**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU**

REJANE FUKUSHIMA

**Unhas humanas como marcadores biológicos de exposição ao flúor:
Correlação com a saliva da parótida e influência da idade**

**BAURU
2007**

REJANE FUKUSHIMA

**Unhas humanas como marcadores biológicos de exposição ao flúor:
Correlação com a saliva da parótida e influência da idade**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de doutor em Odontologia.

Área de concentração: Biologia Oral

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Co-orientador: Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

**BAURU
2007**

Fukushima, Rejane

F955u Unhas humanas como marcadores biológicos de exposição ao flúor: correlação com a saliva da parótida e influência da idade / Rejane Fukushima. -- Bauru, 2007.

137p. : il. ; 30cm.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Co-orientador: Fabio Correia Sampaio

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº:

Data: 17 de junho de 2002

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

Rejane Fukushima

Filiação	Akira Fukusima e Aiko Fukusima
21/07/1978	Nascimento - Araçatuba - SP
1997 - 2000	Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo
1998 - 1998	Bolsista do Programa Bolsa-Trabalho da Universidade de São Paulo sob orientação da Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva
1998 - 1999	Bolsista de Iniciação Científica CNPq sob orientação da Profa. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
2000 - 2000	Bolsista de Iniciação Científica FAPESP (proc.00/01173-6) sob orientação da Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
2001 - 2002	Pesquisa no departamento de Odontologia Preventiva, <i>Kagoshima University</i> , Japão, sob orientação do Prof. Dr. Masakazu Inoue
2001 - 2002	Bolsista <i>Kagoshima Prefectural Government</i>
2003 - 2004	Curso de Pós-Graduação em Biologia Oral, nível de Mestrado, pela Faculdade de Odontologia de Bauru - USP
2003 - 2007	Curso de Pós-Graduação em Biologia Oral, nível de Doutorado, pela Faculdade de Odontologia de Bauru - USP, após conversão de Mestrado para Doutorado Direto
2003 - 2004	Bolsista de Mestrado CAPES sob orientação da Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
2004 - 2005	Bolsista de Mestrado FAPESP (proc.03/03662-2) sob orientação da Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
2005 - 2007	Bolsista de Doutorado Direto FAPESP (proc.04/15417-5) sob orientação da Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf
2007 - 2007	Programa de Treinamento Técnico, <i>The Nippon Dental University</i> , Japão, sob orientação do Prof. Dr. Takaaki Aoba
2007 - 2007	Bolsista JICA (<i>Japan International Cooperation Agency</i>)
Associações	CROSP - Conselho Regional de Odontologia do Estado de São Paulo IADR - <i>International Association for Dental Research</i> SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

DEDICATÓRIA

A meus pais **Akira e Aiko**,
Exemplos de honestidade e simplicidade,
Por me ensinarem o valor da educação,
Por me proporcionarem total apoio, mesmo sem bem entender a “vida acadêmica”,
Pelas palavras de incentivo nos momentos de estresse,
Pelo carinho e amor incondicional.
Muito obrigada!

A meus irmãos **Ricardo e Renata**,
Pela constante torcida positiva em todos os meus intentos.
Muito obrigada!

A meus sobrinhos **Rafael e Gabriel**,
Pelos momentos agradáveis.
Muito obrigada!

Ao querido **Emerson**,
Pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.
Muito obrigada!

DEDICO ESTE TRABALHO

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À querida orientadora **Marília**,

Tenho muita admiração pela tua competência, determinação e honestidade. Você me apresentou ao mundo científico e ensinou que dedicação é primordial para o desenvolvimento de um bom trabalho. Nos momentos de incertezas na vida profissional você proporciona segurança, pois acredito que poderei contar com tua orientação. Nesses anos de convivência pude observar o teu progresso em expansão geométrica, o que tomo como exemplo. Tua doçura ameniza as adversidades, fazendo com que dediquemos menos importância aos problemas. Além de tudo, é uma excelente companheira de viagens. Muito obrigada!

Ao orientador **Fábio**,

Agradeço muito que nossos caminhos tenham se cruzado. Inteligente, acessível, divertido, humilde, são muitos os teus valores. Você foi um ótimo cicerone na Paraíba, Estado que eu desconhecia, mas que se tornou muito especial a partir deste trabalho. Sem tua colaboração esta tese não existiria. A você, Tang e toda a Família, meus sinceros agradecimentos!

Ao amigo **Franklin Delano**,

Pela grandiosa colaboração nas etapas de coleta e análise das amostras das comunidades de Cajazeirinhas e Brejo das Freiras. Agradeço a você e tua família, principalmente a tua avó que cedeu a casa como sede da pesquisa em Catolé do Rocha. Obrigada pela ótima companhia e pela força nos momentos mais difíceis.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, na pessoa de sua Reitora, Dra. Suely Vilela.

