de vista de acesso e desenvolvimento de testes para monitoramento ambiental. Uma questão importante é verificar se as concentrações de chumbo encontradas no esmalte superficial decíduo variam ao longo do tempo em crianças de baixa exposição. Outra questão importante é verificar se há correlações entre as concentrações de chumbo no esmalte superficial e aquelas dos principais fluidos corporais a partir dos quais o chumbo seria acumulado no esmalte, que são sangue total, plasma e saliva. Assim, o objetivo deste trabalho foi verificar *in vivo*, por meio de testes em esmalte em dentes decíduos, se o chumbo acumulado nos primeiros micrometros do esmalte aumenta ao longo de três anos e se as concentrações de chumbo encontradas no esmalte apresentam correlação com aquelas encontradas no sangue total, plasma e saliva. A amostra inicial foi constituída por 50 crianças com idade de 2 a 3 anos procedentes de Ribeirão Preto que estavam recebendo atendimento odontológico na Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP e alunos da Creche Carochinha (USP-Ribeirão Preto). Obtiveram-se as seguintes amostras: primeira etapa (2009): 01 amostra de sangue total e 01 amostra de esmalte de um incisivo central superior; segunda etapa (2010): 01 amostra de sangue total, 01 amostra de plasma sanguíneo, 01 amostra de saliva e 01 amostra de esmalte do dente contralateral. terceira etapa (2011): 01 amostra de sangue total, 01 amostra de plasma sanguíneo, 01 amostra de saliva e 02 amostras de amostra de esmalte dos incisivos laterais. O fósforo foi determinado colorimetricamente, para calcular a profundidade dos testes de esmalte. As concentrações de chumbo no plasma, saliva e esmalte dental foram determinadas por espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICPMS) e no sangue total, por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite. Muitas crianças ou seus responsáveis não permitiram a coleta de sangue em algum dos períodos, e assim ao longo dos 3 anos tivemos participação efetiva de 20 crianças. Em 2009, a concentração de chumbo no sangue total variou de 0,2 µg/dL a 7,48 µg/dL e teve como a mediana 0,26 µg/dL. Apenas uma criança apresentou nível de chumbo no sangue ≥ 5 µg/dL. Em 2010, a concentração de chumbo no sangue total

variou de 0.2 µg/dL a 3,8 µg/dL e teve como a mediana 0,32 µg/dL. Em 2011, a concentração de chumbo no sangue variou de 1,15 µg/dL a 3,55 µg/dL e teve como mediana 0,95 µg/dL. Os dados de chumbo no sangue não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ao longo dos anos ($p>0.05$). Em 2010, valores de chumbo no plasma variaram de 0,29 – 3,20 µg/L e a mediana foi 0,49. Em 2011, variaram de 0,38 – 1,60 µg/L com mediana 0,52 µg/L. A concentração de chumbo na saliva em 2010 variou de 0,02 – 3,00 µg/L, com mediana de 0,34 µg/L. Em 2011, esses valores variaram de 0,02 – 4,27 µg/L e a mediana foi de 0,19 µg/L. Para as concentrações de chumbo no plasma e na saliva, não houve diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (Saliva 2010 x Saliva 2011; Plasma 2010 x Plasma 2011) (teste de Mann Whitney; $p>0.05$). No caso dos dados obtidos no esmalte dentário, os valores de chumbo foram recalculados para uma mesma profundidade, que foi de 3,4 µm. Nenhum dos grupos (Esmalte 2009, Esmalte 2010 e Esmalte 2011) teve distribuição normal, e não houve diferença entre nas concentrações de chumbo encontradas ao longo dos anos, com medianas de 36, 35 e 38 µg/g em 2009, 2010 e 2011, respectivamente ($p=0,71$, teste de Kruskal-Wallis). A análise de correlação foi feita após a transformação logarítmica ($\log_{10}$) de todos os valores. Mesmo após esta transformação, dois grupos ainda não apresentaram distribuição normal, o grupo Plasma 2011 e Esmalte 2010. As associações que envolviam estes grupos foram testadas utilizando-se a correlação de Spearman, enquanto todas as demais associações foram testadas utilizando-se o teste de correlação de Pearson. As correlações significativas positivas encontradas foram: entre Sangue Total 2009 e Sangue Total 2010 ($rP = 0,64$; $p = 0,002$) ; Sangue Total 2010 e Sangue Total 2011 ($rP = 0,66$; $p = 0,002$); Esmalte 2011 e Sangue Total 2009 ($rP= 0,44$; $p=0,05$) e entre Esmalte 2009 e Esmalte 2010 ($rS = 0,45$ e $p=0,03$). Houve uma associação inversa entre a Saliva 2010 e Esmalte 2011 ($rP = -0,55$; $p=0,013$). Conclusão: Os valores de chumbo obtidos em todas as amostras ao longo de 3 anos caracterizam baixa exposição a chumbo no grupo estudado. As concentrações de chumbo no sangue, saliva, plasma e esmalte não variaram ao longo do tempo. Das 28 associações testadas, foram estatisticamente significantes e positivas aquelas entre o Sangue Total 2009 e o Esmalte 2011 e entre o Esmalte 2009 e Esmalte 2010. A associação entre Saliva 2010 e Esmalte 2011 foi inversa. Os resultados sugerem que o esmalte tenha associação com a exposição de chumbo passada, neste estudo caracterizado pelos valores de chumbo no sangue total. Os resultados sugerem que o esmalte possa ser um biomarcador fidedigno para avaliar o grau de exposição a chumbo em populações com baixa exposição a este metal, uma vez que o esmalte superficial de dentes decíduos não incorporou chumbo em quantidades significativas entre 2 e 5 anos de idade em crianças com baixa exposição e baixa atividade de cárie.

PALAVRAS - CHAVE: contaminação por chumbo; esmalte dental; dentes decíduos, saliva humana, plasma sanguíneo

ABSTRACT

Gonçalves, S.C.D. **Post eruptive lead incorporation into the enamel of primary teeth and its correlation with saliva and plasma - a longitudinal study**. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2012.

Environmental exposure to lead is one of the most serious contamination problems that affect public health. Even in small amounts, lead can cause neurological and biochemical changes, such as mental problems and hyperactivity. In Brazil, there is no program for the detection of children contaminated by this metal. Children are more sensitive to the deleterious effects of chronic lead exposure. Studies that proved association between environmental exposure to lead and neurological developmental problems used dentine of primary teeth as a marker of lead exposure. Studies by our group suggest that superficial enamel of deciduous teeth would be a good cumulative marker of past exposure to lead, and this tissue has considerable advantages regarding access and the perspective of development of tests for environmental monitoring of children. An important question is whether the concentrations of lead found in deciduous enamel surface vary over time in children with low exposure and if there are correlations between the concentrations of lead in the enamel surface and those of the main body fluids from which the lead was accumulated in the enamel, which are whole blood, plasma and saliva. The aims of this study was to investigate *in vivo*, by testing lead concentration in deciduous enamel of primary teeth, if the lead accumulated in the first micrometers of enamel increases along three years and if the concentrations of lead found in enamel surface were correlated with those found in whole blood, plasma and saliva. The initial sample consisted of 50 children aged 2 to 3 years from Ribeirão Preto, who were receiving dental care at Children's Clinic of the Faculty of Dentistry of Ribeirão Preto - USP and students of Nursery Carochinha (USP-Ribeirão Preto). The following samples were obtained: first stage (2009): 01 sample of whole blood and 01 sample of enamel of a central upper incisor, second stage (2010): 01 sample of whole blood, 01 sample of blood plasma, 01 sample of saliva and 01 sample of enamel from the contralateral tooth; third stage (2011): 01 sample of whole blood, 01 sample of blood plasma, 01 sample of saliva and 02 enamel samples of lateral upper incisors. Phosphorus was determined by a colorimetric method, in order to calculate the depth of enamel tests. Lead concentrations in plasma, saliva and enamel were determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) and whole blood by atomic absorption spectrometer with graphite furnace. Many children or their guardians did not allow the collection of blood in any of the periods, and thus, over the three years, we had the enrollment of only 20 children. In 2009, the concentration of lead in whole blood varied from 0.2 µg / dL to 7.48 µg /dL and the median was 0.26 µg/dL. Only one child had a blood lead level ≥ 5 µg/ dL. In 2010, the concentration of lead in whole blood ranged from 0.2 µg/dL to 3.8 µg/dL and the median was 0.32 µg/dL. In 2011, the concentration of lead in blood ranged from 1.15 µg/dL to 3.55 µg/dL and the median was 0.95 µg/dL. The blood lead data do not show statistically significant differences over the years ($p > 0.05$). In 2010, values of lead in plasma ranged from 0.29 to 3.20 µg/L and the median was

0.49 µg/L. In 2011, lead levels in plasma ranged from 0.38 to 1.60 µg/L with median 0.52 µg/L. The lead concentration in Saliva 2010 ranged from 0.02 to 3.00 µg/L, median 0.34 µg/L. In 2011, these values ranged from 0.02 to 4.27 µg/L and the median was 0.19 µg/L. For lead concentrations in plasma and saliva, there were no statistically significant differences between groups (Saliva 2010 x Saliva 2011; Plasma 2010 x Plasma 2011)(Mann-Whitney test, p> 0.05). To analyze enamel samples, the values of lead were recalculated so they would reflect the lead found in one same depth, which was 3.4 micrometers. None of the groups (enamel from 2009, enamel from 2010 and enamel from 2011) presented normal distribution. There was no statistically significant difference between these three groups (p=0.71, Kruskal-Wallis). A correlation analysis was performed after logarithmic transformation (log 10) of all values. Even after this transformation, two groups still did not exhibit normal distribution, which were Plasma 2011 & Enamel 2010. The associations that involved these two groups were tested using the Spearman correlation test, while all other associations were tested using the Pearson correlation test. The significant positive correlations found were: Whole Blood 2009 and Whole Blood 2010 (rP = 0,64; p = 0,002) ; Whole Blood 2010 and Whole Blood 2011 (rP = 0,66; p = 0,002); between Enamel 2011 and Whole Blood 2009 (rP= 0.44, p = 0.05) and between Enamel 2009 and Enamel 2010 (rS= 0.45, p= 0.03). There was an inverse association between Saliva 2010 and Enamel 2011 (rP= - 0,55; p = 0,013). Conclusion: The lead values obtained in all samples over three years characterized low exposure to lead by the group studied. Lead concentrations in blood, saliva, plasma and enamel did not vary over time. Of the 28 associations tested, the ones between Whole Blood 2009 and 2011 and between Enamel 2009 and 2010 were positive and significant. The association between Saliva 2010 and Enamel 2011 was negative and significant. The results suggest that the lead found in the enamel is correlated with past exposure to lead characterized in this study by the yearly whole blood lead data. The results further suggest that the dental enamel can be a reliable marker to assess the degree of exposure to lead of populations, since the primary teeth´s enamel surface did not incorporate lead in substantial quantities between 2 and 5 years in children with low exposure to this metal and low caries activity.

KEY - WORDS: lead poisoning; enamel, deciduous teeth, human saliva, blood plasma

INTRODUÇÃO

Introdução

O chumbo (Pb), elemento químico pertencente ao grupo 14 ou IVA da classificação periódica , tem o número atômico mais elevado entre todos os elementos estáveis (Z=82). Por causa das suas características atômicas, inclui-se no grupo dos metais tóxicos. Apresenta baixo ponto de fusão e alta maleabilidade e devido a estas propriedades, tem sido utilizado desde a antiguidade. Porém, apesar de sua ampla utilização, o chumbo é nocivo à saúde humana, sendo também mutagênico e carcinogênico e sua toxicidade é atribuída, principalmente à sua afinidade química com o cálcio (Needleman, 2004; Grant, 2009).

A exposição ao chumbo ocorre por meio de água e alimentos contaminados e atividades industriais como mineração e processamento de chumbo. Fábricas de reciclagem de baterias, cerâmicas e tintas também são focos de contaminação de metais pesados (Warren, 2000). No Brasil a indústria produtora de chumbo produz cerca de 0,003% da produção mundial, sendo que nos últimos anos, esse quadro tem sofrido um declínio significante. Atualmente, os principais consumidores de chumbo no país são os fabricantes de baterias (80%), seguido por indústrias que utilizam óxidos e pigmentos (12%) e setores elétricos e eletrônicos (8%) (Paoliello e De Capitani, 2007).

A contaminação pelo chumbo se dá pelas vias aéreas superiores, no caso de poluição do ar, ou por ingestão e absorção pelo trato gastrointestinal, no caso de contato com o metal, que, em geral, é levado à boca por meio das mãos contaminadas (Calabrese *et al.,* 1997). Em humanos, a absorção de chumbo pelos pulmões é rápida e completa-se dentro de vinte e quatro horas. A absorção de chumbo pelo sistema respiratório depende do tamanho da partícula inalada. Partículas geralmente menores que 2,5 μm de diâmetro depositam-se com maior facilidade nos alvéolos pulmonares. Em condições sistêmicas alteradas, como em casos de alterações de ferro, cálcio e zinco, a absorção é aumentada (Grant, 2009).

