

CONCENTRAÇÃO DE CHUMBO, DEFEITOS DE ESMALTE e cárie em dentes decíduos

Lead level, enamel defects and dental caries in deciduous teeth

Viviane Elisângela Gomes^a, Ronaldo S Wada^b, Jaime Aparecido Cury^c e Maria da Luz Rosário de Sousa^b

^aDepartamento de Odontologia Social. Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp). Piracicaba, SP, Brasil. ^bDepartamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Unicamp. Piracicaba, SP, Brasil. ^cDepartamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. Unicamp. Piracicaba, SP, Brasil

Descritores

Chumbo. Esmalte dentário. Cárie dentária, epidemiologia, hipoplasia do esmalte dentário.

Resumo

Objetivo

Verificar a relação da concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos com a presença de defeitos de esmalte e sua relação com cárie dental em pré-escolares.

Métodos

A amostra foi de 329 crianças de pré-escolas municipais de uma área próxima de indústrias (N=132) e outra não industrial (N=197) da cidade de Piracicaba, Estado de São Paulo. Essa amostra pertence a um estudo inicial realizado entre 2000 e 2001 no qual o chumbo foi analisado por meio de biópsia de esmalte. Foram realizados exames clínicos bucais para verificação da prevalência de defeitos de esmalte (Developmental Defects of Enamel Index - DDE, da Federação Dentária Internacional - FDI) e cárie (Índice ceos, Organização Mundial da Saúde), em ambas regiões. Foram utilizados teste de qui-quadrado e cálculo do risco relativo ao nível de significância de 5%, considerando cada região separadamente.

Resultados

Houve maior proporção de crianças com cárie entre aquelas com maiores concentrações de chumbo nos decíduos na região não industrial ($p=0,02$), o que não se observou na região industrial ($p=0,89$). Houve risco relativo (RR) aumentado de cárie nas crianças da região não industrial o que não foi verificado nas crianças da região industrial. Não se observou relação entre a presença de chumbo e os defeitos de esmalte.

Conclusões

Não foram encontrados dados que evidenciassem a relação entre concentração de chumbo e defeitos no esmalte em nenhuma das regiões pesquisadas. Não foi encontrada relação entre chumbo e cárie na região industrial, ressaltando a necessidade de mais estudos dessas relações.

Keywords

Lead. Dental enamel. Dental caries, epidemiology. Dental enamel, hypoplasia.

Abstract

Objective

To verify the relationship between lead concentration in the enamel of deciduous teeth and the presence of enamel defects and, consequently, with dental caries among preschool children.

Methods

The sample consisted of 329 preschool children in Piracicaba, State of São Paulo: 132 attending municipal kindergartens close to industrial plants and 197 attending

Correspondência para/ Correspondence to:

Maria da Luz Rosário de Sousa
Departamento de Odontologia Social - FOP/
Unicamp
Av. Limeira, 901
13414-900 Piracicaba, SP, Brasil
E-mail: luzsousa@fop.unicamp.br

Financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp - Processo n. 00/07353-6). Trabalho baseado em dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, 2002.

Recebido em 8/10/2003. Aprovado em 16/4/2004.

kindergartens in non-industrial areas. This sample belonged to an initial study made between 2000 and 2001, in which the lead concentration was obtained by means of enamel biopsy. Oral clinical examination of the children from both regions was performed to verify the prevalence of enamel defects, using the Developmental Defects of Enamel (DDE) Index of the World Dental Federation (FDI), and of dental caries, using the decayed, missing and filled surfaces (dmfs) index of the World Health Organization. The chi-squared test and relative risk calculation were utilized in relation to a significance level of 5%, considering each region separately.

Results

Among the children from the non-industrial area, there was a higher proportion with dental caries among those with higher lead concentrations in deciduous teeth ($p=0.02$). This was not, however, observed among the children from the industrial area ($p=0.89$). There was an increased relative risk (RR) of caries among the children from the non-industrial area, but this was not seen among the children from the industrial area. No relationship was observed between the presence of lead and enamel defects.

