

Carolina de Souza Guerra

***“Utilização de dentes decíduos de regiões com diferentes históricos de contaminação ambiental para detecção de grupos de crianças expostas ao chumbo no Brasil.”***

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do grau de Doutor em Biologia Buco-Dental, Área de Histologia e Embriologia.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach

Piracicaba  
2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

G937u Guerra, Carolina de Souza.  
Utilização de dentes decíduos de regiões com diferentes históricos de contaminação ambiental para detecção de grupos de crianças expostas ao chumbo no Brasil / Carolina de Souza Guerra. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010.

Orientador: Raquel Fernanda Gerlach.  
Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Esmalte dentário. 2. Dentina. 3. Metais pesados. I. Gerlach, Raquel Fernanda. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(eras/fop)

Título em Inglês: Use of deciduous teeth from regions with different histories of environmental contamination to detect groups of exposed children to lead in Brazil

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Dental enamel. 2. Dentin. 3. Heavy metals

Área de Concentração: Histologia e Embriologia

Titulação: Doutor em Biologia Buco-Dental

Banca Examinadora: Raquel Fernanda Gerlach, Frederico Barbosa de Sousa, Márcia Andreia Mesquita da Silva Veiga, Viviane Elisângela Gomes, Eduardo Mello de Capitani

Data da Defesa: 14-12-2010

Programa de Pós-Graduação em Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 14 de Dezembro de 2010, considerou a candidata CAROLINA DE SOUZA GUERRA aprovada.

Prof. Dra. RAQUEL FERNANDA GERLACH

Prof. Dr. FREDERICO BARBOSA DE SOUSA

Prof. Dra. MARCIA ANDREIA MESQUITA DA SILVA VEIGA

Prof. Dra. VIVIANE ELISANGELA GOMES

Prof. Dr. EDUARDO MELLO DE CAPITANI



*À minha avó materna Maria (in memorium) ,  
minha maior fonte de inspiração e amor,  
Onde quer que você esteja, Vovó, saiba que essa vitória é nossa!*



# Agradecimento Especial

***Vovó Maria,***

Acredito que Deus tenha um motivo especial para colocar certas pessoas em nossas vidas. De todos os amores que senti na vida, o meu amor por você dispara na frente dos outros e mesmo na sua ausência, sinto como se estivesse sempre ao meu lado.

Eu acredito que poucas pessoas tenham tido a infância tão doce quanto a que você me proporcionou. Minha infância regada de histórias e fábulas, roupinhas de bonecas feitas por você, comidinhas, chamegos e dengos de vovó, os quais causaram muito ciúmes entre os demais netos.

Por algum motivo que ainda não sei, eu mesmo sem saber o que era o amor, já nasci te amando. Mesmo antes de nascer, você já torcia por mim...pra eu nascer perfeita, meu primeiro sorriso, minha primeira palavra, meus primeiros passos.

Há 2 anos, no dia do meu aniversário você se despediu desse mundo e mesmo que eu tenha custado a aceitar, hoje julgo que se despedir no dia do meu nascimento, era como se fosse uma mensagem pra eu continuar e assim o fiz.

Quantas experiências... quantas histórias para contar... quantos conselhos dados... quanta paciência ...sempre cheia de atenção, de carinho, de amor.

Uma advogada na minha vida, mediadora das minhas decisões. Você era o meu ponto de equilíbrio, a palavra de esperança, o ombro que apesar de cansado, sempre me apoiava. Você foi tudo de bom e de belo. Sei que mesmo que a senhora não possa estar presente neste dia, é como se estivesse, assim como todos os outros dias importantes da minha vida em que a senhora esteve. Obrigada pela sua dedicação.. Te amarei eternamente.

*“Sim, tenho saudades.  
Sim, acuso-te porque fizeste  
o não previsto nas leis da amizade e da natureza  
nem me deixaste sequer o direito de indagar  
porque o fizeste, porque te foste” (Carlos Drummond de Andrade)*





## AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por me dar a graça da vida e por ter me guiado com sua força divina.

À minha família:

Aos meus pais **Sonia e Aloisio**, minha irmã Camilla e meu cunhado Weverton,

Por terem me dado todo o alicerce necessário para a conquista desse sonho.

Obrigada pelo amor, pela paciência e pelos bons conselhos.

À minha amiga-irmã **Iza Teixeira Alves Peixoto** e toda sua família: seus pais

Tia Sônia e Dr. Aníbal e seus irmãos Gustavo, Aníbal e sua esposa Mila por terem me acolhido como se eu fizesse parte da família e me dado todo o apoio técnico e psicológico necessário durante o decorrer do meu trabalho.

Aos amigos **Sr. Ezequiel e Sra. Socorro**,

Por terem me adotado e me guiado durante a minha estada em Cubatão, uma das cidades incluídas na pesquisa. O carinho de vocês me deu forças para perseverar no trabalho e atingir meus objetivos.

À **Sra. Irmgarte Schwarzbald** por ter me recebido carinhosamente na cidade de Mato Leitão, RS e por ter me proporcionado momentos inesquecíveis em sua cidade natal.



***Meus queridos pais,***

A vocês, meus amigos, meus companheiros e confidentes,  
Que hoje sorriem orgulhosos ou choram emocionados, que, muitas vezes, na  
tentativa de acertar, cometeram falhas, mas que inúmeras vezes foram  
vitoriosos, que se doaram inteiros e renunciaram seus sonhos, para que, muitas  
vezes, pudéssemos realizar os nossos sonhos.

A vocês que compartilharam os meus ideais e os alimentaram, me incentivando  
a prosseguir na jornada, me mostrando que o meu caminho deveria ser seguido  
sem medo, independente dos obstáculos. Minha eterna gratidão vai além dos  
meus sentimentos, pois vocês cumpriram o dom divino.

O dom de ser Pai, o dom de ser Mãe.

(Sua filha Carolina)



## AGRADECIMENTOS

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa) pelo financiamento da pesquisa.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba e Universidade Estadual de Campinas, pela excelência nas áreas de ensino e pesquisa, fundamental para minha formação.

Aos voluntários da pesquisa e às secretarias de Educação e Saúde das cidades de Santo Amaro, BA; Cubatão, SP; Ribeirão Preto, SP e Mato Leitão, RS por terem concedido a autorização para execução deste trabalho.

À Vanessa Cristina de Oliveira, técnica do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, e Juliana Andrade Nunes, aluna de pós graduação do mesmo laboratório por terem me dado todo o apoio técnico necessário para realização da dosagem de metais nas amostras. A ajuda de vocês foi fundamental!

Ao técnico da linha XRF do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, Carlos Perez, e André Almeida, pela atenção e por todo o apoio técnico.

À Prefeitura de Sertãozinho, em especial ao coordenador de Saúde Bucal Dr. Paulo Siqueira, por ter sido compreensivo e por ter me dado tanto apoio nos preparativos finais deste trabalho. Muito obrigada Dr. Paulo! Sem o seu apoio, tudo seria mais difícil.



## AOS PROFESSORES,

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Mamie Mizusaki Iyomasa**, pela convivência, pelos ensinamentos,  
,  
amizade e pelo apoio constante.

Ao Prof<sup>a</sup> Dr<sup>o</sup> **Frederico Barbosa de Sousa** pelas sugestões, ensinamentos,  
pela presteza e disponibilidade a mim despendidas.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Regina Cely Barroso e Profa. Dra. Silvana Moreira** pelo apoio  
fundamental no trabalho, durante as análises no Laboratório Nacional de Luz  
Síncrotron, pela convivência e pelo estímulo.

Ao Prof<sup>a</sup> Dr<sup>o</sup> **Rafael Rosales**, pelas sugestões e auxílio na elaboração da  
análise estatística e pela atenção com que sempre me recebeu.

Ao Prof<sup>a</sup> Dr<sup>o</sup> **Fernando Barbosa Junior**, pelo auxílio e pela prontidão em que  
me auxílio neste presente trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Márcia Andrea Mesquita Silva da Veiga**, pela amizade, pelos  
ensinamentos e atenção dispensada a mim, quando necessário.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **Maria Cristina Borsatto**, por ter cedido espaço para o  
desenvolvimento deste trabalho em seu laboratório e pelas palavras amigas e  
sábias, nos momentos de angústia e aflição.

Aos **Professores da FOP-UNI CAMP** pelos ensinamentos e pela convivência

## **Em especial...**

À minha orientadora, **Profa. Dra. Raquel Fernanda Gerlach,**

Por 6 anos convivemos juntas e ao final desse tempo pude perceber que Deus me presenteou por ter tido uma orientadora tão amiga. Eu tive a honra de poder contar com você nos meus momentos de aflição e também poder aprender muito com todo seu brilhantismo. Nossa amizade foi tomando proporções tão grandes que hoje já não sei como seguir em frente sem ter seus conselhos. Eu amadureci muito, não somente profissionalmente, mas pessoalmente e sei que você fez parte desse processo, que apesar de muitas vezes ser doloroso, me rendeu frutos maravilhosos. Dentre eles, a sua amizade com certeza está entre os que mais valorizo. Eu não saberia expressar com palavras o meu carinho e admiração.

*“Mestre,  
É aquele que caminha com o tempo, propondo paz, fazendo  
comunhão,  
despertando sabedoria.  
Mestre é aquele que estende a mão, inicia o diálogo e  
encaminha  
para a aventura da vida.  
Não é o que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas o que  
questiona  
e desperta para a realidade.  
Não é aquele que dá de seu saber, mas aquele que faz  
germinar o saber do discípulo.  
Mestre é você, meu professor amigo que me compreende, me  
estimula, me comunica e me enriquece com sua presença, seu  
saber e sua ternura.  
Eu serei sempre um seu discípulo na escola da vida”.*  
*Obrigada, professora! (N.Maccari)*



## **AOS AMIGOS**

**Carlos Henrique Meloni**, por ter me auxiliado durante a execução desse trabalho como aluno de Iniciação Científica e particularmente como meu amigo. Sua ajuda e acima de tudo sua amizade foram fundamentais. Você estará sempre guardado no meu coração.

**Junia Ramos**, por ter me oferecido todo o apoio técnico no laboratório e acima de tudo por ter me proporcionado momentos agradáveis de convivência.

**Débora Silvano Pereira e Ana Luiza Neves**, pelos momentos de aprendizado, alegrias e angústias compartilhados. Por estarem ao meu lado em momentos felizes e de preocupações. Pelos desabafos... Pela fundamental ajuda e por terem sido tão companheiras.

**Érica Maria Luchesi**, pela amizade, respeito, carinho e companheirismo durante toda minha vida. Por todo apoio e pelos conselhos valiosos que você estava sempre disposta a me dar...

**Flávia dos Santos Silva**, por estar sempre ao meu lado. Por ser essa pessoa tão maravilhosa, tão alto astral. Pela eterna e verdadeira amizade!

**Janaína Renata Cintra**, pela grande amizade durante nosso tempo de convivência. Pelo carinho, incentivo, e por saber que eu posso contar sempre com você.

**Maria Eliza Correa Barbosa**, pelo privilégio da sua amizade. Pelo apoio e por estar sempre por perto...

**Miriam, Camila, Márcia, Juliana, Fernanda, Andréa, César, Lauro, Andreza, Elén, Soraya, Carol Torres, Jaciara, Martinha, Regina Saiane, Regina Telles, Paulo Roberto, Ricardo, Dayane, Susana, Talita, Jéssica, Kellen, Marlei e Janaína.** Cada um de vocês tem um significado muito especial na minha vida e podem ser considerados peça fundamental nesse trabalho.

Aos amigos da FOP e da FORP que compartilhei minha vida!

*Durante toda minha vida,  
muitas pessoas passaram por mim,  
dia após dia.  
Mas somente algumas dessas pessoas,  
ficarão para sempre em minha memória.*

*Essas pessoas são ditas amigas,  
e as levarei para sempre em meu coração,  
às vezes pelo simples fato de terem  
cruzado meu caminho,  
às vezes pelo simples fato de terem dito  
uma única palavra de conforto quando eu precisei.  
Às vezes por ter me dado um minuto de sua atenção,  
e me ouvido falar de minhas angústias,  
medos, vitórias, derrotas...*

*Às vezes por terem confiado em mim,  
e me contado também seus problemas,  
angústias, vitórias, derrotas...  
Isso é ser amigo: é ouvir, é confiar, é amar.  
E amigos de verdade,  
ficam para sempre em nossos corações,  
assim como as pegadas na alma, que são indestrutíveis.*

*(Autor desconhecido)*

*Não importa onde você parou...  
em que momento da vida você cansou...  
o que importa é que sempre é possível e necessário  
“Recomeçar”.*

*Recomeçar é dar uma nova chance a si mesmo...  
é renovar as esperanças na vida e o mais importante...  
acreditar em você de novo...*

*Sofreu muito nesse período? Foi aprendizado.*

*Chorou muito? Foi limpeza da alma.*

*Ficou com raiva das pessoas? Foi para perdoá-las um dia.*

*Tem tanta gente esperando apenas um sorriso seu para  
“chegar” perto de você.*

*Recomeçar...*

*hoje é um bom dia para começar novos desafios.*

*Onde você que chegar?*

*Ir alto... sonhe alto...*

*queira o melhor do melhor...*

*pensando assim trazemos pra nós aquilo que desejamos...*

*Se pensarmos pequeno, coisas pequenas teremos....*

*Já se desejarmos fortemente o melhor e principalmente  
lutarmos pelo melhor, o melhor vai se instalar em nossa vida.*

*“Porque sou do tamanho daquilo que vejo, e não do tamanho  
da minha altura.”*

*Carlos Drummond de Andrade*



## RESUMO

**Objetivos:** Os objetivos deste estudo são: a) comparar as concentrações de chumbo em diferentes camadas de esmalte e dentina pré e pós-natal de dentes decíduos, coletados em: 1 - Santo Amaro, BA, 2 - Cubatão, SP, 3 - Ribeirão Preto, SP e Mato Leitão, RS, b) analisar a distribuição espacial do chumbo por microfluorescência de raios X com radiação Síncrotron.

**Métodos:** Uma microbiópsia no esmalte foi realizada *in vitro* na superfície do esmalte e cinco amostras sucessivas de esmalte superficial foram removidas. O chumbo foi medido por Espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado, e o fósforo foi medido colorimetricamente para determinarmos a profundidade de biópsia. Pedacões de dentina pré-natal e pós-natal foram dissolvidos em ácido nítrico. Cortes longitudinais de algumas amostras de dentes decíduos foram analisados por micro-XRF. As áreas anatômicas foram: esmalte superficial (SE), subsuperficial do esmalte (SSE), dentina primária (PD), e dentina secundária (SD).

**Resultados:** A mediana da concentração de chumbo no esmalte superficial dos dentes coletados em Santo Amaro foi estatisticamente superior ao dos dentes coletados em Ribeirão Preto, Cubatão e Mato Leitão ( $p < 0,0001$  para as comparações). A concentração de chumbo no esmalte não diferiu quando os resultados de Ribeirão Preto e Mato Leitão, ou de Cubatão e Mato Leitão foram comparados. A mediana da concentração de chumbo encontrada na dentina pré-natal e pós-natal dos dentes coletados em Santo Amaro foram estatisticamente superiores aos encontrados nos dentes de Ribeirão Preto e Cubatão ( $p < 0,0001$ ). Nenhuma diferença foi encontrada quando os valores da dentina pré e pós-natal de Ribeirão Preto foram comparados com os de Cubatão. O coeficiente de correlação de Spearman para a concentração de chumbo na dentina *versus* concentração de chumbo no esmalte foi estatisticamente significativa para Ribeirão Preto (dentina pré-natal *versus* esmalte  $r = 0,3$ ,  $p = 0,003$ ,  $r = 0,3$ ,  $p = 0,0013$  e dentina pós-natal *versus* esmalte  $r = 0,27$ ,  $p = 0,06$ ,  $r = 0,21$ ,  $p = 0,15$ ), e Santo Amaro (dentina pré-natal *versus* esmalte  $r = 0,38$ ,  $p = 0,0001$ ,  $r = 0,18$ ,  $p = 0,08$  e dentina pós-natal *versus* esmalte  $r = 0,3$ ,  $p = 0,015$ ,  $r = 0,2$ ,  $p = 0,1$ ). Nenhuma correlação significativa foi encontrada em Cubatão ( $r$  dentina pré-natal =  $0,118$ ,  $p = 0,195$ ,  $r = 0,05$ ,  $p = 0,59$ ,  $r = 0,05$  dentina pós-natal,  $p = 0,59$ ,  $r = 0,09$ ,  $p = 0,28$ ). A  $\mu$ -SRXRF confirmou uma distribuição heterogênea de chumbo nos incisivos decíduos, com o maior sinal encontrado em esmalte superficial e dentina interna. A intensidade de Pb / Ca diminuiu da superfície do esmalte à dentina secundária em todas as amostras analisadas.

**Conclusões:** este estudo mostra que existe uma correlação fraca, porém significativa entre os níveis de chumbo encontrado no esmalte superficial e na dentina pré e pós-natal, nas amostras provenientes de cidades que apresentaram maiores valores de chumbo (neste estudo Ribeirão Preto e Santo Amaro). A  $\mu$ -SRXRF confirmou uma distribuição heterogênea de chumbo nos incisivos decíduos, com o maior sinal encontrado em esmalte superficial e dentina interna.

**Palavras-chave:** dentes, esmalte dental, dentina, chumbo.



## ABSTRACT

**Objectives:** The objectives of this study are: a) to compare the concentrations of lead in different layers of enamel with those found in prenatal and postnatal dentine of primary teeth collected from: 1 - Santo Amaro, Bahia State, 2 – Cubatão, São Paulo State, 3 - Ribeirão Preto, São Paulo State and Mato Leitão, Rio Grande do Sul State b) analyze the spatial distribution of lead in same samples by micro X-Ray Fluorescence with Synchrotron Radiation .

**Methods:** A surface enamel acid-etch microbiopsy was performed in vitro in the enamel surface and five successive samples of superficial enamel were removed. Lead was measured by Inductively coupled plasma mass spectrometry, while phosphorus was measured colorimetrically to establish biopsy depth. Pieces of prenatal and postnatal dentine were dissolved in ultrapure nitric acid. Longitudinally cut of some samples of primary teeth were analyzed by micro-XRF. Four anatomical areas were analyzed by bidimensional (x, y) scanning in each tooth section. These anatomical areas were: Superficial enamel (SE), Subsuperficial enamel (SSE), Primary Dentine (PD), and Secondary Dentine (SD).

**Results:** Median superficial enamel lead content of the teeth collected in Santo Amaro were statistically higher than the one from teeth collected in Ribeirão Preto, Cubatão and Mato Leitão ( $p < 0.0001$  for these comparisons). The lead concentration in the enamel did not differ when results from Ribeirão Preto and Mato Leitão, or Cubatão and Mato Leitão were compared. Median lead contents found in prenatal and postnatal dentine of Santo Amaro teeth were statistically higher than the ones found in teeth from Ribeirão Preto and Cubatão ( $p < 0.001$ ). No difference was found when prenatal and postnatal dentine values from Ribeirão Preto were compared with those from Cubatão. Spearman's correlation coefficient for lead concentration in dentine versus lead concentration in the enamel surface was significant for Ribeirão Preto (Prenatal dentine versus enamel  $r = 0,3$ ,  $p = 0,003$  e  $r = 0,3$ ,  $p = 0,0013$  and Postnatal dentine versus enamel  $r = 0,27$ ,  $p = 0,06$  e  $r = 0,21$  e  $p = 0,15$ ), and Santo Amaro (Prenatal dentine versus enamel  $r = 0,38$ ,  $p = 0,0001$  e  $r = 0,18$  e  $p = 0,08$  and Postnatal  $r = 0,3$ ,  $p = 0,015$  e  $r = 0,2$ ,  $p = 0,1$ ) . No correlation significant was found in Cubatão (Prenatal dentine  $r = 0,118$ ,  $p = 0,195$ ,  $r = 0,05$ ,  $p = 0,59$ ; Postnatal dentine  $r = 0,05$ ,  $p = 0,59$ ,  $r = 0,09$ ,  $p = 0,28$ ). The  $\mu$ -SRXRF confirmed a heterogenous distribution of lead in the primary incisors, with the highest signal found in superficial enamel and inner dentine. The Pb/Ca intensity decreased from surface enamel to secondary dentin in all the samples analyzed.

**Conclusions:** this study shows that there is a weak but significant correlation between the lead levels found in the superficial enamel and the ones found in the pre- and postnatal dentine, but only in the samples from cities that showed higher lead values (in this study Ribeirão Preto and Santo Amaro). The  $\mu$ -SRXRF confirmed a heterogenous distribution of lead in the primary incisors, with the highest signal found in superficial enamel and inner dentine.

**Key words:** teeth, dental enamel, dentine and lead





# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>3</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO .....</b>	<b>29</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>45</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>79</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>91</b>



## 1 INTRODUÇÃO

### **Contaminação por chumbo: um problema de saúde pública global**

A exposição ambiental ao chumbo é uma das questões mais sérias de contaminação de populações do ponto de vista de saúde pública, pois a exposição ao chumbo nos primeiros meses e anos de vida leva a seqüelas neurológicas e comportamentais graves (Needleman *et al.*, 1979). A contaminação pelo chumbo já afetou milhões de pessoas, tanto em países desenvolvidos quanto em países subdesenvolvidos e seus efeitos adversos na saúde já são cientificamente comprovados, fazendo que com essa questão tenha se tornado um problema de saúde pública global. A eliminação do chumbo de importantes fontes de contaminação (tintas contendo chumbo e a gasolina) pode ser considerada um dos maiores triunfos da saúde pública, pois a partir desse período, os níveis de chumbo no sangue, o principal biomarcador utilizado em estudos populacionais, tem evidenciado um considerável declínio.

O chumbo é considerado um dos poluentes mais perigosos para a saúde infantil, de acordo com a OMS, que afirma que a cada dia morrem no mundo 5500 crianças vítimas de envenenamento por poluentes ambientais. Seu efeito neurotóxico é comum, mas fontes de exposição são rotineiramente encontradas em diversos tipos de indústrias (mineração, pintura, cerâmica, baterias) e infelizmente os desastres decorrentes da exposição ambiental são descobertos apenas anos ou décadas mais tarde.



## **2 REVISÃO DA LITERATURA**

### **Relatos da contaminação pelo chumbo**

A toxicidade do chumbo é conhecida há milênios. Nicander, um médico e poeta grego, no século II aC, escreveu uma das primeiras descrições de intoxicação por chumbo, descrevendo “gleaming, deadly white lead.” Dioscórides, médico de Nero, no primeiro século dC, disse “Lead makes the mind give way”.

Por milhares de anos, pensava-se que intoxicação por chumbo era uma doença exclusivamente de adultos, sobretudo os mineiros, funileiros, e os apreciadores de vinhos contendo acetato de chumbo como adoçante. Segundo Needleman (2004), os relatos de intoxicação por chumbo em crianças foi reconhecida apenas há um século. As crianças não foram identificadas como vítimas até 1892, quando J. Gibson Lockhart, no Brisbane Children’s Hospital, relatou uma série de crianças com doença neurológica grave e identificou a causa como sendo a pintura das casas e os trilhos de sua cidade. A origem da epidemia é marcada pelo surgimento de tintas contendo chumbo por volta de 1904, sendo que seu uso apenas foi proibido para uso doméstico em 1920 (Needleman, 2004). Atualmente, a Agência de Proteção Ambiental (EPA) estabelece que as tintas não devam conter mais de 0,06% de chumbo em sua formulação. Após o conhecimento da intoxicação por chumbo em crianças, surgiu uma crença generalizada entre os pediatras. Nesta segunda fase da história da intoxicação por chumbo, apenas dois resultados foram reconhecidos: a morte ou a recuperação completa, sem seqüelas. Randolph Byers, neurologista do Boston Childrens Hospital contestou esta afirmação em 1943. Ele acompanhou 20 crianças que passaram por quadro de intoxicação por chumbo e que foram consideradas sem seqüelas e após exame neurológico, constatou que 19 tiveram distúrbios comportamentais, cognitivos, e problemas de aprendizagem. Ele sugeriu que o diagnóstico clínico em muitas das crianças anteriormente intoxicadas tinha sido negligenciado e passou a se perguntar quantas crianças com distúrbios de comportamento ou de aprendizagem tinham sido vítimas da intoxicação por chumbo. As conseqüências em longo prazo da exposição ao chumbo foram gradualmente aceitas, mas acreditava-se que só ocorriam em crianças que apresentavam sinais aparentes de

danos ao sistema nervoso central. A preocupação com casos de intoxicação por chumbo assintomáticos chegou tardiamente.

A década de 1970 marca uma nova fase, quando os estudos de crianças sem sinais clínicos de toxicidade apresentaram déficits em testes de QI, atenção e fala (De La Burne *et al.*, 1972; Perino *et al.*, 1974; Landrigan *et al.*, 1975)

### **Principais fontes de exposição ao chumbo – Relatos históricos**

Há relatos de exposição ao chumbo que datam de 4000 a.C, época em que as mulheres usavam maquiagem à base de cerusita e, desde então, existem evidências de crianças que morreram contaminadas por pó do metal, a partir do contato com suas mães. Existem países que ainda utilizam minerais que contém chumbo para fabricação de produtos de beleza (Vannoccio, 1966).

O chumbo é um elemento que existia em concentrações muito pequenas na atmosfera e superfície da terra até surgirem as atividades humanas de fundição de metais, na Idade dos metais (por volta do ano 5000 a.C). Nessa época, algumas comunidades humanas descobriram a extração e fusão de metais, o que permitiu a fundição de ferramentas e armas. Entre os metais utilizados, o chumbo passou a ter uma grande importância, pois ele tem um baixo de fusão ( $327^{\circ}\text{C}$ ), sendo por isso facilmente utilizado para várias aplicações. Os romanos acreditavam que o chumbo - "Metal mais antigo" - foi um dom precioso do pai dos deuses, Saturn (Kronos), para os gregos. Na época dos romanos, o chumbo passou a ser tão fundamental para a sociedade romana, que descrições de que a invasão do norte da Europa pelos romanos teria também o objetivo de conseguir mais fontes de minério de chumbo (a galena), muito comum na Grã-Bretanha. No início do sexto milênio aC, várias civilizações antigas já estavam empregando chumbo para fabricação de talheres, bandejas e outros objetos decorativos.

A história da escrita também está ligada ao chumbo. Antigos Faraós e reis assírios escreviam mensagens em pedaços de chumbo e ancestrais chineses escreviam em bambu com tinta de chumbo branco (Xenophon, 1968).

O chumbo também teve relação direta com a produção de vinhos. Vinicultores por toda a Europa empregavam tal metal em cada estágio da produção do

vinho utilizando-o com finalidade de armazenamento. Gradualmente, a experiência e a experimentação induziram a alteração intencional dos vinhos. Os vinicultores descobriram que o chumbo poderia retardar a fermentação. Os vinhos armazenados na presença do metal duravam mais tempo e possuíam um gosto mais suave do que aqueles armazenados na sua ausência (Nriago, 1968).

Os maiores incrementos em se tratando de contaminação por chumbo refere-se ao período da Revolução Industrial e no início do século 20, quando houve grande procura pela gasolina antidetonante contendo chumbo, tintas, alimentos enlatados, e baterias de carro. É importante salientar que a população de crianças americanas com níveis de chumbo no sangue acima de 10 mg / dL diminuiu em torno de 80% desde o período em que foi proibido a adição de chumbo na gasolina, soldas de alimentos enlatados, e tintas para uso doméstico (Freitas, acessado em 2006).

Atualmente, a tinta contendo chumbo vendido no E.U.A. entre 1884 e 1978 é a principal fonte de ingestão de chumbo em crianças jovens americanos (Mielke, 1999). Embora proibida desde 1971, 80% das casas construídas E.U.A antes de 1950, ou seja, 23 milhões de residências, continham tinta com chumbo (Needleman, 2004). Em 2002, foi relatado que 65% dos 38 milhões de unidades habitacionais nos Estados Unidos foram pintadas com produtos à base de chumbo considerados de risco (Jacobs *et al.*, 2002).

A descoberta do chumbo tetraetila na gasolina como substância antidetonante foi feita por Thomas Midgley em 1921, quando realizava pesquisas para “General Motors”, e, assim, passou a ser utilizado como aditivo da gasolina. A incorporação de chumbo tetraetila à gasolina é considerado o maior responsável pelo aumento dos níveis de chumbo na atmosfera, e conseqüente acúmulo na crosta terrestre (Warren, 2000). Nesse período, devido à sua alta toxicidade, vários pesquisadores foram intoxicados e mortos por envenenamento pelo chumbo. Mesmo diante dos efeitos desastrosos do chumbo, a “Standard Oil de New Jersey” (Esso/Exxon) e a “General Motors”, em 1924 criaram a “Ethyl Gasoline Corporation” para produzir e comercializar o chumbo tetraetila.

No final da década de 40, Clair Cameron Patterson realizava um estudo para determinar a idade da Terra, mas acidentalmente descobriu a poluição causada pelo chumbo tetraetila. Enquanto ele realizava medidas de chumbo em rochas antigas,

percebeu que suas amostras haviam sido contaminadas, devido ao chumbo presente no ambiente. Diante disso, ele teve de trabalhar em ambiente livre de contaminação com o intuito de evitar medições inexatas. Ao final do seu trabalho, ele concentrou seus esforços para o problema da contaminação por chumbo, examinando geleiras de países como a Groenlândia. Ao final das análises, constatou que a contaminação ambiental pelo chumbo coincidia com o período em que, o chumbo tetraetila tinha se tornado amplamente utilizado como um aditivo na gasolina. Clair Cameron Patterson, consciente dos perigos do chumbo para a saúde, foi um dos primeiros oponentes ao seu uso. Mesmo diante das evidências científicas, a indústria do chumbo utilizando-se de suas influências políticas com o intuito de proteger sua principal fonte lucrativa, pressionou os chefes de sua universidade a mantê-lo em silêncio. Além disso, Patterson foi excluído do Conselho Nacional de Pesquisa dos E.U.A. de 1971, mesmo sendo considerado o principal especialista em chumbo atmosférico (Davidson, 1998).

A água também pode ser contaminada pelo chumbo, quer na fonte, devido à deposição de fontes ambientais, ou na distribuição. Os E.U.A National Primary Drinking Water Regulaments estabelece que a água não é segura se 10% da amostra de um município tiver níveis de chumbo superiores a 15 ppb (EPA, 1998; Jacobs *et al.*, 2002). Vários autores têm apontado que o sistema de distribuição municipal de água contém componentes que podem liberar chumbo, tais como linhas de serviço que levam a água à residência do consumidor, os canos que levam água para o interior da residência, tubos de cobre de abastecimento que foram unidos por meio de solda contendo chumbo. Solda contendo chumbo, tubos de metal e acessórios metálicos podem conter até 8% de chumbo (Bernard *et al.*, 2001; Maas *et al.*, 2002). Fabricação de bateria de carro é a principal fonte secundária de fontes de chumbo (Paoliello *et al.*, 2003), mas outras não podem ser descartadas. Vários estudos têm mostrado que os níveis sanguíneos elevados em pré-escolares são fortemente correlacionados com altos níveis de chumbo na poeira doméstica (Charney *et al.*, 1983; Tornton *et al.*, 1990; Rhoads *et al.*, 1999). Esta associação tem sido atribuída à ingestão de poeira visto que é freqüente o comportamento mão-a-boca nas crianças. Lasca de tinta à base de chumbo, poeira, o solo e partículas em suspensão são consideradas as fontes de chumbo mais comuns na poeira doméstica (Yiin *et al.*, 2000).



## **Contaminação pelo chumbo no mundo e no Brasil**

Pela grande pressão da sociedade civil e pela notória contaminação dos ambientes urbanos de algumas cidades americanas, há atualmente nos EUA um programa nacional para detecção de crianças contaminadas por chumbo. Nesse programa, o sangue é utilizado como marcador de contaminação, e as coletas são realizadas anualmente em todas as crianças do país, sendo todas as amostras analisadas em um único Centro (Wadsworth Center) (Parsons, 1997). O chumbo tem uma meia vida de 40 dias no sangue, sendo em seguida depositado principalmente nos ossos e dentes (95%) (Smith, 1996). Por esse motivo, coletas anuais podem não refletir o grau de exposição da população, uma vez que o sangue reflete majoritariamente exposições agudas. Entretanto, pelo grande número de coletas (anuais) em todos os indivíduos da população, a probabilidade de encontrar indivíduos contaminados aumenta nesse sistema implementado nos EUA. No caso de países em que esse sistema não é adotado, a coleta esporádica de sangue de alguns indivíduos de uma população dificilmente refletirá o grau de exposição da população, especialmente se essas coletas não forem feitas de forma sistemática, baseadas em desenhos epidemiológicos adequados e com intervalos bem definidos

Os níveis de chumbo considerados toleráveis e supostamente não tóxicos tem abaixado nas últimas 3 décadas (Lin-Fu, 1985; CDC, 1991; Needleman, 2004). Enquanto na década de 60, o limite de tolerância era de 60 mg / dL em crianças, a partir de 1991, o CDC recomenda como limite superior aceitável, o valor de 10mg/dL. Esse valor tem servido apenas como ferramenta para gerenciamento de fatores de risco, uma vez que já é conhecido que o chumbo não participa de nenhuma função biológica.

Alguns trabalhos já demonstram que um nível de <10 mg / dL não pode ser considerado seguro. Recentemente, estudos de Lanphear *et al* em 2000 e Canfield *et al.*, em 2003 mostraram déficit intelectual em crianças com concentrações de chumbo no sangue abaixo de 10 mg / dL, e Chiodo *et al* (2004) demonstraram crianças com déficits neurocomportamentais correlacionados a concentrações de chumbo por volta de 3 mg / dL. Nos Estados Unidos, os níveis de chumbo no sangue diminuíram como resultado de medidas de regulamentação federal para reduzir a exposição da população ao contaminante. Triagem de dados do final dos anos 1960 e início de 1970 constatou

que 20% a 45% das crianças testadas tinham níveis de chumbo no sangue de 40 mg / dL. Entre 1976 e 1980, a média geométrica ponderada de chumbo no sangue entre crianças de 1 a 5 anos de idade nos E.U.A foi de 15 g / dL (Pirkle *et al.*, 1994). Dados da Terceira National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III), fase 1 (1988 - 1991), mostrou um declínio na média geométrica do nível de chumbo para 3,6 mg / dL (Pirkle *et al.*, 1994). NHANES III (1991 - 1994) mostrou uma queda ainda maior para 2,7 mg / dL de chumbo no sangue. O NHANES III, fase 2 indicaram que aproximadamente 4,4% de crianças de 1 a 5 anos (cerca de 890 mil crianças) tiveram níveis de sangue  $\geq 10$  mg / dL (CDC, Centers for Disease Control and Prevention, 1994). Bernard *et al* (2001) analisaram os dados do NHANES III (1988-1994) e constatou que a prevalência global dos níveis sanguíneos  $\geq 5$  mg / dL foi de 25,6% embora a maioria (76%) dessas crianças tinham níveis de chumbo  $<10$  mg / dL.

Estudos realizados em Córdoba e Buenos Aires mostrou que 10 e 40% de crianças com idade inferior a 15 anos apresentaram níveis de chumbo no sangue superiores a 10 mg / dL (Garcia e Mercer, 2003). No Uruguai (Manay *et al.*, 2003), no início de 2001, crianças residentes em Montevideu apresentaram níveis de chumbo no sangue superior a 25 mg / dL. Neste local, várias instalações de fundição de metais e outros segmentos industriais estavam operando durante os últimos 50 anos.

No Brasil, estudos sobre a exposição ao chumbo ambiental são raros, limitando uma compreensão mais abrangente sobre o seu impacto na saúde pública brasileira (Franco-Netto *et al.*, 2003). Silvany-Neto *et al* (1989) encontraram como média ( $\pm$ DP) dos níveis de chumbo no sangue o valor de  $36,7 \pm 20,7$  mg / dL nas crianças que viviam nas proximidades de uma usina de fundição primária de chumbo em Santo Amaro, Bahia. Em 1996, os mesmos autores (Silvany-Neto, 1996), utilizando o método de Zn-protoporfirina, encontraram níveis de chumbo em torno de 65,5 mg / dL em crianças na mesma área. Estes níveis mantiveram-se elevados desde 1980 devido à contaminação do solo pelo chumbo. Em 2003, os autores encontraram a média dos níveis de chumbo no sangue por volta de 17 mg / dL, que foram até 5 mg / dL mais alto entre crianças com hábito de levar mão a boca, independente de idade, presença de escória visível em torno da casa, situação de emprego do pai, história familiar de intoxicação pelo chumbo e desnutrição (Carvalho *et al.*, 2003).

Em Cubatão (São Paulo), uma das áreas mais industrializadas do Brasil, Santos Filho *et al.* (1993) encontraram a média dos níveis de chumbo no sangue da população o valor de 17,8 mg / dL. Paoliello (2002) avaliou o nível de chumbo no sangue em crianças que vivem nas proximidades do alto curso do Rio Ribeira de Iguape e encontrou um nível de chumbo no sangue o valor de 11,25 mg / dL. Freitas (2004) realizaram uma avaliação de exposição ao chumbo em uma área contaminada de Bauru, que revelou que 311 de 850 crianças analisadas apresentaram níveis de chumbo no sangue acima dos limites estabelecidos pela OMS (Freitas, 2004). Na pesquisa mencionada (Bauru, São Paulo), a reciclagem de baterias contaminou vegetais da área residencial vizinha com óxidos de chumbo. A contaminação por chumbo ambiental foi avaliada pela CETESB (Autoridade de Estado de Controle Ambiental). A usina teve suas atividades suspensas em 2002. Mais da metade das 311 crianças estudadas apresentaram níveis de chumbo no sangue entre 15 e 19 mg / dL, 21% tinham níveis entre 20 e 39 mg / dL, e menos de 1% (três crianças) apresentaram níveis de chumbo no sangue de 40 mg / dL ou superior.

No Brasil, não existem políticas públicas destinadas a estabelecer procedimentos oficiais de amostragem e de análise de chumbo em tecidos humanos, seguido os padrões comportamentais de outros países.

### **Descrições prévias de contaminação por chumbo em Ribeirão Preto, SP; Cubatão, SP e Mato Leitão, RS.**

Utilizando dentes, nosso grupo demonstrou que são encontradas algumas crianças ou grupos de crianças com níveis relativamente altos de chumbo acumulado nos dentes mesmo em regiões sem contaminação por chumbo descrita. Isso aconteceu, por exemplo, quando analisamos os níveis de chumbo encontrados no esmalte superficial de 2 grupos de pré-escolares de Ribeirão Preto, SP e em Bauru, região sabidamente contaminada (Almeida *et al.*, 2007). Realizamos testes no esmalte de 247 crianças de 7 EMEIs (Escolas Municipais de Educação Infantil) de Ribeirão Preto, SP, e de 26 crianças de uma região notoriamente contaminada por chumbo em Bauru, SP, nas imediações da Fábrica de Baterias Ajax. Os resultados desse trabalho indicaram que o 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 (Almeida et al., 2007, publicado no medline em 17 de maio de 2007). Além disso, verificamos que mesmo com a amostragem de 20 a 30 crianças por grupo, é possível identificar regiões mais e menos contaminadas em uma cidade, como foi o que verificamos em Ribeirão Preto, SP, onde foi encontrada uma região da cidade com 35% das crianças com tanto chumbo quanto a mediana da concentração de chumbo descrita para as crianças de Bauru. Aos nossos olhos, esses dados indicam a necessidade de se estudar formas de implementar no Brasil medidas de verificação da contaminação por chumbo em crianças.

O presente estudo pretende estender nossas análises para cidades com diferentes históricos de contaminação incluindo Ribeirão Preto-SP, Cubatão-SP e Mato Leitão-RS. O município de Cubatão localiza-se no litoral sul do estado de São Paulo, a uma distância de aproximadamente de 60 Km de São Paulo capital. Estudos prévios revelaram que peixes e outros organismos aquáticos estão impróprios ao consumo humano devido a altos teores de chumbo, apresentando níveis acima de 0,5 µg/g. Em estudo realizado por Filho et al., 1993 verificou-se concentrações de chumbo em cabelo de 229 crianças, sendo que 189 delas (82,5%) detectou-se teores que variam de 2,5 a 71,4 µg/g. O teor médio de chumbo foi de  $7,25 \pm 8,51$  µg/g.

A cidade de Mato Leitão é um município do Rio Grande do Sul, situado entre os vales do Rio Taquari e do Rio Pardo, na Encosta Inferior Nordeste, e que até sua emancipação correspondia ao 4º Distrito de Venâncio Aires. Atualmente, se apresenta em pleno desenvolvimento e apresenta um comércio crescente, porém ainda é considerada uma cidade essencialmente agrícola. Não há dados a respeito de contaminação ambiental por metais pesados.

### **O caso Plumbum em Santo Amaro da Purificação, BA**

Há décadas, as instituições públicas, a sociedade e a comunidade que vive e trabalha em Santo Amaro da Purificação, Bahia, têm conhecimento dos impactos ambientais e suas conseqüências à saúde humana pelas emissões de contaminantes resultantes da atividade da empresa denominada Companhia Brasileira de Chumbo (COBRAC), de capital francês e nacional, originalmente subsidiada pelo grupo

Penarroya, a qual se instalou e funcionou, neste município, entre os anos de 1960 e 1993, visando à produção de lingotes de chumbo. Em 1989, a COBRAC foi incorporada à Plumbum Mineração e Metalurgia Ltda., pertencente ao Grupo Trevo.

Segundo Anjos (Anjos,1998), a COBRAC, produziu e depositou aleatoriamente 490.000 t de escória contaminada com metais tóxicos, sobretudo chumbo (Pb) e cádmio (Cd). Além da deposição destes resíduos nas áreas de suas instalações e nas suas proximidades, a escória também foi utilizada pela Prefeitura para pavimentar ruas e pela população de Santo Amaro para aterrar pátios e fundações de casas. A própria empresa admitiu ter lançado através de emissões para a atmosfera, no período de 1960 a 1977, 400 t de Cádmio e durante os 33 anos de funcionamento, uma média de 1.152 t de SO<sub>2</sub> mensais (CRA,1992). As emissões de metais pesados para o rio Subaé não foram precisamente quantificados.

Em 1961 ocorreu a primeira solicitação para o fechamento da fábrica, com base em infração ao Decreto n.º 50.877, de 29 de junho de 1961, referente a poluição dos cursos d'água. Em 1975, Reis, da Universidade Federal da Bahia, apresentou um estudo que evidenciava a contaminação do rio Subaé por chumbo e cádmio, provenientes da indústria.

Segundo Cunha & Araújo (2001), em outubro de 1980, o CEPRAM (Conselho Estadual de Proteção Ambiental), através da resolução 54/80, aprovada por meio do decreto 27.605 de 09 de outubro de 1980, do Estado da Bahia, definiu um elenco de medidas para controle da poluição ambiental, além de medidas de saúde pública de caráter imediato, como, por exemplo, o tratamento e acompanhamento prospectivo da população afetada. Ainda no mesmo ano, a empresa encaminha ao CEPRAM um documento onde apresenta soluções técnicas, acompanhadas de cronograma de execução. Em 30 de abril de 1981, o CEPRAM instituiu a Resolução nº 86/81, onde aprova medidas a serem executadas pela empresa, define prazos de execução e fixa o limite de produção anual de chumbo refinado em 22.000 t/ano. O atendimento às exigências do CEPRAM implicou na redução de 50% da produção (Tavares, 1990).

Em 1987, a Companhia Adubos Trevo, de Porto Alegre/RS, associada a Companhia Paulista de Metais adquirem o controle acionário da empresa. Em 1989, a empresa é incorporada à Plumbum Mineração e Metalurgia S/A (OLIVEIRA, 1977).

Em 29 de novembro de 1991, a Plumbum solicita ao Centro de Recursos Ambientais (CRA) licença de operação. Em resposta, o CRA emite parecer que, para a liberação da licença de operação por três anos, a empresa deveria cumprir 27 condicionantes, dentre eles: controle de emissão atmosférica e fugitiva; medidas visando impedir ou minimizar contaminações para o rio Subaé por efluentes de processo e arraste de metais por águas de chuva; caracterização da escória; monitoramento do lençol freático e do rio Subaé, com envio mensal dos resultados para o CRA; medidas de controle para evitar o transbordamento dos tanques de decantação da escória; realização de estudos epidemiológicos; implantação de medidas de prevenção, controle, tratamento e restauração da saúde dos indivíduos sob os efeitos da empresa; fornecimento de água para as populações que utilizem os mananciais subterrâneos, caso comprovada a poluição; auditoria semestral do CRA na empresa para verificação da implantação dos condicionantes acima listados.

As exigências impostas não foram cumprida sendo assim, em dezembro de 1993, a Plumbum encerra suas atividades em Santo Amaro. Segundo Anjos (1998), a usina é abandonada em janeiro de 1994.

### **Um retrospectiva dos estudos realizados em Santo Amaro da Purificação,BA**

Os estudos referentes aos efeitos sobre a saúde da população decorrentes da contaminação ambiental causada pela PLUMBUM englobam o período de 1978 até 2001. Eles abrangeram a avaliação de biomarcadores de dose e efeito para chumbo e cádmio e a avaliação clínica e laboratorial da população residente no entorno da empresa, sendo estes adultos e principalmente crianças, e de uma população de pescadores.

Em 1978 foi realizado um estudo (Carvalho, 1978) com 201 pescadores das residentes em Santo Amaro, São Brás e São Francisco do Conde situadas ao longo do rio Subaé. A partir dos dados de contaminação ambiental de mariscos, peixes e ostras deste Rio, o objetivo era investigar a existência de intoxicação pelo chumbo, através da dosagem do ácido delta aminolevulínico na urina (ALA-U) e pelo cádmio, a partir da ocorrência de proteinúria de baixo peso molecular. O grupo controle foi composto de 83 pescadores da colônia de Guaibim, situada fora da Baía de Todos os Santos. Além

disso, foi objetivo da pesquisa a avaliação da concentração de chumbo e cádmio no cabelo e o padrão de ingestão de frutos do mar e peixes. Embora os níveis médios de ALA-U (2,28mg/g de creatinina) nos pescadores ao longo do rio Subaé fossem maiores do que no grupo controle (1,8mg/g de creatinina) apenas 06 pescadores apresentaram níveis característicos de intoxicação (ALA-U acima de 4,5mg/g de creatinina). Não se observou associação com a ingestão de frutos do mar, no entanto, a metodologia parece não ser adequada para a investigação da relação entre padrão alimentar e intoxicação por chumbo. Além disso, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os níveis de ALA-U dos pescadores de Santo Amaro e o grupo controle, embora esta tenha ocorrido entre os pescadores de São Brás e São Francisco do Conde e o grupo controle.

Em 1980 foi realizado exame clínico-laboratorial de todas as crianças com idade de até 9 anos do entorno da empresa até 900m. Foram encontrados valores de chumbo e cádmio no sangue e zincoprotoporfirina (ZPP) que se estão entre os mais altos do mundo, com ausência de efeitos clínicos visíveis. Em 1985 foi realizada uma amostragem da população infantil para dosagem de ZPP (250 crianças) e chumbo (PB no sangue) e cádmio (Cd no sangue) no sangue (53 crianças). Houve uma significativa redução dos valores médios de PbS (37,7%) e Cd no sangue (67,8%) porém em menor proporção para ZPP (14%). Há dúvidas quanto ao rigor da análise laboratorial dos metais realizada em 1980, pelos valores elevados sem associação de efeitos clínicos, em especial em relação ao cádmio. Ocorreu também ausência de correlação dos níveis de PB no sangue com os níveis de ZPP, ou seja, os primeiros poderiam estar anormalmente altos ou os segundos anormalmente baixos. A hipótese foi que houvesse erro na técnica de análise do chumbo no sangue, pois exige uma metodologia mais complexa do que a análise laboratorial da ZPP. No entanto, a ausência de correlação entre estes dois biomarcadores (ZPP e PB no sangue) também se repete em 1985, quando a técnica de análise laboratorial foi realizada dentro dos padrões determinados internacionalmente.

Os níveis médios de chumbo no sangue estão na faixa de ocorrência de anemia e alterações do desenvolvimento psicomotor na população exposta. A ausência de achados clínicos neste momento pode refletir a ausência de investigação específica do desenvolvimento psicomotor das crianças envolvidas. Em nenhum dos estudos analisados foi relatado a realização de avaliação do desenvolvimento psicomotor das

crianças afetadas, sejam os realizados pela Universidade Federal da Bahia, sejam nos relatórios de acompanhamento realizado pela PLUMBUM por determinação judicial. A ocorrência de anemia foi profundamente estudada por Carvalho (Carvalho, 1982). Ele encontrou uma prevalência de 18.6% de anemia entre as 463 crianças deste grupo nas quais foi feita avaliação hematológica completa (hemograma, hematócrito, hemoglobina, ferro sérico, capacidade de ligação do ferro). Observou que os níveis de hemoglobina aumentavam com a idade, conforme o esperado, sendo a prevalência de anemia entre as crianças de 1 ano de 47,3%. Não havia diferença dos níveis de hemoglobina entre filhos de trabalhadores e não trabalhadores. A ocorrência de anemia foi significativamente associada com má-nutrição e com a interação entre deficiência de ferro e má-nutrição, mas não com intoxicação pelo chumbo, deficiência de ferro isolada e parasitose.

A análise comparativa do teor de chumbo e cádmio nos solos peridomiciliares (jardins e quintais) em 1980 e 1985, mostrou significativa redução dos seus níveis e associação com níveis crescentes de Pb no sangue, Cd no sangue e ZPP em 1980, porém não em 1985. Não houve correlação com geofagia, no entanto, os níveis mais elevados de chumbo no sangue eram na faixa de 1 a 3 anos. Deve-se lembrar que o hábito de geofagia é difícil de aferir e o número de crianças com dosagem de PbS e CdS era pequeno. Em 1985, não se observou correlação dos níveis de Pb no sangue com a presença de escória na casa e a maior diminuição encontrada dos níveis de Pb no sangue foi na faixa de 600 a 900m, ou seja, onde a maior distância determinava que a contaminação ambiental fosse menor.

Com resultado do estudo de 1980, a empresa iniciou avaliação e acompanhamento médico da população circunvizinha, em um raio de 900m, em maio de 1981. A empresa relatou que foram realizados avaliação clínico-laboratorial e dosagem de ZPP em 1290 pessoas (61,7% da população total de 2.090 pessoas) maiores de 14 anos e 618 menores de 14 anos. Na tabela 1 a seguir mostramos os resultados apresentados pela empresa nas crianças e adultos. Segundo relatos, todas as pessoas em que foi encontrado ZPP, com níveis considerados excessivos pela classificação do CDC, foi realizado confirmação laboratorial com ALA-U, e as crianças, após avaliação pediátrica e neurológica, internação para quelação. Em relação as 108 crianças classificadas como risco moderado, 24 delas mudaram e em 17 o ALA – U estava normal. Segundo informações



oficiais, foi feita quelação em 58 destas crianças totalizando 120 e em 146 crianças foi feita avaliação clínica completa. As crianças eram posteriormente acompanhadas com avaliação de biomarcadores (ZPP, ALA-U, CPU, proteínas séricas, creatinina, uréia e elementos anormais e sedimentos na urina). Os responsáveis pelo acompanhamento clínico e laboratorial da população circunvizinha relatou que não encontraram indícios de manifestações clínicas na população examinada, porém não apresentam os laudos médicos e nem a distribuição da população por idade e sexo.

**Tabela 1.** Classificação da população avaliada pela PLUMBUM segundo os critérios do CDC (a época), a partir dos níveis de ZPP. Santo Amaro, 1981/83.

<b>Classificação do CDC</b>	<b>Menores de 14 anos</b>	<b>Maiores de 14 anos</b>
Risco aceitável	448	1060
Risco moderado	108	159
Risco excessivo	62	71
<b>TOTAL</b>	<b>618</b>	<b>1290</b>

\*Fonte: relatórios técnicos trimestrais apresentados pela PLUMBUM no período de agosto de 1981 a janeiro de 1983 ao Conselho Estadual de Proteção Ambiental (CEPRAN) Salvador / Bahia.

Em 1991, foram realizados por Carvalho *et al.*, exames clínicos e laboratoriais de sangue e urina em uma amostra de 310 moradores entre 20 e 50 anos, 36 trabalhadores e 04 prestadores de serviço residentes em domicílios localizados até 500m. Foram encontrados valores de ZPP acima de 30 µg/100mL em 10% dos moradores, sendo o valor máximo encontrado 134 µg/100mL. Em 40 moradores os níveis de PB no sangue estavam entre 40 e 69 µg/dL e em 04 acima de 70µg/dL. Entre os trabalhadores os níveis eram mais elevados com 9 (25%) apresentando níveis de ZPP acima de 300µg/100mL e 8 com níveis de Pb no sangue acima de 70µg/dL.

Um estudo realizado no ano de 1992 (Carvalho,1996) com 101 crianças do entorno da fábrica indicou contaminação evidenciada por maiores níveis de ZPP na faixa etária de 1 a 2 anos e persistência de contaminação pelos níveis também elevados entre as crianças com idade entre 4 e 5 anos. Diminuiu a proporção de crianças com níveis elevados de ZPP, porém aumentou o número de crianças com níveis elevados.

Em 2001, Costa mostra dados mais recentes. Em setembro de 1998 foram estudadas 52 crianças nascidas após o fechamento da empresa. Elas ainda estavam

expostas a escória e aos focos secundários nas ruas e casas. Apresentaram níveis elevados de chumbo e cádmio no sangue correlacionados com desnutrição, história familiar de intoxicação, escória visível e hábito alimentar. O estudo mostra também uma redução dos níveis médios de chumbo no sangue de 1980 a 1998 de 70,9% e mudança do percentual de crianças na faixa de maior incidência de classificação de risco pelo CDC.

Na tabela 2 pode-se visualizar os níveis médios de chumbo no decorrer dos anos e na tabela 3 pode-se visualizar o percentual de redução dos níveis de chumbo no sangue em cada período.

Em 1980 o maior percentual de crianças estava na classe IV – 58,6%, em 1985 o maior percentual de crianças estava na classe III – 60,4% e em 1998 o maior percentual de crianças estavam distribuídas entre as classes III (31,3%) e IIA (33,3%) (tabela 4).

**Tabela 2.** Níveis médios de Chumbo nas crianças de Santo Amaro, BA ( $\mu\text{g/dL}$ )

<b>ANO</b>	<b>Pb no sangue</b>	<b>Número de crianças</b>
1980	58,8	555
1985	36,7	53
1998	17,1	48

\*Adaptado de: Avaliação de alguns aspectos do passivo ambiental de uma metalurgia de chumbo em Santo Amaro da Purificação – Bahia. Angela Cristina Andrade Costa. Tese de Mestrado – Instituto de Química / UFBA. Julho de 2001, PÁG.65.

