**UNHA COMO BIOMARCADOR DE EXPOSIÇÃO
CRÔNICA AO FLÚOR A PARTIR DA DIETA EM
COMUNIDADES FLUORETADA
E NÃO FLUORETADA**

FLÁVIA MAUAD LEVY

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Ortodontia - opção Saúde Coletiva.

(EDIÇÃO REVISADA)

*Bauru
2003*

**UNHA COMO BIOMARCADOR DE EXPOSIÇÃO
CRÔNICA AO FLÚOR A PARTIR DA DIETA EM
COMUNIDADES FLUORETADA
E NÃO FLUORETADA**

FLÁVIA MAUAD LEVY

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Ortodontia - opção Saúde Coletiva.

**Orientadora: Prof^a Dr^a Marília Afonso
Rabelo Buzalaf**

(EDIÇÃO REVISADA)

*Bauru
2003*

L579u Levy, Flávia Mauad
Unha como biomarcador de exposição crônica ao flúor a partir da dieta em comunidades fluoretada e não fluoretada / Flávia Mauad Levy. -- Bauru, 2003.
xxi, 99 p. : il. ; 30 cm.

Dissertação. (Mestrado) - Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura da autora:

Data:

Comitê de Ética da FOB: Projeto de pesquisa aprovado em 28 de junho de 2001

FLÁVIA MAUAD LEVY

23 de Dezembro de 1974

Nascimento

Guaraci – SP

Filiação

Marilene Carvalho Mauad Levy

José Carlos Levy

1993 – 1997

Curso de Graduação em Odontologia
– Universidade do Sagrado Coração
– Bauru – SP.

1998

Curso de Aperfeiçoamento em
Odontologia Preventiva pela PREV –
Assessoria Odontológica

1999 – 2000

Curso de Especialização em
Odontologia em Saúde Coletiva pela
Faculdade de Odontologia de Bauru,
USP.

2001– 2003

Curso de Pós-Graduação em
Ortodontia, opção Odontologia em
Saúde Coletiva, na Faculdade de
Odontologia de Bauru, USP.

Associações

Conselho Regional de Odontologia
do Estado de São Paulo- CRO- SP
Associação Paulista de Cirurgiões-
Dentistas – APCD
Sociedade Brasileira de Pesquisa
Odontológica – SBPqO

Dedicatória

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Nico e Mila

Que me possibilitaram uma trajetória suave, apoiada na verdade e pelo incentivo constante em minha vida.

Ao meu namorado Rodrigo

Verdadeiro aliado de todos os momentos, meu eterno reconhecimento por seu companheirismo, voluntarismo, carinho e dedicação.

A DEUS

Quem me orienta e me dá coragem para enfrentar os obstáculos e prosseguir a caminhada em busca da realização de meus objetivos.

“ Na realidade, todas as coisas, todos os acontecimentos, para quem os sabe ler com profundidade, encerram uma mensagem que, em definitivo, remete para Deus...”

João Paulo II

“Para que haja uma árvore florida, é preciso haver antes uma árvore; e, para haver um homem feliz, é preciso haver em primeiro lugar um homem”.

Saint-Exupéry, A Cidada

À minha orientadora

Professora Doutora Marília Afonso Rabelo Buzalaf,

Verdadeira mestre e orientadora, que compartilhou seus conhecimentos, sua amizade, fica meu carinho, reconhecimento e minha eterna admiração.

Agradecimentos

Agradeço especialmente

Ao Prof. Dr. José Roberto de Magalhães Bastos

Pelo apoio, orientação e sua constante disposição em transmitir seus conhecimentos. Obrigada.

Aos verdadeiros amigos de turma

À Maria Heloísa, Patrícia, Selma, Soraia, Rosana e José Mauro, agradeço ao estímulo constante, o espírito solidário, o convívio otimista e alegre, serei sempre grata.

À boa vontade de meus voluntários

Que sempre colaboraram, principalmente na coleta de sangue, realizando as etapas necessárias para a conclusão desta pesquisa e acreditando na sua importância, fica meu agradecimento.

Ao Laboratório de Análises Clínicas da Universidade do Sagrado Coração de Bauru-SP

Que contribuiu de forma primordial na seleção e na coleta do sangue dos pacientes desta pesquisa, meu eterno agradecimento.

Ao Laboratório de Análises Clínicas Romanini, Itápolis-SP

Que contribuiu de forma primordial na seleção e na coleta do sangue dos pacientes do grupo controle desta pesquisa, meu eterno agradecimento.

Agradecimentos especiais

Aos amigos e funcionários do Laboratório de Bioquímica da Faculdade de Odontologia de Bauru

Telma, Ovídio, Gilmar, Pámela, Willian, Rodrigo, Ester, Giovana, Ana Paula, Élide, Tatiana, Ana Cláudia, Katiúcia, Juliano, Beatriz, Irene, Vanessa, Maria Fernanda, Taís, Mauro, Juliane e Gustavo.

Aos amigos e funcionários do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, da Faculdade de Odontologia de Bauru

Silvia, Marta, Helena, Rosa e Cleide.

Aos professores da Faculdade de Odontologia de Bauru, em especial:

Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris

Prof. Dr. José Mauro Granjeiro

Prof. Dr. Vitoriano Truvijo Bijella

Profa. Dra. Nilce Emy Tomita

Prof. Arsenio Sales Peres

À Direção da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP

Na pessoa de sua Excelentíssima Diretora, Prof^a Dr^a Maria Fidela de Lima Navarro

Muito obrigada...

Sumário

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xiii
LISTA DE TABELAS	xv
LISTA DE ABREVIATURAS	xvii
RESUMO	xix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	7
2.1 PRINCIPAIS FONTES DE INGESTÃO DE FLÚOR	8
2.1.1 Alimentos e bebidas.....	8
2.1.2 Água	13
2.1.3 Produtos odontológicos fluoretados	15
2.2 INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO FLÚOR	19
2.2.1 Unha como biomarcador de exposição ao flúor	21
2.2.2 Plasma como biomarcador de exposição ao flúor	24
2.2.3 Urina como biomarcador de exposição ao flúor	26
2.2.4 Saliva dos ductos como biomarcador de exposição ao flúor	27
2.2.5 Cabelo como biomarcador de exposição ao flúor	27
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 MATERIAL	32
4.1.1 Material utilizado para a coleta do plasma	32
4.1.2 Material utilizado para a análise de flúor nas unhas, no plasma e na dieta	32
4.2 MÉTODOS	33
4.2.1 Seleção das amostras	33
4.2.2 Obtenção das amostras	34
4.2.2.1 Unhas	34
4.2.2.2 Plasma	34

4.2.2.3 - Dieta	35
4.2.3 - Análise de flúor	36
4.2.3.1 - Unhas	36
4.2.3.2 - Plasma	38
4.2.3.3 - Dieta	40
5 RESULTADOS	43
6 DISCUSSÃO.....	60
7- CONCLUSÃO.....	70
ANEXOS.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
ABSTRACT.....	98

Lista de Figuras

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 a 6 - Método de microdifusão de TAVES, modificado por WHITFORD	42
FIGURA 7 - Distribuição dos grupos quanto à concentração de flúor no plasma.....	50
FIGURA 8 - Distribuição dos grupos quanto à concentração de F nas unhas das mãos	51
FIGURA 9 - Distribuição dos grupos quanto à concentração de F nas unhas dos pés.....	52
FIGURA10 - Distribuição dos grupos quanto à estimativa de ingestão de F a partir da dieta	54
FIGURA11 - Correlação entre a concentração de F nas unhas das mãos e dos pés.....	58
FIGURA12 - Correlação entre a concentração média de F presente nas unhas das mãos e dos pés e a quantidade de F ingerida diariamente a partir da dieta	59

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Características da amostra estudada de Bauru e Itápolis, quanto ao sexo, idade e o peso das crianças	44
TABELA 2 -	Concentração de F no plasma ($\mu\text{g/mL}$) das crianças de Bauru e Itápolis.....	45
TABELA 3 -	Média da concentração de F nas unhas das mãos ($\mu\text{g/g}$), na primeira e segunda coleta, das crianças de Bauru e Itápolis	46
TABELA 4 -	Média da concentração de F nas unhas dos pés ($\mu\text{g/g}$), na primeira e segunda coleta, das crianças de Bauru e Itápolis	47
TABELA 5 -	Ingestão de F (mg) a partir da dieta, conforme estimado pela dieta duplicada, nas cidades de Bauru e Itápolis.....	48
TABELA 6 -	Média ($\pm\text{DP}$) e intervalo de 95% de confiança da concentração de F no plasma, nas unhas das mãos e dos pés das crianças de Bauru e Itápolis.....	49
TABELA 7 -	Ingestão de F a partir da dieta, conforme estimado pela dieta duplicada	53
TABELA 8 -	Teste t não pareado realizado sobre as variáveis concentração de F no plasma, unhas das mãos, unhas dos pés e ingestão estimada de F pela dieta	55

Lista de Abreviaturas e Símbolos

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

F	flúor
[F]	concentração de flúor
FUEF	excreção urinária fracional de flúor
H ⁺	próton
HCl	ácido clorídrico
HF	ácido fluorídrico ou fluoreto de hidrogênio
HMDS	hexametil-disilazano ou hexametil-disiloxano
IPMET	Instituto de Pesquisa Meteorológicas (Unesp-Bauru)
M	molar (mol/L)
µg	micrograma
mL	mililitro
mg	miligrama
mV	milivoltagem
NaOH	hidróxido de sódio
NaF	fluoreto de sódio
r	coeficiente de correlação
p	nível de significância
ppm	partes por milhão
rpm	rotações por minuto
TISAB	“total ionic exchange adjustment buffer”

Resumo

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi verificar se a unha pode ser usada como biomarcador de ingestão crônica de flúor (F) a partir da dieta, em crianças residentes em comunidades com água fluoretada ou não, bem como estimar a ingestão de F a partir da dieta consumida pelas mesmas. A amostra constou de 15 crianças (2-6 anos) residentes em Bauru-SP e 15 residentes em Itápolis-SP, cidades fluoretada (0,6-0,8 ppm) e não, respectivamente. As concentrações de F [F] presentes nas unhas, no plasma e na dieta duplicada foram analisadas com eletrodo íon-específico (Orion 9409), após difusão facilitada por HMDS. Os dados foram analisados pelo teste “t” pareado e não pareado e por estatística de correlação ($p < 0,05$). A [F] média ($\mu\text{g/mL}$) encontrada no plasma das crianças de Itápolis ($0,024 \pm 0,020$) foi ligeiramente maior que a encontrada nas crianças de Bauru ($0,019 \pm 0,011$), no entanto esta diferença não foi estaticamente significativa. A [F] média ($\mu\text{g/g}$) presente nas unhas das mãos e dos pés foi de $3,557 \pm 1,297$ e $2,815 \pm 1,288$, respectivamente para Bauru e de $2,292 \pm 1,250$ e $1,580 \pm 0,589$, respectivamente, para Itápolis, sendo as diferenças entre Bauru e Itápolis, e entre a [F] presente nas unhas das mãos e nas unhas dos pés estatisticamente significantes. As crianças de Bauru ingeriram, de acordo com a estimativa, uma quantidade significativamente maior de F a partir da dieta ($0,551 \pm 0,610$ mg), quando comparadas com as de Itápolis ($0,088 \pm 0,056$ mg), o que correspondeu a uma ingestão diária de 0,029 e 0,004 mg F/Kg peso corporal, para Bauru e Itápolis, respectivamente. Encontrou-se uma correlação positiva significativa entre a [F] das unhas e a ingestão de F pela dieta ($r = 0,566$, $p = 0,00112$). Concluiu-se que a unha pode ser usada como biomarcador de ingestão crônica de F a partir da dieta, para diferenciar crianças na idade de risco para fluorose dentária, residentes em comunidades fluoretada ou não.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Há muito tempo vem sendo destacada a importância do F como elemento fundamental no controle da cárie dentária. A descoberta das propriedades anticariogênicas do F constitui um dos marcos mais importantes na história da Odontologia, possibilitando o controle da cárie dentária. Contudo, o risco de desenvolvimento da fluorose dentária vem sendo destacado, quando ocorre a ingestão de F acima da dose recomendada. O nível “ótimo” de ingestão sistêmica de F adequado para o controle da cárie dentária e incapaz de produzir lesões de fluorose clinicamente inaceitáveis, ainda não é precisamente conhecido (**GUHA-CROWDHURY; DRUMMOND; SMILLIE**⁵², 1996). Dados empíricos apontam para uma ingestão “ótima” em torno de 0,05 a 0,07 mg F/Kg peso corporal/dia (**OPHAUG; SINGER; HARLAND**⁸², 1980). Entretanto, dados mais recentes mostraram fluorose dentária com ingestão de F de menos de 0,04 mg/Kg peso corporal/dia (**BAELUM et al.**⁵, 1987; **FEJERSKOV et al.**⁴³, 1996).

Em 1901, John Macauley Eager, médico do Serviço de Saúde Pública dos Estados Unidos, em Nápoles, escreveu um relato que posteriormente foi reconhecido como a primeira documentação científica no que diz respeito à fluorose dentária, conhecida na Itália pelo nome de “denti di chiaie”. Essa afecção caracterizava-se por manchas escuras no esmalte dentário e supunha-se que a causa deveria estar relacionada com a ocorrência de gases vulcânicos, comuns nessa região da Itália, os quais estavam presentes na atmosfera, e provavelmente dissolvidos nas águas da região.

A partir de 1916, foram conduzidas outras investigações nos Estados Unidos da América, baseadas na ocorrência similar à descrita anteriormente na Itália, relatada em uma série de trabalhos por Frederick

Mckay e H. Trendley Dean, usando pela primeira vez o termo “mottled enamel” (esmalte mosqueado, marchetado ou veteado). Mckay observou a ocorrência de defeitos de desenvolvimento do esmalte dentário, em Colorado Springs, chamados de “manchas marrons do Colorado”. Estes defeitos foram identificados como esmalte manchado, mais especificamente, fluorose dentária crônica endêmica. Verificou-se ainda que isso só ocorria com as crianças da zona urbana.

A fluorose dentária origina-se da exposição do germe dentário durante o seu processo de mineralização a altas concentrações do íon F. Como consequência, tem-se defeitos de mineralização do esmalte, com severidade diretamente associada à quantidade de F ingerida. Geralmente, os sinais clínicos da fluorose variam desde linhas brancas finas que seguem as periquimáceas do esmalte até um aspecto totalmente opaco e calcário. Manchas castanhas podem aparecer em virtude da absorção de substâncias presentes na dieta. Nas formas mais graves, pode ocorrer, após a erupção, o desprendimento de porções do esmalte. Isto leva ao aparecimento de depressões na superfície do dente. Pelo fato das alterações no esmalte, decorrentes da fluorose, serem produzidas durante o desenvolvimento das estruturas dentárias, há certa simetria no grau em que os dentes homólogos são afetados (**FEJERSKOV**⁴², 1994).

Além da dosagem de F, outros fatores interferem na severidade da doença: baixo peso corporal, taxa de crescimento esquelético, estado nutricional, altitude e alterações da atividade renal e homeostasia do cálcio também são fatores relevantes (**DENBESTEN**²⁷, 1994). Neste sentido a fluorose dentária é mais freqüente em dentes de mineralização tardia (dentição permanente), em crianças de baixo peso ou precário estado nutricional, ou ainda portadoras de insuficiência renal crônica, sendo as faixas etárias da primeira e segunda infância consideradas as de maior risco à ingestão do F sistêmico e, conseqüentemente, seus efeitos maléficos (**FEJERSKOV**⁴², 1994).

Apesar da existência de um período de risco para fluorose dos incisivos centrais ter sido questionada recentemente, tem-se sugerido que o mesmo se dá entre 15 e 24 meses para os meninos e entre 21 e 30 meses para as meninas (**BARDSEN**⁶, 1999; **EVANS; DARVELL**⁴¹, 1995). Uma vez que a fluorose é um distúrbio de formação do dente, a sua prevenção deve se concentrar em crianças com menos de 6 anos de idade. Os incisivos centrais superiores são os dentes que mais preocupam, devido ao seu comprometimento estético. A aparência indesejável do esmalte fluorótico pode ser eliminada ou minimizada por técnicas de microabrasão e materiais restauradores quando indicados (**McCLOSKEY**⁷⁵, 1984; **ROSENTHALER; RANDEL**⁹⁴, 1998).

Os marcadores biológicos ou biomarcadores são definidos como indicadores que sinalizam eventos em sistemas biológicos ou amostras (**COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL**²⁰, 1987). Um biomarcador não é usado como um teste para diagnóstico, mas como um indicador de uma alteração que poderia levar a uma doença clínica (**GRANDJEAN**⁵⁰, 1995).

Num Simpósio realizado pelo NIH, em Bethesda, Maryland, EUA, em 1999, foi estabelecida uma agenda internacional de necessidades de pesquisa envolvendo flúor. Entre os tópicos, estava o desenvolvimento de biomarcadores que sejam de fácil coleta e análise, para se determinar a atividade do F após um tempo específico de sua administração e para se medir a exposição aguda e crônica ao F. Sugeriu-se também que fosse avaliado a relação entre os níveis de F no osso e no plasma em jejum, saliva dos ductos, dentina e unhas das mãos (**CLARKSON**¹⁸, 2000).

Vários métodos de preparação e análise das unhas das mãos têm sido analisados para se estimar a exposição ambiental e industrial a vários íons inorgânicos (**ALFTHAN et al.**¹, 1992; **NAGRA et al.**, 1992; **HEWITT et al.**, 1995), bem como ao F em animais (**BUZALAF et al.**¹⁵, 2002) e em humanos (**SCHAMCHULA et al.**⁹⁶, 1985; **MACHOY**⁷⁰, 1989; **CZARNOWSKI; KRECHNIAK**²⁴, 1990; **SCHMIDT; LEUSCHKE**⁹⁷, 1990;

SPATE et al.¹⁰⁰, 1994; **WHITFORD et al.**¹¹⁷, 1999; **ARSATI**⁴, 2003). As vantagens e limitações do plasma, saliva dos ductos e urina como marcadores para exposições recentes e do osso e dentina como marcadores teciduais para exposições crônicas foram discutidos. Também foi discutido o possível uso das unhas como indicadoras de exposições subcrônicas ao F, e possivelmente exposições crônicas se a ingestão permanecesse relativamente constante.