Conclusions

No data was found that would give evidence of a relationship between lead concentration and enamel defects in either of the areas studied. No relationship was found between lead and dental caries in the industrial area, thus emphasizing that more studies of such relationships are needed.

INTRODUÇÃO

Em estudo publicado anteriormente,¹⁰ verificou-se que pré-escolares moradores em região industrial de Piracicaba, Estado de São Paulo, apresentaram maiores concentrações de chumbo (Pb) no esmalte dentário do que os moradores de região não industrial. E, considerando relatos da literatura que descrevem que a presença do chumbo na composição química do esmalte dentário pode alterar sua ultraestrutura, podendo originar um esmalte com defeitos e que estes por sua vez podem aumentar o risco de cárie, verificou-se a importância de ser pesquisada essas relações nessa mesma população de pré-escolares.

Dentro deste contexto, estudos *in vitro* têm mostrado que a presença de chumbo durante a amelogenese pode causar alterações na ultraestrutura do esmalte,⁸ visto que os ameloblastos são células extremamente sensíveis às alterações ambientais. Essas alterações, por sua vez, poderiam estar associadas a modificações no comportamento físico-químico do esmalte¹⁵ tornando-o mais susceptível a desmineralização.

Assim sendo, alguns estudos indicaram haver associação entre a presença de chumbo no tecido dentário e alterações clínicas no esmalte, podendo ser essas variações de coloração⁹ ou hipoplasias.¹ Entretanto, esses trabalhos não foram suficientes para estabelecer uma clara relação entre a presença do chumbo e os defeitos de esmalte.

A relação, mesmo que indireta, entre a presença de chumbo no tecido dentário e aumento na prevalên-

cia de cárie foi relatada por alguns pesquisadores,^{2,9,17} no entanto, o mecanismo com que isso ocorre ainda não está bem estabelecido até o momento.

Devido às divergências da literatura e a escassez de dados sobre esse assunto em comunidades brasileiras, realizou-se uma pesquisa epidemiológica para conhecer a relação entre a presença de chumbo no esmalte, defeitos de esmalte e cárie nos dentes decíduos de crianças brasileiras. Assim, o objetivo do presente trabalho foi verificar a relação entre a concentração de chumbo, presente no esmalte de dentes decíduos dos pré-escolares, e a prevalência de defeitos de esmalte, bem como, com a prevalência de cárie.

MÉTODOS

Para a determinação das regiões da cidade de Piracicaba, Estado de São Paulo, a serem estudadas, foram consultados, inicialmente, os órgãos: Secretaria do Meio Ambiente da Prefeitura Municipal de Piracicaba, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (Cetesb) e o Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo (CENA/USP) para obtenção de informações sobre a poluição por chumbo em Piracicaba. Esses órgãos relataram a existência de uma fábrica de baterias para automóveis em um distrito Industrial localizado na região Dois Córregos (industrial). Assim, foram localizadas por meio de um mapa da cidade, as pré-escolas localizadas nessa região (industrial) e em outra região denominada Campestre que não possuía indústrias (não industrial).

O cálculo da amostra¹³ foi realizado a partir do co-

nhecimento prévio da prevalência de defeitos de esmalte nos pré-escolares dessas duas regiões (industrial e não industrial) por meio dos dados coletados durante o censo de 1999.⁵

O Setor de Saúde do Escolar da Prefeitura do Município de Piracicaba forneceu as listagens das crianças matriculadas nas 10 pré-escolas das regiões selecionadas para o estudo, perfazendo um total de 421 crianças, sendo 209 da região industrial e 212 da região não industrial.

Devido às perdas, a amostra foi composta de 329 pré-escolares de ambos os sexos, de quatro e cinco anos de idade, utilizando-se a Matriz de Frias adaptada¹⁶ para o cálculo da idade. O total da amostra foi de 197 crianças de seis pré-escolas da região não industrial e 132 crianças de quatro pré-escolas da região industrial.

O delineamento do estudo foi monocego. O agendamento das crianças para participação no estudo foi realizado por outra pesquisadora, evitando assim que a examinadora tivesse informações prévias sobre as crianças.