**Tabela 3.** Percentual de redução dos níveis de chumbo no sangue por período.

<b>PERÍODO</b>	<b>Percentual de redução (%)</b>
1980 – 1985	37,7
1985 – 1998	53,7
1980 – 1998	70,9

\*Fonte: COSTA,2001: Avaliação de alguns aspectos do passivo ambiental de uma metalurgia de chumbo em Santo Amaro da Purificação – Bahia. Angela Cristina Andrade Costa. Tese de Mestrado – Instituto de Química / UFBA. Julho de 2001.

**Tabela 4.** Distribuição da frequência dos níveis de chumbo em amostras de sangue de crianças de ambos os sexos de Santo Amaro em 1980, 1985 e 1998 em relação às classes de risco estabelecidas pelo CDC.

<b>Classe de crianças do CDC e faixas de chumbo no sangue (<math>\mu\text{g}/\text{dl}</math>)</b>	<b>1980</b>	<b>1985</b>	<b>1998</b>
Classe I: (menor ou igual 9)	----	-----	6 (12,5%)
Classe IIA: (10 – 14)	----	-----	16 (33,3%)
Classe IIB: (15 – 19)	8 (1,4%)	7 (13,2%)	11 (22,9%)
Classe III: (20 – 44)	133 (24%)	32 (60,4%)	15 (31,3%)
Classe IV: (45 – 69)	325 <sup>1</sup> (58,6%)	13 (24,5%)	-----
Classe V: (maior ou igual a 70)	89 <sup>2</sup> (16%)	1 (1,9%)	-----
<b>TOTAL</b>	<b>555 (100%)</b>	<b>53 (100%)</b>	<b>48 (100%)</b>

\*Fonte: Avaliação de alguns aspectos do passivo ambiental de uma metalurgia de chumbo em Santo Amaro da Purificação – Bahia. Angela Cristina Andrade Costa. Tese de Mestrado – Instituto de Química / UFBA. Julho de 2001, PÁG.66, TABELA 31.

<sup>1</sup> Faixa de valores de chumbo ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ ): 41,44 – 82,7.

<sup>2</sup>Faixa de valores de chumbo ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ ): 82,88 – 155,4.

Tomando como base os estudos prévios e levando-se em consideração que nenhuma medida efetiva de remediação foi tomado pode-se dizer que mesmo após anos do fechamento da fábrica ainda persiste um quadro de intoxicação da população trabalhadora e da comunidade do entorno da fábrica. Não foram observados pelos estudos realizados sinais de efeitos clínicos nesta população relacionados a esta contaminação. No entanto, devemos ressaltar que talvez as pesquisas não tenham sido direcionadas para a identificação dos efeitos esperados sob aquela dose de exposição. Não foram realizados estudos de coorte com a população e os dados fornecidos pela empresa não são confiáveis. Porém devemos ressaltar que os dados fornecidos por estes estudos são mais do que suficientes para confirmar a condição da saúde da população de Santo Amaro, BA, a qual permanece inalterada até os dias de hoje.

### **Fontes de exposição**

As fontes de exposição ao chumbo não são as mesmas em todos os países (Bloch *et al.*, 1998). A exposição ao chumbo pode ocorrer por meio de alimentos, água e poeira contaminados, encanamentos revestidos com chumbo, atividades industriais

como mineração e processamento de chumbo, além de fábricas de reciclagem de baterias, cerâmicas e tintas (Lappalainen & Knuuttila, 1979; Lanphear *et al.*, 1998; Warren, 2000; Ryan *et al.*, 2004; Barbosa *et al.*, 2005; Nriagu *et al.*, 2006).

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 significativo. Atualmente, os principais consumidores de chumbo no país são os fabricantes de baterias (80%), seguido por óxidos e pigmentos (12%) e setores elétricos e eletrônicos (8%) (Paoliello & De Capitani, 2005).

A tabela 5 assinala as rotas de exposição específicas para cada compartimento ambiental.

**Tabela 5.** Rotas de exposição específica de cada meio

<b>MEIO AMBIENTAL</b>	<b>ROTAS DE EXPOSIÇÃO</b>
<b>ÁGUA</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ingestão direta.</li> <li>2. Contato e reação dérmicas. Contato e reação oculares.</li> <li>3. Inalação secundária pelo uso doméstico (vapor, aerossol).</li> </ol>
<b>SOLO</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ingestão direta (principalmente crianças de 9 meses a 5 anos).</li> <li>2. Contato e reação dérmicas. Contato e reação oculares.</li> <li>3. Inalação de compostos químicos voláteis presentes no solo.</li> <li>4. Inalação de pó.</li> </ol>
<b>AR</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inalação.</li> <li>2. Contato e reação dérmicas. Contato e reação oculares.</li> </ol>
<b>BIOTA/ CADEIA ALIMENTAR</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Consumo de plantas, animais ou produtos contaminados, secundário ao consumo de água contaminada.</li> <li>2. Consumo de plantas, animais ou produtos contaminados, secundário ao consumo ou contato com solo, pó ou ar contaminado.</li> <li>3. Consumo de plantas, animais ou produtos contaminados.</li> <li>4. Contato dérmico com, ou reação à, plantas, animais ou produtos contaminados.</li> </ol>
<b>MEIOS MISCELÂNEOS</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Ingestão direta.</li> <li>2. Contato e reação dérmicas. Contato e reação oculares.</li> <li>3. Inalação secundária à volatilidade ou arraste dos contaminantes de meios miscelâneos</li> </ol>

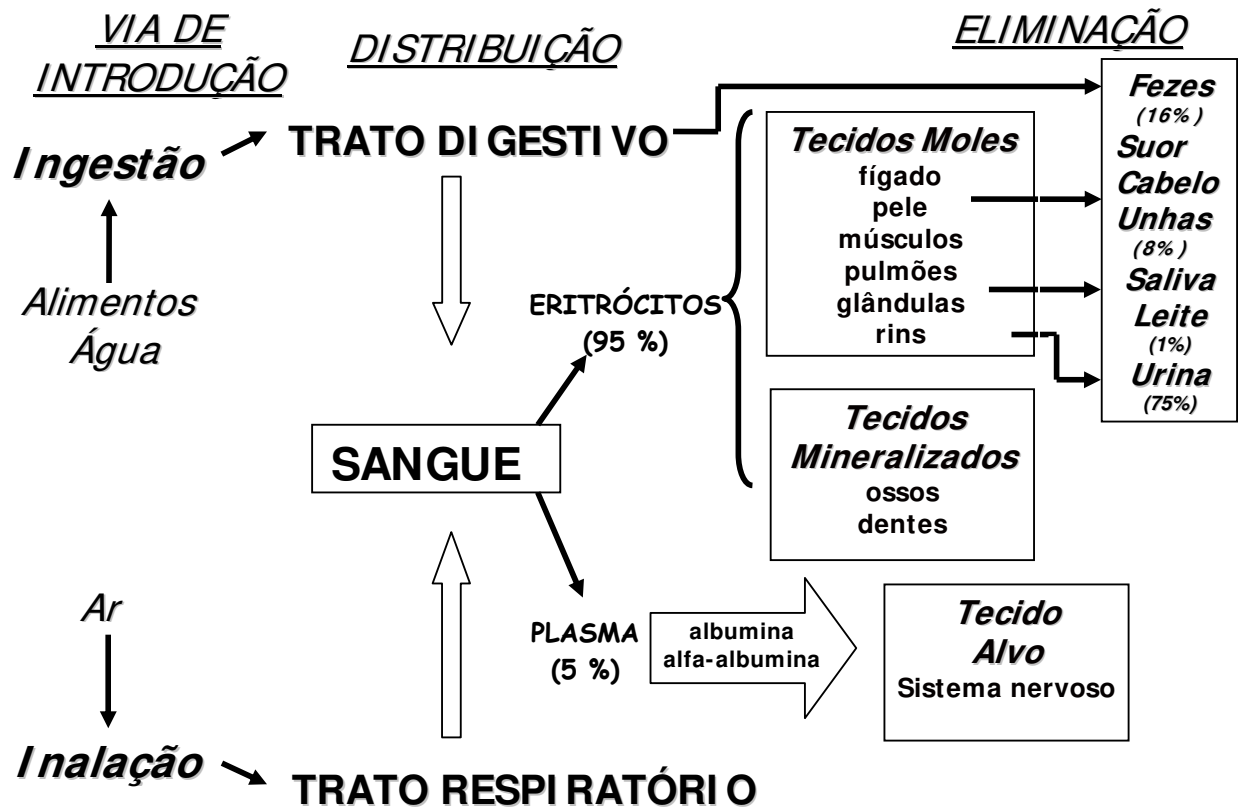
Fonte: ATSDR (1992)

## **Metabolismo do Chumbo**

A contaminação pelo chumbo se dá pelas vias aéreas superiores, no caso de poluição do ar, ou por ingestão e absorção através do trato gastrointestinal, no caso de contato com o metal, que, em geral, é levado à boca através das mãos contaminadas (Calabrese *et al.*, 1997). O chumbo quando inalado é completamente absorvido, quando ocorre absorção gastrointestinal, a porcentagem de absorção é diferente, em se tratando de 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 retêm 38,1% (Ziegler *et al.*, 1978). Em condições sistêmicas alteradas, como em casos de alterações de ferro, cálcio e zinco, a absorção é aumentada (Freitas, 2001).

Depois que o chumbo entra no organismo, pode seguir diversas vias; conforme sua fonte, e extensão; dependendo de sua biodisponibilidade. A fração do chumbo que é absorvida depende principalmente da sua forma física e química, particularmente do tamanho da partícula e a solubilidade do componente específico (National Research Council 1993; Agency for Toxic Substances and Disease Registry - ATSDR, 1999).

Após sua absorção, o chumbo passa a ser distribuído por todo o organismo, através da 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 os tecidos alvo, principalmente para o sistema nervoso (Needleman *et al.*, 1979).



### Biomarcadores de exposição ao chumbo

A avaliação da exposição aos agentes químicos constitui um importante aspecto para a saúde pública, tendo em vista a possibilidade de se prevenir ou minimizar os efeitos da interação dos contaminantes com o organismo humano (Amorim, 2003).

Os estudos dos efeitos das substâncias químicas sobre a saúde possibilitam avaliar o risco da população exposta e constitui o primeiro passo na fixação de normas ambientais para um contaminante químico presente em um meio. E para isso é importante conhecer a solidez e as limitações dos dados toxicológicos, assim como as informações disponíveis provenientes destes estudos (Amorin, 2003).

Os biomarcadores indicam a exposição individual ao chumbo e sua concentração pode refletir a história de exposição passada ou recente. Inúmeros biomarcadores para chumbo já foram citados na literatura, dentre os quais, sangue,

plasma, osso, saliva, cabelo, unha, urina, fezes, dentes, porém cada um deles tem validade variável e revela uma situação específica (Barbosa *et al.*, 2005).

Como apontado por Bergdahl e Skerfving (2008), entre os atributos que se precisa avaliar em um biomarcador de exposição a chumbo estão: 1) a acurácia e precisão analítica, 2) custo, 3) as questões práticas de uso (coleta por exemplo), 4) o que o biomarcador reflete, 5) a relação com exposição e 6) a relação com efeitos. Iremos discutir os diferentes biomarcadores à luz destes atributos a seguir.

### **Chumbo no sangue e no plasma**

A utilização de biomarcadores de efeito, em alguns casos, pode ser útil. Os biomarcadores de efeito estão correlacionados com os produtos da biossíntese do heme que se formam em maiores quantidades quando as enzimas que participam da via da síntese do heme estão inibidas pelo chumbo. Em casos de exposição à altas doses esses biomarcadores são vantajosos (>25 ug/dL), principalmente pelo menor custo das medidas e ausência de problemas com contaminação das amostras por chumbo exógeno. Entretanto, quando o chumbo está presente em baixas doses no sangue, esses marcadores deixam de ser úteis, e as medidas diretas de chumbo são mais adequadas (Parsons *et al.*, 1991).

As determinações de chumbo no sangue normalmente são feitas por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF-AAS), havendo métodos padronizados para sangue (Parsons and Slavin, 1993). O limite de detecção descrito para esta técnica está torno de 1 ug/dL e são descritas variações entre medidas da mesma amostra de cerca de 5%, o que é considerado uma variação pequena (Bergdahl and Skerfving, 2008).

Durante as últimas cinco décadas, o sangue total tem sido o principal fluido biológico utilizado para análise da exposição ao chumbo (Rabinowitz, 1995). A concentração deste metal no sangue dura em média 30-40 dias, podendo ocorrer um declínio se o indivíduo não for exposto a novas fontes de contaminação (Altshuller *et al.*, 1962; Attramadal e Jonsen, 1976; Brudevold *et al.*, 1977; Needleman *et al.*, 1979; Haavikko *et al.*, 1984; Rabinowitz, 1990, Hu *et al.*, 1998, Ericson, 2001). Isso se deve ao fato do chumbo ser distribuído para os diferentes tecidos do organismo,

principalmente os mineralizados, pois o chumbo se comporta de forma muito semelhante ao cálcio (Stewart, 1974). Caso a exposição cesse ou diminua, o mineral depositado nos tecidos ósseos passa a ser liberado na corrente sanguínea. Desta forma, a porcentagem de chumbo proveniente de exposição passada na corrente sanguínea aumenta até que todo o estoque nos tecidos ósseos se esgote (Gwiazda *et al.*, 2005).

Existe uma constante troca de chumbo entre o sangue e o osso, e a concentração de chumbo no sangue corresponde cerca de 5% do “body burden” total (Rabinowitz, 1998).

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 (Coke *et al.*, 1996).

O CBLI (Cumulative Blood Lead Index ) pode ser útil para ter uma medida cumulativa, mesmo que as medidas de sangue não tenham sido obtidas de forma sistemática a intervalos regulares. Esse índice se baseia no uso da área sob a curva de chumbo no sangue traçada para um determinado indivíduo para calcular a exposição, assim se tem como parâmetro as concentrações e o tempo (Hu *et al.*, 2007).

A avaliação dos efeitos do chumbo na saúde humana deve levar em conta a variabilidade na suscetibilidade individual a efeitos para uma mesma concentração de chumbo no sangue (Bergdahl and Skerfving, 2008). Isso pode ser resultante de variações individuais em vários polimorfismos genéticos, que parecem caracterizar subgrupos populacionais particularmente suscetíveis aos efeitos do chumbo. Além disso, algumas doenças crônicas como a diabetes tipo II tem sido associadas a piores efeitos em concentrações mais baixas de chumbo (Schwartz e Hu, 2007).

Embora agências de saúde e de controle ambiental recomendem limites máximos de exposição ao chumbo, a Secretaria de Segurança e Saúde no Trabalho tem como valor referência de normalidade (VR) o nível sanguíneo de chumbo de 40 µg/dL, e como Índice Biológico Máximo Permitido (IBMP) o nível de 60 µg/dL (Manual de Legislação Atlas:Segurança e Medicina no Trabalho, 1997). Estes níveis estão bem acima daquele estabelecido pela Organização Mundial da Saúde de 20 µg/dL como



limite máximo para a população adulta. No caso das crianças, que são mais susceptíveis aos efeitos do chumbo, este limite é de 10 µg/dL (World Health Organization: Regional Office for Europe: air quality guidelines, 1986).

## **Chumbo nos tecidos mineralizados**

### **Osso**

O osso, assim como o sangue, também pode ser utilizado como biomarcador, porém, devido ao processo de remodelação óssea, a concentração encontrada deve ser correlacionada com a intensidade e período de exposição a esse metal (Hu *et al.*, 1998). Outra desvantagem seria a necessidade de procedimentos invasivos para obtenção desses dados. Recentemente procedimentos não invasivos, porém de elevado custo, como fluorescência de raio X têm se mostrado promissores quando se trata da determinação da concentração de chumbo no osso (Hu *et al.*, 1998; Todd *et al.*, 2000). A adaptação do uso de XRF para uso *in vivo* começou em meados de 1980 (Hu, 1998), e os primeiros resultados de estudos populacionais utilizando XRF aparecem em meados da década de 1990 (Hu *et al.*, 2007). O tempo de medida requerido para obter sinal adequado é no mínimo 30 minutos, e é fundamental que a área irradiada esteja totalmente imóvel. A quantidade de radiação emitida tem sido comparada àquela de uma tomada de radiografia odontológica convencional, o que é bastante aceitável do ponto de vista de riscos à saúde (Hu *et al.*, 2007; Todd and Chettle, 1994). Autores apontam para o cuidado que se deve ter ao expor crianças, uma vez que a dose recebida por uma criança será muito maior do que a de um adulto em função da presença de medula óssea vermelha na tíbia da criança (Nie *et al.*, 2007).

O chumbo no sangue é incorporado em tecidos calcificados como ossos e dentes, e pode permanecer por anos (Rabinowitz 1991, O'Flaherty, 1995). De acordo com Rabinowitz (1991), a meia vida do chumbo no osso pode durar de 10 a 30 anos. O estoque de chumbo nos tecidos calcificados depende do *turnover* que acontece no tecido, e esse processo, por sua vez, vai depender do tipo de osso, que pode ser compacto (baixo *turnover*) ou trabecular (alto *turnover*) (O'Flaherty, 1995). Rabinowitz (1989) calculou a capacidade de *turnover* no osso compacto, que é aproximadamente

2% por ano e no osso esponjoso ou trabecular, que é em torno de 8%. As descrições mais freqüentes são de chumbo na patela e na tíbia. A patela é um osso predominantemente trabecular, onde o tempo de residência do chumbo é de poucos anos. A tíbia é um osso predominantemente cortical, sendo as medidas feitas na região da diáfise, o qual o tempo de residência do chumbo é de cerca de 30 anos (Barbosa *et al.*, 2005).

Diferenças fisiológicas entre crianças e adultos aumentam a susceptibilidade das crianças aos efeitos deletérios: nos adultos 94% do “body burden” de chumbo é armazenado nos ossos e dentes, sendo que essa proporção é apenas de 70% em crianças (Barry 1981). Além disso, o crescimento contínuo de crianças implica constante remodelação óssea, por causa do desenvolvimento esquelético (O’Flaherty, 1995). Tal fato contribui para um estado em que o chumbo no osso é continuamente liberado no compartimento sangüíneo, um processo descrito como contaminação endógena (Gulson *et al.*, 1996). Esse processo é particularmente significativo em se tratando de mulheres grávidas porque a gravidez causa um aumento da remodelação óssea (Rust *et al.*, 1999).

As medidas de chumbo no osso são realizadas por meio de técnicas quantitativas bem estabelecidas, como GF-AAS, voltametria anódica ou ICP-MS. Um dos dois elementos mais abundantes do osso (fósforo e cálcio) é também determinado, o que permite a expressão dos resultados em micrograma de chumbo por grama de osso (ug/g, normalmente de osso seco). As medidas em osso seco apresentam variação de 20% a mais na concentração de chumbo em comparação com medidas obtidas *in vivo*.

A concentração média encontrada em indivíduos não expostos a chumbo no ambiente de trabalho e de cerca de 20 ug/g de chumbo no osso, enquanto trabalhadores expostos podem apresentar até 100 ug/g (Bergdahl and Skerfving, 2008). Devido ao processo de remodelação, trabalhadores com esta concentração no osso podem apresentar 16 ug/dL de chumbo no sangue pela mobilização contínua de chumbo do osso (Barbosa *et al.*, 2005). No caso de mulheres com cerca de 50 ug/g de chumbo no osso, poderão apresentar medidas no sangue de 8 ug/dL. Em períodos de intenso remodelamento ósseo, mais chumbo é mobilizado do osso (Barbosa *et al.*, 2005).

Ainda hoje podemos afirmar que medidas realizadas no osso não têm a mesma acurácia e precisão analíticas, e não podem ainda ser feitas em laboratórios comerciais ou governamentais se compararmos com as medidas no sangue (Hu *et al.*,

2007). Além disso, o tempo de meia hora para medição e a imobilidade necessária para realização do exame dificultam a medida, que tem uma precisão razoável em homens adultos. Em mulheres e crianças a variabilidade das medidas é muito grande e uma boa porcentagem das medidas de pessoas não expostas ocupacionalmente costuma ser negativa. Apesar destes problemas, o uso de medidas de chumbo acumulado no osso, particularmente no osso cortical, e os dados de CBLI foram fundamentais para a demonstração de que maior exposição cumulativa a chumbo está associada a risco aumentado de doenças crônicas em populações adultas (Schwartz and Hu , 2007).

## **Dentes**

As medidas das concentrações de chumbo no dentes nos trazem informações distintas quanto à exposição a chumbo. Além disso, a facilidade de acesso e realização das medições diretas fez com que esse tecido atraísse a atenção por parte de alguns pesquisadores.

Os dentes decíduos começam sua formação no período intrauterino, sendo assim, as medidas de chumbo em amostras de dentes decíduos muitas vezes representam a exposição a chumbo de um período precoce do desenvolvimento, quando os efeitos do chumbo são particularmente nocivos.

Para a utilização de dentes como biomarcadores é necessário levar em conta a “cronologia” de formação e mineralização de cada grupo de dentes, além das características de cada tecido que compõe os dentes (Nanci , 2008). Sendo assim, é possível identificar as partes dos dentes que registram a exposição em um período específico do passado e outras partes que trazem informação sobre a exposição acumulada de certo momento no passado até o momento em que o dente foi perdido.

## **Dentina**

Hebert Needleman foi um dos pioneiros a estudar os efeitos do chumbo na saúde das crianças. Em 1970, ele realizou um estudo a fim de documentar os efeitos da exposição ao chumbo no desenvolvimento intelectual e comportamento destas crianças. Em 1979, começou sua luta na tentativa de eliminar o chumbo da gasolina, pois a

concentração deste metal no sangue das crianças se mostrava muito elevada. Posteriormente, Needleman inovou seus estudos investigando as concentrações de chumbo na dentina e sugeriu, desde então, que esta fosse utilizada como biomarcador para chumbo. Ele relatou que mesmo em concentrações mínimas, particularmente em crianças, o chumbo apresenta efeitos neurotóxicos, levando a diminuição de QI, inabilidades de fala e atenção e distúrbios no desenvolvimento psíquico (Needleman *et al.*, 1972, 1974, 1979, 1992)

A incorporação de chumbo à hidroxiapatita da dentina acontece como reflexo dos níveis de chumbo no sangue durante sua mineralização (Rabinowitz *et al.*, 1993).

A linha neonatal é um achado histológico que, normalmente, está presente em todos os dentes decíduos e, ocasionalmente, em primeiros molares permanentes (Schour, 1936). Por meio de sua visualização pela microscopia de luz podemos utilizá-la para identificação de regiões depositadas nos períodos pré e pós natal no esmalte e na dentina (Weber e Eisenmann, 1971). Assim, a análise de dentes decíduos esfoliados pode fornecer dados importantes sobre a história da contaminação por chumbo desde a vida intra-uterina (Rabinowitz *et al.*, 1993).

A dentina de dentes decíduos evidencia a exposição durante a fase precoce da primeira infância, na qual a contaminação por objetos é uma das maiores fontes de contaminação (Gulson, 1996).

Mesmo depois da erupção dental, a dentina continua sendo depositada, mas em ritmo mais lento. Assim, ela é um indicador da exposição ao chumbo durante toda a vida do indivíduo. Medidas de chumbo na dentina circumpulpar são consideradas as melhores medidas do metal acumulado cronicamente.

### **Esmalte Dental**

Existe uma variação muito grande entre as concentrações de chumbo no esmalte descritas na literatura (Shapiro *et al.*, 1972; Fergusson *et al.*, 1987; Antilla, 1987; Gil *et al.*, 1994; Arora *et al.*, 2006), que vai de 1.7 até 4.900 µg/g (Antilla, 1987; Brudevold, 1956). Os dados acerca da concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos são escassos, pois poucos trabalhos utilizaram este modelo como amostra

(Gomes *et al.*, 2004; Costa de Almeida *et al.*, 2007). Também há dúvidas sobre a origem do chumbo no esmalte, ou seja, se ele seria oriundo da incorporação pré-eruptiva, ou se o chumbo dos primeiros micrometros de esmalte seria resultante do acúmulo pós eruptivo (contaminação por objetos, saliva, alimentação) (Pfrieme, 1934; Maulbetsch e Rutishauser, 1936; Barbosa *et al.*, 2005).

Um aspecto valioso e interessante das medidas de chumbo no esmalte é sua capacidade de elucidar a história de exposição ao chumbo. Os dentes são compostos por tecidos distintos, os quais são formados em diferentes períodos e por isso, suas partes podem refletir diferentes estágios da vida do indivíduo. Por exemplo, o esmalte de dentes decíduos e parte do esmalte de dentes permanentes são formados *in útero*, fato que pode prover informações da exposição pré natal ao chumbo. Essa informação é valiosa para entendimento da relação dose-efeito das anomalias embrionárias, particularmente em se tratando de disfunção neurotóxica (Gulsson, 1996).

O esmalte dental pode refletir a exposição passada e atual ao chumbo, mesmo que os níveis sanguíneos tenham voltado ao normal (Needleman, 1991). Esse achado se deve ao fato de não ocorrer *turnover* de apatita no esmalte, como acontece remodelação no osso, ou seja, uma vez que o chumbo é depositado, ele não é posteriormente removido (Grobler *et al.*, 2000).

O interesse na utilização do esmalte como biomarcador do chumbo é cada vez maior (Ericson, 2001; Uryu, 2003; Rinderknecht, 2005), particularmente quando consideramos que as amostras de esmalte superficial são facilmente coletadas por meio de biópsia de esmalte, técnica introduzida por Brudevold *et al.*, em 1975, que utiliza uma amostra dos minerais do esmalte obtida por meio de ataque ácido para fazer a análise de chumbo. Contudo, detalhes sobre o mecanismo de acúmulo de chumbo na superfície do esmalte ainda não foram completamente elucidados (Costa de Almeida *et al.*, 2007).

Utilizando dentes, particularmente o esmalte dental, demonstrou-se que são encontradas algumas crianças ou grupos de crianças com níveis relativamente altos de chumbo acumulado nos dentes mesmo em regiões sem contaminação por chumbo descrita. Isso aconteceu, por exemplo, quando analisamos os níveis de chumbo encontrados no esmalte superficial de 2 grupos de pré-escolares de Piracicaba, SP, uma população residente em uma região industrial e outro residente numa região não

industrial (Gomes *et al.*, 2004). Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa quando comparou-se os resultados obtidos para as crianças da região industrial com aqueles das crianças da região não industrial. Esses resultados demonstram que também no Brasil as crianças estão expostas a níveis mais altos de chumbo em alguns ambientes, particularmente em regiões industrializadas de cidades. Posteriormente realizou-se testes no esmalte de 247 crianças de 7 EMEIs (Escolas Municipais de Educação Infantil) de Ribeirão Preto, SP, e de 26 crianças de uma região notoriamente contaminada por chumbo em Bauru, SP, nas imediações da Fábrica de Baterias Ajax. Os resultados desse trabalho indicaram que o 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 (Costa de Almeida *et al.*, 2007). Além disso, verificamos que mesmo com a amostragem de 20 a 30 crianças por grupo, é possível identificar regiões mais e menos contaminadas em uma cidade, como foi o que verificamos em Ribeirão Preto, SP, onde foi encontrada uma região da cidade com 35% das crianças com tanto chumbo quanto a mediana da concentração de chumbo descrita para as crianças de Bauru.

### 3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente trabalho foram:

- a) comparar as concentrações de chumbo em diferentes camadas do esmalte dentário e na dentina primária e secundária em dentes decíduos coletados em regiões com diferentes históricos de poluição ambiental, particularmente por chumbo. Essas regiões são: 1- Santo Amaro da Purificação (BA); 2- Cubatão (SP); 3- Ribeirão Preto (SP); e 4- Mato Leitão (RS);
- b) correlacionar a concentração de chumbo em diferentes camadas do esmalte e na dentina nos dentes coletados;
- c) definir a equação da reta que melhor representa a distribuição de chumbo em regiões com diferentes históricos de contaminação ambiental, de acordo com o tipo de dente;
- d) analisar espacialmente a distribuição de chumbo nas amostras descritas em **a** por microfluorescência de raio X.





## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **Seleção da amostra populacional e local da pesquisa**

Após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - Campus de Ribeirão Preto (processo número - 2007.1.1016.58.8, Anexo A), segundo a Resolução 196/96 de 10 de novembro de 1996 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), iniciou-se a seleção das amostras.

Inicialmente obtivemos a autorização da Secretaria da Saúde e Educação em cada cidade incluída no presente trabalho. A Secretaria da Educação de cada cidade nos forneceu a lista das escolas municipais e com o auxílio de um mapa localizamos cada uma delas. Excluímos da lista as escolas de educação infantil, uma vez que a faixa etária não corresponde ao período de esfoliação dentária. As escolas incluídas foram escolhidas aleatoriamente com o auxílio de um mapa da cidade. Sorteamos escolas em diferentes localidades optando sempre por incluir apenas uma por bairro. Nas escolas selecionadas, visitamos as salas de aula que incluía a faixa etária de 6-12 anos, a qual corresponde ao período de esfoliação dos dentes decíduos. Foram realizadas campanhas para coleta de dentes decíduos esfoliados, nas escolas públicas das cidades incluídas.

Participaram deste estudo 4 cidades brasileiras com diferentes históricos de contaminação ambiental incluindo Santo Amaro, BA; Ribeirão Preto, SP; Cubatão, SP e Mato Leitão, RS.

Os diretores das escolas, os professores, os pais ou responsáveis pelas crianças receberam informações sobre a realização da pesquisa e deram sua autorização através da assinatura de um termo de doação de dentes (Anexo B).

### **Materiais**

A fase experimental foi realizada no Laboratório de Proteínas no Departamento de Morfologia, Estomatologia e Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Antes de iniciar o preparo das amostras, todo o material que seria utilizado e a bancada sobre a qual o instrumental e pipetas seriam dispostos, foram limpos com uma

solução de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) a 10% v/v, a fim de remover possíveis contaminações prévias pelo chumbo. Os tubos tipo eppendorf foram previamente deixados em solução de ácido nítrico a 10% durante 24 horas. Em seguida, esse material recebeu 3 banhos com água ultrapura (MILI Q) e foram secos em capela de fluxo laminar classe 100. Todo esse procedimento foi realizado dentro de uma sala branca classe 10000. Essa limpeza tinha o objetivo de descontaminação do material para o chumbo.

### **Preparo das amostras**

No presente trabalho somente foram incluídos dentes hígidos. Além disso, apenas foram incluídas as crianças que doaram 3 ou mais dentes. Todas as crianças incluídas no projeto foram catalogadas. Feito isso, os dentes dispostos em tubos descontaminados para chumbo foram submersos em peróxido de hidrogênio 10% por 15 minutos para remoção da matéria orgânica, conforme descritos por Fergusson em 1987.

Em seguida, as amostras foram submetidas à profilaxia profissional com escova de Robinson, em baixa-rotação e posteriormente foram limpas 5 vezes consecutivas em ultrassom por 30 minutos em tubos tipo eppendorf contendo água ultrapura (MILI Q). As amostras limpas foram armazenadas em tubos para centrífuga (tipo eppendorf - Axygen Scientific, Inc., Union City, USA) previamente descontaminados para chumbo, em uma sala branca classe 10000, para posterior realização das microbiópsias de esmalte.

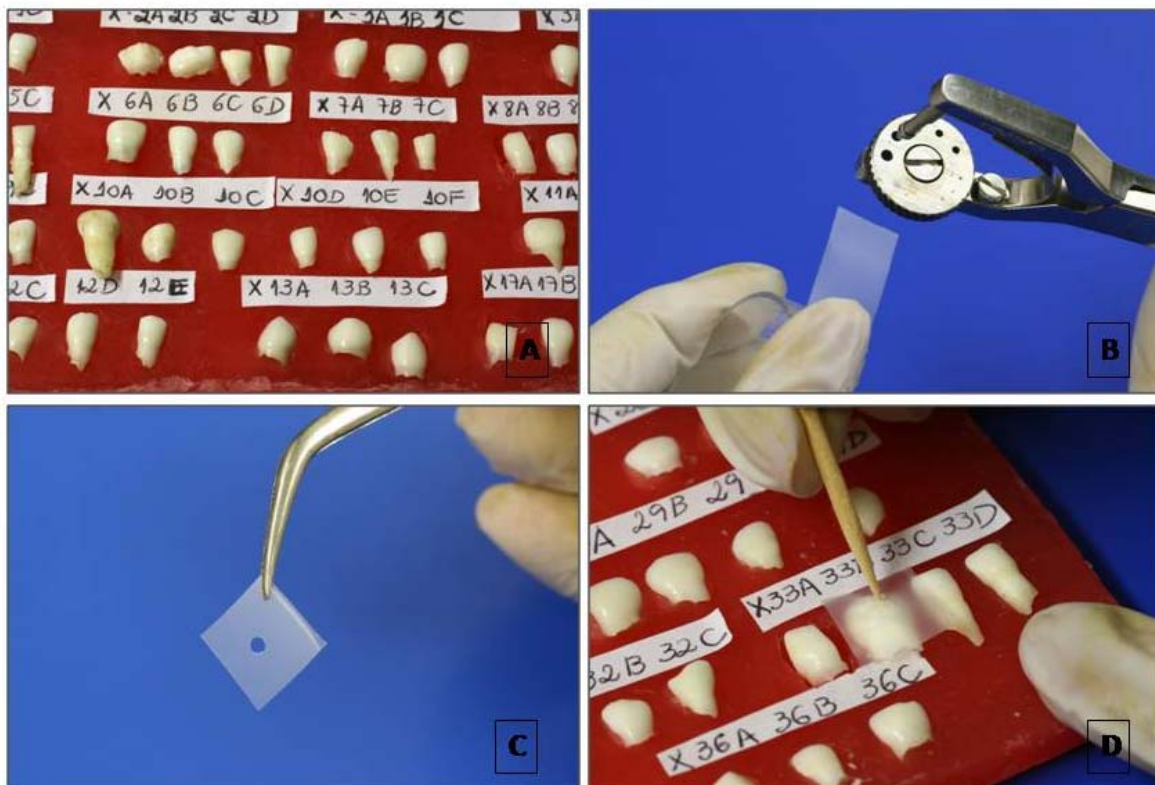
### **Técnica da biópsia de esmalte**

Foram obtidas amostras da superfície do esmalte dentário através de uma técnica denominada microbiópsia de esmalte. Em cada dente foram realizados 5 biópsias de esmalte sucessivas. A técnica utilizada foi modificada por Gomes *et al.*, 2004 a partir da técnica original, proposta por Brudevold *et al.* (1975) com o objetivo de adaptá-la à presente amostra, o qual trata-se de dentes decíduos.

Foram incluídos no presente trabalho todas as crianças que doaram 3 ou mais dentes. Os dentes, os quais foram previamente limpos, foram montados em cera utilidade (Figura 1A) e identificados. Durante a execução da técnica da biópsia do esmalte, as amostras foram manuseadas dentro de uma capela de fluxo laminar classe 100.

Na figura 1, de A a D, podemos visualizar as etapas que antecedem a realização da microbiópsia de esmalte. Inicialmente uma fita adesiva (fita mágica, 810 Scotch® - 3M) com uma perfuração de diâmetro 1,6mm foi firmemente aderida à porção central da superfície vestibular do dente, demarcando o local da biópsia. No local da perfuração foram dispensados, com uma micropipeta automática, 5µl da solução de HCl a 1,6N em glicerol a 70% (v/v), o qual permaneceu em contato com a superfície dental durante 20 segundos. Após 20 segundos, a solução da biópsia foi aspirada e transferida a um tubo tipo eppendorf descontaminado e contendo 200µl de água ultrapura (MILI Q). Em seguida, foram aplicados 5µl de solução de glicerol a 70% na perfuração, por 10 segundos, os quais também eram aspirados e adicionados ao mesmo tubo contendo a solução de biópsia diluída em água ultrapura (MILI Q).

Com o intuito de verificar a contaminação pelo chumbo no ambiente de trabalho durante os procedimentos, foi feito o controle obtido por meio de brancos à partir da mesma solução de biópsia utilizada para aquisição das amostras de esmalte e dentina.

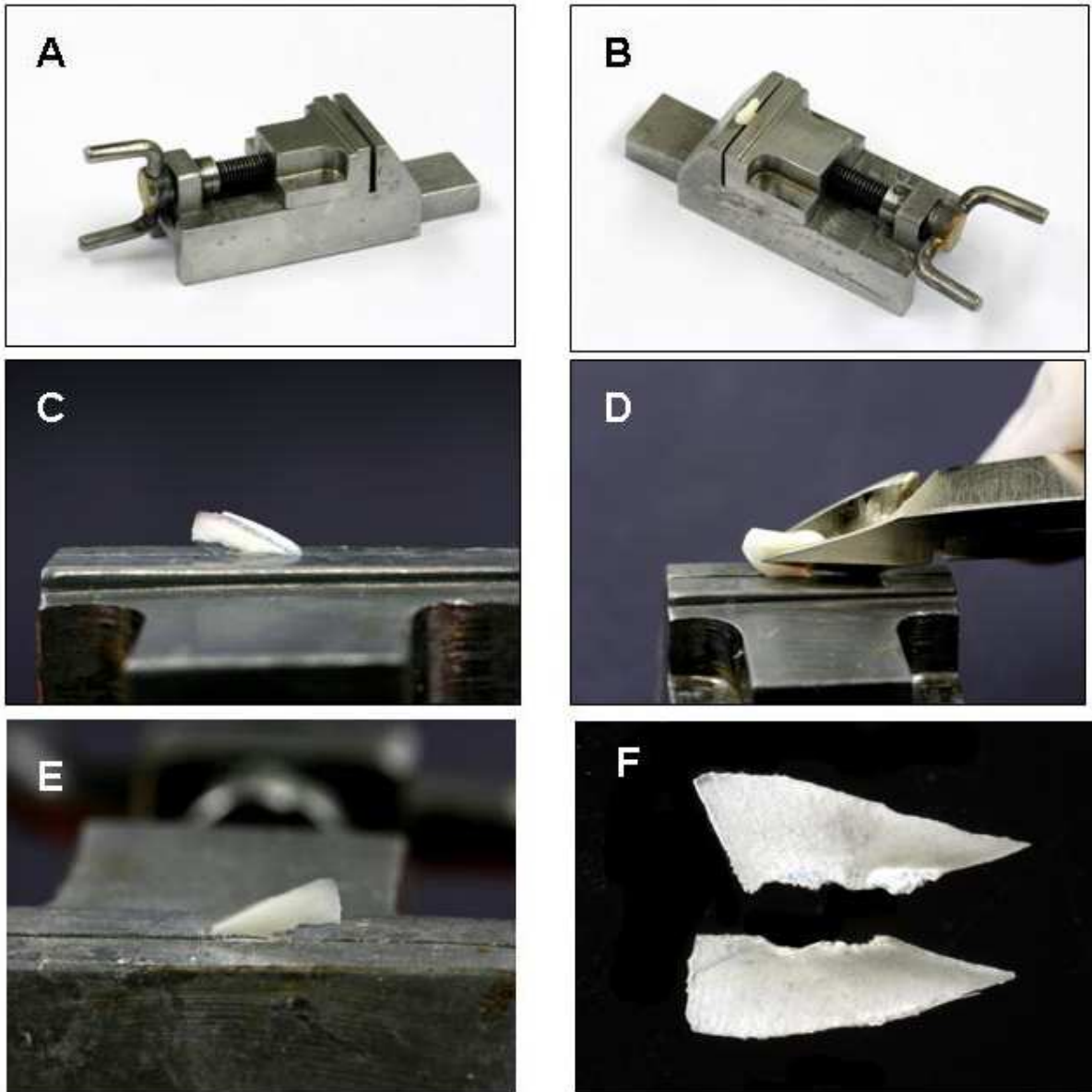


**Figura1-** A- dentes decíduos montados em cera utilidade; B-perfurador utilizado para realização da demarcação central; C-fita mágica com demarcação central; D-fita mágica posicionada na face vestibular de um dente decíduo

## **Preparo das amostras de dentina**

Os mesmos dentes utilizados para aquisição de amostras de esmalte dental para determinação de chumbo foram utilizados para remoção de amostras de dentina pré e pós natal. Cada dente foi dividido ao meio com disco diamantado Buehler Diamond Wafering Blade series 15 LC Diamond. Os dentes foram posicionados em uma placa metálica com cera utilidade e posicionados na cortadeira de dentes, a qual era refrigerada com água destilada. As 2 amostras de dentina dos dentes decíduos utilizados foram obtidas a partir de 1 fatia longitudinal central de cada dente, cortada no sentido vestibulo-lingual com discos diamantados. Essas fatias foram cortadas após terem sido feitas as 5 biópsias sucessivas de esmalte nesses dentes. Para obtenção dos 2 fragmentos de dentina de regiões distintas, um procedimento detalhado foi padronizado a partir dos trabalhos de Needleman *et al.* (1972).

O esmalte foi inicialmente removido da fatia central de dente (Figura 2D). A fatia do dente sem o esmalte foi firmemente presa a uma morsa (Figura 2 A, B e C). As amostras de dentina das 2 partes distintas foram obtidas com o uso de um alicate de unhas pequeno e afiado, sendo uma da região junto à câmara pulpar e outra da região sob o esmalte na região incisal. As amostras de dentina (Figura 2F) foram acondicionadas em tubos tipo eppendorf descontaminados e lavadas em ultrassom com 5 banhos de água miliq, sendo a seguir dissolvidas em 20 ul de ácido nítrico bidestilado (ultrapuro, Merck) até completa digestão das amostras, para posterior análise de fósforo e chumbo.



**Figura 2-** **A)** Imagem ilustrativa da morsa que foi utilizada para preparação das amostras; **B)** Fatia retirada no sentido vestibulo lingual da porção central do dente, posicionada na morsa; **C)** Fatia presa na morsa, **D)** Imagem ilustrativa do alicate que foi utilizado para preparação das amostras; **E)** Fatia presa na morsa após corte do esmalte com alicate, **F)** Fatia dividida ao meio, após remoção do esmalte

## **Análises químicas**

### **Determinação de fósforo**

A fim de determinar a espessura da camada de esmalte removida durante a biópsia, foi dosada a concentração de fósforo inorgânico (Pi) no esmalte em solução.

As concentrações de fósforo presentes nas amostras foram determinadas pelo método colorimétrico de Fiske e Subbarow (1925). O íon fosfato (Pi) reage com o molibdato de amônio na presença de ácido sulfúrico formando um complexo de fosfomolibdato de amônio. Por ação do ácido ascórbico (ácido alfa-amino-naftol sulfônico), em meio alcalino, o complexo formado é reduzido a azul de molibdênio, cuja absorbância medida a 660 nm é diretamente proporcional à concentração de fósforo na amostra analisada.

A determinação das concentrações de fósforo nas amostras de esmalte superficial foi realizada em triplicata. Sendo assim, foram pipetados 30 µl de amostra e acrescentou-se 220 µl de água deionizada, 50 µl de ácido molibdico (molibdato de amônio a 2,5% (p/v) em 4N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), agitou-se e após 10 minutos adicionou-se 20 µl 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 660 nm. O reativo redutor foi preparado imediatamente antes de cada dosagem, ou seja, a mistura do pó preparado com 1-Amino-2-Naphthol-4-Sulfônica Acid, sulfito de sódio e bissulfito de sódio na proporção 1:6:6 foi misturado em água (2,5% (w/v)).

Em cada placa de Elisa foi preparado uma curva padrão para calibração do aparelho. A curva padrão apresentava concentrações conhecidas de fósforo, que foram de: 1 µg/ml, 2 µg/ml, 4 µg/ml e 8 µg/ml.

### **Profundidade da biópsia**

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 (Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>). 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 biópsia.

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:

$$v = B \cdot h \quad (1)$$

$$h = v / B \quad (1')$$

$$d = m / v \quad (2)$$

$$v = m / d \quad (2')$$

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

$$h = m / B \cdot d \quad (3)$$

$$B = \pi \cdot r^2 \quad (4)$$

Substituindo-se 4 em 3 encontra-se:

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

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 biópsia

$$\pi = 3,14$$

Os resultados da profundidade das biópsias foram expressos em  $\mu\text{m}$ .

### **Determinação de chumbo**

As análises de chumbo foram realizadas pelo Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. As concentrações de chumbo nas amostras de microbiópsias de esmalte e dentina foram determinadas pela técnica da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICPMS) (Perkin Elmer Elan DRC II).

As amostras de microbiópsia e dentina foram diluídas em solução de ácido nítrico 2%. Sessenta microlitros de amostra de microbiópsia de esmalte dental e dentina foram diluídas em 2 mL de ácido nítrico 2%.

### **Determinação de fósforo nas amostras de dentina**

A determinação de fósforo nas amostras de dentina foi determinada pela técnica da espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICPMS) (Perkin Elmer Elan DRC II), pois não foi possível determinarmos a concentração de fósforo pelo mesmo método utilizado para as amostras de esmalte. Supomos que o fato tenha ocorrido devido às amostras de dentina terem sido digeridas em ácido nítrico 70% v/v, pois conhecimentos prévios revelam que o mesmo é usado para identificar aminoácidos aromáticos, resultando um composto amarelado após reagir com o anel aromático presente nas proteínas da dentina.

As amostras de dentina foram diluídas em solução de ácido nítrico 2%. Cinquenta microlitros de solução contendo dentina previamente digerida foi diluída em 4,95 mL de ácido nítrico 2%.

### **Análise da distribuição espacial do chumbo por microfluorescência de raio-X no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron**

A microfluorescência de raios X ( $\mu$ -XRF; Micro X-Ray Fluorescence) é uma sub variante microanalítica da fluorescência de raios X por dispersão em energia (EDXRF; Energy Dispersive X-Ray Fluorescence), possibilitando realizar mapeamento químico da amostra (*mapping*) e verificar a sua homogeneidade, e também melhorar o limite de detecção para elementos traços. Atualmente o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS) é o único a trabalhar com  $\mu$ -XRF na América Latina.

### **Principais características do anel de armazenamento e da estação de fluorescência de raios X do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron**

- Energia do elétron no anel de armazenamento: 1,37 Ge (corrente em torno de 100 mA);
- Campo magnético do dipolo D09B: 1,65 T;
- Anel de armazenamento de elétrons: 93,2 m de perímetro e 30 m de diâmetro;



- Acelerador linear de elétrons: 18 m;
- Energia crítica do fóton: 2,08 keV;
- Frequência de revolução dos elétrons no anel de armazenamento: 3,2 MHz;
- Fluxo de fótons, à 8 keV, em uma área de 20 mm<sup>2</sup> : 4,2x10<sup>9</sup> fótons/s;
- Feixe policromático (branco) ou seleção de energia entre 3 e 14 keV, utilizando cristal monocromador de silício (111);
- Alto grau de polarização do feixe;
- Detectores semicondutores, de Si (Li), com resolução de 165 eV à 5,9 keV e de Ge (HP), com resolução de 150 eV à 5,9 keV;
- Posicionamento da amostra utilizando um sistema semi-automático, com movimento tridimensional (Pérez *et al.* 1999).

### **Preparo das amostras**

Previamente às análises, cortou-se uma fatia no sentido vestibulo-lingual na porção central de cada dente. As fatias de cada dente foram cortadas com disco diamantado *Buehler Diamond Wafering Blade series 15 LC Diamond*, e posteriormente as fatias foram polidas com lixas de água de diferentes granulações até obtermos a espessura de 100 µm. Ao término, as fatias dispostas em tubos descontaminados contendo água ultrapura MilliQ foram limpas em ultrassom por 30 minutos. Apenas uma fatia de cada dente foi analisada. A análise por microfluorescência de Raio X induzida por radiação Síncrotron pode ser realizada por meio de mapeamento ou por análise em pontos pré determinados, de acordo com o interesse da investigação. Realizamos análise por pontos de algumas amostras previamente selecionadas, uma vez que, o tempo requerido para a realização das análises é muito extenso.

### **Set-up experimental**

Realizou-se a análise em 2 etapas: na primeira etapa realizou-se análise em pontos, na segunda análise em pontos em quintuplicatas.

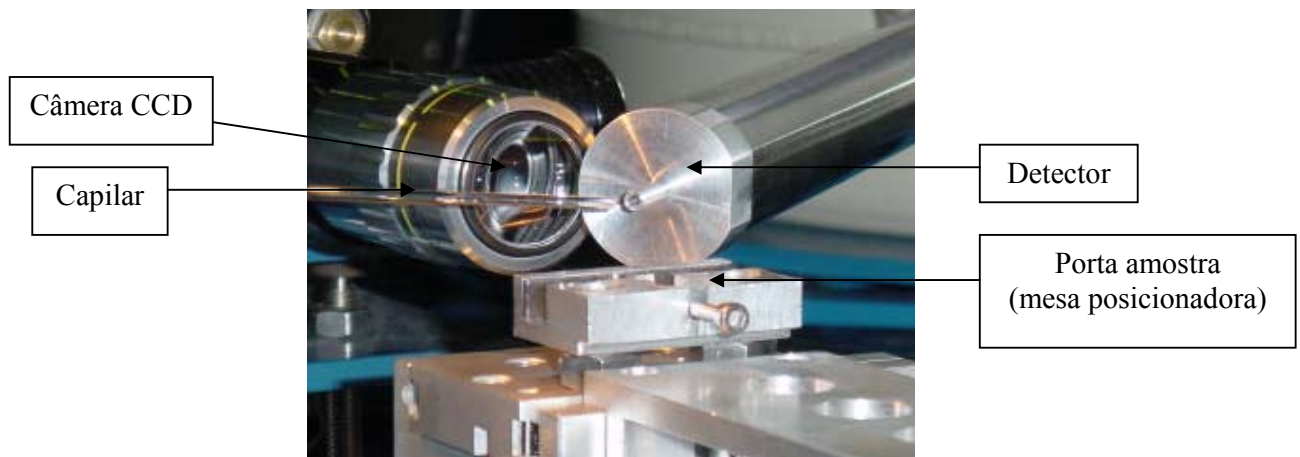
Inicialmente, áreas selecionadas na coroa foi analisada por scanning bidimensional (x,y), sendo que o padrão de scanning foi similar para todas as amostras: da superfície do esmalte até a dentina circumpulpar no eixo y e da incisal para cervical no eixo x.

Na segunda análise, optamos por fazer análises em quintuplicatas em 4 diferentes regiões anatômicas (esmalte superficial (SE), esmalte subsuperficial (SSE), dentina primária (PD) e dentina secundária (PS) (Figura 4) . Na presente análise, posicionamos o capilar com apenas metade do feixe incidindo na superfície do esmalte, pois o capilar possui diâmetro de 20  $\mu\text{m}$  conforme Figura 5, uma vez que trabalhos prévios descrevem que as maiores concentrações de chumbo está presente nos primeiros 10  $\mu\text{m}$  do esmalte. Essas áreas selecionadas foram analisadas por scanning bidimensional (x,y), sendo que o padrão de scanning foi similar para todas as amostras: da superfície do esmalte até a dentina secundária no eixo y e da incisal para cervical no eixo x, semelhante às primeiras análises.

O set up experimental pode ser visualizado na Figura 3. A energia de excitação dentro do anel de armazenamento era de 1.37 GeV com campo magnético dipolo de 1.65 T, que produzia uma energia de excitação de 2.08 keV. A radiação sincrotron para a linha XRF provém do dipolo D09B do anel de armazenamento (1,37 GeV e 100 mA) com dupla janela de berílio. A amostra foi posicionada na mesa analisadora portada de sistema automático, câmera CCD acoplada a um monitor de vídeo de 14" para a realização de foco, capilar de quartzo com geometria cônica e diâmetro de 20  $\mu\text{m}$  no feixe de saída e detector com 2 folhas de Al = 2 x 15 $\mu\text{m}$  = 30  $\mu\text{m}$ . A distância amostra-detector era de 21.50 mm e distância entre a fonte e a amostra era de 604 mm posicionamento da amostra na mesa analisadora, a imagem era transferida com acurácia de 0.5  $\mu\text{m}$  para os 3 eixos (x, y, z). A imagem da amostra projetada no visor (magnitude 500) foi usada para definição dos pontos a serem analisados na amostra. As medidas foram realizadas em geometria padrão (45°+45°), excitados com feixe de luz branca utilizando-se slits ortogonais (300  $\mu\text{m}$  X 300  $\mu\text{m}$ ). Desta forma, pixels de 300  $\mu\text{m}$  X 300  $\mu\text{m}$  foram obtidos mantendo um alto fluxo de fótons na amostra. O espectro fluorescente foi registrado com um detector Si(Li) de 165 eV FWHM a 5.9 keV em ar atmosférico posicionado a 90° da direção de incidência. Para determinação dos elementos químicos no dente, o  $K_{\beta}$ -line do Pb foi utilizado. Todos os espectros foram analisados utilizando-se Quantitative X-ray Analysis Software (QXAS) package, que é um programa convencional para análise de espectros.

A interpretação dos espectros de raios X foi feita utilizando-se o programa AXIL (*Analysis of X-ray spectra by Iterative Least squares fitting*; ESPEN, 1977),

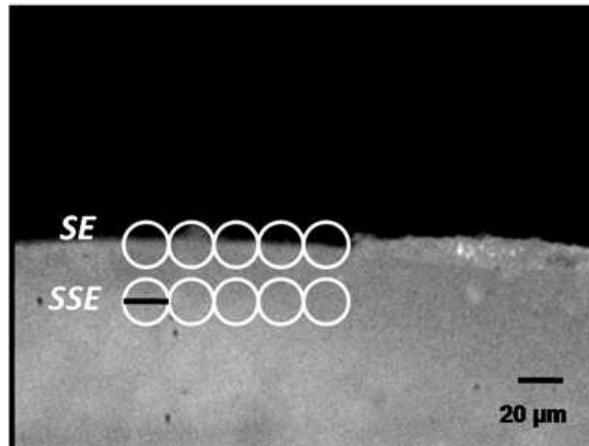
integrante do pacote computacional QXAS (*Quantitative X-ray Analysis System*), desenvolvido na Universidade de Antuérpia, Bélgica. Os fatores de absorção dos raios X característicos pela matriz de interesse foram calculados utilizando-se uma sub-rotina do pacote QXAS, sendo necessário fornecer a composição química e a densidade superficial da matriz, a energia da radiação incidente (ou de excitação) e as energias dos raios X característicos dos elementos químicos presentes nessa matriz.



**Figura 3-** Fotografia do sistema de XRF no LNLS.



**Figura 4-** Representação esquemática de uma coroa de incisivo central decíduo. Esmalte superficial (SE), esmalte subsuperficial (SSE), dentina primária (PD) e dentina secundária (SD) estão os pontos analisados por microfluorescência de raio-X.