Após sua absorção, o chumbo passa a ser distribuído por todo o organismo pela corrente sanguínea. A maior parte dele, cerca de 95%, se liga aos eritrócitos e pode se depositar nos tecidos moles ou duros, ou ainda ser excretado (Rabinowitz, 1991). O restante, cerca de 5%, permanece no plasma, no qual se liga a albumina e alfa-albumina, difundindo-se para o tecido alvo, principalmente para o sistema nervoso (O'Flaherty, 1995).

O sistema nervoso central é o mais atingido pelos efeitos deletérios do chumbo (Needleman, 2004).

As crianças são particularmente mais sensíveis à exposição ao metal (Cleymaet *et al.,* 1991b). Quando ocorre absorção gastrointestinal, a porcentagem de absorção é diferente, entre adultos e crianças. Enquanto os indivíduos adultos absorvem em torno de 10 a 15%, e

armazenam cerca de 5% do que é absorvido, as crianças absorvem cerca de 41,5% e retém 38,1% (Ziegler *et al.,* 1978), interferindo em órgãos e sistemas ainda em desenvolvimento (Needleman e Bellinger, 1991; Cicuttini *et al.,* 1994; Wigg, 2001). Assim, para um mesmo nível de chumbo no sangue, os efeitos deletérios são mais severos em crianças, uma vez que estas absorvem mais cálcio que os adultos. Além disso, a fase oral, própria de crianças menores, aumenta o risco de contaminação por chumbo (Jones *et al.,* 2009).

Estudos anteriores mostravam que o desenvolvimento físico e mental da criança poderia ser afetado por concentrações de chumbo no sangue de 10 µg/dL, valor mínimo tolerável anteriormente (Bellinger *et al.,* 1992; Lanphear *et al.,* 2000; Canfield *et al.,* 2003; Chiodo *et al.,* 2004; Surkan *et al.,* 2007; Binns *et al*., 2007). Em 2006, um comitê científico de neurotoxicologia e psicofisiologia da Comissão Internacional de Toxicologia de Metais (ICOH) concluiu que os padrões de exposição a chumbo estabelecido há muitos anos atrás não refletem os recentes avanços do conhecimento científico sobre os efeitos tóxicos em níveis de exposição abaixo destes padrões e necessitam de urgente redução (Landrigan *et al.,* 2007).

Recentemente, o CDC-ACCLP (Centers for Disease Control's Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning) aprovou uma resolução que recomenda que o limite de ação seja diminuído de 10 µg/dl para 5 µg/dl (CDC, 2012). Embora esta resolução não tenha entrado ainda em vigor, uma vez que foi publicada em 04/01/2012, há uma grande expectativa na comunidade que estuda este assunto de que esta resolução seja aceita e implementada pelo CDC, de modo que haverá uma proteção mais efetiva a um grande número de crianças que hoje são expostas a chumbo e apresentam valores de chumbo no sangue inferiores a 10 µg/dL.

A recomendação anterior feita aos pediatras americanos pelo Comitê Assessor para Controle da Exposição a Chumbo do Center for Disease Control and Prevention dos EUA (CDC-ACCLPP) já indicava que o limite mínimo tolerável de exposição a chumbo em crianças pequenas não era mais aceitável cientificamente, visto que a revisão crítica dos trabalhos recentes mostrava relação inversa entre concentração de chumbo no sangue total e desempenho em testes neuropsicológicos, mesmo em trabalhos em que as concentrações de chumbo no sangue total eram menores do que 10 µg/dL (Binns *et al.,* 2007).

Segundo Canfield *et al.,* 2003, pode-se encontrar déficit de aprendizado em crianças de três e cinco anos de idade e associações com QI abaixo da média em concentrações de chumbo no sangue abaixo de 10 µg/dL.

Por esse motivo a partir de 2007 a recomendação desse Comitê assessor do CDC já era de que, mesmo quando as concentrações de chumbo no sangue total de uma criança

estivessem entre 6 e 10 µg/dL, os pediatras fizessem uma entrevista mais específica para buscar possíveis fontes de chumbo e deveriam alertar os pais para a necessidade de diminuir o risco de exposição da criança.

No Brasil não há programas para detecção de crianças contaminadas por este metal. Além disso, há poucos dados sobre exposição ao chumbo e, os que existem, resultam de coletas esporádicas e amostras relativamente pequenas de indivíduos.

Em alguns estudos foi demonstrado que, também no Brasil, as crianças estão expostas a níveis mais altos de chumbo em alguns ambientes, particularmente em regiões industrializadas de cidades (Gomes *et al.,* 2004, Costa de Almeida *et al.,* 2007). Esses dados indicam a necessidade de se buscar formas de implementar, no Brasil, medidas de verificação da contaminação por chumbo em crianças, pelo menos em algumas regiões, por exemplo, em grandes centros urbanos e áreas industrializadas de cidades.

Muitos trabalhos que correlacionam contaminação por chumbo e seus efeitos tóxicos utilizam sangue total como biomarcador pela sua acurácia e precisão analítica. Porém a utilização exclusiva do sangue total para medir chumbo tem sido criticada devido a suas limitações. O chumbo no sangue total representa apenas uma pequena fração do chumbo acumulado, além disso, maior parte do chumbo no sangue total reflete a exposição recente ao chumbo. Assim, outros biomarcadores como saliva, plasma sanguíneo e esmalte tem sido propostos para detectar grau de exposição e acúmulo no organismo (Gerlach *et al.,* 2009).

De um ponto de vista fisiológico, o chumbo no plasma representa o índice mais relevante de exposição, distribuição e risco à saúde, se comparado com o chumbo no sangue total, pois a fração plasmática está em continuidade com o líquido intersticial dos tecidos (Barbosa *et al.,* 2005). Existem vários relatos de chumbo no plasma em que a validação dos dados é fraca ou ausente. Isso porque não há um material de referência certificado para este metal no plasma (Cake *et al.,* 1996).

O desenvolvimento e uso de um instrumento analítico mais sensível, especialmente ICP-MS (espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado), tem resultado em determinações de chumbo no plasma com limites de detecção muito menores e resultados mais confiáveis. Dados recentes, baseados na metodologia com ICP-MS, mostraram níveis de chumbo no plasma menores que 1,0 µg/L em indivíduos não expostos (Schutz *et al.,* 1996).

No caso deste trabalho, a análise do chumbo no plasma é particularmente relevante porque provavelmente é a fração de chumbo no plasma aquela que está em contato com o esmalte dos dentes ao longo da fase de mineralização destes (ainda dentro das criptas ósseas), e também aquela a partir da qual a saliva é formada nas glândulas salivares. Assim,

os dados de chumbo no plasma permitem correlações importantes entre chumbo no esmalte e no plasma.

Além do plasma a saliva também tem sido proposta como um biomarcador promissor. Sua principal vantagem é facilidade de coleta (Silbergeld, 1993). No entanto, a saliva apresenta grande variação na sua concentração de íons ao longo do dia, mudanças de seu fluxo antes, durante e após as refeições, entre outras variações que dependem da maneira como a saliva é coletada, se estimulada (ou não) e o nível nutricional e hormonal de cada indivíduo (Barbosa *et al.,* 2005). Apesar das associações relatadas na literatura, a concentração de chumbo na saliva varia muito entre estudos. Dados recentes sugerem níveis de chumbo muito baixos na saliva, em sujeitos expostos e não expostos. De acordo com Wilhelm et al. (2002) a concentração de chumbo na saliva de crianças não expostas é geralmente < 1,5 µg/dL. Falta de padronização ou material de referência certificado e ausência de valores de referência confiáveis para a população humana são os fatores que limitam a utilização das medidas de chumbo na saliva.

Recentemente, foram analisadas as concentrações de chumbo na saliva em 125 crianças de Ribeirão Preto e 19 crianças de Bauru por ICPMS. Verificou-se que a média de chumbo na saliva foi estatisticamente diferente entre a população de Ribeirão Preto (1.64 µg/L) e a população de Bauru (5.85 µg/dL), indicando que a saliva é provavelmente um bom marcador da exposição recente ao chumbo (Costa de Almeida *et al.,* 2009). Este trabalho foi realizado em crianças de 4 a 6 anos de idade. Ficou demonstrada também a ausência de correlação entre chumbo no esmalte superficial e a saliva, sendo esta mais uma indicação de que o esmalte parece ser um indicador cumulativo de exposição passada, enquanto a saliva parece ser um marcador de exposição recente. Mesmo com a amostra pequena, neste trabalho foi verificada uma correlação positiva ($r = 0.76$ e $p = 0.04$) entre chumbo na saliva e chumbo no sangue.

Alguns autores também consideram o esmalte dentário promissor para se detectar contaminações precoces pelo chumbo (Ericson 2001; Gomes *et al.,* 2004; Rinderknecht et al. 2005; Costa de Almeida *et al.,* 2007; Costa de Almeida *et al.,* 2008), considerando que as amostras de esmalte superficial são facilmente coletadas por meio de testes.

O teste de esmalte é um procedimento de ataque ácido, que utiliza solução de HCl a 1,6 $mol.L^{-1}$ em glicerol 70% (v/v). Quando a solução é preparada apropriadamente, (com reagentes ultrapuros) e o procedimento é realizado cuidadosamente, esta técnica permite a obtenção de amostras não contaminadas da superfície do esmalte em volume adequado para a determinação de fósforo, cálcio e chumbo. O procedimento leva apenas 20 segundos e pode ser feito *in vivo*, sem a necessidade de coleta e secção dos dentes decíduos.

A primeira descrição do teste em esmalte para determinar chumbo foi feita em 1956, por Brudevold *et al.,* para dentes permanentes extraídos. Esse teste era originalmente chamado de biópsia de esmalte, sendo um procedimento de ataque ácido superficial, no qual se utiliza HCl a 1,6 N em glicerol a 70%. Alguns estudos que a utilizaram em dentes permanentes extraídos (Brudevold *et al*. 1975) sugeriram uma relação entre o chumbo na superfície do esmalte e os níveis de chumbo ambiental. Esta técnica foi posteriormente adaptada para a utilização *in vivo* para se obter dados de chumbo na superfície do esmalte em dentes permanentes (Cleymaet *et al*. 1991a, 1991b, 1991c, 1991d, 1991e).

Esse procedimento foi adaptado para obter amostras de esmalte de dentes decíduos (Gomes *et al*., 2004) e com isso, permitir a coleta de dados de exposição ao chumbo em populações de crianças de 4 a 6 anos, com o objetivo do monitoramento de populações. A técnica do teste em esmalte possibilita a determinação da quantidade de chumbo na região do esmalte onde o chumbo se encontra nas maiores quantidades (Arora *et al*., 2006), uma vez que a profundidade média alcançada pela biópsia foi de 3,8 µm, evidenciando seu caráter superficial. Tal metodologia, além de pouco invasiva, indolor e de fácil execução, mostra-se adequada para estudos epidemiológicos que freqüentemente utilizam grandes amostras populacionais (Costa de Almeida *et al*., 2007).

Uma limitação da técnica do teste de esmalte, até recentemente, era apenas poderem ser comparados resultados de concentrações de chumbo obtidos em profundidades parecidas (Gomes *et al*., 2004). Isso porque o chumbo se acumula na superfície do esmalte (onde é encontrado em centenas a milhares de µg/g) (Brudevold et al., 1956) e decresce rapidamente em direção à parte mais interna, onde é descrita sua concentração em torno de 1 µg/g (de Souza Guerra *et al*., 2009).

Também, em três estudos prévios do nosso grupo foi demonstrado que o chumbo se acumula na camada superficial do esmalte de dentes decíduos de acordo com sua presença no ambiente (Gomes *et al*., 2004; Costa de Almeida *et al*., 2007, Costa de Almeida *et al*., 2008). Nestes trabalhos foi demonstrado que é muito importante determinar chumbo na camada mais superficial do esmalte, especialmente entre 3,18 e 5,9 µm, na qual se verificou a presença de um plateau de acúmulo de chumbo (Costa de Almeida *et al*., 2008). Essa descoberta poderia abrir a perspectiva de utilizar este acúmulo diferencial de chumbo na superfície do esmalte para aferir a exposição cumulativa de crianças, o que não é possível ainda por nenhum método, uma vez que as medidas de chumbo em osso ainda não podem ser amplamente utilizadas. Mesmo quando dentina e osso são utilizados (que são os marcadores mais amplamente utilizados da exposição cumulativa passada), não há limites mínimos aceitáveis conhecidos.