O atendimento dos participantes foi realizado em consultórios de laboratório odontológico universitário.

Foram realizadas algumas modificações na técnica original da biópsia³ a fim de adequá-la à presente amostra, sendo que essas modificações foram feitas após a realização de estudo piloto.¹⁰

Os dentes foram submetidos à profilaxia profissional com escova tipo Robinson, taça de borracha e pedra-pome, seguindo-se lavagem e secagem com ar e gaze e isolados relativamente com roletes de algodão. Esses procedimentos foram realizados pela auxiliar para que a pesquisadora não tocasse em nenhuma superfície metálica antes da realização da biópsia.

Uma fita adesiva com uma perfuração central de 1,6 mm de diâmetro ($\pm 0,03$) foi firmemente aderida à superfície vestibular de um dos incisivos centrais superiores decíduos (51 ou 61) de cada participante do estudo, demarcando a área de biópsia. Nesta área de esmalte exposto foi depositado 5 μL de HCl 1,6 mol.L⁻¹, preparado em glicerol a 70% (v/v). A gota de ácido foi agitada durante 20 segundos, utilizando-se a ponta da ponteira, sendo aspirada e transferida para um tubo de coleta contendo 200 μL de água ultrapurificada tipo MILLI-Q. Para recuperar o residual de ácido e esmalte dissolvido, 5 μL de água ultrapurificada foi colocada no esmalte, agitada por 10 segundos, aspirada e reunida à solução de biópsia

no tubo de coleta. Nessa solução foram determinadas no laboratório as concentrações de Pb e de P. O fósforo foi usado para estimar a massa de esmalte removido pela biópsia. Finalizada a biópsia, a fita foi removida e o dente lavado com água durante 30 segundos, seco com jatos de ar e isolado novamente para receber aplicação de fluoreto em gel.

Foram realizadas biópsias controles na superfície da bancada ou sobre as tampas dos suportes para ponteira, para verificar a contaminação pelo chumbo no ambiente de trabalho durante os procedimentos. Todo o material utilizado e a bancada onde os instrumentais e pipetas foram dispostos, foram limpos com uma solução de ácido nítrico (HNO₃) a 10%, a fim de remover possíveis contaminações prévias pelo chumbo. Os tubos de coleta foram também, previamente lavados com ácido nítrico a 10%: imersos na solução durante 24h e em seguida foram enxaguados 20 vezes com água ultrapurificada e secos em capela descontaminada de metais.

Os exames foram conduzidos sob luz artificial, secagem da superfície com ar e gaze, espelho clínico e sonda Community Periodontal Index (CPI). A prevalência de cárie foi descrita pelo índice 'ceos', que consiste na soma das superfícies cariadas, perdidas e obturadas dos dentes decíduos, segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde,¹⁹ e a prevalência de defeitos de esmalte pelo índice de defeitos no esmalte dentário (Índice DDE), o qual descreve os diferentes tipos de defeitos desde opacidades a hipoplasias.⁶ Os exames foram conduzidos por uma única examinadora calibrada, sendo o erro intra-examinador calculado. Cerca de 10% do total da amostra foi selecionada ao acaso para reexame, calculando-se o erro intra-examinador durante a coleta de dados.

Para evitar possível evaporação e perda do volume das amostras optou-se pela sua desidratação, colocando-as em um dessecador com cloreto de cálcio anidro (CaCl₂) durante 36 horas. Esse procedimento foi previamente testado para verificar se não ocorreriam alterações. No momento das dosagens de chumbo e de fósforo, as amostras foram hidratadas novamente com 210 μL de água ultrapurificada, agitadas e divididas em duas partes, para a dosagem do chumbo e do fósforo.

A determinação de chumbo foi realizada em espectrômetro de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS), calibrado com soluções padrão contendo de 0 a 100 ppb de chumbo. A amostra foi misturada a 490 μL da seguinte solução: NH₄H₂PO₄ a 0,2% (w/v), Triton X-100 a 0,5% (v/v) e HNO₃ a 0,2%.