**Figura 5-** Fotografia do esmalte dental com círculos na cor branca representando as áreas analisadas no Esmalte superficial (SE), esmalte subsuperficial (SSE), dentina primária (PD) e dentina secundária (SD). Observe que o diâmetro do capilar na superfície do esmalte corresponde apenas à metade do seu diâmetro total (20 µm)

### **Análise estatística**

Inicialmente todas as variáveis foram analisadas, com o intuito de selecionarmos o teste estatístico mais adequado. As variáveis não apresentaram distribuição normal, por isso, utilizamos o teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunns para fazer todas as comparações entre a concentração de chumbo no esmalte e na dentina pré e pós natal de dentes decíduos procedentes de diferentes regiões. Para a análise das correlações, a concentração de chumbo no esmalte dental e na dentina pré e pós natal foram analisadas utilizando-se, e o coeficiente de correlação de Spearman, sendo que o  $r$  e o  $p$  foram calculados.

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 5.0).

### **Análise de regressão Log-log**

Para compararmos a concentração de chumbo em amostras de esmalte superficial provenientes de dentes decíduos coletados em diferentes localidades foi

necessário definir uma equação que nos permitisse calcular a concentração de chumbo em uma mesma profundidade. Nesta equação o ponto x representa a profundidade em  $\mu\text{m}$  e y representa a concentração de chumbo em  $\mu\text{g/g}$ . Os dados abaixo serão utilizados para exemplificarmos os cálculos realizados.

x (Profundidade em $\mu\text{m}$ )	y (Pb em $\mu\text{g/g}$ )
1,55	633,6
4,05	355,19
7,83	216,23
10,41	124,9
14,16	14,59

Computamos os dados e transformamos os mesmos em log natural. Feito isso, realizamos a regressão linear. A regressão linear nos dá o valor de Ln (logaritmo natural) de  $\alpha$  (intercept no eixo y, quando  $x = 0,0$ ) e o  $\beta$  (slope).

A equação é dada por:

$$\text{Ln}(y) = \text{Ln}(\alpha) + \beta \text{Ln}(x)$$

Onde,  $y = \alpha x^\beta$

A regressão linear nos dá o valor de  $\text{Ln}(\alpha)$ . Para deduzirmos o valor de  $\alpha$ , calculamos  $e^{\text{Ln}(\alpha)} = \alpha$ . (Lê-se exponencial do logaritmo natural de  $\alpha$  é igual ao próprio  $\alpha$ ).

Ao realizarmos a regressão linear no Graph Prism 5 determinamos os valores de  $\beta$  e  $\text{Ln}(\alpha)$

$$\beta = -1,3855$$

$$\text{Ln}(\alpha) = 7,5045$$

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

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

Por exemplo, se quisermos saber qual a concentração de chumbo numa profundidade de 6  $\mu\text{m}$ , substituímos 6 em x, ou seja:

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

Neste caso, pode-se dizer que numa profundidade de 6  $\mu\text{m}$ , a concentração de chumbo encontrada é de 151,71704  $\mu\text{g/g}$  de chumbo.

## 5 RESULTADOS

### Concentração de chumbo em diferentes profundidades do esmalte superficial de dentes decíduos

A concentração de chumbo no esmalte superficial de dentes decíduos foi analisada em 101 crianças, sendo que 31, 36, 25 e 9 crianças residiam em Santo Amaro, BA, Cubatão, SP, Ribeirão Preto, SP e Mato Leitão, RS, respectivamente. Apenas foram incluídas no presente trabalho as crianças que doaram 3 ou mais dentes. As tabelas 6-9 mostram a distribuição das crianças de acordo com a concentração de chumbo no esmalte dental nas 5 microbiópsias sucessivas realizadas no esmalte dental.

**Tabela 6-** Concentração de chumbo em 5 amostras consecutivas de esmalte superficial obtidas a partir de dentes decíduos coletados em Santo Amaro, BA.

<b>Esmalte Superficial</b>	<b>1ª biópsia</b>	<b>2ª biópsia</b>	<b>3ª biópsia</b>	<b>4ª biópsia</b>	<b>5ª biópsia</b>
<b>Número de valores</b>	87	100	99	90	88
<b>Mín-Máx</b>	105 -94417	13 - 8986	3 - 1677	6 - 776	1 - 722
<b>Q1-Q3</b>	253-1142	72-537	40-275	31-329	23-218
<b>Mediana</b>	<b>530</b>	<b>198</b>	<b>137</b>	<b>117</b>	<b>97</b>
<b>Média</b>	3060	472	212	200	152
<b>Desvio Padrão</b>	11194	1076	265	208	163

A distribuição das variáveis das concentrações de chumbo no esmalte dental em todas as cidades avaliadas não apresentou distribuição normal, sendo assim, utilizamos o teste estatístico Kruskal- Wallis seguido do teste de múltiplas comparações de Dunn's para compararmos a distribuição de chumbo nas 5 microbiópsias sucessivas. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.0001$ ) entre as variáveis. A 1ª microbiópsia foi estatisticamente diferente ( $P < 0.05$ ) das demais microbiópsias (2ª, 3ª, 4ª, 5ª) e a 2ª microbiópsia foi estatisticamente diferente da 5ª microbiópsia ( $P < 0.05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a 2ª, 3ª e 4ª microbiópsia de esmalte.

**Tabela 7-** Concentração de chumbo em 5 amostras consecutivas de esmalte superficial obtidas a partir de dentes decíduos coletados em Ribeirão Preto, SP.

<b>Esmalte Superficial</b>	<b>1ª biópsia</b>	<b>2ª biópsia</b>	<b>3ª biópsia</b>	<b>4ª biópsia</b>	<b>5ª biópsia</b>
<b>Número de valores</b>	83	95	93	90	81
<b>Mín - Máx</b>	36 - 963	21 - 976	9 - 994	5 - 582	4 - 493
<b>Q1 – Q3</b>	165 - 546	70 - 372	50 - 232,8	38 - 202	31 - 156
<b>Mediana</b>	<b>312</b>	<b>152</b>	<b>119</b>	<b>91</b>	<b>83</b>
<b>Média</b>	376	244	173	130	115
<b>Desvio Padrão</b>	254	433	179	123	105

Na cidade de Ribeirão Preto, SP foi encontrado diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.0001$ ) entre as variáveis. A 1ª microbiópsia foi estatisticamente diferente ( $P < 0.05$ ) das demais microbiópsias (2ª, 3ª, 4ª, 5ª) e a 2ª microbiópsia foi estatisticamente diferente da 4ª e 5ª microbiópsia ( $P < 0.05$ ). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a 2ª e a 3ª microbiópsia, a 3ª e a 4ª microbiópsia e a 4ª da 5ª microbiópsia. .

**Tabela 8-** Concentração de chumbo em 5 amostras consecutivas de esmalte superficial obtidas a partir de dentes decíduos coletados em Cubatão, SP.

<b>Esmalte Superficial</b>	<b>1ª biópsia</b>	<b>2ª biópsia</b>	<b>3ª biópsia</b>	<b>4ª biópsia</b>	<b>5ª biópsia</b>
<b>Número de valores</b>	122	121	120	114	109
<b>Mín - Máx</b>	9 - 1124	6 - 968	1 - 917	1 - 359	0,9 - 312
<b>Q1 – Q3</b>	66 - 193	31 - 107	20 - 62	13 - 46	12 - 40
<b>Mediana</b>	<b>116,7</b>	<b>56</b>	<b>38</b>	<b>26</b>	<b>24</b>
<b>Média</b>	171	96	64	46	38
<b>Desvio Padrão</b>	183	141	105	63	48

Quando analisamos as variáveis referente à concentração de chumbo no esmalte nas amostras de Cubatão encontramos diferença estatisticamente significativa entre a 1ª microbiópsia e as demais microbiópsias (2ª, 3ª, 4ª, 5ª) ( $P < 0.05$ ) e a 2ª microbiópsia foi estatisticamente diferente da 3ª, 4ª e 5ª microbiópsia ( $P < 0.05$ ). A 3ª microbiópsia teve diferença estatisticamente significativa da 5ª microbiópsia ( $P < 0.05$ ). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a 4ª e a 5ª microbiópsia.



**Tabela 9-** Concentração de chumbo em 5 amostras consecutivas de esmalte superficial obtidas a partir de dentes decíduos coletados em Mato Leitão, RS.

<b>Esmalte Superficial</b>	<b>1ª biópsia</b>	<b>2ª biópsia</b>	<b>3ª biópsia</b>	<b>4ª biópsia</b>	<b>5ª biópsia</b>
<b>Número de valores</b>	23	24	20	21	21
<b>Mín - Máx</b>	56 - 1970	26 - 483	4 - 308	16 - 296	15 - 206
<b>Q1 - Q3</b>	89 - 371	42 - 164	35 - 185	28 - 124	21-72
<b>Mediana</b>	<b>132</b>	<b>95</b>	<b>64</b>	<b>42</b>	<b>45</b>
<b>Média</b>	518	134	108	83	65
<b>Desvio Padrão</b>	800	126	92	84	59

Na cidade de Mato Leitão, RS encontramos diferença estatisticamente significativa ( $P < 0.0001$ ) entre a 1ª microbiópsia e a 4ª e 5ª microbiópsia ( $P < 0.05$ ). Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre a 1ª e a 2ª, a 1ª e a 3ª, 2ª e a 3ª e entre a 2ª e a 4ª microbiópsia de esmalte.

#### **Comparação entre as concentrações de chumbo no esmalte de dentes decíduos coletados em diferentes procedências**

Na presente análise separamos o tipo de dente (incisivo, canino e molar) antes de efetuarmos as análises. Realizamos essa análise para que a comparação fosse feita com base em microbiópsias com profundidades semelhantes, pois já é conhecido que a concentração de chumbo diminui quando a profundidade de biópsia aumenta. Sabendo disso, e utilizando a equação que nos permite calcular a concentração de chumbo numa dada profundidade (ver detalhes na Metodologia), efetuamos a presente análise.

#### **Correlação entre concentração de chumbo e profundidade de biópsia**

A profundidade de microbiópsia é um parâmetro importante quando a utilizamos para determinação dos níveis de chumbo no esmalte dental, em função do gradiente de concentração que decresce a partir da superfície do esmalte em direção ao seu interior, ou seja, a medida que aumenta a profundidade de biópsia diminui a concentração de chumbo

As tabelas 10-13 apresentam o valor da concentração de chumbo *versus* a profundidade de microbiópsia. A análise da correlação de Spearman revelou um coeficiente negativo e estatisticamente significativo (exceto em Mato Leitão, RS que apesar de revelar um coeficiente de correlação negativo, não foi estatisticamente significativo).

**Tabela 10-** Correlações entre as concentrações de chumbo nas amostras de esmalte (1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª microbiópsias) de dentes decíduos coletados em Santo Amaro, BA, 2010.

<b>Santo Amaro, BA</b>	<b>1ª biópsia</b>	<b>2ª biópsia</b>	<b>3ª biópsia</b>	<b>4ª biópsia</b>	<b>5ª biópsia</b>
<b>n =</b>	100	100	99	90	87
<b>r =</b>	-0,34	-0,35	-0,28	-0,31	-0,39
<b>p =</b>	0,0005	0,0004	0,0037	0,0023	0,0002

**Tabela 11-** Correlações entre as concentrações de chumbo nas amostras de esmalte (1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª microbiópsias) de dentes decíduos coletados em Ribeirão Preto, SP, 2010.

<b>Ribeirão Preto, SP</b>	<b>1ª biópsia</b>	<b>2ª biópsia</b>	<b>3ª biópsia</b>	<b>4ª biópsia</b>	<b>5ª biópsia</b>
<b>n =</b>	95	95	93	90	81
<b>r =</b>	-0,54	-0,43	-0,28	-0,20	-0,24
<b>p =</b>	< 0.0001	< 0.0001	0,0063	0,0512	0,0306

**Tabela 12-** Correlações entre as concentrações de chumbo nas amostras de esmalte (1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª microbiópsias) de dentes decíduos coletados em Cubatão, SP, 2010.

<b>Cubatão, SP</b>	<b>1ª biópsia</b>	<b>2ª biópsia</b>	<b>3ª biópsia</b>	<b>4ª biópsia</b>	<b>5ª biópsia</b>
<b>n =</b>	123	122	121	114	110
<b>r =</b>	-0,29	-0,35	-0,20	-0,41	-0,40
<b>p =</b>	0,0011	< 0.0001	0,0221	< 0.0001	< 0.0001

**Tabela 13-** Correlações entre as concentrações de chumbo nas amostras de esmalte (1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5ª microbiópsias) de dentes decíduos coletados em Mato Leitão, RS, 2010.

<b>Mato Leitão, RS</b>	<b>1ª biópsia</b>	<b>2ª biópsia</b>	<b>3ª biópsia</b>	<b>4ª biópsia</b>	<b>5ª biópsia</b>
<b>n =</b>	22	22	22	21	21
<b>r =</b>	-0,11	-0,17	-0,10	-0,29	-0,02
<b>p =</b>	0,59	0,41	0,64	0,18	0,91

## Regressão linear Log-Log dos dados da concentração de chumbo por tipo de dente e por cidade

Com os dados da concentração de chumbo no esmalte superficial dos dentes decíduos de diferentes procedências (Santo Amaro, BA, Ribeirão Preto, SP e Cubatão, SP) e os dados da profundidade de biópsias fizemos as análises de regressão linear log-log. A partir dessas análises e utilizando-se a equação da reta estabelecida no presente trabalho e mencionada na metodologia, podemos calcular a concentração de chumbo em uma dada profundidade em cada uma das regiões incluídas neste trabalho, de acordo com o tipo de dente. Para estas análises optamos por excluir os dados de Mato Leitão, RS, devido ao número reduzido de amostras e porque pretendíamos analisar as amostras de acordo com o tipo de dente.

A **Tabela 14** mostra os dados obtidos por meio da regressão linear, de acordo com o tipo de dente, separados por cidade

Nesta equação o ponto x representa a profundidade em  $\mu\text{m}$  e o y representa a concentração de chumbo em  $\mu\text{g/g}$ . A equação é dada por:

$$\text{Ln}(y) = \text{Ln}(\alpha) + \beta \text{Ln}(x)$$

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

**Tabela 14-** Equação da reta com os valores de  $\alpha$  e  $\beta$  obtidos na regressão linear log-log, onde y= concentração de chumbo no esmalte dental.

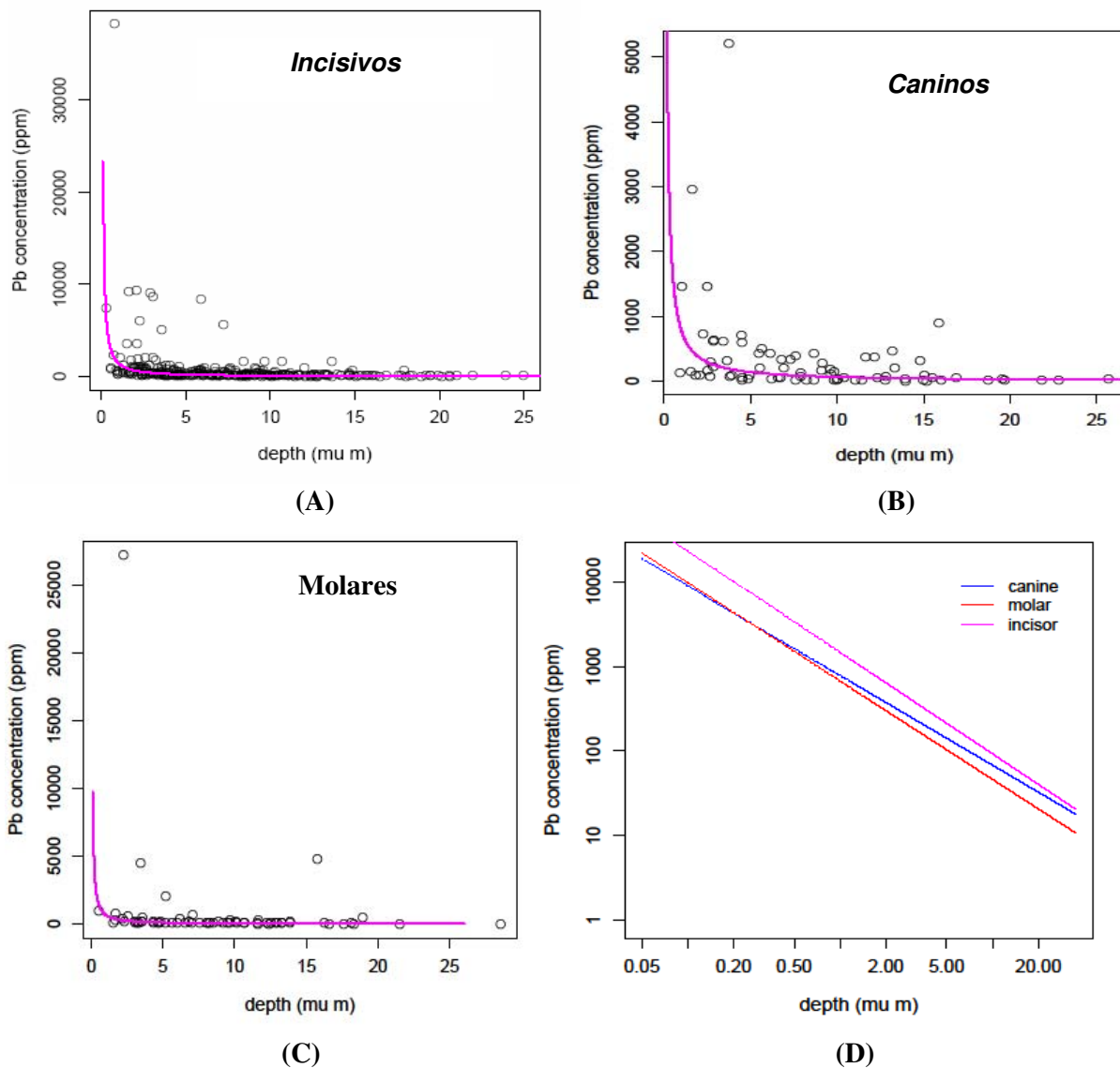
Tipo de dente	Santo Amaro, BA	Ribeirão Preto, SP	Cubatão, SP
<b>Incisivos</b>	$y = (e^{7,29305}). x^{-1,20027}$	$y = (e^{6,86456}). x^{-0,95858}$	$y = (e^{5,4386}). x^{-1,04211}$
<b>Caninos</b>	$y = (e^{6,6612}). x^{-1,0600}$	$y = (e^{6,048}). x^{-0,8728}$	$y = (e^{4,3398}). x^{-0,6268}$
<b>Molares</b>	$y = (e^{6,5078}). x^{-1,1608}$	$y = (e^{6,42295}). x^{-0,99413}$	$Y = (e^{3,8053}). x^{-0,3167}$

## **Comparação entre a concentração de chumbo no esmalte dental de acordo com o tipo de dente (incisivo, canino e molar)**

Optamos por separar os dados da concentração de chumbo no esmalte dental de acordo com o tipo de dente (incisivo, canino e molar), pois trabalhos prévios descrevem que a concentração de chumbo varia de acordo com o tipo de dente (Mackie *et al.*, 1977; Paterson *et al.*, 1988; Tvinnereim *et al.*, 2000; Karahalil *et al.*, 2007). Analisamos também o padrão de distribuição da concentração de chumbo no esmalte dental de acordo com o tipo de dente.

A figura 6 mostra o padrão de distribuição da concentração de chumbo no esmalte dental em incisivos (6 A), caninos (6 B) e molares (6 C). Pode-se notar que para todos os tipos de dentes o padrão de distribuição do chumbo é muito semelhante, ou seja, diminui exponencialmente da superfície em direção às camadas mais profundas de esmalte (6 D).

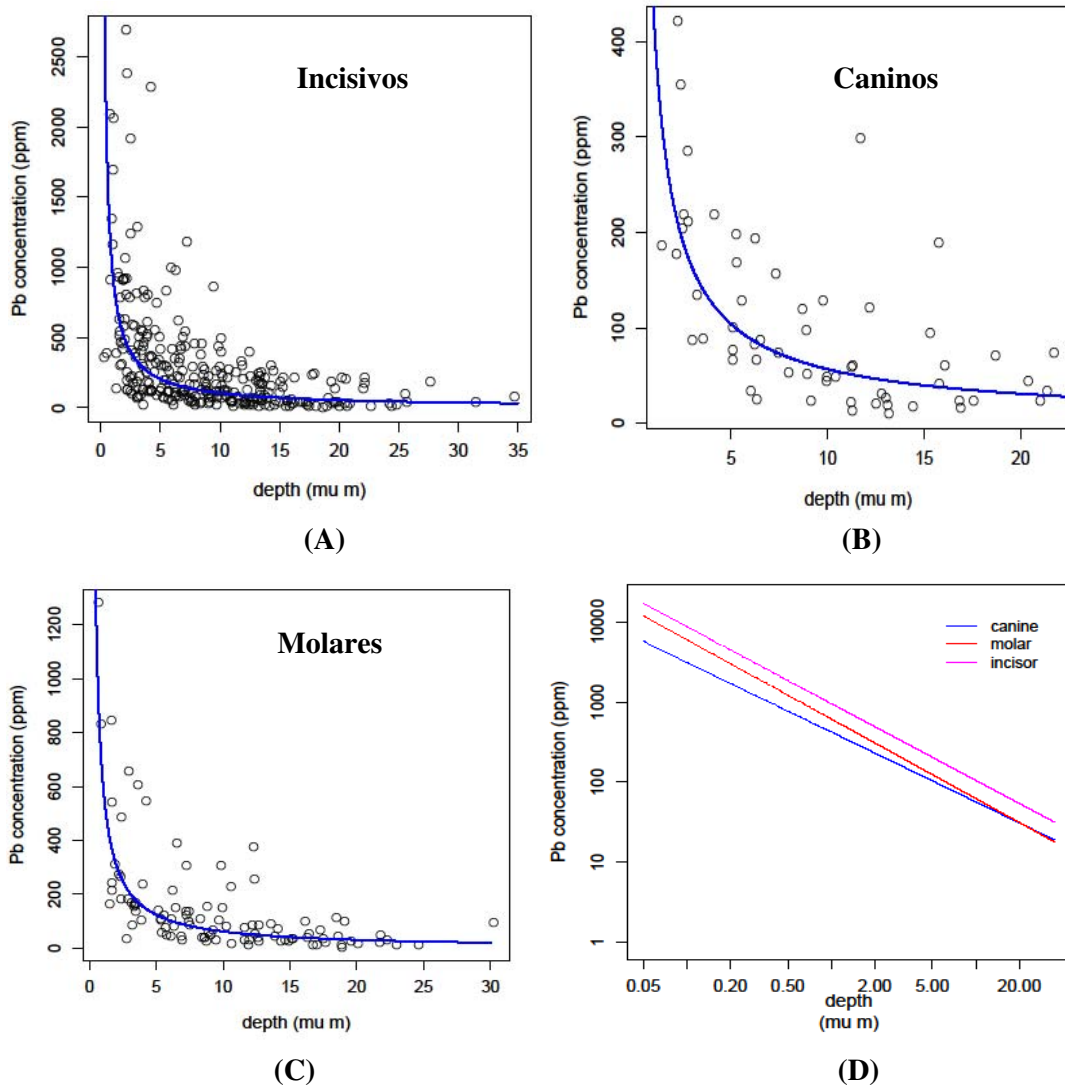
Quando visualizamos a distribuição da concentração de chumbo nos incisivos, caninos e molares em um mesmo gráfico pode-se notar que a quantidade de chumbo numa dada profundidade é diferente de acordo com o tipo de dente. Na cidade de Santo Amaro, BA, a concentração de chumbo decresce no sentido incisivo > molares > caninos.



**Figura 6-** Concentração de chumbo *versus* profundidade em amostras de esmalte superficial de dentes decíduos coletados em Santo Amaro, BA. (A) incisivos, n= 69, (B) caninos, n= 15, (C) molares, n= 23 , (D) apresentação das linhas de tendência dos 3 diferentes tipos de dente apresentados em A, B e C.

Os dados referentes à concentração de chumbo no esmalte dental de dentes decíduos coletados em Ribeirão Preto estão representados na Figura 7. O padrão de distribuição da concentração de chumbo no esmalte dental, independente do tipo de dente, decresce quando aumentamos a profundidade de biópsia. Em relação à concentração de chumbo em diferentes tipos de dentes, quando observamos a figura 7 D, pode-se concluir que ela decresce no sentido incisivo > molar > canino. Pela Figura 7

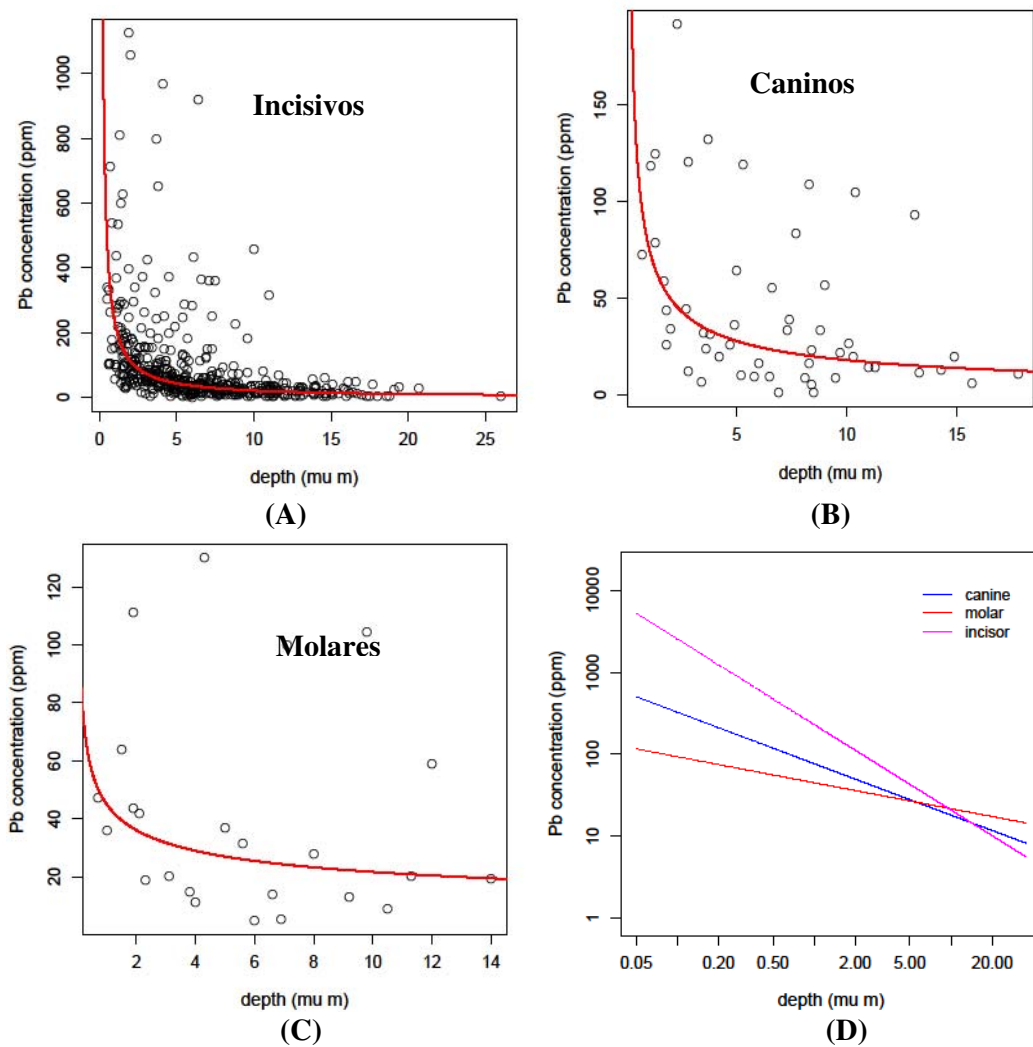
D pode-se também concluir que o padrão de distribuição de chumbo no esmalte é muito semelhante, independente do tipo de dente.



**Figura 7-** Concentração de chumbo *versus* profundidade em amostras de esmalte superficial de dentes decíduos coletados em Ribeirão Preto, SP. (A) incisivos, n= 61, (B) caninos, n= 11, (C) molares, n= 20, (D) apresentação das linhas de tendência dos 3 diferentes tipos de dente apresentados em A, B e C.

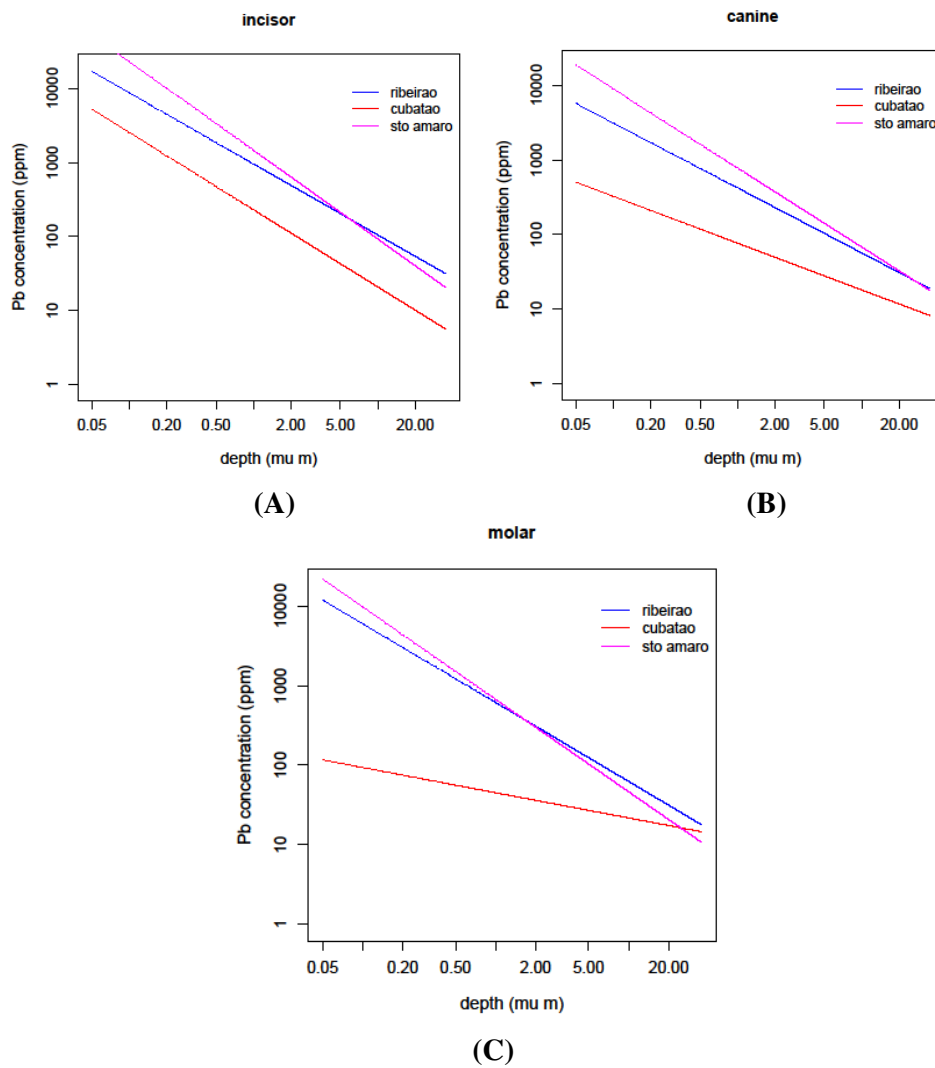
Na **Figura 8**, os dados da cidade de Cubatão, SP estão representados. Neste caso, podemos visualizar que a distribuição dos dados está menos uniforme se compararmos com as demais regiões descritas no presente trabalho, porém, mesmo

assim, o padrão de distribuição continua se repetindo. Em Cubatão, podemos notar que os incisivos possuem maiores concentrações de chumbo numa dada profundidade, seguido de canino e molar. Este padrão foi diferente nas demais regiões analisadas. Outro fator importante é que apesar do padrão de distribuição ser semelhante em todos os tipos de dentes, as retas representativas desta distribuição estão mais distantes e se cruzam quando as biópsias são mais profundas.



**Figura 8-** Concentração de chumbo *versus* profundidade em amostras de esmalte superficial de dentes decíduos coletados em Cubatão, SP. (A) incisivos, n= 107, (B) caninos, n= 11, (C) molares, n= 5 , (D) apresentação das linhas de tendência dos 3 diferentes tipos de dente apresentados em A, B e C.

Na **Figura 9** podemos visualizar a distribuição da concentração de chumbo no esmalte superficial de acordo com o tipo de dente, porém podemos comparar a distribuição de acordo com o tipo de dente em cada cidade (Ribeirão Preto, SP, Cubatão, SP e Santo Amaro, BA). Pode-se notar que independente do histórico de contaminação ambiental, embora a concentração de chumbo seja maior em Santo Amaro, BA; seguida de Ribeirão Preto, SP e Cubatão, SP, o padrão de distribuição é o mesmo. Por meio destas análises, podemos comparar biópsias em uma mesma profundidade, o que seria ideal, já que a concentração de chumbo está diretamente relacionada com a profundidade de biópsia.



**Figura 9-** Comparação das linhas de tendência que caracterizam os dentes coletados em diferentes cidades: (A) incisivos, (B) caninos e (C) molares



## Concentração de chumbo na dentina pré e pós natal

A concentração de chumbo nas amostras de dentina pré e pós natal foram realizadas nas mesmas amostras supracitadas. A tabela 15 mostra a distribuição das crianças de acordo com a concentração de chumbo na dentina pré e pós natal em cada localidade especificada. As amostras de Mato Leitão, RS foram excluídas dessa análise porque houve perda de algumas amostras e como o número já estava reduzido, optamos por excluir os dados.

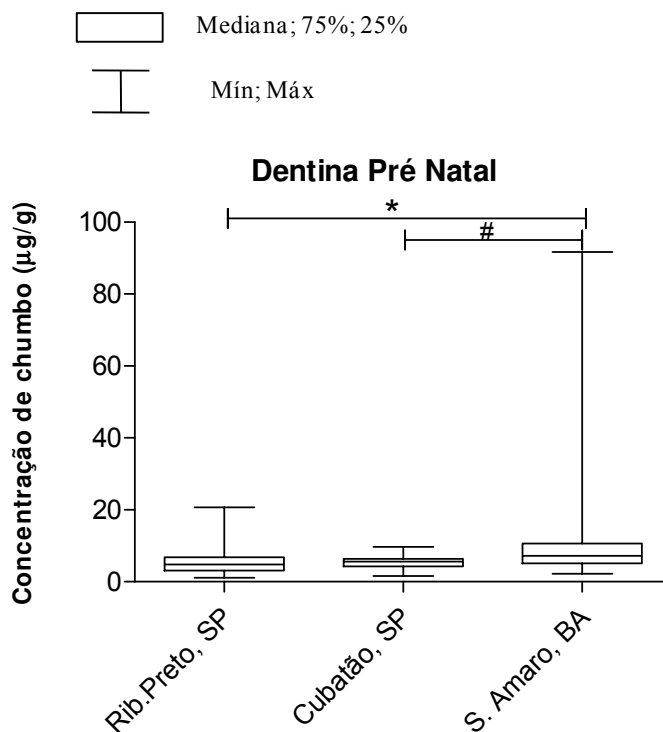
**Tabela 15-** Concentração de chumbo nas amostras de dentina pré e pós natal de dentes decíduos coletados em Cubatão, SP; Ribeirão Preto, SP e Santo Amaro, BA.

	Cubatão, SP		Ribeirão Preto, SP		Santo Amaro, BA	
	Pré Natal	Pós Natal	Pré Natal	Pós Natal	Pré Natal	Pós Natal
<b>N</b>	137	113	92	45	95	68
<b>Mín - Máx</b>	1,6 - 9,7	1 - 14	1,1 - 20,7	1,8 - 22,8	2,2 - 91,7	3,1 - 28,5
<b>Q1-Q3</b>	4,3 - 6,4	4,9 - 8	3,1 - 6,7	3,6 - 8,5	5,1 - 10,6	6,9 - 15,5
<b>Mediana</b>	5,6	6,1	4,8	6	7,2	10,7
<b>Média</b>	5,3	6,7	5,6	7	10,6	18,1
<b>Desvio Padrão</b>	1,6	2,6	3,6	4,9	13,1	51,4

Pode-se notar que há mais chumbo na dentina pós-natal em comparação com a dentina pré-natal nas cidades de Cubatão, Ribeirão Preto e Santo Amaro ( $P < 0.05$ ), quando usamos o teste t não paramétrico para comparamos a concentração de chumbo na dentina pré e pós natal na cidade de Santo Amaro, BA e Ribeirão Preto, SP, pois neste caso os dados apresentaram distribuição não normal. Os dados da concentração de chumbo na dentina pré e pós natal na cidade de Cubatão, SP apresentaram distribuição normal, sendo assim, usamos o teste t pareado para testar se há diferença estatisticamente significativa entre a concentração de chumbo na dentina pré e pós natal. Houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração de chumbo na dentina pré e pós natal.

A **Figura 10** mostra a distribuição da concentração de chumbo na dentina pré-natal dos dentes decíduos utilizados para realização dos testes de esmalte.

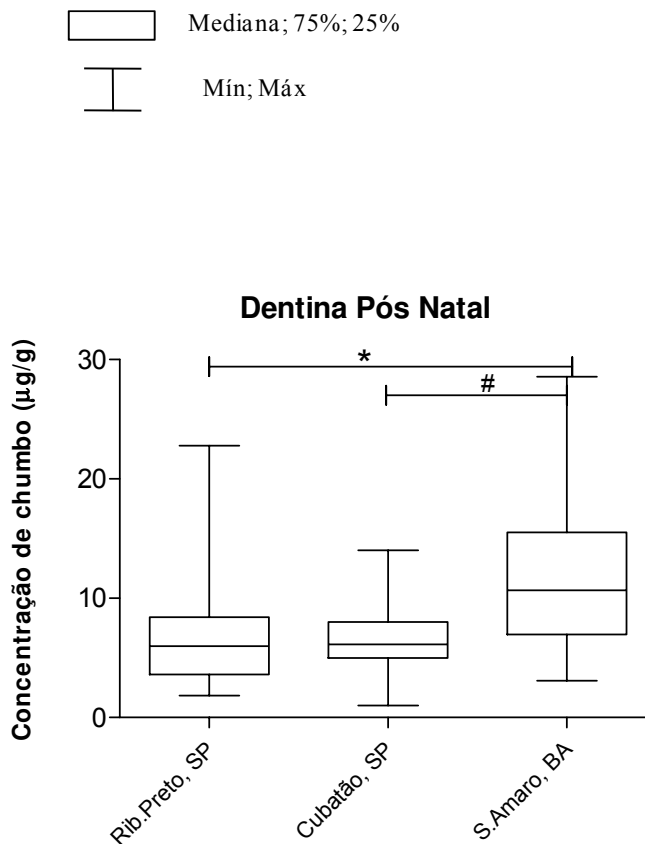
A distribuição da concentração de chumbo nas amostras de dentina pré-natal não foi normal. A análise estatística não paramétrica utilizada foi ANOVA seguida do teste de Múltiplas Comparações de Dunn's. A concentração de chumbo na dentina pré-natal dos dentes decíduos coletados em Cubatão, SP (n=137) e Ribeirão Preto, SP (n=92) respectivamente foi estatisticamente diferente da concentração de chumbo nas amostras de dentina pré-natal provenientes dos dentes coletados em Santo Amaro, BA (n=95) ( $p < 0,001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração de chumbo na dentina pré-natal dos dentes decíduos coletados em Cubatão, SP e Ribeirão Preto, SP.



**Figura 10-** Distribuição da concentração de chumbo ( $\mu\text{g/g}$ ) amostras de dentina pré natal dos dentes decíduos coletados em diferentes regiões. \* $P < 0.0001$ ; #  $P < 0.0001$ .

A **Figura 11** mostra a distribuição da concentração de chumbo na dentina pós-natal dos dentes decíduos utilizados para realização dos testes de esmalte. Novamente a distribuição não foi normal, e a análise estatística não paramétrica

utilizada foi ANOVA seguida do teste de Múltiplas Comparações de Dunn. A concentração de chumbo na dentina pré-natal dos dentes decíduos coletados em Cubatão, SP (n=113) e Ribeirão Preto, SP (n=45) respectivamente foi estatisticamente diferente da concentração de chumbo nas amostras de dentina pós-natal proveniente dos dentes coletados em Santo Amaro, BA (n=68) ( $p < 0,0001$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração de chumbo na dentina pós-natal dos dentes decíduos coletados em Cubatão, SP e Ribeirão Preto, SP.



**Figura 11-** Distribuição da concentração de chumbo ( $\mu\text{g/g}$ ) nas amostras de dentina pós natal dos dentes decíduos coletados em diferentes regiões.  $*P < 0,0001$ ;  $\#P < 0,0001$ .

## Correlação entre esmalte dental e dentina pré e pós natal

Para a análise das correlações, a concentração de chumbo no esmalte dental e na dentina pré e pós natal foram analisadas utilizando o coeficiente de correlação de Spearman ( $r$ ,  $p$ ) foi calculado, pois os dados não apresentaram distribuição normal.

Na Tabela 16 mostramos os resultados de todas as comparações para os resultados de chumbo na dentina pré e pós-natal e 1ª e 2ª biopsias de esmalte (portanto as biopsias mais rasas, até cerca de 5 um de profundidade). Nota-se que o valor do  $r$  é relativamente estável, mesmo indicando uma correlação não muito forte (mas significativa) nas cidades de Ribeirão Preto (apenas na dentina pré natal) e Santo Amaro. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa quando correlacionamos a concentração de chumbo no esmalte dental e a concentração de chumbo na dentina pré e pós natal na cidade de Cubatão, SP.

**Tabela 16-** Correlações entre as concentrações de chumbo nas amostras de dentina pré e pós natal, e esmalte (1ª e 2ª biopsias) de dentes decíduos coletados em Cubatão, SP; Ribeirão Preto, SP e Santo Amaro, BA. Ribeirão Preto, 2010.

	Cubatão, SP		Ribeirão Preto, SP		Santo Amaro, BA	
	Dentina Pré	Dentina Pós	Dentina Pré	Dentina Pós	Dentina Pré	Dentina Pós
<b>1a Biopsia</b>	$r = 0,118$	$r = 0,05$	$r = 0,3$	$r = 0,27$	$r = 0,38$	$r = 0,3$
<b>Esmalte</b>	$p = 0,195$ $n = 136$	$p = 0,59$ $n = 98$	<b><math>p = 0,003</math></b> $n = 92$	$p = 0,06$ $n = 45$	<b><math>p = 0,0001</math></b> $n = 92$	<b><math>p = 0,015</math></b> $n = 65$
<b>2a Biopsia</b>	$r = 0,05$	$r = 0,09$	$r = 0,3$	$r = 0,21$	$r = 0,18$	$r = 0,2$
<b>Esmalte</b>	$p = 0,95$ $n = 105$	$p = 0,28$ $n = 135$	<b><math>p = 0,0013</math></b> $n = 92$	<b><math>p = 0,15</math></b> $n = 45$	<b><math>p = 0,08</math></b> $n = 92$	<b><math>p = 0,1</math></b> $n = 65$

## Análise de dentes decíduos por Microfluorescência de Raio-X ( $\mu$ -XRF)

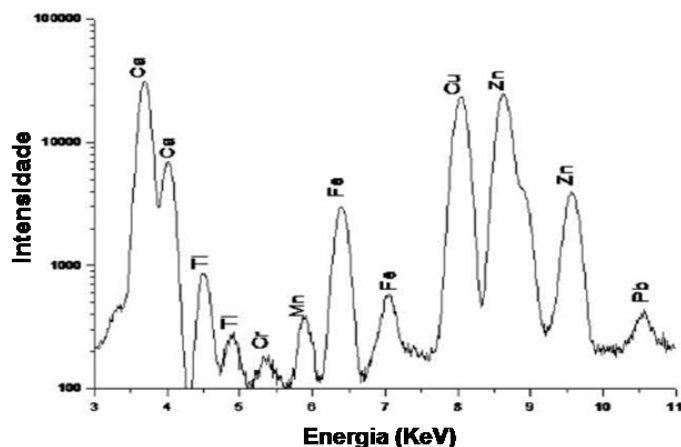
As amostras utilizadas neste experimento foram as mesmas amostras utilizadas para realização das microbiópsias no esmalte dental e para análise da concentração de chumbo na dentina pré e pós natal porém, com um número bem reduzido, pois o tempo disponível para análise era menor.

Os espectros obtidos foram interpretados pelo aplicativo AXIL, estimando-se as intensidades dos raios X característicos para os elementos de interesse, neste caso o Pb e Ca.

Para o presente trabalho, realizamos apenas uma análise qualitativa, uma vez que, para a estimativa das concentrações químicas nestas amostras há necessidade de se conhecer as sensibilidades elementares e os fatores de absorção para os analitos. Deve ser ressaltado que essa equação é válida para feixe monoenergético, mas no presente experimento foi utilizado um feixe polienergético, tornando mais complexo o cálculo da sensibilidade e fatores de absorção.

Para o cálculo das sensibilidades elementares dos elementos de interesse foram utilizadas amostras de referência certificadas. Em cada pastilha, foram obtidos 10 espectros em varredura linear na região central, distanciando-se 1 mm entre cada ponto. Para isto, o espectro de excitação foi subdividido em várias classes monoenergéticas, calculando-se então os fatores de absorção para cada elemento de interesse em cada classe.

A **Figura 12** ilustra um espectro típico de uma amostra de dente. Esse espectro foi utilizado para calibração da curva padrão, previamente às análises de dentes por  $\mu$ -XRF.

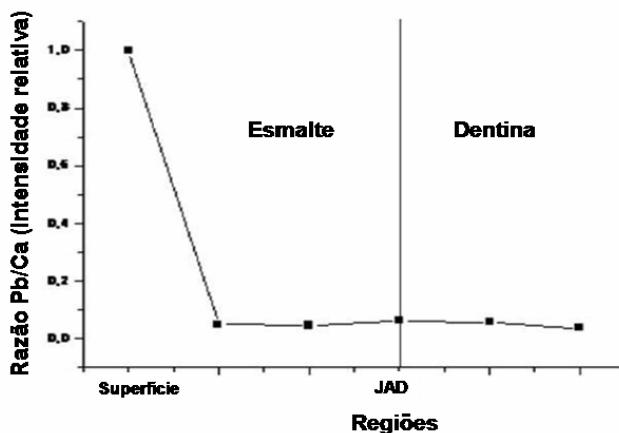


**Figura 12** – Espectro típico SRXRF de uma amostra de dente

A **Figura 13** ilustra a média da intensidade relativa referente às medidas realizadas no esmalte dental e na dentina. Estas medidas foram feitas por meio de scanning linear desde o esmalte superficial até a dentina secundária. Pode-se notar que observou-se maior intensidade relativa da razão Pb/Ca no esmalte superficial em comparação com a dentina. Para a presente análise utilizamos amostras mais

representativas incluindo dentes decíduos provenientes de todas as localidades envolvidas na pesquisa (Cubatão, SP, n=5, Ribeirão Preto, n=5, Santo Amaro, BA: n=16 e Mato Leitão, n=2). Neste caso, trata-se de uma análise qualitativa com o objetivo de descrevermos a distribuição espacial do chumbo em dentes decíduos.

Observado o gráfico nota-se que a intensidade relativa da razão Pb/Ca decresce no sentido esmalte superficial – dentina, coincidindo com os dados já descritos na literatura.



**Figura 13** - Razão da intensidade relativa Pb/Ca obtida por meio de scanning linear da superfície de esmalte até a dentina interna em amostras de dentes decíduos

Na **Figura 14** podemos visualizar a média da intensidade relativa Pb/Ca em amostras de diferentes procedências (Amostra A: Cubatão, SP, Amostra B: Ribeirão Preto, SP, Amostra C: Ribeirão Preto, SP, Amostra D: Santo Amaro, BA e Amostra E: Santo Amaro, BA) nas regiões de interesse (superfície de esmalte, JAD e dentina secundária). Mais uma vez nota-se que independente do histórico de contaminação ambiental, todas as amostras apresentaram intensidade relativa da razão Pb/Ca maior no esmalte mais superficial em comparação com as demais regiões de interesse.

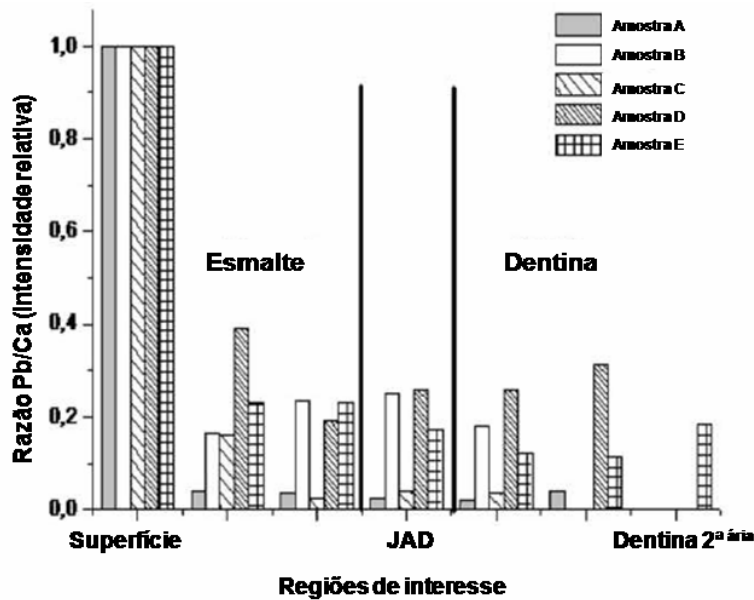


Figura 14 – Comparação da razão Pb/Ca em função de uma região de interesse em todas as amostras analisadas

A tabela 17 mostra os dados da concentração de chumbo no esmalte e na dentina obtidos por ICP-MS das mesmas amostras analisadas por medidas em quintuplicatas por  $\mu$ -XRF.

Tabela 17 – Concentração de chumbo ( $\mu\text{g/g}$ ,  $\pm$  DP) nas amostras de esmalte superficial (0-3  $\mu\text{m}$ ) e dentina de dentes decíduos analisados.

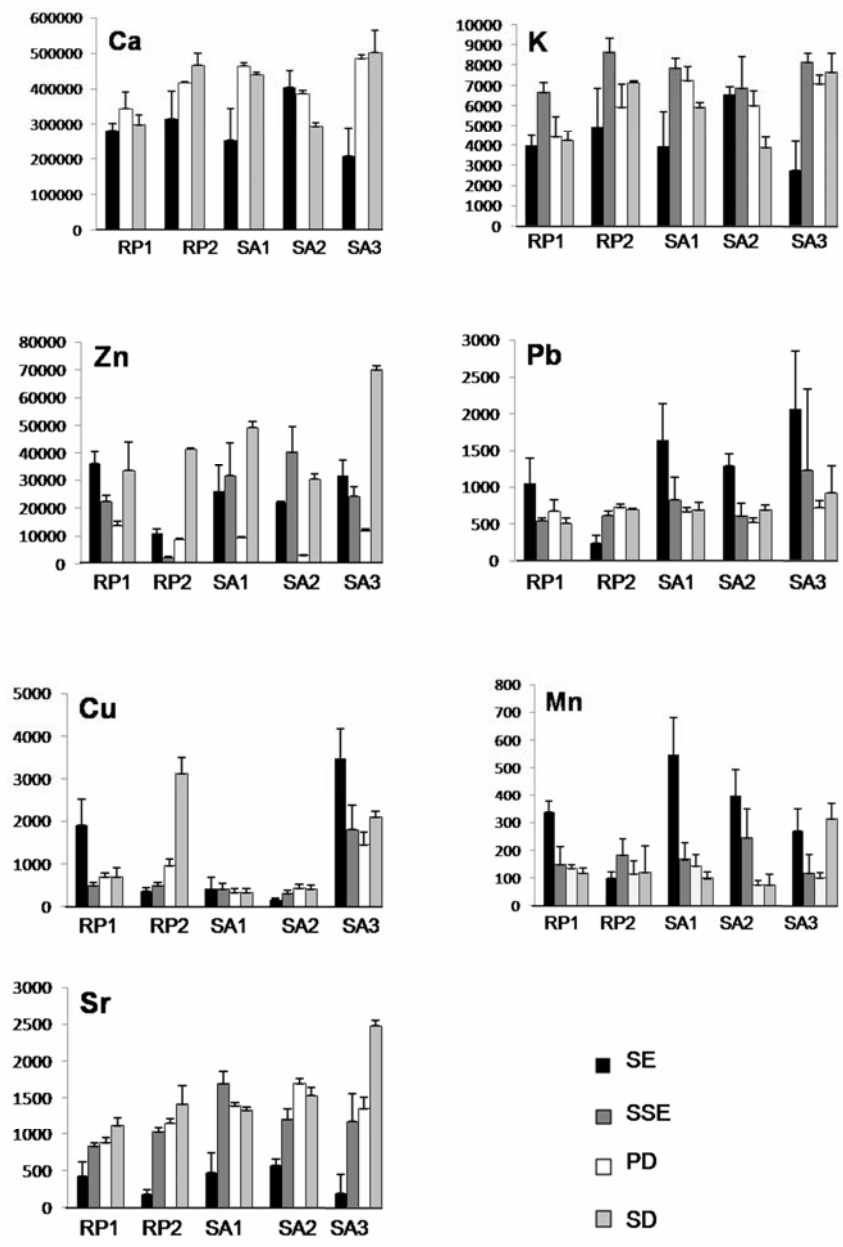
Amostra	Cidade	Pb ( $\mu\text{g/g}$ ) Esmalte ( $\pm$ DP)	Pb ( $\mu\text{g/g}$ ) Dentina ( $\pm$ DP)
RP1	Ribeirão Preto. SP	218 ( $\pm$ 2.04)	24.7 ( $\pm$ 0.187)
RP2	Ribeirão Preto. SP	224 ( $\pm$ 4.07)	39.8 ( $\pm$ 0.33)
SA1	Santo Amaro. BA	2,033 ( $\pm$ 15.85)	62.4 ( $\pm$ 0,39)
SA2	Santo Amaro. BA	5,200 ( $\pm$ 54.08)	209.5 ( $\pm$ 0.25)
SA3	Santo Amaro. BA	2,964 ( $\pm$ 64.31)	53.4 ( $\pm$ 0.64)

A Figura 15 mostra os resultados referentes às análises feitas por  $\mu$ -XRF em dentes decíduos. Neste caso, fizemos medidas em quintuplicatas nas regiões de interesse (Esmalte Superficial- SE; Esmalte Subsuperficial-SSE, dentina primária- PD e dentina secundária – SD). A figura 15 ilustra a média da intensidade relativa do Ca, K,

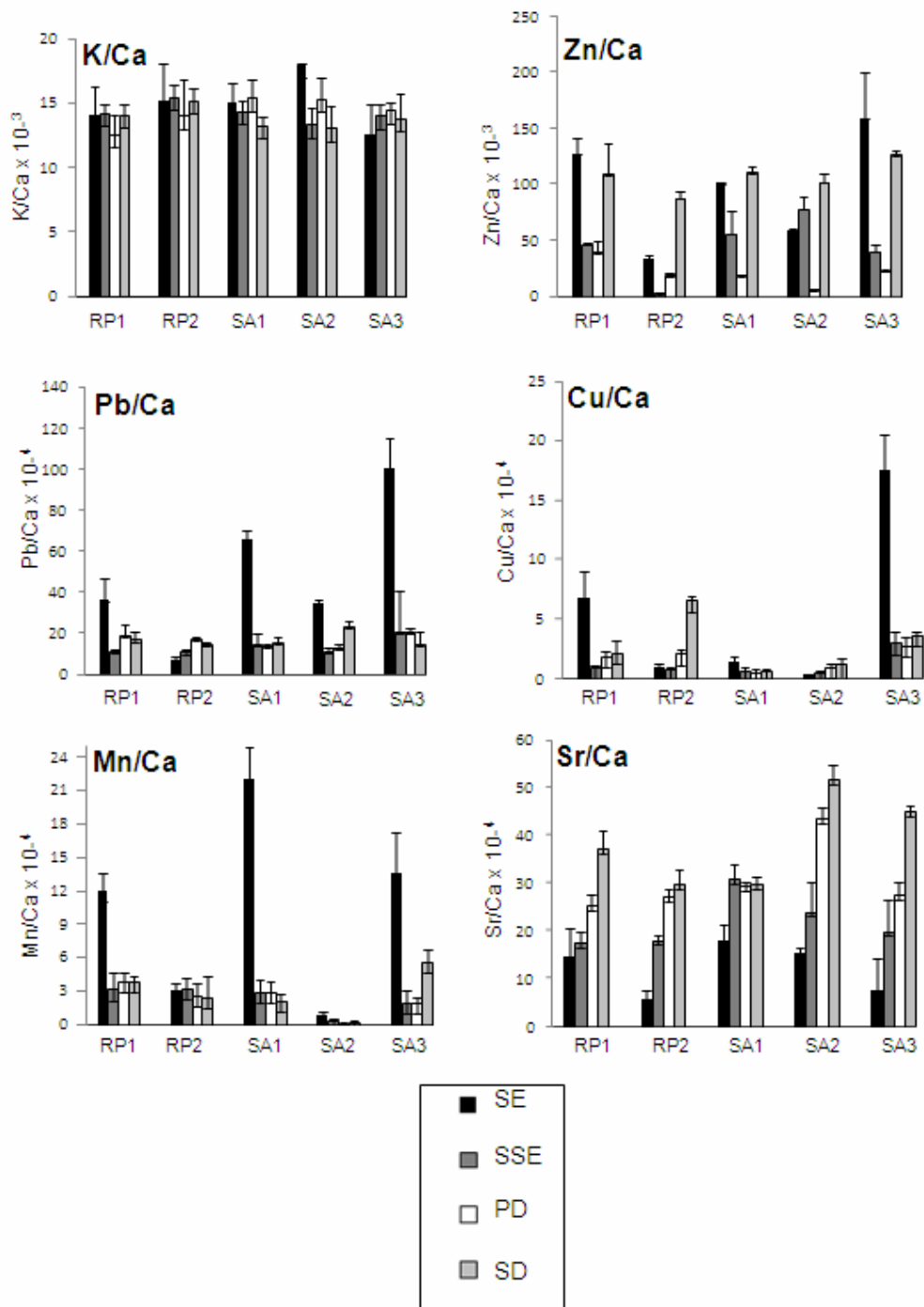
Zn, Pb, Cu, Mn e Sr em amostras controles (RP 1 e RP2), pois estes dentes apresentaram baixas concentrações de chumbo em amostras de esmalte dental analisada por ICP-MS e em amostras que apresentaram altas concentrações de chumbo no esmalte dental( SA1, SA2 e SA3). Observa-se que o padrão de distribuição dos diferentes elementos é semelhante em todas as amostras analisadas, independente da procedência, ou seja, independente se o dente apresentava alta ou baixa concentração de chumbo.