Um trabalho concluído por **BUZALAF et al.**¹⁵ em 2002 demonstrou uma boa correlação entre a concentração de F presente no plasma e nas unhas de ratos submetidos à ingestão crônica de F a partir da água de beber. Os autores sugeriram que esta relação deveria ser avaliada em humanos. Em caso positivo, a análise das unhas de crianças poderia dar uma idéia dos níveis plasmáticos e da exposição ao F. Assim, seria necessário um estudo para avaliar se a mesma relação acontece em humanos, pois a análise da concentração de F nas unhas de crianças na idade de risco para fluorose dentária poderia dar idéia dos níveis plasmáticos de F e da exposição que esta criança está tendo a este elemento.

ARSATI⁴ (2003) avaliou a concentração de F nas unhas de crianças de 2 a 3 anos residentes em Cordeirópolis, Piracicaba e Assistência, SP, com concentração de F de 0,03, 0,64 e 1,53 µg F/mL na água respectivamente. Os resultados das concentrações de F nas unhas foram: $1,65 \pm 1,03$, $2,85 \pm 1,54$ e $4,14 \pm 1,91$ µg F/g, para as crianças de Cordeirópolis, Piracicaba e Assistência, respectivamente. No entanto, não há relatos na literatura correlacionando a concentração de F nas unhas de crianças com a ingestão de F a partir da dieta (sólidos e líquidos) e também correlacionando a concentração de F encontrada nas unhas das mãos e dos pés, coletadas em diferentes datas, em cidades fluoretadas e não fluoretadas. Considerando os estudos anteriormente realizados, o presente estudo, é o primeiro que enfoca a unha como biomarcador de ingestão

crônica de F a partir da dieta em crianças em idade de risco para fluorose dentária, residentes em comunidades fluoretada e não fluoretada.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

Nesta Revisão de Literatura, foram abordados os seguintes temas:

2.1 PRINCIPAIS FONTES DE INGESTÃO DE FLÚOR

2.2 INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO FLÚOR

2.1 PRINCIPAIS FONTES DE INGESTÃO DE FLÚOR

Atualmente, as principais fontes de ingestão de F para indivíduos acima de 1 ano de idade são alimentos, bebidas, água de beber e produtos odontológicos fluoretados (**BURT**¹², 1992; **WHITFORD**¹¹³, 1994; **FOMON**; **EKSTRAND**; **ZIEGLER**⁴⁶, 2000). A atmosfera carrega algum F, mas fornece apenas uma pequena fração da ingestão diária total, com exceção de regiões altamente poluídas (**WHITFORD**¹¹⁴, 1994).

2.1.1 Alimentos e bebidas

A maioria dos alimentos tem [F] menor que 0,5 ppm (**TAVES**¹⁰⁴, 1983), com exceção dos produtos à base frutos do mar e frango, que podem conter altos níveis de F. Cabe lembrar que a inclusão de ossos, pele e conchas nestes produtos durante o processo de industrialização contribui muito para estes valores elevados. Os produtos à base de frango

podem conter de 0,6 a 10,5 ppm de F (**LEVY; KIRITSY; WARREN**⁶⁶, 1995; **HEIMAN et al.**⁵⁷, 1997). Entretanto **TRAUTNER; SIEBERT**¹⁰⁵ (1986) observaram uma reduzida biodisponibilidade do F para a maioria dos produtos à base de carnes e peixes, provavelmente devido ao alto conteúdo de cálcio destes alimentos.

Em relação às bebidas, estas incluem refrigerantes, sucos de frutas, chás e leites em pó, quando processados em regiões com água de abastecimento fluoretada. As concentrações de F presentes nas bebidas refletem aquelas encontradas na água usada para o seu preparo (**HEILMAN et al.**⁵⁷, 1999). Em geral, variam de 0,1 a 1,4 ppm, exceto para os chás, que podem conter até 7 ppm de F (**CURY**²³, 1981; **CLOVIS; HARGREAVES**¹⁹, 1988; **PANG; PHILIPPS; BAWDEN**⁸⁶, 1992). **HEINTZE e BASTOS**⁵⁸ (1996), avaliaram a concentração de F em vários tipos de bebidas encontradas no mercado brasileiro. Todas apresentaram baixo conteúdo de F, sendo a maioria abaixo de 0,4 ppm, com exceção de um chá preto que apresentou 1,6 ppm e uma água com gás, 2,4 ppm.

Em 2002, **BUZALAF et al.**¹⁶ analisaram o conteúdo de F em diversas marcas de chás e sucos encontrados no Brasil e o risco de fluorose dentária. Foi observado que todas as amostras analisadas de chá preto para infusão, duas amostras de chá industrializado pronto para consumo e todas de suco em pó, contendo chá, apresentaram uma concentração de F maior que 0,7 ppm, podendo ser importantes contribuintes para a ingestão diária total de F. Desta forma o seu consumo por crianças na faixa etária de risco para fluorose dentária deveria ser evitado.

O leite humano tem uma baixa concentração de F, geralmente em torno de 0,005 a 0,010 ppm, pois o F é pobremente transportado do plasma para o leite (**EKSTRAND; BOREUS; DE CHATEAU**³¹, 1981; **EKSTRAND et al.**³³, 1984), mesmo quando a ingestão de F pela mãe é alta (**ESALA; VUORI; HELLE**⁴⁰, 1982; **EKSTRAND; HARDELL; SPAK**³³, 1984). Considerando este fator, a ingestão de F por crianças que se alimentaram exclusivamente de leite materno é baixa, em

torno de 0,001 mg/kg/dia. A concentração de F no leite de outros mamíferos também é baixa, mas, pelo menos no caso do leite bovino, aumenta ligeiramente quando atinge os pontos de venda, onde se encontram concentrações variando de 0,030 a 0,060 ppm (**FOMON; EKSTRAND; ZIEGLER**⁴⁶, 2000; **DIAS; ROSA; BUZALAF**²⁸, 2000). Sendo assim a ingestão de F por uma criança que ingere cerca de 150 mL/Kg/dia seria em torno de 0,004 a 0,009 mg/Kg/dia (**FOMOM; EKSTRAND; ZIEGLER**⁴⁶, 2000).

Há que se considerar que os hábitos alimentares das crianças mudaram bastante nos últimos anos, tendo aumentado o consumo de alimentos e bebidas processados industrialmente. **PANG et al.**⁸⁶ (1992) estudando crianças canadenses de 2 a 10 anos de idade, observaram que 40% da ingestão de líquidos vinha da água e do leite, enquanto que 60% era proveniente de outras bebidas. **BUZALAF et al.**¹⁷, (2003) analisaram a [F] em diversas marcas de chocolates e bolachas de chocolate encontradas no mercado nacional, visto que o chocolate e as bolachas de chocolate são bastante apreciados pelas crianças. Neste caso, foi observado em uma marca de bolacha (Danyt's) uma maior concentração de F, considerando que apenas 3 unidades poderiam fornecer 40% da ingestão diária máxima de F recomendada (0,07 mg/Kg peso corporal) para uma criança de 2 anos de idade (12 Kg), quando consumidas uma única vez por dia.

Em 2002, **BUZALAF et al.**¹⁴ realizaram uma pesquisa analisando produtos alimentícios consumidos por bebês e crianças brasileiras. Estes produtos eram originados de áreas fluoretadas e não fluoretadas e foram comprados em supermercados locais em três diferentes datas, compreendendo: A) cereais infantis; B) sopas; C) produtos à base de leite. A maioria apresentou baixos conteúdos de F, exceto dois cereais, o Mucilon (2,43 ppm) e o Neston (6,16 ppm) e um achocolatado, Toddynho, o qual apresentou uma concentração média de F de 1,18 ppm. Com base nos resultados, os autores sugeriram que a quantidade total de F disponível em alguns produtos pode contribuir significativamente para a quantidade total de

F ingerida diariamente. Os rótulos dos produtos deveriam fornecer informações sobre seu conteúdo de F, que uma vez conhecido, poderia auxiliar na orientação quanto ao controle da sua ingestão, e assim, prevenir fluorose na idade de risco.

Quando se pensa em produtos manufaturados, existe ainda a ocorrência do chamado “efeito halo”, onde produtos fabricados em regiões que contêm F na água de abastecimento difundem o mineral para populações que vivem em áreas com água fluoretada e não fluoretada (TURNER; CHAN; LIN¹⁰⁶, 1998; NEWBRUN⁷⁹, 1999; ROJAS-SANCHES et al⁸³., 1999; JACKSON et al.⁶⁴, 2002).

VLACHOU; DRUMMOND; CURZON¹¹⁰ (1992), através do método de TAVES, avaliaram a [F] em 113 alimentos e bebidas para bebês no Reino Unido e encontraram grandes variações, conforme a classificação: laticínios mostraram valores entre 0,01 e 0,31 mg F/Kg; produtos à base de carne, entre 0,04 e 0,72 mg F/Kg; cereais, entre 0,04 e 0,7 mg F/Kg; produtos à base de vegetais, entre 0,03 e 0,48 mg F/Kg; frutas, entre 0,03 e 0,07 mg F/Kg; sobremesas, entre 0,02 e 0,28 mg F/Kg. A ingestão de F poderia variar conforme o produto consumido.

Quando se pretende afirmar o valor da dose “ótima” de F, todas as fontes deste elemento, devem ser consideradas. Os relatos sobre a ingestão de F através de alimentos e bebidas têm se baseado na análise dos dados de consumo de alimentos derivados de tabelas de alimentos, pesquisa da dieta ou registro da dieta. Estes métodos têm estimado a quantidade de cada alimento consumido. No entanto, um dado mais preciso sobre o consumo de alimentos e ingestão de nutrientes pode ser obtido se as porções duplicadas de toda a dieta (sólidos e líquidos) consumida por um indivíduo forem coletadas e analisadas. A técnica da dieta duplicada apresenta vantagem quando comparada à análise da dieta real do indivíduo feita através apenas do uso de tabelas de alimentos consumidos, as quais podem incluir itens que na verdade não foram consumidos, como cascas de

frutas, ossos, etc. (**GUHA-CHOWDRHURY; DRUMMOND; SMILLIE**⁵², 1996).

Em 1993, **BRUNETTI e NEUBRUM**¹¹ determinaram a ingestão diária de F através da alimentação de crianças entre 3 e 4 anos de idade, fazendo a coleta da dieta-duplicada. Estes autores verificaram uma ingestão diária de 0,33 mg F, que corresponde uma dose aproximada de 0,02 mg F/Kg.

Em 1996, **GUHA-CHOWDHURY, DRUMMOND e SMILLIE**⁵² realizaram um estudo onde foi avaliada a quantidade de F ingerida por crianças de 3 a 4 anos de idade durante um período de 12 meses, através da coleta da dieta duplicada em regiões de água “otimamente” fluoretada e em regiões sem fluoretação da água de abastecimento publico. O valor encontrado para as regiões fluoretadas foi de 0,019 mg F/Kg/dia e de 0,008 mg F/Kg/dia para as regiões não fluoretadas.

ROJAS-SANCHES et al.⁹³ (1999) encontraram uma dose de 0,039 mg F/ Kg devido à dieta para crianças de 16 a 40 meses de idade, contribuindo a água fluoretada com 73% da dose. Os autores analisaram a ingestão diária de F de crianças residentes em 3 comunidades, sendo 2 não fluoretadas (San Juan, Porto Rico e Connerville, Indiana, EUA) e uma otimamente fluoretada (Indianápolis, Indiana, EUA). A ingestão diária total de F (dieta e dentifício) não diferiu significativamente entre as comunidades, sendo que nas não fluoretadas, o maior componente da ingestão foi o dentifício fluoretado. Nas comunidades fluoretadas, a ingestão a partir do dentifício e das bebidas foi semelhante. Em San Juan, a ingestão média diária de F estava dentro dos limites de segurança, enquanto que em Connerville, devido ao “efeito halo”, e em Indianápolis, isto não aconteceu.

Em 2001, **HAFTENBERGER et al.**⁵⁴ avaliaram a ingestão total de F de crianças pré-escolares (3-6 anos de idade) residentes em Dresden, Alemanha, cidade com teor de F na água de abastecimento de 0,25 ppm. A ingestão de F, a partir da dieta, foi estimada pela dieta

duplicada. A ingestão média de F a partir da dieta foi de $202,5 \pm 116,2 \mu\text{g}$ e a partir do dentifrício foi de $273,9 \pm 175,6 \mu\text{g}$. Considerando-se que havia uso de suplementos e uso de sal fluoretado por algumas crianças, a ingestão de F diária a partir de todas as fontes totalizou $930,7 \pm 391,5 \mu\text{g}$, ou $0,053 \pm 0,021 \text{ mg/Kg peso/ dia}$.

LIMA; CURY⁶⁷ (2001) estimaram a ingestão média diária de F pela dieta por crianças entre 20 e 30 meses de idade, residentes em Piracicaba, SP, em $0,04 \text{ mg F/Kg}$.

No estudo de **PESSAN et al.⁸⁹** (2003), para crianças de 4-5 anos e de 6-7 anos de idade residentes em Bauru, SP, a ingestão diária de F pela dieta foi de $0,018$ e $0,025 \text{ mg/Kg peso}$, o que correspondeu a uma ingestão de $0,455$ e $0,346 \text{ mg}$, respectivamente.

Em 2003, **PAIVA; LIMA; CURY⁸⁵** relataram para crianças de 19-38 meses, residentes em 2 comunidades brasileiras, Piracicaba, SP e Ibiá, MG, que freqüentavam ou não creches públicas, uma ingestão de flúor a partir da dieta de $0,040 \pm 0,039$ e $0,027 \pm 0,013 \text{ mg/Kg/dia}$, respectivamente.

2.1.2 Água

A fluoretação da água de abastecimento público tem sido realizada com base na média anual das temperaturas máximas diárias, não sendo considerado nenhum outro fator para o estabelecimento da [F] indicada para comunidade. Os valores que vêm sendo utilizados até os dias atuais foram preconizados por **GALAGAN; VERMILLION⁴⁷**, em 1957, ocasião em que não havia o uso disseminado de dentifrícios fluoretados, os hábitos alimentares da população eram diferentes e a aplicação profissional

de fluoretos não era tão freqüente. **PENDRYS; STAMM**⁸⁸ (1990) concluíram em sua revisão que a prevalência de fluorose dentária em áreas fluoretadas tem permanecido relativamente constante desde a década de 1930. Apesar do aumento de outras fontes de F, a prevalência de fluorose ainda está correlacionada com a concentração de F na água de beber (**SZPUNAR; BURT**¹⁰¹, 1988). A água fluoretada provavelmente tem um impacto maior na prevalência de fluorose indiretamente, por ser usada no processamento de leites em pó e outros alimentos e bebidas infantis (**BURT**¹², 1992).

Em anos recentes tem havido um aumento no consumo de água mineral pela população. Este fato pode ser justificado pela busca de uma água de melhor qualidade, sabor agradável, e livre de impurezas. **GREC et al.**⁵¹, em 2003, realizaram um estudo onde foi avaliado o consumo de água mineral em Bauru-SP, sendo constatado uma prevalência de consumo de água mineral de 29,72%. Na análise da [F] de diversas marcas de água mineral, a maioria apresentou teor de F inferior a 0,1 ppm, visto que as amostras que continham maior conteúdo de F, não indicavam este elemento no rótulo. Esses resultados reforçam a importância e a necessidade de um controle bastante rigoroso, por parte da vigilância sanitária, da concentração de F nestas águas.

VILLENA; BORGES e CURY¹⁰⁹ realizaram um estudo em 1996, em que foi avaliado a concentração de F em 104 marcas de águas minerais comercializadas no Brasil e de diferentes regiões. Foram observadas concentrações de F variando de 0,0 a 4,4 ppm. Concluiu-se ser necessário ser incluído dentro do Sistema de Vigilância Sanitária para o controle de F nas águas minerais oferecidas à população brasileira em termos de risco-benefício.

BASTOS et al.⁸(2000), ao avaliarem a [F] em água mineral engarrafada e de fontes naturais das cidades de Lindóia, Águas de Lindóia e Serra Negra, SP, observaram concentrações de F variando de 0 a 0,46 ppm. Todas as amostras apresentaram concentrações de F abaixo dos limites considerados preventivos para a cárie dentária, necessitando assim, de

divulgação destes dados, para que a população e os profissionais de saúde sejam alertados para tal fato, uma vez que tem ocorrido o aumento do consumo destas águas minerais, que são vendidas em todo território nacional. Além disso, a população desta região, por razões culturais, consome apenas água proveniente destas fontes naturais, não sendo beneficiada pelo F da água de abastecimento público.