Uma das maiores controvérsias a respeito dos níveis de chumbo na superfície do esmalte dental é se o acúmulo de chumbo no esmalte reflete somente a exposição da matriz de esmalte ao plasma durante o estágio de maturação da amelogênese, e a quantidade de chumbo disponível no plasma, ou também a exposição do esmalte superficial à saliva, e ao chumbo presente na saliva, no período de 1 a 6 anos de idade. Ou seja, ainda não se sabe se o metal acumulado nos primeiros micrometros do esmalte é incorporado após a erupção (pós-eruptivamente) a partir da saliva, ou apenas na fase pré-eruptiva, durante o período da mineralização do esmalte dentro das criptas ósseas. Um trabalho recente mostrou que mesmo quando não é possível medir chumbo nos ameloblastos, este metal já pode ser detectado em maiores quantidades no esmalte em formação, ainda na fase secretória da amelogênese (Arora *et al.*, 2007). Pelos dados dos trabalhos descritos no parágrafo anterior, fica claro que há cerca de 300 µg/g de esmalte na superfície de dentes decíduos (incisivos) de crianças não expostas a quantidades excessivas de chumbo, enquanto há mais do que 600 µg/g em crianças de regiões contaminadas por chumbo. Importante que essas crianças sempre moraram nas respectivas regiões.

Em um trabalho anterior (Costa de Almeida *et al.*, 2007), foi demonstrado que esmalte de dentes decíduos de crianças residentes em regiões contaminadas apresenta cerca de 4 vezes mais chumbo do que o esmalte de crianças residentes em cidades sem uma fonte de contaminação conhecida, o que sugere que este tecido é um bom marcador da contaminação ambiental. Posteriormente, Costa de Almeida *et al.*, 2008 demonstrou que o esmalte decíduo pode ser usado para identificar crianças e ambientes expostos a níveis mais elevados de chumbo.

Essas evidências sugerem fortemente que o chumbo na superfície do esmalte se acumula durante o longo processo de maturação deste tecido, que leva meses nos dentes decíduos e anos nos permanentes (Smith *et al.*, 1998).

Entretanto, há ainda muitas controvérsias sobre o assunto. O único estudo feito aponta para um incremento na quantidade de chumbo na superfície do esmalte quando diferentes grupos de crianças (um grupo de 8 anos de idade e outro de 11 anos) são comparados, tendo o grupo de crianças mais velhas apresentado maior quantidade de chumbo (Cleymaet *et al.*, 1991b). Entretanto, como não foram as mesmas crianças avaliadas, esses resultados não são de forma alguma conclusivos.

Pelo exposto, é fundamental verificar se o chumbo acumulado no esmalte superficial aumenta ao longo do tempo. Uma forma mais confiável de determinar isso é verificar *in vivo*, por meio de testes em esmalte, se a quantidade de chumbo acumulada nos primeiros micrômetros do esmalte se modifica ao longo dos anos após o irrompimento de um dente,

em dentes decíduos de pacientes em que fatores como dieta e cárie são também observados. Além disso, num estudo como esse é possível verificar como a concentração de chumbo no esmalte se correlaciona com a concentração deste no plasma e a saliva ao longo de alguns anos, sendo fundamental para que se possa utilizar amplamente o teste de esmalte para determinar a exposição a chumbo.

Muitos estudos mais consistentes sobre o efeito do chumbo no desenvolvimento neuropsicológico das crianças somente serão possíveis com um marcador como o esmalte, uma vez que o principal problema da maioria dos trabalhos é não utilizar um marcador da exposição cumulativa no passado (a maioria dos estudos utiliza sangue total e não osso ou dentina).

PROPOSIÇÃO

PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é verificar *in vivo*, por meio de testes em esmalte, se o chumbo acumulado nos primeiros micrometros do esmalte aumentam ao longo de três anos e se, no mesmo indivíduo, as concentrações de chumbo no esmalte se correlacionam com as concentrações de chumbo encontradas no plasma e na saliva.

MATERIAL E MÉTODO

MATERIAL E MÉTODO

O presente estudo foi inicialmente submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, processo número 2007.1.661.58.7, recebendo parecer favorável e as crianças puderam participar do estudo apenas mediante de concordância dos pais ou responsáveis por meio de consentimento livre e esclarecido (Anexo A).

AMOSTRA E LOCAL DA PESQUISA

A amostra inicial constituiu de cinqüenta crianças com idade de 2 a 3 anos procedentes de Ribeirão Preto que estavam recebendo atendimento odontológico na Clínica de Bebês da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP e alunos da Creche Carochinha (USP-Ribeirão Preto).

Caracterizando um estudo longitudinal, obtiveram-se as seguintes amostras nas idades indicadas abaixo:

PRIMEIRA ETAPA (inicio): 01 amostra de sangue total e 01 amostra de esmalte de um incisivo central superior.

SEGUNDA ETAPA (12 meses após): 01 amostra de sangue total, 01 amostra de plasma sanguíneo, 01 amostra de saliva e 01 amostra de esmalte do dente contralateral. Terceira etapa (24 meses após): 01 amostra de sangue total, 01 amostra de plasma sanguíneo, 01 amostra de saliva e 02 amostras de amostra de esmalte dos incisivos laterais.

O critério de inclusão foi a presença de incisivos centrais e laterais superiores decíduos hígidos.

O atendimento para o exame bucal geral e instruções de higiene bucal estava sendo realizados na Clínica de bebês da FORP/USP, onde também foram realizados os testes de esmalte, a coleta de saliva do assoalho bucal e as coletas de sangue.

MATERIAL

Todos os reagentes utilizados foram de alto grau de pureza analítica. Os tubos para centrífuga (tipo eppendorf - Axygen Scientific, Inc., Union City, USA), ponteiras, pipetas de Pasteur foram previamente deixados em solução de ácido nítrico 10% durante 24 horas. Em seguida, esse material recebeu 5 banhos com água MILI-Q e foi seco em capela de fluxo laminar classe 100. Todo esse procedimento foi realizado dentro de uma sala branca classe 10000. Tal limpeza tinha o objetivo de descontaminação do material para o chumbo.

Coleta das Amostras

SANGUE TOTAL E PLASMA

As amostras de sangue foram coletadas por profissional habilitado e treinado para o trabalho com bebês e crianças menores que três anos.

Antes da coleta de sangue, a pele de cada indivíduo foi limpa com uma solução de álcool 70%. Foram coletados aproximadamente 4 mL de sangue venoso de cada criança, e essa quantidade foi distribuída em diferentes tubos para coleta a vácuo:

- 1 mL em tubo Vacutainer® (trace metals free, BD) com EDTA para a dosagem de chumbo no sangue total;
- 3 mL em tubo Vacutainer® (trace metals free, BD) sem qualquer anticoagulante para a dosagem de chumbo no soro;

As amostras de sangue colocadas no tubo sem anticoagulante foram imediatamente centrifugadas (800xg durante 6 minutos à temperatura ambiente) com o intuito de separar o soro do sangue total e, assim, evitar a transferência do chumbo dos eritrócitos. A fração de soro foi pipetada em eppendorf (2 mL) e imediatamente congelada à -20ºC até sua análise. Schutz *et al.* (1996) sugeriram que a utilização do EDTA como anticoagulante pode causar falsos resultados elevados de chumbo no soro, devido à extração do chumbo dos eritrócitos.

As amostras de soro foram examinadas a olho nu, para verificação da hemólise e foram divididas em 3 grupos: nenhuma, ligeira (sem qualquer coloração

vermelha óbvia) ou com óbvia contaminação pelos eritrócitos. As amostras com ligeira coloração avermelhada foram mantidas no estudo.

As medidas de chumbo no sangue total foram realizadas conforme os parâmetros de tempo e temperatura para determinação de chumbo no sangue listados na Tabela 1. Em todas as medidas foi adicionado o modificador químico de 5 µg de Pd e 3 µg de $Mg(NO_3)_2$. Foi utilizado o espectrômetro de absorção atômica AAnalyst 600 (PerkinElmer, Norwalk, EUA), com amostrador automático AS-800 (PerkinElmer) para introdução das soluções, e um atomizador em tubo de grafite pirolítico aquecido transversalmente, com corretor de fundo por efeito Zeeman longitudinal. Uma lâmpada de descarga sem eletrodo EDL System 2 (PerkinElmer) de chumbo foi utilizada como fonte de radiação para a determinação deste elemento, operada com corrente de 440 mA. A linha analítica utilizada para todas as determinações de Pb foi em 283,3 nm, com largura (fenda) de banda espectral 0,7 nm. Os tubos de grafite possuem plataformas integradas com recobrimento pirolítico (PerkinElmer Part Nº. B3 000641). Como gás inerte de proteção e purga, argônio com pureza de 99,999% (White Martins, São Paulo, Brasil) foi utilizado.

Etapa	**Temperatura (°C)**	**Tempo de rampa (s)**	**Tempo de permanência (s)**	**Fluxo de Ar (mL min^{-1})**
Secagem	130	10	5	250
Secagem	200	05	5	250
Pirólise	700	01	15	250
Atomização	1700	0	3	0
Limpeza	2400	1	2	250

Tabela 1. Programa de tempo-temperatura de ET AAS para a determinação de PB em sangue.

Com os parâmetros utilizados no dia em que foram realizadas as medidas de sangue total, calculou-se o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ).

O LOD (*Limit Of Detection*) é a concentração acima da qual pode-se afirmar que há o analito em questão, porém não se pode afirmar que a concentração medida corresponde à real.

O LOQ (*Limit Of Quantification*) é a concentração acima da qual, pode-se afirma que a concentração mensurada corresponde à concentração real.

Para calcular estes valores, foram realizadas 10 medidas do branco e, dos valores absolutos de sinal de absorbância obtidos, tirou-se o desvio-padrão destas. Por recomendação da IUPAC, multiplicou-se este valor por 3 e então dividiu-se pela inclinação da reta de calibração obtida durante as análises. Para o LOQ foi realizado o mesmo procedimento, porém multiplicou-se o valor por 10, ao invés de 3.
O desvio-padrão destes sinais foi 0,000425 e a reta da curva de calibração feita possuía uma inclinação (slope) de 0,00216. O LOD calculado foi de 0,06 µg/dL e o LOQ foi 0,196 µg /dL ou ~ 0,2 µg/dL.

Para os valores das concentrações de chumbo no sangue total (µg/dL) que ficaram abaixo do LOD, utilizamos o LOQ.

SALIVA

A saliva total foi coletada com uma pipeta de Pasteur. Após uma lavagem da boca da criança, aproximadamente 4 mL de saliva total não estimulada foram coletados em tubo (eppendorf - Axygen Scientific, Inc., Union City, USA). Estes tubos foram centrifugados (15.000g durante 5 minutos à temperatura ambiente) e o sobrenadante recolhido e aliquotado em tubos eppendorfs (2 mL). Foram diluídos 120 µL de amostra de saliva em 2 mL de água milli Q para quantificação das concentrações de chumbo por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICPMS). O limite de detecção do método foi de 0,02 µg/L.

ESMALTE

Foram realizadas 4 microbiópsias em esmalte dental de cada criança, sendo uma microbiópsia em incisivo central superior decíduo direito (dente 51) na primeira etapa, uma microbiópsia no incisivo central superior decíduo esquerdo (dente 61) na segunda etapa e 2 microbiópsias em incisivos laterais decíduos (dentes 52 e 62) na terceira etapa.

TÉCNICA DO TESTE DE ESMALTE

Para a determinação de chumbo nos dentes foram realizados testes no esmalte *in vivo* em dentes decíduos, utilizando-se o método proposto por Brudevold *et al.*, 1975, modificado por Gomes *et al.*, 2004.

Os dentes foram submetidos à profilaxia profissional com escova Robinson (Microdent®) em baixa rotação (Figura 1A), em seguida foram lavados com água MILI Q e secos com jato de ar. Fez-se o isolamento relativo com roletes de algodão.

Em seguida, uma fita adesiva (fita mágica, 810 Scotch® - 3M) com uma perfuração de diâmetro 2,01 mm (Figura 1B) foi firmemente aderida à porção central da superfície vestibular do dente, demarcando o local do teste de esmalte. Nesta demarcação foram depositados, com uma micropipeta automática, 5 µl da solução de HCl a 1,6N em glicerol a 70% (v/v), e agitado suavemente com a ponta do pipetador durante 20 segundos (Figura 1C). A solução dos testes de esmalte foi aspirada e transferida a um tubo de coleta (tubo tipo eppendorf) contendo 200µl de água ultra-pura (MILI Q) (Figura 1D), sendo aplicados em seguida, por 10 segundos, 5 µl de solução de glicerol a 70% na demarcação, os quais também eram aspirados e adicionados à solução presente no tubo de coleta.