A **Figura 16** ilustra a média da intensidade relativa do Ca, K, Zn, Pb, Cu, Mn e Sr em razão do cálcio em amostras controles (RP 1 e RP2), e em amostras que apresentaram altas concentrações de chumbo no esmalte dental( SA1, SA2 e SA3). Observa-se que o padrão de distribuição dos diferentes elementos não se modifica quando comparamos os dados obtidos. Isso se deve ao fato do cálcio apresentar distribuição praticamente constante, por isso, se comporta como um padrão interno.



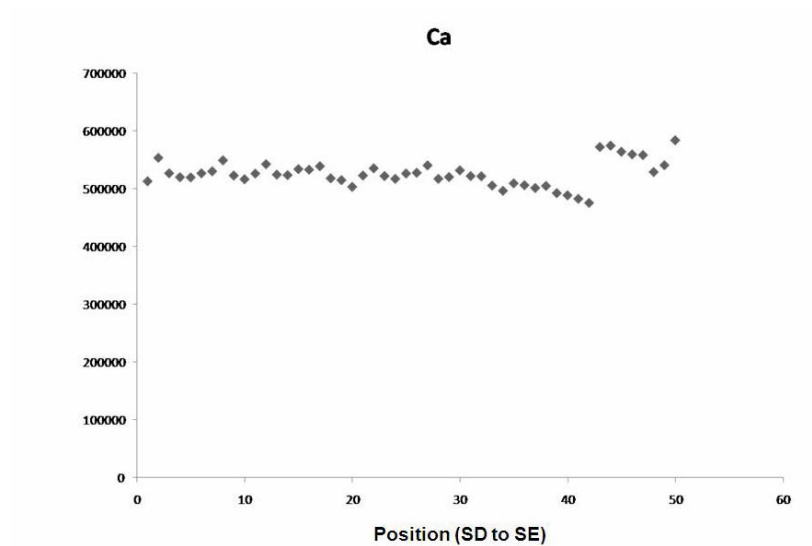


**Figura 15** – Intensidade Relativa do Ca, K, Zn, Pb, Cu, Mn, e Sr em amostras controles (RP 1 e RP2) e em dentes com altas concentrações de chumbo (SA1, SA2 e SA3). SE: Esmalte Superficial, SSE: esmalte subsuperficial, PD: dentina primária e SD: dentina secundária (Adaptado de Souza-Guerra, paper em preparação 2010)



**Figura 16**– Razão da intensidade Relativa do K, Zn, Pb, Cu, Mn, e Sr pelo cálcio em amostras controles (RP 1 e RP2) e em dentes com altas concentrações de chumbo (SA1, SA2 e SA3). SE: esmalte superficial, SSE: esmalte subsuperficial, PD: dentina primária e SD: dentina secundária (Adaptado de Souza-Guerra, paper em preparação 2010)

A **Figura 17** mostra um scanning linear realizado em um dente proveniente de Santo Amaro, BA. Podemos visualizar no gráfico que o esmalte dental apresenta uma maior intensidade relativa de Ca em comparação com a dentina. Os resultados estão consistentes com os dados descritos na literature, pois já conhecido que o esmalte dental tem cerca de 37,4% de cálcio enquanto que a dentina tem cerca de 28,2% (Soremark and Bergman 1961).



**Figura 17** - Scanning linear na amostra SA1, começando no dentina secundária (DS) (ponto 0) até o esmalte superficial (ES) (ponto 52)



## 6 DISCUSSÃO

O chumbo é muito conhecido como um onipresente, insidiosa e devastadora neurotoxina. A intoxicação por chumbo está fortemente ligada a um risco elevado de deficiência de aprendizagem, agressividade e delinquência (Olympio *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2008; Nevin, 2007; Needleman *et al.*, 2002; Dietrich *et al.*, 2001; Needleman *et al.*, 1996)

Diante de tantas seqüelas graves podemos dizer que as autoridades já têm motivos suficientes para lançar políticas públicas que visem o controle da contaminação ambiental, particularmente pelo chumbo. Alguns países desenvolvidos têm discutido sobre a relação da intoxicação por chumbo e as perdas econômicas de um país. Quando se fala de perdas econômicas podemos dizer que esta não está somente relacionada com os gastos envolvidos com o tratamento dos intoxicados, mas também com o desenvolvimento de uma dada economia. Isto pode ser melhor compreendido quando constatamos que após a redução do chumbo na gasolina, por exemplo, calculou-se que houve um ganho de cerca de 2,2 - 4,7 no QI e o aumento do QI da população está diretamente relacionado com o sucesso econômico de um país. Sabendo disso, algumas políticas de saúde pública lançaram medidas para proteger a população dos riscos e evitar o envenenamento individual e nacional com o intuito de prevenir futuras perdas econômicas. O governo apoiou campanhas de educação visando informar o público sobre os perigos da exposição ao chumbo. Tais iniciativas públicas para a prevenção primária já existem em países desenvolvidos ([www.cdc.gov](http://www.cdc.gov), [www.fda.gov](http://www.fda.gov), [www.epa.gov](http://www.epa.gov)), no entanto, muito pouco tem sido feito no Brasil, onde a grande maioria da população não está consciente dos perigos do envenenamento por chumbo.

Nos países em que há programas para detecção de pessoas contaminadas por chumbo, o sangue total é utilizado como marcador de contaminação, e as coletas são realizadas anualmente, no caso dos E.U.A., em todas as crianças do país. Assim, embora o chumbo não permaneça no sangue por muito tempo, devido ao maior número de coletas de amostras por vários anos, há uma maior probabilidade de encontrarmos indivíduos contaminados. Outro aspecto importante do uso do sangue total como marcador de contaminação por chumbo é que as coletas são feitas em crianças, a partir de idades bem precoces, que são os indivíduos com maior suscetibilidade aos efeitos

tóxicos do chumbo, principalmente em se tratando dos seus efeitos neurotóxicos(Parsons, 1997).

Além do sangue total, existem outros biomarcadores que refletem a contaminação pelo chumbo (Barbosa, 2005). Os dentes podem oferecer informações úteis sobre a contaminação ambiental principalmente porque é formado por diferentes tipos de tecidos, os quais são formados em diferentes períodos da vida de um indivíduo. A dentina foi utilizada por Needleman *et al.* em 1979 para provar os efeitos neurotóxicos do chumbo. A necessidade de procedimentos mais invasivos para análise da incorporação do metal fez com que o esmalte superficial de dentes decíduos fosse considerado uma boa alternativa para se determinar a exposição de um indivíduo ou população ao chumbo. A técnica da biópsia de esmalte, proposta por Brudevold *et al.* em 1975 e modificada por Gomes *et al.* em 2004, possibilita a determinação da concentração de chumbo presente no esmalte de dentes decíduos. Tal procedimento, além de pouco invasivo, indolor, de baixo custo e de fácil execução, mostrou-se adequado para estudos epidemiológicos que frequentemente utilizam-se de grandes amostras populacionais (Costa de Almeida *et al.*, 2007).

Ainda não foi completamente elucidado os mecanismos envolvidos na incorporação de chumbo no esmalte superficial, porém diversos trabalhos demonstraram diferenças muito claras entre populações de cidades notoriamente contaminadas e cidades sem histórico de contaminação ambiental descrito (Gomes *et al.*, 2004; Costa de Almeida *et al.*, 2007).

O presente estudo demonstrou uma forte associação entre altas concentrações de chumbo entre crianças que residem nas proximidades de uma área contaminada ou mesmo quando a criança esteve em contato com um ex-trabalhador de uma área contaminada. A importância do presente trabalho reside no fato de que a exposição ao chumbo é evitável, e as conseqüências da intoxicação por chumbo são muito graves, sobretudo em crianças. Esse trabalho visa identificar crianças e regiões contaminadas em países como o Brasil, em que praticamente não há informações sobre contaminação por chumbo na população, a um custo relativamente baixo, gerando informações muito importantes sobre necessidade de estudos de contaminação mais detalhados.

Recentemente alguns trabalhos demonstraram que fontes que até então estavam fora de suspeita, como medicamentos, continham quantidades significantes, não somente de chumbo, mas também de mercúrio e arsênico (Saper *et al.*, 2008). No entanto, o principal perigo reside nos produtos destinados às crianças. Alguns brinquedos podem conter chumbo em suas pinturas e as crianças, sobretudo as de menor idade, têm o hábito de colocar objetos na boca. Isso pode ser grave, porque a absorção intestinal de uma criança é muito mais rápido que em um adulto. Além disso, o sistema nervoso central em desenvolvimento é muito mais vulnerável a agentes tóxicos do que o sistema nervoso maduro, especialmente no caso de crianças desnutridas. (Brown *et al.*, 2004)

Além disso, as pessoas continuam a ser contaminados em umas das áreas estudadas, no caso de Santo Amaro, BA, pois nenhuma medida de remediação eficiente foi tomada. Mesmo nas demais regiões, sem histórico de contaminação ambiental, encontraram-se uma quantidade significativa de chumbo. Isso comprova a hipótese de que existem fontes ocultas de intoxicação por chumbo presente na rotina diária de milhões de pessoas no mundo.

Para verificar se os dados acerca da concentração de chumbo do esmalte superficial e subsuperficial poderiam ser úteis para detectar populações possivelmente contaminadas, nós coletamos amostras em regiões com diferentes históricos de contaminação ambiental: Santo Amaro, BA, região notoriamente contaminada, Ribeirão Preto, SP, Cubatão, SP e Mato Leitão, RS. Foram realizadas 5 microbiópsias sucessivas no esmalte dental. A decisão de realizarmos 5 biópsias sucessivas se justifica porque Gomes *et al.* (2004) relatou que microbiópsias mais profundas exibem resultados mais consistentes devido à alta variabilidade dos níveis de chumbo no esmalte mais superficial.

Com base na literatura, optamos por padronizar as análises em alguns dos tecidos que compõem o dente, ou seja, o esmalte e a dentina separadamente. Fizemos essa opção porque já é conhecido que esses tecidos possuem composições diferentes e conseqüentemente, quantidades diferentes de chumbo (Purchase & Fergusson, 1986).

A utilização da técnica da microbiópsia de esmalte foi útil para coletar amostras de esmalte dental, pois além de ser uma técnica de fácil execução, já se tem trabalhos na literatura para comprovar a eficiência da técnica. A microbiópsia de

esmalte foi utilizada *in vivo* como amostra para dosagem de chumbo tanto em dentes permanentes (Brudevold *et al.*, 1975; Cleymaet *et al.*, 1991 a, b, c, d), quanto em decíduos (Gomes *et al.*, 2004; Costa de Almeida *et al.*, 2007; de Almeida *et al.*, 2008).

Recentemente a morfologia das microbiópsias foi estudada por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de Luz Polarizada (Costa de Almeida *et al.*, 2008.). Nesse trabalho verificou-se que a microbiópsia não desmineraliza o esmalte em profundidade. Além disso, pela análise da birrefringência do esmalte, pôde ser demonstrado que não ocorre perda mineral no esmalte devido à utilização do ácido no procedimento da microbiópsia do esmalte. Esses achados corroboram para a afirmação de que a microbiópsia não é um procedimento invasivo, nem destrutivo.

Neste estudo utilizamos dentes esfoliados, por isso, no caso das análises realizadas na dentina, apesar de requerer um procedimento invasivo, que depende da perda do elemento dental, não tivemos dificuldades para acesso. O único inconveniente é que para o preparo das amostras é necessário um maior tempo experimental.

Sabe-se que os mecanismos de formação e mineralização do esmalte e da dentina são bem diferentes. Sabe-se que durante a deposição da matriz do esmalte apenas 30% dele é mineralizado, enquanto que o restante do volume de mineral é adquirido depois que toda a sua espessura foi depositada (Bercovitz *et al.*, 1992). Estudos realizados em fetos humanos e dentes decíduos (Deutsch e Shapiro, 1987) evidenciaram que o esmalte presente ao nascimento não é completamente mineralizado e adquire um volume substancial de minerais no período pós natal. Diante disso, é possível que os componentes inorgânicos depositados no período pré natal, incluindo os depósitos de chumbo, podem ser particularmente adquiridos também no período pós natal (Arora *et al.*, 2006).

Diferentemente sabe-se que a dentina é quase que completamente mineralizada imediatamente após a deposição da matriz (Bercovitz *et al.*, 1992). Assim, é plausível afirmarmos que os níveis de chumbo incorporados nos períodos pré e pós natal na dentina refletem a exposição durante o período correspondente de desenvolvimento. Esses períodos são facilmente definidos na dentina a partir da linha neonatal (Arora *et al.*, 2006). Sabendo disso, optamos por analisar amostras de dentina pré e pós natal. Chamamos de dentina pré natal àquela imediatamente abaixo do esmalte



localizado no terço incisal ou ponta de cúspide e dentina pós natal àquela adjacente a polpa dentária.

Outro importante parâmetro a ser considerado é a profundidade de biópsia. Quando correlacionamos a concentração de chumbo com a profundidade de microbiópsia constatamos que existe uma correlação significativa e negativa, ou seja, a medida que a profundidade da microbiópsia, aumenta a concentração de chumbo diminui. Esse achado foi encontrado em todas as amostras, independente da procedência da amostra, ou seja, se é proveniente de uma região notoriamente contaminada ou sem nenhum histórico de contaminação ambiental descrito. Esse achado também foi descrito por vários autores para dentes permanentes (Brudevold *et al.*, 1975, 1977; Purchase & Fergusson, 1986; Cleymaet *et al.*, 1991 a, b, c, d) e dentes decíduos (Gomes *et al.*, 2004; Costa de Almeida *et al.*, 2007). Baseado nisso, é recomendável que façamos uma comparação entre microbiópsias de profundidades similares. A profundidade de biópsia sofre influência de vários fatores que não podem ser controlados pelo indivíduo que está executando a técnica. Diferenças na temperatura ambiente, evaporação da solução ácida e maior resistência do dente são alguns fatores que podem afetar a profundidade de microbiópsia (Cleymaet *et al.*, 1991 d).

Sabendo-se da relação entre concentração de chumbo e a profundidade de biópsia, concluímos que o ideal não seria comparar apenas as medianas encontradas em cada cidade, sem levar em consideração a profundidade, ou seja, o ideal é compararmos numa mesma profundidade. Pensando nisso, tentamos estabelecer uma equação que pudesse prever qual a concentração de chumbo encontrada em uma dada profundidade. Para fazer os cálculos foi necessário realizar uma regressão linear log-log. Para as análises, plotamos os dados da profundidade de biópsia em  $\mu\text{m}$  no eixo x e os dados da concentração de chumbo no esmalte em  $\mu\text{g/g}$  em y. Esses dados foram transformados em logaritmo natural. A partir desses dados, realizou-se a regressão linear, o qual nos forneceu o valor de  $\beta$  e  $\alpha$  que estão relacionados com a concentração de chumbo e a profundidade de biópsia na equação ( $y = \alpha x^\beta$ , onde y é a concentração de chumbo e x a profundidade de biópsia). Finalmente com os valores de  $\beta$  e  $\alpha$  e utilizando-se a equação da reta foi possível fazer esse cálculo.

É importante salientar que essa equação foi determinada para cada tipo de dente, pois incluímos em nossas análises diferentes tipos de dentes (incisivos, caninos e

molares) e não sabíamos se esse fator influenciaria na determinação dessa equação. Após as análises, concluímos que o padrão de distribuição de chumbo é semelhante para todos os dentes, independente do tipo. Outro achado importante e já relatado em trabalhos prévios foi que a concentração de chumbo é diferente para cada tipo de dente e parece ter relação com a contaminação ambiental. Na cidade de Santo Amaro, BA e Ribeirão Preto, SP, a concentração de chumbo decresce no sentido incisivo > molares > caninos. Em Cubatão, podemos notar que os incisivos possuem maiores concentrações de chumbo numa dada profundidade, seguido de canino e molar. Alguns autores concordam com esse achado e relatam que a concentração do chumbo varia entre incisivos, caninos e molares, apresentando um gradiente que decresce dos incisivos para os molares (Mackie *et al.*, 1977; Paterson *et al.*, 1988; Tvinnereim *et al.*, 2000; Karahalil *et al.*, 2007). Grandjean *et al.* (1984, 1986) e Smith *et al.* (1983) não encontraram diferenças nas concentrações de chumbo presentes em dentes contralaterais. Os incisivos são os primeiros dentes que começam a se formar no período de vida intra-uterino e os primeiros dentes que irrompem na cavidade bucal, por isso, permanecem mais tempo em contato com os fluídos que banham o esmalte no período de vida intra-uterino e com a saliva, após irromperem na cavidade bucal.

A mediana da concentração de chumbo ( $\mu\text{g/g}$ ) encontrada nas 5 microbiópsias sucessivas em Santo Amaro, BA, (530, 198, 137, 117 e 97  $\mu\text{g/g}$ ), Ribeirão Preto, SP (312, 152, 119, 91 e 83  $\mu\text{g/g}$ ), Cubatão, SP (116, 56, 38, 26 e 24  $\mu\text{g/g}$ ) e Mato Leitão, RS (132, 95, 64, 42 e 45  $\mu\text{g/g}$ ) está de acordo com os dados descritos anteriormente na literatura. Purchase e Fergusson (1986) descreveram níveis de chumbo na superfície de esmalte que variavam de 230 a 2400  $\mu\text{g/g}$  nos primeiros 2  $\mu\text{m}$  seguido por um declínio gradual em direção ao esmalte interno. Além disso, Gomes *et al.* (2004) descreveram valores similares em uma profundidade semelhante (286,2  $\mu\text{g/g}$  para a região não industrial e 457,3  $\mu\text{g/g}$  para a região industrial de Piracicaba, SP; Gomes *et al.*, 2004). Costa de Almeida *et al.* (2007) encontrou uma mediana de 206  $\mu\text{g/g}$  em pré escolares de Ribeirão Preto, SP enquanto que em Bauru, uma região notoriamente contaminada, encontrou uma mediana de 786  $\mu\text{g/g}$ .

O esmalte dental ainda não é considerado um marcador confiável provavelmente devido a grande variação dos níveis de chumbo descritos na literatura (Anttila, 1987a, b; Fergusson e Purchase, de 1987; Gil *et al.*, 1994; Shapiro *et al.*, 1972),

variando de 1,7 a. 4900 mg / g (Anttila, 1987a; Brudevold *et al*, 1977). No entanto, vários estudos que utilizaram o procedimento da microbiópsia do esmalte em dentes permanentes (Brudevold *et al*, 1975;. Brudevold e Steadman, 1956) ou dentes decíduos (Gomes *et al.*, 2004; Costa de Almeida *et al.*, 2007) , encontraram evidências de que a concentração de chumbo presente na superfície de esmalte tem relação com a contaminação ambiental. Curiosamente, os valores da concentração de chumbo encontrados na superfície do esmalte de dentes decíduos são da mesma ordem de magnitude dos valores reportados na superfície do esmalte de dentes permanentes provenientes do Quênia (145 mg / g) numa região sem histórico de contaminação ambiental (Cleymaet *et al.* 1991d).

Os dados encontrados no presente trabalho estão de acordo com dados descritos na literatura em uma profundidade semelhante utilizando-se PIXE (Emissão de Raio-X induzido por partículas). Encontrou-se uma mediana de 357 µg / g em uma área urbana e 267 µg / g na área rural (Anttila,1987a).

Quando comparamos os nossos dados em dentes decíduos com dados provenientes de dentes permanentes, concluímos que a mediana da concentração de chumbo encontrada é pelo menos 2 vezes menor do que aqueles para dentes permanentes obtidos biópsias de esmalte in vivo das áreas urbanas na Europa (Cleymaet *et al.*, 1991a, b) e Estados Unidos da América (Brudevold *et al.* 1975,1977), ou para a superfície do esmalte de dentes extraídos da Nova Zelândia (1100 mg / g) (Purchase e Fergusson, 1986).Este fato pode ser explicado pelo tempo necessário para a conclusão do estágio de maturação da amelogênese, que é muito diferente nas diferentes dentições, ou seja, decídua e permanente (Smith, 1998). Durante a fase de maturação, a maioria dos íons são incorporados ao esmalte, através da sua superfície, em um processo que leva alguns meses em dentes decíduos, mas muitos anos em dentes permanentes. Este período mais longo de maturação nos dentes permanentes, provavelmente, resulta em maiores concentrações de chumbo no esmalte superficial de dentes permanentes (Brudevold *et al*, 1975;. Brudevold e Steadman 1956; Purchase e Fergusson, 1986).

Uma das maiores controvérsias a respeito dos níveis de chumbo na superfície do esmalte dental é se o metal acumulado nos primeiros micrometros é incorporado após a erupção do dente, devido aos processos de des- e remineralização, ou apenas em sua fase pré-eruptiva, durante o estágio de maturação da amelogênese. Nosso grupo recentemente

realizou um experimento simulando os processos DES-RE num modelo de cárie *in vitro* e concluiu-se que o chumbo presente no meio pode ser incorporado durante os processos DES-RE, porém esse acúmulo se concentra nos primeiros micrometros do esmalte (Molina *et al.*, no prelo 2010).

Os mecanismos sobre a incorporação de chumbo no esmalte não foi completamente elucidado, pois há dados controversos na literatura. Brudevold & Steadman, em 1956, estudaram a concentração e distribuição do chumbo no esmalte a partir de dentes com diferentes idades, agrupados em: dentes não irrompidos, parcialmente e completamente formados; e dentes irrompidos. Verificou-se que a quantidade do metal na superfície do esmalte dental foi maior nos dentes irrompidos em relação aos não irrompidos, nos dentes completamente formados em comparação com os parcialmente formados e nos dentes mais antigos. Os autores sugerem uma aquisição pós-eruptiva de chumbo. Utilizando-se o procedimento da microbiópsia de esmalte, Cleymaet *et al.* (1991 b) analisaram a concentração de chumbo em grupos de crianças com diferentes idades e sugeriram que a incorporação pós-eruptiva do chumbo no esmalte pode acontecer em regiões contaminadas, enquanto que em áreas de baixa exposição ao metal este ganho pós-eruptivo é desprezível.

Brudevold *et al.* (1977) determinaram a concentração de chumbo no esmalte superficial de crianças com diferentes idades (10 anos e 12 anos) e verificaram que a concentração de chumbo foi maior, em média de 130 µg/g, nas crianças mais novas, o que pode ser um indicativo de que o chumbo não é incorporado pelo meio bucal. Outros trabalhos confirmam essa hipótese. Estudos recentes realizados em animais mostram que a incorporação de chumbo ao esmalte acontece no período pré-eruptivo. Arora *et al.* (2005) avaliaram a distribuição espacial do chumbo no esmalte dental de dentes não irrompidos de ratos portanto, sem contato direto com a saliva. Os autores encontraram grandes quantidades do metal na camada superficial do esmalte, mais do que em seu interior, o que demonstra sua incorporação pré-eruptiva. Arora *et al.* (2006) quantificaram a distribuição intracelular de chumbo e zinco durante o estágio inicial de maturação da amelogênese, utilizando microfluorescência de raio x induzida por radiação Síncroton. Enquanto que o chumbo não pôde ser detectado nos ameloblastos, uma maior intensidade relativa foi observado na margem do esmalte em mineralização.

Em relação à utilização na dentina como biomarcador de exposição ambiental pode-se dizer que a literatura aponta como um biomarcador mais confiável, por ser mais estável. Em relação à estabilidade dos depósitos de chumbo na dentina, Gulsson e Gilling (1997) demonstraram que o índice de trocas de chumbo na dentina circumpulpar foi baixo (aproximadamente 1% ao ano). Quando pensamos em esmalte dentário, pensamos também que por ser o tecido que está exposto na cavidade bucal, e por este motivo, poderia estar sujeito à incorporação de chumbo por ação na saliva em processos DES-RE que ocorrem rotineiramente na cavidade bucal. Pensando nisso, e levando-se em consideração que o acesso ao esmalte dental é mais fácil, por dispensar algumas fases laboratoriais necessárias para o preparo de amostras de dentina, por exemplo, nos questionamos qual seria a correlação entre a concentração de chumbo no esmalte superficial *versus* a dentina. Além disso, outro questionamento que nos motivou a estender nossos dados para a análise da dentina foi a questão se o chumbo presente na dentina é incorporado no período pré e pós natal.

Os dados da mediana da concentração de chumbo encontrado respectivamente na dentina pré e pós natal em Santo Amaro, BA foi 7,2 e 10,7 µg/g, em Ribeirão Preto, SP foi de 4,8 e 6 e Cubatão, SP foi de 5,6 e 6,1. Quando analisamos estatisticamente os dados da concentração de chumbo na dentina pré e pós natal em cada cidade (Santo Amaro, BA, Ribeirão Preto, SP e Cubatão, SP) concluímos que em regiões com mais chumbo disponível no ambiente, nesse caso trata-se de Santo Amaro, BA e Ribeirão Preto, SP, há diferença estatisticamente significativa entre a concentração de chumbo pré e pós natal, ou seja, há uma tendência a uma maior incorporação de chumbo no período pós natal.

Nossos achados estão de acordo com os dados descritos na literatura. Grobler *et al.* (2000) relatou que a concentração de chumbo na dentina circumpulpar, o qual denominamos de secundária, teve uma mediana de  $9,88 \pm 8,291 \mu\text{g/g}$ . Needleman *et al.* (1979) distribuiu as crianças de acordo com as concentrações de chumbo encontradas na dentina em Grupo 1 <5.1 ppm; Grupo 2, 5.1 to 8.1 µg/g; Grupo 3, 8.2 to 11.8 µg/g; Grupo 4, 11.9 to 17.1 µg/g; Grupo 5, 17.2 to 27 µg/g and Grupo 6 > 27 µg/g. Este estudo foi um marco na ciência, pois foi com base nele, que constatou-se que crianças com maiores concentrações de chumbo na dentina tinham sequelas neuropsicológicas, as quais poderiam comprometer seu desempenho escolar.

Com relação a correlação entre o chumbo presente no esmalte superficial e na dentina pré e pós natal, não há dados descritos na literatura. Nossos achados apontam para a existência de uma fraca correlação positiva, porém significativa na cidade de Santo Amaro, BA e Ribeirão Preto, SP apenas. Esses achados apontam para o fato que quanto mais chumbo disponível no ambiente, mas forte é essa correlação.

Outro objetivo do nosso trabalho é analisar nossas amostras de dentes decíduos por  $\mu$ -XRF.

A análise por micro-XRF mostraram que a distribuição de chumbo em incisivos decíduos tem um padrão especial, com diferenças claras nos níveis de chumbo presentes no esmalte e na dentina. Foi observado que os níveis de Pb têm uma maior intensidade na superfície do esmalte para todas as amostras analisadas (Figura 13 e 14) (Gomes *et al*, 2004;. Costa de Almeida *et al*, 2007; de Souza Guerra *et al.*, 2010). A hipótese de valores elevados da razão Pb/Ca no esmalte superficial não é nova. O acúmulo de chumbo na superfície do esmalte, provavelmente, reflete a quantidade de tempo que a matriz do esmalte é exposta ao plasma durante a fase de maturação e amelogênese e a quantidade de chumbo disponível no plasma durante o longo tempo de maturação do esmalte (cerca de seis meses nos incisivos decíduos, os dentes analisados neste estudo). Apesar da dentina ter sido utilizada com sucesso no passado para classificar crianças de acordo com a quantidade de chumbo, com esta análise não identificamos maiores níveis de chumbo na dentina. Provavelmente capilares com diâmetros menores e  $\mu$ -XRF com resolução maior será necessária para distinguir diferenças na quantidade de chumbo na dentina, que são cerca de 10 ppm a 30 ppm, quase duas ordens de grandeza menores do que a concentração de chumbo encontrada na superfície do esmalte dental de crianças que vivem em áreas contaminadas. A partir dos nossos resultados, podemos dizer que a análise por meio de  $\mu$ -XRF é capaz de identificar alterações na distribuição dos elementos em dentes. Utilizando-se esta técnica foi possível confirmar que o chumbo está distribuído mais fortemente no esmalte superficial.

Numa segunda análise, optamos por fazer análises em quintuplicatas em dentes decíduos. O padrão de análise foi similar ao que já havia sido realizado, porém as medidas foram feitas em quintuplicatas, para cada região analisada. Previamente às análises, selecionamos dentes decíduos que já tinham sido analisados por ICP-MS

sendo que para estas análises incluímos 3 dentes com altas concentrações de chumbo (SA1, SA2 e SA3) e 2 dentes com baixas concentrações de chumbo (RP1 e RP2). A Tabela 17 apresenta as concentrações de chumbo no esmalte superficial (0-3 mm) e interior da dentina determinados por ICP-MS desses 5 dentes utilizados neste estudo. Os dados são expressos em  $\mu\text{g} / \text{g}$  de esmalte e da dentina, e indicam que os 5 dentes contêm concentrações muito diferentes de chumbo: RP1 e RP2 têm relativamente baixas concentrações de chumbo (em comparação com estudos anteriores, como relatado por Almeida *et al.*, 2008), enquanto SA1, SA2 e SA3 apresentam concentrações muito elevadas de chumbo. As concentrações de chumbo encontrados na esmalte superficial dos dentes doados pelas crianças de Santo Amaro, BA são 10 a 23 vezes maior do que as encontradas nos dentes de crianças residentes em Ribeirão Preto.

Ca é abundante nos dentes e seu conteúdo é relativamente constante. Realizou-se a análise do nível de cálcio através de uma análise linear da dentina (dentina secundária) para o esmalte superficial. Como esperado, a intensidade de Ca é maior no esmalte do que na dentina (Figura 17) (Angmar *et al.*, 1963). A distribuição de Ca no esmalte e dentina está de acordo com estudos anteriores que determinaram os valores médios de cálcio de 37,4% (peso%) para o esmalte dental (Brudevold, 1967) e 26,5% para a dentina (Robinson *et al.*, 1971). No presente estudo, selecionamos dentes hígidos. Sabe-se que na ausência de lesões de cárie e defeitos de esmalte, o Ca pode ser considerado como um elemento constante no esmalte, sendo por isso utilizado como padrão interno. Os níveis médios para o K, Mn, Cu, Zn, Sr e Pb foram expressos individualmente na Figura 15 e pela razão pelo cálcio na Figura 16.

No presente estudo, a distribuição do K em todos os dentes se assemelha a de Ca, K, sendo o segundo elemento mais abundante. Zn foi o terceiro elemento mais abundante, com os níveis mais elevados sendo encontrados no esmalte superficial e dentina secundária, e níveis baixos foram detectados na dentina primária, para todos os 5 dentes (Figura 15). Os níveis crescentes de Sr foram encontrados a partir do esmalte para a dentina, com os níveis mais elevados sendo detectados na dentina secundária, uma distribuição única entre os elementos analisados.

A distribuição de Pb e Cu são semelhantes, com níveis muito mais elevados sendo encontrados no esmalte superficial. Uma maior intensidade relativa do Pb foi observado no esmalte superficial, tanto em termos de valores absolutos como pela razão

Pb / Ca. Uma maior intensidade relativa de chumbo foi detectada nos dentes coletados em Santo Amaro, BA. No entanto, não é possível a comparação estatística.

Esta análise descreve a distribuição de intensidades relativas em relação ao K, Zn, Pb, Cu, Mn, Sr e normalizado pela Ca, conforme determinado pela  $\mu$ -SRXRF em 4 regiões anatômicas distintas, em 5 dentes decíduos com diferenças quanto à exposição ao chumbo. Um aumento de cinco vezes no teor de chumbo é observada quando a razão Pb / Ca obtido no esmalte superficial é comparado com os detectados nas outras áreas anatômicas analisadas. Embora algumas investigações têm empregado  $\mu$ -SRXRF ou ablação por laser-ICPMS, no passado, esses estudos não conseguiram demonstrar maiores quantidades de chumbo na esmalte superficial (Bloch *et al.*, 1998; Kang *et al.*, 2004; Uryu *et al.*, 2003).

Quando Zn, Pb, Cu, Mn e Sr são determinados, pode ser necessário analisar os primeiros micrômetros do esmalte. No entanto, os resultados são muito consistentes com os dados obtidos através de técnicas quantitativas (Cleymaet *et al.*, 1991a;. Cleymaet *et al.*, 1991b;. Costa de Almeida *et al.*, 2009;. Costa de Almeida *et al.*, 2007;. De Almeida *et al.*, 2008;. Gomes *et al.*, 2004;. Robinson, 1995) e destaca a importância da determinação dos microelementos em diferentes áreas do dente.

Nossos dados sugerem que, como no caso de Ca e K, em determinados locais alguns outros elementos (Zn, Pb e Mn na SE, e Zn e Sr em SD), parecem ter uma distribuição similar, o que pode indicar que esta co-localização provavelmente tem relevância biológica.



## 7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que a mediana da concentração de chumbo ( $\mu\text{g/g}$ ) encontrada nas 5 microbiópsias sucessivas em Santo Amaro, BA, foi de (530, 198, 137, 117 e 97  $\mu\text{g/g}$ ), Ribeirão Preto, SP (312, 152, 119, 91 e 83  $\mu\text{g/g}$ ), Cubatão, SP (116, 56, 38, 26 e 24  $\mu\text{g/g}$ ) e Mato Leitão, RS (132, 95, 64, 42 e 45  $\mu\text{g/g}$ ). A mediana da concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos coletados em cidade de Santo Amaro da Purificação, cidade notoriamente contaminada, foi estatisticamente maior que as demais cidades incluídas no presente estudo evidenciando, mais uma vez, que a concentração de chumbo presente no esmalte tem forte ligação com a contaminação ambiental. Independente da procedência do dente decíduos, todos os tipos de dentes apresentaram o mesmo padrão de distribuição da concentração de chumbo no esmalte dental. Além disso, a concentração de chumbo variou entre os diferentes tipos de dentes.

A equação da reta definida no presente trabalho pode em muito auxiliar futuras análises, uma vez que, tornou possível o cálculo da concentração de chumbo em uma mesma profundidade de biópsia e como a profundidade está inversamente relacionada com a concentração de chumbo, o ideal seria compararmos dados de diferentes populações, utilizando-se uma mesma profundidade de biópsia.

Os dados da concentração de chumbo na dentina pré e pós natal nos revelou que há uma tendência a um maior acúmulo de chumbo no período pós natal. A correlação entre a concentração de chumbo na dentina pré e pós natal e o esmalte dental, apesar de fraca, foi significativa, mas apenas nas amostras provenientes de cidades que apresentaram maiores valores de chumbo (neste estudo Ribeirão Preto e Santo Amaro). Nossos dados revelam que mais estudos são necessários para descrevermos melhor os mecanismos envolvidos durante o processo de acúmulo de chumbo em tecidos dentais e como estes se correlacionam-se entre si.

Quanto às análises feitas por  $\mu\text{-SRXRF}$ , o presente estudo confirma a distribuição heterogênea dos diferentes elementos de dentes, demonstrando claramente a importância dos 10 primeiros  $\mu\text{m}$  do esmalte superficial para determinação de alguns elementos, tais como Zn, Pb, Mn e Cu. Usando a técnica  $\mu\text{-SRXRF}$ , foi possível avaliar a distribuição espacial dos elementos.

A intensidade relativa de fluorescência de cálcio serviu como um padrão interno para normalizar as variações na distribuição elementar, mas não alterou a distribuição de elementos. K foi o segundo elemento mais abundante, e sua distribuição foi semelhante ao do Ca. Zn foi o terceiro elemento mais abundante, com os maiores níveis de Zn, sendo encontrado em esmalte superficial e na dentina secundária, e níveis baixos detectados na dentina primária em todos os 5 dentes. Os níveis crescentes de Sr foram encontrados em curso a partir do esmalte para a dentina, uma distribuição similar entre os elementos testados. Pb, Mn, Cu e apresentaram uma tendência semelhante, com maior intensidade relativa do Pb, sendo encontrado em esmalte superficial.

## REFERÊNCIAS\*

Altshuller L F, Halak D B, Landing B H, Kehoe R A. Deciduous teeth as an index of body burden of lead. *J Pediatr* 1962;60:224-229.

Amorim LCA. Os biomarcadores e sua aplicação na avaliação da exposição aos agentes químicos ambientais. *Ver Bras Epidemiol* 2003;6: 1-13.

Angmar B, Carlstrom D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastruct Res* 1963; 8: 12-23.

Anjos MJ, Barroso RC, Pérez CA, Braz D, Moreira S, Dias KRHC, Lopes RT. Elemental mapping of teeth using micro-SRXRF. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. 2004;213, 569-573.

Anjos, J. A. S. A. Estratégia para remediação de um sítio contaminado por metais pesados – estudo de caso [tese]. São Paulo: Escola Politécnica da Universidade de São Paulo; 1998.

Anttila A, Anttila A. Trace-element content in the enamel surface and in whole enamel of deciduous incisors by proton-induced X-ray emission of children from rural and urban Finnish areas. *Archs Oral Biol* 1987(a);32:713-717.

Anttila A. Lead content of deciduous tooth enamel from a high-radon area. *Acta Odontol Scand*. 1987 (b); 45(4): 283-8.

Arora M, Chan SW, Ryan CG, Kennedy BJ, Walker DM. Spatial distribution of lead in enamel and coronal dentine of wistar rats. *Biol Trace Elem Res*. 2005; 105(1-3): 159-70.

Arora M, Kennedy BJ, Elhlou S, Pearson NJ, Walker DM, Bayl P, Chan SW. Spatial distribution of lead in human primary teeth as a biomarker of pre- and neonatal lead exposure. *Sci Total Environ*. 2006; 371(1-3): 55-62.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Public Health Assessment Guidance Manual. Lewis Publishers. Boca Raton – Ann Arbor – London – Tokyo; 1992.

ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry). Evaluación de Riesgos en Salud por la Exposición a Residuos Peligrosos. Servicio Nacional de Información Técnica (SNIT) del Departamento de Comercio de los E.E.U.U; 1992. Numero: PB92-147164.

ATSDR. 2001. Hair Analysis Panel Discussion: Exploring the state of the Science. Atlanta, GA: Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Available: [http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/hair\\_analysis/](http://www.atsdr.cdc.gov/HAC/hair_analysis/) [accessed 15 April 2005].

---

\* De acordo com a norma da UNICAMP/ FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

- Attramadal A, Jonsen J. The content of lead, cadmium, zinc and copper in deciduous and permanent human teeth. *Acta Odontol Scand* 1976;34:127-131.
- 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*. 2005; 113(12): 1669-74.
- Bercovitz K, Laufer D. Systemic lead absorption in human tooth roots. *Arch Oral Biol* 1992;37: 385-387.
- Bergdahl IA, Skerfving S. Biomonitoring of lead exposure - alternatives to blood. *J Toxicol Environ Health A* 2008;71:1235-43.
- Bernard SM, Samet JM, Grambsch A, Ebi KL, Romieu I. The potential impacts of climate variability and change on air pollution related health effects in the United States. *Environ Health Perspect* 2001; 109:199-209.
- Brudevold F, Gardner D E, Smith F A. A distribution of fluoride in human enamel. *J Dent Res*. 1956;35:420-429.
- Brudevold F, Steadman LT, The distribution of lead in human enamel. *J Dent Res*. 1956; 35(3): 430-7.
- Brudevold F, and Soremark, R. . Chemistry of the mineral phase of enamel. In *Structure and chemical organization of teeth* (A.E.W. Miles, Ed). Academic Press, London 1967: 251-267.
- 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*. 1975;20:667-673.
- Brudevold F, Aasenden R, Srinivasian B N, Bakhos Y. Lead in enamel and saliva, dental caries and the use of enamel biopsies for measuring past exposure to lead. *J Dent Res* 1977;56:1165-1171.
- Byers RK, Lord EE. Late effects of lead poisoning on mental development. *Am J Dis Child* 1943; 66:471-83.
- 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*. 1996;29:440.
- Calabrese EJ. Expanding the reference dose concept to incorporate and optimize beneficial effects while preventing toxic responses from nonessential toxicants. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1996; 24(1 Pt 2): S68-75.
- Canfield RC, Henderson CR, Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per deciliter. *N Engl J Med* 2003; 348:1517-26.

Carvalho, F.M. Intoxicação por chumbo e cádmio entre pescadores da Região do Rio Subaé e de Guaibim (área controle) [dissertação]. Salvador, BA: Universidade Federal da Bahia; 1978.

Carvalho, F.M.; Silvany-Neto, A. M.; Barreto, M.L.; Tavares, T.M. Efeito da Poluição por Chumbo em população infantil. Relatório. Projeto Estudos Ecológicos do Recôncavo. Faculdade de Medicina / Instituto de Química. Universidade Federal da Bahia; 1980.

Carvalho, F.M.; Neto, A. M.S.; Peres, M.F.T.; Gonçalves, H.R.; Guimarães, G.C.; Amorim, C.J.B.; Jr.Silva, J.A. S.; Tavares, T.M. Intoxicação pelo chumbo: Zinco protoporfirina no sangue de crianças de Santo Amaro da Purificação e de Salvador, Bahia. *J. Pediatr.* 1996;72(5): 295-298.

Carvalho FM, Silvany Neto AM, Tavares TM, Costa ACA, Chaves CER, Nascimento LD, et al. Chumbo no sangue de crianças e passivo ambiental de uma fundição de chumbo no Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 2003; 13:19-23.

Centers for Disease Control and Prevention. Preventing lead poisoning in young children: a statement. Atlanta: US Department of Health and Human Services, Public Health Services; 1991.

CEPRAM. Conselho Estadual de Proteção Ambiental do Estado da Bahia. 1981. Secretaria de Planejamento, Ciência e Tecnologia – BA. Informação para o CEPRAM sobre a situação da COBRAC.

Charney E, Kessler B, Fartel M, Jackson D. Childhood lead poisoning: a controlled trial of the effect of dust-control measures on blood lead levels. *N Engl J Med.* 1983; 309:1089-93.

Chiodo LM, Jacobson SW, Jacobson JL. Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels. *Neurotoxicology.* 2004; 26:359-71.

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.* 1991(a);25,256-263.

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.* 1991(b);19,107-111.

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.* 1991(c);32,111-127.

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.* 1991(d); 104,175-189.

Costa de Almeida GR, Pereira Saraiva Mda C, Barbosa F Jr, Krug FJ, Cury JA, Rosário de Sousa Mda L, Rabelo Buzalaf MA, Gerlach RF. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ Res.* 2007; 104(3): 337-45.

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

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 (b);407(18):5169-75.

Costa, A.C.A.. 2001. Avaliação de alguns aspectos do passivo ambiental de uma metalurgia de chumbo em Santo Amaro da Purificação, Bahia [dissertação]. Salvador, BA: Universidade Federal da Bahia; 2001.

CRA - Centro de Recursos Ambientais da Bahia. Respostas aos quesitos do Ministério Público. Salvador; 1992.

Cunha, P. S. P. & Araújo, P. S. P. Laudo Pericial de Avaliação e Quantificação da Contaminação Ambiental por Chumbo e Cádmio no Município de Santo Amaro da Purificação, BA; 2001.

Davidson CI. *Clean Hands: Clair Patterson's Crusade Against Environmental Lead Contamination.* Nova Science Publishers, 1998.

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.

De La Burne B, NcLin S, Choate S. Does asymptomatic lead exposure in children have latent sequelae? *J Pediatr.* 1972; 81:1088-91.

De Souza Guerra, C., Fernanda Gerlach, R., Pinto, N.G.V., Cardoso, S.C., Moreira, S., Almeida, A.P., Peixoto, I.T.A., Meloni, C.H., Mota, C.L., Oliveira, L.F., Braz, D., and Cely Barroso, R. X-ray fluorescence with synchrotron radiation to elemental analysis of lead and calcium content of primary teeth. *Applied Radiation and Isotopes.* 2010; 68, 71-75.

Deutsch D, Shapira L. Pattern of mineral uptake in the developing human deciduous enamel. *J Craniofac Genetic Dev Biol.* 1987;7:137-43.

Dietrich KN, Ris MD, Succop PA, Berger OG, Bornschein RL. Early exposure to lead and juvenile delinquency. *Neurotoxicol Teratol.* 2001; 23:511-8.

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

- Fergusson J E, Purchase N G. The analysis and levels of lead in human teeth: a review. *Environ Pollut.* 1987;46:11-44.
- Fiske CH, Subbarow Y. The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.* 1925;66:375-400.
- Franco-Netto G, Alonzo MD, Cancio J, Jost M, Souza-Oliveira S. Human health risk reduction due to lead exposure in Brazil. *Salud Publ Mex.* 2003; 45: s255-s7.
- Freitas CU. *Vigilância de população exposta a chumbo no município de Bauru – São Paulo: investigação de fatores de risco de exposição e avaliação da dinâmica institucional [tese]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo; 2004.*
- 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.
- Garcia SI, Mercer R. Salud infantil y plomo en Argentina. *Salud Publ Mex.* 2003; 45: 252-5.
- Gil F, Perez M L, Facio A, Villanueva E, Tojo R, Gil A. Dental lead levels in the Galician population, Spain. *Sci Total Environ.* 1994;156:145-150.
- Gil F, Pérez ML, Facio A, Villanueva E, Tojo R, Gil A. Dental lead levels in the Galician population, Spain. *Sci Total Environ.* 1994; 156(2): 145-50.
- Gomes V E, Sousa M L R, Barbosa F, Krug F J, Saraiva M C P, Cury J A, Gerlach R F. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of pre-school children. *Sci Total Environ.* 2004;320:25-35.
- Grandjean P, Hansen ON, Lyngbye K. Analysis of lead in circumpulpal dentin of deciduous teeth. *Ann Clin Lab Sci.* 1984; 14(4): 270-5.
- Grandjean P, Lyngbye T, Hansen ON. Lead concentration in deciduous teeth: variation related to tooth type and analytical technique. *J Toxicol Environ Health.* 1986; 19(3): 437-44.
- Grobler SR, Theunissen FS, Kotze TJ. The relation between lead concentration in human dental tissues and in blood. *Arch Oral Biol.* 2000;45:607-609.
- Gulson BL. Tooth analyses of sources and intensity of lead exposure in children. *Environ Health Perspect.* 1996;104:306-312.
- Gulson BL, Gillings BR: Lead exchange in teeth and bone--a pilot study using stable lead isotopes. *Environ Health Perspect.* 1997;105:820.
- Gwiazda R, Campbell C, Smith D: A noninvasive isotopic approach to estimate the bone lead contribution to blood in children: implication for assessing the efficacy of lead abatement. *Environ Health Perspect.* 2005;113:104.

Haavikko K, Anttila A, Helle A, Vuori E. Lead concentrations of enamel and dentine of deciduous teeth of children from two Finnish towns. *Arch Environ Health*. 1984;39:78-84.

Hu H, Rabinowitz M, Smith D. Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: conceptual paradigms. *Environ Health Perspect*. 1998;106:1-8.

Hu H, Shih R, Rothemberg S, Schwartz BS. The epidemiology of lead toxicity in Adults: measuring dose and consideration of other methodologic issues. *Environ Health Persp*. 2007;115(3):455-62.

Jacobs DE, Clickner RP, Zhou JY, Viet SM, Marker DA, Rogers JW, et al. The prevalence of lead-based paint hazards in U.S. housing. *Environ Health Perspect*. 2002; 110:A599-A606.

Kang D, Amarasiriwardena D, Goodman AH. Application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp. *Anal Bioanal Chem*. 2004; 378: 1608-15.

Karahalil B, Aykanat B, Ertas N, Dental lead levels in children from two different urban and suburban areas of Turkey. *Int J Hyg Environ Health*. 2007; 210(2): 107-12.

Landrigan PJ, Baloh RW, Barthel WF. Neuropsychological dysfunction in children with low level lead absorption. *Lancet*. 1975; 1:708-12.

Lanphear BP, Matte TD, Rogers J, Clickner RP, Dietz B, Bornschein RL et al. The contribution of lead-contaminated house dust and residential soil to children's blood lead levels. A pooled analysis of 12 epidemiologic studies. *Environ Res*. 1998; 79(1): 51-68.

Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C. Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dL in US children and adolescents. *Public Health Rep*. 2000; 115(6): 521-9.

Lappalainen R, Knuutila M. The distribution and accumulation of Cd, Zn, Pb, Cu, Co, Ni, Mn and K in human teeth from five different geological areas of Finland. *Arch Oral Biol*. 1979; 24(5): 363-8.

Lazzari E P. Dental Biochemistry. Lea and Keliger, Philadelphia; 1976, p.7-8.lead still linger. Available from:<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fdalead.html> [Accessed 2006 Oct 23].

Lin-Fu JS. Health effects of lead, an evolving concept. In: Mahaffey KR, editor. *Dietary and environmental lead: human health effects*. Amsterdam: Elsevier; 1985;7:58-9.

Maas RP, Patch SC, Parker AF. An assessment of lead exposure potential from residential cutoff valves. *J Environ Health*. 2002; 65:9-14.

Mackie AC, Stephens R, Townshend A. Tooth lead levels in Birmingham children. *Arch Environ Health*. 1977; 32(4): 178-85.



- Manay N, Alonzo C, Dol I. Contaminación por plomo en el barrio La Teja; Montevideo, Uruguay. *Salud Publ Mex.* 2003; 45: s268-s75.
- Manuais de Legislação Atlas: Segurança e Medicina do Trabalho, vol. 16 (ed 36). São Paulo, Editora São Paulo Atlas, 1997.
- Molina G.F, Costa de Almeida GR, Souza-Guerra C, Cury J.A, Almeida AP, Barroso R.C, Gerlach R.F. Distribution of lead in artificially induced caries using  $\mu$ SRXRF. *Caries Res.* no prelo, 2010.
- Needleman HL, Tuncay OC, Shapiro IM. Lead Levels in deciduous teeth of urban and suburban American children. *Nature.* 1972;235:11-112.
- Needleman HL, Davidson I, Sewell EM, Shapiro IM. Subclinical lead exposure in Philadelphia schoolchildren. Identification by dentine lead analysis. *N Engl J Med.* 1974;290:245-248.
- 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.* 1979;300:689-695.
- Needleman H L, Bellinger D. The health effects of low level exposure to lead. *Annu Rev Public Health.* 1991;12:111-140.
- Needleman HL. Salem comes to the National Institutes of Health: notes from inside the crucible of scientific integrity. *Pediatrics.* 1992;90:977-981.
- Needleman HL, Riess JA, Tobin MJ, Biesecker GE, Greenhouse JB. Bone lead levels and delinquent behavior. *J Am Med Assoc.* 1996;275:363-9.
- Needleman HL, McFarland C, Ness RB, Fienberg SE, Tobin MJ. Bone lead levels in adjudicated delinquents. A case control study. *Neurotoxicol Teratol* 2002; 24:711-7.
- Needleman H. Lead poisoning. *Annu Rev Med.* 2004; 55:209-22.
- Nevin R. Understanding international crime trends: the legacy of preschool lead exposure. *Environ Res* 2007; 104: 315-36.
- Nie H, Chettle D, Luo L, O'Meara J. Dosimetry study for a new in vivo X-ray fluorescence (XRF) bone lead measurement system. *Nuclear Instr Meth Physics B.* 2007;225-230.
- Nriagu. Lead Poisoning in Antiquity. *Sun Circles and Human Hands* 1968:94-102. O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. V: Lead absorption and disposition in childhood. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995;131:297-308.
- Nriagu J, Burt B, Linder A, Ismail A, Sohn W. Lead levels in blood and saliva in a low-income population of Detroit, Michigan. *Int J Hyg Environ Health.* 2006; 209(2): 109-21.
- Olympio KPK, Gonçalves C, Günther WMR, Bechara EJH, Neurotoxicity and aggressiveness triggered by low-level lead in children – a review. *Rev Panam Salud Publica.* 2009 ;26(3):266-75.