2.1.3 Produtos odontológicos fluoretados

Os produtos odontológicos fluoretados têm concentrações de F variando entre 230 ppm nas soluções para bochechos até 23000 ppm nos vernizes fluoretados. Os dentifrícios, que são os produtos odontológicos mais freqüentemente usados, contêm uma concentração de F variando entre 1000 e 1500 ppm, tanto na forma de fluoreto de sódio quanto na forma de monofluorofosfato de sódio (**WHITFORD**¹¹⁴, 1994). Recentemente foi lançado no mercado brasileiro, um dentifrício infantil contendo 550 ppm de F. Nos dentifrícios, a quantidade média aplicada na escova por crianças menores que 6 anos, é 0,55 g por escovação (**RICHARDS; BANTING**⁹¹, 1996). Considerando o dentifrício contém 1000 ppm de F, isto corresponde a uma exposição a 0,55 mg de F por escovação. Em média, 48% desta quantidade é ingerida por crianças de 2 a 3 anos, 42% por crianças de 4 anos e 34% por crianças de 5 anos (**ERICSSON; FORSMAN**³⁹, 1969; **HARGREAVES; INGRAM; WAGG**⁵⁵, 1972; **BARNHART et al.**⁷, 1974; **RICHARDS; BANTING**⁹¹, 1996; **PESSAN et al.**⁸⁹, 2003). Assumindo-se pesos corporais médios de 15, 18 e 20 kg, respectivamente, a ingestão de F a partir de uma única escovação por dia resultaria numa ingestão de F de 0,018, 0,013 e 0,009 mg/kg/dia, respectivamente. Assim, fica evidente que a escovação com dentifrício fluoretado aumenta significativamente a ingestão de F, particularmente para crianças de 2-3 anos e, claro, para aquelas que escovam os dentes 2 ou mais vezes ao dia. No caso específico do Brasil,

estudos conduzidos com crianças de 2-3 anos, residentes em áreas com água fluoretada, constataram que havia uma ingestão média de 0,061 mg/kg/dia de F (variação de 0,011 a 0,142) a partir do dentifrício (**PAIVA; CURY**⁸⁴, 2002) e que, o dentifrício contribuía com 55% da quantidade total de F ingerida diariamente (**LIMA; CURY**⁶⁷, 2001).

Em 2003, **PESSAN et al.**⁸⁹ realizaram um estudo onde foi avaliado a ingestão total de F de crianças entre 4 e 7 anos de idade através da dieta e do dentifrício. Os autores estimaram uma ingestão diária de F através da dieta, para crianças de 4-5 anos, em 0,018 mg/Kg peso corporal e do dentifrício, de 0,041 mg/Kg de peso, determinando que 33% das crianças analisadas ingeriram mais de 0,07 mg de F/Kg/ dia .

A efetividade dos dentifrícios fluoretados na redução da incidência de cárie dentária tem sido extensivamente documentada em uma infinidade de pesquisas clínicas publicadas, as quais foram revisadas em várias ocasiões na década de 80 (**MELLBERG; RIPA**⁷⁶, 1983; **BIESWANGER; STOOKEY**⁹, 1989), e em muitas outras, não publicadas. Entretanto, é claro que fica difícil documentar precisamente, devido ao uso disseminado da água fluoretada e de outras fontes de consumo do F. Mas não pode ser considerada uma simples coincidência, o fato do primeiro relato de declínio de cárie dentária numa comunidade não fluoretada, dos EUA (**ZACHERL; LONG**¹²¹, 1979) ter ocorrido alguns anos após cerca de 90% das crianças escolares terem começado a usar dentifrícios fluoretados. Uma evidência ainda mais forte da importância dos dentifrícios fluoretados, como medida de saúde pública foi trazida por estudos na Inglaterra, onde menos que 10% da população ingere água fluoretada. Nesses estudos o declínio na prevalência de cáries coincidiu com o aumento do uso de dentifrícios fluoretados (**ANDLAW; BURCHELL; TUCKER**³, 1982; **ALLEN; ASHLEY; NAYLOR**², 1983; **MANSBRIDGE; BROWN**⁷², 1985).

Vários estudos têm investigado o possível impacto do uso de dentifrícios fluoretados no desenvolvimento da fluorose dentária, sendo que, muitos apresentam resultados contraditórios. **RIPA**⁹² (1991) revisou vários

estudos procurando uma associação entre o uso de dentifrício fluoretado e prevalência de fluorose. Concluiu que dos 10 artigos avaliados, nove (**HOLM; ANDERSON**⁶², 1982; **DRISCOLL et al.**²⁹, 1983; **SOPARKAR; DEPAOLA**⁹⁸, 1985; **BUTLER; SEGRETO; KOLLINS**¹³, 1985; **SZPUNAR; BURT**¹⁰¹, 1988; **KUMAR et al.**⁶⁵, 1989; **WOOLFOLK; FAJA; BAGRAMIAN**¹¹⁹, 1989; **PENDRYIS; KATZ**⁸⁷, 1989; **BOHATY et al.**¹⁰, 1989) não encontraram associação entre o uso precoce de dentifrício fluoretado e prevalência de fluorose dentária. A maioria destes estudos foi delineada para encontrar a prevalência ou tendência de fluorose dentária na população de interesse (**DRISCOLL et al.**²⁹, 1983; **BUTLER; SEGRETO; KOLLINS**¹³, 1985; **KUMAR et al.**⁶⁵, 1989) ou para encontrar fatores de risco para fluorose nas populações que tinham sido expostas a múltiplas fontes de F sistêmico durante o período de desenvolvimento do dente (**HOLM; ANDERSON**⁶², 1982; **SZPUNAR; BURT**¹⁰¹, 1988; **WOOLFOLK; FAJA; BAGRAMIAN**¹¹⁹, 1989; **PENDRYIS; KATZ**⁸⁷, 1989; **BOHATY et al.**¹⁰, 1989). Os delineamentos e metodologias eram, em geral, apropriados para a questão individual a ser pesquisada, mas não para encontrar associação entre o uso precoce de dentifrício fluoretado e a prevalência de fluorose. Por exemplo, **DRISCOLL et al.**²⁹ (1983), estudando a prevalência de fluorose em 11 cidades de Illinois, com concentrações variadas de F na água de abastecimento, encontraram 8 crianças com fluorose moderada ou severa, em áreas otimamente fluoretadas. Os autores então entrevistaram os pais das 8 crianças por telefone para detectar a causa da fluorose. Para verificar se a causa era o dentifrício fluoretado, eles perguntaram aos pais se a criança tinha ingerido quantidades de F “não usuais”. Outro exemplo é o estudo de **BUTLER; SEGRETO; KOLLINS**¹³ (1985), onde 16 comunidades do Texas com concentrações variadas de F na água, usaram o índice de Dean, mas o dividiram em 2 categorias. Fluorose moderada e severa estavam em uma categoria, e esmalte normal, com fluorose questionável, muito suave e suave, em outra. Definir a fluorose desta maneira reduziria o número de casos da doença, porque as crianças que tinham fluorose suave e muito suave estavam classificadas como não portadoras da doença. Vale

ressaltar que, as idades da população estudada em alguns dos trabalhos, não eram apropriadas para responder à questão estudada (**SZPUNAR; BURT**¹⁰¹, 1988; **BOHATY et al.**¹⁰, 1989). Alguns destes estudos usaram crianças entre as idades de 6 a 13 anos. No estudo de **SZPUNAR; BURT**¹¹⁰ (1988), 46% das crianças estavam abaixo da idade de 7 anos. Em 1988, **OSUJI et al.**⁸³, encontraram uma associação estatisticamente significativa, com uma prevalência de fluorose 11 vezes maior quando se iniciou o uso de dentifício fluoretado antes da idade de 2 anos.

Baseado no grande número de estudos controlados bem conduzidos e na força de associação vista em vários deles, o risco de fluorose dentária associado ao uso precoce de dentifício fluoretado não é mais um assunto controverso (**MASCARENHAS**⁷⁴, 2000).

Para que seja reduzido o risco de desenvolvimento de fluorose dentária, dentifício sem F ou então com concentrações mais baixas, em torno de 500 ppm, deveria ser recomendado para crianças muito pequenas ou pré-escolares, ou então, o dentifício contendo níveis acima de 1000 ppm só deveria ser usado sob a supervisão dos pais, os quais deveriam colocar o dentifício na escova (apenas uma porção do tamanho de uma ervilha) e supervisionar a escovação para assegurar que a criança estaria expelindo e lavando a boca após a escovação (**WARREN; LEVY**¹¹², 1999; **MASCARENHAS**⁷⁴, 2000; **TABARI et al.**¹⁰², 2000).

2.2 INDICADORES BIOLÓGICOS DE EXPOSIÇÃO AO FLÚOR

Os marcadores biológicos ou biomarcadores são definidos como indicadores que sinalizam eventos em sistemas biológicos ou amostras (**COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL**²⁰, 1987). O conceito de biomarcador, ainda que com

as necessárias adaptações, pode ser aplicado às alterações verificadas ao nível da população, comunidade e ecossistema (**WALKER et al.**¹¹¹, 1998).

Um biomarcador não é usado como um teste para diagnóstico, mas como um indicador de uma alteração que poderia levar a uma doença clínica (**GRANDJEAN**⁵⁰, 1995). Através da utilização de biomarcadores é possível determinar se a bioquímica, a morfologia, ou a fisiologia de um indivíduo são substancialmente diferentes das de um indivíduo considerado normal (**WALKER et. Al**¹¹¹,1998). O uso de biomarcadores em epidemiologia não é uma idéia nova (**HULKA**⁶³, 1991), mas foi apenas recentemente que, os biomarcadores se tornaram importantes na toxicologia ambiental (**CULLEN; REDLICH**²², 1995). Infelizmente, poucos biomarcadores têm sido validados. Nos últimos anos, novas técnicas analíticas vêm fornecendo a oportunidade de validação de alguns biomarcadores até então não reconhecidos. Uma vez validado, um biomarcador pode ser usado para avaliar o risco de exposição a substâncias perigosas em populações e provavelmente também em indivíduos.

De uma maneira geral, os biomarcadores foram classificados em três tipos, de acordo com o Comitê de Marcadores Biológicos do Conselho de Pesquisa Nacional²⁰, dos Estados Unidos, em 1987.

- *Biomarcador de efeito*: pode ser um indicador de um componente endógeno do sistema biológico, uma medida da capacidade funcional do sistema ou um estado alterado do sistema, que é reconhecido como uma anormalidade ou doença;

- Biomarcador de susceptibilidade: é definido como um indicador de que a saúde do sistema é especialmente sensível ao desafio da exposição a um composto xenobiótico (substância originada fora do organismo), mede a capacidade inata ou induzida, de um indivíduo apresentar uma resposta a um dado agente;
- Biomarcador de exposição: pode ser a identificação de uma substância exógena ao sistema, o produto de interação entre um composto xenobiótico e componentes endógenos, ou outro evento no sistema biológico relacionado à exposição.

Dependendo dos eventos biológicos envolvidos, os biomarcadores podem ser úteis na monitoração do estado de saúde, em determinar relações dose-resposta e em estimar os riscos (DeCAPRIO²⁶, 1997). A utilização potencial de biomarcadores para F foi discutida recentemente (NIDR⁸⁰, 1994; CLARKSON¹⁸, 2000). Trata-se de uma questão relevante, uma vez que o mecanismo biológico de ação do F resultando na fluorose dentária ainda não está totalmente esclarecido. Além do mais, as estimativas de ingestão de F são geralmente imprecisas.

O Comitê de Biomarcadores do Conselho de Pesquisa Nacional²⁰, em 1987, classificou alguns biomarcadores de F, subdivididos em:

- Biomarcadores de efeito: fluorose dentária e fluorose esquelética;
- Biomarcadores de susceptibilidade: genética, estado nutricional, desordens ácido básicas, condição renal, “turnover” ósseo e crescimento esquelético;

- *Biomarcadores de exposição:* plasma, soro, ossos, dentes, urina, saliva, placa dentária, fluido da placa, cabelos e unhas.

A Organização Mundial de Saúde (**WHO**¹¹⁹, 1994) classificou os biomarcadores de exposição ao F de acordo com a cronologia de sua marcação: marcadores históricos (osso e dentes), marcadores contemporâneos (urina, plasma e saliva) e marcadores recentes (cabelo e unhas). Os marcadores históricos são ferramentas úteis para o monitoramento da exposição crônica ao F, enquanto que, os contemporâneos podem refletir a exposição aguda ao F. Os marcadores recentes podem refletir exposições crônicas e sub- crônicas ao F.

2.2.1 Unha como biomarcador de exposição ao flúor

A unha, que é composta principalmente por queratina, faz parte dos fâmeros cutâneos, como os cabelos, e, é muito peculiar à raça humana, podendo refletir o estado de saúde dos indivíduos assim como poderá demonstrar seus hábitos bons ou ruins, das pessoas.

As unhas se formam na chamada raiz ou matriz e, a medida que crescem, deslizam pelo leito ungueal, até atingirem a extremidade do dedo.

As unhas têm sido consideradas um confiável indicador biológico de exposição a diversas substâncias, como selênio

(**LONGNECKER et al.**⁶⁹, 1999; **GHADIRIAN et al.**⁴⁹; 2000), arsênio (**LIN et al.**⁶⁸, 1998), zinco, cobre e cádmio (**MAJUMDAR et al.**⁷¹, 1999), substâncias estas relacionadas a variadas patologias. Verifica-se que os teores destas substâncias nas unhas, por estas refletirem exposição por um período relativamente longo, não estão sujeitos a variações diárias de exposição/ingestão. Apesar da variabilidade dos resultados entre os

indivíduos poder atenuar um pouco a sua efetividade como biomarcador, uma única coleta é capaz de refletir essa exposição (**GARLAND et al.**⁴⁸, 1993).

Quando se pensava na confiabilidade das unhas como biomarcadores da exposição ao F, esbarrava-se na possibilidade de contaminação devido à incorporação de F a partir da água e outras fontes exógenas. No entanto, **WHITFORD et al.**¹¹⁷ (1999) afirmaram que não acontece esta incorporação. Vários métodos de preparação e análise das unhas têm sido descritos na literatura.

SCHAMCHULA et al.⁹⁶ (1985) fizeram hidrólise em base forte, a alta temperatura, e, então usaram o eletrodo íon específico para analisar as unhas das mãos de 3 grupos de crianças húngaras, estabelecidos a partir da concentração de F na água de beber, que variava de 0 a 0,11 ppm, de 0,5 a 1,1 ppm ou de 1,6 a 3,1 ppm. As concentrações médias de F encontradas nas unhas das mãos foram 0,79, 1,31 e 2,31 mg/Kg, respectivamente.

Em 1989, **MACHOY**⁷⁰ usou um método de cromatografia gasosa para analisar as unhas das mãos de cinco grupos de crianças polonesas. Um dos grupos vivia numa comunidade sem água fluoretada, mas que possuía uma fábrica que processava “fosforitas e apatitas”. A concentração média de F nas unhas das mãos foi de 12,2 mg/kg. Três grupos residiam em comunidades sem água fluoretada, enquanto que, o outro grupo, onde a concentração era de 0,64 ppm. A concentração média nas unhas das mãos do último grupo foi de 8,6 mg/Kg, enquanto que, dos outros três grupos foi de 2,5, 6,4 e 7,6 mg/Kg. O autor também analisou as unhas das mãos e as dos pés de um único indivíduo e encontrou concentrações de F idênticas em ambas.

SPATE et al.¹⁰⁰ (1994) usaram análise por ativação neutra para determinar as concentrações em unhas dos pés obtidas de mulheres residentes em Holden ou Boston, Massachusetts, onde a água continha 0,09

e 1,0 ppm, respectivamente. As concentrações médias (amplitude) foram de 4,2 (2,4-9,7) e 6,4 (2,7-10,1) mg/Kg.

Em 1999, **WHITFORD et al.**¹¹⁷ analisaram a concentração de F existente nas unhas com eletrodo, através de difusão facilitada por HMDS. Os autores observaram que a área de superfície das unhas (intactas, cortadas em pequenos pedaços ou pulverizadas), a imersão em água deionizada por 6 horas, a imersão em água fluoretada (1 ppm) por 2 horas ou a remoção de matéria orgânica das unhas por incineração não causaram alterações no conteúdo de F analisado. Os autores relataram ainda que, o conteúdo de F presente nas unhas dos pés é aproximadamente a metade daquele presente nas unhas das mãos. Um dos autores e participante do trabalho aumentou sua ingestão de F durante 1 mês, observando um aumento significativo na concentração de F das unhas das mãos cerca de 3,5 meses depois. Foram ainda dosadas as concentrações de F presentes nas unhas das mãos de crianças brasileiras que residiam em áreas contendo 0,1, 1,6 ou 2,3 ppm de F na água, tendo-se encontrado médias de 1,85, 5,28 e 7,52 mg/kg, respectivamente. Os resultados indicam que, a semelhança das concentrações de F nas unhas das mãos são bons indicadores da ingestão de F.

Em 2000, **RUI; LIMA; CURY**⁹⁵ analisaram amostras de unhas dos dedos das mãos de crianças que possuíam entre 18 e 36 meses de idade, sendo 20 de Cordeirópolis, SP (0,04 ppm F na água) e 26 do Distrito de Assistência, Rio Claro, SP (1,33 ppm F na água). Todas as crianças escovavam os dentes com dentífrico fluoretado. A análise de F nas unhas foi feita após difusão facilitada por HMDS. Os resultados em termos de média $\pm$ erro padrão (amplitude), expressos em mgF/kg de unha foram: $1,54 \pm 0,22$ (0,27-3,80) e $4,15 \pm 0,37$ (1,95-9,34), respectivamente, para as crianças de Cordeirópolis e Assistência. Os resultados sugerem que a unha pode ser um indicador biológico para diferenciar fontes de exposição ao F. Os autores recomendaram que este estudo deveria ser complementado com

outros de correlação com a dose de exposição (mg F/kg de peso corporal/dia).

ARSATI⁴, em 2003, realizou uma pesquisa para avaliar se a unha poderia ser utilizada como indicador biológico de exposição ao F em crianças de 20 a 30 meses, em três cidades distintas. Os dados obtidos sugeriram que a unha pode ser um indicador para diferenciar a exposição ao F pela água de abastecimento consumida, mas não pelo dentífrico.

2.2.2 Plasma como biomarcador de exposição ao flúor

O sangue é composto por plasma (60%) e por glóbulos brancos, glóbulos vermelhos, leucócitos e plaquetas (40%). O plasma é classificado como um biomarcador de exposição ao F de meia-vida curta, podendo indicar uma exposição que ocorreu há poucos minutos ou horas atrás. A determinação do F no plasma envolve a retirada de sangue, que, por se tratar de um procedimento invasivo, é mais difícil de ser realizado em crianças.