Finalizando este procedimento, a fita adesiva era removida, o dente era lavado com água, seco e isolado novamente para receber aplicação de flúor neutro em gel.

O controle dos testes de esmalte foi obtido por meio de brancos e por testes de esmalte controle na superfície da bancada ou sobre as tampas dos raques para ponteira, a fim de verificar a contaminação pelo chumbo no ambiente de trabalho durante os procedimentos.

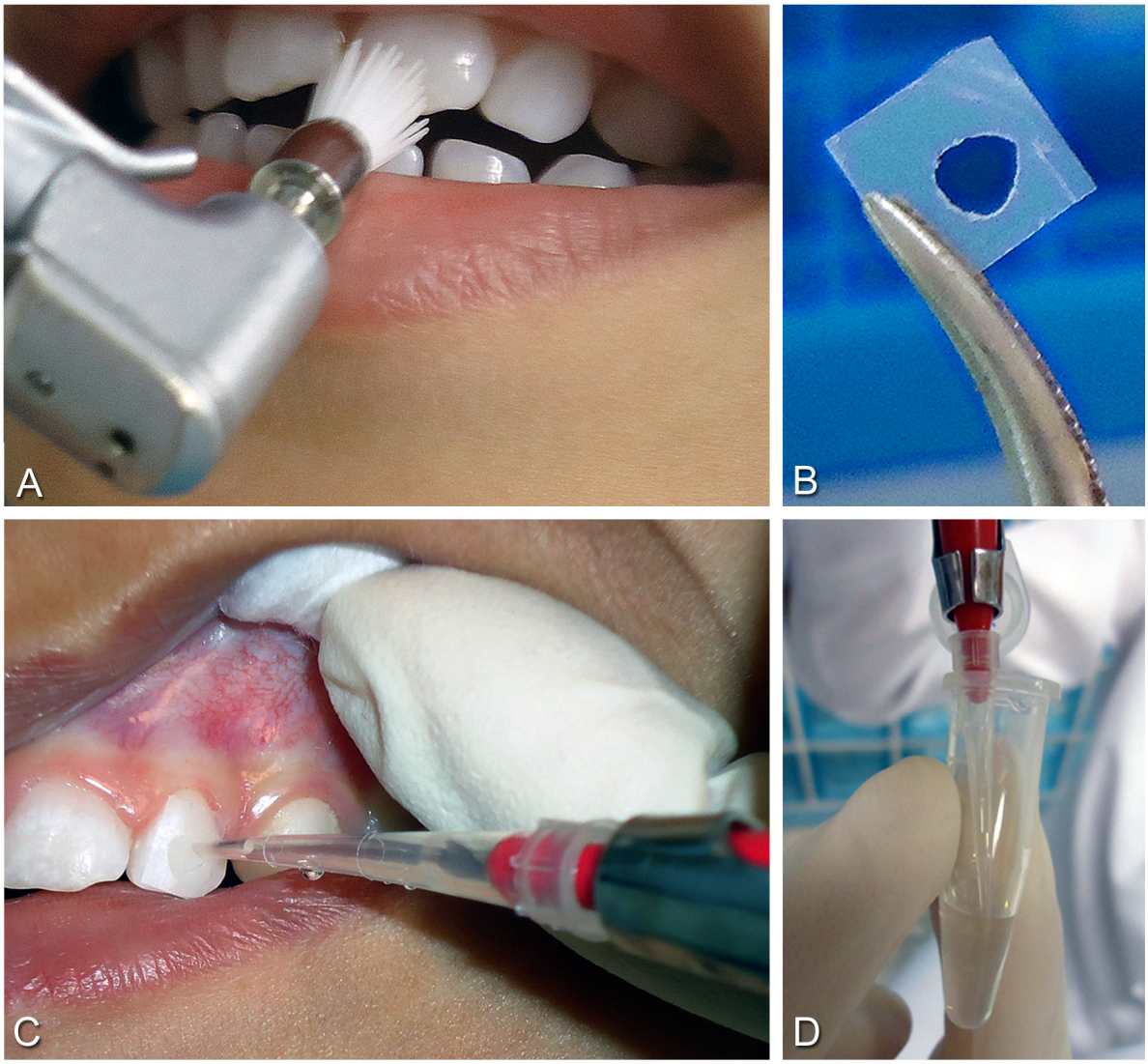

Figura 1. A profilaxia profissional com escova Robinson; B fita adesiva (fita mágica, 810 Scotch ® - 3M) com uma perfuração de diâmetro 2,01 mm; C Teste de esmalte (microbiópsia); D um tubo de coleta contendo 200µl de água ultrapura.

ANÁLISES QUÍMICAS

DETERMINAÇÃO DO FÓSFORO

A fim de determinar a espessura da camada de esmalte removida durante o teste de esmalte, foi dosada a concentração de fósforo inorgânico (P) no esmalte em solução. As concentrações de fósforo presentes nas amostras foram determinadas pelo método colorimétrico de Fiske e Subbarow (1925), cujo princípio é que o fósforo dos fosfatos minerais é transformado em fosfomolibdato, o qual é em seguida reduzido pelo ácido alfa-amino-naftol sulfônico a um produto de cor azul, cuja intensidade de coloração é proporcional ao teor de fósforo inorgânico presente na amostra. A determinação das concentrações de fósforo foi realizada em triplicata. Sendo assim, foram pipetados 30µl de amostra e acrescentou-se 220µl de água deionizada, 50µl de ácido molibdico, agitou-se e após 10 minutos adicionou-se 20µl de reativo redutor, agitou-se novamente e, após 20 minutos, a intensidade de cor foi medida em um leitor de Elisa com um comprimento de onda de 660nm. O aparelho foi calibrado com amostras que apresentavam concentrações conhecidas de fósforo, que foram de: 0µg/ml, 1µg/ml, 2µg/ml, 4µg/ml e 8µg/ml, utilizadas para a realização da curva de calibração.

PROFUNDIDADE DO TESTE DE ESMALTE

A concentração de fósforo foi utilizada para o cálculo da quantidade (g) de esmalte removido. Com base em estudos prévios sabe-se que o esmalte humano é formado de cristais de hidroxiapatita (Ca10 (PO4)6(OH)2). A hidroxiapatita, principal constituinte do esmalte, contém 17,4% de P (Lazzari, 1976) e 37,1% de Ca (Brudevold *et al.*, 1956), em peso e o esmalte possui uma densidade de 2,95 g/mL (Weidmann *et al.*, 1967). A partir disso foi feito o cálculo da quantidade de esmalte removido e da profundidade da camada da microbiópsia.

A profundidade foi então calculada usando-se a fórmula do volume do cilindro - figura geométrica que se assemelha à camada do esmalte removido.

A profundidade equivale, nesta figura, à altura do cilindro, e foi deduzida pela expressão abaixo:

$v = B.\ h$ (1)

$h = v / B$ (1')

$d = m / v$ (2)

$v = m / d$ (2')

Substituindo-se 2' em 1', tem-se:

$h = m / B.\ d$ (3)

$B = \pi . r^2$ (4)

Substituindo-se 4 em 3 encontra-se:

$h = m / \pi . r^2 . d$

Sendo:

v= volume do cilindro

B= área da base do cilindro

h= altura do cilindro (profundidade da biópsia)

d= densidade do esmalte (2,95g/mL)

m= massa do esmalte

r= raio da microbiópsia

$\pi = 3,14$

Os resultados da profundidade das microbiópsias de esmalte foram expressos em µm.

ANÁLISE DE REGRESSÃO LOG-LOG

Para comparar a concentração de chumbo em amostras de esmalte superficial foi necessário definir uma equação que permitisse calcular a concentração de chumbo em uma mesma profundidade. Nesta equação o ponto "x" representa a profundidade em µm o "y" representa a concentração de chumbo em µg/g. Os dados seguintes (Tabela 2) serão utilizados para exemplificar os cálculos realizados.

x (Profundidade em µm)	y (Pb em µg/g)
1,55	633,6
4,05	355,19
7,83	216,23
10,41	124,9
14,16	14,59

Tabela 2. Profundidade da microbiópsia em µm X concentração de PB em µg/g.

Os dados foram computados e transformamos em logaritmo natural (Ln). Em seguida, foi realizada a regressão linear. A regressão linear fornece o valor do logaritmo natural (Ln) de α (intercept no eixo y, quando x = 0,0) e o β (slope).

A equação é dada por:

$$Ln\ (y) = Ln\ (\alpha) + \beta\ Ln\ (x)$$

$$\text{Onde, } y = \alpha\ x^{\beta}$$

A regressão linear nos dá o valor de ln (α). Para deduzirmos o valor de α, calculamos ln (α) = α. (Lê-se exponencial do logaritmo natural de α é igual ao próprio α).

Ao realizar a regressão linear no Graph Prism 5 determinou-se os valores de β e Ln (α)

$$\beta = -1,3855$$

$$Ln\ (\alpha) = 7,5045$$

Calculamos e ln $^{(\alpha)}$ = α, onde e ln $^{(7,\ 5045)}$ = 1816, 1969

y = α x $^{\beta}$, substituindo α por 1816, 1969 e β= - 1, 3855, temos Y = 1816,1969 . x - 1, 3855

Exemplificando, para saber qual a concentração de chumbo numa profundidade de 6 µm, basta substituir 6 em x, ou seja:

y= 1816, 1969. 6 $^{-1,\ 3855}$ = 1816, 1969. 0, 08353557 = 151, 71704

Neste caso, pode-se dizer que numa profundidade de 6 µm, a concentração de chumbo encontrada é de 151,71704 µg/g de chumbo.

Esta fórmula matemática permite fazer o cálculo para ter a concentração de chumbo em uma mesma profundidade em todos os dentes analisados. Este cálculo é muito importante, uma vez que a concentração de chumbo diminui na parte mais interna do esmalte, de modo que teste de esmalte mais rasos tem mais chumbo (Souza Guerra, 2010).

A fórmula foi descrita por Souza Guerra, 2010, porém foi desenvolvida pelo Prof. Dr. Rafael Andrés Rosales Mitrowsky do Departamento de Computação e Matemática, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, USP. Inicialmente os dados de concentração de chumbo na superfície do esmalte de diferentes cidades (Ribeirão Preto, SP; Santo Amaro, BA; Cubatão, SP) e os dados de profundidade de biópsia sofreram transformação logarítmica para sua utilização na regressão linear. A equação é mostrada abaixo, sendo que x representa a profundidade (µm) e y é a concentração de chumbo (µg/g).

$$Ln\ (y) = Ln\ (\alpha) + \beta\ Ln\ (x)$$

$$\text{Onde } y = \alpha\ x^{\beta}$$

Neste estudo, as análises estatísticas foram feitas com base nesta fórmula matemática utilizando profundidade média de 3,4 µm conforme figura 2.

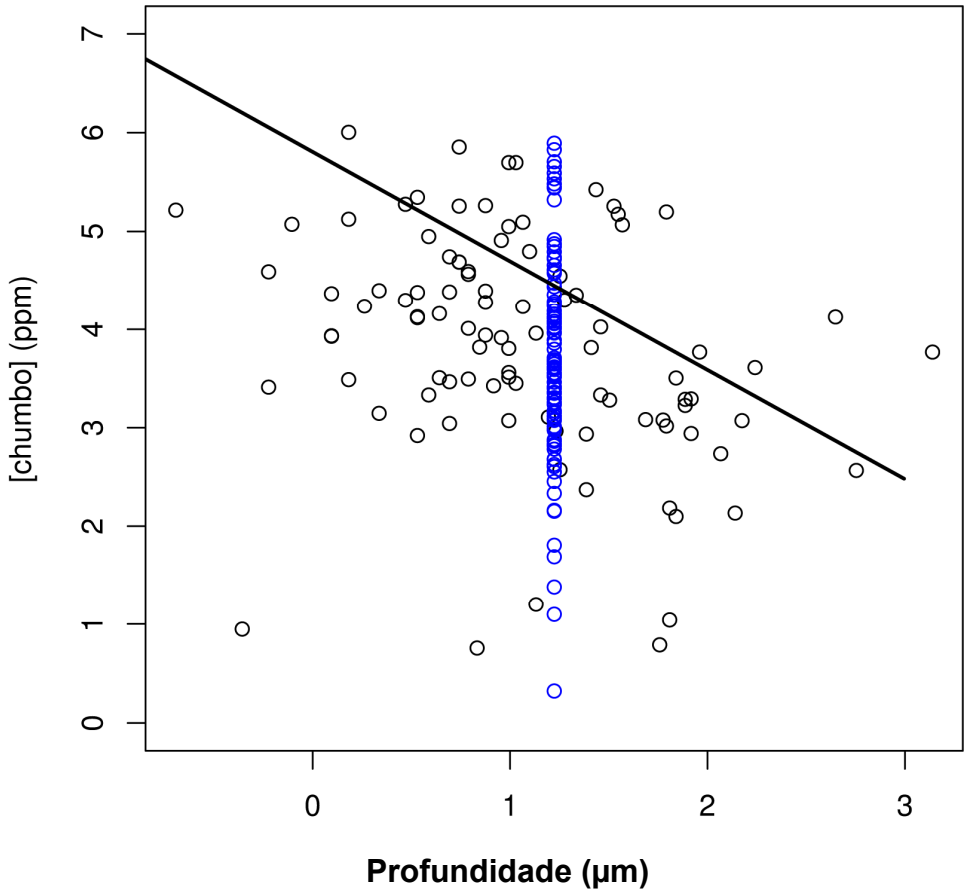

Figura 2. Cálculo da concentração de chumbo em uma mesma profundidade (3,4 µm, que foi a profundidade média obtida nos 104 testes feitos neste estudo). Os pontos marcados em azul representam as concentrações de chumbo calculadas. Os pontos em preto representam os valores originalmente obtidos.