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa de seu Diretor, Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro.

À Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado, Presidente da Comissão de Pós-Graduação da FOB-USP.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris, pela realização das análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Antonio de Castro Rodrigues, pelo apoio constante aos nossos intentos, sempre de forma atenciosa.

Ao Prof. Dr. José Humberto Damante e Profa. Dra. Ana Lúcia Álvares Capelozza, pelo apoio e oportunidades concedidas.

À Profa. Dra. Salete Moura Bonifácio da Silva e Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet pelas valiosas sugestões e correções deste trabalho no Exame de Qualificação.

Ao Prof. Dr. Eulazio Mikio Taga e Prof. Dr. José Mauro Granjeiro pela orientação no laboratório de Bioquímica.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira, docente e amigo de longa data do laboratório de Bioquímica.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica, Flávia, Thelma e Ovídio, pelo apoio e amizade.

Agradecimentos

À secretária Vera do dep. de Ciências Biológicas que com prontidão e bom-humor auxilia todos os alunos com os trâmites burocráticos.

Aos amigos Juliano Pelim Pessan e Tatiana de Almeida Furlani pela valiosa colaboração no processo de coleta de amostras em Brejo das Freiras e Brejo dos Santos, respectivamente. Foi um tremendo prazer tê-los como companheiros no sertão nordestino! Jamais esquecerei as peripécias que vivenciamos. Vocês tornaram leve uma etapa de trabalho duro. Muito obrigada!

À Daniela dos Santos Rigolizzo e Luciana Prado Maia, que na condição de alunas de iniciação científica, auxiliaram nas etapas das cidades de Bauru e Pirajuí. A nossa convivência permitiu-me ensinar, bem como a aprender muito. Agradeço a colaboração.

À aluna de graduação Mariana Ricardo Pereira, residente de Pirajuí, que nos ajudou na obtenção de voluntários em sua cidade.

A todos os Agentes Comunitários de Saúde que colaboraram com as etapas do Estado da Paraíba. Em especial, a Geralda e a Ivania, que se dedicaram bastante em prol deste estudo e proporcionaram agradável companhia.

À Teca e família (Brejo das Freiras) e Betinha e família (Brejo dos Santos), que contribuíram muito nos procedimentos de coletas de unhas.

Aos amigos da primeira turma de Mestrado e Doutorado em Biologia Oral da FOB-USP: Cristina, Juliane, Kellen, Mauro, Tatiana, Ariádnnes, Esther, Flávia, Maria Heloísa, Renato e Tânia, entre outros.

Aos alunos de graduação e pós-graduação que trabalham ou já pesquisaram no Laboratório de Bioquímica, pela amizade e convivência harmoniosa, entre eles, Aline, Carol, Claudinha, Dani, Eduardo, Flavinha, Gabriel, Helô, Irene, Mileni e Thiemi.

Agradecimentos

Às amigas Dinah, Andréia, Kátia, Rita, Rosana, Mari, Sumi, Aretha, Blandine, Michelline e Carla, que apesar da distância, tenho a certeza de que mantêm o pensamento positivo em minha pessoa.

Às amigas com as quais passei ótimos momentos em Bauru, no combate ao estresse do dia-a-dia: entre elas, Ana Cristina, Cinthia e Roberta.

Aos amigos da 36ª Turma da FOB-USP.

À amiga Juliane Carvalho, companheira para todos os momentos, pela amizade e apoio constante. Ju, muito obrigada de coração!

Aos meus familiares que apoiaram com palavras de incentivo.

A todos os voluntários participantes deste estudo, pela fundamental colaboração.

À Associação Kagoshima do Brasil, que viabilizou um ano de experiência em pesquisa no Japão, e a *Kagoshima University* pelos ensinados adquiridos. Agradeço aos amigos da associação e a todos que criei durante a estada no Japão.

À *Japan International Cooperation Agency*, pela oportunidade concedida de aperfeiçoar-me em pesquisa na *The Nippon Dental University*. Agradeço a todos do departamento de Patologia dessa unidade, em especial ao Prof. Dr. Aoba.

Aos órgãos de fomento CAPES e em especial à FAPESP, pelo suporte financeiro que viabilizou este estudo científico.

A todas as pessoas que, embora não citadas, de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho e concretização desta etapa importante em minha vida. Meus sinceros agradecimentos!

“Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite. É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje. Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo. Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus. Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar. O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma. Tudo depende só de mim.”