Estabeleceu-se que os níveis plasmáticos humanos de F variam durante o dia (**COWELL; TAYLOR²¹**, 1981; **EKSTRAND³⁰**, 1978), variações estas certamente relacionadas aos padrões de exposição ao F. Quando a ingestão de F ocorre de acordo com o padrão diário normal de ingestão de alimentos, líquidos, escovação, etc., seria esperado que os níveis plasmáticos mostrassem vários picos pequenos, geralmente tendendo a subir durante as horas em que o indivíduo mantém-se acordado e, a descer, durante o sono. Desta forma, estaria refletindo o fato de que, quando a entrada de F no plasma excede o grau de sua remoção, as concentrações plasmáticas de F devem aumentar. É provável que exista algum componente fisiológico envolvido, mas sua natureza e impacto no ritmo circadiano ainda não foram investigados (**WHITFORD¹¹⁵**, 1996).

GUY; TAVES⁵³ (1973) consideraram que a concentração de F plasmática aumenta com a concentração de F na água de beber. Relataram que, em áreas com 1,0 e 5,6 ppm de fluoretação da água, os níveis de F no plasma foram de 0,41 e 4,3 μM , respectivamente.

EKSTRAND³⁰ (1978) analisou a concentração de F no plasma de 15 indivíduos pertencentes a 3 diferentes áreas com 9,6 , 1,2 e 0,25 ppm de F na água de beber, durante 36 horas. Na região com 9,6 ppm de F, foi observada uma marcante flutuação na concentração de F plasmático durante o dia, comparado com as demais regiões. Evidenciou-se também, uma clara tendência ao aumento da excreção urinária de F com o aumento da idade.

As concentrações de F no plasma variam de acordo com o nível de ingestão e vários fatores fisiológicos (**WHITFORD¹¹⁵**, 1996). Entretanto, o valor numérico da concentração plasmática de F em indivíduos saudáveis, cuja principal fonte de F é a dieta, é igual àquela presente na água de beber, desde que a concentração plasmática seja expressa em $\mu\text{mol/L}$ e a concentração na água em ppm (**GUY, TAVES; BREY Jr.⁵³**, 1976). O risco de fluorose dentária é diretamente proporcional à interação entre as concentrações de F circulantes e o tempo, ou seja, à área sob a curva tempo-concentração. Assim, a fluorose dentária pode resultar de variações de concentrações plasmáticas de F, desde que elas sejam mantidas por períodos suficientemente longos (**WHITFORD¹¹⁶**, 1997). Apesar da correlação entre as concentrações de F no plasma e a fluorose dentária estarem bem estabelecidas, a coleta de sangue não é um procedimento ideal para ser realizado em humanos.

2.2.3 Urina como biomarcador de exposição ao flúor

Uma vez que a urina é a principal via de excreção para o F ingerido, a análise da concentração de F na urina é um bom meio para se estimar a ingestão total de F de uma população (**WHO¹¹⁹**, 1994). Para este

fim, a coleta de amostras de urina por 24 horas é mais confiável que a de amostras isoladas (**HODGE; SMITH; GEDALIA**⁶¹, 1970), pois o F é rapidamente excretado após sua ingestão, atingindo um pico em 2 horas. Amostras isoladas podem não refletir a concentração média e muito menos a ingestão total. É importante salientar que, a urina é um biomarcador de exposição de meia-vida curta ou de curto tempo, podendo indicar uma exposição que ocorreu há poucos minutos ou horas atrás.

Vários estudos têm mostrado que a fração de F que é excretada pela urina varia de acordo com a massa corporal (**WHITFORD**¹¹³, 1990; **EKSTRAND et al.**³⁸, 1994). Assim, em crianças jovens tem-se relatado uma excreção menor em relação aos adultos, e isto é atribuído à maior capacidade que as crianças apresentam para depositar F nos tecidos duros. Para adultos jovens, a FUEF tem sido reportada como sendo aproximadamente 50% (**WHITFORD**¹¹³, 1990; **MARTHALER et al.**⁷³, 1995), apesar da variação dos valores experimentais relatados em vários estudos de farmacocinética estar entre 41 e 47% (**EKSTRAND**³⁰, 1978; **EKSTRAND; EHRNEBO; BORÉUS**³², 1978; **EKSTRAND; KOCH; PETERSSON**³⁴, 1980). Mais recentemente, um valor médio de 16,7% foi determinado para a FUEF de crianças entre 37 e 410 dias (**EKSTRAND et al.**³⁸, 1994), e de 30,7%, para crianças de 3 a 5 anos (**VILLA et al.**¹⁰⁸, 1999).

EKSTRAND; KOCH; PETERSSON³⁴ (1980) avaliaram a concentração de F presente na urina e no plasma de crianças após a aplicação de verniz fluoretado, e encontraram um valor de 550µg de F/12 h, para a urina das crianças mais novas (que receberam 2,3-3,0 mg F) e de 1100µg de F/12h, para as mais velhas (que receberam 5-5,2 mg F).

2.2.4 Saliva dos ductos como biomarcador de exposição ao flúor

Quando se fala em biomarcadores para exposição ao F em substituição ao plasma deve-se pensar também no uso da saliva dos ductos.

Uma das vantagens da sua utilização, quando comparada ao plasma, é sua fácil coleta, apresentando-se também como um procedimento não invasivo nos indivíduos a serem examinados.

O trabalho de **WHITFORD; THOMAS; ADAIR**¹¹⁸ (1999) mostrou que a [F] na saliva de parótida é significativamente relacionada aos níveis plasmáticos ($p < 0,0001$) por uma constante de proporcionalidade de 0,80. Os autores concluíram que, as concentrações de F na saliva da parótida podem ser usadas para se estimar as concentrações plasmáticas em crianças de 5 a 10 anos de idade.

2.2.5 Cabelo como biomarcador de exposição ao flúor

Entre os biomarcadores de exposição crônica ao F, o cabelo e a unha são provavelmente os menos estudados.

VALKOVIC¹⁰⁷, em 1977, descreveu que o cabelo e a unha são os mais valiosos tecidos que podem refletir variações internas e externas no corpo humano, em período de curto e de longo tempo.

Em 1990, **CZARNOWSKI e KRECHNIAK**²⁴ realizaram um estudo com 106 indivíduos que trabalhavam com fertilizantes de fosfato em plantas. Avaliou-se o conteúdo de F na urina, no cabelo e nas unhas desses trabalhadores. Foram encontradas correlações positivas entre as concentrações de F na urina e no cabelo ($r = 0,77$), na urina e nas unhas ($r = 0,99$), e no cabelo e nas unhas ($r = 0,70$). Os resultados obtidos indicaram que o conteúdo de F encontrado nos cabelos e nas unhas pode ser usado como um indicador de exposição profissional para o F.

NAGRA et al.⁷⁸ (1992), realizaram um estudo com trabalhadores industriais em Ontário, Canadá, onde se avaliou o vestígio de elementos contaminantes através dos cabelos e unhas desses

trabalhadores. Foi demonstrado que a significância de cabelos e unhas é bastante semelhante.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos do presente trabalho foram:

- Verificar se a unha pode ser usada como biomarcador de ingestão crônica de F a partir da dieta, em crianças na idade de risco para fluorose dentária, residentes em comunidades com água fluoretada ou não.
- Estimar a ingestão de F a partir da dieta pelas mesmas crianças.
- Avaliar a correlação existente entre a quantidade de F ingerida pela dieta, os níveis plasmáticos de F e a [F] presente nas unhas das mãos e dos pés das crianças.
- Comparar a [F] presente nas unhas das mãos com as unhas dos pés das crianças.
- Verificar se existe correlação entre a [F] encontrada nas unhas das mãos e nas unhas dos pés coletadas em diferentes datas.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Material utilizado para a coleta do plasma

- Seringa descartável Becton Dickinson
- Agulha descartável Becton Dickinson 25/7
- Heparina sódica contendo 5000 UI/mL (Eurofarma)
- Centrífuga Jouan modelo A 14
- Frasco plástico tipo “eppendorf” (2,0 mL)

4.1.2 Material utilizado para a análise de flúor nas unhas, no plasma e na dieta

- Escova interdental
- Ultra-som cleaner modelo USC 750, marca Unique
- Balança de precisão Metter Toledo (precisão $\pm 0,01$ mg)
- Placas de Petri plásticas (Falcon, nº 1007)
- Vaselina
- Hexametil-disiloxano HMDS (Aldrich)
- Mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145)
- Pipetas automáticas da marca Gilson

- Ponteiras descartáveis
- Eletrodo flúor sensível Orion, modelo 9409
- Micro-eletrodo de referência calomelano da marca Accumet, número de catálogo #13-620-79
- Potenciômetro da marca Orion, modelo EA 940
- Solução estoque padrão contendo 0,1 M de F (Orion)
- Ácido sulfúrico concentrado (Merck)
- Liquidificador
- Todos os demais reagentes possuíam grau analítico

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Seleção das amostras

Participaram deste estudo, devidamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, e com assinatura dos seus responsáveis ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, 15 crianças de 2 a 6 anos de idade, de ambos os sexos, residentes no município de Bauru-SP (grupo teste), cidade com água de abastecimento fluoretada (0,6-0,8 ppm de F), e 15 crianças de 2 a 6 anos de idade, de ambos os sexos, residentes no município de Itápolis-SP (grupo controle), cidade com água de abastecimento não fluoretada (0,09-0,2 ppm), formando assim dois grupos focais. As crianças estavam em bom estado de saúde bucal e geral e sem ingestão de medicamentos durante a pesquisa. Foram selecionadas através

de uma amostra de conveniência, não sendo portadoras de distúrbios gastro-intestinais, ósseos e/ou renais. Tiveram indicação médica para coleta de sangue, realizada em laboratórios especializados.

As crianças residentes em Bauru, desde o seu nascimento, consumiram exclusivamente água de abastecimento público fluoretada e seus alimentos foram preparados com esta (grupo teste), o mesmo padrão se repetiu para a cidade de Itápolis. Além disso, as temperaturas das cidades seguem o mesmo padrão climático, com temperatura média anual variando em torno de 23°C (IPMET). As cidades, portanto são semelhantes em diversos aspectos, exceto pela concentração de fluoretos na água de consumo.

4.2.2 Obtenção das amostras

4.2.2.1 UNHAS

Os pais foram orientados quanto a necessidade de deixarem que as unhas das mãos e dos pés das crianças crescessem por um período de 15 dias para depois cortar uma a uma e armazená-las em frascos plásticos virgens, oferecidos pela pesquisadora e com a identificação e data correspondente à coleta. Este procedimento foi repetido após 15 dias de pausa para as unhas crescerem, totalizando um intervalo de tempo de 1 mês. Posteriormente, as amostras, de unhas foram coletadas nas casas dos voluntários e levadas para o laboratório para realizar as análises de F.

4.2.2.2 PLASMA

Em Bauru, a coleta de sangue foi realizada no Laboratório de Análises Clínicas da Universidade do Sagrado Coração, e em Itápolis, no

Laboratório Romanini. Para a coleta do sangue foram utilizadas agulhas e seringas descartáveis contendo 25µL de heparina, de 3 a 4 mL e que posteriormente foi colocado em um frasco plástico tipo “eppendorf” identificado com o número do voluntário. Posteriormente o sangue foi centrifugado por 5 min a 3000 rpm (Centrífuga Jouan modelo A14) para a obtenção do plasma.

4.2.2.3 DIETA

A fim de se estimar a ingestão de F a partir da dieta, foi utilizado o método da dieta duplicada. Este procedimento foi feito uma única vez, porque se estima que a dieta seja relativamente constante e o nosso objetivo foi apenas ter um parâmetro para se estimar a ingestão de F a partir dela. As instruções dadas aos pais quanto ao método de coleta de todos os alimentos e bebidas ingeridos por seus filhos num período de 24 horas foram similares às descritas por **GUHA-CHOWDHURY; DRUMMOND; SMILLIE**⁵² (1996). Foi enfatizada a importância de se manter os hábitos dietéticos usuais em casa e de se duplicar a dieta o mais precisamente possível pela observação do que a criança realmente iria comer e beber. Foi pedido aos pais para removerem as partes dos alimentos que normalmente não são ingeridas, como sementes, cascas e ossos, antes de colocá-los no recipiente.

Os pais, por observação visual, estimaram a quantidade de alimentos consumidos o mais precisamente possível, usando medidas caseiras, como colher de chá, colher de sobremesa, xícara de chá, etc., para aproximar as quantidades de alimentos ingeridos. No caso das refeições, foi pedido para os pais servirem duas porções similares em dois pratos separados, esperar até que a criança terminasse a sua refeição e então adicionar ou remover porções similares no prato que haviam separado. Além disto, os pais forneceram também uma relação contendo todos os alimentos e bebidas ingeridos pela criança nestas 24 horas. No dia seguinte, a

amostra da dieta armazenada em frasco plástico foi recolhida e pesada. As amostras foram então homogeneizadas em liquidificador com volumes conhecidos de água deionizada, e o volume final foi medido. Posteriormente, foram armazenadas em recipientes plásticos devidamente rotulados a -20°C até a análise de F.

A finalidade da coleta da dieta duplicada foi estimar a ingestão de F pelas crianças, a fim de estabelecer uma correlação entre a quantidade de F ingerida e a concentração F presente no plasma, e unhas, a fim de se validar a unha como biomarcador de exposição ao F através da dieta em crianças.

Devido à coleta da dieta duplicada, os voluntários foram ressarcidos pela sua participação com alimentos não perecíveis.

4.2.3 Análise de flúor

4.2.3.1 UNHAS

Os fragmentos das unhas das mãos e dos pés de cada criança, coletados a cada período, foram analisados simultaneamente. Em algumas amostras, quando o peso total foi superior a 20 mg, as análises foram feitas em duplicata e obteve-se a média das 2 leituras. Os fragmentos foram limpos com água deionizada, usando-se uma escova interdental para os fragmentos maiores, sendo que os fragmentos muito pequenos foram limpos por fricção contra um pedaço de tecido umedecido em água deionizada. Foram então colocados em ultra-som com água deionizada por 10 minutos, secos em estufa a 60°C por 2 horas e pesados em balança de precisão (balança Mettler Toledo, precisão $\pm 0,01$ mg) e colocados em placas de Petri plásticas (Falcon, n° 1007), juntamente com 2 mL de água deionizada (FIGURA1). Na tampa destas placas, foram colocados 50 μ L de

NaOH 0,05 M, distribuídos em 3 gotas (FIGURA 2). As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado hexametil-disiloxano (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3 M), (FIGURA 3). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme (FIGURA 4). As placas foram colocadas então numa mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante a noite. No dia seguinte, as tampas de polietileno foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μ L de ácido acético 0,2 M. O volume total foi ajustado para 75 μ L com água deionizada usando uma pipeta (FIGURA 5). A gota, que continha todo o F das unhas foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa (FIGURA 6).

Validação da análise:

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o F da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do F pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 μ g/mL, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS podemos detectar quantidades de F acima de 0,0015 μ g, o que é suficiente para amostras de unha pesando mais que 2,5 mg.

As soluções-padrão (contendo 0,0095, 0,019, 0,095 e 0,19 μ g F) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de unha

analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de unhas, a segunda quando a metade das amostras já tinha sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras.

As leituras obtidas em milivoltagem (mV), foram convertidas para μg de F, através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha de dados, e então foi calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $\geq 0,99$ (linearidade) foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Além disto, padrões que não sofreram difusão foram preparados usando-se as mesmas soluções (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,20 M) que foram usadas para se preparar os padrões e amostras que sofreram difusão. Estes padrões não difundidos foram feitos de modo a ter exatamente a mesma concentração de F que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras de mV mostrou que o F nos padrões difundidos foi completamente captado e analisado.

4.2.3.2 PLASMA

A análise de F foi feita após difusão facilitada por HMDS (hexametil-disiloxano), pelo método de **TAVES**¹⁰³ (1968), como modificado por **WHITFORD**¹¹⁵ (1996), com exceção de que, por se tratar de um fluido biológico, contendo, portanto CO_2 , foi realizada uma pré-difusão para se eliminar o CO_2 . Para tanto, a amostra de plasma foi colocada na placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela foi colocado o ácido sulfúrico saturado (HMDS) num volume que corresponda a 20% do volume da amostra de plasma. Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) terá sido previamente aquecido até que o seu volume seja reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer F residual que possa contaminar a amostra. Após a

adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 minutos para a saída do CO₂, o volume das mesmas foi completado para 2 mL com água deionizada e então a difusão seguiu normalmente como descrito para as unhas.

Validação da análise:

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o F da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do F pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 µg/mL, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS, podemos detectar quantidades de F acima de 0,0015 µg. Considerando que os níveis de F plasmáticos geralmente giram em torno de 0,5-1,0 µmol/L (0,0095-0,019 µg/mL), utilizando-se 1 mL de plasma para análise (antes da difusão facilitada por HMDS) teríamos uma quantidade de F de 0,0095-0,019 µg, portanto bem acima do limite de detecção do eletrodo. As soluções-padrão (contendo 0,0095, 0,019, 0,095 e 0,19 µg F) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de plasma que foram analisadas. Foi feita uma primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de plasma, a segunda quando a metade das amostras já tiver sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras.

As leituras obtidas em milivoltagem (mV), foram convertidas para µg de F, através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então foi calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação

de até 5% para todos os padrões e $\geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

Além disto, padrões que não sofrerão difusão foram preparados usando-se as mesmas soluções (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,20 M) que forem usadas para se preparar os padrões e amostras que sofreram difusão. Estes padrões não difundidos foram feitos de modo a ter exatamente a mesma concentração de F que os padrões que sofreram difusão. A comparação das leituras de mV mostrará que o F nos padrões difundidos terá sido completamente captado e analisado.