Análise estatística

A normalidade da distribuição de todas variáveis contínuas foram analisadas, com o objetivo de selecionar o melhor método estatístico. Visto que a distribuição da concentração de chumbo nas amostras não foi normal, utilizamos o teste não paramétrico de Mann Whitney para fazer as comparações de concentração de chumbo na saliva e no plasma (2 comparações) e Kruskal-Wallis para o teste no esmalte dental e sangue total. Ao utilizar o Kruskal-Wallis, foi utilizado o teste pos-hoc de comparação múltipla de Dunn. Na análise de sangue total três amostras foram eliminadas da análise de dados devido à discrepância muito grande de valores, uma delas exibiu valor de 6,8 µg/dL na coleta intermediária e 2 valores abaixo do LOQ no primeiro e terceiro ano, Como a amostra era constituída por crianças nas quais se esperava baixa exposição, foi considerado que um ponto erroneamente alto pudesse gerar um impacto negativo sobre as análises.

Uma vez que nenhum dos grupos estudados teve distribuição normal, a concentração de chumbo no sangue, plasma e esmalte dental foram transformadas em log10, com o objetivo de normalizar os dados, e o coeficiente de correlação de Pearson (r, *p*) foi calculado. Mesmo após esta transformação, dois grupos ainda não apresentaram distribuição normal, o grupo Plasma 2011 e Esmalte 2010. As associações que envolviam estes grupos foram testadas utilizando-se a correlação de Spearman.

O nível de significância utilizado em cada uma das estatísticas foi de 0,05 e a análise estatística foi realizada com o Programa Graph Pad Prism (Versão 3.0).

RESULTADOS

RESULTADOS

AMOSTRAS DE SANGUE TOTAL

As análises foram feitas no Laboratório de Metais do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da FORP/USP, pelo método da análise direta de sangue descrita por Parsons & Slavin (1993) por espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite. Todo o material utilizado foi de qualidade ultrapura, incluindo o Triton X-100 da MERCK®. O ácido nítrico utilizado foi bidestilado. O LOQ de chumbo nas amostras de sangue foi 0,2 µg/dL.

No primeiro ano desta pesquisa (2009) obteve-se resultados de chumbo no sangue de 41 crianças e de 29 amostras de esmalte. No segundo ano (2010) dezessete abandonaram o estudo devido ao não consentimento dos pais (retirado verbalmente). No segundo ano (2010), foram coletadas 26 amostras de sangue total, porém, durante a análise estatística duas amostras foram eliminadas devido à discrepância de valores no ano subseqüente. No ano de 2011 foram coletadas 23 amostras de sangue total. Algumas crianças que haviam permitido a coleta em 2009 não tiveram o seu sangue coletado em 2010, mas o tiveram em 2011. Outras ainda não permitiram a ultima coleta, e assim só temos resultados das primeiras e segundas coletas de algumas crianças.

CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO NO SANGUE

No ano de 2009 a concentração de chumbo no sangue total foi variou de 0,2 µg/dL a 7,48 µg/dL e teve como a mediana 0,26 µg/dL. Apenas uma criança apresentou nível de chumbo no sangue ≥ 5 µg/dL. No ano de 2010 a concentração de chumbo no sangue total variou de 0,2 µg/dL a 3,82 µg/dL e teve como a mediana 0,32 µg/dL. No ano de 2011 a concentração de chumbo no sangue variou de 1,15 µg/dL a 3,55 µg/dL e teve como mediana 0,95 µg/dL.

A Tabela 3 mostra a distribuição das crianças de acordo com o chumbo no sangue nos anos de 2009 a 2011.

	2009	2010	2011
N	41	24	21
Distribuição normal	Não	Sim	Não
Média (±DP)	0,82 ± 1,32	1,02 ± 1,97	1,19 ± 1,06
Mediana	0,26	0,32	0,95
Q1 – Q3	0,2 – 0,91	0,2 – 1,49	0,12 – 1,92
Mínimo - Máximo	0,2 – 7,48	0,2 – 3,82	1,15 – 3,55

Tabela 3. Resultados da concentração de chumbo no sangue total (µg/dL) de crianças de Ribeirão Preto ao longo do período de 2009 a 2011. Ribeirão Preto, 2012.
Limite de quantificação: 0,2 µg/dL
DP: Desvio Padrão

Os dados de chumbo no sangue (Tabela 3) não apresentam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ($p>0.05$).

Na Tabela 4 e na Tabela 5 são apresentados os dados obtidos para as concentrações de chumbo no plasma e na saliva, respectivamente, assim como um sumário da estatística de cada grupo, com o ***n***, tipo de distribuição, a média, mediana, Q1, Q3, valores mínimo e máximo. Não houve diferença estatisticamente significante entre os grupos (saliva 2010 x saliva 2011; plasma 2010 x plasma 2011) (teste de Mann Whitney; $p>0.05$).

	2010	2011
N	24	22
Distribuição normal	Não	Não
Média (±DP)	1,03 ± 1,00	0,60 ± 0,28
Mediana	0,49	0,52
Q1 – Q3	0,41 – 1,45	0,46– 0,61
Mínimo – Máximo	0,29 – 3,20	0,38 – 1,60

Tabela 4. Resultados da concentração de chumbo no plasma (µg/L) de crianças de Ribeirão Preto no período de 2010 a 2011. Ribeirão Preto, 2012. Limite de Detecção: 0,01 µg/L
DP: Desvio Padrão

	2010	2011
N	31	24
Distribuição normal	não	Não
Média (±DP)	0,46 ± 0,57	0,41 ± 0,85
Mediana	0,34	0,19
Q1 – Q3	0,08 – 0,63	0,12 – 0,34
Mínimo – Máximo	0,02 – 3,00	0,02 – 4,27

Tabela 5. Resultados da concentração de chumbo na saliva total (µg/L) de crianças de Ribeirão Preto ao longo do período de 2010 a 2011. Ribeirão Preto, 2012.
Limite de detecção: 0,02 µg/L
DP: Desvio Padrão

A Figura 3 apresenta os resultados da análise de correlação entre os resultados de chumbo no sangue obtidos no ano de 2009 e 2010. Esta análise foi feita com os resultados "brutos", ou seja, sem sofrer transformação logarítmica, ou outra transformação. Das análises de correlação dos dados de sangue total, houve correlação moderada e estatisticamente significante entre as amostras de sangue de 2009 e 2010 (r de Spearman = 0,60 e p=0,0062).

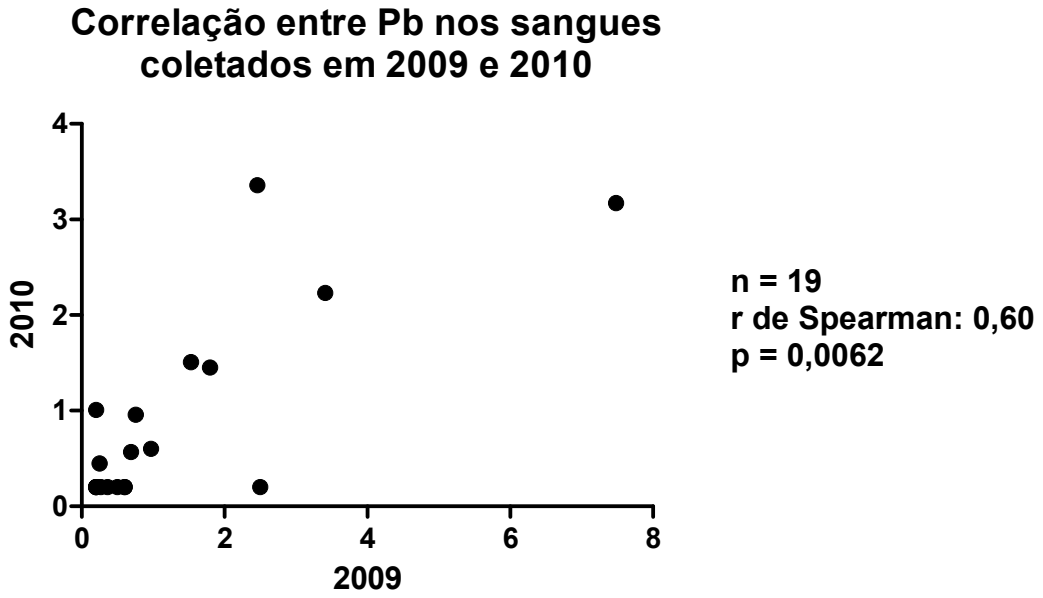

Figura 3. Correlação entre as concentrações de Pb (µg/g) nos sangues coletados em 2009 e 2010 (valores sem transformação logarítmica)

ESMALTE

Foram analisadas amostras de esmalte coletadas entre 2009 e 2011. Os valores de chumbo foram recalculados para uma mesma profundidade, que foi 3,4 µm (este valor foi a média de todas as profundidades verificadas nos testes de esmalte dos três anos). Este cálculo foi baseado na descrição feita por de Souza Guerra (2010). Como o chumbo se acumula nos primeiros micrometros externos do esmalte, o cálculo de chumbo em uma mesma profundidade para todos os dentes é muito importante para poder comparar valores de chumbo.

Em 2009 as amostras foram coletadas no incisivo central superior direito (dente 51) decíduo. Em 2010 as amostras foram coletadas no incisivo central superior esquerdo (dente 61) decíduo. Em 2011 as amostras foram coletadas nos dois incisivos superiores laterais (dente 52 e 62). O grau de concordância dos valores de chumbo obtidos nos dois dentes cujas amostras foram coletadas em 2011 foi de 50%. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significante entre os valores obtidos para estes dois dentes ($p= 0,19$; teste *t* não pareado). Por este motivo foi usado um dos valores (dente direito, 52) apenas para todas as análises. Além disso, havia seis amostras a menos no grupo dos dentes 62, por questões de coleta.

Os detalhes das concentrações de chumbo verificadas no esmalte são mostrados na Tabela 6. Estes dados já foram calculados para a profundidade de 3,4 µm em todas as amostras. Nenhum dos grupos (esmalte 2009, esmalte 2010 e esmalte 2011) teve distribuição normal. Não foi verificada diferença estatisticamente significante entre estes 3 grupos ($p=0,71$, teste de Kruskal-Wallis).

	2009	2010	2011
n	29	31	22
Distribuição normal	não	não	não
Média (±DP)	68,88 ± 76,45	53,97 ± 59,35	62,40 ± 69,42
Mediana	36,26	34,97	38,27
Q1 – Q3	20,72 – 105,2	19,59 – 63,69	20,83 – 60,76
Mínimo - Máximo	3,00 – 339,5	0,44 – 267,90	11,63 – 240,2

Tabela 6. Resultados da concentração de chumbo (µg/g) nas amostras de esmalte de incisivos decíduos na profundidade de 3,4 µm de crianças de Ribeirão Preto ao longo do período de 2009 a 2011. Ribeirão Preto, 2012.
DP: Desvio Padrão
2009: amostras (dente 51)
2010: amostras (dente 61)
2011: amostras (dente 52)

A análise de correlação foi feita após a transformação logarítmica (log_{10}) de todos os valores.

O resultado desta análise é mostrado na Tabela 7. Esta Tabela apresenta 28 comparações, e estão marcadas em negrito as associações cujo p é igual ou menor do que 5%. Mesmo após a transformação logarítmica 2 grupos ainda não apresentaram distribuição normal, que são o grupo **Plasma 2011** e **Esmalte 2010**. Estes grupos estão sublinhados na Tabela 7, para facilitar sua visualização. As associações que envolviam estes grupos foram testadas utilizando-se a correlação de Spearman, enquanto todas as demais associações foram testadas utilizando-se o teste de correlação de Pearson. Por este motivo, nesta Tabela 6 são vistos resultados de rS e rP, que equivalem ao r de Spearman e r de Pearson, respectivamente.