Paoliello MMB. Human lead exposure in mining areas, Vale do Ribeira, Brazil [tese]. Campinas:Universidade Estadual de Campinas; 2002

Paoliello MMB, Capitani EM. Chumbo. In: Azevedo FA, Chasin AM. Metais: gerenciamento da toxicidade. São Paulo: Atheneu Inter Tox. 2003. p. 359-60.

Paoliello MM, De Capitani EM. Environmental contamination and human exposure to lead in Brazil. *Rev Environ Contam Toxicol*. 2005; 184: 59-96.

Parsons PJ, Reilly AA, Hussain A. Observational study of erythrocyte protoporphyrin screening test for detecting low lead exposure in children: impact of lowering the blood lead action threshold. *Clin Chem*. 1991;37(2):216-25.

Parsons PJ, Slavin W. A rapid Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometric method for the determination of lead in blood. *Spectrochim Acta B* 1993;48:925-39.

Parsons PJ, Reilly AA, Esernio-Jenssen D. Screening children exposed to lead: an assessment of the capillary blood lead fingerstick test. *Clin Chem*. 1997;43:302-311.

Paterson LJ, Raab GM, Hunter R, Laxen DP, Fulton M, Fell GS, Halls DJ, Sutcliffe P. Factors influencing lead concentrations in shed deciduous teeth. *Sci Total Environ*. 1988; 74: 219-33.

Perino J, Ernhart CB. The relation of subclinical lead level to cognitive and sensorimotor impairment in black preschoolers. *J Learn Disabil*. 1974; 7:26-30.

Pfrieme F.Über den Normalen und Pathologischen Bleigehalt der Zahne von Menschen und Tieren, *Arch J Hyg*. 1934:111:323.

Pirkle JL, Brody DJ, Gunter EW, Kramer RA, Paschal DC, Flegal KM, et al. The decline in blood lead levels in the United States: the National Health and Nutritional Examination Surveys (NHANES). *JAMA, J Am Med Assoc*.1994; 272:284-91.

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*. 1986; 52(3): 239-50.

Rabinowitz MB, Leviton A, Bellinger DC. Blood lead--tooth lead relationship among Boston children.*Bull Environ Contam Toxicol*. 1989 Oct;43(4):485-92.

Rabinowitz M B. Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect* 1990;91:33-37.

Rabinowitz M B, Bellinger D, Leviton A, Wang J D. Lead levels among various deciduous tooth types. *Bull Environ Contam Toxicol* 1991;47:602-608.

Rabinowitz MB, Leviton A, Bellinger D: Relationships between serial blood lead levels and exfoliated tooth dentin lead levels: models of tooth lead kinetics. *Calcif Tissue Int* 1993;53:338.

- Rabinowitz M B. Relating tooth and blood lead levels in children. *Bull Environ Contam Toxicol* 1995;55:853-857.
- Rabinowitz MB. Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect*. 1991; 91: 33-7.
- Rhoads GG, Ettinger AS, Weisel CP, Buckley TJ, Goldman KD, Lioy PJ. The effect of dust lead control on blood lead in toddlers: a randomized trial. *Pediatrics* 1999; 103:551-5.
- 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*. 2005;99:169-176.
- Robinson C, Kirkham, J., Brookes, S.J, and Roger, C.S. Chemistry of Mature Enamel. In *Dental Enamel: formation to destruction* (C. Robinson, J. Kirkham, and R. Shore, Eds.), 1st ed, CRC Press, London. 1995: 167-188.
- Rust SW, Kumar P, Burgoon DA, Niemuth NA, Schultz BD. Influence of bone-lead stores on the observed effectiveness of lead hazard intervention. *Environ Res*. 1999 81:175-184.
- Ryan JA, Scheckel KG, Berti WR, Brown SL, Casteel SW, Chaney RL et al. Reducing children's risk from lead in soil. *Environ Sci Technol*. 2004; 38(1): 18-24.
- Santos Filho E, Souza e Silva R, Barretto HHC, Inomata ONK, Lemes VRR, Sakuma AM, et al. Concentrações sanguíneas de metais pesados e praguicidas organoclorados em crianças de 1 a 10 anos. *Rev Saúde Pública*. 1993; 27:59-67.
- Saper RB, Phillips RS, Sehgal A, Khouri N, Davis RB, Paquin J et al. Lead, mercury, and arsenic in US- and Indian-Manufactured ayurvedic medicines sold via the internet. *J Am Med Assoc*. 2008; 300:915-23
- Schwartz BS, Hu H. Adult lead exposure: time for change. *Environ Health Persp* 2007;115(3):451-4.
- Shapiro I M, Needleman H L, Tuncay O C. The lead content of human deciduous and permanent teeth. *Environ Res*. 1972;5:467-470.
- Silvany-Neto AM, Carvalho FM, Chaves MEC, Brandão AM, Tavares TM. Repeated surveillance of lead poisoning among children. *Sci Total Environ* 1989; 78: 179-86.
- Smith M, Delves T, Lansdown R, Clayton B, Graham P. The effects of lead exposure on urban children: the Institute of Child Health/Southampton Study. *Dev Med Child Neurol Suppl*, 1983. 47: p. 1-54.
- Smith DR, Osterloh JD, Flegal AR. Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. *Environ Health Perspect*. 1996; 104(1): 60-6.
- Smith DR, Ilustre RP, Osterloh JD. Methodological considerations for the accurate determination of lead in human plasma and serum. *Am J Ind Med*. 1998; 33(5): 430-8.

Stewart D J. Teeth as indicators of exposure of children to lead. *Arch Dis Child* 1974;49:895-897.

Tavares, T.M. Avaliação de e feitos das emissões de cádmio e chumbo em Santo Amaro, BA [tese]. São Paulo: Instituto de Química – USP; 1990.

Tornton I; Davies DJA; Watt JM; Quinn MJ. Lead exposure in Young children from dust and soil in the United Kingdom. *Environ Health Perspect.* 1990; 89:55-60.

Tvinnereim HM, Eide R, Riise T. Heavy metals in human primary teeth: some factors influencing the metal concentrations. *Sci Total Environ.* 2000; 255(1-3): 21-7.

United States. Environmental Protection Agency. National primary drinking water regulations: consumer confidence; proposed rule, in CFR 1998; 40:141-142. Available from: <http://www.regulations.gov/fdmspublic/component/main> [Accessed 2007 Jan 24].

United States. Environmental Protection Agency. National primary drinking water regulations: consumer confidence; proposed rule, in CFR1998; 40:141-142. Available from:<http://www.regulations.gov/fdmspublic/component/main> [Accessed 2007Jan 24].

United States. Food and Drug Administration. FDA consumer. Dangers of lead still linger. Available from:<http://www.cfsan.fda.gov/~dms/fdalead.html> [Accessed 2006 Oct 23].

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.*2003;19:1413-1416.

Vannoccio B. *The Pirotchnia*. Cambridge Mit Press. 1966:55.

Warren C. *Brush with Death: a social history of lead poisoning*. 1<sup>st</sup> ed. The Johns Hopkins Paperbacks;2000.

Weidmann SM, Weatherell JA, Hamm SM: Variations of enamel density in sections of human teeth. *Arch Oral Biol.* 1967;12:85.

World Health Organization: Regional Office for Europe: air quality guidelines. Geneve, Switzerland, World Health Organization, 1986.

Wright JP, Dietrich KN, Ris D, Hornung RW, Wessel SD, Lanphear BP, et al. Association of prenatal and childhood blood lead concentrations with criminal arrests in early adulthood. *PLOS Med* 2008; 5: 732-40.

Xenophon O. *Early American:Lead Compounds*.Dover Publication.1968:108-134.

Yiin LM, Rhoads GG, Liroy PJ. Seasonal influences on childhood lead exposure. *Environ Health Perspect.*2000; 108:177-82.

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

## ANEXOS

### ANEXO A – Aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

 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/311/FORP

Ribeirão Preto, 20 de setembro de 2007.


Prezado (a) Pesquisador (a),

**Ref.: Processo nº 2007.1.1016.58.8**  
**Caae n. 0045.0.138.000-07**

De ordem da Senhora Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade, informamos que o referido Comitê, em sua 81ª Sessão, realizada no dia 20 de setembro de 2007, **aprovou** o Projeto de Pesquisa envolvendo seres humanos intitulado: **"Comparação da concentração de chumbo e outros metais em esmalte e dentina de dentes de diferentes procedências"**, a ser desenvolvido por Vossa Senhoria na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, devendo o atestado para publicação final ser expedido pelo Comitê de Ética em Pesquisa, após a entrega e aprovação do Relatório Final pelo referido Comitê.

Na oportunidade, esclarecemos que o **Relatório Parcial** deverá ser encaminhado à Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa até o dia **30 de setembro de 2008**, e o **Relatório Final** até o dia **30 de outubro de 2009**, acompanhados do Formulário que se encontra no *site* da FORP/USP (*link*: Colegiados e Comissões - Comitê de Ética em Pesquisa - Formulários 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 Morfologia, Estomatologia e Fisiologia - FORP/USP

GDR/bgcp

---

Secretária do Comitê de Ética em Pesquisa - Glauce Della Rosa - e-mail: glauce@forp.usp.br

**ANEXO B-** Termo de Doação de Dentes

**UNIVERSIDADE E SÃO PAULO  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO**

***Banco de Dentes Humanos***



**TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES**

Eu, \_\_\_\_\_ portador(a) do RG \_\_\_\_\_,

Cirurgiã(o)-dentista, CRO \_\_\_\_\_, consultório situado \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

telefone \_\_\_\_\_, dê o(s) dente(s) \_\_\_\_\_

para o BANCO DE DENTES HUMANOS DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO – SP, declarando que este(s) dente(s) foi (foram) extraídos por indicação terapêutica, durante os anos anteriores de trabalho, cujos históricos fazem parte dos prontuários dos pacientes de quem se originam, arquivados sob minha responsabilidade. Estou ciente de que estes dentes serão utilizados para a realização de pesquisas previamente aprovadas pelo comitê de ética em pesquisa ou em atividades didáticas no processo de ensino-aprendizagem da odontologia.

Ribeirão Preto, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

Assinatura



## 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<sup>☆, ☆ ☆</sup>

Glauce Regina Costa de Almeida<sup>a</sup>, Carolina de Souza Guerra<sup>a</sup>, José Eduardo Tanus-Santos<sup>b</sup>,  
Fernando Barbosa Jr.<sup>c</sup>, Raquel Fernanda Gerlach<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Morphology, Stomatology and Physiology, Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo–FORP/USP, Av. do Café,  
S/JN, Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>b</sup>Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo–FMRP/USP, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, CEP  
14049-900, Ribeirão Preto, SP, Brazil

<sup>c</sup>Department of Clinical Analysis, Toxicology and Bratology, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo–FCFRP/  
USP, Av. do Café, S/JN, Monte Alegre, CEP 14040-903, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Received 19 June 2007; received in revised form 8 November 2007; accepted 2 January 2008  
Available online 4 March 2008

---

### Abstract

In a previous study, we showed 4 times more lead in surface deciduous enamel (1.9–5.9 μm) of a notoriously contaminated area (Bauru, São Paulo State, Brazil) in comparison to samples from a region with no lead contamination described (Ribeirão Preto, São Paulo State, Brazil). The samples from the more superficial enamel (1.9–3.18 μm) showed higher amounts of lead and the highest variability, while in the subsurface enamel (3.18–5.9 μm) a plateau in lead content was detected in children living in the contaminated environment (around 600 μg/g). Here we expand our previous study, and use only samples obtained from subsurface enamel (Ribeirão Preto,  $n = 186$ ; Bauru,  $n = 20$ ). We tried to distinguish regions with more children with lead above the threshold of 600 μg/g of lead in enamel. We tested whether differences in the percentage of children with “high” lead ( $\geq 600$  μg/g) could be observed among the different Kindergartens studied in Ribeirão Preto. We also tested whether these results were different from the ones provided by conventional comparison of the data. Ribeirão Preto showed almost 4 times less lead than Bauru ( $p < 0.0001$ ), and a statistically significant difference was found only in Ribeirão Preto between Kindergarten 2 and 5 ( $p < 0.01$ ). Twelve percent of the children from Ribeirão Preto had “high” lead, while 55% of the children from Bauru did so. However, when we looked at the percentages of children with “high” lead in each Kindergarten, and compared them, a whole new picture emerged, in which we could see children with “high” lead concentrated mainly in 3 Kindergartens from Ribeirão Preto, with Kindergarten 5 with 33% of the children with “high” lead, being statistically different from all Kindergartens, except 4 and 6. The threshold of 600 μg/g of lead in subsurface enamel was tentatively settled here after the plateau seen in exposed children, and enabled us to identify locations with more children exposed to a higher amount of lead.

© 2008 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Lead; Enamel; Deciduous teeth; Enamel biopsy; Plateau

---

### 1. Introduction

Needleman demonstrated in many studies that teeth could be used to assess lead exposure when children with different backgrounds of exposure to lead were compared (Needleman and Bellinger, 1991; Needleman et al., 1972, 1974, 1979, 1990). In some of these studies, lead content in dentine of deciduous teeth was determined, since dentine lead closely represents lead stored in bones, a compartment

<sup>☆</sup> This study was supported by FAPESP, CAPES and CNPq.

<sup>☆☆</sup> The study proposal was submitted to the Committee of Ethics in Research (FORP/USP protocol no. 2003.1.353.58.7), according to Resolution 196/96 of the National Commission of Ethics in Research.

\* Corresponding author. Fax: +55 16 3633 0999.

E-mail address: [rferlach@forp.usp.br](mailto:rferlach@forp.usp.br) (R.F. Gerlach).

of long-term storage (Hu et al., 1998; Todd et al., 1996). Over the past decades, dentine lead content was used in many studies to indicate exposure to lead in archeological, environmental and epidemiological studies (Grandjean and Jorgensen, 1990; Gulson, 1996; Rabinowitz et al., 1993). However, what dentine lead levels are associated with different degree of exposure or degree of neurological damage remains to be determined. The main disadvantage of deciduous teeth dentine as a biomarker of exposure to lead is the need to collect large numbers of teeth from a population and the laboratory steps necessary to gain access to inner dentine. While dentine lead levels can only be determined in shed deciduous teeth, lead content of enamel can be estimated in samples obtained by a clinical procedure that is easily performed in 4–6-year-old children. The use of this procedure enables researchers to gain access to lead content data of surface enamel of a large number of children from a population (when parents are appropriately informed on the procedure, and give their informed consent). Recent studies of our group using this procedure to obtain superficial samples of deciduous enamel (Almeida et al., 2007; Gomes et al., 2004) coincide with a new interest in the use of enamel as a marker of exposure to lead (Barbosa et al., 2005; Ericson, 2001 Rinderknecht et al., 2005; Uryu et al., 2003). However, details on how lead accumulates in surface enamel are not known, particularly in deciduous surface enamel, and this precludes the development of a strategy to use deciduous enamel as a marker of exposure to lead.

Lead is found in higher levels in surface enamel, and a gradient has been described in permanent human teeth, with lead levels steadily decreasing from surface to inner enamel (Arora et al., 2005; Brudevold et al., 1977; Brudevold and Steadman, 1956; Purchase and Fergusson, 1986). Some studies showed a relationship between the lead in surface enamel and environmental lead exposure in permanent teeth (Cleymaet et al., 1991a–e) and in deciduous teeth (Almeida et al., 2007; Gomes et al., 2004). These studies reported lead concentration in surface enamel in agreement with the environment where people lived.

In a previous study we described how lead accumulates in surface deciduous enamel (1.9–5.9  $\mu\text{m}$ ). These data were collected *in vivo* from a large sample size ( $n = 247$ , children from Ribeirão Preto, a city with no record of environmental lead contamination, and  $n = 26$ , children from Bauru, which lived in an area notoriously contaminated with lead). In each of these children (4–6 years old) one enamel microbiopsy was done in one upper deciduous incisor, and the sample obtained was used for determination of lead and phosphorus. Samples from both regions were stratified in categories of close biopsy depths based on the biopsy depth quartiles. Median lead contents were statistically different when Ribeirão Preto (206  $\mu\text{g/g}$ ) was compared with Bauru (786  $\mu\text{g/g}$ ) ( $p < 0.0001$ ), whereas biopsy depth was not different (3.9  $\mu\text{m}$  in Ribeirão Preto and 3.8  $\mu\text{m}$  in Bauru). Pearson's correlation coefficient

between biopsy depth and  $\log_{10}$  of lead content was  $-0.29$  (Ribeirão Preto) and  $-0.18$  (Bauru). Differences in lead content were statistically significant between the children living in Ribeirão Preto and Bauru in all quartiles of biopsy depth, showing that the lead accumulation in deciduous teeth surface enamel is related to the environment where people live, and, in contrast to permanent teeth, lead does not show a steady decrease in lead content in the subsurface enamel (Almeida et al., 2007). In that study we described a *plateau* in lead content in subsurface deciduous enamel ( $\geq 3.18 \mu\text{m}$  depth) of children living in an area notoriously contaminated with lead. This *plateau* appeared because lead values medians from the three groups of deepest biopsies (3.18–5.9  $\mu\text{m}$ ) were all close to 600  $\mu\text{g}$  of lead per g of enamel in children from the contaminated area, while these lead values medians steadily decreased in the children living in the apparently non-contaminated city (from 278 to 121  $\mu\text{g/g}$ ). Since the outermost enamel has direct contact with saliva, and is probably the most susceptible area of enamel to small fluctuations in lead contents over time, we thought that this subsurface enamel (3.18–5.9  $\mu\text{m}$ ) might be analyzed separately, and that the *plateau* might be a useful indication of the exposure of a child or group of child to lead.

Therefore, the aim of this study was to test whether we would find different results of lead in enamel from the children from seven Kindergartens from Ribeirão Preto, SP, Brazil, by distributing the children as having “high” or “low” exposure to lead based on the cut-off value of 600  $\mu\text{g/g}$  of lead in enamel.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sample population

The data analyzed in this study comprise enamel subsurface samples from deciduous teeth collected *in vivo* from 4- to 6-year-old children living in Ribeirão Preto, SP, Brazil ( $n = 186$ ) and Bauru, SP, Brazil ( $n = 20$ ). While Ribeirão Preto is a city in which no contamination with lead has been described so far (either in scientific journals or by the local health authorities), the sample population in Bauru was selected in the area nearby a battery plant that worked until January 29, 2002, which heavily contaminated the environment (de Freitas et al., 2007). Further details on the study design, population and chemical analysis of lead and phosphorus are found in our previous work (Almeida et al., 2007). Briefly, a sample from surface enamel was obtained by a microbiopsy technique (Gomes et al., 2004), and lead was expressed as  $\mu\text{g/g}$  of enamel, and enamel mass was calculated assuming an enamel density of 2.95  $\text{g/cm}^3$  and a phosphorus content of 17.4% (Koo and Cury, 1998; Weidmann et al., 1967). Only samples with phosphorus determined in triplicate were included in the analysis. Data for lead and phosphorus were initially obtained from 247 children from Ribeirão Preto and 26 children from Bauru, and the data were stratified according to quartiles of biopsy depths. Since lead levels are extensively described in the literature to accumulate in surface enamel, no normal distribution of lead contents was expected (nor found) in relation to biopsy depth, and therefore initially median and quartile values were described, as well as non-parametric statistics used for comparisons. A steady decrease in lead content medians was seen in samples from the Ribeirão Preto children from the outer to the inner quartile of biopsy depth, while a *plateau* was observed in lead content medians from the Bauru children in the subsurface enamel (3.18–5.9  $\mu\text{m}$ ),



which remained close to 600 µg/g. We decided therefore to expand our previous analysis by concentrating on the samples derived from this subsurface region (quartiles 2–4 of biopsy depth from the previous study), which might harbor more relevant information on the exposure of the children to lead. We decided to use 600 µg/g as a cut-off point to classify the children as having high or low lead contents.

In the present analysis, we tested whether differences in the percentage of children with lead  $\geq 600$  µg/g in subsurface enamel could be observed among the different Kindergartens studied in Ribeirão Preto, and how these results are different from the conventional analysis. Therefore, only samples from the previous study obtained in depths from 3.18 to 5.9 µm were used for analysis throughout this study, and for simplicity purposes, we will refer to this depth interval as “subsurface enamel”.

## 2.2. Statistical analysis

Statistical analyses were performed using the Graph Pad Prism (Version 3.0). Initially, we tested whether lead contents in subsurface enamel showed normal distribution. Since all data passed normality test, parametric statistics was used throughout this study. A probability level of 5% was considered statistically significant. Differences in lead content in subsurface enamel between each of the seven Kindergartens of Ribeirão Preto and Bauru were tested by Anova followed by the Dunnett's Multiple Comparison Test, and differences in lead content among all Kindergartens (1–7) of Ribeirão Preto, by Anova followed by the Bonferroni's Multiple Comparison Test. Moreover, we used *t*-test to compare lead content between the two cities. For comparison of the percentages of children with lead in subsurface enamel  $\geq 600$  µg/g between the two cities and between each of the Kindergartens from Ribeirão Preto and Bauru, we used chi-square test. The number of comparisons was 35, so we divided the alpha value by this value. Pearson's correlation analysis was done for Ribeirão Preto and Bauru to test the correlation between the lead concentration and biopsy depth.

## 3. Results

### 3.1. Mean lead contents found in the subsurface of enamel

The number of children (*n*), median, minimum and maximum values of lead concentration in subsurface enamel from each Kindergarten of Ribeirão Preto and the study population of Bauru are shown in Table 1. Fig. 1 shows mean lead values (µg/g) found in subsurface enamel (3.18–5.9 µm) in children from Ribeirão Preto and Bauru. When we compared the mean lead content among the

Table 1

Lead concentrations (µg/g) in subsurface deciduous enamel biopsies performed in children from Ribeirão Preto (*n* = 186) and Bauru (*n* = 20), São Paulo State, Brazil (2004)

Location	Kindergarten	<i>n</i>	Median	Q1–Q3	Min–Max
Ribeirão Preto	1	20	270	177–417	22–567
	2	38	118	88–167	16–1146
	3	24	165	117–246	90–450
	4	29	172	108–323	18–1229
	5	27	276	176–740	30–1090
	6	35	163	94–477	5–1335
	7	13	309	226–472	8–919
	All kindergartens	186	177	112–338	5–1335
Bauru		20	615	483–1490	320–4712

Q1 = first quartile, Q3 = third quartile.

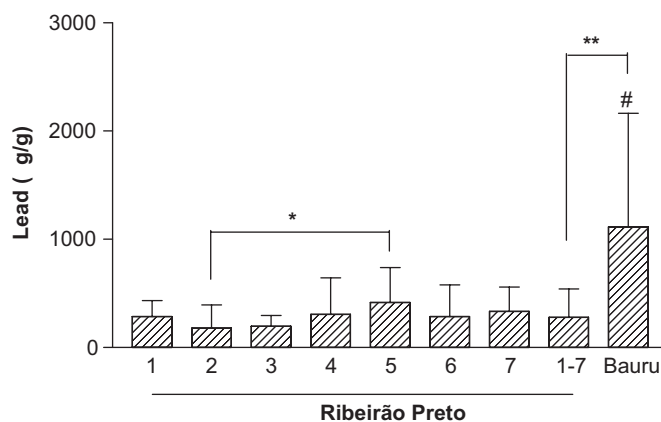


Fig. 1. Lead content (µg/g) in subsurface enamel in children from each Kindergarten of Ribeirão Preto (*n* = 186) and Bauru (*n* = 20), State of São Paulo, Brazil (2004). #*p* < 0.001 vs. all groups from Ribeirão Preto; \**p* < 0.01; \*\**p* < 0.0001.

seven Kindergartens in Ribeirão Preto, we found a statistically significant difference between Kindergarten 2 and 5 (*p* < 0.01). When any of the Kindergartens from Ribeirão Preto was compared with Bauru, all differences were statistically significant (*p* < 0.001), and when all children from Ribeirão Preto were compared with Bauru, the difference was highly significant (*p* < 0.0001). The mean lead content found in the Bauru population was 1115 and 286 µg/g in the children from Ribeirão Preto (3.89 times more lead in subsurface enamel of children living in the contaminated area). Removal of the data from the shallowest biopsies did not change this result, since a similar ratio was found in our previous study.

### 3.2. Percentage of children with lead content $\geq 600$ µg/g

Fig. 2 shows the percentage of children with lead values  $\geq 600$  and < 600 µg/g from each of the 7 Kindergartens from Ribeirão Preto, from all children from Ribeirão Preto (1–7) and from the children from Bauru. Six of the seven Kindergartens from Ribeirão Preto showed between 0% and 17.2% of children with lead contents  $\geq 600$  µg/g. Only one Kindergarten of Ribeirão Preto (number 5) had a much higher percentage of children with lead content  $\geq 600$  µg/g (33.3%). Bauru showed the highest percentage of children (55%) with  $\geq 600$  µg/g of lead in subsurface enamel. In Ribeirão Preto (sum of all Kindergartens) the percentage of the children showing lead values  $\geq 600$  µg/g was  $\approx 12\%$ , a value statistically different from the one found in Bauru (*p* < 0.0001). This figure indicates that a high percentage of children with high lead content in subsurface enamel may go undetected when conventional presentation of data is used. Comparison of differences in percentages of children with lead in the subsurface enamel values  $\geq 600$  µg/g are shown in Table 2. A total of 35 comparisons were performed using chi-square test. Adopting Bonferroni's correction, the alpha value becomes 0.0014. Therefore, Bauru is different from all

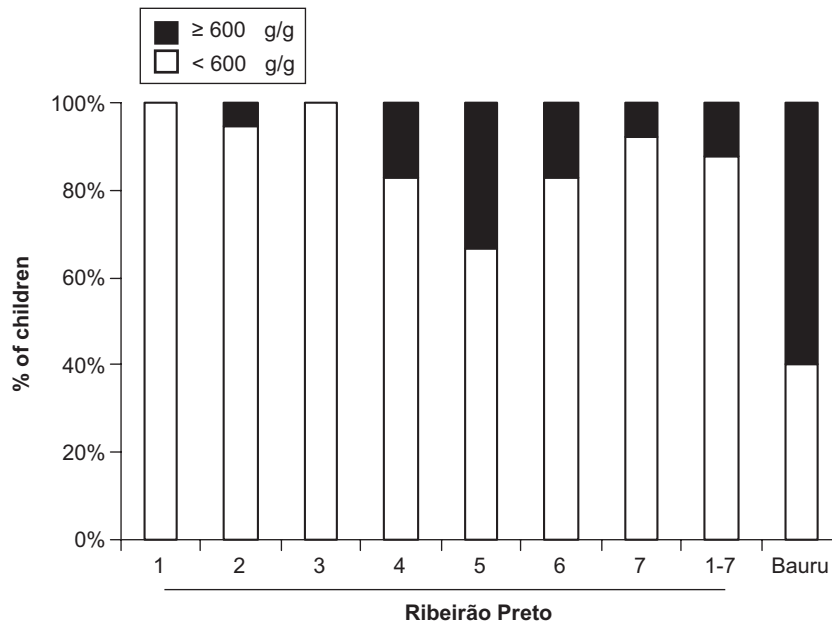


Fig. 2. Percentages of children distributed according to lead values  $\geq 600$  or  $< 600$   $\mu\text{g/g}$  in biopsies deeper than  $3.18\ \mu\text{m}$  in Kindergartens of Ribeirão Preto ( $n = 186$ ) and Bauru ( $n = 20$ ), State of São Paulo, Brazil (2004).

Table 2

Probability values for differences in percentage of children with lead content values  $\geq 600$  or  $< 600$   $\mu\text{g/g}$  among all Kindergartens in Ribeirão Preto (1–7) and Bauru, São Paulo State, Brazil (2004)

	1	2	3	4	5	6	7	1–7	Bauru
1		0.0235	1.0000	$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$	0.0039	0.0004	$< 0.0001$
2			0.0235	0.0067	$< 0.0001$	0.0067	0.3895	0.0759	$< 0.0001$
3				$< 0.0001$	$< 0.0001$	$< 0.0001$	0.0039	0.0004	$< 0.0001$
4					0.0090	1.0000	0.0543	0.3153	$< 0.0001$
5						0.0090	$< 0.0001$	0.0004	0.0001
6							0.0543	0.3153	$< 0.0001$
7								0.3458	$< 0.0001$

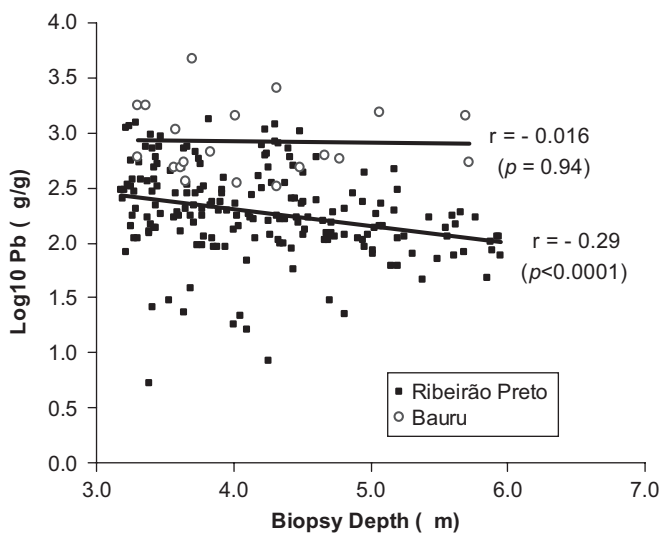


Fig. 3.  $\text{Log}_{10}$  of lead concentration *versus* etch depths of enamel biopsies deeper than  $3.18\ \mu\text{m}$  in population from Ribeirão Preto and Bauru, São Paulo, Brazil (2004).

Kindergartens from Ribeirão Preto (1–7) as well as from the sum of all children from Ribeirão Preto (1–7). Overall, it becomes clear that Kindergartens 4, 5, and 6 are different from most of the others.

### 3.3. Lead concentration and biopsy depth

Fig. 3 shows the correlation between lead content ( $\text{log}_{10}$ ) and biopsy depth in children from Ribeirão Preto and Bauru. Pearson's correlation analysis showed a coefficient of  $-0.29$  ( $p < 0.0001$ ) for Ribeirão Preto and  $-0.016$  ( $p = 0.94$ ) for Bauru.

## 4. Discussion

In this study we expand our previous analysis of lead in surface enamel samples collected from 4- to 6-year-old children in two locations with different backgrounds of exposure to lead. Specifically, we analyzed only samples from the subsurface enamel ( $3.18$ – $5.9\ \mu\text{m}$ ). The main idea

behind this new analysis was to test whether a *plateau* in lead in subsurface enamel would indicate Kindergartens with a higher percentage of children with more lead in teeth in comparison with the conventional comparison of means or medians between groups of children.

The first aspect of note is the normalization of the data in this analysis. The major factor that contributed to this change appears to be the removal of the data from more superficial enamel, in which a higher content of lead (and also a higher variation) is described (Anttila, 1987a,b; Fergusson and Purchase, 1987; Gil et al., 1994; Shapiro et al., 1972). Conventional analysis showed only statistically significant differences between Kindergartens 5 and 2. Even though in comparisons involving Kindergarten 7 type II error cannot be ruled out, it seems that the small sample would not explain the lack of difference found between other Kindergartens. By observing Fig. 2 a very different picture emerges, showing that Kindergarten 5 has more children (33.3%) with lead  $\geq 600 \mu\text{g/g}$  in comparison to the other Kindergartens from Ribeirão Preto. Children from Kindergartens 4 and 6 may also be at risk. We also checked whether Kindergarten 5 had changes in other parameters (dental caries, dental defects or biopsy depth), but this was not the case (results not shown). The use of the *plateau* of lead in subsurface enamel around  $600 \mu\text{g/g}$  as a cut-off-point to separate children as having “high” or “low” lead content allowed us to find differences in the degree of exposure of children and suggests the need to investigate sources of exposure to lead in the regions of Kindergartens 4, 5, and 6 from Ribeirão Preto, SP. This threshold does not indicate a maximum value of incorporation of lead, since this incorporation seems to depend on the degree of exposure of children.

Another interesting aspect of the incorporation of lead into enamel comes from the observation that not only medians from biopsies from  $3.18$  to  $5.9 \mu\text{m}$  seem to *plateau* around  $600 \mu\text{g/g}$ , but also the 75th percentile values is very close to  $1400 \mu\text{g/g}$ . But *in vitro* studies in teeth from regions with different histories of lead contamination and population studies with larger sample sizes will reveal details on the exact amount of lead found in different depths in deciduous teeth.

A peculiar aspect of deciduous subsurface enamel is further highlighted here: the inverse correlation of lead in the surface enamel and biopsy depth shown in our previous study was  $-0.29$  (Pearson's correlation coefficient) in Ribeirão Preto, using data from all depths, and was the same in this analysis in which the shallowest samples were removed ( $r = -0.29$ ,  $p < 0.0001$ ). As expected from the observation of the *plateau*, the opposite happened with the correlation line in samples from Bauru. While in our previous study, Pearson's correlation analysis resulted in a coefficient of  $-0.18$ , now the  $r$  equaled  $-0.016$  ( $p = 0.94$ ). Also, while there was no difference before when the correlations found in Ribeirão Preto and Bauru were compared, now it is clear that they are different, since there is no correlation in Bauru between the lead content and biopsy depth.

The central area in the labial surface of tooth used to obtain the samples is normally not covered with too much biofilm due to movements of the lips, and so this area is less susceptible to the demineralization and remineralization processes. Currently, we do not know whether lead in the subsurface enamel region described here is of pre- or post-natal origin, or both, and how it accumulates. Nonetheless, independent of the origin of lead, deciduous subsurface enamel appears a good marker to pinpoint children of populations at risk of high exposure to lead.

There is an assumption in this study that tooth enamel mass is calculated based on the actual P content in leachate, using a density of  $2.95 \text{ g/cm}^3$  and a phosphate content of 17.4%. However, it is possible that lead modifies enamel density. There is no data from the density of enamel formed in the presence of lead. So far, studies aimed specifically to test whether lead altered the morphology of enamel formed in the presence of lead showed that enamel is not structurally different in control or lead-exposed animals when fully mature enamel is analyzed (Gerlach et al., 2002). Studies aimed at understanding accumulation of lead in enamel also did not show any morphological alterations (Arora et al., 2005). Finally, analysis by polarized light microscopy of shed deciduous teeth from regions highly contaminated with lead in comparison with teeth from regions with no contamination described also failed to observe differences in the structure of the two groups of teeth (Youravong et al., 2005). A good correlation has been described between enamel birefringence in the polarized light microscopy and mineral content (Theuns et al., 1993), and is also a method that increases the changes of observing morphological alterations of enamel development (Dean, 1998).

In Brazil, as in many developing countries, industrialization occurred some decades after the same processes occurred in the USA and Europe. As in those countries, industrialization is associated in developing countries to increases in the exposure of the population to lead. But, as pointed out by Shen et al. (1998) “this problem (lead poisoning) has not been a subject of concern in most of the developing countries”. In Brazil, no legislation to control lead emissions by industries is in place, and there are no screening tests for lead in blood of newborn, 1- or 2-year-old children, which are the most vulnerable group to neurological damage by exposure to lower levels of lead. In this scenario, we think that our enamel test associated to the use of the  $600 \mu\text{g/g}$  threshold level of lead is an important contribution that can rapidly identify areas at risk. Particularly, in our city Ribeirão Preto, the higher percentage of children with “high” lead in Kindergarten 5 urged an in-depth investigation of the possible causes, and two sites where battery recycling factories had worked for some years were found (and these factories were circa 2.5 km from the homes of some children tested in Kindergarten 5). Furthermore, a pilot study on lead in water showed that the water system of our city has different amounts of lead depending on the region of the

city—whether new or older neighborhoods were tested—with the higher amounts of lead in drinking water found in the older neighborhoods.

From the analysis presented in the study, a “threshold” (600 µg/g) appears to be useful as a content of lead to separate children as having “high” or “low” lead contents. To ascertain its true value, studies on accumulation of lead in enamel will be needed.

## 5. Conclusion

Our results support the existence of a *plateau* in the incorporation of lead in the subsurface of enamel, which can be detected in the first 3.18–5.9 µm of deciduous enamel, and may be used to identify children exposed to higher levels of lead, indicating children and environments in which contamination with lead occurs. This analysis is also very useful because it has a potential to reveal the percentage of children exposed to higher amounts of lead in a population.

## Acknowledgments

We would like to acknowledge Adriana Aziani and Francisco Marcelo Paranhos Pinto for help during the biopsy procedure.

## References

- Almeida, G.R.C., Saraiva, M.C.P., Barbosa, F., Krug, F.J., Cury, J.A., Sousa, M.L.R., Buzalaf, M.A.R., Gerlach, R.F., 2007. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled *in vivo* from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ. Res.* 104, 337–345.
- Anttila, A., 1987a. Trace-element content in the enamel surface and in whole enamel of deciduous incisors by proton-induced X-ray emission of children from rural and urban Finnish areas. *Arch. Oral Biol.* 32, 713–717.
- Anttila, A., 1987b. Lead content of deciduous tooth enamel from a high-radon area. *Acta Odontol. Scand.* 45, 283–288.
- Arora, M., Chan, S.W., Ryan, C.G., Kennedy, B.J., Walker, D.M., 2005. Spatial distribution of lead in enamel and coronal dentine of wistar rats. *Biol. Trace Elem. Res.* 105, 159–170.
- Barbosa Jr., F., Tanus-Santos, J.E., Gerlach, R.F., Parsons, P.J., 2005. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ. Health Perspect.* 113, 1669–1674.
- Brudevold, F., Aasenden, R., Srinivasian, B.N., Bakhos, Y., 1977. Lead in enamel and saliva, dental caries and the use of enamel biopsies for measuring past exposure to lead. *J. Dent. Res.* 56, 1165–1171.
- Brudevold, F., Steadman, L.T., 1956. The distribution of lead in human enamel. *J. Dent. Res.* 35, 430–437.
- Cleymaet, R., Bottenberg, P., Retief, D.H., Slop, D., Michotte, Y., Coomans, D., 1991a. *In vivo* use of a dual acid etch biopsy for the evaluation of lead profiles in human surface enamel. *Caries Res.* 25, 256–263.
- Cleymaet, R., Bottenberg, P., Slop, D., Clara, R., Coomans, D., 1991b. Study of lead and cadmium content of surface enamel of schoolchildren from an industrial area in Belgium. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 19, 107–111.
- Cleymaet, R., Collys, K., Retief, D.H., Michotte, Y., Slop, D., Taghon, E., Maex, W., Coomans, D., 1991e. Relation between lead in surface tooth enamel, blood, and saliva from children residing in the vicinity of a non-ferrous metal plant in Belgium. *Br. J. Ind. Med.* 48, 702–709.
- Cleymaet, R., Quartier, E., Slop, D., Retief, D.H., Smeyers-Verbeke, J., Coomans, D., 1991c. Model for assessment of lead content in human surface enamel. *J. Toxicol. Environ. Health* 32, 111–127.
- Cleymaet, R., Retief, D.H., Quartier, E., Slop, D., Coomans, D., Michotte, Y., 1991d. A comparative study of the lead and cadmium content of surface enamel of Belgian and Kenyan children. *Sci. Total Environ.* 104, 175–189.
- de Freitas, C.U., De Capitani, E.M., Gouveia, N., Simonrtti, M.H., Silva, M.R.P., Sakumaf, A.M., Carvalho, M.F.H., Duran, M.C., Tiglea, P., Abreu, M.H., 2007. Lead exposure in an urban community: investigation of risk factors and assessment of the impact of lead abatement measures. *Environ. Res.* 103, 338–344.
- Dean, M.C., 1998. A comparative study of cross striation spacings in cuspal enamel and of four methods of estimating the time taken to grow molar cuspal enamel in Pan, Pongo and Homo. *J. Hum. Evol.* 35, 449–462.
- Ericson, J.E., 2001. Enamel lead biomarker for prenatal exposure assessment. *Environ. Res.* 87, 136–140.
- Fergusson, J.E., Purchase, N.G., 1987. The analysis and levels of lead in human teeth: a review. *Environ. Pollut.* 46, 11–44.
- Gerlach, R.F., Cury, J.A., Krug, F.J., Line, S.R., 2002. Effect of lead on dental enamel formation. *Toxicology* 175, 27–34.
- Gil, F., Perez, M.L., Facio, A., Villanueva, E., Tojo, R., Gil, A., 1994. Dental lead levels in the Galician population, Spain. *Sci. Total Environ.* 156, 145–150.
- Gomes, V.E., Sousa, M.L.R., Saraiva, M.C.P., Barbosa Jr., F., Krug, F.J., Cury, J.A., Gerlach, R.F., 2004. *In vivo* studies on lead content of enamel surface of deciduous teeth of preschool children. *Sci. Total Environ.* 320, 25–35.
- Grandjean, P., Jorgensen, P.J., 1990. Retention of lead and cadmium in prehistoric and modern human Teeth. *Environ. Res.* 53, 6–15.
- Gulson, B.L., 1996. Tooth analyses of sources and intensity of lead exposure in children. *Environ. Health Perspect.* 104, 306–312.
- Hu, H., Rabinowitz, M., Smith, D., 1998. Bone Lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: conceptual paradigms. *Environ. Health Perspect.* 106, 1–8.
- Koo, R.H., Cury, J.A., 1998. Soluble calcium/SMFP dentifrice: effect on enamel fluoride uptake and remineralization. *Am. J. Dent.* 11, 173–176.
- Needleman, H.L., Bellinger, D., 1991. The health effects of low level exposure to lead. *Annu. Rev. Public. Health* 12, 111–140.
- Needleman, H.L., Davidson, I., Sewell, E.M., Shapiro, I.M., 1974. Subclinical lead exposure in Philadelphia schoolchildren. Identification by dentine lead analysis. *N. Engl. J. Med.* 290, 245–248.
- Needleman, H.L., Gunnoe, C., Leviton, A., Reed, R., Peresie, H., Maher, C., Barrett, P., 1979. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N. Engl. J. Med.* 300, 689–695.
- Needleman, H.L., Schell, A., Bellinger, D., Leviton, A., Allred, E.N., 1990. The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. An 11-year follow-up report. *N. Engl. J. Med.* 322, 83–88.
- Needleman, H.L., Tuncay, O.C., Shapiro, I.M., 1972. Lead levels in deciduous teeth of urban and suburban American children. *Nature* 235, 111–112.
- Purchase, N.G., Fergusson, J.E., 1986. Lead in teeth: the influence of the tooth type and the sample within a tooth on lead levels. *Sci. Total Environ.* 52, 239–250.
- Rabinowitz, M.B., Leviton, A., Bellinger, D., 1993. Relationships between serial blood lead levels and exfoliated tooth dentin lead levels: models of tooth lead kinetics. *Calcif. Tissue Int.* 53, 338–341.
- Rinderknecht, A.L., Kleinman, M.T., Ericson, J.E., 2005. Pb enamel biomarker: deposition of pre- and postnatal Pb isotope injection in reconstructed time points along rat enamel transect. *Environ. Res.* 99, 169–176.

- Shapiro, I.M., Needleman, H.L., Tuncay, O.C., 1972. The lead content of human deciduous and permanent teeth. *Environ. Res.* 5, 467–470.
- Shen, X.M., Yan, C.H., Guo, D., Wu, S.M., Li, R.Q., Huang, H., Ao, L.M., Zhou, J.D., Hong, Z.Y., Xu, J.D., Jin, X.M., Tang, J.M., 1998. Low-level prenatal lead exposure and neurobehavioral development of children in the first year of life: a prospective study in Shanghai. *Environ. Res.* 79, 1–8.
- Theuns, H.M., Shellis, R.P., Groeneveld, A., Van Dijk, J.W.E., Poole, D.F.G., 1993. Relationships between birefringence and mineral content in artificial caries lesion of enamel. *Caries Res.* 27, 9–14.
- Todd, A.C., Wetmur, J.G., Moline, J.M., Godbold, J.H., Levin, S.M., Landrigan, P.J., 1996. Unraveling the chronic toxicity of lead: an essential priority for environmental health. *Environ. Health Perspect.* 104, 141–146.
- Uryu, T., Yoshinaga, J., Yanagisawa, Y., Endo, M., Takahashi, J., 2003. Analysis of lead in tooth enamel by laser ablation—inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal. Sci.* 19, 1413–1416.
- Weidmann, S.M., Weatherell, J.A., Hamm, S.M., 1967. Variations of enamel density in sections of human teeth. *Arch. Oral Biol.* 12, 85–97.
- Youravong, N., Chongsuvivatwong, V., Teanpaisan, R., Geater, A.F., Dietz, W., Dahlén, G., Norén, J.G., 2005. Morphology of enamel in primary teeth from children in Thailand exposed to environmental lead. *Sci. Total Environ.* 348, 73–81.

## ANEXO D- Artigo Publicado

Elsevier Editorial System(tm) for Applied Radiation and Isotopes  
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: X-Ray Fluorescence with Synchrotron Radiation to Elemental Analysis of Lead and Calcium Content of Primary Teeth

Article Type: Full Length Article

Section/Category: Radiation Sources and Applications

Keywords: lead contamination, X-ray fluorescence, synchrotron radiation, calcium, enamel and dentine

Corresponding Author: Professor Regina Cely Barroso, PhD

Corresponding Author's Institution: State University of Rio de Janeiro

First Author: Carolina S Guerra

Order of Authors: Carolina S Guerra; Raquel F Gerlach, DSc; Nivia G Villela Pinto, DSc; Simone C Carsoso, DSc; Silvana Moreira, DSc; André P Almeida; Iza T Alves Peixoto; Carlos H Meloni; Carla L Mota; Luis F Oliveira, DSc; Delson Braz, DSc; Regina Cely Barroso, PhD

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Primary teeth were analyzed by micro-SRXRF. The aim of this study was to determine the elemental distribution of lead and calcium in different regions of primary incisor of children living in a notoriously contaminated area (Santo Amaro da Purificação, Bahia State, Brazil). The measurements were performed in standard geometry of 45° incidence, exciting with a white beam and using a conventional system collimation (orthogonal slits) in the XRF beamline at the Synchrotron Light National Laboratory (Campinas, Brazil).

## **X-Ray Fluorescence with Synchrotron Radiation to Elemental Analysis of Lead and Calcium Content of Primary Teeth**

**Carolina de Souza Guerra<sup>a</sup>, Raquel Fernanda Gerlach<sup>b</sup>, Nívia Graciele Villela Pinto<sup>c</sup>,  
Simone Coutinho Cardoso<sup>d</sup>, Silvana Moreira<sup>e</sup>, André Pereira de Almeida<sup>f</sup>, Iza Teixeira  
Alves Peixoto<sup>a</sup>, Carlos Henrique Meloni<sup>b</sup>, Carla Lemos Mota<sup>f</sup>, Luis Fernando de Oliveira<sup>d</sup>,  
Delson Braz<sup>f</sup>, Regina Cely Barroso<sup>d\*\*</sup>**

<sup>a</sup> Universidade Estadual de Campinas, FOP/UNICAMP, Piracicaba, 13414-903, SP, Brazil.

<sup>b</sup> Universidade de São Paulo, FORP/USP, Ribeirão Preto, 14040-904, SP, Brazil.

<sup>c</sup> Universidade do Estado do Rio de Janeiro, IF/UERJ, Rio de Janeiro, 20550-900, Brazil.

<sup>d</sup> Universidade Federal do Rio de Janeiro, IF/UFRJ, Rio de Janeiro, 21941-972, RJ, Brazil.

<sup>e</sup> Universidade Estadual de Campinas, FEC/UNICAMP, São Paulo, 13083-852, Brazil.

<sup>f</sup> Laboratório de Instrumentação Nuclear; COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, 21941-972, RJ, Brazil.

### **Abstract**

Primary teeth were analyzed by micro-SRXRF. The aim of this study was to determine the elemental distribution of lead and calcium in different regions of primary incisor of children living in a notoriously contaminated area (Santo Amaro da Purificação, Bahia State, Brazil). The measurements were performed in standard geometry of 45° incidence, exciting with a white beam and using a conventional system collimation (orthogonal slits) in the XRF beamline at the Synchrotron Light National Laboratory (Campinas, Brazil).

**Keywords:** lead contamination, X-ray fluorescence, synchrotron radiation, calcium, enamel and dentine

---

\* Corresponding author: R.C. Barroso, e-mail:cely\_barroso@hotmail.com

## **Introduction**

Pollution of the environment by lead affects human health. Particularly young children are at risk because lead adversely affects neuropsychological development (Bellinger et al., 1987, Needleman et al., 1974, Needleman et al., 1979). Whole blood lead test is the most common biomarker of lead exposure and is used in most epidemiological studies, but the amount of lead decreases in blood 40 days after the exposure to lead (Rabinowitz et al., 1973) and cannot therefore be considered as a reliable biomarker for past exposures (Needleman et al., 1979).

Some studies have shown that superficial enamel lead concentration is related to the individual's environmental exposure to lead (Almeida et al., 2007; Almeida, 2008; Gomes et al., 2004), and enamel has been proposed as a biomarker of lead exposure. However, there are many important differences between enamel and dentine, and there is scarce information on the distribution of lead in enamel. When this information is available, enamel may become an important biomarker of exposure to lead, with the important advantage of its accessibility (it is exposed in the mouth).

Some techniques like X-Ray Fluorescence with synchrotron radiation have been used in the determination of the elemental composition of biological materials. There are several advantages of applying XRF analysis using SR microbeams for the investigation of elemental distribution in teeth. The non-destructive characteristic and simple sample preparation requirements decrease the time of analysis and allows repeated analysis, and combination with other analysis. The results of the relative amounts of different elements enables the comparisons of elemental distribution in comparison to the most abundant



ones, for example calcium. Small microbeam size leads to high spatial resolution, and the high brilliance characteristic of the radiation source enables a high efficiency for trace element determination, and short time of analysis (Ide-Ektessabi et al., 2004). This technique is expected to provide sufficient spatial resolution and sensitivity for Pb analysis of enamel. Previous studies show that this method can be useful to determine of the spatial distribution of trace elements in mineralized tissues (Anjos et al., 2004; Farquharson et al, 2008; Hu et al., 1995; Martin et al., 2004;).

Therefore, this study aimed at determining the spatial distribution of lead and calcium in the enamel and dentine of primary teeth donated by children living in an area notoriously contaminated with lead. Emphasis was placed on the very superficial enamel and circumpulpal dentin, since such comparison is essential to understand how valuable the information on enamel's lead concentration is in comparison to the information on lead concentrations found in dentine.

## **Materials and methods**

### **Experimental set-up**

The determination of the elemental composition was performed using SRmicrobeams at the X-Ray Fluorescence beamline (XRF) at Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), in Campinas, Brazil. The measurements were performed in standard geometry, the fluorescence spectrum was recorded with a SiLi detector in air atmosphere. The white beam of a bending magnet source is focussed by a fine conical capillary capable to achieve 20  $\mu\text{m}$  spatial resolution. An optical microscope is used in order to select the region of interest on the sample surface. All the spectra were analyzed

using the Quantitative X-ray Analysis Software (QXAS) package, which is a conventional program for spectrum analysis. Figure 1 show a typical energy SRXRF spectrum of enamel.

### **Sample preparation**

The study proposal was submitted to the Committee of Ethics in Research (FORP/USP approval protocol no.2007.1.1016.58.8), according to the Resolution 196/96 of the National Commission of Ethics in Research. Parents or a guardian had to sign an informed consent prior to engagement of the child in the study.

Exfoliated primary teeth were donated by children living in Santo Amaro da Purificação, Bahia State, Brazil, area of this city was contaminated (mainly soil and dust) as result of a lead ore smelter which operated in this city from 1960 to 1993. Children were asked to bring their primary teeth to the teacher, who then recorded the informed consent signed by parents or guardians.

Five primary incisors donated by children living in contaminated neighborhood were analyzed in this study. The teeth were soaked in hydrogen peroxide for 15 minutes, ultrasonic cleaning in Ultrapure Water for 30 minutes, dried in laminar flow hood at room temperature and stored in an individual container, which was also trace element free. A longitudinal 300  $\mu\text{m}$  thick slice was cut through the center of the tooth crown with a diamond saw, at the buccal-lingual direction. The slice was polished using sand paper with Ultrapure water as a lubricant in order to obtain a smooth and plane surface. The final thickness was around 100  $\mu\text{m}$ . In this analysis only one slice of each tooth was analyzed. Selected areas of the crown of each sample were analyzed by bidimensional (x,

y) scanning. The scan pattern adopted was similar for all samples: from the enamel surface to the circumpulpal dentine by moving the sample in the y-axis and from incisal to cervical edge by moving the sample in the x axis.

### **Results and Discussion**

The sample was positioned in the image plane within an accuracy of 0.5  $\mu\text{m}$  with a 3 axis (x, y, z) remote-controlled stage. The sampling time for each data point is 12 s which allowed samples to be scanned at acceptable time (approximately 6 hours). Automatic 2D scans were performed and element distribution maps were obtained with a matrix size of  $41 \times 40$  pixels resulting in an area of  $2.05 \times 2.0$  mm. selected areas of the crown of each sample were analyzed by bidimensional (x, y) scanning. The scan pattern adopted was similar for all samples: from surface enamel to circumpulpal dentine for y-axis and from incisal to cervical for x axis. The home-made software used to reconstruct the maps was developed at the Physics Institute of the Rio de Janeiro University State. The maps showed that the spatial distributions of Ca and Pb were similar, independently of the donor child. Figure 1 shows, as an example, the maps obtained for calcium and lead.

The analysis by micro-XRF with synchrotron radiation showed that the distribution of lead in primary incisors has a particular pattern with clear differences in the level of lead between different regions of enamel and dentine. The figure 2b shows a decrease in the levels of Ca in dentin in comparison to the Ca levels in the enamel. The results are consistent with the higher amount of calcium found in enamel that it is constituted by 37,4% of calcium, versus 28,2% of calcium found in the human dentin,

(Soremark and Bergman 1961). A similar behaviour was observed for Pb levels distribution showing a higher intensity in the surface enamel for all analyzed samples (figure 2c) (Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et al., 2007).