Foi feita também uma seqüência de padrões que sofreram adição do ácido aquecido da mesma maneira que as amostras e as leituras de mV deveriam ser as mesmas tanto para os padrões que não sofrerem adição de ácido aquecido, quanto para aqueles que sofrerem, assim como também para os que não sofrerem difusão.

4.2.3.3 DIETA

A análise de F foi feita em duplicata, como descrito para as unhas, após difusão facilitada por HMDS (**TAVES**¹⁰³, 1968, modificado por **WHITFORD**¹¹⁵, 1996).

A ingestão total de F pela dieta (mg F/dia) foi calculada multiplicando-se a quantidade de F na amostra (mg F/ml) pelo volume final diário no qual estava contido tudo que a criança ingeriu. A dose de F decorrente da dieta, em mg F/Kg peso/dia, foi determinada dividindo-se pelo peso da criança.

Validação da análise:

Os critérios para realização da curva de calibração foram os mesmos descritos para as unhas.

Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do teste “t” de Student não pareado para comparação da concentração de F existente no plasma, nas unhas e a quantidade de F presente na dieta entre as crianças de Bauru e Itápolis ($p<0,05$).

O teste “t” de Student pareado foi usado para comparar a diferença entre a concentração de F presente nas unhas das mãos e dos pés das crianças ($p<0,05$), bem como para detecção de diferenças entre as concentrações de F encontradas nas duas datas diferentes, para as unhas das mãos e dos pés ($p<0,05$).

Foi avaliada ainda a correlação existente entre a concentração de F presente no plasma e aquela presente nas unhas das mãos e pés, bem como a quantidade de F ingerida a partir da dieta. Avaliou-se também a correlação existente entre a concentração de F encontrada nas unhas das mãos e dos pés ($p<0,05$), bem como entre as concentrações de F encontradas nas unhas das mãos e dos pés, nas 2 coletas diferentes.

As FIGURAS 1 a 6 ilustram alguns passos executados na técnica de microdifusão de **TAVES**¹⁰³, modificada por **WHITFORD**¹¹⁵ com amostras de unhas.

FIGURA 1: Adição das amostras de unhas com 2mL de água deionizada.

FIGURA 2: Adição de 50µL de NaOH a 0,05 M.

FIGURA 3: Fechamento da placa de Petri e adição de 2 mL de HMDS.

FIGURA 4: Vedamento imediato do orifício com vaselina e parafilme.

FIGURA 5: O NaOH foi combinado em uma única gota, tamponado com 25µL de ácido acético.

FIGURA 6: A leitura de F foi obtida através de um eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano.

5 Resultados

5 RESULTADOS

A TABELA 1 mostra as características das crianças da amostra estudada, em relação ao sexo, idade e o peso das crianças.

TABELA 1 - Característica da amostra estudada de Bauru e Itápolis, quanto ao sexo, a idade e peso das crianças.

Criança	Cidade	Sexo	Idade	Peso Kg
1	Bauru	F	5	23,00
2	Bauru	M	3	22,00
3	Bauru	M	4	13,10
4	Bauru	F	4	18,00
5	Bauru	M	4	27,00
6	Bauru	M	5	13,50
7	Bauru	M	5	19,00
8	Bauru	M	4	15,80
9	Bauru	F	4	29,00
10	Bauru	F	5	15,80
11	Bauru	F	6	22,00
12	Bauru	M	5	22,70
13	Bauru	M	5	17,00
14	Bauru	M	6	23,00
15	Bauru	F	5	13,00
16	Itápolis	F	5	35,00
17	Itápolis	F	3	22,00
18	Itápolis	F	3	22,00
19	Itápolis	F	3	21,00
20	Itápolis	M	5	21,00
21	Itápolis	F	4	20,00
22	Itápolis	F	5	21,50
23	Itápolis	M	4	22,00
24	Itápolis	M	5	24,00
25	Itápolis	F	4	17,50
26	Itápolis	F	4	19,00
27	Itápolis	M	2	15,00
28	Itápolis	F	3	16,00
29	Itápolis	M	4	20,00
30	Itápolis	M	5	37,00

Na TABELA 2 encontramos os valores da concentração de F no plasma ($\mu\text{g/mL}$) das crianças das cidades de Bauru e Itápolis.

TABELA 2 - Concentração de F no plasma ($\mu\text{g/mL}$) das crianças de Bauru e Itápolis.

Crianças	Plasma	Plasma
	Bauru	Itápolis
1	0,019	0,032
2	0,011	0,025
3	0,027	0,019
4	0,010	0,019
5	0,013	0,090
6	0,002	0,026
7	0,019	0,025
8	0,039	0,031
9	0,015	0,022
10	0,015	0,020
11	0,020	0,023
12	0,008	0,006
13	0,037	0,008
14	0,038	0,010
15	0,014	0,010

A TABELA 3 relata a média dos valores da concentração de F nas unhas das mãos ($\mu\text{g/g}$), na primeira e segunda coleta, das crianças de Bauru e Itápolis.

TABELA 3 - Média da concentração de F nas unhas das mãos ($\mu\text{g/g}$), na primeira e segunda coleta, das crianças de Bauru e Itápolis.

Crianças	Unhas das mãos	Unhas das mãos
	Bauru	Itápolis
1	1,439	1,529
2	3,003	1,952
3	3,496	3,108
4	4,398	0,518
5	1,941	4,136
6	4,002	2,564
7	6,171	1,466
8	5,205	2,847
9	3,231	1,761
10	2,646	5,471
11	4,767	2,354
12	4,571	2,342
13	3,029	1,317
14	2,165	1,093
15	3,298	1,921

Na TABELA 4 temos a média dos valores da concentração de F nas unhas dos pés ($\mu\text{g/g}$), na primeira e segunda coleta, das crianças de Bauru e Itápolis.

TABELA 4 - Média da concentração de F nas unhas dos pés ($\mu\text{g/g}$), na primeira e segunda coleta, das crianças de Bauru e Itápolis.

Crianças	Unhas dos pés	
	Bauru	Itápolis
1	1,431	1,880
2	1,303	1,371
3	4,491	1,204
4	2,721	2,147
5	1,956	1,328
6	4,678	1,809
7	4,502	0,794
8	1,871	1,567
9	4,064	1,835
10	2,131	1,086
11	2,401	0,830
12	4,706	2,446
13	2,496	1,405
14	1,954	2,878
15	1,522	1,139

Já a TABELA 5 refere-se aos valores da estimativa da ingestão de F (mg) a partir da dieta, conforme estimado pela dieta duplicada, nas cidades de Bauru e Itápolis.

TABELA 5 - Ingestão de F (mg) a partir da dieta, conforme estimado pela dieta duplicada, nas cidades de Bauru e Itápolis.

Crianças	Dieta	Dieta
	Bauru	Itápolis
1	0,284	0,077
2	0,130	0,069
3	0,325	0,085
4	1,024	0,109
5	0,205	0,120
6	0,896	0,044
7	0,150	0,083
8	0,363	0,009
9	0,253	0,055
10	0,139	0,138
11	2,000	0,087
12	1,798	0,082
13	0,358	0,015
14	0,110	0,248
15	0,224	0,106

A TABELA 6 mostra a média da concentração de F presente no plasma, nas unhas das mãos e dos pés, nas duas datas coletadas, bem como a média das duas coletas, para as crianças de Bauru (água fluoretada) e Itápolis (água não fluoretada).

TABELA 6 - Média ($\pm$ DP) e intervalo de 95% de confiança da concentração de F no plasma, nas unhas das mãos e dos pés das crianças de Bauru e Itápolis.

Variáveis	Bauru	Itápolis
Plasma	0,019 $\pm$ 0,011 (0,012-0,025)	0,024 $\pm$ 0,020 (0,013-0,035)
Unhas das mãos - coleta 1	3,560 $\pm$ 1,370	2,104 $\pm$ 1,311
Unhas dos pés - coleta 1	2,855 $\pm$ 1,411	1,565 $\pm$ 0,668
Unhas das mãos - coleta 2	3,555 $\pm$ 1,520	2,480 $\pm$ 1,345
Unhas dos pés - coleta 2	2,775 $\pm$ 1,520	1,597 $\pm$ 0,780
Unhas das mãos - média das coletas	3,557 $\pm$ 1,297 (2,839-4,276)	2,292 $\pm$ 1,250 (1,599-2,985)
Unhas dos pés - média das coletas	2,815 $\pm$ 1,288 (2,101-3,529)	1,580 $\pm$ 0,589 (1,255-1,908)

Os valores foram expressos em $\mu\text{gF/mL}$ e $\mu\text{gF/g}$ para plasma e unhas, respectivamente.

Os mesmos dados demonstrados através das tabelas, estão ilustrados nas figuras 7, 8 e 9.

FIGURA 7 - Distribuição dos grupos quanto à [F] no plasma

FIGURA 8 - Distribuição dos grupos quanto à [F] nas unhas das mãos

FIGURA 9 - Distribuição dos grupos quanto à [F] nas unhas dos pés.

A TABELA 7 e a FIGURA 10 revelam a ingestão diária de F, conforme estimado pela dieta duplicada.

TABELA 7 - Ingestão de F a partir da dieta, conforme estimado pela dieta duplicada.

Ingestão diária de F	Bauru	Itápolis
mg	0,551 $\pm$ 0,610	0,088 $\pm$ 0,056
mg/Kg peso corporal	0,029 $\pm$ 0,029	0,004 $\pm$ 0,003

FIGURA10 - Distribuição dos grupos quanto à estimativa de ingestão de F a partir da dieta.

A TABELA 8 fornece os resultados da análise estatística realizada sobre estas variáveis. A concentração média de F encontrada no plasma das crianças de Itápolis foi de $0,024 \pm 0,020$ $\mu\text{g/mL}$, portanto ligeiramente maior que a encontrada nas crianças de Bauru ($0,019 \pm 0,011$ $\mu\text{g/mL}$). No entanto, conforme se observa na TABELA 8, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($t = -0,892$, $p = 0,379$).

TABELA 8 - Teste t não pareado realizado sobre as variáveis concentração de F no plasma, unhas das mãos, unhas dos pés e ingestão estimada de F pela dieta.

Variáveis	Bauru	Itápolis	t	P
	Média $\pm$ DP	Média $\pm$ DP		
Plasma	$0,019 \pm 0,011$	$0,024 \pm 0,020$	- 0,892	0,379
U.Mão média	$3,555 \pm 1,520$	$2,480 \pm 1,345$	2,718	0,011
U.Pé média	$2,775 \pm 1,520$	$1,597 \pm 0,780$	3,372	0,002
Dieta	$0,551 \pm 0,610$	$0,088 \pm 0,056$	2,921	0,006

A concentração de F encontrada nas unhas das mãos das crianças, na primeira coleta, foi maior para as crianças de Bauru ($3,560 \pm 1,370 \mu\text{g/g}$), quando comparadas às de Itápolis ($2,104 \pm 1,311 \mu\text{g/g}$), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($t = 2,972$, $p = 0,006$). Na segunda coleta, valores muito próximos aos da primeira coleta foram obtidos, ou seja, $3,555 \pm 1,520$ e $2,480 \pm 1,345 \mu\text{g/g}$ para as crianças de Bauru e Itápolis, respectivamente, sendo a diferença entre as 2 cidades pouco significativa ($t = 2,019$, $p = 0,053$). Quando foi realizada a média entre as 2 coletas, as crianças de Bauru apresentaram uma concentração maior de F nas unhas das mãos ($3,557 \pm 1,297 \mu\text{g/g}$) que as de Itápolis ($2,292 \pm 1,250 \mu\text{g/g}$), sendo esta diferença estatisticamente significativa ($t = 2,718$, $p = 0,011$).

Já para as unhas dos pés, também a concentração de F encontrada na primeira coleta para as crianças de Bauru ($2,855 \pm 1,411 \mu\text{g/g}$) foi maior que para as de Itápolis ($1,565 \pm 0,668 \mu\text{g/g}$), sendo esta diferença altamente significativa ($t = 3,200$, $p = 0,003$). O mesmo padrão foi observado na segunda coleta, quando se encontraram valores de $2,775 \pm 1,520 \mu\text{g F/g}$ e $1,597 \pm 0,780 \mu\text{g F/g}$ para as crianças de Bauru e Itápolis, respectivamente, sendo esta diferença estatisticamente significativa ($t = 2,669$, $p = 0,012$). Quando se considerou a média das duas coletas, o valor encontrado foi de $2,815 \pm 1,288 \mu\text{g F/g}$ e de $1,580 \pm 0,589 \mu\text{g F/g}$ para as cidades de Bauru e Itápolis, respectivamente. Esta diferença foi altamente significativa ($t = 3,372$, $p = 0,002$).

Quando se realizou o teste t pareado para comparação entre as coletas 1 e 2 das unhas das mãos de Bauru e Itápolis, observou-se não haver diferenças entre as mesmas ($t = 0,8723$, $p = 0,387$). Foi ainda encontrada uma forte correlação positiva, extremamente significativa, entre os valores obtidos nas 2 coletas ($r = 0,711$, $p < 0,0001$). O mesmo foi encontrado para as unhas dos pés, sendo que não foi encontrada diferença

significante entre as amostras coletadas nas duas diferentes datas ($t = 0,1133$, $p = 0,910$). Também foi encontrada uma correlação positiva, extremamente significativa entre as 2 coletas ($r = 0,616$, $p < 0,0001$).

A concentração de F encontrada nas unhas dos pés foi sempre inferior à concentração de F encontrada nas unhas das mãos, coletadas nas mesmas datas. Em Bauru, a diferença foi em média de 20% e em Itápolis, de 30%. O teste t pareado, realizado sobre as médias das coletas das unhas das mãos e dos pés revelou que esta diferença foi altamente significativa ($t = 2,816$, $p = 0,008$).

Com relação à estimativa da ingestão de F a partir da dieta, o valor encontrado foi de $0,551 \pm 0,610$ mg e de $0,088 \pm 0,056$ mg para as cidades de Bauru e Itápolis, respectivamente, sendo esta diferença altamente significativa ($t = 2,921$, $p = 0,006$). Sendo o peso médio das crianças de Bauru e Itápolis de $19,54 \pm 5,04$ e $22,20 \pm 6,11$ Kg, respectivamente, ingestão diária de F estimada a partir da dieta foi de $0,029 \pm 0,029$ e $0,004 \pm 0,003$ mg/Kg peso corporal, para as cidades de Bauru e Itápolis, respectivamente.

Não foi encontrada correlação entre a concentração de F presente no plasma e nas unhas das mãos ($r = 0,137$, $p = 0,468$), plasma e unhas dos pés ($r = -0,2664$, $p = 0,155$), bem como plasma e ingestão estimada de F pela dieta ($r = -0,212$, $p = 0,260$). No entanto, foi encontrada uma correlação positiva média ($r = 0,410$), estatisticamente significativa ($p = 0,024$), entre a concentração média de F encontrada nas 2 coletas de unhas das mãos, quando comparadas às dos pés. A regressão linear para esta situação está ilustrada na FIGURA 11.

FIGURA 11 - Correlação entre a [F] nas unhas das mãos e dos pés.

Uma correlação positiva média ($r=0,566$), altamente significativa ($p=0,00112$), foi encontrada entre a quantidade de F ingerida pela dieta (mg) e a concentração média de F existente nas unhas ($\mu\text{g/g}$), o que poderia validar a unha como biomarcador da ingestão de F a partir da dieta. A regressão linear para esta situação está ilustrada na FIGURA 12.

FIGURA12 - Correlação entre a concentração média de F presente nas unhas das mãos e dos pés e a quantidade de F ingerida diariamente a partir da dieta.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Há na literatura vários trabalhos enfocando o uso da unha como biomarcador de exposição ao F em humanos (**SCHAMSCHULA et al.**⁹⁶, 1985, **MACHOY**⁷⁰, 1989; **CZARNOWSKI and KRECHNIAK**²⁴, 1990; **SCHMIDT and LEUSCHKE**⁹⁷, 1990; **SPATE et al.**¹⁰⁰, 1994; **CZARNOWSKI et al.**²⁵, 1996; **WHITFORD et al.**¹¹⁷, 1999 e **ARSATI**⁴, 2003) e em animais (**BUZALAF et al.**¹⁵, 2002). No entanto, este é o primeiro relato do uso da unha como biomarcador de ingestão crônica de F a partir da dieta em crianças em idade de risco para fluorose dentária, residentes em comunidades fluoretada e não fluoretada. Este trabalho é pioneiro no sentido de correlacionar a ingestão estimada de F a partir da dieta com a concentração deste elemento nas unhas.