A análise da concentração de fósforo foi realizada a fim de determinar a quantidade de esmalte retirado da superfície dental e a profundidade da biópsia, para que pudesse ser calculada a quantidade de chumbo em μg por g de esmalte removido (ppm). O fósforo foi dosado pelo método colorimétrico de Fiske & Subbarow.⁷ Assim, foram pipetados 105 μL de amostra, 295 μL de água ultrapurificada tipo MILLI-Q, 83 μL de ácido molibdic, agitou-se e após 10 min adicionou-se 33 μL de redutor, agitou-se novamente e, após 20 min, a intensidade de cor foi medida em um espectrofotômetro (Beckman DU-70) a 660 nm. O aparelho foi calibrado com amostras que apresentavam concentrações conhecidas de fósforo, que foram iguais a: 0,58 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 1,16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 2,32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 4,65 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 9,30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Considerando que o esmalte humano contém 17% de P, em peso, partiu-se desse pressuposto para determinar a massa de esmalte removida. Para determinar a espessura de esmalte removido pela biópsia foi assumido que o esmalte apresenta uma densidade de 2,95 g/cm^3 .

Informações sobre o nível socioeconômico das crianças estudadas foram coletadas pela aplicação de um questionário às cada mãe ou responsável, pelas agentes de saúde das pré-escolas, com questões relacionadas à renda familiar e grau de instrução das mães.

A análise estatística foi realizada com o emprego dos *softwares* estatísticos SAS (Statistical Analysis System) e Epi Info, versão 5.0. Utilizaram-se estudos de correlação, teste de qui-quadrado e cálculo do risco relativo (RR) ao nível de significância de 5%, considerando cada região separadamente.

A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/Unicamp) (protocolo n° 29/99), segundo a Re-

solução 196/96 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

RESULTADOS

Os parâmetros de confiabilidade foram aceitáveis de acordo com os sugeridos pela FDI⁶ e pela OMS¹⁸ para a percentagem de concordância e Bulman & Osborn⁴ para o índice de concordância Kappa. O treinamento mostrou que a percentagem de concordância intra-examinador foi de 97,6% e o Kappa de $k=0,8$ para a cárie; e para os defeitos de esmalte a percentagem de concordância foi 97,7%. Durante a coleta de dados, a percentagem de concordância do erro intra-examinador foi de 99% e o Kappa foi de $k=0,9$ para a cárie, e 90% de concordância para os defeitos.

A perda amostral foi de 36,8% na região industrial e 7,1% na não industrial.

O valor médio (\pm desvio-padrão [dp]) de fósforo encontrado nas amostras de biópsia de esmalte no grupo dos expostos (região industrial) foi de 4,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\pm 1,5$) e de 4,4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\pm 1,6$) no grupo de não expostos (região não industrial). A média da massa de esmalte removido (\pm dp) foi de 0,24 μg ($\pm 0,095$) e 0,25 μg ($\pm 0,097$), respectivamente, sendo que não houve diferença estatística da profundidade das biópsias (\pm dp) entre os grupos das diferentes regiões ($p>0,05$), sendo de 4,1 μm ($\pm 1,5$) no grupo dos expostos e de 4,4 μm ($\pm 1,6$) nos não expostos.

Encontrou-se correlação negativa entre concentração de chumbo e total de defeitos de esmalte ($r^2=-0,1497$ e $p=0,0357$) na região não industrial, não sendo observada na região industrial ($p>0,05$). Quando o total de defeitos foi discriminado, não houve correlação ($p>0,05$) entre concentração de chumbo e hipoplasia, concentração de chumbo e opacidade de-

Tabela 1 - Concentração de chumbo no esmalte de acordo com a região em dentes decíduos de pré-escolares e presença ou ausência de defeitos de esmalte. Piracicaba, 2001.