For each sample, regions of interest were set using pixel coordinates over areas of enamel, dentin and in the dentinoenamel junction (DEJ), which is the limit between the enamel and the underlying dentin. The number of regions for a given sample depend on the shape and size of the crown, but at least two regions in the enamel, one region in the DEJ and two regions in the dentin were analyzed. In this way, a linear scan was performed from surface enamel to circumpulpal dentine. Figure 3 shows the intensity of Pb/Ca ratio as function of the region in a given sample. Figure 4 shows the relative intensity Pb/Ca ratio as a function of the region of interest for all analyzed sample. The results showed that the intensity Pb/Ca ratio decreases from surface enamel to inner dentine.

The hypothesis for high values of Pb/Ca ratio in enamel near the tooth surface is not new, on the other hand, the high concentrations of lead were expected because the children always lived in a contaminated environment.

Santo Amaro da Purificação is a notoriously contaminated area, with descriptions of lead in the soil in the 8000 ppm (Machado et al., 2004). The accumulation of lead in enamel surface probably reflects the amount of time the enamel matrix is exposed to plasma during amelogenesis maturation stage and the amount of lead available in the plasma during the long time of enamel maturation (approximately 6 months in primary incisors, the teeth analyzed in this study).

Although lead in the dentin has been successfully used in the past to classify children according to the amount of lead accumulated in their bodies in the first months of life, circumpulpal dentine lead signal was not high using XRF. Probably beams with smaller diameters and XRF with increased resolution will be needed to distinguish differences in the amount of lead in dentine, which are from around 10 ppm (low) to 30 ppm (high), almost 2 orders of magnitude smaller than the concentration of lead found in the surface enamel formed in children living in contaminated areas.

### **Conclusions**

From this preliminary work we can conclude that XRF analysis using SR microbeams is capable of identifying changes in element distribution in single teeth slices which leads to developing of a new monitoring method. In summary, investigated by SRXRF microprobe in the lead contamination of enamel and dentine of primary incisor of children, significant high Pb level was observed in the surface enamel. Moreover, Pb/Ca intensity decreases from surface enamel to circumpulpal dentin. The ability of investigating elemental distribution in high spatial resolution is the significant aspect of this approach compared to other techniques. The micro mapping analysis of lead distribution provides a methodology of characterizing the pathways through which lead levels are involved in enamel of primary incisor. This may clarify how the lead levels in surface enamel are related to environmental background. Further work will include quantifying the lead concentration.

## **Acknowledgements**

We would like to acknowledge Dr. Carlos Alberto Perez for helping during the analysis at the XRF beamline and Anibal Araújo Alves Peixoto, for helping during collect of teeth. This research was partially supported by the Synchrotron Light National Laboratory (LNLS/CNPq), Brazil. This study was also supported by FAPESP and CNPq.

## **References**

Anjos MJ, Barroso RC, Pérez CA, Braz D, Moreira S, Dias KRHC, Lopes RT, 2004. Elemental mapping oh teeth using micro-SRXRF. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research.* 213, 569-573.

Almeida, G.R.C., Saraiva, M.C.P., Barbosa, F., Krug, F.J., Cury, JA.,Sousa, M.LR., Buzalaf, MAR., Gerlach, RF, 2007. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ. Res.* 104,337–345,

Almeida, G.R.C. Guerra, C.S. Tanus-Santos, J.E. Barbora Jr, F. Gerlach, R.F., 2008. 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.*, 107, 264-270.

Bellinger D, Leviton A, Waternaux C, Needleman H, Rabinowitz M, 1987. Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N Engl J Med.* 23;316(17):1037-43.

Farquharson M J, Al-Ebraheem A , Falkenberg G, Leek R, Harris A L, Bradley D A, 2008. The Distribution Of Trace Elements Ca, Fe, Cu And Zn And The Determination Of Copper Oxidation State In Breast Tumour Tissue Using Msrxf And Mxanes. *Phys. Med. Biol.*. 53: 3023–3037.

Gomes V E, Sousa M L R, Barbosa F, Krug F J, Saraiva M C P, Cury J A, Gerlach R F. , 2004. In Vivo Studies On Lead Content Of Deciduous Teeth Superficial Enamel Of Pre-School Children. *Sci Total Environ.*320:25-35.

Hu H, Aro A, Rotnizky A., 1995. Bone Lead Measured By X-Ray Fluorescence: Epidemiologic Methods. *Environmental Health Perspectives.* 103 (1), 105-110.

Ide-Ektessabi A, Shirasawa K, Koizumi A, Azechi M., 2004. Application Of Synchrotron Radiation Microbeams To Environmental Monitoring. *Nuclear Instruments And Methods In Physics Research B.* 213:761–765.

Machado, SL ; Ribeiro, LD. ; Firsat, AK. ; Botelho, MAB ; Carvalho, MF., 2004. Diagnóstico da contaminação por metais pesados em Santo Amaro da Purificação-BA. *Revista Engenharia Sanitária e Ambiental, Rio de Janeiro,* 9 (2), 140-155.

Martin Rr, Naftel Sj, Nelson Aj, Feilen Ab And Narvaez A., 2004. Synchrotron X-Ray Fluorescence And Trace Metals In The Cementum Rings Of Human Teeth. *J Environ. Monit.,* 6: 783-786.

Needleman Hl, Davidson I, Sewell Em, Shapiro Im. Subclinical Lead Exposure In Philadelphia Schoolchildren. Identification By Dentine Lead Analysis, 1974. *N Engl J Med.* 290:245-248.

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, 1979. *N Engl J Med* 300:689-695.

Rabinowitz Mb, Wetherill Gw, Koppale Jd. Lead Metabolism In The Normal Human: Stable Isotope Studies. *Science.* 1973 Nov 16;182(113):725-7.

Soremark R, Bergaman B., 1961 Gama-ray spectrometric analysis of elements in normal human enamel. Arch Oral Biol. 6(5):275-83.



## Figure Captions

**Figure 1.** A typical SRXRF spectrum of the teeth.

**Figure 2.** An example of the scanned area (a) and the corresponding intensity distribution maps for calcium (b) and lead (c).

**Figure 3.** Relative intensity Pb/Ca ratio obtained from linear scanning from surface enamel to inner dentin for a given sample.

**Figure 4.** Comparison of Pb/Ca ratio in function of the region of interest for all analyzed sample.

Figure 1  
[Click here to download high resolution image](#)

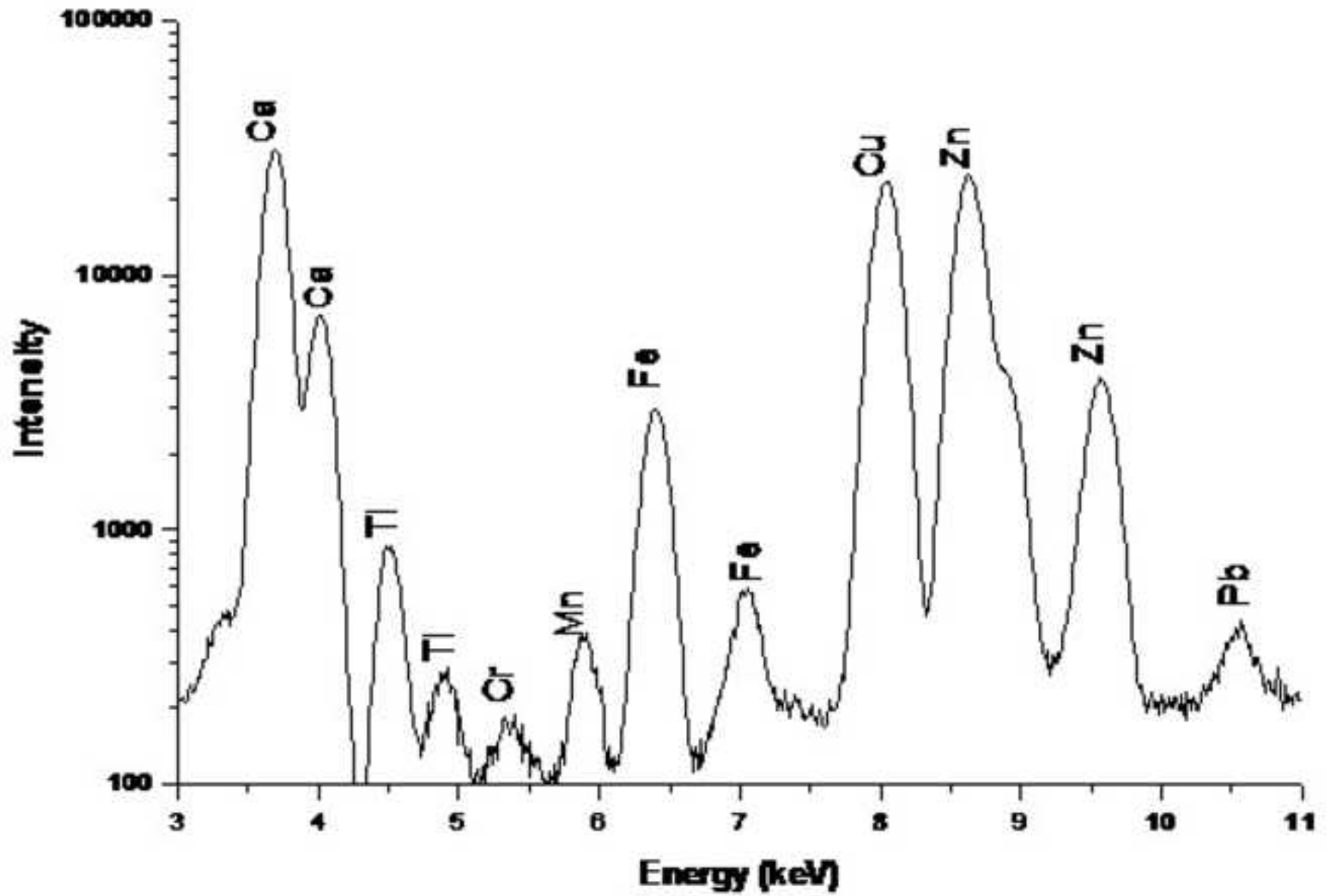


Figure 2a  
[Click here to download high resolution image](#)

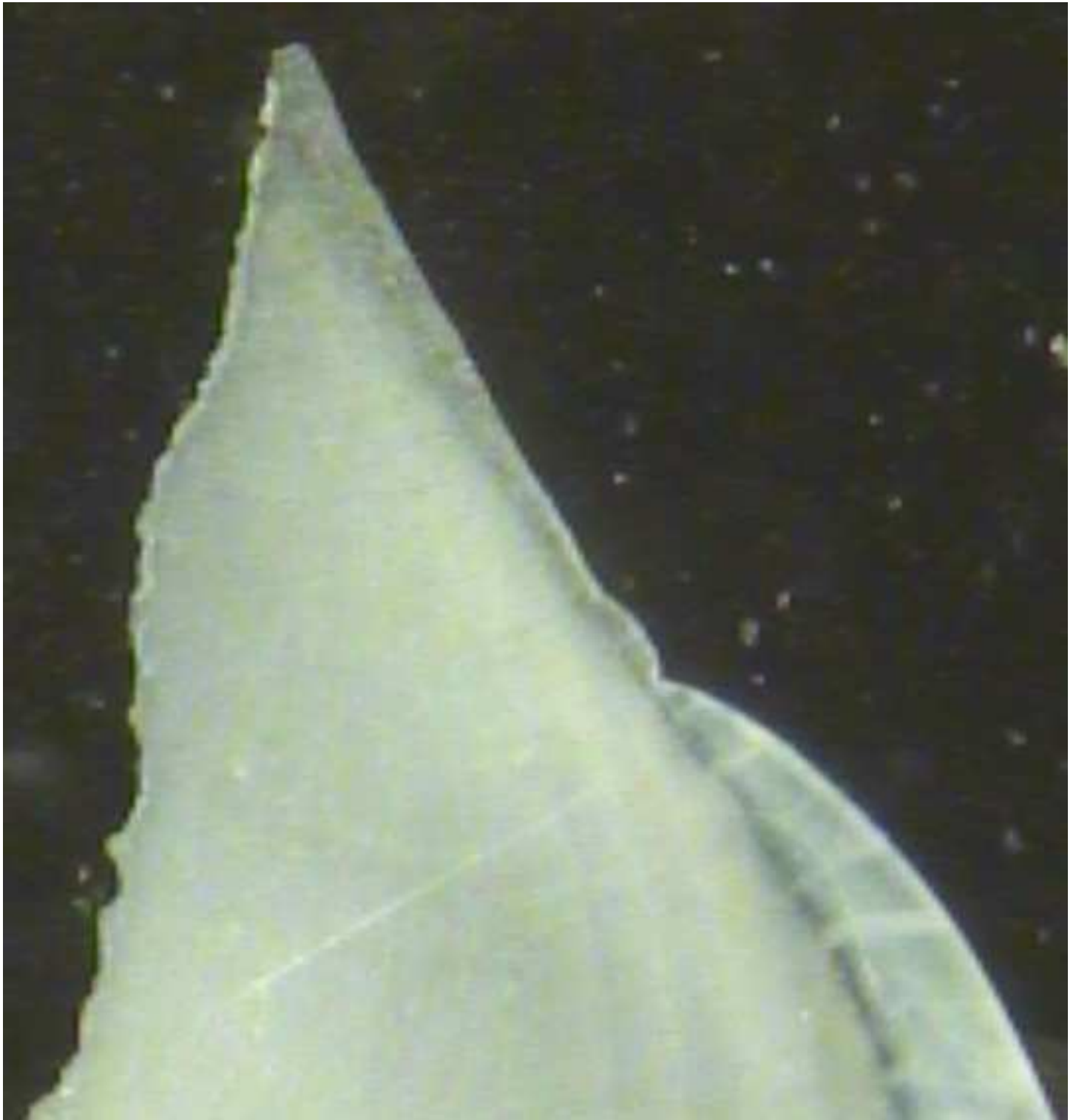


Figure 2b  
[Click here to download high resolution image](#)

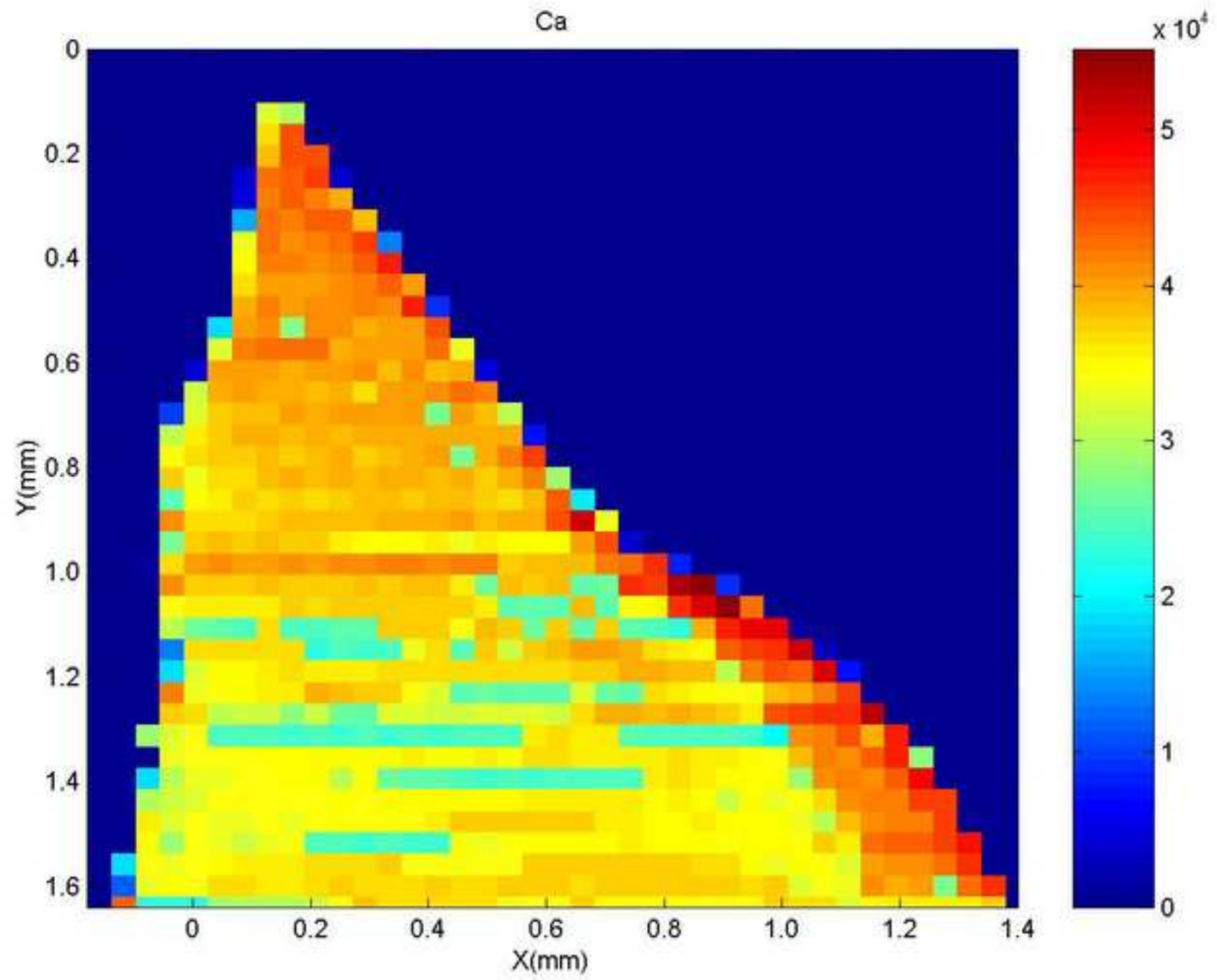


Figure 2c  
[Click here to download high resolution image](#)

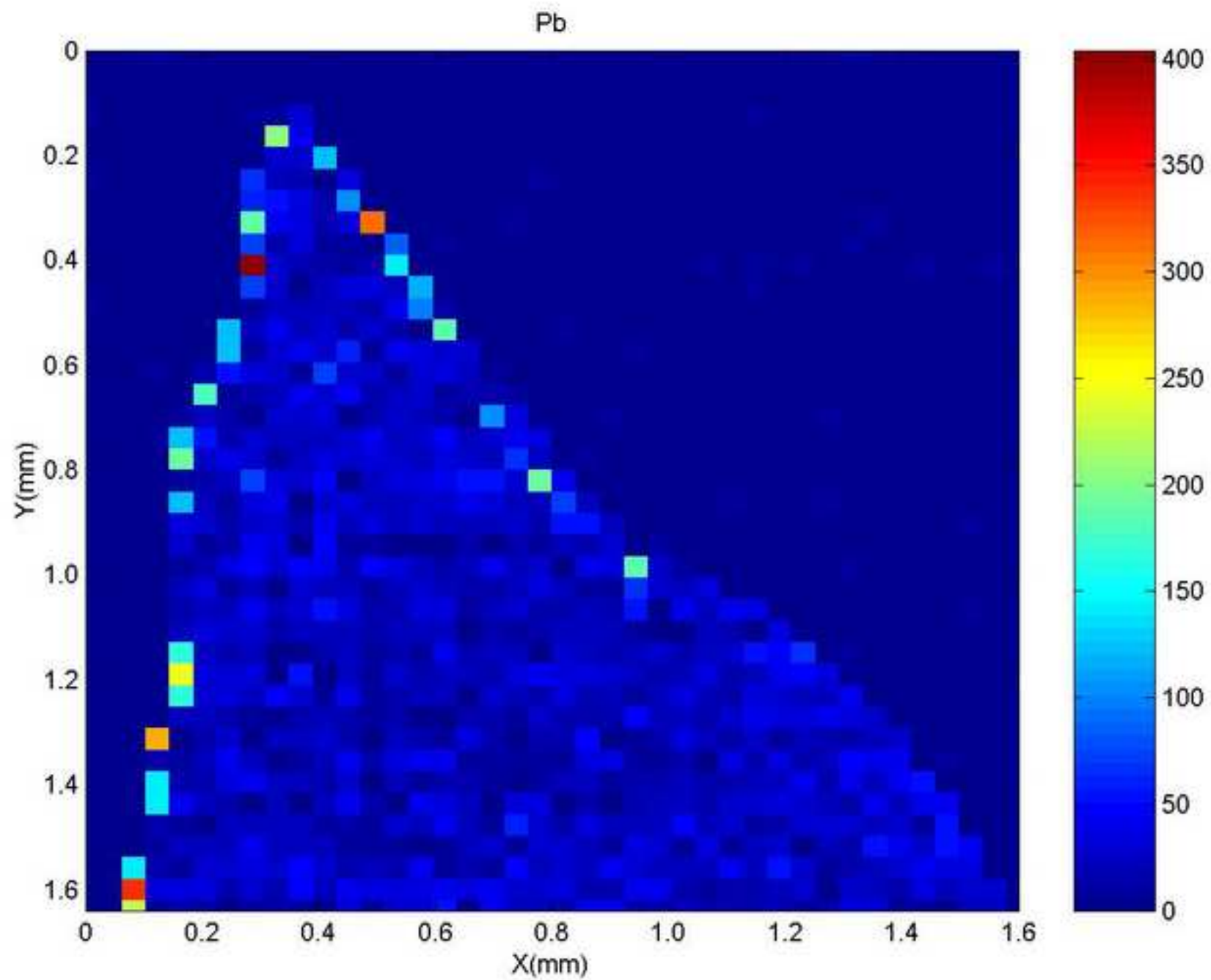


Figure 3  
[Click here to download high resolution image](#)

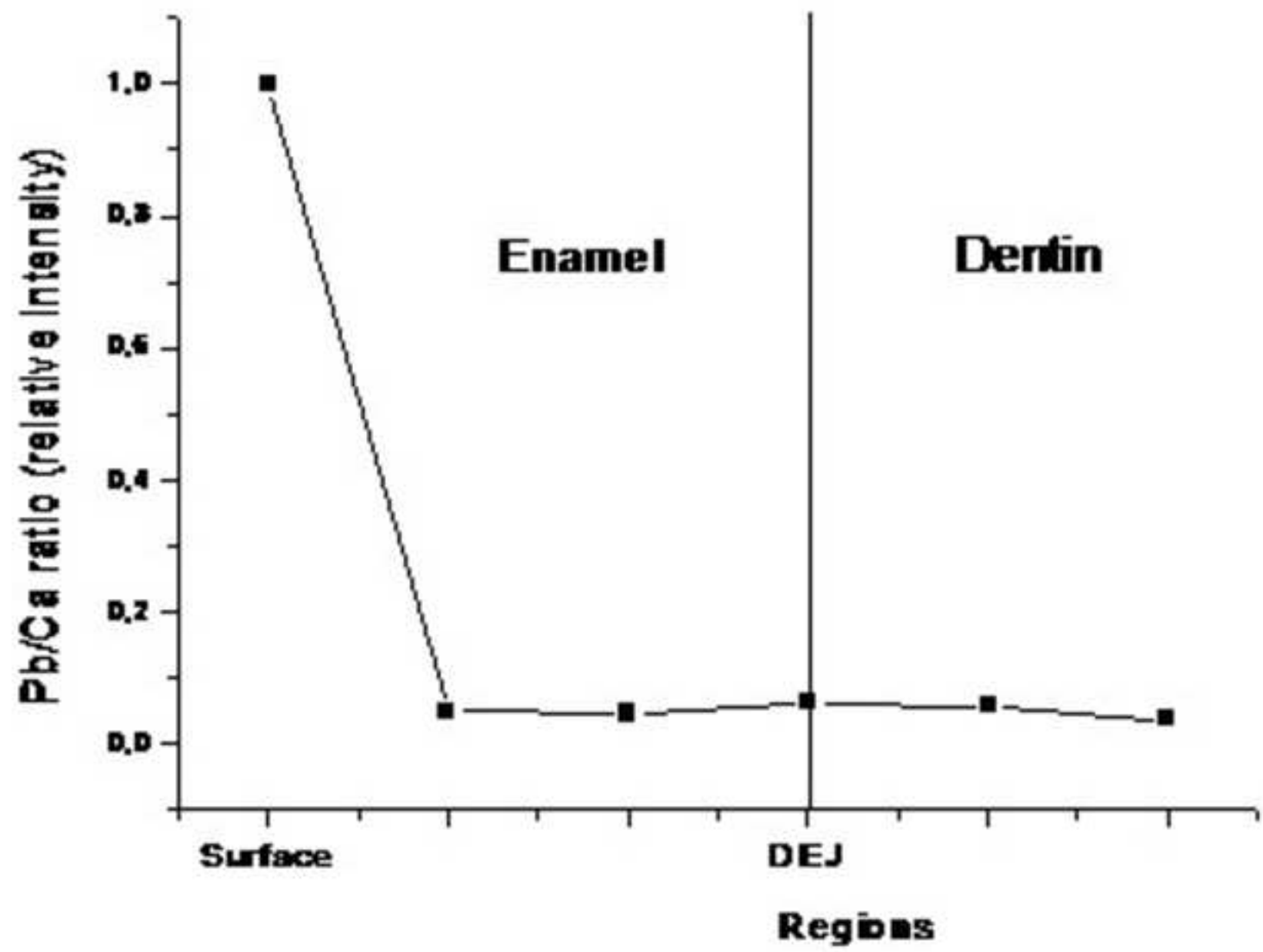
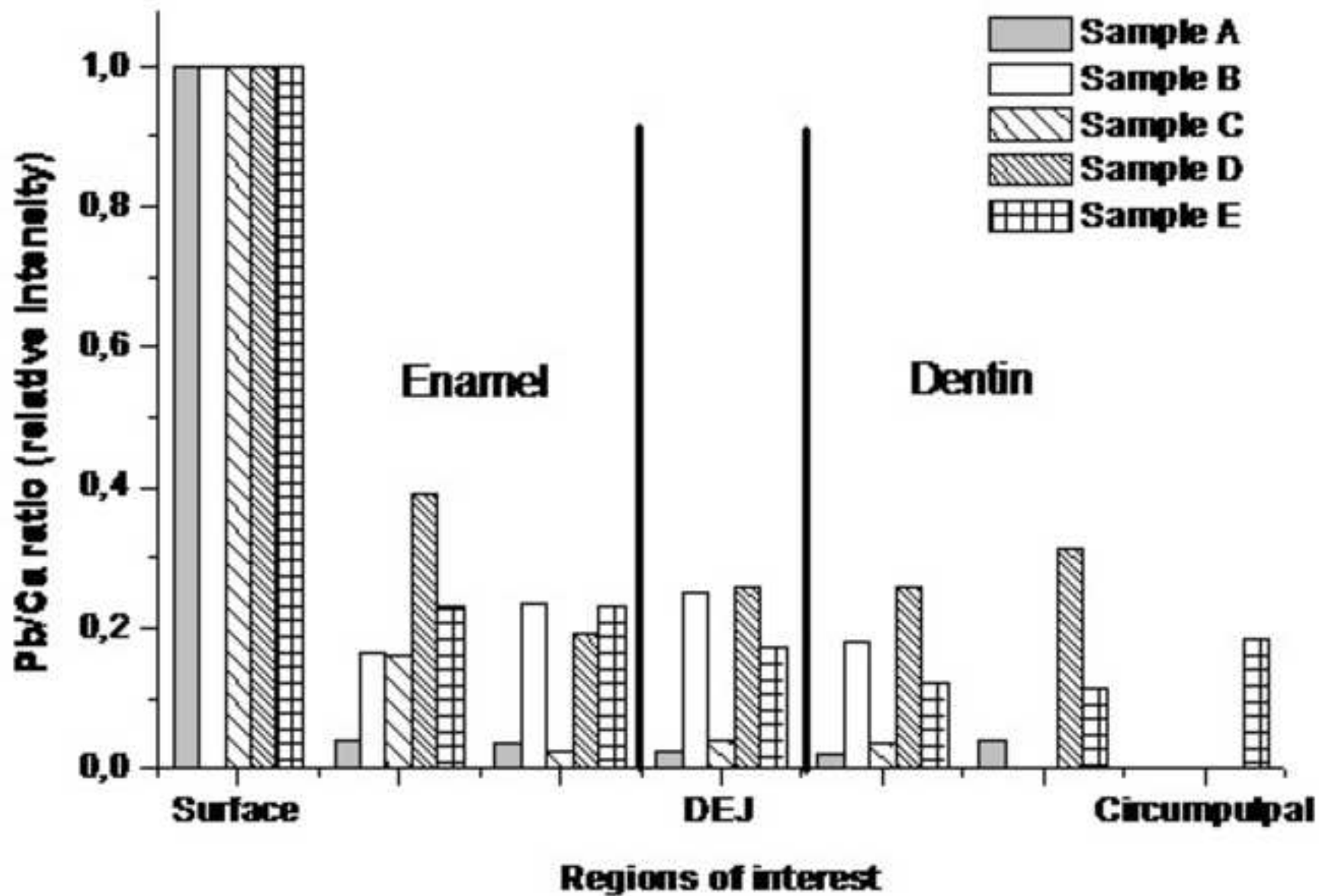


Figure 4  
[Click here to download high resolution image](#)



## Biomarcadores de exposição a chumbo

*Biomarkers of exposure to lead*

Raquel Fernanda Gerlach<sup>1</sup>, Soraya Cheier Dibb Gonçalves<sup>2</sup>, Carolina de Souza Guerra<sup>3</sup>

### RESUMO

O objetivo deste artigo é descrever alguns dos principais biomarcadores de exposição a chumbo, mostrando suas vantagens e limitações, assim como sua relação com exposição presente, passada ou cumulativa. Essas noções básicas são fundamentais para a compreensão dos efeitos do chumbo, da dificuldade do diagnóstico e do problema da exposição a baixas doses. Os biomarcadores de exposição a chumbo mais discutidos neste artigo são sangue, osso e dentes.

**Palavras-chave:** Chumbo. Biomarcadores Farmacológicos. Sangue Total. Osso. Dente.

Os biomarcadores de exposição a chumbo descritos na literatura são sangue, plasma, urina, fezes, saliva, osso, dentes, unhas e cabelo.<sup>1,2</sup>

Há poucos trabalhos sobre medidas de chumbo em cabelos e unhas, e uma quantidade ainda pequena de trabalhos sobre chumbo no plasma e na saliva, embora estes últimos sejam biomarcadores muito promissores. Medidas de chumbo nas fezes não são largamente utilizadas, mas tem papel importante para determinar o grau de exposição pela via gastrointestinal. As medidas de chumbo na urina podem ser muito úteis e têm sido muito utilizadas para monitorar a exposição ocupacional, mas é preciso utilizar medidas seriadas e correção pela creatinina.<sup>1</sup> A excreção urinária de chumbo após administração de um quelante foi utilizada como índice de carga corpórea de chum-

bo. Entretanto, essa medida de chumbo na urina após a administração de quelante parece refletir apenas a mobilização de chumbo de tecidos moles e osso trabecular, não refletindo a carga corpórea total.<sup>2</sup> O plasma é o marcador que teoricamente refletiria as concentrações de chumbo importantes do ponto de vista dos efeitos nos diferentes tecidos, entretanto, só muito recentemente começaram a surgir trabalhos com medidas confiáveis de chumbo no plasma feitas por Espectrometria de Massas com Plasma Indutivamente acoplado (ICP-MS). O plasma tem também um grande problema, que é a dificuldade de se coletar amostras de plasma sem hemólise. Como a concentração de chumbo no plasma é 1% daquela do sangue total, qualquer contaminação com o chumbo das hemácias irá ter conseqüências dramáticas para os resultados.

1. Docente, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP.  
2. titulação e instituição  
3. titulação e instituição

Correspondência:  
Profa. Dra. Raquel F. Gerlach  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, FORP/USP  
Avenida do Café, S/N  
14040-904 - Ribeirão Preto, SP  
Fone: 16-3602-4065 / Fax: 16-3602-4102  
e-mail: rigerlach@forp.usp.br

Artigo recebido em 26/08/2009  
Aprovado em 08/12/2009



Pode-se encontrar na literatura o uso de biomarcadores de efeito, sendo estes principalmente produtos da biossíntese do heme que se formam em maiores quantidades quando as enzimas que participam da via da síntese do heme estão inibidas pelo chumbo. Esses biomarcadores de efeitos foram vantajosos no passado para medir chumbo mais facilmente em indivíduos com alta exposição a chumbo, principalmente pelo menor custo das medidas e ausência de problemas com contaminação das amostras por chumbo exógeno. Estes biomarcadores de efeito ainda podem ser úteis para aferir rapidamente exposições a altas doses de chumbo (>25 ug/dL). Entretanto, quando o chumbo está presente em baixas doses no sangue, esses marcadores deixam de ser úteis, e as medidas diretas de chumbo são mais adequadas.<sup>3</sup>

Nesta revisão iremos nos concentrar em sangue, osso e dentes como biomarcadores de exposição a chumbo. O sangue é sem dúvida o biomarcador mais utilizado e o único para o qual há conhecimento acumulado na literatura, formas de medidas fidedignas e também uma noção bem estabelecida de suas limitações. Entretanto, as medidas cumulativas mais aceitas hoje são as medidas de chumbo no osso *in vivo* para adultos, enquanto os dentes permitem a comparação de indivíduos ou grupos de indivíduos quanto à quantidade de chumbo, o que é particularmente interessante para detectar crianças expostas a quantidades excessivas de chumbo.

Como apontado por Bergdahl e Skerfving,<sup>2</sup> entre os atributos que se precisa avaliar em um biomarcador de exposição a chumbo estão: 1) a acurácia e precisão analítica, 2) custo, 3) as questões práticas de uso (coleta por ex), 4) o que o biomarcador reflete, 5) a relação com exposição e 6) a relação com efeitos. Iremos discutir os diferentes biomarcadores à luz destes atributos a seguir.

## Sangue

Em termos de acurácia e precisão analítica, o sangue é um dos biomarcadores mais vantajosos (leia-se sempre sangue total para medidas de chumbo no sangue, pois 99% do chumbo no sangue está nas hemácias). O uso de medidas de chumbo no sangue é amplamente utilizado como teste laboratorial para aferir o grau de exposição, para estudos epidemiológicos e também para determinar o grau de exposição de crianças em vários estados dos EUA.<sup>4</sup> Há experiência acumulada de cerca de 40 anos de uso de chumbo no

sangue total e descrições amplamente aceitas dos protocolos de medidas analíticas. Nos EUA e em alguns outros países, há vários laboratórios governamentais e particulares que fornecem resultados fidedignos de medidas de chumbo no sangue. No Brasil há um número relativamente pequeno de laboratórios que faz medidas de chumbo no sangue. As determinações de chumbo no sangue normalmente são feitas por Espectrometria de Absorção Atômica com Forno de Grafite (GF-AAS), havendo métodos padronizados para sangue.<sup>5</sup> O limite de detecção descrito para esta técnica está torno de 1 ug/dL e são descritas variações entre medidas da mesma amostra de cerca de 5%, o que é considerado uma variação pequena.<sup>2</sup> É fundamental que os laboratórios que fazem medidas de chumbo de amostras clínicas de sangue participem de programas de calibração inter-laboratorial de chumbo no sangue (existem diversos em vários países, como por ex. o programa da Grã-Bretanha, o United Kingdom National External Quality Assessment Service, UKNEQAS, e o Programa de Ensaio de Proficiência para chumbo em sangue, PEP-Pb-s, coordenado pelo Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP). Para determinar chumbo, os laboratórios precisam adotar medidas de rigoroso controle de qualidade e também usar amostras de referência contendo quantidades conhecidas de chumbo durante as análises.<sup>5</sup>

Há grande variação nos custos das medidas de chumbo no sangue. Bergdahl & Skerfving<sup>2</sup> avaliaram que o custo de uma medida de chumbo no sangue varia entre \$4,00 e \$64,00 dólares americanos. Claro que o uso de métodos bem estabelecidos, e rotina de grande número de medidas tende a diminuir os custos, mas o custo alto e a falta de rotina para medidas de chumbo no sangue ainda são problemas que dificultam o uso amplo deste teste importante para avaliar exposição a chumbo no Brasil.

Do ponto de vista da coleta, é relativamente simples a coleta de sangue, que normalmente é feita por punção venosa no braço utilizando-se um tubo BD *trace metal free* contendo Na<sub>2</sub>EDTA ou heparina ou, no caso de crianças pequenas, o ideal é utilizar o tubo BD plástico para coleta de 3 mL (Vacutainer Plus Low Lead, Becton Dickinson Vacutainer Tube Systems) contendo K<sub>2</sub>EDTA e produzido especificamente para testar chumbo em crianças.<sup>6</sup> Estes tubos são certificados e apresentam menos do que 0,25 ug/dL de chumbo. Após a coleta, o tubo pode ser guardado na geladeira por alguns meses até o momento da determinação de chumbo. Para medidas de chumbo em

crianças nos EUA, coleta de sangue capilar feita num dedo da mão foi utilizada por certo tempo. Este método é muito sujeito a contaminação,<sup>7</sup> e não traz muitas vantagens do ponto de vista do desconforto da criança, e por isso não é mais usado.

O chumbo no sangue pode refletir a exposição recente a chumbo do meio externo assim como o chumbo mobilizado do compartimento ósseo.<sup>4</sup> Geralmente a maior parte do chumbo no sangue reflete a exposição recente (semanas a meses), uma vez que o chumbo tem uma meia vida relativamente curta no sangue: cerca de um mês.<sup>8,9</sup> O termo meia vida é muitas vezes substituído por "tempo de residência" em determinado compartimento do organismo para descrições sobre chumbo.<sup>1</sup> Entretanto, há situações em que a maior parte do chumbo no sangue pode não refletir a exposição a chumbo do meio externo, mas sim o chumbo do osso, como é o caso em situações caracterizadas por altas taxas de remodelamento ósseo, como o crescimento, a gravidez e o período pós-menopausa.<sup>4</sup>

Existe uma forma de utilizar medidas repetidas de sangue para ter uma medida cumulativa, mesmo que as medidas de sangue não tenham sido obtidas de forma sistemática a intervalos regulares. Esse índice é chamado de Índice cumulativo de chumbo no sangue (Cumulative Blood Lead Index, CBLI) e se baseia no uso da área sob a curva de chumbo no sangue traçada para um determinado indivíduo para calcular a exposição, assim se tem como parâmetro as concentrações e o tempo.<sup>4</sup> O cálculo da área sob a curva é feito simplesmente pela plotagem dos valores no eixo y e do tempo no eixo x em papel milimetrado e o cálculo da área sob a curva, que resulta em ug-anos/dL. Esse índice é muito importante, principalmente para medir exposições ocupacionais quando não há possibilidade de fazer medidas de osso, pois foi demonstrado haver forte correlação entre o CBLI e as medidas de chumbo no osso cortical.<sup>10</sup> No caso do Brasil, onde não há ainda um equipamento para medidas diretas *in vivo* de chumbo no osso, o uso de CBLI pode ser uma alternativa para estimar melhor os riscos da exposição crônica em trabalhadores.

O uso do CBLI e das medidas de chumbo no osso cortical foram fundamentais para as associações demonstradas em anos recentes entre chumbo e algumas doenças crônicas como hipertensão<sup>11</sup> e diminuição da função cognitiva em adultos.<sup>12</sup> Resultado do grande aumento nas evidências de doenças de adultos associadas a níveis moderados de chumbo acumulado é a sugestão de mudança nos níveis aceitos

nos EUA para exposição ocupacional a chumbo.<sup>13</sup>

Do ponto de vista da relação entre medidas de chumbo no sangue com efeitos, já é bem aceito na literatura que há bastante variabilidade na suscetibilidade individual a efeitos para uma mesma concentração de chumbo no sangue.<sup>2</sup> Isso poderia decorrer de variações individuais em vários polimorfismos genéticos, que parecem caracterizar subgrupos populacionais particularmente suscetíveis aos efeitos do chumbo. Além disso, algumas doenças crônicas como a diabetes tipo II tem sido associadas a piores efeitos em concentrações mais baixas de chumbo.<sup>13</sup>

## Osso

Conforme discutido em outros artigos deste simpósio, o chumbo que é absorvido ao longo da vida de um indivíduo se acumula no osso (cerca de 95% do chumbo em adultos).<sup>4</sup> Normalmente a quantidade de chumbo só aumenta no osso ao longo da vida.

Em decorrência do acúmulo no osso, as medidas de chumbo no osso há algum tempo passaram a ser vistas como as melhores medidas de exposição cumulativa a chumbo.<sup>4</sup> Em trabalhos em animais, pode-se fazer a determinação direta em ossos após a morte do animal, e esta técnica é também utilizada para verificar a quantidade de chumbo em pessoas após a morte e em ossos de centenas de anos. Nestes casos o chumbo é medido por técnicas quantitativas bem estabelecidas, como GF-AAS, voltametria anódica ou ICP-MS. Um dos dois elementos mais abundantes do osso (fósforo e cálcio) é também determinado, o que permite a expressão dos resultados em micrograma de chumbo por grama de osso (ug/g, normalmente de osso seco). As medidas em osso seco apresentam variação de 20% a mais na concentração de chumbo em comparação com medidas obtidas *in vivo*.

Indivíduos não expostos a chumbo no ambiente de trabalho apresentam cerca de 20 ug/g de chumbo no osso, enquanto trabalhadores expostos podem apresentar 100 ug/g.<sup>2</sup> Trabalhadores com esta concentração no osso podem apresentar 16 ug/dL de chumbo no sangue pela mobilização contínua de chumbo do osso.<sup>1</sup> No caso de mulheres com cerca de 50 ug/g de chumbo no osso, estas poderão apresentar medidas no sangue de 8 ug/dL, sem considerar o aumento ainda maior nos períodos de intenso remodelamento ósseo, quando mais chumbo é mobilizado do osso.<sup>1</sup>

A determinação de chumbo em ossos em seres humanos vivos se tornou possível com o desenvolvi-

mento de uma técnica chamada fluorescência de raio X para uso *in vivo*. A fluorescência de raios X (X-ray fluorescence, XRF) já era amplamente utilizada para análises químicas de materiais, com a grande vantagem de permitir a determinação de vários elementos ao mesmo tempo. A adaptação do uso de XRF para uso *in vivo* começou em meados de 1980,<sup>14</sup> e os primeiros resultados de estudos populacionais utilizando XRF aparecem em meados da década de 1990.<sup>4</sup>

A fluorescência é um fenômeno óptico que ocorre pela emissão de energia decorrente do deslocamento de elétrons de orbitais mais externos para os mais internos.<sup>15</sup> Por exemplo: do orbital L para o orbital K. Esse deslocamento acontece quando uma energia superior à ao potencial de ionização de um átomo é aplicada, do que resulta que um elétron de uma camada mais interna (K) seja deslocado para um orbital mais externo, resultando numa estrutura atômica instável, e no deslocamento de um elétron de orbitais mais externos para o mais interno que se tornou "incompleto", com liberação de energia igual à diferença de energia entre os 2 orbitais. Como essas energias são muito características de orbitais de diferentes elementos, a análise muitas vezes pode ser multielementar, dependendo da capacidade do detector. Chumbo, cálcio e muitos outros elementos têm essa característica de emitir fluorescência quando excitados com energia adequada. A fonte de energia usada para produzir fótons fluorescentes do orbital K (por isso KXRF) característicos do chumbo para medidas em osso tem sido a radiação gama de baixa intensidade do cádmio-109.<sup>4</sup> Há também medidas *in vivo* feitas com LXRF (que usa medidas baseadas no deslocamento de elétrons da camada L), mas há menos trabalhos utilizando esta técnica.

O tempo de medida requerido para obter sinal adequado é no mínimo 30 minutos, e é fundamental que a área irradiada esteja totalmente imóvel. A quantidade de radiação emitida tem sido comparada àquela de uma tomada de radiografia odontológica pequena, o que é bastante aceitável do ponto de vista de riscos à saúde.<sup>4,15</sup> Entretanto, autores que pesquisam melhorias nos instrumentos atuais de XRF apontam para o cuidado que se deve ter ao expor crianças, uma vez que a dose recebida por uma criança será muito maior do que a de um adulto em função da presença de medula óssea vermelha na tíbia da criança.<sup>16</sup>

Nesta técnica, a calibração entre medidas e calibração entre instrumentos é feita com modelos de gesso contendo quantidades conhecidas de chumbo.

Entretanto padrões internacionais para calibração interlaboratorial (a exemplo dos de sangue) ainda não existem.

As medidas de chumbo feitas em ossos como a tíbia de cadáveres com concentrações de chumbo no osso entre 20 e 30 ug/g mostram desvios padrões de 3-4 ug/g,<sup>17</sup> o que é uma variação relativamente grande em comparação com técnicas para sangue. Outro problema sério é que comumente pessoas não expostas ocupacionalmente apresentam medidas negativas de chumbo no osso por XRF (o que naturalmente não é real, mas decorre do cálculo da medida baseado nos padrões de gesso), e assim um desafio atual é diminuir o limite de detecção mínimo por esta técnica.<sup>18</sup>

Além destes problemas, as medidas de chumbo no osso apresentam maior grau de incerteza se for maior a quantidade de tecido mole sobre o osso.<sup>18</sup> Além disso, como as medidas dependem da quantidade de massa óssea, o índice de massa corporal pode ter efeito nas medidas, e o grau de incerteza aumenta muito em mulheres e crianças.<sup>4</sup>

Não há uma variação importante quando quantidades de chumbo de posições simétricas foram medidas.<sup>17</sup> Há trabalhos que fizeram medidas em falange, patela, tíbia e calcâneo, sendo que as medidas de falange praticamente só são confiáveis em indivíduos expostos ocupacionalmente.<sup>2</sup>

As descrições mais frequentes são de chumbo na patela e na tíbia. A patela é um osso predominantemente trabecular, onde o tempo de residência do chumbo é de poucos anos. Já a tíbia é um osso predominantemente cortical, sendo as medidas feitas na região da diáfise, em que o tempo de residência do chumbo é de cerca de 30 anos.<sup>1</sup>

Portanto, em termos de comparação com o sangue, as medidas de chumbo no osso não têm a mesma acurácia e precisão analíticas, e não podem ainda ser feitas em laboratórios comerciais ou governamentais. Há menos de uma dezena de equipamentos de XRF para medidas *in vivo* de chumbo no osso no mundo, e estes são utilizados para estudos epidemiológicos até o momento.<sup>4</sup>

Do ponto de vista da medida, o tempo de meia hora e a imobilidade dificultam a medida, que tem uma precisão razoável em homens adultos. Em mulheres e crianças a variabilidade das medidas é muito grande e uma boa porcentagem das medidas de pessoas não expostas ocupacionalmente costuma ser negativa. Apesar destes problemas, o uso de medidas de chumbo acumulado no osso, particularmente no osso corti-

cal, e os dados de CBLI foram fundamentais para a demonstração de que maior exposição cumulativa a chumbo está associada a risco aumentado de doenças crônicas em populações adultas.<sup>13</sup>

## Dentes

O chumbo se acumula nos dentes e nos ossos, mas as medidas de chumbo em dentes e ossos trazem informações distintas quanto à exposição a chumbo.

Os dentes podem representar uma alternativa potencialmente interessante do ponto de vista da coleta de amostras e da facilidade de medidas de amostras de dentes. Isso se torna mais importante quando lembramos que as medidas de chumbo no osso *in vivo* podem ser feitas em poucos laboratórios do mundo e que esse método ainda não está adequadamente desenvolvido para medidas em crianças. Além disso, enquanto os ossos são inacessíveis para medidas diretas por técnicas estabelecidas, os dentes de leite são perdidos e podem ser usados para medidas diretas. Mesmo os dentes presentes na boca permitem que sejam obtidas amostras superficiais para medir chumbo, sem haver dano para o sujeito da pesquisa. Finalmente, os dentes trazem informações sobre a exposição em crianças que só são conseguidas por várias medidas seriadas de sangue da mãe e da criança (o que tem um custo alto e dificuldades de coleta). Finalmente, as medidas de chumbo em amostras de dentes de leite muitas vezes representam a exposição a chumbo de um período precoce do desenvolvimento, quando os efeitos do chumbo são particularmente nocivos.

Para compreender a utilidade dos dentes como biomarcadores é preciso levar em conta a "cronologia" de formação e mineralização de cada grupo de dentes, além das características de cada tecido que compõe os dentes.<sup>19</sup> Levando isso em conta, é possível identificar as partes dos dentes que registram a exposição em um período específico do passado e outras partes que trazem informação sobre a exposição acumulada de certo momento no passado até o momento em que o dente foi perdido.

Os trabalhos utilizando a dentina de dentes de leite como marcador da exposição passada e cumulativa a chumbo foram fundamentais para estabelecer que a exposição precoce a baixas doses de chumbo estava associada a perdas cognitivas e diminuição do desempenho escolar.<sup>20,21</sup> Infelizmente em anos recentes houve um grande desinteresse pelo uso de dentes para medidas de chumbo, o que pode decorrer do uso

de medidas seriadas de chumbo no sangue em estudos recentes<sup>22</sup> e do grande número de informações inconsistentes sobre chumbo em dentes publicadas nos últimos anos em periódicos de diferentes áreas.

Aqui iremos ressaltar alguns aspectos biológicos e metodológicos a considerar ao analisar trabalhos de chumbo em dentes, mostrando a seguir as informações que já tivemos no Brasil sobre exposição de crianças a chumbo aferida a partir de amostras de dentes.

Os dentes têm uma coroa (que é visível na boca) e uma raiz (Figura 1). A coroa é revestida externamente pelo esmalte, enquanto a raiz é revestida pelo cimento. A dentina é o tecido mineralizado subjacente ao esmalte e ao cimento. Internamente está localizada a polpa, tecido conjuntivo não mineralizado, que nutre a dentina.<sup>19,23</sup> Os dentes de leite são perdidos sem a maior parte da raiz (Figura 1 A e B).

Dentina, cimento e osso são tecidos mineralizados bastante semelhantes do ponto de vista bioquímico: os três têm uma matriz orgânica majoritariamente constituída de colágeno tipo I, o mineral (hidroxiapatita) se precipita sobre esse arcabouço orgânico, e a quantidade de mineral fica em torno de 70% de peso. Estes três tecidos tem respostas semelhantes a estímulos hormonais e normalmente uma camada contínua de células separa o compartimento mineral (a matriz) do líquido tecidual do restante do organismo. Há também muitas semelhanças entre estes três tecidos quanto ao acúmulo de chumbo, sendo a mais óbvia a quantidade relativa de chumbo encontrada, que é da mesma ordem de magnitude. Há também uma diferença fundamental entre estes tecidos a considerar para comparar medidas de chumbo: enquanto o osso é um tecido que se remodela constantemente (a sua estrutura é continuamente modificada), a dentina praticamente não se remodela. Portanto, na dentina o chumbo será incorporado enquanto esta estiver sendo depositada, enquanto no osso o chumbo será continuamente depositado, dependendo da taxa de remodelamento ósseo.

Uma camada espessa de dentina é produzida enquanto o dente se forma e até ele surgir na boca (erupcionar) e tomar o seu lugar. Essa dentina é produzida com maior velocidade e se chama dentina primária. Depois que o dente já erupcionou toda a sua raiz está formada, as células da polpa junto à dentina continuam a produzir matriz de dentina durante toda a vida do dente, mas numa velocidade muito mais baixa. Essa camada é a "dentina secundária", que tem

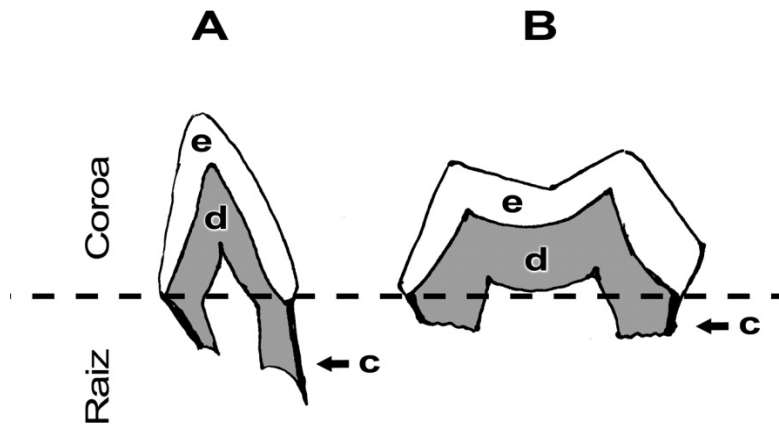


Figura 1. Desenho esquemático de dentes de leite (A e B) e de um dente permanente (C). A linha tracejada indica onde acaba a coroa e inicia a raiz. e: esmalte, d: dentina, p: polpa, c: cimento. Notar que os dentes de leite estão sem a maior parte da raiz.

grande importância aqui porque muitos trabalhos descrevem a quantidade de chumbo acumulada nesta camada (em muitos trabalhos no exterior ela foi chamada de dentina circumpulpar, mas é um termo que não iremos usar aqui). A dentina secundária e o cimento são tecidos que apresentam as maiores quantidades de chumbo em comparação com a dentina primária e osso.<sup>24</sup>

As crianças têm 20 dentes de leite, que são perdidos entre os 6-12 anos, nascendo a seguir os dentes permanentes (que são 32). O período de formação deste grande número de dentes começa na vida intra-uterina e vai até os 15-18 anos. Por isso, dentes têm sido usados como registro de eventos que ocorrem ao longo da vida de um indivíduo e que não ficam registrados definitivamente em outros tecidos, pois estes normalmente se modificam ao longo da vida. Esse registro é muito usado por antropólogos.<sup>25</sup>

Entre os eventos registrados nos dentes está o momento do nascimento, que aparece como uma linha no esmalte e na dentina, a linha neonatal.<sup>23</sup> Essa linha pode ser usada para se conhecer o que acontecia antes e depois do nascimento. A referência a esta linha neonatal é utilizada em trabalhos de chumbo em dentes, mas o seu significado é pouco compreendido:

enquanto na dentina ela realmente separa partes da dentina que mineralizaram antes e depois do nascimento, no esmalte isso não ocorre. Essa diferença decorre da diferença no processo de mineralização de dentina e esmalte. Como dentina é depositada em incrementos microscópicos e não se remodela, o que foi depositado antes do nascimento é distinto do que foi depositado após o nascimento.