As correlações significativas foram: entre Sangue Total 2009 e Sangue Total 2010 (rP = 0,64 e p = 0,002), Sangue Total 2010 e Sangue Total 2011 (rP = 0,66 e p = 0,002); Esmalte 2011 e Sangue Total 2009 (rP= 0,44; p=0,05), entre Esmalte 2011 e Saliva 2010 (rP = - 0,55 e p = 0,013) e entre Esmalte 2009 e Esmalte 2010 (rS = 0,45 e p=0,03).

Tabela 7. Correlações entre os valores de log 10 das concentrações de chumbo determinadas nos diferentes fluidos e amostras de esmalte superficial coletados entre 2009 e 2011. Total de 28 comparações, estando destacadas em negritos aquelas que atingiram significância estatística ao nível de 5% e sublinhados os grupos que não apresentaram distribuição normal após transformação logarítmica. Ribeirão Preto, 2012.

	ST 2010	**ST 2011**	**P 2010**	**P 2011**	**S 2010**	**S 2011**	**E 2009**	**E 2010**	**E 2011**
ST 2009	**n= 20** **rP = 0,64** **p = 0,002**	n= 17 rP = 0,38 p = 0,12	X	X	X	X	n= 24 rP = 0,22 p = 0,28	n= 24 rS = 0,16 p = 0,43	**n= 20** **rP = 0,44** **p = 0,05**
ST 2010		**n= 19** **rP = 0,66** **p = 0,002**	n = 19 rP = 0,13 p = 0,59	X	n= 17 rP = - 0,05 p = 0,82	X	n= 20 rP = -0,13 p = 0,56	n= 18 rS = 0,03 p = 0,88	n= 15 rP = - 0,3 p = 0 , 23
ST 2011			X	n= 20 rS = - 0,22 p = 0,37	X	n= 19 rP = - 0,04 p = 0,84	X	X	n= 17 rP = 0,04 p = 0,98
P 2010				n = 21 rS= 0,10 p = 0,63	n= 22 rP = 0,07 p = 0,73	X	X	n= 22 rS = 0,25 p = 0,24	n= 18 rP = 0,044 p = 0,86
P 2011					X	n= 20 rS = 0,02 p = 0,90	X	X	n= 18 rS = 0,19 p = 0,43
S 2010						n= 22 rP = -0,09 p = 0,67	n= 21 rP = -0,26 p = 24	n= 21 rS = -0,18 p = 0,42	**n= 19** **rP = -0,55** **p = 0,013**
S 2011							X	X	n= 19 rP = -0,07 p = 0,74
E 2009								**n= 22** **rS = 0,45** **p = 0,03**	n= 19 rP = 0,16 p = 0,51
E 2010									n= 19 rS = 0,39 p = 0,09

ST = Sangue Total; P = Plasma; S = Saliva; E = Esmalte; rS = r de Spearman; rP = r de Pearson; X = associação sem sentido biológico, por isso não testada durante a análise.

DISCUSSÃO

Discussão

As crianças participaram deste estudo ao longo de 3 anos (2009-2011). Entretanto, nem todas apresentam amostras de todos os fluidos ou esmalte em todos os períodos, pois muitas vezes a própria criança não colaborou ou o seu responsável não permitiu as coletas em determinados momentos. Também não foram coletadas muitas amostras por falta de interesse dos participantes, a despeito de muitas chamadas por telefone. Assim, o grupo final e as análises de correlação foram feitas com amostras de aproximadamente de 20 crianças, conforme tabela 7.

Como há poucos trabalhos de chumbo no Brasil, este estudo traz, as primeiras informações no Brasil sobre valores de chumbo em sangue de crianças de 3-5 anos de baixa exposição, e estes valores são relativamente baixos em comparação com os descritos em outros países para indivíduos da mesma idade (média 2,1 µg/dL nos EUA, NHANES 2010) e para crianças de 6-8 anos no Brasil (2,2 µg/dL), embora este estudo não seja um estudo epidemiológico e os valores obtidos não possam ser extrapolados para a população de Ribeirão Preto (Costa de Almeida *et al.*, 2010). A média dos valores de chumbo no sangue (em µg/dL) vistos neste estudo no ano de 2009 foi de 0,82 (±1,32). Em 2010, a média foi 1,02 (±1,97), ao passo que em 2011 a média foi 1,19 (±1,06). Uma observação digna de nota é que os valores têm uma tendência a subir, embora não haja diferenças estatisticamente significantes. Isso deveria ser observado em um grupo maior de crianças em acompanhamento ao longo de anos. Nos trabalhos que avaliam crianças, os valores de chumbo no sangue apresentam seu pico entre 12 e 36 meses, diminuindo a partir deste momento. Uma vez que os resultados deste trabalho sugerem que seja diferente neste grupo de indivíduos, seria interessante verificar se os valores continuam subindo em idades maiores, o que talvez indicasse outras fontes de exposição no Brasil. Porém, seria bastante especulativo, uma vez que este estudo não foi desenhado para determinar a média na população ou como esta se comporta ao longo dos anos.

Do ponto de vista da proposição e objetivo deste trabalho, as médias no sangue obtidas servem para comprovar que as crianças que participaram do estudo apresentavam baixa exposição inicial e que esta continuou baixa, no que se refere a chumbo no sangue total. Mesmo havendo uma tendência a subir, esta não foi

estatisticamente significante e os valores de chumbo foram baixos comparados com outras populações. Este dado inicial de sangue é muito importante, pois o sangue ainda é o único marcador aceito para caracterizar a exposição a chumbo em crianças e amplamente utilizado.

Plasma e saliva tiveram valores também baixos, sendo os valores de saliva ainda menores. É um grande desafio centrifugar rapidamente o plasma, na verdade soro, uma vez que a coleta foi feita em tubo Vacutainer® (trace metals free, BD) sem nenhum tipo de anticoagulante, para obter amostras com os valores reais de chumbo (antes da hemólise), que se torna inevitável à medida que o tempo passa.

O tempo decorrido ter prejudicado a coleta de plasma, devido à dificuldade de coletar e centrifugar estas amostras rapidamente (eram necessários entre 5-15 minutos), principalmente pelo aspecto do estresse da criança durante a coleta de sangue. A grande variabilidade vista nestes dados talvez decorra deste aspecto, bem como a ausência de correlação entre plasma e sangue do mesmo ano, que seria uma correlação esperada se as medidas de plasma representassem realmente o chumbo que havia só no plasma da criança, e não em uma possível fração advinda das hemácias (esta totalmente variável e impossível de quantificar). Ainda no plasma, houve uma amostra com valor muito alto, tornando difícil com a amostra pequena saber se este valor, fora da distribuição, afetou a análise de correlação. Devido ao enorme desafio de quantificar chumbo no plasma e na saliva, uma vez que o chumbo presente nestes fluidos está normalmente abaixo de 3 µg/L, qualquer pequena contaminação em um dos passos de coleta, estocagem ou na preparação para a medida são críticos e podem afetar o resultado aumentando os valores de chumbo. Neste estudo, muitas medidas para diminuir a contaminação foram tomadas (tubos limpos, manipulação utilizando ponteiras lavadas em ácido nítrico, manipulação dentro de capela de fluxo laminar), mas não é possível descartar que os valores que fogem à distribuição (principalmente nestes 2 fluidos) sejam devidos a contaminação no processo de coleta e preparo das amostras para determinação de chumbo.

Também as amostras de esmalte apresentaram valores bastante baixos, tendo em vista os baixos valores de chumbo no sangue das crianças que participaram deste estudo. As medianas de chumbo no esmalte dos anos de 2009, 2010 e 2011 foram 36,2; 35 e 38,3 µg/g de esmalte coletado, após o ajuste dos valores para a

mesma profundidade. Um dos objetivos deste estudo era analisar os valores de chumbo na superfície do esmalte ao longo dos anos, e o resultado acima mostra de forma clara que, quando as crianças apresentam baixa exposição ambiental a chumbo, as concentrações deste no esmalte não mudam ao longo dos anos. A análise estatística mostrou claramente que não houve diferença, mas os valores estão tão próximos, que é impressionante detectar valores de chumbo no esmalte tão coincidentes, com variações menores do que 10%, uma vez que as variações geralmente observadas para os valores de chumbo no esmalte foram muito grandes, da ordem de centenas de µg/g. Talvez, a correção para uma mesma profundidade, feita com parâmetros bastante corretos geraram os dados tão coincidentes neste estudo.

Das 28 associações testadas, foram estatisticamente significantes e positivas aquelas entre o sangue total de 2009 e sangue total 2010; sangue total de 2010 e sangue total 2011; sangue total de 2009 e o esmalte de 2011; o esmalte de 2009 e o esmalte de 2010. Houve uma tendência na associação entre o esmalte de 2010 e o esmalte de 2011 ($p = 0,09$). Como 40 amostras de sangue de um total de 86 ficaram abaixo do LOQ, um procedimento necessário antes da publicação destes resultados é reanalisar todas as amostras de sangue por ICP-MS, para verificar com exatidão quais são os valores de chumbo presentes em cada amostra. Desta forma provavelmente as análises estatísticas que envolvem sangue fiquem muito mais robustas, mesmo com um número relativamente pequeno de amostras em cada grupo. Outra associação estatisticamente significante neste estudo foi uma associação negativa verificada entre a saliva de 2010 e o esmalte de 2011. Esta associação não era esperada, embora na literatura haja vários trabalhos que mostram associação entre esmalte e saliva, inclusive alguns trabalhos do nosso grupo (Costa de Almeida *et al.*, 2009 e Costa de Almeida *et al.*, 2011). O aspecto inusitado deste resultado, entretanto é o fato da correlação ser inversa, sugerindo que possivelmente a saliva estivesse perdendo chumbo que aparece no ano seguinte acumulado no esmalte. Esta associação pode ser interessante, mas precisará ser estudada adequadamente *in vitro* e em modelos animais. Em trabalho recente do nosso grupo sobre cárie e chumbo foi demonstrado que o esmalte é sim uma matriz

que incorpora chumbo, mesmo quando se utiliza o esmalte bovino maduro no modelo de cárie *in vitro* (Molina *et al.*, 2011).

O desenho deste trabalho (a longo prazo) permitiu pela primeira vez comprovar que há relação entre os valores no esmalte dentário superficial e os valores de chumbo no sangue total medidos 24 meses antes. Este é o primeiro estudo feito em uma população caracterizada por exposição muito baixa que demonstra que existe uma associação entre chumbo no sangue (no passado) e no esmalte atual.

Este estudo tem muitas limitações, sendo a principal delas a pequena amostragem. Em contrapartida, o extremo zelo permitiu que algumas conclusões fossem tiradas mesmo com esta limitação. Uma amostragem muito maior poderia talvez, comprometer a qualidade das análises, que foi crítica para este trabalho.

CONCLUSÕES

Conclusões

1. Os valores de chumbo obtidos em todas as amostras ao longo de 3 anos (cerca de 20 crianças) caracterizam baixa exposição a chumbo no grupo estudado.

2. As concentrações de chumbo no sangue destas crianças entre 2-5 anos não variaram ao longo do tempo e as concentrações de chumbo obtidas no esmalte permaneceram entre 35 e 38 µg/g ao longo dos 3 anos de estudo na profundidade de 3,4 µm.

3. Houve correlação positiva entre o sangue total de 2009 e o sangue total de 2010; entre sangue total de 2010 e sangue total de 2011; sangue total de 2009 e o esmalte de 2011 e o esmalte de 2009 e o esmalte de 2010.

4. Houve uma associação inversa entre a saliva de 2010 e esmalte de 2011.

5. Os resultados sugerem que o esmalte tenha associação com a exposição de chumbo passada, caracterizado pelos valores de chumbo no sangue total.

6. Os resultados sugerem que o esmalte possa ser uma forma fidedigna de avaliar o grau de exposição a chumbo, mesmo em populações com baixa exposição.

7. Os resultados sugerem que, em crianças de 2 a 5 anos de idade, com baixa exposição a chumbo e baixa atividade de cárie, não haja incorporação de chumbo no esmalte superficial de dentes decíduos em quantidades significativas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Anttila A. Lead content of deciduous tooth enamel from a high-radon area. Acta Odontol Scand. 45,283-288, 1987.

Arora M, Kennedy, BJ, Elhlou S, Pearson NJ, Walker, DM, Bayl P, Chan SWY. Spatial distribution of lead in human primary teeth as a biomarker of pre- and neonatal lead exposure. Sci Total Environ. 371, 55–62, 2006.

Arora M, Kennedy, BJ, Ryan CG, Ross AB, Walker DM, Harland CL, Lay B et al. The application of synchrotron radiation induced X-ray emission in the measurement of zinc and lead in wistar rat ameloblasts. Arch Oral Biol. 52, 938-944, 2007.