Concentrações de Pb ($\mu\text{g}/\text{g}$)	Região			
	Industrial (N=132)		Não industrial (N=197)	
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
>140*	68 (51,6%) ^a	12 (9,0%)	71 (36,0%) ^a	13 (6,6%)
≤140	44 (33,4%) ^a	8 (6,0%)	93 (47,2%) ^a	20 (10,2%)
Total	112	20	164	33
>220**	45 (34,0%) ^a	7 (5,3%)	47 (23,9%) ^a	10 (5,0%)
≤220	67 (50,8%) ^a	13 (9,9%)	117 (59,4%) ^a	23 (11,7%)
Total	112	20	164	33

Valores seguidos por letras iguais, na coluna, indicam que não há diferença estatisticamente significativa pelo teste de qui-quadrado ($p<0,05$).

*Valor da mediana das concentrações de Pb

**Valor da média das concentrações de Pb

marcada e concentração de chumbo e opacidade difusa tanto na região industrial como na região não industrial.

Os resultados da relação entre concentração de chumbo e defeitos de esmalte (presença/ausência) nas regiões industrial e não industrial estão expressos na Tabela 1.

Segundo a Tabela 1 não se encontrou diferença estatisticamente significativa entre as regiões ($p>0,05$) quanto a presença/ausência de defeitos de esmalte.

O risco relativo entre concentração de chumbo (140 e 220 ppm) e defeitos de esmalte (presença/ausência) foi de 1,01 ($0,87<RR<1,16$) e 1,03 ($0,89<RR<1,19$), respectivamente, para a região industrial, e 1,03 ($0,91<RR<1,16$) e 0,99 ($0,86<RR<1,14$), respectivamente, para a região não industrial, mostrando não haver risco ($p>0,05$).

A distribuição dos defeitos de esmalte segundo a concentração de chumbo encontrada no esmalte dos dentes decíduos das crianças das regiões industrial e não industrial está representada na Figura.

Não houve correlação entre concentração de chumbo e cárie em ambas as regiões ($p>0,05$).

A relação entre concentração de chumbo e cárie (presença/ausência) das amostras das regiões industrial e não industrial encontra-se na Tabela 2.

Houve diferença estatisticamente significativa entre a proporção de indivíduos com presença de cárie e concentrações de chumbo maiores que 140 e 220 ppm daqueles com presença de cárie e concentrações de chumbo menores ou iguais a 140 e 220 ppm ape-

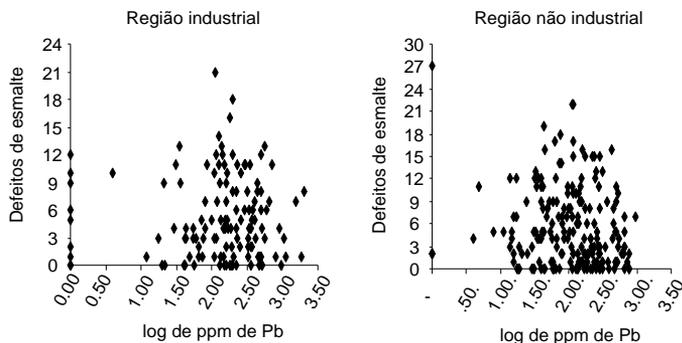


Figura - Distribuição dos defeitos de esmalte dentário de acordo com a concentração de chumbo no esmalte de cada criança da região industrial e não industrial. Piracicaba, SP, 2001.

nas na região não industrial ($p=0,0223$ e $p=0,0141$, respectivamente).

Houve risco aumentado de cárie nas crianças da região não industrial com dosagens de chumbo acima da mediana e média 1,40 ($1,05<RR<1,88$) e 1,46 ($1,10<RR<1,93$), respectivamente; o que não foi verificado nas crianças da região industrial, 0,98 ($0,67<RR<1,43$) e 0,89 ($0,60<RR<1,32$).

Houve diferença estatisticamente significativa da renda familiar ($p<0,0001$) e o grau de instrução ($p<0,0001$) entre os grupos da área industrial e não industrial, sendo maiores na área industrial.