Os dados da concentração de F no plasma trouxeram alguma surpresa, uma vez que se esperava encontrar uma diferença significativa entre as crianças residentes em comunidade fluoretada e não fluoretada. Em ratos foi demonstrada uma forte correlação positiva entre a concentração de F presente nas unhas e no plasma dos animais submetidos a diferentes níveis de ingestão de F a partir da água de beber (**BUZALAF et al.**¹⁵, 2002). Na verdade, a concentração de F presente no plasma das crianças de Itápolis (não fluoretada) foi ligeiramente maior que a das crianças de Bauru (fluoretada), embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Isto pode ser devido a alguns fatores. Inicialmente, as crianças deveriam estar em jejum quando da coleta de sangue. No entanto, os níveis de F encontrados no plasma de algumas crianças, tanto de Bauru quanto de Itápolis, foram maiores que os esperados para indivíduos em jejum, sendo encontrados valores de até 0,09 ppm. O valor esperado para a concentração de F no plasma em jejum de indivíduos adultos e residentes por longo tempo em comunidade com água fluoretada (1 ppm) é de 1 µM (0,019 ppm) (**EKSTRAND**³⁰, 1978). No presente estudo,

níveis semelhantes a este foram encontrados para a comunidade fluoretada ($0,019 \pm 0,011$ ppm), mas também para comunidade não fluoretada ($0,024 \pm 0,020$ ppm). Supostamente, as crianças deveriam estar em jejum no momento da coleta de sangue, entretanto, as que apresentaram níveis plasmáticos acima de 0,02 ppm provavelmente não estavam. Uma segunda hipótese seria a possibilidade das crianças terem ingerido uma quantidade de dentifrício fluoretado na sua escovação matutina, suficiente para ter aumentado os níveis plasmáticos de F no momento da coleta, já que o plasma é um biomarcador de exposição ao F de meia-vida curta (**HENDERSON**⁵⁹, 1995). Em adição, **EKSTRAND et al**³⁰. (1978) relataram a necessidade de se coletar várias amostras de plasma ao longo do tempo a fim de que dados confiáveis da concentração plasmática de F possam ser obtidos. Isto é verdade especialmente em comunidades com altos níveis de ingestão de F a partir da água, alimentos, bebidas e dentifrício, uma vez que flutuações podem acontecer ao longo do dia. Valores isolados são representativos apenas quando os níveis plasmáticos de F são baixos e estáveis. Deste modo, uma possível alternativa para que se possa estabelecer uma correlação entre os níveis plasmáticos de F e a concentração deste elemento nas unhas de crianças seria usar a saliva do ducto da parótida em substituição ao plasma, o que permitiria várias coletas ao longo do dia. A concentração de F na saliva de parótida é significativamente relacionada aos níveis plasmáticos ($p < 0,0001$) por uma constante de proporcionalidade de 0,80 (**WHITFORD; THOMAS; ADAIR**¹¹⁸, 1999), podendo, portanto, ser usada para se estimar as concentrações plasmáticas em crianças de 5 a 10 anos de idade.

No presente trabalho, a concentração média de F encontrada nas unhas das mãos para a cidade de Bauru, variou de 1,439 a 6,171, e de 0,518 a 5,471 para a cidade de Itápolis (TABELA 3). Já para as unhas dos pés, a concentração de F variou entre 1,303 e 4,706 e entre 0,794 e 2,878 para Bauru e Itápolis, respectivamente. A média ($\pm$ DP) e intervalo de 95% de confiança da concentração de F encontrada nas unhas das mãos das crianças foi de $3,557 \pm 1,297$ (2,839 - 4,276) e de $2,292 \pm$

1,250 (1,599 - 2,985) para Bauru e Itápolis, respectivamente. O mesmo dado para as unhas dos pés foi de $2,815 \pm 1,288$ (2,101 - 3,529) e $1,580 \pm 0,589$ (1,255 - 1,908) para Bauru e Itápolis, respectivamente (TABELA 6). Apesar de ter havido uma diferença estatisticamente significativa entre a concentração de F nas unhas das mãos e dos pés das crianças de Bauru, quando comparadas às de Itápolis, aconteceu uma pequena sobreposição dos valores entre as duas cidades no caso das unhas das mãos, mas não no caso das unhas dos pés, considerando-se o intervalo de 95% de confiança. Esta pequena sobreposição pode ser devida a diferenças na ingestão e balanço de F (ingestão total menos a excreção total) entre as crianças. A variável considerada para este estudo foi a presença de F na água de abastecimento público, mas além desta, várias são as possíveis fontes de F para crianças, como alimentos, bebidas, e produtos odontológicos fluoretados (**BURT**¹², 1992; **WHITFORD**¹¹⁴, 1994; **FOMOM**; **EKSTRAND**⁴⁵, 1999; **FOMON**; **EKSTRAND**; **ZIEGLER**⁴⁶, 2000), entre os quais, o dentifrício fluoretado assume um importante papel (**RICHARDS**, **BANTING**⁹¹, 1996; **GUHA-CHODHURRY**; **DRUMMOND**; **SMILLIE**⁵², 1996; **LIMA**; **CURY**⁶⁷, 2001 ; **PESSAN et al.**⁸⁹, 2003). Uma sobreposição de dados foi encontrada também por **WHITFORD et al.**¹¹⁷ (1999), quando analisaram as unhas de crianças de 6-7 anos de idade residentes no Estado da Paraíba, Brasil, em comunidades com água contendo 1,6 e 2,3 ppm de F. A concentração média ($\pm$ erro-padrão) encontrada nas unhas das mãos foi de 5,28 ($\pm$ 0,50), com intervalo de 95% de confiança de 4,19 a 6,38 e de 7,52 ($\pm$ 0,73), com intervalo de 95% de confiança de 5,95 a 9,09, respectivamente. No entanto, os autores não observaram sobreposição de dados para crianças residentes em áreas com 0,1 ppm F na água, que apresentaram uma concentração média de F ($\pm$ erro-padrão) nas unhas das mãos de 1,85 ($\pm$ 0,19), com intervalo de 95% de confiança variando de 1,46 a 2,25. No entanto, nas regiões onde as crianças deste estudo residiam, a utilização de dentifrício é muito baixa ou mesmo nula. Talvez se fosse usado dentifrício fluoretado, poderia haver sobreposição mesmo para as crianças da área contendo 0,1 ppm de F na água de beber.

Diferenças na concentração de F nas unhas de crianças brasileiras residentes em cidades com diferentes níveis de F na água de abastecimento público também foram relatadas por **ARSATI⁴** (2003). A autora analisou as unhas das mãos de crianças residentes em três cidades do Estado de São Paulo: Cordeirópolis (<0,04 ppm), Piracicaba (0,70 ppm) e Assistência (1,53 ppm). A concentração média de F encontrada nas unhas das mãos das crianças de 2-3 anos ($\pm$ DP, intervalo de 95% de confiança, unidade $\mu\text{g/g}$) foram: $1,65 \pm 1,03$ (1,16 a 2,14), $2,85 \pm 1,54$ (2,17 a 3,52) e $4,14 \pm 1,91$ (3,21 a 5,08), com diferença estatisticamente significativa entre as cidades. Os valores relatados por **ARSATI⁴** (2003) para as unhas das mãos da cidade de Piracicaba ($2,85 \mu\text{g F/g}$) foram semelhantes aos encontrados no presente estudo para a cidade de Bauru ($3,557 \mu\text{g F/g}$), sendo que as cidades apresentaram teores de F na água de abastecimento similares. Da mesma forma, os valores encontrados por **ARSATI⁴** (2003) para a cidade de Cordeirópolis ($1,65 \mu\text{g F/g}$) podem ser comparados aos encontrados neste estudo para Itápolis ($2,292 \mu\text{g F/g}$), cidades contendo menos que 0,04 e 0,2 $\mu\text{g F/g}$, respectivamente).

Um achado importante do presente estudo foi a não existência de diferença significativa entre as amostras de unhas coletadas em datas distintas, tanto para as mãos como para os pés. Mais que isto, foi encontrada uma correlação positiva forte e extremamente significativa ($p < 0,0001$) para as concentrações de F presentes nas unhas das mãos ($r = 0,711$) e dos pés ($r = 0,616$) coletadas em 2 datas distintas. Isto reforça que a unha pode ser usada como biomarcador de ingestão crônica de F.

A concentração de F encontrada nas unhas das mãos foi sempre superior à das unhas dos pés, coletadas nas mesmas datas (TABELAS 3 e 4). Em Bauru, a diferença foi em média de 20% e em Itápolis, 30%. Estes dados vão de encontro aos achados de **WHITFORD et al.¹¹⁷** (1999), que encontraram valores para as unhas das mãos aproximadamente o dobro dos encontrados para as unhas dos pés. Os autores não relataram a idade dos voluntários e atribuíram esta diferença ao maior fluxo sanguíneo

da região das mãos e também a uma possível maior velocidade de crescimento das unhas das mãos. No entanto, **MACHOY**⁷⁰ (1989) encontrou concentrações idênticas de F nas unhas das mãos e dos pés de um único voluntário com idade de 10-12 anos. Esta divergência na literatura pode ser devida ao tamanho da amostra e idade dos participantes, visto que nos dois trabalhos relatados foram analisados as unhas de apenas um único indivíduo, e os dados podem não refletir as características de uma população.

Neste trabalho foi coletada dieta duplicada uma única vez. Trabalhos que avaliaram a ingestão de F pelo método da dieta duplicada, que coletaram 3 amostras de dieta duplicada ao longo de 1 ano (**GUHA-CHODHURY; DRUMMOND; SMILLIE**⁵², 1996) e que coletaram amostras de dieta duplicada por 2 dias seguidos, em quatro períodos do ano (**LIMA; CURY**⁶⁷, 2001) com crianças na faixa etária de risco para fluorose dentária não encontraram diferenças significativas entre as concentrações de F. Estes resultados mostram que a ingestão pode ser interpretada como sendo relativamente constante, dispensando a necessidade de várias coletas para se estimar a ingestão de F. No entanto, **ROJAS-SANCHES et al.**⁹³ (1999) monitoraram a ingestão de F a partir da dieta de crianças de 16 a 40 meses em 2 ou 3 dias alternados, durante 1 semana. Neste caso foi encontrada uma variação considerável de um dia para o outro na mesma criança. Os autores sugeriram que uma estimativa mais precisa poderia ser obtida se a ingestão fosse avaliada numa série de amostras coletadas em 3 dias, 3 a 4 vezes ao ano. No entanto, este procedimento demanda tempo e gastos, uma vez que é necessário ressarcir os voluntários dos gastos com a coleta da dieta, além da disponibilidade de estarem participando de um estudo de maior duração e possibilidade de perda de alguns participantes.

A ingestão média diária de F estimada pela dieta duplicada foi de $0,551 \pm 0,610$ mg para Bauru, e de $0,088 \pm 0,056$ mg para Itápolis. Sendo o peso médio das crianças de Bauru e Itápolis de $19,54 \pm 5,04$ e $22,20 \pm 6,11$ Kg, respectivamente, a ingestão diária de F estimada a partir da

dieta foi de 0,029 e 0,004 mg/Kg peso corporal, para as cidades de Bauru e Itápolis, respectivamente. Portanto, bem abaixo do limite máximo de ingestão diária, que é de 0,07 mg F/Kg peso corporal. Esses dados vão de encontro aos encontrados por **PESSAN et al.**⁸⁹ (2003) para a cidade de Bauru, e que estimaram uma ingestão diária de F pela dieta para crianças de 4-5 anos em 0,016 mg/Kg peso corporal. No entanto, **LIMA; CURY**⁶⁷ (2001) estimaram a ingestão média diária de F por crianças, residentes em Piracicaba, SP, em níveis um pouco maiores, em torno de 0,04 mg F/Kg. Esta diferença em relação ao nosso trabalho pode ser devida à idade das crianças, uma vez que no estudo de **LIMA; CURY**⁶⁷ (2001), as crianças tinham entre 20 e 30 meses de idade. No estudo de **PESSAN et al.**⁸⁹ (2003) as crianças tinham entre 4 e 5 anos, e no presente estudo, a maioria das crianças também possuía esta faixa etária. Pode-se supor que o aumento da massa corporal das crianças, entre 4 e 5 anos, seja superior ao incremento de ingestão de F a partir da dieta, resultando nestas diferenças.

A diferença significativa encontrada na ingestão diária F a partir da dieta entre as comunidades fluoretada e não fluoretada já era esperada. **ROJAS-SANCHES et al.**⁹³ (1999) encontraram uma dose de 0,039 mg F/ Kg devido à dieta, contribuindo a água fluoretada com 73% da dose. Os autores analisaram a ingestão diária de F de crianças residentes em 3 comunidades, sendo 2 não fluoretadas (San Juan, Porto Rico e Connerville, Indiana, EUA) e uma otimamente fluoretada (Indianápolis, Indiana, EUA). A ingestão diária estimada de F, a partir da dieta foi de 0,017, 0,029 e 0,040 mg/Kg peso corporal, para San Juan, Connerville e Indiana, respectivamente. A ingestão diária total de F (dieta e dentifrício) não diferiu significativamente entre as comunidades, sendo que nas não fluoretadas, o maior componente da ingestão foi o dentifrício fluoretado. Nas fluoretadas, a ingestão a partir do dentifrício e das bebidas foi semelhante. Em San Juan, a ingestão média diária de F estava dentro dos limites de segurança, enquanto que em Connerville, devido ao “efeito halo”, e em Indianápolis, isto não aconteceu.

No presente estudo, não foi estimada a ingestão de F a partir do dentifrício. Esta pode ser considerada, inclusive, uma das limitações do trabalho. No entanto, estudos realizados por **PESSAN et al.**⁸⁹ (2003) revelaram, para crianças residentes em Bauru, com idade entre 4 e 7 anos, uma ingestão de F estimada, a partir do dentifrício, em torno de 0,041 mg/Kg peso corporal. Com base nesta estimativa, os níveis de ingestão diários de F nas duas comunidades estudadas (Bauru e Itápolis) devem estar dentro dos limites de segurança.

A baixa ingestão de F a partir da dieta pelas crianças residentes em Itápolis, sugere uma baixa existência do “efeito halo” na região, o que era esperado, pois o mesmo tende a ser mais pronunciado em comunidades maiores.

Quando falamos em ingestão de F, qualquer que seja a fonte devemos sempre ter em mente a sua biodisponibilidade, pois o fato de uma dose de F ser ingerida não implica que 100% dela será absorvida. Deste modo, a ingestão diária de F obtida deve estar superestimada.

SPAK; EKSTRAND; ZYLBERSTEIN⁹⁹ (1982) administraram 3 soluções diferentes (500 mL de uma solução aquosa contendo 10 ppm de flúor, 500 mL de leite contendo 10 ppm F e 500 mL de uma fórmula infantil preparada com uma solução de 10 ppm F) contendo 5 mg F para 4 voluntários, em 3 ocasiões separadas e monitoraram os níveis de F urinários e plasmáticos por 15 horas. Foi observada uma absorção de 72% do F presente no leite e 65% do F presente na fórmula infantil. Foi relatado que os alimentos poderiam atuar como uma barreira física, impedindo o acesso do F à mucosa do trato gastro-intestinal. Os autores enfatizaram que a ingestão diária total de F por crianças pode estar sendo superestimada.

Num estudo de protocolo semelhante, **TRAUTNER; SIEBERT**¹⁰⁵ (1986) analisaram a biodisponibilidade de produtos à base de carne, frango e peixe, além de chá e leite, comparados com solução de NaF e suplementos de NaF. Os autores observaram que o tempo médio para se atingir o pico na concentração plasmática de F quando se usou solução de NaF foi de $26 \pm 8,2$ minutos, enquanto que quando se administraram suplementos, foi de $41 \pm 9,3$ minutos, mostrando claramente o tempo necessário para a dissolução dos suplementos no trato gastro-intestinal. A curva da concentração de F no plasma ao longo do tempo após sua ingestão foi similar para o chá e a solução de NaF. Entretanto, após a ingestão de produtos à base de carne, frango e peixe, o aumento na concentração de F plasmática foi mais demorado, não sendo observado um pico definido, provavelmente devido à alta concentração de cálcio nestes alimentos. Também a adição de leite à solução de NaF e de sacarose ao chá reduziu a disponibilidade do F, enquanto que a adição de sacarose à solução de NaF não alterou sua curva plasmática. Acredita-se que esta ocorrência se deve ao fato de que a ingestão concomitante de alimentos afeta a absorção de F, apesar de este mecanismo não estar ainda completamente esclarecido.

Estes estudos de biodisponibilidade, com a participação de voluntários e envolvendo coleta de sangue e urina são difíceis de serem realizados. Para simular a ação do “suco gástrico” nos alimentos, **FERNANDES; TABCHOURY; CURY**⁴⁴ (2000) propuseram um pré-tratamento das amostras de alimentos a serem analisadas com HCl 0,01 M, em banho-maria (37°C) por 1 hora, previamente à análise de F pelo método direto. Este método tem a vantagem de apenas analisar o F que teoricamente seria solúvel no suco gástrico. No entanto, aproximadamente 80% do F é absorvido no intestino (**MESSER; NOPAKUM; RUDNEY**⁷⁷, 1989; **NOPAKUN et al.**⁸¹, 1999; **WHITFORD**¹¹⁶, 1997). Para que se possa realmente avaliar a biodisponibilidade, é necessário que o F seja administrado, e amostras de plasma coletadas ao longo do tempo, estabelecendo-se a área sob a curva da concentração plasmática de F em relação ao tempo. Para que este experimento seja viável, uma possível

alternativa seria substituir a coleta de plasma pela de saliva do ducto da parótida (**WHITFORD; THOMAS; ADAIR**¹¹⁸, 1999).

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

- A unha pode ser usada como biomarcador de ingestão crônica de F a partir da dieta, em crianças na idade de risco para fluorose dentária, residentes em comunidades com água fluoretada ou não, uma vez que foi encontrada uma correlação positiva significativa ($r = 0,566$) entre a ingestão estimada de F a partir da dieta e a concentração de F presente nas unhas.
- A ingestão estimada de F a partir da dieta foi de $0,551 \pm 0,610$ mg e de $0,088 \pm 0,056$ mg para as crianças residentes em Bauru e Itápolis, respectivamente.
- Não houve correlação entre a quantidade de F ingerida pela dieta e os níveis plasmáticos de F, e nem entre os níveis plasmáticos de F e a concentração de F presente nas unhas das mãos e dos pés, na amostra estudada.
- A concentração de F presente nas unhas das mãos foi superior à encontrada nas unhas dos pés, sendo a diferença média de 20 % para Bauru e de 30% para Itápolis.
- Não foi encontrada uma diferença significativa entre as amostras de unhas coletadas em datas distintas, tanto para as mãos como para os pés. Em adição, foi encontrada uma correlação positiva forte significativa para as concentrações de F presentes nas unhas das mãos ($r = 0,711$) e dos pés ($r = 0,616$) coletadas em 2

datas distintas. Isto reforça que a unha pode ser usada como biomarcador de ingestão crônica de F.

ANEXO 1

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Bauru, 29 de junho de 2001

Ilma Sra.