ATSDR.2001.Hair Analysis Panel Discussion: Exploring the state of the Science. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry.Avaiable:http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/hair_analysis/ acessado em 15 de Abril de 2005.

Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ: A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. Environ Health Perspect 113:1669, 2005.

Bellinger DC, Stiles KM, Needleman HL. Low-level lead exposure, intelligence and academic achievement: a long-term follow-up study. Pediatrics 1992;90:855–61.

Binns HJ, Campbell C, Brown MJ. Interpreting and managing Blood lead levels of les than 10 µg/dL in children and reducing childhood exposure to lead: recommendations of the Centers for Disease Control and Prevention Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention (CDC-ACCLPP). Pediatrics 120(5):1285-1299, 2007.

Brudevold F, Steadman LT: The distribution of lead in human enamel. J Dent Res 35:430, 1956.

Brudevold F, Reda A, Aasenden R, Bakhos Y. Determination of trace elements in surface enamel of human teeth by a new biopsy procedure. Arch Oral Biol 20:667, 1975.

Brudevold F, Aasenden R, Srinivasian BN, Bakhos Y: Lead in enamel and saliva, dental caries and the use of enamel biopsies for measuring past exposure to lead. J Dent Res 56:1165, 1977.

Cake KM, Bowins RJ, Vaillancourt C, Gordon CL, McNutt RH, Laporte R et al.: Partition of circulating lead between serum and red cells is different for internal and external sources of lead. Am J Ind Med 29:440, 1996.

Calabrese EJ, Stanek EJ, James SM: Soil ingestion: a concern for acute toxicity in clildren. Environ Health Perspect 105:1354, 1997.

Canfield RL, Henderson CR Jr, Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 microg per deciliter. N Engl J Med. 2003 Apr 17;348(16):1517-26.

Centers for Disease Control. Fourth national report on human exposure to environmental chemicals. Atlanta (GA): CDC; 2009. Available from URL: http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport_ExecutiveSummary.pdf

Chiodo LM, Jacobson SW, Jacobson JL. Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels. Neurotoxicol Teratol 2004;26:359–71.

Cicuttini FM, Fairley CK, McNeil JJ, Taylor ER: The public health problem of environmental lead exposure. Med J Aust 160:173, 1994.

Cleymaet, R., Bottenberg, P., Retief, D.H., Slop, D., Michotte, Y., Coomans, D,. In vivo use of a dual acid etch biopsy for the evaluation of lead profiles in human surface enamel. Caries Res. 25,256-263, 1991a.

Cleymaet, R., Bottenberg, P., Slop, D., Clara, R., Coomans, D., Study of lead and cadmium content of surface enamel of schoolchildren from an industrial area in Belgium. Community Dent Oral Epidemiol. 19,107-111, 1991b.

Cleymaet, R., Quartier, E., Slop, D., Retief, D.H., Smeyers-Verbeke, J., Coomans, D., Model for assessment of lead content in human surface enamel. J Toxicol Environ Health. 32,111-127, 1991c.

Cleymaet, R., Retief, D.H., Quartier, E., Slop, D., Coomans, D., Michotte, Y. A comparative study of the lead and cadmium content of surface enamel of Belgian and Kenyan children. Sci Total Environ. 104,175-189, 1991d.

Cleymaet, R., Collys, K., Retief, D.H., Michotte, Y.,Slop, D., Taghon, E., Maex, W., Coomans, D. Relation between lead in surface tooth enamel, blood, and saliva from children residing in the vinicity of a non-ferrous metal plant in Belgian. 48, 702-9, 1991e.

Costa de Almeida GR, Molina GF, Meschiari CA, Barbosa de Sousa F, Gerlach RF. Analysis of enamel microbiopsies in shed primary teeth by Scanning Electron microscopy (SEM) and Polarizing Microscopy (PM). Sci Total Environ. 2009; 407:
5169-75.

Costa de Almeida GR, Saraiva MCP, Barbosa F, Krug FJ, Cury JA, Sousa MLR, Buzalaf MAR, Gerlach RF. Differences in lead content of deciduous teeth surface enamel sampled in vivo from children living in an apparently not-contamined and in a lead-contaminated area: a contribution for the development of an accessible marker of lead exposure in children. Environ Res 104(3):337-45, 2007.

Costa de Almeida GR, de Souza Guerra C, Tanus-Santos JE, Barbosa F Jr, Gerlach RF. A plateau detected in lead accumulation in subsurface deciduous enamel from individuals exposed to lead may be useful to identify children and regions exposed to higher levels of lead. Environ Res 2008; 107(2): 264-70.

Costa de Almeida GR, Molina GF, Meschiari CA, Barbosa de Sousa F, Gerlach RF. Analysis of enamel microbiopsies in shed primary teeth by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Polarizing Microscopy (PM). Sci Total Environ 2009b;407(18):5169-75.

Costa de Almeida GR, de Freitas CU, Barbosa Jr F, Tanus-Santos JE, Gerlach RF. Lead in saliva from lead-exposed and unexposed children. Sci Total Environ 2009 ;407: 1547–50.

de Freitas CU, De Capitani EM, Gouveia N, Simonetti MH, de Paula E Silva MR, Kira CS, Sakuma AM, de Fatima Henriques Carvalho M, Duran MC, Tiglea P, de Abreu MH. Lead exposure in an urban community: investigation of risk factors and assessment of the impact of lead abatement measures. Environ Res., 103:338-44, 2007.

de Souza Guerra C, Fernanda Gerlach R, Graciele Villela Pinto N, Coutinho Cardoso S, Moreira S, Pereira de Almeida A, Teixeira Alves Peixoto I, Henrique Meloni C, Lemos Mota C, Fernando de Oliveira L, Braz D, Cely Barroso R. X-ray fluorescence with synchrotron radiation to elemental analysis of lead and calcium content of primary teeth. Appl Radiat Isot. 2009;68(1):71-5.

de Souza Guerra C. Utilização de dentes decíduos de regiões com diferentes históricos de contaminação ambiental para detecção de grupos de crianças expostas ao chumbo no Brasil (tese) -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Ericson JE. Enamel lead biomarker for prenatal exposure assessment. Environ Res 87:136-140, 2001.

Fiske C H, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. J Biol Chem 1925;66:375-400.

Freitas, C U. Estratégias de abordagem para exposição ambiental ao chumbo no estado de São Paulo. São Paulo: Centro de Vigilância Epidemiológica do estado de São Paulo. Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/chumbo.htm. Acessado em 23 Nov 2001.

Gil F, Perez M L, Facio A, Villanueva E, Tojo R, Gil A. Dental lead levels in the Galician population, Spain. Sci Total Environ 156:145-150, 1994.

Gilbert SG, Weiss B. A rationale for lowering the blood lead action level from 10 to 2 microg/dL. Neurotoxicology 2006;27:693–701.

Gomes VE, Sousa M LR, Barbosa F, Krug FJ, Saraiva MCP, Cury JA, Gerlach RF: In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of pre-school children. Sci Total Environ 320:25, 2004.

Grant LD. Lead and compounds. In: Environmental Toxicants: Human Exposures and their health effects. New Jersey: John Wiley & Sons; 2009. p. 757-809.

Jones RL, Homa DM, Meyer PA, Brody DJ, Caldwell KL, Pirkle JL, Brown MJ. Trends in blood lead levels and blood lead testing among U.S. children aged 1 to 5 years, 1988–2004. Pediatrics 2009;123(3):e376-e385.

Jusko TA, Henderson CR, Lanphear BP, Cory-Slechta DA, Parsons PJ, Canfield RL. Blood lead concentrations < 10 microg/dL and child intelligence at 6 years of age.Environ Health Perspect. 2008 Feb;116(2):A60-1.

Landrigan P, Nordberg M, Lucchini R, Nordberg G, Grandjean P, Iregren A, et al. The Declaration of Brescia on prevention of the neurotoxicity of metals. Am J Ind Med 2007;50:709–11.

Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations b10 microg/dL in US children and adolescents. Public Health Rep 2000;115:521–9.

Lazzari E P. Dental Biochemistry. Lea and Keliger, Philadelphia;1976,p.7-8.

Low Level Lead Exposure Harms Children: A Renewed Call for Primary Prevention Report of the. Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention of the Centers for Disease Control and Prevention January 4,

Meyer PA, Pivetz T, Dignam TA, Homa DM, Schoonover J, Brody D, Centers for Disease Control and Prevention: Surveillance for elevated blood lead levels among children--United States, 1997-2001. MMWR Surveill Summ 52: 1-21, 2003.

Molina GF, Costa de Almeida GR, de Souza Guerra C, Cury JA, de Almeida AP, Barroso RC, Gerlach RF.Lead deposition in bovine enamel during a pH-cycling regimen simulating the caries process.Caries Res. 2011;45(5):469-74.

Needleman H L, Gunnoe C, Leviton A, Reed R, Peresie H, Maher C, Barrett P. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. N Engl J Med 300:689-695, 1979.

Needleman HL, Bellinger D. The health effects of low level exposure to lead. Annu Rev Public Health;12:111-140, 1991.

Nogueira-de-Almeida CA, Ricco RG, Del Ciampo LA, de Souza AM, Dutra-de-Oliveira JE. Growth and hematological studies on Brazilian children of low socioeconomic level. Arch Latinoam Nutr. 51:230-5, 2001.

O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. V. Lead absorption and disposition in childhood. Toxicol Appl Pharmacol. 1995; 131(2): 297-308.

Paoliello MM, De Capitani EM. Occupational and environmental human lead exposure in Brazil. Environ Res. 2007 103(2):288-97.

Parsons PJ, Reilly AA, Esernio-Jenssen D, Werk LN, Mofenson HC, Stanton NV, Matte TD. Evaluation of blood lead proficiency testing: comparison of open and blind paradigms. Clin Chem. 2001 Feb;47(2):322-30.

Purchase NG, Fergusson JE: Lead in teeth: the influence of the tooth type and the sample within a tooth on lead levels. Sci Total Environ 52:239, 1986.

Rabinowitz MB: Toxicokinetics of bone lead. Environ Health Perspect 91:33, 1991

Rinderknecht AL, Kleinman MT, Ericson JE. Pb enamel biomarker: deposition of pre- and postnatal Pb isotope injection in reconstructed time points along rat enamel transect. Environ Res. 99:169-176, 2005.

Rogan WJ, Ware JH. Exposure to lead in children-how low is
low enough? *N Engl J Med.* 2003;348(16):1515–1516

Schütz A, Bergdahl IA, Ekholm A, Skerfving S: Measurement by ICP-MS of lead in plasma and whole blood of lead workers and controls, Occup Environ Med 53: 736, 1996.

Shapiro I M, Needleman H L, Tuncay O C. The lead content of human deciduous and permanent teeth. Environ Res 5:467-470, 1972.

Shapiro IM: The lead content of teeth. Evidence establishing new minimal levels of exposure in a living preindustrial human population. Arch Environ Health 30:483, 1978.

Silbergeld EK: New approaches to monitoring environmental neurotoxins. Ann NY Acad Sci 694: 62, 1993.

Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 9(2): 128-161, 1998.

Surkan PJ, Zhang A, Trachtenberg F, Daniel DB, McKinlay S, Bellinger DC. Neuropsychological function in children with blood lead levels b10 microg/dL. Neurotoxicology 2007;28:1170–7.
Tenuta LM, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL, Cury JA. Ca, Pi, and F in the fluid of biofilm formed under sucrose. J Dent Res 85(9):834-8, 2006.

Uryu T, Yoshinaga J, Yanagisawa Y, Endo M, Takahashi J. Analysis of lead in tooth enamel by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. Anal Sci 19:1413-1416, 2003.

Warren C. Brush with Death: a social history of lead poisoning. 1st ed. The Johns Hopkins University Press, 2000.

Weidmann S M, Weatherell J A, Hamm S M. Variations of enamel density in sections of human teeth. Arch Oral Biol 12:85-97, 1967.

Wigg NR: Low-level lead exposure and children. J Paediatr Child Health 37:423, 2001.

Wilhelm M Pesch A, Rostek U, Begerow J, Schmitz N, Idel H, et al.: Concentrations of lead in blood, hair and saliva of German children living in three different areas of traffic density. Sci Total Environ 297:109, 2002.

Ziegler E E, Edwards B B, Jensen R L, Mahaffey K R, Fomon S J. Absorption and retention of lead by infants. Pediatr Res 12:29-34, 1978.

ANEXOS

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Avenida do Café, s/nº - Telefone: (016) 3602-3963
14040-904 - Ribeirão Preto - SP - Brasil
Fax: (016) 3633-0999

OF.CEP/043/FORP

Ribeirão Preto, 20 de março de 2008.