Com base nessas informações e na época em que a dentina primária é depositada nos diferentes dentes, é possível usar diferentes partes da dentina primária para aferir a exposição a chumbo num certo momento do passado. Além disso, a dentina secundária de dentes de leite trará a informação sobre o chumbo acumulado entre a época que um determinado dente entrou em função (por ex. 12 meses de vida no caso dos incisivos centrais decíduos) e a época em que estes foram perdidos (por ex. 6 ou 7 anos). Essas informações foram cuidadosamente obtidas no passado.<sup>20,21,24,26</sup>

Além dos trabalhos com escolares para aferir a exposição passada cumulativa a chumbo, a dentina também é muito útil para estimar a exposição de populações passadas, pois ela está relativamente protegida do meio externo.<sup>24</sup> A comparação de medidas de chumbo na dentina secundária de dentes permanen-

tes de mais de 5000 anos com dentes de pessoas que viveram na Dinamarca na Idade Média e atualmente revelaram que a exposição a chumbo era muito baixa há 5000 anos (mediana: 2 ug/g de chumbo na dentina), chegando a 100 ug/g na Idade Média, enquanto atualmente dinamarqueses adultos não expostos apresentavam cerca de 23 ug/g de chumbo na dentina. O mesmo padrão de mudanças foi visto quando se usou a razão Pb/Ca para esta comparação, e estes dados concordam o aumento na concentração de chumbo verificado como conseqüência das atividades humanas. As menores concentrações de chumbo recentes na Dinamarca estão de acordo com a relativamente baixa exposição a chumbo vista naquele país.<sup>24</sup>

Apesar de sua importância e algumas vantagens, a dentina só pode ser coletada em dentes que já foram perdidos. Para conseguir um fragmento de dentina, é preciso fraturar, moer ou tirar uma fatia de um dente, processo laborioso que facilmente leva à contaminação da amostra. Conseguindo o fragmento, este é dissolvido em ácido para as medidas de chumbo e cálcio ou fósforo, o que permite expressar o resultado em ug de chumbo/g de dentina (ug/g).

Acreditamos que entre as principais razões para poucos trabalhos recentes usarem dentes como biomarcadores estão a dificuldade técnica para se obter fragmentos de dentina e a falta de trabalhos sobre a correlação entre as concentrações de chumbo na dentina e as quantidades de chumbo no sangue ao longo do tempo.

O esmalte, por outro lado, não tem nenhuma semelhança com a dentina e o osso do ponto de vista da mineralização.<sup>23</sup> A mineralização do esmalte não é aposicional, como a da dentina. O esmalte maduro que encontramos nos dentes na boca é o tecido mais mineralizado do nosso corpo (95% de mineral em peso e menos de 1% de proteínas) e se mineraliza por meses a anos depois da matriz ter sido depositada a partir do contínuo influxo de íons através da superfície.<sup>27</sup> A compreensão de como o esmalte se mineraliza é bastante recente.<sup>28</sup> É essa forma distinta de mineralização que resulta no acúmulo de certos íons na superfície do esmalte, e sua distribuição muito distinta no esmalte e na dentina. Entre os íons encontrados em maiores concentrações na superfície estão flúor, chumbo, cádmio, zinco e estrôncio.<sup>29,30,31</sup>

Estudos com número razoável de crianças mostram que o esmalte dos dentes pode ser muito útil para a obtenção de uma amostra superficial, na qual o chumbo pode ser medido fidedignamente, permitindo encontrar crianças excessivamente expostas ou regiões

de maior ou menor contaminação por chumbo.<sup>30,32-36</sup> A grande vantagem do uso de esmalte é que a amostra pode ser obtida *in vivo* em menos de 1 minuto, por um teste indolor e que não causa comprometimento ao dente.<sup>37</sup>

Nós realizamos alguns trabalhos utilizando coletas *in vivo* de esmalte superficial de dentes de leite para verificar a quantidade de chumbo em escolares.<sup>35,36,37</sup> Esta técnica surgiu em 1956, para conseguir amostras superficiais de dentes extraídos.<sup>29</sup> Como dito na Introdução deste Simpósio, nesta época ainda não se usavam técnicas limpas para determinação da maioria dos elementos, e assim as concentrações de milhares de ug/g de chumbo no esmalte superficial encontradas em meados da década de 1970<sup>38</sup> eram vistas com desconfiança, uma vez que na dentina a quantidade máxima na maioria dos trabalhos fica em torno de 40 ug/g e pouco ainda se sabia sobre as diferenças na forma distinta de mineralização do esmalte e da dentina.

A partir da análise dos dados obtidos, é possível perceber crianças e populações de crianças com concentrações bem mais altas de chumbo, o que é muito característico quando se observam amostras coletadas de crianças que sempre residiram nas proximidades de uma fábrica de baterias, como é o caso da AJAX, em Bauru, SP. Isso ficou bem claro em um trabalho nosso em que comparamos as quantidades de chumbo em dente de leite coletados em 7 Escolas Municipais de Educação Infantil (4-6 anos) e nas crianças que moravam perto da Fábrica da AJAX.<sup>39</sup> Uma análise preliminar sugere que concentrações em torno de 600 ug/g de chumbo no esmalte indiquem exposição excessiva quando esta quantidade estiver na entre 3 e 6 um da superfície externa do esmalte (Figura 2).

Esse trabalho, assim como os anteriores<sup>30,32-36</sup> e o estudo ainda não publicado realizado em Ribeirão Preto em 2008, com coletas de sangue, saliva e amostras de esmalte de 444 escolares de 6-8 anos,<sup>40</sup> mostram que algumas crianças apresentam exposição excessivamente alta, mesmo em regiões sem contaminação notória por chumbo descrita. Esses achados não causam espanto, uma vez que o chumbo é amplamente utilizado para vários fins e seu controle em vários países não é muito rígido (e as formas de monitoramento na população em geral muitas vezes inexistentes). Os dados indicam que é preciso estudar cuidadosamente a prevalência da exposição indevida, as fontes de chumbo e estimar as perdas para a população, para que se possa prevenir completamente a exposição excessiva.

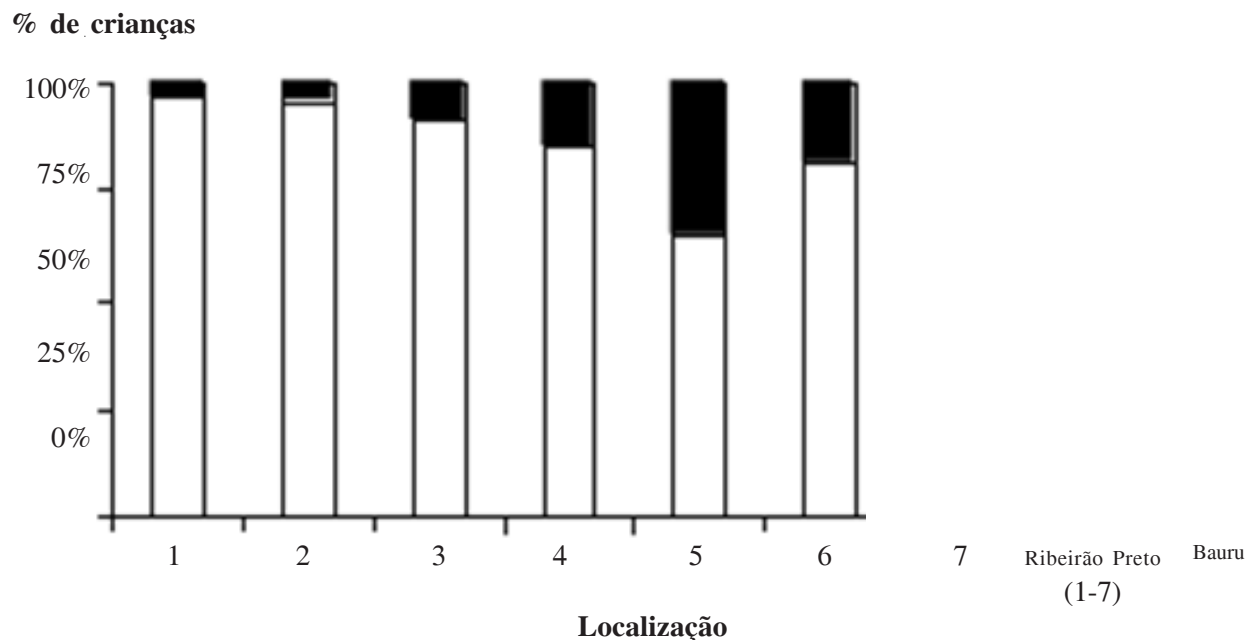


Figura 2. Porcentagens de crianças distribuídas de acordo com valores de chumbo 600 ou <600 µg/g em amostras de esmalte superficial obtidas *in vivo* em 7 Escolas Municipais de Ribeirão Preto, SP (n=186) e nas cercanias da Fábrica de Baterias AJAX, em Bauru, SP (n=20)(2004). Notar a maior porcentagem de crianças com chumbo de chumbo 600 µg/g na Escola 5 de Ribeirão Preto em comparação com as demais. Figura reproduzida de Environmental Research 107: 264-70, 2008, com permissão da Editora Elsevier.

## Conclusões

As medidas de chumbo no sangue total são as mais adequadas do ponto de vista da acurácia e precisão analítica e das informações acumuladas ao longo das últimas décadas sobre a relação de medidas de chumbo no sangue com efeitos. Recentemente medidas no osso *in vivo* por XRF se tornaram possíveis e permitiram trabalhos epidemiológicos com centenas de indivíduos, os quais mostram que índices cumulativos (como medidas repetidas de sangue ou medidas

no osso) são essenciais para verificar os efeitos do chumbo em adultos. Os dentes deixaram de ser usados nas últimas décadas, mas podem ser uma alternativa importante para verificar exposição excessiva em crianças, especialmente em países em que medidas repetidas no sangue não são feitas. Para utilizar dentes é fundamental prestar atenção aos diferentes tecidos e aos cuidados com contaminação exógena. As informações de diferentes biomarcadores de exposição a chumbo são distintas e muitas vezes complementares.

### ABSTRACT:

This article aims at describing some of the most important biomarkers of exposure to lead, showing its advantages and limitations, as well as how they relate to present, past or cumulative exposure to lead. This basic knowledge is essential for the comprehension of the effects of lead, the difficulties of the diagnosis of excessive exposure, and the problem of exposure to low levels of lead. The biomarkers of exposure discussed in depth in this article are blood, bone, and teeth.


**keywords:** Lead. Biomarkers, Pharmacological. Whole Blood. Bone. Tooth.

## Referências Bibliográficas

1. Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons JP. A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect.* 2005;113:1669-74.
2. Bergdahl IA, Skerfving S. Biomonitoring of lead exposure - alternatives to blood. *J Toxicol Environ Health.* 2008;71:1235-43.
3. Parsons PJ, Reilly AA, Hussain A. Observational study of erythrocyte protoporphyrin screening test for detecting low lead exposure in children: impact of lowering the blood lead action threshold. *Clin Chem.* 1991; 37:216-25.
4. Hu H, Shih R, Rothemberg S, Schwartz BS. The epidemiology of lead toxicity in Adults: measuring dose and consideration of other methodologic issues. *Environ Health Perspect.* 2007; 115:455-62.
5. Parsons PJ, Slavin W. A rapid Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometric method for the determination of lead in blood. *Spectrochim Acta, B* 1993; 48:925-39.
6. Esernio-Jenssen D, Busch V, Parsons JP. Evaluation of VACUTAINER PLUS Low Lead Tubes for blood lead and erythrocyte protoporphyrin testing. *Clin Chem.* 1999; 45:148-50.
7. Parsons PJ, Reilly AA, Esernio-Jenssen D. Screening children exposed to lead: an assesment of the capillary blood lead fingerstick test. *Clin Chem.* 1997;43: 302-11.
8. O'Flaherty EJ. Physiologically based models for bone-seeking elements. V: Lead absorption and disposition in children. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995;131: 297-308.
9. Rabinowitz MB, Wetherill GW, Koopple JD. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest.* 1976;58: 260-70.
10. Roels H, Konings J, Green S, Bradley D, Chettle D, Lauwerys R. Time-integrated blood lead concentration is a valid surrogate for estimating the cumulative lead dose assessed by tibial lead measurement. *Environ Res.* 1995; 69:75-82.
11. Shih RA, Hu H, Weisskopf M, Schwartz BS. Cumulative lead dose and cognitive function in adults : a review of studies that measured both blood and bone lead. *Environ Health Perspect.* 2007;115:483-92.
12. Navas-Acien A, Gualler E, Silbergeld EK, Rothemberg SJ. Lead exposure and cardiovascular disease - a systematic review. *Environ Health Perspect.* 2007;115:472-82.
13. Schwartz BS, Hu H. Adult lead exposure: time for change. *Environ Health Perspect.* 2007;115:451-4.
14. Hu H, Rabinowitz M, Smith D. Bone lead as a biological marker in epidemiologic studies of chronic toxicity: Conceptual paradigms. *Environ Health Perspect.* 1998;106:1-8.
15. Todd AC, Chettle DR. *In vivo* X-ray fluorescence of lead in bone: review and current issues. *Environ Health Perspect.* 1994;102:172-7.
16. Nie H, Chettle D, Luo L, O'Meara J. Dosimetry study for a new *in vivo* X-ray fluorescence (XRF) bone lead measurement system. *Nucl Instr and Meth in Phys Res. B* 2007; 263: 225-30.
17. Aro A, Amarasiriwardena C, Lee ML, Kim R, Hu H. Validation of K x-ray fluorescence bone lead measurements by inductively coupled plasma mass spectrometry in cadaver legs. *Med Phys.* 2000; 27:119-23.
18. Ahmed N, Fleming DEB, Wilkie D, O'Meara JM. Effects of overlying soft tissue on X-ray fluorescence bone lead measurement uncertainty. *Radiation Physics and Chemistry.* 2006; 75:1-6.
19. Nanci A. *Histologia oral de Ten Cate: desenvolvimento, estrutura e função.* 7ª Ed. Rio de Janeiro (RJ): Elsevier; 2008.
20. Needleman HL, Gunnoe C, Leviton A, Reed R, Peresie H, Maher C, Barret P. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N Engl J Med.* 1979; 300: 689-95.
21. Hansen ON, Trillingsgaard A, Beese I, Lyngbye T, Grandjean P. A neuropsychological study of children with elevated dentine lead level: assessment of the effect of lead in different socioeconomic groups. *Neurotoxicol Teratol.* 1989;11:205-13.
22. Canfield RL, Henderson CRJ, Cory-Slechta DA, Cox C, Jusko TA, Lanphear BP. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per deciliter. *N Engl J Med.* 2003; 348: 1517-26.
23. Avery JK (ed), Steele PF (assoc. ed): *Oral development and histology.* Third Edition, Thieme, New York: 2002.
24. Grandjean P, Jorgensen PJ. Retention of lead and cadmium in prehistoric and modern human teeth. *Environ Res.* 1990;53:6-15.
25. Dean MC. Tooth microstructure tracks the pace of human life-history evolution. *Proc R Microsc Soc. B.* 2006; 273: 2799-808.
26. Needleman HL, Tuncay OC, Shapiro IM. Lead levels in deciduous teeth of urban and suburban American children. *Nature (Lond.)* 1972; 235: 111-2.
27. Gerlach RF, Line SRP. Ameloblastos. In: Carvalho HF, Collares-Buzato CB (editores). *Células: uma abordagem multidisciplinar.* 1ª ed. Barueri (SP): Manole; 2005. p. 95-106.
28. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998; 9:128-36.
29. Brudevold F, Steadman LT. The distribution of lead in human enamel. *J Dent Res.* 1956; 35:43.
30. Cleymaet R, Retief DH, 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.* A 1991;104:175-89.
31. Robinson C, Kirkham J, Brookes SJ, Roger CS. Chemistry of mature enamel (Chapter 8). In: Robinson C, Kirkham J, Shore R (eds). *Dental enamel: formation to destruction.* 1st ed. London, CRC Press, 1995.
32. Cleymaet R, Quartier E, Slop D, Retief DH, Smeyers-Verbeke J, Coomans D. Model for assessment of lead content in human surface enamel. *J Toxicol Environ Health. B* 1991; 32:111-27.
33. Cleymaet R, Bottenberg P, Retief DH, 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.* 1991c; 25:256-63.
34. Cleymaet R, Collys K, Retief DH, Michotte Y, Slop D, Taghon E, Maex W, Coomans. Relation between lead in surface tooth enamel, blood, and saliva from children residing in the vicinity of a non-ferrous metal plant in Belgium. *Br J Ind Med.* 1991d; 48:702-9.
35. Gomes VE, Sousa MLR, 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.* 2004; 320: 25-35.
36. Costa de Almeida GR, Pereira Saraiva Mda C, Barbosa F Jr, Krug FJ, Cury JA, Rosário de Sousa M da L, Rabelo Buzalaf MA, Gerlach RF. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled *in vivo* from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ Res.* 2007; 104: 337-45.
37. 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.
38. Brudevold F, Redá A, Aasenden R, Bakhos Y. Determination of trace elements in surface enamel of human teeth by a new biopsy procedure. *Arch Oral Biol.* 1975; 20: 667-73.
39. 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: 264-70.
40. Costa de Almeida, GR. Utilização de biomarcadores de dose interna para avaliação da exposição ao chumbo e suas correlações com anemia e polimorfismos genéticos em crianças residentes em uma região supostamente não contaminada. [Tese de Doutorado]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2009.



Anexo F- Artigo no Prelo



**Carries Research**  
Welcome Dr. Raquel F. Gerlach

<p><b>Dr. Raquel Gerlach</b> University of Sao Paulo Avenida do Café, S/N Ribeirao Preto 14040904 Brazil</p> <p>Tel 1: +55 16 3602 4065 Tel 2: +55 16 3602 4014 Email 1: rfgerlach@forp.usp.br</p> <p><a href="#">Edit Contact Information</a></p>	<p>Editorial Office Phone: +44 2071887465 Editorial Office Email: <a href="mailto:david.beighton@kcl.ac.uk">david.beighton@kcl.ac.uk</a> <a href="#">Logout</a></p>
--	---

**SUBMISSIONS**

[Submit a New Manuscript](#) ([Guidelines for Authors](#))

**MANUSCRIPTS AS CORRESPONDING AUTHOR**

- Manuscripts Currently Under Consideration** (1 manuscript)

201009020 Revision 0 *Deposition of lead in bovine enamel duri...*  
Submitted: 23/09/2010 Current Status: Under Review

## **Distribution of lead in artificially induced caries using $\mu$ SRXRF**

**Gabriela Ferian Molina<sup>a</sup>, Glauce Regina Costa de Almeida<sup>a</sup>, Carolina de Souza Guerra<sup>b</sup>, Jaime Aparecido Cury<sup>b</sup>, André Pereira de Almeida<sup>c</sup>, Regina Cely Barroso<sup>d</sup>, Raquel Fernanda Gerlach<sup>\*a</sup>**

<sup>a</sup> Universidade de São Paulo, FORP/USP, São Paulo, 14040-904, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade Estadual de Campinas, FOP/UNICAMP, São Paulo, 13414-903, Brasil.

<sup>c</sup> Laboratório de Instrumentação Nuclear; COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, P.O. Box 68509, 21941-972 Brasil.

<sup>d</sup> Universidade do Estado do Rio de Janeiro, IF/UERJ, Rio de Janeiro, 20559-900, Brasil.

\* corresponding author: R.F.Gerlach, Department of Morphology, Stomatology and Physiology

Dental School of Ribeirão Preto, University of São Paulo – FORP/USP, Av. do Café, S/N, Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirão Preto-SP, Brazil. Phone: +55 16 3602 4065 FAX: +55 16 3633 0999 e-mail: [rfgerlach@forp.usp.br](mailto:rfgerlach@forp.usp.br)

## **Abstract**

Lead (Pb) accumulates on the surface of dental enamel. So far, there are studies on the incorporation of Pb into the enamel during the process of dental caries. This study aimed at studying the distribution of Pb at different enamel depths in bovine enamel blocks submitted to artificial caries conditions, which are 8 cycles of des- and remineralization *in vitro*. Control blocks were exposed to no additional Pb in the des- and remineralizing solutions, while the Experimental 1 group (E1) was exposed to 30 µg/L of Pb acetate, and the E2 group, to 300 µg/L. The tooth blocks were sectioned and 100 µm-sections were prepared for polarizing microscopy to observe the extent of the porous caries lesions, these sections were then photographed, and used for lead analysis by micro Sincrotron Radiation X-Ray Microfluorescence (µSRXRF).

Higher Pb signals were observed in the E2 group, however, when we compared the Pb signal among the three groups (C, E1 and E2), a statistically significant difference was only observed at enamel depths of 0 (C vs E2;  $p= 0.029$ ) and 50 µm (C vs E2 and E1 vs E2;  $p= 0.029$ ). We also observed a decrease of Pb signal from the enamel surface toward the inside. Results show that the caries process enables the incorporation of Pb into the dental enamel both in the control group as in the Experimental groups E1 and E2 apparently in dose-dependent manner. In conclusion, this study shows for the first time that, under *in vitro* caries conditions, Pb accumulates in the very surface of the dental enamel under control and the tested Pb concentration of 30 µg/L, and no significant incorporation of Pb found deeper than 50 µm under these conditions. The exposure of the enamel to 300 µg/L of Pb in the des- and remineralizing solution resulted in the incorporation of Pb into deeper enamel layers, reaching up to 200 µm.

**Key words:** lead, Sincrotron Radiation X-Ray Microfluorescence, enamel and teeth.

## 1 Introduction

Lead is one of the most hazardous environmental toxins known. Dental enamel is known to accumulate high amounts of Pb in its surface (Cleymaet et al., 1991a; b; c; d; Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et al., 2007). This superficial localization of Pb turns dental enamel into a potential interesting marker of exposure to Pb. Indeed, some studies showed a relationship between the Pb in surface enamel and environmental Pb exposure in permanent teeth (Cleymaet et al., 1991a; b; c; d) and in deciduous teeth (Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et al., 2007; de Almeida et al., 2008). These studies reported Pb concentration in surface enamel in agreement with the environment where people lived.

Lead is found in higher levels in surface enamel, and a gradient has been described in permanent (Brudevold and Steadman, 1956; Brudevold et al., 1977; Purchase and Fergusson, 1986; Arora et al., 2005) and deciduous human teeth (Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et al., 2007), with Pb levels steadily decreasing from surface to inner enamel. In a previous study (de Almeida et al., 2008) we described a *plateau* in Pb content in subsurface deciduous enamel of children living in an area notoriously contaminated with Pb. This *plateau* appeared because Pb values medians from the groups of deepest biopsies were all close to 600 µg of Pb per g of enamel in children from the contaminated area, while these Pb values medians steadily decreased in the children living in the apparently noncontaminated city (from 278 to 121 µg/g).

We have investigated the Pb exposure in 4- to 8-year-old children in the superficial enamel (Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et al., 2007; de Almeida et al., 2008; Costa de Almeida et al., 2009) however, many questions always arise whether the Pb concentrations found would reflect pre-eruptive or post-eruptive exposure to Pb.

Since the caries process involves the des- and remineralization of the dental enamel, we hypothesized that Pb in the fluid bathing the enamel during the caries process would be incorporated into the enamel. The depth to which Pb is incorporated is also important to know. Such information is important to be able to judge data on Pb in enamel in children.

Thus, the aim of this study is to determine whether enamel blocks incorporate lead from the remineralizing solution under conditions that cause the formation of artificial caries, and at which depths of enamel Pb is found. To be able to determine Pb with spatial resolution, block sections were analyzed by micro Sincrotron Radiation X-Ray Microfluorescence ( $\mu$ SRXRF).

## **2 Methods**

### *2.1 Experimental set-up*

The determination of the elemental composition was performed using SRmicrobeams at the X-Ray Fluorescence beamline (XRF) at Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), in Campinas, Brazil. The measurements were performed in standard geometry, the fluorescence spectrum was recorded with a SiLi detector in air atmosphere. The white beam of a bending magnet source is focussed by a fine conical capillary capable to achieve 20  $\mu$ m spatial resolution. An optical microscope is used in order to select the region of interest on the sample surface. All the spectra were analyzed using the Quantitative X-ray Analysis Software (QXAS) package, which is a conventional program for spectrum analysis. Other analysis was done through the mapping of chemical elements distributed on the teeth forming a matrix of data. The quality of the data analysis is directly related to the number of X-ray fluorescence spectra obtained for the selected area of each sample. The fluorescence data were obtained in the line of XRF at Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), Brazil, and processed with the package Quantitative X-ray

Analysis Software (QXAS). This program uses spectra generated by QXAS as input data and separates the intensities of each chemical element found in the fluorescence spectra in files themselves. From these files, the program generates the intensity maps that can be visualize in any program of treatment of images. In this work, automatic 2D scans were performed and element distribution maps were obtained with a matrix size of  $41 \times 40$  pixels resulting in an area of  $2.05 \times 2.0 \text{ mm}^2$ .

### *2.2 Enamel Block Preparation*

The experimental units were 15 bovine enamel blocks. Further cleaning was conducted with Triton X-100 solution (0.1%) and a dental brush. It was then submitted to 3 cycles of ultrasound in ultrapure water (10 min each), rinsed in ultrapure water, and allowed to dry at room temperature for 18 h in a laminar flow hood.

Flattened and polished bovine enamel blocks ( $2.0 \times 4.0 \text{ mm}$ ) were prepared (Cury et al., 2000). An adhesive strip was attached to the vestibular surface enamel and the remaining surfaces of the block were coated with dental bond adhesive and flow resin. Then the adhesive strip was removed from the buccal surface so that an area of  $8.0 \text{ mm}^2$  was exposed to the Demineralizing-Remineralizing Cycling.

Enamel blocks were randomly divided into three groups: Control Group, called "C" ( $n= 5$ ), Experimental Group 1, called "E1" ( $n= 5$ ) and Experimental Group 2, called "E2" ( $n= 5$ ).

### *2.3 Demineralizing Solution Preparation*

**The demineralizing solution was prepared based on Queiroz et al., 2008. Fifty mmol/L acetate buffer, pH 5.0 and containing 1.28 mmol/L Ca, 0.74 mmol/L Pi and**

0.03 µg F/mL was prepared from the salts  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  and NaF, respectively. This demineralizing solution was used in both pH-cycling models (de- and remineralizing) and also to induce caries-like lesions on enamel blocks subjected to the pH-cycling caries reversal model.

#### ***2.4 Demineralizing pH-Cycling Model***

The pH-cycling regimen took 8 days, and the blocks were kept at 37°C for 4 h in the demineralizing solution and 20 h in the remineralizing solution. Twice a day (before and after immersion in the demineralizing solution), the blocks were washed with distilled deionized water and subjected to one of the groups of treatments for 5 min under agitation. After treatments, the blocks were washed and individually kept in the demineralizing solution. The remineralizing solution used contained 1.5 mmol/L Ca, 0.9 mmol/L P, 150 mmol/L KCl, 0.05 µg F/mL in 0.1 mol/L Tris buffer, pH 7.0. The proportion of demineralizing and remineralizing solutions per area of block was 6.25 mL/mm<sup>2</sup> and 3.12 mL/mm<sup>2</sup>, respectively. On the 4<sup>th</sup> day, the de- and remineralizing solutions were replaced by fresh ones. After the 8<sup>th</sup> cycle, the blocks remained in the remineralizing solution for additional 24 h until the analyses (Argenta et al., 2003).

The remineralizing solutions differ among the three groups. This solution in the “C” Group contained 300 µg/L sodium acetate, in the “E1” contained 30 µg/L Pb acetate and in the “E2” contained 300 µg/L Pb acetate. These concentrations were chosen based on the paper of Costa de Almeida et al., 2009, which found a maximum Pb concentration of 36.19 µg/L in saliva of children living in an area notoriously contaminated by Pb.

The blocks of each group were included in self-curing resin and a longitudinal 300 µm thick slice was cut through the center of the tooth crown with a diamond saw, at the buccal-lingual direction, in order to obtain adequate sections for the analysis of superficial enamel. The slice was polished using sand paper with Ultrapure water as a lubricant in order to obtain a smooth and plane surface. The final thickness was 100 µm (Figure 1).

The artificial caries lesion depth was analyzed in a polarized light microscope (Axioskop 40, Carl Zeiss).

Lead was determined at the very surface of the enamel (point 1), and at another 5 points at different distances from the surface surface: 50 µm (point 2), 100 µm (point 3), 150 µm (point 4), 200 µm (point 5), 500 µm (point 6).

### ***2.5 Statistical analysis***

The distribution of relative fluorescence intensities was analyzed for normality and lead, and the distribution was not normal. The Kruskal-Wallis test was used to compare relative fluorescence intensities among the three different groups (C, E1 and E2) and among the same groups at different enamel depths. Differences were considered statistically significant at the 5% level.

## **3 Results and Discussion**

Figure 2 shows a polarized light microscopy photograph showing a caries lesion in the surface of the enamel as a black zone. The caries lesion extended to a depth of approximately 100 µm in all sections analyzed.



The spatial differences in the distribution of Pb in artificially induced enamel caries lesions are shown in Figure 3. Mean ( $\pm$ SD) of relative fluorescence intensities of Pb signals are shown for control and the 2 groups of tooth blocks exposed to Pb.

Higher Pb signals were observed in the E2 group, however, when we compared the Pb signal among the three groups (C, E1 and E2), a statistically significant difference was only observed at enamel depths of 0 (C vs E2;  $p= 0.029$ ) and 50  $\mu\text{m}$  (C vs E2 and E1 vs E2;  $p= 0.029$ ). In these two depths, the Pb relative intensity was 227.3 (SD=  $\pm 126.9$ ) for the C group; 675.0 (SD=  $\pm 508.6$ ) for the E1 group and 1592.0 (SD=  $\pm 782.6$ ) for the E2 group at the enamel surface (enamel depth = 0) and 45.0 (SD=  $\pm 72.4$ ); 90.7 (SD=  $\pm 20.6$ ) and 926.0 (SD=  $\pm 786.4$ ) for C; E1 and E2 groups, respectively, at the enamel depth of 50  $\mu\text{m}$ . This Figure also shows the decrease of Pb signal from the enamel surface toward the inside, especially of the enamel surface (enamel depth = 0) into the first depth (50  $\mu\text{m}$ ). This gradient was more pronounced in E2 group.

We also compared the relative fluorescence intensities within the same groups at different enamel depths (data not shown). In the C group, we found a statistically significant difference only between the depths of 0 and 50  $\mu\text{m}$  ( $p = 0.029$ ). In E1 and E2 groups, there was a statistically significant difference between the depths of 0 and 150  $\mu\text{m}$  ( $p= 0.029$  and  $p= 0.033$ , respectively); 0 and 200  $\mu\text{m}$  ( $p= 0.027$  and  $p= 0.029$ , respectively) and 0 and 500  $\mu\text{m}$  ( $p= 0.016$  and  $p= 0.027$ , respectively).

Zinc and Pb showed a similar trend, with much higher levels found in the enamel surface (not shown), but no differences when the 3 groups of tooth blocks were found.

Results show that the caries process enables the incorporation of Pb into the dental enamel both in the control group (in which no Pb was present in the des- and remineralizing solution) as in the Experimental groups E1 and E2 apparently in dose-dependent manner. While the E1 group (30  $\mu\text{g/L}$  Pb acetate) Pb was increased only in

the very surface of the enamel, in the E2 group (300 µg/L Pb acetate) Pb also increased in deeper enamel layers. Eventhough no differences did not reach statistical significance at the 5% level, increased absolute values of Pb were observed even at 200 µm of the surface, which is double the depth of the caries process observed under polarizing light. This may indicate that when present at increased concentration, Pb gets into the enamel to greater distances than those observed as the dark area of the caries lesion that is the more porous area due to loss of mineral (Darling, 1962).

The difference between the E1 and E2 group results suggests that there is a distinct behavior in the incorporation of Pb into the enamel depending on the concentrations found in the fluid that bathes the enamel. Saliva Pb levels ranging from 0.09 to 9.10 µg/L has been described in uncontaminated populations and from 1.64 to 36.19 µg/L in contaminated populations (Costa de Almeida et al., 2009).

This indicates that the E2 group Pb concentration is relatively high, even compared to the saliva Pb concentrations found in exposed individuals. And if one considers that the saliva levels closely follow the plasma/serum Pb levels, this results become even more interesting. For unexposed populations, plasma Pb levels are described to range from 0.14 to 0.38 µg/L (Bergdahl et al., 1999) and serum Pb levels ranging from less than 0.03 µg/L (detection limit) to 2.6 µg/L (Costa de Almeida et al., 2010). For exposed populations, plasma Pb levels are described to be 0.02–2.50 µg/L for men and 0.03–1.60 µg/L for women (Barbosa et al., 2006).

Plasma Pb levels are important when we speculate about how Pb is incorporated into the enamel, because in the maturation stage of enamel formation (in which the enamel mineral content increases from 30% to 96% (Smith, 1998)) the enamel matrix is thought to be in direct contact with plasma, and this stage may last up to 4 years in many permanent teeth (Smith, 1998).

Many studies have shown that Pb accumulates in the first 10  $\mu\text{m}$  of the enamel (Gomes et al., 2004; Arora et al., 2005; Costa de Almeida et al., 2007; de Almeida 2008). We have been using Pb determinations in the superficial enamel to obtain data on Pb in populations (Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et al., 2007; Costa de Almeida et al., 2009), and the question always arises whether the Pb concentrations found would reflect pre-eruptive or post-eruptive exposure to Pb.

This study shows that the higher levels of Pb found in the saliva of children, which we used in the E1 group, will probably only result in changes in the surface of the enamel up to 50  $\mu\text{m}$ . The Pb concentration used in the E2 group is probably much higher than the concentration found in the saliva or plasma of exposed individuals.

The changes in the distribution of Pb in the control and in the experimental group suggest that the changes in mineral caused by the carious process may alter the distribution of Pb post-eruptively. However, as Pb has been shown here to enter the enamel, a further possibility needs to be explored, which is that Pb may as well leave the dental enamel during a caries process. If the enamel with a high amount of Pb in the surface (which has matured bathed in the plasma of an individual exposed to high levels of Pb) undergoes des- and remineralization processes in an environment of low Pb, some Pb may be lost from the tooth enamel, which will then be swallowed and absorbed.

## **Conclusion**

In conclusion, this study shows for the first time that, under *in vitro* caries conditions, Pb accumulates in the very surface of the dental enamel under control and the tested Pb concentration of 30  $\mu\text{g/L}$ , and no significant incorporation of Pb found deeper than 50  $\mu\text{m}$  under these conditions. The exposure of the enamel to 300  $\mu\text{g/L}$  of Pb in the

des- and remineralizing solution resulted in the incorporation of Pb into deeper enamel layers, reaching up to 200 µm.

### **Acknowledgements**

We would like to acknowledge Dr. Carlos Alberto Perez for helping during the analysis at the XRF beamline. This research was partially supported by the Synchrotron Light National Laboratory (LNLS/CNPq), Brazil. This study was also supported by FAPESP and CNPq.

### References

**Argenta RMO, Tabchoury CPM, Cury JA., 2003. A modified pHcycling model to evaluate fluoride effect on enamel demineralization. Braz Oral Res. 17:241-246.**

**Arora, M., Chan, S.W., Ryan, C.G., Kennedy, B.J., Walker, D.M., 2005. Spatial distribution of lead in enamel and coronal dentine of wistar rats. Biol Trace Elem Res. 105,159-170.**

Barbosa F Jr, Corrêa Rodrigues MH, Buzalaf MR, Krug FJ, Gerlach RF, Tanus-Santos JE., 2006. Evaluation of the use of salivary lead levels as a surrogate of blood lead or plasma lead levels in lead exposed subjects. Arch Toxicol.; 80: 633-7.

Bergdahl IA, Vahter M, Counter SA, Schütz A, Buchanan LH, Ortega F, Laurell G, Skerfving S., 1999. Lead in plasma and whole blood from lead-exposed children. Environ Res. 80: 25-33.

Brudevold, F., Aasenden, R., Srinivasian, B.N., Bakhos, Y., 1977. Lead in enamel and saliva, dental caries and the use of enamel biopsies for measuring past exposure to lead. *J Dent Res.* 56,1165-1171.

Brudevold, F., Steadman, L.T., 1956. The distribution of lead in human enamel. *J Dent Res.* 35,430-437.

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

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

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

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

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

Costa de Almeida GR, de Freitas Tavares CF, de Souza AM, Sampaio de Sousa T, Rodrigues Funayama CA, Barbosa F Jr, Tanus-Santos JE, Gerlach RF., 2010. Whole blood, serum, and saliva lead concentrations in 6- to 8-year-old children. *Sci Total Environ.* 408:1551-6.

**Costa de Almeida GR, Saraiva MCP, Barbosa F Jr, Krug FJ, Cury JA, Sousa MLR, Buzalaf MAR, Gerlach RF., 2007. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. Environ Res. 104: 337-45.**

**Cury JA, Rebelo MAB, Del Bel Cury AA, Derbyshire MTV, Tabchoury CPM., 2000. Biochemical composition and cariogenicity of dental plaque formed in the presence of sucrose or glucose and fructose. Caries Res. 34:491-497.**

Darling AI., 1962. Decay of the teeth. Ir J Med Sci. 438:262-71.

de Almeida GR, Guerra CS, Tanus-Santos JE, Barbosa F Jr, Gerlach RF., 2008. 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.; 107: 264-70.

**Gomes, V.E., Sousa, M.L.R., Saraiva, M.C.P., Barbosa, Jr. F., Krug, F.J., Cury, J.A., Gerlach, R.F., 2004. In vivo studies on lead content of enamel surface of deciduous teeth of preeschool children. Sci Total Environ. 320,25-35.**

**Purchase, N.G., Fergusson, J.E., 1986. Lead in teeth: the influence of the tooth type and the sample within a tooth on lead levels. Sci Total Environ. 52,239-250.**

Queiroz CS, Hara AT, Paes Leme AF, Cury JA., 2008. pH-cycling models to evaluate the effect of low fluoride dentifrice on enamel de- and remineralization. Braz Dent J.;19:21-7.

Smith, C.E., 1998. Cellular and chemical events during enamel maturation. Crit Rev Oral Biol Med. 9,128-161.

**Anatomical variations in Ca, K, Zn, Pb, Cu, Mn, and Sr  
determined by micro X-Ray Fluorescence using Synchrotron  
Radiation in shed primary teeth with known differences in lead  
content**

**Carolina de Souza-Guerra<sup>1</sup>, Regina Cely Barroso<sup>2</sup>, André Pereira de Almeida<sup>3</sup>, Iza  
Teixeira Alves Peixoto<sup>1</sup>, Frederico Barbosa de Sousa<sup>4</sup>, Silvana Moreira<sup>5</sup>, Raquel  
Fernanda Gerlach<sup>6\*</sup>**

<sup>1</sup> Dental School of Piracicaba, State University of Campinas, FOP/UNICAMP, P.O.

Box 13414-903, Piracicaba, SP, Brazil, carolforpusp@hotmail.com.

<sup>2</sup> State University of Rio de Janeiro, IF/UERJ, P.O. Box 20559-900, Rio de Janeiro, RJ,  
Brazil, cely\_barroso@hotmail.com.

<sup>3</sup> Laboratory of Nuclear Instrumentation; COPPE/UFRJ, P.O. Box 68509, 21941-972,  
Rio de Janeiro, RJ, Brazil, apalmeid@gmail.com.

<sup>4</sup> State University of Paraiba, UFPB, P.O. Box 58051-900, Joao Pessoa, PB, Brazil,  
fredericosousa@hotmail.com.

<sup>5</sup> State University of Campinas, FEC/UNICAMP, P.O. Box 13083-852, Campinas, SP, Brazil,  
silvana@fec.unicamp.br.

<sup>6</sup> Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo, FORP/USP, P.O. Box 14040-904,  
Ribeirao Preto, SP, Brazil, rfgerlach@forp.usp.br.

\* To whom correspondence should be addressed at: Departamento de Morfologia,  
Estomatologia e Fisiologia, Universidade de Sao Paulo, FORP/USP, Av. do Cafe, S/N,  
Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirao Preto-SP, Brazil. Phone: +55 16 3602-4065  
FAX: +55 16 3602-4102 e-mail: rfgerlach@forp.usp.br

**Short Title:** Elemental variations in primary teeth by  $\mu$ -SRXRF

**Abstract**

Shed teeth have been proposed as trace element biomarkers, but the precise differences in the distribution of elements in teeth are unknown. This study determined variations in the spatial distribution of Ca, K, Zn, Pb, Mn, Cu, and Sr in four anatomical locations: superficial enamel (SE, 0-10  $\mu\text{m}$ ), subsuperficial enamel (SSE, 10-30  $\mu\text{m}$ ), primary dentine (PD), and secondary dentine (SD). Five primary incisors were analyzed by micro Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence ( $\mu\text{-SRXRF}$ ). Two teeth had low concentrations of lead in the SE ( $< 250 \mu\text{g/g}$ ), while 3 contained very high lead concentrations in the SE ( $> 2,000 \mu\text{g/g}$ ). Teeth were sliced, and five spot measurements (20  $\mu\text{m}$  beam diameter) were accomplished in each location. The data are shown as absolute values and as the ratio between the different elements and Ca. The distribution of K was close to that of Ca. Zn was the third most abundant element, with the highest levels being found in the SE and SD and low levels being detected in the PD. Increasing Sr levels were found ongoing from the enamel to the dentine, with the highest levels being found in the SD, a distribution that was unique. Pb, Mn, and Cu exhibited a similar trend, with higher signals for these elements being detected in the SE. In conclusion, this study confirms the heterogeneous distribution of different elements in the tooth, clearly highlighting the importance of the first 10  $\mu\text{m}$  of the SE for determination of some elements, such as Zn, Pb, Mn, and Cu.

**Keywords:** Ca, K, Zn, Pb, Cu, Mn, Sr,  $\mu\text{-SRXRF}$ , enamel, dentine, and primary teeth.



## 1. INTRODUCTION

The human teeth have been shown to be valuable biomarkers of trace elements. In the past, dentine, an inner tissue of the tooth that has many biochemical similarities with the bone, was important past marker of exposure to lead in children (Needleman et al., 1972). Results concerning the lead content in the dentine were key for studies demonstrating an association between performance in various psychological and classroom performance tests and prior exposure to higher amounts of lead (Needleman et al., 1979). Since dentine sampling can only be accomplished in shed teeth, determination of lead in the blood has been used in more recent epidemiological studies and for routine screening of lead in children. However, lead screening using blood samples has some shortcomings, particularly in nations where it is not routinely performed, and where low lead levels are anticipated.

Under such circumstances, samples from a tissue that accumulates lead would be desirable. The dental enamel is known to accumulate high amounts of lead on its surface (Brudevold et al., 1975) (Cleymaet et al., 1991b) (Cleymaet et al., 1991a). This happens due to the unique mineralization process of the enamel (called enamel maturation), during which enamel mineralization increases from ~30% to 95% over the course of many years in permanent teeth (Smith, 1998). Lead and some other elements accumulate on the surface of the enamel (through which they enter the tissue) as a result of their physicochemical behavior in an environment where apatite is formed (Brown et al., 2004). This unexpected superficial localization of lead makes the dental enamel a potential interesting marker of exposure to lead. Indeed, an increasing number of recent studies points to superficial enamel as a reliable marker of exposure to lead (Gomes et al., 2004) (Costa de Almeida et al., 2007) (de Almeida et al., 2008).

However, the enamel still is not a valid biomarker of exposure to lead. Questions concerning the anatomical distribution of lead (and also of other elements) in the enamel as well as the lead concentrations found in the different parts of the enamel in exposed individuals compared with those with low exposure to lead still have to be answered. Some recent studies have failed to demonstrate the presence of higher amounts of lead within the very first micrometers of the dental enamel (Uryu et al., 2003) previously described in studies that determined lead in enamel samples by quantitative techniques (Brudevold et al., 1975) (Cleymaet et al., 1991a; Cleymaet et al., 1991b) (Gomes et al., 2004) (Costa de Almeida et al., 2007; de Almeida et al., 2008). A few studies with sufficient resolution and sensitivity have clearly shown that the superficial enamel contains high amounts of lead compared with the inner enamel or the dentine, and that this lead had been incorporated prior to tooth eruption (Arora et al., 2005) (Arora et al., 2006).

So far, no study has compared the amounts of lead and other trace elements in different anatomical locations of the enamel and dentine from human teeth known to contain different concentrations of lead, particularly within the first 10  $\mu\text{m}$  of the superficial enamel. Because the distribution of other elements may be altered in teeth formed in the presence of high amounts of lead, the distribution of these elements may also provide interesting information for the formulation of hypotheses that need to be later tested by quantitative techniques.

Therefore, this study aimed at investigating variations in the spatial distribution of Ca, K, Zn, Pb, Mn, Cu, and Sr in four anatomical locations: the superficial enamel (SE, 0-10  $\mu\text{m}$ ), the subsuperficial enamel (SSE, 10-30  $\mu\text{m}$ ), the primary dentine (PD), and the secondary dentine (SD) of primary incisors by micro Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence ( $\mu\text{-SRXRF}$ ), a semi-quantitative technique with spatial resolution. Two of the 5 teeth selected for this study had low concentrations of lead in the SE ( $< 250 \mu\text{g/g}$ ), while 3 were included for their very high lead concentrations in the SE ( $> 2,000 \mu\text{g/g}$ ).

## **2. MATERIALS AND METHODS**

*2.1. Sample.* Due to the long time necessary for analysis by micro Synchrotron Radiation X-Ray Fluorescence ( $\mu\text{-SRXRF}$ ), only representative samples were analyzed. The better the initial sample was selected and prepared, the better the spatial and elemental information would be. The teeth employed in this study were obtained under a study proposal submitted to the Committee of Ethics in Research with Human Subjects of the Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo (CEP/FORP/USP approval protocol no.2007.1.1016.58.8), according to the Resolution 196/96 of the National Commission of Ethics in Research with Human Subjects. Children attending schools in Ribeirao Preto, Sao Paulo State, and Santo Amaro, Bahia State, Brazil were asked to donate 3 shed primary teeth. The tooth donation campaign coordinated by C.S.-G took place in 2007 and 2008. Children were asked to bring their primary teeth to the teacher, who collected them in labeled tubes. Children could only donate their teeth when parents or a guardian had signed a tooth donation form.

Five teeth were selected for this study, based on the amounts of lead determined in the SE by Ion-coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS). Two were from children studying in Ribeirão Preto, SP (called RP1 and RP2) and contained low concentrations of lead (less than  $250 \mu\text{g/g}$  in the superficial enamel); 3 had been collected in Santo Amaro, BA (called SA1, SA2 and SA3) and had high lead concentrations (all presented more than  $2,000 \mu\text{g/g}$ ). Details on lead determination by ICP-MS are described elsewhere (Costa de Almeida et al., 2010). Since lead is a ubiquitous environmental contaminant that accumulates in teeth, a previous determination of lead was important to ensure that teeth with truly different background exposures to this element

would be included. Although the majority of the children from Ribeirao Preto, SP, displayed low levels of lead in the SE, some do have high concentrations (Costa de Almeida et al., 2007) (de Almeida et al., 2008). Therefore, this initial screening was particularly useful. Santo Amaro, BA, on the other hand, is an area exhibiting one of the highest environmental contaminations with lead in the world, with reported lead concentrations in the dust found inside houses reaching 10,000 ppm (Silvany-Neto et al., 1989), a result of a lead ore smelter which operated in this city from 1960 to 1993.

*2.2. Sample Preparation.* The 5 selected teeth were prepared as follows. A longitudinal section in the bucco-lingual direction was performed, which divided the tooth crown into two halves. Care was taken to avoid the labial area where the acid etch procedure had been performed for determination of lead and phosphorus. The half with no superficial etching was further processed for  $\mu$ -SRXRF. A 300  $\mu$ m section was initially made with a diamond saw. This section was polished with sandpaper, so that a smooth and plane surface with a final thickness of 100  $\mu$ m was obtained. Sections were analyzed by polarized light microscopy, to verify whether the teeth had caries or other alterations. All 5 teeth were sound. Ultrapure water was used as the lubricant. Thereafter, the section was soaked in hydrogen peroxide (10% v/v) for 15 min, followed by ultrasonic cleaning in Ultrapure Water for 30 min (5 changes of water). Sections were then dried in a laminar flow hood at room temperature and stored in an individual container free of metals.

*2.3. Experimental Setup.* The determination of the elemental composition in the teeth was performed using SR microbeams at the X-Ray Fluorescence beamline (XRF), in the Synchrotron Light National Laboratory (LNLS), in Campinas, Brazil. The measurements were carried out in standard geometry. The fluorescence spectrum was recorded with a SiLi detector in air atmosphere. The white beam of a bending magnet source was focused by a fine conical capillary capable of achieving a spatial resolution of 20  $\mu$ m (beam diameter). An optical microscope was used, in order to select the region of interest on the sample surface. Photographs from the analyzed areas were taken with a digital camera. The acquired spectra were analyzed using the Quantitative X-ray Analysis Software (QXAS) package, in order to obtain the intensities of the characteristic X-rays (Bernasconi, 1996). The elements K, Mn, Cu, Zn, Sr, and Pb were identified.

The sample was positioned in the image plane within an accuracy of 0.5  $\mu$ m by means of a 3 axis (x, y, z) remote-controlled stage. Figure 1 shows the four anatomical areas (SE, SSE, PD, SD) analyzed by bidimensional (x, y) scanning in each tooth section. The spectra from SE were acquired in such a way that half of the beam area would be on the enamel and the other half, outside (Figure 2). Each spot was irradiated for about 300 s. The mean elemental levels of

K, Mn, Cu, Zn, Sr, and Pb in the samples were achieved after five measurements had been accomplished on each analyzed area.

### 3. RESULTS

Table 1 lists the concentrations of lead in the SE (0-3  $\mu\text{m}$ ) and inner dentine measured by ICP-MS from the 5 teeth used in this study. The data are expressed as  $\mu\text{g/g}$  of dry enamel and dry dentine, and indicate that the 5 teeth contain very different concentrations of lead: RP1 and RP2 have relatively low lead concentrations (compared with previous studies on the SE, as reported by de Almeida et al., 2008), while SA1, SA2 and SA3 present very high lead concentrations. The concentrations of lead found in the SE of the teeth donated by the children from Santo Amaro are 10 to 23 times higher than those detected in the teeth from children living in Ribeirao Preto.

Ca is abundant in teeth and its content is relatively constant, so the calcium level across a line from the dentine (SD) toward the SE was determined. The analyzed points were measured at a distance of approximately 20  $\mu\text{m}$  from each other. As expected, Ca intensity is higher in the enamel than in the dentine (Figure 3) (Angmar et al., 1963). The distribution of Ca in the enamel and dentine is in accordance with previous studies that determined mean calcium values of 37.4% (weight%) for the dental enamel (Brudevold, 1967) and 26.5% for the dentine (Robinson et al., 1971).

Ca can be assumed to be constant in the enamel, and it was thus employed as an internal standard. The background of each spectrum was subtracted, and the fluorescent counts of each element were normalized by the fluorescent counts of Ca, in order to assess the changes in the elemental concentration. Figure 4 depicts the results for the K/Ca, Mn/Ca, Cu/Ca, Zn/Ca, Sr/Ca, and Pb/Ca ratios of the fluorescent counts obtained from each analyzed area in all the teeth. The mean elemental levels determined for K, Mn, Cu, Zn, Sr, and Pb are also presented in Figure 5.

In the present study, K distribution in all the teeth closely resembles that of Ca, K being the second most abundant element. Some abundant elements like P were not detected, because their levels are below the detection limit of the technique. Zn is the third most abundant element, with the highest levels being found in the SE and SD, and low levels being detected in the PD, for all the 5 teeth (Figure 5). Increasing levels of Sr can be found ongoing from the enamel to the dentine, with the highest levels being detected in the SD, a distribution that was unique among the tested elements.

The distribution of Pb and Cu are similar, with much higher levels being found in the SE only. Increased Pb signal is observed in the SE both in terms of absolute values as well as in terms of Pb/Ca ratios. Higher lead signals are detected in the teeth collected in Santo Amaro,

BA. However, no statistical comparison is possible. The RP1 tooth also contains 3 times more lead in the SE compared with the SSE, and the lead signal is of the same magnitude as the lead signal displayed by the SE of the SA2 tooth. Indeed, the latter was the tooth exhibiting the highest lead concentrations in both the enamel and the dentine, as determined by means of a well established quantitative methodology.

As in the cases of Pb, Mn (in 3 out of 5 teeth), and Cu (in 2 out of 5), the Zn signal displayed by the SE was also higher compared with the other tooth regions, which became clearer after normalization by calcium intensity (Figure 5).

#### **4. DISCUSSION**

This study describes the distribution of intensities relative to K, Zn, Pb, Cu, Mn, and Sr normalized by Ca as determined by  $\mu$ -SRXRF in 4 very distinct anatomical regions, in 5 primary teeth with different backgrounds regarding exposure to lead. To our knowledge, the distribution of these elements in these specific locations in teeth with different backgrounds of lead exposure has not been examined by  $\mu$ -SRXRF so far.

A five-fold increase in lead content is observed when Pb/Ca ratios obtained in the SE are compared with those detected in the other analyzed anatomical areas. This is in sharp contrast with the numbers depicted in Table 1, in which a much broader variation in the lead concentrations of the SE is found, being up to 50-fold the value of lead concentration determined in the dentine. The lead concentrations observed in the dentine of these 5 teeth (Table 1) are within the ranges described for primary dentine (Needleman et al., 1972).

Results of relative calcium intensities across the dentine and the enamel are consistent with the expected pattern, and the distribution of some elements is also consistent with the intensities described in the literature using  $\mu$ -SRXRF (Anjos, 2004) (de Souza Guerra et al., 2009). Some important novel conclusions can be drawn from the present study, particularly on the spatial distribution of the elements, their relative amounts, and common pitfalls that have influenced results obtained by means of the  $\mu$ -SRXRF technique.

First of all, this investigation confirms the heterogeneous distribution of most of the tested elements in the different anatomical locations studied here. This is anticipated by the way the different parts of these tissues are formed, and has also been well described for certain elements in earlier studies (Brudevold et al., 1975; Robinson, 1995) (Brudevold et al., 1975; for detailed description see Robinson et al., 1995). Therefore, data on Zn, Pb, Cu, Mn, and Sr must be obtained taking the sampled anatomical site into account. Using well established quantitative techniques, some studies have indeed found differences in the amounts of lead present in different regions of the tooth (Begerow et al., 1994). However, when the whole tooth is

dissolved in acid, the higher amount of lead found in the SE will be under-represented, so differences between regions might be even greater. Furthermore, it is possible that many studies (not cited here) have not found differences in the distribution of lead in different anatomical regions for this same reason, and this might also be valid for other elements with heterogeneous distribution. Even though some investigations have employed  $\mu$ -SRXRF or laser ablation-ICPMS in the past, these studies understandably failed to show increased amounts of lead in the SE (Bloch et al., 1998) (Kang et al., 2004) (Uryu et al., 2003), probably because a large volume was sampled in comparison with the small volume containing high concentration of lead (or any other element).