DISCUSSÃO

Foram analisadas duas concentrações de chumbo nos dentes decíduos (mediana e média) por não existirem valores de referência definidos na literatura para concentrações no esmalte dentário que reflitam um quadro de intoxicação por chumbo ou ainda que se relacione com defeitos de esmalte e cárie. Os trabalhos da literatura nacional estabeleceram valores de referência apenas para sangue e relataram a impor-

Tabela 2 - Concentração de chumbo no esmalte de acordo com a região em dentes decíduos de pré-escolares e presença ou ausência de cárie. Piracicaba, 2001.

Concentrações de Pb (µg/g)	Região			
	Industrial (N=132)		Não industrial (N=197)	
	Presença	Ausência	Presença	Ausência
>140*	36 (27,3%) ^a	44 (33,4%)	48 (24,4%) ^a	36 (18,3%)
≤140	24 (18,1%) ^a	28 (21,2%)	46 (23,3%) ^{a/b}	67 (34,0%)
Total	60	72	94	103
>220**	22 (16,7%) ^a	30 (22,8%)	35 (17,8%) ^a	22 (11,2%)
≤220	38 (28,7%) ^a	42 (31,8%)	59 (29,9%) ^{a/b}	81 (41,1%)
Total	60	72	94	103

Valores seguidos por letras distintas, na coluna, indicam que não há diferença estatisticamente significativa pelo teste de qui-quadrado ($p<0,05$).

*Valor da mediana das concentrações de Pb

**Valor da média das concentrações de Pb

tância da verificação do chumbo como exame de rotina,¹⁴ porém o sangue indica contaminação aguda pelo chumbo diferente do esmalte dentário que indica contaminação passada. Entretanto, não foi verificada relação entre nenhuma das concentrações de chumbo analisadas no presente estudo com defeitos de esmalte nos dentes decíduos, sendo que os resultados das correlações e risco relativo entre concentração de chumbo e defeitos de esmalte quando existiram foram fracos. Considerando a região não industrial cuja correlação foi negativa, essa relação deve ser melhor investigada, já que esse resultado diverge de alguns relatos da literatura.^{1,10} Entretanto estes não trazem resultados conclusivos e relatam a relação entre chumbo nos tecidos dentários e defeitos de esmalte de forma indireta. E ainda, ao analisar-se a Figura, verificou-se que existem mais casos de crianças com defeitos de esmalte mesmo na ausência de concentração de chumbo na região industrial, indicando que outros fatores devem estar contribuindo para a presença desses defeitos. Além do que a visualização das regiões industrial e não industrial na Figura permite verificar que onde há maior concentração de chumbo há maior número de defeitos de esmalte na região industrial do que na não industrial.

Quanto à relação entre chumbo e cárie surpreendentemente na região não industrial observou-se maior proporção de indivíduos com presença de cárie nas concentrações de chumbo maiores que a média e mediana. Entretanto, verificou-se que na região industrial tanto o nível de escolaridade da mãe quanto a renda familiar foram superiores aos da região não industrial, podendo ter atuado como fatores de confusão exercendo assim um papel talvez, mais importante que a contaminação ambiental por chumbo da região industrial. Entretanto, a caracterização do nível socioeconômico a partir da rede de ensino foi

utilizada por outros pesquisadores,¹² mas no presente trabalho parece não ter sido uma variável que homogeneizou os grupos quanto à semelhança do nível socioeconômico. Outra questão que pode ter interferido foi a maior perda amostral no grupo da região industrial.

Um dado epidemiológico importante foi o risco relativo de ter cárie apresentar-se maior nas crianças residentes na região não industrial que apresentaram concentrações de chumbo acima de 140 e 220 ppm nos dentes decíduos. Este resultado reafirmou a tendência da literatura que relaciona a presença de chumbo no tecido dentário com aumento da prevalência de cárie.^{2,9,17}

Não foram encontrados dados que evidenciassem a relação entre concentração de chumbo no esmalte de dentes decíduos e defeitos de esmalte em nenhuma das regiões pesquisadas, entretanto encontrou relação entre chumbo e cárie na região não industrial, ressaltando a necessidade de mais estudos dessas relações considerando a importância dos fatores socioeconômicos para a doença cárie.