Senhora Professora,

Ref.: Processo nº 2007.1.661.58.7

A pedido da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informo que o referido Comitê, em sua 86ª Sessão realizada no dia 13 de março de 2008, **aprovou** a modificação do Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos, intitulado: **"Estudo da incorporação de chumbo pós-eruptiva no esmalte de dentes decíduos e sua correlação com saliva e plasma – Um estudo longitudinal".**

Na oportunidade, lembramos que os **Relatórios Parciais** deverão entregues à Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa até o dia **30 de setembro de 2008, 30 de setembro de 2009, 30 de setembro de 2010 e 30 de setembro de 2011 e o Relatório Final** até o dia **30 de setembro de 2012,** acompanhados com o formulário preenchido pelo pesquisador responsável conforme modelo que se encontra no *site* da FORP/USP (link: Colegiados e Comissões – Comitê de Ética em Pesquisa – Formulário do Pesquisador para entrega dos Relatórios Parcial ou Final).

Atenciosamente,

Glauce Della Rosa
Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa

Ilma. Sra.
Profa. Dra. RAQUEL FERNANDA GERLACH
Professora Associada do Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia - FORP/USP

GDR/gdr

USP Coseas
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
COORDENADORIA DE ASSISTÊNCIA SOCIAL
Creche e Pré Escola Carochinha

DECLARAÇÃO

Declaro concordar com a participação de crianças da Creche/Pré-escola Carochinha (COSEAS-USP-RP), no projeto: **"Estudo da incorporação de chumbo pós-eruptiva no esmalte de dentes decíduos e sua correlação com saliva e plasma – um estudo longitudinal"** dos pesquisadores: Profª Drª. Raquel F. Gerlach (responsável) do Departamento de Fisiologia, Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (FORP/USP), Soraya Cheier Dib Gonçalves (Cirurgiã-dentista), Profª Drª. Maria Cristina Borsatto, ambas do departamento de Clínica Infantil, Odontologia preventiva e Social, FORP-USP e Drª. Walkíria Aparecida Fonseca Orlando (Médica Pediatra do SISUSP-RP).

Ribeirão Preto, 27 de novembro de 2008

Regina Célia da Silva Marques Teles
Diretora

Avenida Bandeirantes nº 3900 – Monte Alegre CEP: 14040-900
Telefones (016)3602.3580 –3 602.3581 – 3602.3588
RIBEIRÃO PRETO - SP
E-MAILS: ccarochinha@usp.br Jcdsilva@usp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da criança: _____

Fui convidado a participar do estudo "ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DE CHUMBO PÓS-ERUPTIVA NO ESMALTE DE DENTES DECÍDUOS E SUA CORRELAÇÃO COM PLASMA E SALIVA – UM ESTUDO LONGITUDINAL", e por este instrumento de autorização, na qualidade de _____ autorizo que o menor _____ participe da pesquisa.

Justificativa: O chumbo é um dos poluentes ambientais mais perigosos para a saúde infantil e ele é encontrado em diversos locais, como por exemplo, tintas, soldas, maquiagem, cerâmicas utilizadas na alimentação. A exposição ao chumbo é muito preocupante, pois se ela ocorrer nos primeiros meses e anos de vida, as crianças podem ter seqüelas neurológicas e comportamentais graves. Como o chumbo é quimicamente semelhante ao cálcio, 95% do chumbo que entra no corpo humano é depositado nos ossos e dentes. No entanto, ainda não se sabe o se a incorporação de chumbo ao esmalte dentário (parte mais externa do dente) acontece apenas no período pré-eruptivo (antes do dente "nascer"), quando o esmalte está se formando, ou se essa incorporação pode acontecer pós-eruptivamente (depois que o dente já "nasceu" na boca), por meio da saliva, alimentos, objetos. Somente com um estudo longitudinal *in vivo* é que essa questão pode ser resolvida. **Os objetivos** deste estudo são: 1- Comparar a concentração de chumbo no sangue total e no esmalte superficial em 2 grupos de crianças de 2-3 anos (n= 50 em cada um) muito diferentes quanto à exposição a chumbo; 2- Comparar a concentração de chumbo no sangue total, plasma, saliva e esmalte superficial destes 2 mesmos grupos de crianças 18 e 36 meses depois da coleta inicial; 3- Correlacionar as concentrações de chumbo entre os marcadores em cada momento de coleta e verificar se há correlação entre os marcadores nos 2 momentos de coleta. 4- Verificar se há aumento na concentração de chumbo no esmalte superficial após 18 meses, e, se houver, se há diferença no aumento quando crianças de região aparentemente não contaminada são comparadas com crianças que moram em região notoriamente contaminada. **Procedimentos:** Será realizado um teste de esmalte para coletar pequena amostra de cálcio do dente, que será reposta pela aplicação de flúor gel. Este teste de esmalte também será realizado após 18 e 36 meses do início do trabalho. A coleta de saliva será feita com uma haste de algodão após 18 e 36 meses do início do trabalho. **Desconfortos:** quanto aos testes no esmalte e coleta de saliva não há possibilidade de causarem desconforto ou trauma para a criança. **Riscos:** Não haverá utilização de qualquer tipo de procedimento que traga risco aos participantes. **Benefícios:** Esta pesquisa trará informações importantes sobre a incorporação de chumbo no esmalte dos dentes decíduos. **Métodos alternativos:** O método aceito para saber da exposição de crianças ao chumbo é a dosagem no sangue, e estamos testando neste projeto dois métodos alternativos:esmalte e saliva. **Forma de assistência e responsável**: Se ocorrer algum imprevisto durante a execução dos procedimentos desta pesquisa, os pesquisadores se comprometem a prestar assistência (**C.D. Soraya Cheier Dib Gonçalves** – Avenida do Café, S/N - Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – **Tel: 9133-5036/3602-4014**; soraya@forp.usp.br). **Esclarecimentos antes e durante a pesquisa sobre a metodologia**: Se houver qualquer dúvida não esclarecida neste documento, o pai/mãe/responsável poderá procurar a cirurgiã-dentista Soraya Cheier Dib Gonçalves para maiores esclarecimentos. **Liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem penalização**: para fazer parte do estudo, a criança deverá estar com autorização assinada havendo plena liberdade para a criança deixar de participar da pesquisa em qualquer momento, sem que esta decisão implique em qualquer prejuízo para a criança. **Garantia de sigilo e privacidade**:

esta pesquisa é científica e poderá ser publicada em jornais, revistas e/ou congressos científicos no país e no exterior, mantendo-se o sigilo e respeitando-se o código de Defesa do Menor e do Adolescente. **Não** está previsto o **ressarcimento** de despesas, uma vez que os sujeitos da pesquisa serão examinados mediante seu consentimento e sem nenhum custo adicional. **Não** está prevista qualquer forma de **indenização** referente a possíveis danos, visto que não existe essa possibilidade por se tratar somente de exames clínicos por visualização, teste de esmalte para coleta de quantidade mínima de minerais (cálcio) da superfície de um dente e coleta de saliva, sem risco à saúde.

Estou ciente de que esta pesquisa tem como responsáveis a C.D. Soraya Cheier Dib Gonçalves, a Profª. Drª. Raquel Fernanda Gerlach,a Profª. Drª. Maria Cristina Borsatto e a Drª. Walkíria Aparecida Fonseca Orlando.

Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo.
Ribeirão Preto, _____ de _____ de 200__.

_____
Assinatura do pai/mãe/responsável

_____
C.D. Soraya Cheier Dib Gonçalves
CPF: 81257082191
CRO: 85335 - SP

_____
Profª Drª. Raquel F. Gerlach
CPF:664860410/72
CRO: 53891-SP

_____
Profª Drª.. Maria Cristina Borsatto
CPF: 074593 888-40
CRO: 28567 -SP

_____
Drª. Walkíria Aparecida Fonseca Orlando
CPF:
CRM:

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome da criança: _____

Fui convidado a participar do estudo intitulado "ESTUDO DA INCORPORAÇÃO DE CHUMBO PÓS-ERUPTIVA NO ESMALTE DE DENTES DECÍDUOS E SUA CORRELAÇÃO COM PLASMA E SALIVA – UM ESTUDO LONGITUDINAL" e por este instrumento de autorização, na qualidade de _____ autorizo que o menor _____ participe da pesquisa.

Justificativa: O chumbo é um dos poluentes ambientais mais perigosos para a saúde infantil e ele é encontrado em diversos locais, como por exemplo, tintas, soldas, maquiagem, cerâmicas utilizadas na alimentação. A exposição ao chumbo é muito preocupante, pois se ela ocorrer nos primeiros meses e anos de vida, as crianças podem ter seqüelas neurológicas e comportamentais graves. Como o chumbo é quimicamente semelhante ao cálcio, 95% do chumbo que entra no corpo humano é depositado nos ossos e dentes. No entanto, ainda não se sabe o se a incorporação de chumbo ao esmalte dentário (parte mais externa do dente) acontece apenas no período pré-eruptivo (antes do dente "nascer"), quando o esmalte está se formando, ou se essa incorporação pode acontecer pós-eruptivamente (depois que o dente já "nasceu" na boca), por meio da saliva, alimentos, objetos. Somente com um estudo longitudinal *in vivo* é que essa questão poderá ser resolvida. **Os objetivos** deste estudo são: 1- Comparar a concentração de chumbo no sangue total e no esmalte superficial em 2 grupos de crianças de 2-3 anos (n= 50 em cada um) muito diferentes quanto à exposição a chumbo; 2- Comparar a concentração de chumbo no sangue total, plasma, saliva e esmalte superficial destes 2 mesmos grupos de crianças 18 e 36 meses depois da coleta inicial; 3- Correlacionar as concentrações de chumbo entre os marcadores em cada momento de coleta e verificar se há correlação entre os marcadores nos 2 momentos de coleta. 4- Verificar se há aumento na concentração de chumbo no esmalte superficial após 18 meses, e, se houver, se há diferença no aumento quando crianças de região aparentemente não contaminada são comparadas com crianças que moram em região notoriamente contaminada. **Procedimentos:** Será feita a coleta de uma amostra de sangue para dosagem do chumbo. Esta coleta será também realizada 18 e 36 meses após a coleta inicial. **Desconfortos:** A coleta de sangue pode causar algum desconforto inerente a este procedimento, No entanto, esta coleta será realizada por profissional habilitado. **Riscos:** Não haverá utilização de qualquer tipo de procedimento que traga risco aos participantes. **Benefícios:** esta pesquisa trará informações importantes para a comunidade e para os pais dos indivíduos que participarem do estudo sobre contaminação por chumbo. **Métodos alternativos:** Usamos os melhores métodos aceitos até o momento e não há métodos alternativos a esses. **Forma de assistência e responsável**: Se ocorrer algum imprevisto durante a execução dos procedimentos desta pesquisa, os pesquisadores se comprometem a prestar assistência (**Cirurgiã-Dentista Soraya Cheier Dib Gonçalves** – Avenida do Café, S/N - Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – **Tel: 9133 5036/3602-4014**; soraya@forp.usp.br). **Esclarecimentos antes e durante a pesquisa sobre a metodologia:** Se houver qualquer dúvida não esclarecida neste documento, o pai/mãe/responsável poderá procurar a cirurgiã-dentista Soraya Cheier Dib Gonçalves para maiores esclarecimentos. **Liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem penalização**: para fazer parte do estudo, a criança deverá estar com autorização assinada havendo plena liberdade para a criança deixar de participar da pesquisa em qualquer momento, sem que esta decisão implique em qualquer prejuízo para a criança. **Garantia de sigilo e privacidade**: esta pesquisa é científica e poderá ser publicada em jornais, revistas e/ou congressos científicos no país e no exterior, mantendo-se o sigilo e respeitando-se o código de Defesa do Menor e do Adolescente. **Não** está previsto o **ressarcimento** de despesas, uma vez que os sujeitos da pesquisa serão examinados mediante seu consentimento e sem nenhum custo adicional. **Não** está prevista qualquer forma de **indenização** referente a possíveis danos, visto que não existe essa possibilidade por se tratar somente de coleta de sangue (realizada por pessoa habiliatda) para verificação da concentração de chumbo no sangue total, sem riscos à saúde.

Estou ciente de que esta pesquisa tem como responsáveis a C.D. Soraya Cheier Dib Gonçalves, a Profª. Drª. Raquel Fernanda Gerlach, a Profª. Drª. Maria Cristina Borsatto e a Drª. Walkíria Aparecida Fonseca Orlando.

Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 200__.

_____

Assinatura do pai/mãe/responsável

_____

Profª Drª. Raquel F. Gerlach

CPF: CPF:664860410/72
CRO: 53891-SP

_____

Drª. Walkíria Aparecida Fonseca Orlando

CPF:
CRM:

_____

C.D. Soraya Cheier Dib Gonçalves

CPF: 812570821/91
CRO: 85335-SP

_____

Profª Drª.Maria Cristina Borsatto

CPF: 074593 888-40
CRO: 28567 -SP