Second, when Zn, Pb, Cu, Mn, and Sr are determined, it may be necessary to analyze the very first micrometers of the enamel. We tentatively tried to obtain the signal characteristic from the very first micrometers of the SE by positioning half of the beam area on the superficial enamel, which resulted in a radius of approximately 10  $\mu$ m. In this way, we assume that most of the signal probably stems from the very first micrometers of the SE. Clearly, if we had not done so, we would not have detected increased amounts of Zn, Pb, and Mn in the SE, since in the SSE samples (which are derived from the superficial 10- to 30  $\mu$ m) very low amounts of these elements were found. We know that this is not the standard geometry used for data acquisition, and that there may be problems with this unconventional geometry. Nonetheless, the results are very consistent with data obtained by quantitative techniques on the SE (Cleymaet et al., 1991a; Cleymaet et al., 1991b; Costa de Almeida et al., 2009; Costa de Almeida et al., 2007; de Almeida et al., 2008; Gomes et al., 2004; Robinson, 1995) and highlight the importance of determining microelements in different areas of the tooth at the micrometer-scale. The development of high brilliance high energy X-ray sources coupled with advances in manufacturing technologies of focusing optics has led to significant improvements in sub-micrometer probes for  $\mu$ -SRXRF analysis (Lombi E., 2009; Marcus et al., 2004; Sutton S.R., 1994). Within this perspective, synchrotron-based analytical techniques, such as  $\mu$ -SRXRF, will play an important role by offering unique means of describing the accumulation of certain elements within the very first micrometers, and not only lead, for which this information is already known.

Third, our data suggest that, as in the case of Ca and K, in certain locations some other elements (Zn, Pb, and Mn in the SE; and Zn and Sr in the SD) appear to have similar distributions, which may indicate that this co-localization probably has biological relevance. Moreover, our results may aid better understanding of processes like enamel and dentin mineralization.

The differences in calcium content in teeth with caries and hypomaturation need to be studied, as they may impact results of investigations like ours, which makes use of element-to-calcium ratios for data analysis.

The present study demonstrates that clear differences in the signals of certain elements can be obtained at specific anatomical locations within the enamel and dentine, which needs to be further explored.

Previous works have shown that tooth concentrations of lead and zinc, and to some extent mercury, are significantly affected by caries status, root status, and tooth group. The use of teeth without caries and without roots, collected from one tooth group only (upper incisors), has probably had a positive effect on the data reported here, decreasing the variability of our results. Most previous studies included teeth of many tooth groups; for instance, incisors, canines, and molars. However, the number of teeth available is strongly reduced when this restriction criterion is employed. The advantages of using a homogeneous material must thus be weighed against the benefits of dealing with a larger number of teeth, which, in most cases, cannot be analyzed by  $\mu$ -SRXRF.

Some studies using  $\mu$ -SRXRF have carried out only one measure per location, while others have accomplished duplicate or triplicate measures. Quintuplicate measurements were performed in the present study, which was very important for reduction of the variability of our data.

The lack of attention to the way the different parts of the teeth are formed and the lack of understanding of the limitations of the techniques (together with the increase in the availability of microelement determination techniques) have resulted in a wealth of publications, mostly based on the analysis of few tooth samples. Even though our investigation was also conducted on a few teeth, those were all primary incisors, and with very distinct exposure to lead, one of the elements of interest that gave rise to this study.

Unfortunately, the inconsistency of the data on the distribution and concentration of lead in teeth may be one reason for the lack of interest in teeth as biomarkers of exposure to this toxic element. In fact, several studies in the past have shown that teeth are valuable biomarkers of trace elements, as well as a readily accessible biological tissue for their analysis (Cleymaet et al., 1991b; Needleman et al., 1979; Needleman et al., 1972) (Costa de Almeida et al., 2007; de Almeida et al., 2008; Gomes et al., 2004; Rabinowitz, 1991).

Efforts toward the adequate assessment of lead and other elements in teeth will help in the establishment of the concentrations that indicate undue exposure. This may be of great importance for public health. Lead is a neurotoxic metal that is ubiquitously found in the environment, and many children may suffer from the undue exposure to excessive levels during

the first years of life. Lead is not determined in the blood of children in many nations, and even where it is, one blood lead determination is not adequate to determine low lead exposures can be deleterious for health. Lead measurement in the bone requires expensive equipment for *in vivo* lead determination, and this technique varies too widely in both children and young adults, besides taking at least 30 minutes for data acquisition *in vivo* (Hu et al., 2007). Therefore, the use of teeth (particularly using a superficial enamel acid etch technique that requires 20 seconds for sample collection) could be a very important alternative to assess exposure to lead. Reconciling data on lead distribution in teeth by different techniques is essential for researchers to feel confident with the use of teeth for lead determination.

## **5. CONCLUSION**

In conclusion, the present study confirms the heterogeneous distribution of different elements in teeth, clearly highlighting the importance of the first 10  $\mu\text{m}$  of the superficial enamel for determination of some elements, such as Zn, Pb, Mn, and Cu. By using the  $\mu\text{-SRXRF}$  technique, it is possible to evaluate the spatial distribution of elements.

The relative fluorescence intensity of calcium served as an internal standard to normalize variations in the elemental distribution, but did not modify the distribution of elements. K was the second most abundant element, and its distribution was similar to that of Ca. Zn was the third most abundant element, with the highest levels of Zn being found in the SE and SD, and low levels being detected in the PD in all 5 teeth. Increasing levels of Sr were found ongoing from the enamel to the dentine, a distribution that was unique among the tested elements. Pb, Mn, and Cu exhibited a similar trend, with higher Pb signal being found in the SE.

## **FUNDING**

This work was partially supported by the Synchrotron Light National Laboratory (LNLS/CNPq), Brazil. This work was also supported by the State of Sao Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Sao Paulo, FAPESP) and the National (Brazilian) Research Council (Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq).



## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We would like to acknowledge Dr. Carlos Alberto Perez for help during the analysis at the XRF beamline and Prof. Dr. Fernando Barbosa Junior for the analysis of the samples by ICP-MS, which is part of an ongoing collaboration that includes analyses of a very large number of teeth from different States of Brazil.

## REFERENCES

- Angmar B, Carlstrom D, Glas JE. Studies on the ultrastructure of dental enamel. IV. The mineralization of normal human enamel. *J Ultrastruct Res* 1963; 8: 12-23.
- Anjos MJ, Barroso, R.C., Perez, C.A., Braz, D., Moreira, S., Dias, K.R.H.C., and Lopes, R.T. Elemental mapping of teeth using  $\mu$ SRXRF. *Nucl. Instr. and Meth. B* 2004; 213: 569-573.
- Arora M, Chan SW, Ryan CG, Kennedy BJ, Walker DM. Spatial distribution of lead in enamel and coronal dentine of wistar rats. *Biol Trace Elem Res* 2005; 105: 159-70.
- Arora M, Kennedy BJ, Elhlou S, Pearson NJ, Walker DM, Bayl P, et al. Spatial distribution of lead in human primary teeth as a biomarker of pre- and neonatal lead exposure. *Sci Total Environ* 2006; 371: 55-62.
- Begerow J, Freier I, Turfeld M, Kramer U, Dunemann L. Internal lead and cadmium exposure in 6-year-old children from western and eastern Germany. *Int Arch Occup Environ Health* 1994; 66: 243-8.
- Bernasconi G, and Tajani, A. Quantitative X-ray Analysis System (QXAS) Software, Package: Documentation Version 1.2, International Atomic Energy Agency, Vienna, Austria. 1996.
- Bloch P, Shapiro IM, Soule L, Close A, Revich B. Assessment of lead exposure of children from K-XRF measurements of shed teeth. *Appl Radiat Isot* 1998; 49: 703-5.
- Brown CJ, Chenery SR, Smith B, Mason C, Tomkins A, Roberts GJ, et al. Environmental influences on the trace element content of teeth--implications for disease and nutritional status. *Arch Oral Biol* 2004; 49: 705-17.
- Brudevold F, and Soremark, R. . Chemistry of the mineral phase of enamel. In *Structure and chemical organization of teeth* (A.E.W. Miles, Ed). Academic Press, London 1967: 251-267.
- 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* 1975; 20: 667-73.
- 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* 1991a; 19: 107-11.
- Cleymaet R, Retief DH, 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* 1991b; 104: 175-89.

- Costa de Almeida GR, de Freitas Tavares CF, de Souza AM, Sampaio de Sousa T, Rodrigues Funayama CA, Barbosa F, Jr., et al. Whole blood, serum, and saliva lead concentrations in 6- to 8-year-old children. *Sci Total Environ* 2010; 408: 1551-6.
- 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, Pereira Saraiva Mda C, Barbosa F, Jr., Krug FJ, Cury JA, Rosario de Sousa Mda L, et al. Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ Res* 2007; 104: 337-45.
- 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: 264-70.
- de Souza Guerra C, Fernanda Gerlach R, Graciele Villela Pinto N, Coutinho Cardoso S, Moreira S, Pereira de Almeida A, et al. X-ray fluorescence with synchrotron radiation to elemental analysis of lead and calcium content of primary teeth. *Appl Radiat Isot* 2009.
- Gomes VE, Rosario de Sousa Mda L, Barbosa F, Jr., Krug FJ, Pereira Saraiva Mda C, Cury JA, et al. In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Sci Total Environ* 2004; 320: 25-35.
- Hu H, Shih R, Rothenberg S, Schwartz BS. The epidemiology of lead toxicity in adults: measuring dose and consideration of other methodologic issues. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 455-62.
- Kang D, Amarasiriwardena D, Goodman AH. Application of laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry (LA-ICP-MS) to investigate trace metal spatial distributions in human tooth enamel and dentine growth layers and pulp. *Anal Bioanal Chem* 2004; 378: 1608-15.
- Lombi E. SJ. Synchrotron-based techniques for plant and soil science: opportunities, challenges and future perspectives. *Plant Soil* 2009; 320: 1-35.
- Marcus MA, MacDowell AA, Celestre R, Manceau A, Miller T, Padmore HA, et al. Beamline 10.3.2 at ALS: a hard X-ray microprobe for environmental and materials sciences. *J Synchrotron Radiat* 2004; 11: 239-47.
- Needleman HL, Gunnoe C, Leviton A, Reed R, Peresie H, Maher C, et al. Deficits in psychologic and classroom performance of children with elevated dentine lead levels. *N Engl J Med* 1979; 300: 689-95.

- Needleman HL, Tuncay OC, Shapiro IM. Lead levels in deciduous teeth of urban and suburban American children. *Nature* 1972; 235: 111-2.
- Rabinowitz MB. Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect* 1991; 91: 33-7.
- Robinson C, Kirkham, J., Brookes, S.J, and Roger, C.S. . Chemistry of Mature Enamel. In *Dental Enamel: formation to destruction* (C. Robinson, J. Kirkham, and R. Shore, Eds.), 1st ed, CRC Press, London.. 1995: 167-188.
- Robinson C, Weatherell JA, Hallsworth AS. Variatooon in composition of dental enamel within thin ground tooth sections. *Caries Res* 1971; 5: 44-57.
- Silvany-Neto AM, Carvalho FM, Chaves ME, Brandao AM, Tavares TM. Repeated surveillance of lead poisoning among children. *Sci Total Environ* 1989; 78: 179-86.
- Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998; 9: 128-61.
- Sutton S.R. RML, Bajt S., Jones K., and Smith J.V. Synchrotron X-ray-fluorescence microprobe - a microanalytical instrument for trace-element studies in geochemistry, cosmochemistry, and the soil and environmental sciences. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. A* 1994; 347: 412-416.
- 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* 2003; 19: 1413-6.

***Legend for Figures***

**Figure 1-** Schematic representation of the crown of a human primary lower central incisor. Superficial Enamel (SE), Subsuperficial Enamel (SSE), Primary Dentine (PD), and Secondary Dentine (SD) were analyzed for relative fluorescence intensities.

**Figure 2-** Photograph of the enamel with white circles representing the quintuplicate areas analyzed in the Superficial Enamel (SE) and Subsuperficial Enamel (SSE). Note that the beam diameter is shown as a black line (20  $\mu\text{m}$ ) inside one of the SSE circles, and that it was focused on only half the area of the SE samples constituted enamel, while the other half of the beam area was focused outside the enamel.

**Figure 3-** Scanning accomplished on the SA1 tooth, starting at the SD (point 0) and finishing at the SE (point 52).

**Figure 4-** K, Zn, Pb, Cu, Mn, and Sr relative intensities in relation to Ca in control samples (RP1 and RP2) and in the teeth with high lead concentrations (SA1, SA2, and SA3). SE: Superficial Enamel, SSE: Subsuperficial Enamel, PD: Primary Dentine, and SD: Secondary Dentine.

**Figure 5 –** Elemental distribution of Ca, K, Zn, Pb, Cu, Mn, and Sr in control samples (RP1 and RP2) and in the teeth with high lead concentrations (SA1, SA2, and SA3). SE: Superficial Enamel, SSE: Subsuperficial Enamel, PD: Primary Dentine, and SD: Secondary Dentine.

Figure 1

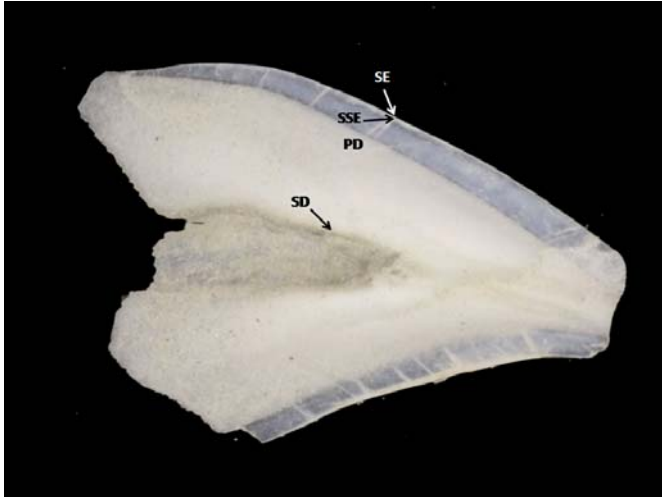


Figure 2

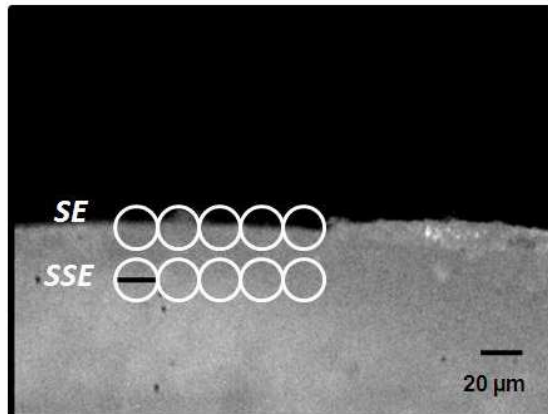
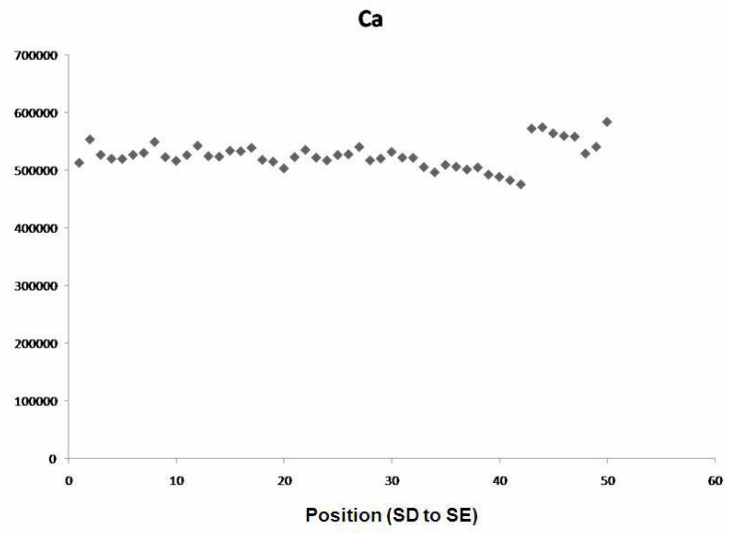
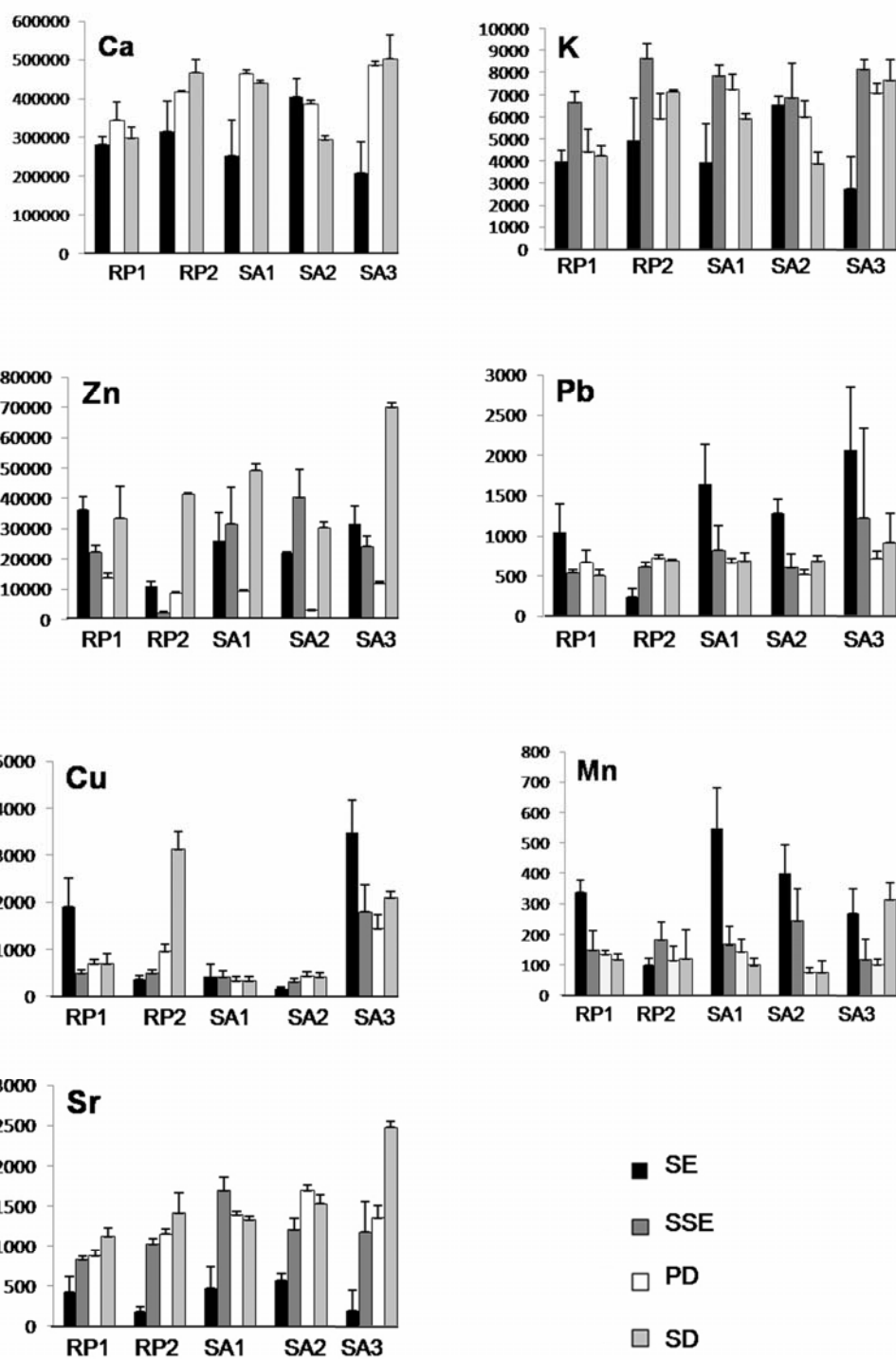


Figure 3

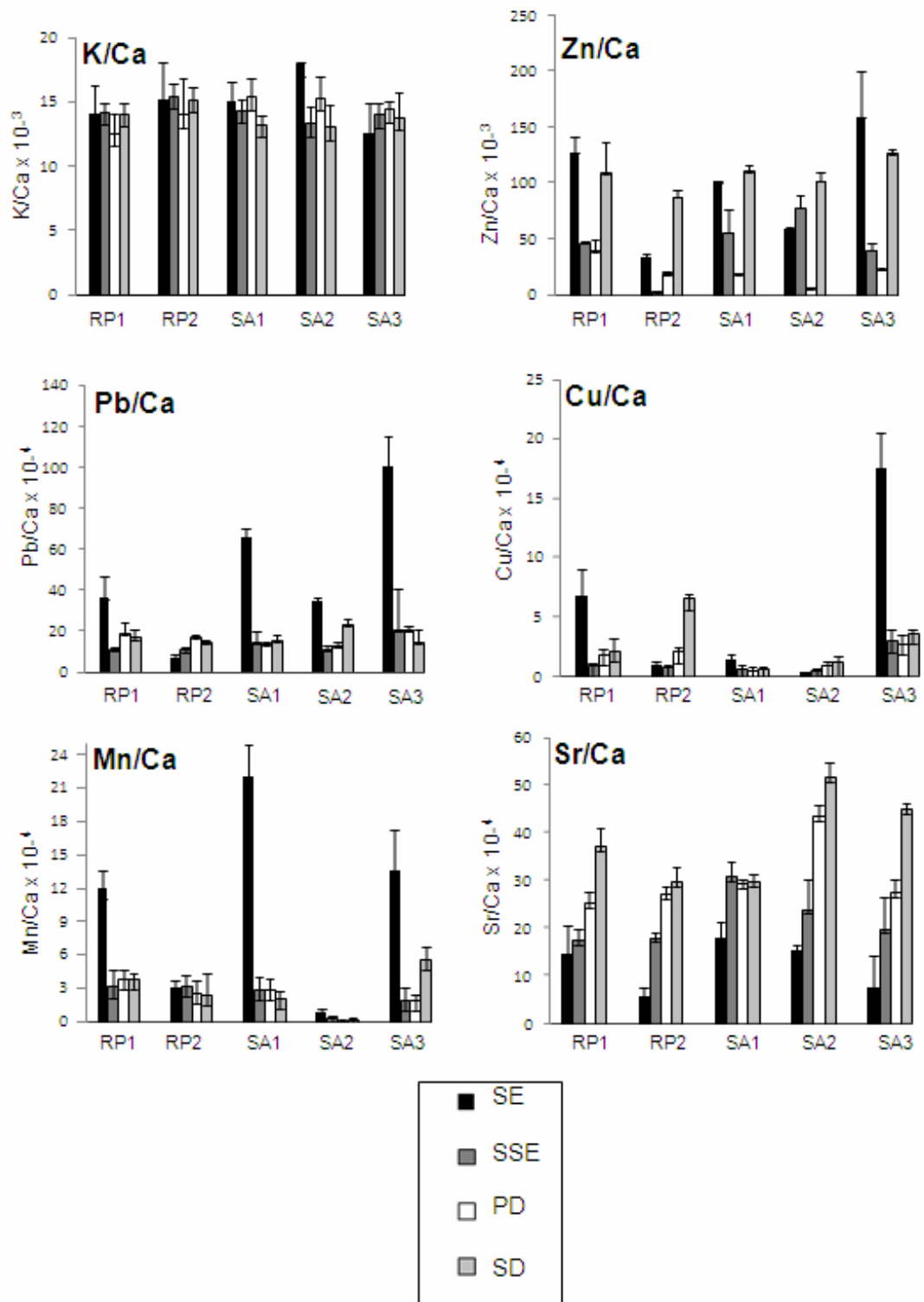


# Figure 4





**Figure 5**



**Table 1** – Lead concentration ( $\mu\text{g/g}$ ) determined in the superficial enamel (0-3  $\mu\text{m}$ ) and dentine of the primary teeth used in this study

<b>Sample</b>	<b>City</b>	<b>Pb (<math>\mu\text{g/g}</math>)* Enamel (<math>\pm\text{SD}</math>)</b>	<b>Pb (<math>\mu\text{g/g}</math>)* Dentin (<math>\pm\text{SD}</math>)</b>
<b>RP1</b>	<b>Ribeirão Preto. SP</b>	218 ( $\pm 2.04$ )	24.7 ( $\pm 0.187$ )
<b>RP2</b>	<b>Ribeirão Preto. SP</b>	224 ( $\pm 4.07$ )	39.8 ( $\pm 0.33$ )
<b>SA1</b>	<b>Santo Amaro. BA</b>	2,033 ( $\pm 15.85$ )	62.4 ( $\pm 0.39$ )
<b>SA2</b>	<b>Santo Amaro. BA</b>	5,200 ( $\pm 54.08$ )	209.5 ( $\pm 0.25$ )
<b>SA3</b>	<b>Santo Amaro. BA</b>	2,964 ( $\pm 64.31$ )	53.4 ( $\pm 0.64$ )

## **Captions**

**Figure 1-** Schematic representation of the crown of a human primary mandibular central incisor. Superficial enamel (SE), subsuperficial enamel (SSE), primary dentine (PD) and secondary dentine (SD) were the points of analysis for relative fluorescence intensities.

**Figure 2-** Photograph of the enamel with white circles representing the quintuplicate areas analyzed in the Superficial Enamel (SE) and Subsuperficial Enamel (SSE). Note that the beam diameter is shown as a black line (20  $\mu\text{m}$ ) inside one of the SSE circles, and that only around half the area of the SE samples constituted enamel, the other half of the beam area was outside the enamel.

**Figure 3-** Scanning realized in the SA1 tooth, starting at the SD (point 0), and ending in the SE (point 52).

**Figure 4 –** Elemental distribution for Ca, K, Zn, Pb, Cu, Mn, and Sr in control samples (RP1 and RP2) and the teeth with high lead concentrations (SA1, SA2, and SA3). SE: superficial enamel; SSE: subsuperficial enamel, PD: primary dentine, and SD: secondary dentine.

**Figure 5-** Ratio of K, Zn, Pb, Cu, Mn, and Sr relative intensities by Ca in control samples (RP1 and RP2) and the teeth with high lead concentrations (SA1, SA2, and SA3). SE: superficial enamel; SSE: subsuperficial enamel, PD: primary dentine, and SD: secondary dentine.

**Lead contents in the surface enamel of deciduous and permanent teeth,  
whole blood, serum, and saliva of 6- to 8-year-old children**

Glauce Regina Costa de Almeida <sup>a</sup>, Carolina de Sousa Guerra <sup>a</sup>, Fernando Barbosa Jr. <sup>b</sup>, José Eduardo Tanus-Santos <sup>c</sup>, Raquel Fernanda Gerlach <sup>\*a</sup>

<sup>a</sup> Department of Morphology, Estomatology and Physiology, Dental School of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – FORP/USP, Av. do Café, S/N, Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirao Preto-SP, Brazil.

<sup>b</sup> Department of Clinical Analysis, Toxicology and Bromatology, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirao Preto - University of Sao Paulo – FMRP/USP, Av. do Café S/N, Monte Alegre, CEP 14040-903, Ribeirao Preto-SP, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Pharmacology, Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, University of Sao Paulo – FMRP/USP, Av. Bandeirantes, 3900, Monte Alegre, CEP 14049-900, Ribeirao Preto-SP, Brazil.

\* corresponding author: R.F.Gerlach, Department of Morphology, Estomatology and Physiology - Faculdade de Odontologia de Ribeirao Preto, FORP/USP, Av. do Café, S/N, Monte Alegre, CEP 14040-904, Ribeirao Preto-SP, Brazil. Phone: +55 16 3602 4065 FAX: +55 16 3602-4102 e-mail: rfgelach@forp.usp.br

## 1. Abstract

Key words: Lead; enamel microbiopsy; whole blood; serum; saliva.

## 2. Introduction

Lead is a heavy metal hazardous to humans which is increased in polluted environments like industrial areas and large cities (Youravong et al., 2005). Despite reduction of environmental lead contamination in many nations after removal of tetraethyl lead from gasoline, lead still remains a significant public health concern (Wilhelm et al., 2002). Over the past several years, lead poisoning has attracted growing attention in the United States and other developed countries. At the same time, however, this problem has not been a subject of concern in most of the developing countries (Shen et al., 1998).

The most commonly used exposure indicator is the lead concentration in whole blood (Pb-blood). However, Pb-blood decreases gradually after exposures, since Pb-blood is considered to reflect only 2% of the lead body burden, with 94% of lead stored up in calcified tissues and the remaining 4% stored in other soft tissues (Rabinowitz et al., 1976). From a physiological viewpoint, it is reasonable to assume that the toxic effects of lead are primarily associated with lead in plasma (Pb-plasma), since those should reflect the most rapidly exchangeable fraction of lead in the bloodstream (Barbosa et al., 2005). Whereas there seems to be no difference in the lead content of Pb-plasma and blood serum (Pb-serum)(Manton et al., 2001), the words cannot be used interchangeably because the fluid in the living person is always plasma, whereas the fluid obtained after blood has clotted is serum. Also, some authors have argued that lead in saliva (Pb-saliva) may indirectly reflect the amount of Pb-plasma (Omokhodion and Crockford, 1991) since saliva is formed by the active transport of water and ions from the plasma (Humphrey and Williamson, 2001), so saliva has been suggested as a good monitor of lead exposure (P'an, 1981; Gonzalez et al., 1997).

Throughout life, lead is also stored in teeth (Brudevold and Steadman, 1956; Altshuller et al., 1962; Needleman et al., 1972, 1979; Brudevold et al., 1975, 1977; Attramadal & Jonsen, 1976; Fosse & Justesen, 1978; Grobler et al., 1985; Mackie et al., 1977; Fergusson & Purchase, 1987; Gulson, 1996; Budd et al., 1998; Bloch et al., 1998; Tvinnereim et al., 2000; Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et al., 2007; de Almeida et al., 2008). Dentine has actually been of great value for determination of past exposure to lead, since dentine lead values were the ones used to undoubtedly correlate decreased

performance in IQ tests in children with increased exposure to lead (Needleman et al., 1972, 1974, 1979). Despite these important findings observed using dentine, most of the literature on lead concentrations in teeth is controversial. Lead levels in the different dental tissues and in different tooth types vary a lot (Mackie et al., 1977; Purchase and Fergusson, 1986; Paterson et al., 1988; Gulson, 1996; Tvinnereim et al., 2000; Karahalil et al., 2007), and this fact occurs at least in part due to the mineral content differences and mineralization characteristics of these different tissues, which are usually not taken into consideration. Besides, there are many practical problems that preclude the use of bone and dentine for wide screening for lead contamination. Therefore, the most recent studies showing decreases in children's IQ use Pb-blood collected over a many years to assess past and cumulative lead exposure (Lanphear et al., 2000; Canfield et al., 2003; Chiodo et al., 2004; Canfield et al., 2005; Surkan et al., 2007). Also, there are still challenges for studies on the effect of lead in criminal behavior (Needleman et al., 1996, 2002), in which only bone lead has been determined.

Dental enamel is known to accumulate high amounts of lead in its surface (Cleymaet et al., 1991a; b; c; d; Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et al., 2007). This superficial localization of lead turns dental enamel into a potential interesting marker of exposure to lead. Indeed, some studies showed a relationship between the lead in surface enamel (Pb-enamel) and environmental lead exposure in permanent teeth (Cleymaet et al., 1991a; b; c; d) and in deciduous teeth (Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et al., 2007; de Almeida et al., 2008). Recently, we showed that superficial enamel samples from a notoriously contaminated area in Bauru, Sao Paulo State, contained 4 times more lead than samples from Ribeirao Preto, Sao Paulo State, a city with no reported source of lead contamination (Costa de Almeida et al., 2007). Further analysis of data showed that, even in Ribeirao Preto, there are children exposed to excessive amounts of lead according to data from superficial deciduous enamel (de Almeida et al., 2008). However, so far no one knows how the information of lead in the enamel of deciduous and permanent teeth correlates with lead found in the whole blood and in tissue fluids, like plasma and saliva.

Since Ribeirao Preto is a half-million city with a large variety of industrial plants, it is not surprising to find children with increased amounts of lead in their teeth.

This study was designed to obtain information on lead exposure in ~450 6 to 8-year-old children attending schools in the district of Campos Eliseos in Ribeirao Preto, to be able to correlate data on lead in two successive enamel etching tests done in vivo on

the same spot in one deciduous and in one permanent tooth with data on lead in whole blood, serum, parotid, sub-, and whole saliva.

Therefore, this study aimed at: (1) evaluating the association the Pb-enamel in two successive enamel microbiopsies in one deciduous and in one permanent tooth; (2) examining the association of Pb-enamel with Pb-blood and Pb-serum; (3) evaluating the association of Pb-enamel with whole (Pb-whole-saliva), submandibular/sublingual (Pb-sub-saliva) and parotid saliva (Pb-parotid-saliva).

### 3. Materials and methods

#### *3.1. Study population*

The study population included 444 children aged 6 to 8 years (199 boys and 245 girls), attending 4 government schools in the district of Campos Eliseos in Ribeirao Preto, Sao Paulo State, Brazil. This district was chosen because higher lead levels had been identified in a kindergarten belonging to this district in a previous study (de Almeida et al., 2008). Data from lead in saliva and ... was already published in...

The study proposal was submitted to the Committee of Ethics in Research (FORP/USP protocol no. 2006.1.797.58.5), according to Resolution 196/96 of the National Commission of Ethics in Research. Parents or a guardian signed an informed consent form prior to inclusion of the child in the study.

#### *3.2 Materials*

High purity deionized water (resistivity 18.2 MΩ cm) obtained by a Milli-Q water purification system (Milli-pore, Bedford, MA, USA) was used throughout. All employed reagents were high purity analytical grade. All transfer pipettes, centrifuge tubes, plastic bottles, autosampler cups, and glassware materials were cleaned by soaking in 10% v/v HNO<sub>3</sub> for 24 h, rinsing five times with Milli-Q water, and drying in a laminar flow hood.

#### *3.3 Sample collection*

Two successive microbiopsies were taken from the labial surface of the central maxillary permanent incisor (11 or 21) and the maxillary deciduous canine (53 or 63) of

each child. In the absence of the permanent tooth the microbiopsy was done only in the deciduous tooth and vice versa. A detailed description of the microbiopsy procedure was given by Gomes et al. (2004), which is a modified version of the method developed by Brudevold et al. (1975). Lead-free adhesive tape (Magic Tape, 810 Scotch® -3M) with a circular perforation (diameter = 1.6 mm) was firmly pressed on to the labial surface of tooth, delimiting the microbiopsy site. The sampling site was etched according to the following procedure: 5  $\mu\text{L}$  1.6 mol.L<sup>-1</sup> HCl in 70% glycerol (v/v) were applied to the area for 20 seconds during which time circular movements were made with the pipette tip. The microbiopsy solution was then transferred to an ultra-cleaned centrifuge tube (2 mL) (Axygen Scientific, Inc., Union City, USA) containing 200  $\mu\text{L}$  ultrapurified water. The surface was then rinsed once for 10 seconds with 5  $\mu\text{L}$  ultrapurified water which was then transferred to the centrifuge tube, making a final volume of 210  $\mu\text{L}$ . The tape was then removed and the tooth was washed with water for 30 seconds and dried with an air jet to receive a topical fluoride application. In this way two etch biopsy sample solutions were quantitatively obtained corresponding to two successive removals of a microlayer of surface enamel.

Three types of saliva were collected: whole saliva, saliva from the submandibular/sublingual glands (used in this text as “sub-saliva”), and saliva from the parotid gland.

Children were asked to thoroughly rinse their mouth with deionized water, and thereafter 5 mL of non-stimulated whole saliva was collected into a 50 mL Falcon tube (trace metal free, BD), which the child hold for the time of collection (around 4-6 minutes). These tubes were centrifuged (15,000 g for 5 minutes at room temperature), and the supernatant was then pipetted into an ultra-cleaned centrifuge tube (2 mL). Sub-saliva was collected in an ultra-cleaned centrifuge tube (2 mL), using a plastic Pasteur pipette, after relative isolation with cotton rolls (to prevent that this saliva would be mixed with the saliva secreted by the parotid gland). Saliva from the parotid gland was then collected using a modified Carlson-Crittenden collector (Navazesh, 1993).

Before blood collection, the skin of the child was cleaned with 70% ethanol. Venous blood samples were collected in two evacuated tubes of 6 mL, one containing EDTA (Trace Metal Free EDTA Tube, Dark Blue Cap, Vacuntainer BD, Becton-Dickinson, Brazil), and another containing no anticoagulant (Trace Metal Free No Anticoagulant, Dark Blue Cap, Vacuntainer BD, Becton-Dickinson, Brazil). The first fraction of blood was used for Pb-blood determination, and the second for Pb-serum determination.



Samples collected for Pb-serum determinations were centrifuged as soon as they were collected (800 g for 6 min at room temperature), to separate serum from whole blood, thus avoiding transference of lead from erythrocytes. Each serum fraction was then pipetted into an ultra-cleaned centrifuge tube (2 mL). All the samples were kept at -20°C until the lead determinations were performed.

At the time of analysis, the serum samples were examined with naked eye, to observe the degree of hemolysis. In some samples, this had occurred at separation. The samples with a slight discoloring were therefore included in the study. There were 21 samples with obvious erythrocyte contamination (hemolysis), so they were excluded from all data processing.

### *3.4. Chemical analyses*

To determine the mass of enamel obtained by each microbiopsy procedure, the concentration of phosphorus was determined in triplicate by the colorimetric method of Fiske and Subbarow (1925) as described in Costa de Almeida et al. (2007), assuming an enamel density of 2.95 g cm<sup>-3</sup> and a phosphorus content of 17.4% (Koo and Cury, 1998; Weidmann et al., 1967).

Lead levels were determined at the Laboratory of Metals Toxicology, University of Sao Paulo in Ribeirao Preto (Brazil), by Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry (ICP-MS). The detection limit for lead was 0.05, 0.03, and 0.02 µg/L for whole blood, serum, and saliva, respectively.

### *3.5. Statistical analysis*

The distribution of all continuous variables was analyzed for normality to select the appropriated statistical method. Lead distribution was not normally distributed in Pb-enamel. To perform the comparison of the Pb-enamel between the genders and the association of Pb-enamel with Pb-blood, Pb-serum and Pb-saliva, we use the mean lead values obtained between the first and second microbiopsies. Mann Whitney test was employed to compare Pb-enamel among the successive microbiopsies in primary and permanent teeth and between the two genders. Moreover, Pb-enamel, Pb-blood, Pb-serum and Pb-saliva values were log transformed, to normalize data for the correlations testing. These correlations were performed using Pearson's correlation coefficient ( $r$ ,  $p$ ).

A probability level of 5% was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using the Graph Pad Prism (Version 3.0).

#### 4. Results

As described in our a previous manuscript on lead in saliva, whole blood and serum based on the same cohort, many saliva and plasma samples contained lead concentrations below the detection limit and were thus excluded from the analysis (193 serum samples, 98 sub-saliva samples, and 147 parotid saliva samples).

##### *4.1 Microbiopsy Lead Levels*

The data of the successive microbiopsies according to lead concentration are shown in Table 1. For deciduous teeth (n=387), Pb-enamel in the first microbiopsy ranged from 7.9 µg/g to 2040.0 µg/g with a median of 109.3 µg/g, and Pb-enamel in the second microbiopsy ranged from 2.3 µg/g to 2409.0 µg/g with a median of 45.01 µg/g. For permanent teeth (n=261), Pb-enamel in the first microbiopsy ranged from 14.1 µg/g to 2950.0 µg/g with a median of 308.3 µg/g, and Pb-enamel in the second microbiopsy ranged from 4.4 µg/g to 3787.0 µg/g with a median of 99.7 µg/g. Permanent teeth had higher amount of Pb-enamel when compared to the Pb-enamel in deciduous teeth in both first and second microbiopsies. This difference was statistically significant ( $p < 0.0001$ ). Also, Pb-enamel in the first microbiopsy of deciduous and permanent teeth was 2.5 and 3.1 times higher when compared with the second microbiopsy, respectively, and this difference between the first and second biopsies was statistically significant ( $p < 0.0001$  in both cases).

The percentage of children with Pb-enamel  $\geq 400$  µg/g was 9% (n= 35) and 3% (n= 12) for the first and second microbiopsies in deciduous teeth, respectively, and 33% (n= 87) and 7% (n= 18) for the first and second microbiopsies in permanent teeth.

When we compared Pb-enamel according to the gender, no statistically significant difference was found in median Pb-enamel between girls and boys when all data was compared for deciduous teeth (83.59 µg/g vs 85.97 µg/g;  $p = 0.84$ ) and for permanent teeth (202.9 µg/g vs 219.5 µg/g;  $p = 0.92$ ). However, when median Pb-enamel between the two genders was compared using only Pb-enamel  $\geq 400$  µg/g, there was a significant difference in median Pb-enamel between girls and boys for deciduous teeth

(474.2 µg/g vs 910.0 µg/g;  $p= 0.02$ ), but not for permanent teeth (559.9 µg/g vs 574.8 µg/g;  $p= 0.59$ ). This difference is depicted in Figure 1.

Table 2 presents the Pearson's correlation coefficients and  $p$  values for the correlation between  $\text{Log}_{10}$  Pb-enamel in the deciduous teeth with  $\text{Log}_{10}$  Pb-enamel in the permanent teeth, for both first and second microbiopsies. All associations were statistically significant ( $p < 0.0005$ ), but those with higher Pearson's coefficients were found between the  $\text{Log}_{10}$  Pb-enamel of the first and the second biopsies in deciduous and permanent teeth (of 0.64 and 0.53, respectively), followed by the association between the second deciduous and the second permanent enamel biopsy ( $r=...$ ) ( $n=$  em todos..... ).

#### *4.2 Microbiopsy Depth*

Microbiopsy depths were normally distributed and are given in Table 3. For deciduous teeth, depth in the first microbiopsy ranged from 0.4 µm to 10.0 µm with a mean of 3.3 µm (SD=1.4) and depth in the second microbiopsy ranged from 0.2 µm to 11.4 µm with a mean of 4.1 µm (SD=1.7), indicating a final depth of 7.4 µm. For permanent teeth, depth in the first microbiopsy ranged from 0.1 µm to 11.6 µm with a mean of 3.0 µm (SD=1.4) and depth in the second microbiopsy ranged from 0.2 µm to 11.0 µm with a mean of 3.3 µm (SD=1.6). Sum of the first and second depth indicated a mean final depth of 6.3 µm in permanent teeth.

There was no statistically significant difference when all depths in deciduous and permanent teeth were compared.

#### *4.3 Lead concentration and biopsy depth*

In deciduous teeth, Pearson's correlation analysis resulted in a coefficient of -0.41 ( $p < 0.0001$ ) and -0.54 ( $p < 0.0001$ ) for first and second microbiopsies, respectively. For permanent teeth, Pearson's correlation analysis revealed a coefficient of -0.49 ( $p < 0.0001$ ) and -0.55 ( $p < 0.0001$ ) for the first and second microbiopsies, respectively.

#### *4.4 Relationship between Pb-enamel with Pb-blood*

Pearson's correlation analysis furnished a coefficient of 0.13 ( $p= 0.09$ ) for deciduous teeth and 0.09 ( $p= 0.15$ ) for permanent teeth, indicating that no statistically significant

correlation exists between Pb-enamel and Pb-blood in this sample of 6 to 8-year-old children.

#### *4.5 Relationship between Pb-enamel and Pb-serum*

Pearson's correlation analysis revealed a coefficient of 0.05 ( $p= 0.44$ ) for deciduous teeth and 0.09 ( $p= 0.32$ ) for permanent teeth, indicating that no statistically significant correlation exists between Pb-enamel and Pb-serum in this sample of 6 to 8-year-old children.

When the association between Pb-enamel and Pb-serum was examined using only lead values  $\geq 400$   $\mu\text{g/g}$ , Pearson's correlation analysis showed a coefficient of 0.65 ( $p<0.0001$ ) for deciduous teeth and 0.51 ( $p<0.0001$ ) for permanent teeth, indicating a statistically significant correlation between Pb-enamel and Pb-serum.

Figure 2 shows the correlation between  $\text{Log}_{10}$  Pb-enamel and  $\text{Log}_{10}$  Pb-serum using only Pb-enamel  $\geq 400$   $\mu\text{g/g}$  for deciduous and permanent teeth.

#### *4.6 Relationship between Pb-enamel and Pb-saliva*

In deciduous teeth, when the association between Pb-enamel and Pb-saliva was tested, the Pearson's correlation analysis revealed a coefficient of -0.04 ( $p= 0.58$ ) for whole saliva, -0.05 ( $p= 0.44$ ) for sub-saliva, and 0.04 ( $p= 0.51$ ) for parotid saliva. For permanent teeth, Pearson's correlation analysis resulted in a coefficient of -0.07 ( $p= 0.39$ ) for whole saliva, 0.07 ( $p= 0.41$ ) for sub-saliva, and -0.03 ( $p= 0.74$ ) for parotid saliva. No statistically significant correlations were found between Pb-enamel and lead levels in these 3 different salivas.

Table 4 presents the Pearson's correlation coefficient and  $p$  values for the correlations between  $\text{Log}_{10}$  Pb-enamel and  $\text{Log}_{10}$  Pb-blood,  $\text{Log}_{10}$  Pb-enamel and  $\text{Log}_{10}$  Pb-serum, and between  $\text{Log}_{10}$  Pb-enamel and  $\text{Log}_{10}$  Pb-saliva for deciduous and permanent teeth.

## 5. Discussion

Few studies have used *in vivo* microbiopsies to recover surface enamel and measure lead both in permanent (Brudevold et al. 1975; Cleymaet et al., 1991 a, b, c, d), as in deciduous teeth (Gomes et al. , 2004; Costa de Almeida et al., 2007; de Almeida et al., 2008). Furthermore, most studies have used it merely a single microbiopsy, which further complicates comparisons. The enamel microbiopsy can easily collect samples

of tooth enamel and these samples provide information that makes sense in terms of environmental contamination. This methodology is painless, easy to perform, and has proved to be suitable for epidemiological studies that require large number of individuals (Costa de Almeida et al., 2007).

Comparing our data with data from earlier studies, median Pb-enamel in the first microbiopsy of deciduous teeth (109.3  $\mu\text{g/g}$ ) was lower compared with that obtained at a similar depth (286.2  $\mu\text{g/g}$  for a non-industrial area and 457.3  $\mu\text{g/g}$  for an industrial area of Piracicaba, another city in the São Paulo State, Brazil). Median Pb-enamel in the second microbiopsy (45.9  $\mu\text{g/g}$ ) was comparable to Pb-enamel in a similar depth (fourth quartile of depth) towards the non-industrial area (42.0  $\mu\text{g/g}$ ) but not in relation to the industrial area (118.9  $\mu\text{g/g}$ ) (Gomes et al., 2004). Costa de Almeida et al., 2007, showed a median Pb-enamel of 206  $\mu\text{g/g}$  for the 247 children who participated in the study. When children were divided according to the neighborhood where they lived, the median values ranged from 127  $\mu\text{g/g}$  to 337  $\mu\text{g/g}$ , which were higher, but comparable with those of the first deciduous microbiopsy in the current study. The same study showed a very high Pb-enamel value (786  $\mu\text{g/g}$ ) in deciduous teeth of children living in a highly contaminated area located near a battery factory in Bauru, São Paulo State, Brazil. Interestingly, Pb-enamel of deciduous teeth, in present study, are of the same order of magnitude of values reported in surface permanent tooth enamel from Kenya (145  $\mu\text{g/g}$ ) (Cleymaet et al. 1991d), where very low concentrations of environmental lead have been detected.

Current data of Pb-enamel in permanent teeth were 2.5 to 8 fold less than those for permanent teeth obtained using *in vivo* enamel biopsies from urban areas in Europe (Cleymaet et al. 1991a, 1991b) and the United States of America (Brudevold et al. 1975, 1977), or for the surface enamel of extracted teeth from New Zealand (Purchase and Fergusson 1986).

Despite this difference between the studies, Pb-enamel in permanent teeth presented 2 times higher when compared with deciduous teeth. This unequal Pb-enamel between deciduous and permanent teeth can be explained by the time necessary for completion of the maturation stage of amelogenesis, that is very different in the two different human dentitions (Smith 1998). During the maturation stage, most ions are incorporated into the enamel, through its surface, in a process that takes a few months in deciduous teeth, but many years in permanent teeth. This longer maturation period probably causes the much higher lead concentrations and steeper lead gradients

described in permanent tooth surface enamel (Brudevold et al. 1975; Brudevold and Steadman 1956; Purchase and Fergusson 1986).

A significant correlation was demonstrated between the first and second microbiopsies in deciduous ( $r= 0.64$ ;  $p< 0.0001$ ) and permanent teeth ( $r= 0.53$ ;  $p< 0.0001$ ), agreeing with the results of Cleymaet et al. (1991a) who found a strong relationship between the two successive microbiopsies held in *in vivo* permanent teeth ( $r= 0.74$ ). However, according with these authors, the second microbiopsy provided more reliable results of lead concentration. Gomes et al. (2004) argued that the deeper microbiopsies also showed more consistent results due to the high variability of lead levels in the shallowest enamel microbiopsies.

When microbiopsy is employed for determination of Pb-enamel, the etched depth is a very important parameter, because of the gradient described in lead concentrations, which are greater at the outermost few micrometers, for permanent teeth (Brudevold et al., 1975, 1977; Purchase & Fergusson, 1986; Cleymaet et a., 1991 a, b, c, d) and deciduous teeth (Gomes et al., 2004; Costa de Almeida et al., 2007). In this study, this gradient could be observed in two situations: when comparing the lead concentration in the first microbiopsy, both for deciduous and in permanent teeth, with the second successive microbiopsy, which always showed lower amounts of lead, and when we correlated the lead concentration with the microbiopsy depth, which provided a negative and significant correlation, both for deciduous and in permanent teeth.

With regard to our findings about gender, when we compared all data of Pb-enamel in first and second microbiopsies of deciduous and permanent teeth, although we observed a slight difference (a higher Pb-enamel in boys), it was not statistically significant. However, when median Pb-enamel between the two genders was compared using only Pb-enamel  $\geq 400 \mu\text{g/g}$ , the result was a statistically significant difference in Pb-enamel between the genders for both the first and second microbiopsies for deciduous, but not for permanent teeth. In literature, most comparisons of lead concentrations between the genders were based on data from whole teeth. Bu-Olayan and Thomas (1999) found a statistically significant difference in lead concentration of whole deciduous teeth between females and males ( $2.42 \mu\text{g/g}$  in girls and  $2.84 \mu\text{g/g}$  in boys). However, other studies showed no statistically significant difference in lead concentrations between the genders of whole permanent (Lappalainen & Knuutila, 1981; Steenhout & Pourtois, 1981) and deciduous teeth (Mackie et al. 1977; Delves et al., 1982). The only study that compared the lead

concentrations, between the genders, in enamel surface of permanent teeth, also found no significant differences between females and males (Cleymaet et al., 1991a).

Our results did not find correlation between Pb-enamel and Pb-blood for deciduous ( $r=0.13$ ;  $p=0.09$ ) and permanent teeth ( $r=0.09$ ;  $p=0.15$ ). Therefore, we think that the lack of correlation between Pb-enamel and Pb-blood is not surprising, since Pb-blood would reflect a recent exposure, while Pb-enamel is emerging as a cumulative past marker. Using lead isotopes, Rinderknecht et al. (2005) analyzed the pre- and post-natal lead deposition in enamel of rats, and they showed that Pb-enamel reflects the Pb-blood during the amelogenesis. Pb-enamel correlated with Pb-blood in a study in which enamel samples were collected from 9.5-year-old children, the correlation between Pb-blood and Pb-enamel reached significance when Pb-enamel was compared with blood collected when the children were 7.5-year-old and correlation was still significant at the time of enamel sample collection (Cleymaet et al. 1991e). This study suggests that Pb-enamel correspond partly to exposure to lead at the time of eruption or post-eruptive development.

This is, to the best of our knowledge, the first study that has verified the correlation between Pb-enamel and Pb-serum in children. When we correlate these concentrations, using all data of Pb-enamel, no statistically significant difference was found for both deciduous and permanent teeth. Surprisingly, when the analysis included only Pb-enamel  $\geq 400 \mu\text{g/g}$ , a strong, positive and significant correlation was achieved for deciduous ( $r=0.65$ ;  $p<0.0001$ ) and permanent teeth ( $r=0.51$ ;  $p<0.0001$ ). Bone is the main store of lead in the body (Todd et al., 1996; Hu et al., 1998). Like bone, tooth enamel reflects the amount of lead accumulated in the past (Altshuller et al., 1962). According to Hu et al. (1998), Pb-plasma or Pb-serum provides superior information of the metal in bone, compared with its fraction in whole blood. Calkins et al. (1996) determined lead concentrations in serum, whole blood, tibia (cortical bone), and calcaneus (trabecular bone) of 49 exposed workers and found that, compared with Pb-blood, Pb-serum is strongly correlated with the lead levels in both bones. Our results may indicate that, in high lead concentrations, serum may reflect the lead levels at which the enamel was exposed during its period of maturation, similar to what occurs with bone.

This is also the first study that has examined the correlation between Pb-enamel and lead present in three different types of saliva. Our results show a non significant correlation between Pb-enamel, in deciduous and permanent teeth, and lead levels in the 3 different salivas collected in this study. These data are in agreement with the

results of our previous work (Costa de Almeida et al., 2008), in which there was no correlation between Pb-enamel in deciduous teeth and Pb-whole-saliva of children living in two regions, an exposed ( $r= 0.38$ ,  $p= 0.11$ ) and another apparently not exposed ( $r= 0.15$ ,  $p= 0.08$ ) to lead. However, the current results are in disagreement to the findings of Nriagu et al. (2006), which stated that saliva may be a significant route in the accumulation of lead on the enamel.. As well as Pb-blood, Pb-saliva probably reflects recent exposure, while Pb-enamel is a cumulative past marker (Cleymaet et al., 1991; Almeida et al., 2007, 2008).

Acknowledgements: We would like to acknowledge Cristiane Fernandes de Freitas Tavares, Tiago Sampaio de Sousa and Zita Maria Gregório for help during sample collection, Vanessa Cristina de Oliveira for help during lead determination, the State of São Paulo Research Foundation (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP), and the (Brazilian) National Science and Technology Council (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq) for financial support.

## References

### Figure legends

Figure 1 - Pb-enamel ( $\mu\text{g/g}$ ) from girls and boys for deciduous ( $n= 12$ ;  $n= 23$ , respectively) and permanent teeth ( $n= 39$ ;  $n= 48$ , respectively), using only lead values  $\geq 400 \mu\text{g/g}$ , from Ribeirao Preto, Sao Paulo State, Brazil (2008). The box and whiskers plots show range and quartiles. The boxes extend from the 25<sup>th</sup> percentile to the 75<sup>th</sup> percentile, with a line at the median. The whiskers show the highest and the lowest values.

Figure 2 - Scatter diagrams showing the correlation between  $\text{Log}_{10}$  Pb-enamel and  $\text{Log}_{10}$  Pb-serum for deciduous ( $n= 39$ ) and permanent ( $n= 75$ ) teeth, using only Pb-enamel  $\geq 400 \mu\text{g/g}$ , of 6- to 8-year-old children from Ribeirao Preto, Sao Paulo State, Brazil (2008).



**Figure 1**



\*  $p = 0.02$  vs boys in deciduous teeth

**Figure 2**