AGRADECIMENTOS

À Débora Dias da Silva, doutoranda em odontologia, área de cariologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo auxílio durante a realização das biópsias de esmalte e exames clínicos. À Dra. Raquel F. Gerlach e ao Dr. Francisco José Krug, do Laboratório de Química Analítica do CENA/USP pela orientação; às técnicas utilizadas; à Dra. Sueli A. Araújo do Setor de Saúde do Escolar da Secretaria de Educação da Prefeitura Municipal de Piracicaba, por possibilitar a realização deste estudo.

REFERÊNCIAS

1. Brook AH, Fearnle JM, Smith JM. Environmental causes of enamel defects. In: Symposium on Dental Enamel, 1996, Ciba Foundation. Proceedings. New York: John Wiley & Sons, 1997. Ciba Foundation Symposium, v. 205.
2. Brudevold F, Aasenden R, Srinivasian BN, Bakhos Y. Lead in enamel and saliva, dental caries and the use of enamel biopsies for measuring past exposure to lead. *J Dent Res* 1977;56:1165-71.
3. 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.
4. Bulman JS, Osborn JF. Measuring diagnostic consistency. *Br Dent J* 1989;166:377-81.
5. Cypriano S, Sousa MLR, Rihs LB, Wada RS. Saúde bucal dos pré-escolares em Piracicaba, Brasil, 1999. *Rev Saúde Pública* 2003;37:247-53.
6. Fédération Dentaire Internationale. Commission on Oral Health, Research and Epidemiology. A review of the developmental defects of enamel index (DDE Index). *Int Dent J* 1992;42:411-26.
7. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* 1925;66:375-400.

8. Gerlach RF, Souza AP, Cury JA, Line SRP. Effect of lead, cadmium and zinc on the activity of enamel matrix proteinases in vitro. *Eur J Oral Sci* 2000;108:327-34.
9. Gil F, Facio A, Villanueva E, Pérez ML, Tojo R, Gil A. The association of tooth content with dental health factors. *Sci Total Environ* 1996;192:183-91.
10. Gomes VE, Gerlach RF, Sousa MLR, Krug FJ. Concentração de chumbo em dentes decíduos de pré-escolares de Piracicaba, SP, Brasil – Estudo Piloto. *Rev Odonto Ciência* 2003;18:3-7.
11. Gomes VE, Sousa MLR, Barbosa Fjr, Krug FJ, Saraiva MCP, Cury JA, Gerlach RF. *In vivo* studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Sci Total Environ* 2004;320:25-35.
12. Maltz M, Silva BB. Relação entre cárie, gengivite e fluorose e nível socioeconômico em escolares. *Rev Saúde Pública* 2001;35:170-6.
13. Oliveira, AGR. Levantamentos epidemiológicos em saúde bucal: análise metodológica proposta pela Organização Mundial da Saúde. *Rev Bras Epidemiol* 1998;1:180-4.
14. Paoliello MMB, Gutierrez PR, Turini CA, Matsuo T, Mezzaroba L, Barbosa DS et al. Valores de referência para plumbemia em uma população urbana do Sul do Brasil. *Rev Panam Salud Publica* 2001;9:315-9.
15. Simons TJ. Cellular interactions between lead and calcium. *Br Med Bull* 1986;42:431-4.
16. Universidade de São Paulo. Faculdade de Saúde Pública. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Levantamento Epidemiológico em Saúde Bucal – Estado de São Paulo, 1998. São Paulo: Núcleo de Estudos e Pesquisas de Sistemas de Saúde; 1998. [Relatório apresentado à Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo como conclusão do projeto realizado com o Núcleo de Estudos e Pesquisas em Serviços de Saúde, 1999].
17. Watson GE, Davis BA, Raubertas RF, Pearson SK, Bowen WH. Influence of maternal lead ingestion on caries in rat pups. *Nature Med* 1997;3:1024-5.
18. World Health Organization. Oral health surveys: basic methods. 3rd ed. Geneva: WHO; 1987.
19. World Health Organization. Oral health surveys: basic methods. 4th ed. Geneva: WHO; 1997.