Profa. Dra. Marília Afonso Ribeiro Buzalaf

FOB USP

Senhora Professora

O projeto de pesquisa denominado "Correlação entre a concentração de flúor presente nas unhas e no plasma de crianças nas faixa etária de risco para fluorose dental residentes em comunidades com água fluoretada ou não", de autoria da C.D. Flávia Mauad Levy e que será desenvolvido sob sua orientação, foi recebido por este Comitê e encaminhado ao relator para avaliação quanto aos seus aspectos éticos.

O parecer do relator, aprovando o projeto, foi aceito pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Faculdade na reunião de 28 de junho de 2001

Atenciosamente

Prof. Dr. Roberto L. Maríngoni
Coordenador

ANEXO 2

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa

Of. n° CEP/10 2003/FOB

Bauru, 9 de abril de 2003

Senhora Professora,

Informamos que após análise por este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, seu pedido de alteração do título do projeto de pesquisa intitulado **"Correlação entre a concentração de flúor presente nas unhas e no plasma de crianças na faixa etária de risco para fluorose dental residentes em comunidades com água fluoretada ou não"** de autoria da CD. Flávia Mauad Levy, sob a sua orientação, para **"Unha como biomarcador da ingestão de flúor a partir da dieta em comunidade com água fluoretada e não fluoretada"**, foi **aprovado** considerando que sua metodologia não sofreu modificações.

Lembramos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para a publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Lúcia Alvares Capelozza
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Ilmª Srª Profª Drª **Marília Afonso Rabelo Buzalaf**
DD. Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO 3

**Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru**

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa

Of.nº CEP/15 2003/FOB

Bauru, 24 de abril de 2003

Senhora Professora,

Informamos que após análise por este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, seu pedido de alteração do título do projeto de pesquisa intitulado **"Unha como biomarcador da ingestão de flúor a partir da dieta em comunidade com água fluoretada e não fluoretada"** de autoria da CD. Flávia Mauad Levy, sob a sua orientação, para **"Unha como biomarcador de exposição crônica ao flúor a partir da dieta em comunidades com água fluoretada e não fluoretada"**, foi aprovado considerando que sua metodologia não sofreu modificações.

Lembramos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para a publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Lúcia Alvares Capelozza
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos

Ilmª Srª Profª Drª **Marília Afonso Rabelo Buzalaf**
DD. Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO 4

Carta de informação ao paciente

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Comitê de Ética em Pesquisa
Carta de Informação ao Paciente

As informações contidas nesta carta serão fornecidas pela aluna de Mestrado Flavia Mauad Levy , sob a orientação da Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf ,com o intuito de informar o paciente e seu responsável sobre a natureza dos procedimentos a que se submeterá ao participar da pesquisa, com a capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação.

1 - Título do Trabalho Experimental

“Correlação entre a concentração de flúor presente nas unhas e no plasma de crianças na faixa etária de risco para fluorose dental, residentes em comunidades com água fluoretada ou não .”

2 - Objetivo

O objetivo deste trabalho é avaliar a correlação entre a concentração de flúor presentes nas unhas das mãos e no plasma de crianças na faixa etária entre 2 e 6 anos de idade, residentes em comunidade com água fluoretada ou não. Também será realizada estimativa da ingestão diária de flúor através da dieta e da ingestão de dentifrício fluoretado.

3 – Procedimentos da Fase Experimental

Participarão deste estudo 15 crianças residentes em Bauru-SP, cidade com água de abastecimento fluoretada (0,6 – 0,8), e 15 crianças residentes em Itápolis-SP, cidade com água não fluoretada.

Estas crianças, não portadoras de distúrbios gastro-intestinais, ósseos e renais, deverão ter indicação médica para retirada de sangue nos laboratórios das suas cidades correspondentes. Uma parte do sangue

retirado será cedida para o nosso laboratório, para que possamos fazer análise de flúor no plasma. Também serão colhidas amostras de unhas das mãos das crianças, que também serão submetidas a análise de flúor. Também será colhida dieta duplicada a partir destas crianças, bem como estimativa da ingestão de flúor a partir do dentífrico.

4 - Benefícios do Experimento

Essa pesquisa fornecerá dados importantes com relação à ingestão de flúor pelas crianças na faixa etária de 2 a 6 anos, residentes em áreas com água fluoretada ou não, bem como poderá validar o uso da unha como indicador da concentração plasmática de flúor em crianças.

5 - Informações

Os pais/ou responsáveis terão a garantia de receber esclarecimento de qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa. Qualquer dúvida ou problema, por favor entrar em contato com um dos pesquisadores no telefone 235-8246 (Departamento de Bioquímica).

Por estarem entendidos e de acordo com a presente carta de informação,

Nome do pai/mãe ou responsável

Assinatura do pai/mãe ou responsável

ANEXO 5

Instruções aos pais coleta da dieta duplicada

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Nome da criança _____

Nome da mãe: _____

COLETA DOS ALIMENTOS DAS CRIANÇAS:

Deve ser colocado no pote de plástico **TUDO** o que a crianças **COMER E BEBER** durante todo o dia (24 horas), anotando na ficha o tipo de alimento que ela comeu.

Deve-se fazer duas porções de tudo o que a crianças comer, uma para a criança, e outra para colocar no pote. Nessa parte é necessário muita atenção, pois o que a criança não comer, não deve ser colocado no pote.

Deve-se utilizar medidas caseiras, como **colher de sopa, colher de chá, xícara, concha, etc.**

As partes dos alimentos que as crianças não comem (cascas de frutas, sementes, ossos de carne). **NÃO** devem ser colocadas no pote plástico.

Exemplo:

Café da manhã: Uma xícara de leite, uma colher de Nescau, uma colher de açúcar, um pão francês, manteiga.

IMPORTANTE: Se foi colocado um copo de leite para a criança, mas ela só bebeu **meio copo**, deve-se colocar no pote plástico **somente meio copo** de leite preparado de maneira igual ao que a criança bebeu.

**** **O pote de ser mantido na geladeira de preferência no freezer, até eu passar para recolher.**

Qualquer dúvida, ligar para Flávia, pesquisadora responsável,

(14) 227-2441, 235-8246

ANEXO 6

Instruções aos pais para a coleta das amostras de unhas

- 1) Deixar as unhas dos pés e das mãos crescerem por duas semanas.
- 2) Cortar as unhas no dia _____ e guardar no seu frasco correspondente.
- 3) Deixar as unhas crescerem novamente, por duas semanas.
- 4) Cortar as unhas no dia _____ e guardar no seu frasco correspondente.
- 5) Vou passar em sua casa para recolher os frascos.

Qualquer dúvida ligar para:

Dr^a Flávia, pesquisadora responsável, Laboratório de Bioquímica- FOB/
USP

(014)234-8246, 227-2441/ 91135277

ANEXO 7

Exemplo de planilha (Excel) utilizada para calcular a concentração de flúor no plasma, nas unhas e dieta.

Análise de F nas unhas de Itápolis

nm F	µg F	Log F	mV	Log F. Calc.	µg F calc.	% variação
0,5	0,0095	-2,022276	88,1	-1,9953814	0,0101	-6,39
1	0,019	-1,721246	75,6	-1,7486963	0,0178	6,12
5	0,095	-1,022276	39,7	-1,0402166	0,0912	4,05
10	0,19	-0,721246	22,6	-0,7027513	0,1983	-4,35

intercepção -0,2567446

inclinação -0,0197348

Rquad. 0,998037

Amostra	mV	Log F. Calc.	µg F calc.	peso (mg)	F (ppm)	
30/05/02						
Mão						
1	78,6	-1,8079007	0,016	11,37	1,369	
2	68,1	-1,6006852	0,025	11,17	2,245	
7	69,7	-1,6322609	0,023	11,99	1,945	
8	74,4	-1,7250145	0,019	14,62	1,288	duplicata
8	69,3	-1,6243670	0,024	11,51	2,063	duplicata
10	46,9	-1,1823072	0,066	10,54	6,235	
18	42,1	-1,0875801	0,082	11,72	6,974	
Pé						
1	61,9	-1,4783294	0,033	13,95	2,383	
2	79,8	-1,8315825	0,015	9,75	1,512	
7	75,5	-1,7467228	0,018	8,48	2,113	
8	60,8	-1,4566211	0,035	14,03	2,491	
10	78,8	-1,8118477	0,015	9,8	1,574	
18	83,7	-1,9085483	0,012	3,58	3,448	

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 ALFTHAN, G. et al. The human selenium status in Hungary. **J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.**, v. 6, n.4, p. 233-8, 1992.
- 2 ALLEN, C.D.; ASHLEY, F.D.; NAYLOR, M.N. Caries experience in 11-year-old schoolchildren between 1962 and 1981. **Brit. dent. J.**, v.154, n.6, p.167-70, Mar 1983.
- 3 ANDLAW, R.J.; BURCHELL, C.K.; TUCKER, G. Comparison of dental health in 11-year-old children in 1970 and 1979, and of 14-year-old children in 1973-1979; studies in Bristol, England. **Caries Res.**, v.16, n.3, p.257-64, 1982.
- 4 ARSATI, Y.B.O.L. **A unha como indicador biológico de exposição a fluoreto para prever risco de fluorose dental**. 2003. 75p. Tese (Doutorado) –Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.
- 5 BAELUM, V. et al. Daily dose of fluoride and dental fluorosis. **Tandlaegebladet**, v. 91, n.10, p. 452-6, June 1987.
- 6 BARDESEN, A. "Risk periods" associated with the development of dental fluorosis on maxillary permanent central incisors. **Acta odont. scand.**, v. 57, n. 5, p. 247-56, 1999.
- 7 BARNHART, W.E. et al. Dentifrice usage and ingestion among four age groups. **J. dent. Res.**, v.53, n.6, p.1317-22, 1974.

* Normas recomendadas para o uso no âmbito da Universidade da São Paulo, com base no documento "Referências Bibliográficas: exemplos", emanado do Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

- 8 BASTOS, J. R. de M. et al. Concentração de flúor em água mineral engarrafada e de fontes naturais das cidades de Lindóia, Águas de Lindóia e Serra Negra, Brasil. **Rev. Univ. Fed. Passo Fundo**, v.6, n.1, p.15-9, jan./jun. 2001.
- 9 BIESWANGER, B.B.; STOOKEY, G.K. The comparative clinical cariostatic efficacy of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate dentifrices: A review of trials. **J. Dent. Child.**, v.57, n.5, p.337-47, Sept./Oct. 1989.
- 10 BOHATY, B.S. et al. The prevalence of fluorosis-like lesions associated with topical and systemic fluoride usage in an area of optimal water fluoridation. **Pediat. Dent.**, v.11, n.2, p.125-8, June 1989.
- 11 BRUNETTI, A., NEWBRUN, E. Fluoride balance of children 3 and 4 years old. **Caries Res.**, v.17, n.2, p.171, Mar./Apr. 1983.
- 12 BURT, B.A. The changing patterns of systemic fluoride intake. **J. dent. Res.**, v. 71, n.5, p. 1228-37, May 1992. Special Issue.
- 13 BUTLER, W.J.; SEGRETO, V.; COLLINS, E. Prevalence of dental mottling in school-aged lifetime residents of 16 Texas communities. **Amer. J. publ Hlth**, v.75, n.12, p.1408-12, Dec. 1985.
- 14 BUZALAF, M.A.R. et al. Fluoride content of infant foods in Brazil and risk of dental fluorosis. **J. Dent. Child.**, v.69, n.2, p. 196-200, May/Aug. 2002.
- 15 BUZALAF, M.A. et al. Correlation between plasma and nail fluoride concentrations in rats given different levels of fluoride in the drinking water. **Fluoride**, v.35, n.3, p.185-92, 2002.

- 16 BUZALAF, M.A.R. et al. Fluoride content of several brands of teas and juices found in Brazil and risk of dental fluorosis. **Rev. Fac. Odont. Bauru**, v.10, n.4, p.263-7, out./dez. 2002.
- 17 BUZALAF, M.A.R. et al. Fluoride content of several brands of chocolate bars and chocolate cookies found in Brazil. **Pesq. Odontol. Bras.**, 2003. /no prelo/.
- 18 CLARKSON, J.J. International collaborative research on fluoride. **J. dent. Res.**, v. 79, n. 4, p. 893-904, Apr. 2000.
- 19 CLOVIS, J.; HARGREAVES, J.A. Fluoride intake from beverage consumption. **Community Dent. oral Epidem.**, v. 16, n.1, p. 11-5, Feb. 1988.
- 20 COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Biological markers in environmental health research. **Environ. Health Perspec.**, v. 74, p. 3-9, 1987.
- 21 COWELL, D.C.; TAYLOR, W.H. Ionic fluoride: a study of its physiological variation in man. **Ann. Clin Biochem.**, v.18 (Pt2), p.76-83, Mar. 1981.
- 22 CULLEN, M.R.; REDLICH, C.A. Significance of individual sensitivity to chemicals: Elucidation of host susceptibility by use of biomarkers in environmental health research. **Clin. Chem.**, v. 41, n.12, pt. 2, p. 1809-13, 1995.
- 23 CURY, J.A. Concentração de fluoreto em chás brasileiros e seu significado na prevenção de cárie. **Rev. gaúcha Odont.**, v. 29, n. 2, p. 136-8, abri/jun. 1981.

- 24 CZARNOWSKI, W.; KRECHNIAK, J. Fluoride in urine, hair and nails of phosphate fertilizer workers. **Brit. J. Ind. Med.**, v.47, n.5, p.349-51, May 1990.
- 25 CZARNOWSKI, W.; WRZESNIEWSKA, K.; KRECHNIAK, J. Fluoride in drinking water and human urine in northern and central Poland. **Sci Total Environ.**, v.191, n.1-2, p.177-84, Nov. 1996.
- 26 DeCAPRIO, A.P. Biomarkers: coming age for environmental health and risk assessment. **Environ. Science Tech.**, v. 31, p. 1837-48, 1997.
- 27 DENBESTEN, P.K. Dental fluorosis: its use as a biomarker. **Advanc. dent. Res.**, v. 8, n.1, p. 105-10, June 1994.
- 28 DIAS, H.; ROSA, H.M.; BUZALAF, M.A.R. Concentracion de flúor em leches comercialmente disponibles em Bresil. In: REUNION ANUAL DE LA SOCIEDAD ARGENTINA DE INVESTIGATION FOR DENTAL RESEARCH, Córdoba, 2000. **Programa y Resúmenes de Trabajo**. Cordobaa, AR, IADR, 2000. Resumo 191.
- 29 DRISCOLL, W.S. et al. Prevalance of dental caries and dental fluorosis in areas with optimal an above-optimal water fluoride concentrations. **J. Am. Dent. Assoc.**, v.107,n.1, p.42-7, July 1983.
- 30 EKSTRAND, J. Relationship between fluoride in the drinking water and the plasma fluoride concentration in man. **Caries Res.**, v. 12, n.3, p. 123-7, 1978.
- 31 EKSTRAND, J.; BOREUS, L.O.; DE CHATEAU, P. No evidence of transfer of fluoride from plasma to breast milk. **Brit. Med. J.**, v.293, n.6294, p.761-2, Sept. 1981.

- 32 EKSTRAND, J.; EHRNEBO, M.; BORÉUS, L. Fluoride bioavailability after intravenous and oral administration: importance of renal clearance and urine flow. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 23, n.3, p. 329-37, Mar. 1978.
- 33 EKSTRAND, J.; HARDELL, L.I.; SPAK, C.J. Fluoride balances studies on infants in a 1-ppm-water-fluoride area. **Caries Res.**, v.18, n.1, p.87-92, 1984.
- 34 EKSTRAND, J.; KOCH, G.; PETERSSON, L.G. Plasma fluoride concentration and urinary fluoride excretion in children following application of the fluoride-containing varnish Duraphat®. **Caries Res.**, v.14, n.4, p.185-9, 1980.
- 35 EKSTRAND, J.; SPAK, C.J.; EHRNEBO, M. Renal clearance of fluoride in a steady state condition in man: influence of urinary flow and pH changes by diet. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v. 50, n.5, p. 321-5, May 1982.
- 36 EKSTRAND, J.; ALVAN, G.; BORÉUS, L.; NORLIN, A. Pharmacokinetics of fluoride in man after single and multiple oral dosages. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 12, n.2, p. 311-7, Dec. 1977.
- 37 EKSTRAND, J. et al. Fluoride pharmacokinetics during acid-base balance changes in man. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v. 18, n.2, p. 189-94, Aug. 1980.
- 38 EKSTRAND, J. et al. Fluoride pharmacokinetics in infancy. **Pediat. Res.**, v. 35, n.2, p. 157-63, Feb. 1994.
- 39 ERICSSON, Y.; FORSMAN, B. Fluoride retained from mouthrinsing and dentifrices in preschool children. **Caries Res.**, v.3, n.3, p.290-9, 1969.

- 40 ESALA, S.; VUORI, E.; HELLE, A. Effect of maternal fluorine intake on breast milk fluorine content. **Brit. J. Nutr.**, v.48, n.2, p.201-4, Sept. 1982.
- 41 EVANS, R.W.; DARVELL, B.W. Refining the estimate of the critical period for susceptibility to enamel fluorosis in human maxillary central incisors. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v. 55, n.4, p. 238-49, 1995.
- 42 FEJERSKOV, O.; MANJI, V.A. A fluorose dentária e o uso do flúor na prevenção da cárie. In_____. **Fluorose dentária: um manual para profissionais da saúde**. São Paulo, Ed. Santos, 1994. p.99-108.
- 43 FEJERSKOV, O.; BAELUM, V.; RICHARDS, A. Dose-response and dental fluorosis. In: FEJERSKOV, O et al. **Fluoride in dentistry**. 2. ed. Copenhagen, Munksgaard, 1996. p.153-66.
- 44 FERNANDES, G.M.; TABCHOURY, C.M.; CURY,J.A. Fluoride concentration in infant foods and risk of dental fluorosis. **J. dent. Res.**, v.80, p.244, 2001. Special issue. /Abstract 1505/
- 45 FOMON, S.J.; EKSTRAND, J. Fluoride intake by infants. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v. 59, n. 4, p. 229-34, 1999.
- 46 FOMON, S.J.; EKSTRAND, J.; ZIEGLER, E.E. Fluoride intake and prevalence of dental fluorosis: trends in fluoride intake with special attention to infants. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v. 60, n. 3, p. 131-9, 2000.
- 47 GALAGAN, D. J.; VERMILLION, J. R. Determining optimum fluoride concentrations. **Publ. Hlth Rep.**, v.72, p. 491, 1957.
- 48 GARLAND, M. et al. Toenail trace element levels as biomarkers: reproducibility over 6-year period. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v.2, n.5, p.494-7, 1993.
- 49 GHADIRIAN, P. et al. A case-control study of toenail selenium and

- cancer of the breast, colon and prostate. **Cancer Detect Prev.**, v.24, n.4, p.305-13, 2000.
- 50 GRANDJEAN, P. Biomarkers in epidemiology. **Clin. Chem.**, v. 12, n.12 pt.2, p. 1800-3, Dec. 1995.
- 51 GREC, R.H.C. et al. Consumo de água mineral em Bauru. In: JORNADA ODONTOLÓGICA DE BAURU "PROF^a DR^a ANA LÚCIA ALVARES CAPELOZZA", 16., Bauru, 2003. Anais. Bauru. /no prelo/.
- 52 GUHA-CHOWDHURY, N.; DRUMMOND, B.K.; SMILLIE, A.C. Total fluoride intake in children aged 3 to 4 years: a longitudinal study. **J. dent. Res.**, v. 75, n. 7, p. 1451-7, July 1996.
- 53 GUY, W.S.; TAVES, D.R.; BREY JR, W.S. Organic fluorocompounds in human plasma: Prevalence and characterization. In: R. Filler, Ed. Biochemistry involving carbon-fluorine compounds. **Amer. Chem. Soc. Symp.**, v. 28, p. 117-34, 1976.
- 54 HAFTENBERGER, M. et al. Total fluoride intake and urinary excretion in German children aged 3-6 years. **Caries Res.**, v.35, n.6, p.451-57, Nov./Dec. 2001.
- 55 HARGREAVES, J.A.; INGRAM, G.S.; WAGG, B.J. A gravimetric study of the ingestion of toothpaste by children. **Caries Res.**, v.6, n.3, p.236-43, 1972.
- 56 HEILMAN, J.R. et al. Fluoride concentrations of infant foods. **J. Amer. dent. Ass.**, v. 128, p. 857-63, July 1997.
- 57 HEILMAN, J.R. et al. Assessing fluoride levels of carbonated soft drinks. **J. Amer. dent. Ass.**, v. 130, n. 11, p. 1593-9, Nov. 1999.

- 58 HEINTZE, S.D.; BASTOS, J.R.de M. Avaliação do teor de flúor e ph em bebidas do mercado nacional. **Rev. Ass. paul. cirurg. Dent.**, v.50, n.4, p.339-345, jul./ago. 1996.
- 59 HENDERSON, R.F. Strategies for the use of biological markers of exposure. **Toxic. Lett.**, v. 82/83, p. 379-83, 1995.
- 60 HEWITT, D.J. et al. Investigation of arsenic exposure from soil at a superfund site. **Environ. Res.**, v. 68, n.2, p. 73-81, Feb. 1995.
- 61 HODGE, H.C.; SMITH, F.A.; GEDALIA, I. Excretion of fluorides. **In: Fluorides and human health**. Geneva: WHO, 1970. p. 141-61.
- 62 HOLM, A.K.; ANDERSSON, R. Enamel mineralization disturbances in 12-year-old children with known early exposure to fluorides. **Community Dent. oral Epidem.**, v. 10, n.6, p. 335-9, Dec. 1982.
- 63 HULKA, B.S. Epidemiological studies using biological markers: issues for epidemiologists. **Cancer Epidem. Biomarkers Prev.**, v. 1, n. 1, p. 13-9, Nov./ Dec. 1991.
- 64 JACKSON, R.D. et al. The fluoride content of foods and beverages from negligibly and optimally fluoridated communities. **Community Dent. oral Epidemiol.**, v.30, n.5, p.382-91, Oct. 2002.
- 65 KUMAR, J.V. et al. Trends in dental fluorosis and dental caries prevalences in Newburg and Kingston, NY. **Amer. J. Publ. Hlth**, v. 79, n.5, p. 565-69, May 1989.
- 66 LEVY, S.M.; KIRITSY, M.C.; WARREN, J.J. Sources of fluoride intake in children. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v. 55, n. 1, p. 39-52, 1995.

- 67 LIMA, Y.B.O.; CURY, J.A. Ingestão de flúor por crianças através da água e dentifrício. **Rev. Saúde públ.**, v. 35, n. 6, p. 576-81, 2001.
- 68 LIN, T.H.; HUANG, Y. L.; WANG, M.Y. Arsenic species in drinking water, hair, fingernails and urine of patients with blackfoot disease. **J. Toxicol. Environ. Health A.**, v.53, n.2, p.85-93, 1998.
- 69 LONGNECKER, M. P. et al. Use of selenium concentration in whole blood, serum, toenails or urine as a surrogate measure of selenium intake. **Epidemiology**, v.7, n.4, p.127-38, 1999.
- 70 MACHOY, Z. Effects of environment upon fluoride content in nails in children. **Fluoride**, v. 22, n.4, p. 169-73, 1989.
- 71 MAJUMDAR, S.; CHATTERJEE, J.; CHAUDHURI, K. Ultrastructural and trace metal studies on radiographer's hair and nails. **Biol. Trace Elem. Res.**, v.67, n.2, p.127-38, 1999.
- 72 MANSBRIDGE, J.N.; BROWN, M.D. Changes in dental caries prevalence in Edinburgh children over three decades. **Community dent. Hlth**, v. 2, n.1, p.3-13, Mar. 1985.
- 73 MARTHALER, T.M. et al. Urinary fluoride excretion in children with low fluoride intake or consuming fluoridated salt. **Caries Res.**, v. 29, n.1, p. 26-34, 1995.
- 74 MASCARENHAS, A.K. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. **Pediat. Dent.**, v. 22, n. 4, p. 269-77, July/Aug. 2000.
- 75 McCLOSKEY, R.J. A technique for removal of fluorosis stains. **J. Amer. dent. Ass.**, v. 109, n.1, p. 63-4, July 1984.

-
- 76 MELLBERG, J.R.; RIPA, L.W. **Self-applied topical fluoride. Fluoride in preventive dentistry: theory and clinical implications.** Chicago, Quintessence, 1983. p. 243-77.
- 77 MESSER, H.H.; NOPAKUM, J.; RUDNEY, J. D. Influence of pH on intestinal fluoride transport in vitro. **J. dent. Assoc. Thai.**, v.39, n.6, p.226-32, Nov./Dec. 1989.
- 78 NAGRA, M.S. et al. A study of trace-elements in scalp hair and fingernails of industrial workers of Ontario, Canada. **J. Radioanalyt. Nucl. Chem.**, v. 162, p. 283-9, 1992.
- 79 NEWBRUN, E. The case for reducing the current council on dental therapeutics fluoride supplementation schedule. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v.59, n.4, p.262-8, Fall 1999.
- 80 NIDR Workshop: Report pf working group I: Strategies for improving the assessment of fluoride in accumulation in body fluids and tissues. **Advanc. dent. Res.**, v. 8, p. 113-5, 1994.
- 81 NOPAKUN, J.; MESSER, H,H,; VOLLER, V. Fluoride absorption from the gastrointestinal tract of rats. **J. Nutr.** v.119, n.10, p. 1411-7, Oct. 1989.
- 82 OPHAUG, R.H.; SINGER, L.; HARLAND, B.F. Estimated fluoride intake of 6-month-old infants in four dietary regions of the United States. **Amer. J. Clin. Nutr.**, v. 33, n.2, p. 324-7, Feb. 1980.
- 83 OSUJI, O.O. et al. Risk factors for dental fluorosis in a fluoridated community. **J. dent. Res.**, v. 67, n.12, p. 1488-92, Dec. 1988.
- 84 PAIVA, S.M.; CURY, J.A. Dentifrício fluoretado e risco de fluorose dentária. **Rev. Pós Grad.**, 2002. /no prelo/.

- 85 PAIVA, S.M.; LIMA, Y.B.O.; CURY, J.A. Fluoride intake by brazilian children from two communities with fluoridated water. **Community Dent. oral. Epidemiol.**, v.31, p.1-8, 2003.

- 86 PANG, D.T.Y.; PHILIPPS, C.L.; BAWDEN, J.W. Fluoride intake from beverage consumption in a sample of North Carolina children. **J. dent. Res.**, v. 71, p. 1382-8, 1992.

- 87 PENDRYS, D.G.; KATZ, R.V. Risk of enamel fluorosis associated with fluoride supplementation, infant formula, and fluoride dentifrice use. **Amer. J. Epidemiol.**, v. 130, n.6, p. 1199-208, Dec. 1989.

- 88 PENDRYS, D.G.; STAMN, J.W. Relationship of total fluoride intake to beneficial effects and enamel fluorosis. **J. dent. Res.**, v.69, p.529-38, Feb. 1990. Special Issue.

- 89 PESSAN, J.P.; SILVA, S.M.B.; BUZALAF, M.A.R. Evaluation of the total fluoride intake of 4-7-year-old children from diet and dentifrice. **J Appl. Oral Sci.**, v.11, n.2, abr./jun. 2003.

- 90 PIN, M.L.G. et al. Concentração de flúor em alimentos infantis e risco de fluorose dental. **Pesq. Odont. Bras.**, v. 14, p. 47, 2000. Suplemento. /Resumo n.1289/.

- 91 RICHARDS, A.; BANTING, D.W. Fluoride toothpastes. In: FEJERSKOV, O.; EKSTRAND, J.; BURT, B.A. eds. **Fluoride in dentistry**. 2. ed. Copenhagen, Munksgaard, 1996. p.328-46.

- 92 RIPA, L.W. A critique of topical fluoride methods (dentifrices, mouthrinses, operator-, and self-applied gels) in na era of decreased caries and increased fluorosis prevalence. **J. Publ. Hlth Dent.**, v. 51, n.1, p. 23-41, 1991.

- 93 ROJAS-SANCHEZ, F. et al. Fluoride intake from foods, beverages and dentifrice by young children in communities with negligible and optimally fluoridated water: a pilot study. **Community Dent. oral Epidem.**, v.27, n.4, p. 288-97, 1999.
- 94 ROSENTHALER, H.; RANDEL, H. Rotatory reduction, enamel microabrasion, and dental bleaching for tooth color improvement. **Comp. Continuing Educ. Dent.**, v. 19, n. 1, p. 62-7, 1998.
- 95 RUI, A. A.; LIMA, Y. B. O.; CURY, J.A. A unha como indicador biológico de exposição ao flúor pela água e/ou dentifício fluoretado. **Pesq. Odont. Bras.**, v. 14 (Suppl.), 2000.
- 96 SCHAMCHULA, R.G. et al. Physiological indicators of fluoride exposure and utilization: an epidemiological study. **Community Dent. oral Epidem.**, v. 13, n.2, p. 104-7, 1985.
- 97 SCHMIDT, C.W.; LEUSCHKE, W. Fluoride content in fingernails of individuals with and without chronic fluoride exposure. **Fluoride**, v.23, n.2, p.79-82, 1990.
- 98 SOPARKAR, P.M.; DEPAOLA, P.F. History of fluoride ingestion among children diagnosed with and without fluorosis (abstract). **J. dent. Res.**, v. 64, p. 230, 1985. Special issue.
- 99 SPACK, C.K.; EKSTRAND, J., ZYBERTEIN, D. Bioavailability of fluoride added by baby formula and milk. **Caries Res.**, v.16, n.3, p.249-56, 1982.
- 100 SPATE, V.L. et al. Determination of fluoride in human nails via cyclic neutral activation analysis. **J. Radioanalyt. Nucl. Chem.**, v. 179, p. 27-33, 1994.

- 101 SZPUNAR, S.M.; BURT, B.A. Dental caries, fluorosis, and fluoride exposure in Michigan schoolchildren. **J. dent. Res.**, v.67, n.5, p 802-6, May 1988.
- 102 TABARI, E.D et al. Dental fluorosis in permanent incisor teeth in relation to water fluoridation, social deprivation and toothpaste use in infancy. **Brit. dent. J.**, v. 189, n. 4, p. 206-20, Aug. 2000.
- 103 TAVES, D.R. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. **Talanta**, v. 15, p. 969-74, 1968.
- 104 TAVES, D.R. Dietary fluoride intake of fluoride ashed (total fluoride) v. unashed (inorganic fluoride) analysis of individual foods. **Brit. J. Nutr.**, v. 49, p. 295-301, 1983.
- 105 TRAUTNER, K.; SIEBERT, G. An experimental study of bioavailability of fluoride from dietary sources in man. **Arch. oral Biol.**, v. 31, n. 4, p. 223-8, 1986.
- 106 TURNER, S.D.; CHAN, J.T.; LI, E. Impact of imported beverages on fluoridated and nonfluoridated communities. **Gen. Dent.**, v.46, n.2, p.190-3, Mar./Apr. 1998.
- 107 VALKOVIC, V. **Trace elements in human hair**. New York, Garland STPM Press , 1977.
- 108 VILLA, A. et al. Estimation of the fraction of an ingested dose of fluoride excreted through urine in pre-school children. **Community Dent. oral Epidem.**, v. 25, p. 305-12, 1999.
- 109 VILLENA, R.S.; BORGES, D.G.; CURY, J.A. Avaliação da concentração de F em águas minerais comercializadas no Brasil. **Rev. Saúde públ.**, v.6, n.30, p.512-8, 1996.

- 110 VLACHOU, A.; DRUMMOND, B.K.; CURZON, M.E.J. Fluoride concentrations of infant foods and drinks in the United Kingdom. **Caries Res.**, v.26, n.1, p.29-32, 1992.
- 111 WALKER, C. H et al. The use of biomarkers to measure the interactive effects of chemicals. **Ecotoxicol. Environm. Safety**, v.40, p.65-70, 1998.
- 112 WARREN, J.J.; LEVY, S.M. A review of fluoride dentifrice related to dental fluorosis. **Pediat. Dent.**, v. 21, n. 4, p. 265-71, July/Aug. 1999.
- 113 WHITFORD, G.M. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. **J. dent. Res.**, v. 69, p.539-49, 1990. Special issue.
- 114 WHITFORD, G.M. Intake and metabolism of fluoride. **Advanc. dent. Res.**, v. 8, n. 1, p. 5-14, 1994.
- 115 WHITFORD, G.M. **The metabolism and toxicity of fluoride**. 2.ed. Karger, Basel, 1996.
- 116 WHITFORD, G.M. **Determinants and mechanisms of enamel fluorosis**. Ciba Found. Symp., v. 205, p. 226-45, 1997.
- 117 WHITFORD, G.M. et al. Fingernail fluoride: a method for monitoring fluoride exposure. **Caries Res.**, v.33, n.6, p.462-7, Nov./Dec. 1999.
- 118 WHITFORD, G.M.; THOMAS, J.E.; ADAIR, S.M. Fluoride in whole saliva, parotid ductal saliva and plasma in children. **Arch. oral Biol.**, v. 44, n. 10, p. 785-8, 1999.

- 119 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fluorides and oral health. Report of WHO expert committee and oral health status and fluoride use. WHO Technical Report Series 846. Geneva, WHO, 1994. p. 37.
- 120 WOOLFOLK, M.W.; FAJA, B.W., BAGRAMIAN, R.A. Relation of sources of systemic fluoride to prevalence of dental fluorosis. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v.49, p.78-82, 1989.
- 121 ZACHERL, W.A.; LONG, D.M. Reduction in caries attack rate – non-fluoridated community. **J. Dent. Res.**, (Abs) v. 58 , p. 227, 1979. /Abstract/

Abstract

ABSTRACT

NAIL AS A BIOMARKER OF CHRONIC FLUORIDE EXPOSURE FROM THE DIET IN FLUORIDATED AND NON-FLUORIDATED COMMUNITIES.

The aim of the present study was to verify if nails can be used as biomarkers of chronic fluoride (F) exposure from the diet in children living in fluoridated and non-fluoridated communities. Fluoride intake from the diet was also evaluated. Fifteen 2-6-year-old children living in the fluoridated (0.6-0.8 ppm) Bauru-SP and 15 living in the non-fluoridated Itápolis-SP participated in the study. Fluoride concentrations in nails, plasma and duplicate diet were analyzed with the ion-specific electrode, following HMDS-facilitated diffusion. Data were analyzed by Student's *t* test and by linear regression ($p < 0.05$). Mean plasma F concentration ($\mu\text{g/mL}$) found in Itápolis (0.024 ± 0.020) was slightly higher than in Bauru (0.019 ± 0.011), but this difference was not significant. Mean F concentrations ($\mu\text{g/g}$) in fingernails and toenails were: 3.557 ± 1.297 and 2.815 ± 1.288 , respectively, for Bauru and 2.292 ± 1.250 and 1.580 ± 0.589 , respectively for Itápolis. The differences between Bauru and Itápolis, as well as between F concentrations in fingernails and toenails were statistically significant. The estimated fluoride intake from the diet was significantly higher for the children living in Bauru (0.551 ± 0.610 mg), when compared to those living in Itápolis (0.088 ± 0.056 mg). This corresponds to a total daily F intake of 0.028 and 0.003 mg/Kg body weight for children living in Bauru and Itápolis, respectively. A significant positive correlation was found between nail F concentrations and estimated F intake from the diet ($r = 0.566$, $p = 0.00112$). It was concluded that nails can be used as biomarkers of chronic F exposure from the diet to differentiate children at the age of risk for dental fluorosis living in fluoridated and non-fluoridated communities.