Charles Chaplín

RESUMO

Avaliou-se a influência da exposição ao flúor (F) através da água de beber, da velocidade de crescimento das unhas, da idade e do gênero na concentração deste elemento nas unhas das mãos e dos pés. Em adição, verificou-se a correlação entre as concentrações de F na saliva total, saliva do ducto da parótida e unhas das mãos e dos pés. Participaram do estudo 300 indivíduos, das faixas etárias de 3-7, 14-20, 30-40 e 50-60 anos, residentes de cinco comunidades brasileiras, sendo duas no Estado de São Paulo (Pirajuí e Bauru, com água não fluoretada e 0,7 mgF/L na água de abastecimento, respectivamente) e três no Estado da Paraíba (Cajazeirinhas, Brejo dos Santos e Brejo das Freiras, com 0,2, 0,7 e 1,7 mgF/L na água de consumo, respectivamente). Foram coletadas duas ou três (apenas em Bauru) amostras de água de beber, além de duas amostras de: unhas dos pés, unhas das mãos, saliva total e saliva do ducto da parótida de cada indivíduo. O F nas amostras foi analisado com eletrodo íon-específico. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através de análise de variância e regressão linear ($p < 0,05$). A exposição ao F através da água de beber, a velocidade de crescimento das unhas, a idade e o gênero influenciaram a concentração de F nas unhas das mãos e dos pés, sendo que o fator de exposição ao F através da água foi o que exerceu maior influência pelo modelo de regressão linear adotado. As unhas dos pés ($R^2=0,46$) se mostraram melhores indicadoras de exposição ao F do que as das mãos ($R^2=0,24$). Foi encontrada uma correlação negativa significativa entre velocidade de crescimento das unhas e concentração de F nas mesmas. Houve correlação positiva significativa entre concentração de F nas unhas das mãos e dos pés com: saliva total ($r=0,36$ e $r=0,41$) e saliva do ducto da parótida ($r=0,25$ e $r=0,53$), respectivamente. Também se observou correlação positiva entre saliva total e do ducto da parótida ($r=0,24$), bem como entre concentração de F na água e saliva total ($r=0,41$) e saliva do ducto ($r=0,65$). Todos os fatores testados influenciaram os níveis de F nas unhas e, portanto, devem ser levados em consideração quando se utiliza este marcador biológico.

Palavras-chave: Fluoretos. Marcadores biológicos. Unhas. Saliva.

ABSTRACT

Human nails as biological markers of fluoride exposure: correlation to parotid ductal saliva and influence of age

The influence of fluoride (F) concentration in the drinking water, nails growth rate, age and gender upon the F content in fingernail and toenail were evaluated. In addition, the correlations among the F concentrations in whole saliva, parotid ductal saliva and finger/toenails were verified. Three hundred volunteers of 3-7, 14-20, 30-40, 50-60 years participated. They were residents of five Brazilian communities, two in Sao Paulo State (Pirajuí and Bauru, non-fluoridated and 0.7 mgF/L artificially fluoridated drinking water, respectively) and three in Paraiba State (Cajazeirinhas, Brejo dos Santos and Brejo das Freiras, 0.2, 0.7 and 1.73 mgF/L naturally fluoridated drinking water, respectively). Two or three samples of drinking water, and two samples of fingernails, toenails, whole saliva and ductal saliva were collected from each volunteer, with one-week interval period between the collections. F in water, whole saliva, ductal saliva and nails was determined using the ion-sensitive electrode. Data were analyzed by ANOVA and linear regression ($p < 0.05$). The F exposure from the drinking water, nails growth rate, age and gender influenced the levels of F in fingernails and toenails. Considering the model of multivariate linear regression adopted, F exposure from the water influenced the most. Toenails ($R^2 = 0.46$) seemed to be better indicators of F than fingernails ($R^2 = 0.24$). It was found a significant negative correlation between nails growth rate and their content of F. Positive correlations were found between F concentration in fingernails and toenails and: F concentration in whole saliva ($r = 0.36$ and $r = 0.41$) and in parotid ductal saliva ($r = 0.25$ and $r = 0.53$), respectively. Moreover, it was observed a positive correlation between whole and parotid saliva ($r = 0.24$), as well as between F concentration in the drinking water and whole ($r = 0.41$) and parotid saliva ($r = 0.65$). All factors that influenced nails F concentration must be taken into account when using them as biological markers.

Keywords: Fluorides. Biological Markers. Nails. Saliva.

SUMÁRIO

1 Introdução	27
2 Revisão de Literatura	35
2.1 Ingestão de flúor e fluorose dentária	35
2.1.1 Água fluoretada	38
2.2 Marcadores biológicos.....	43
2.2.1 Marcadores biológicos de F	44
2.2.1.1 Saliva total como biomarcador de F	45
2.2.1.2 Saliva do ducto da parótida como biomarcador de F	48
2.2.1.3 Unhas como biomarcadores de F	49
3 Proposição	57
4 Material e Métodos	61
4.1 Aspectos éticos	61
4.2 Locais Amostrados	61
4.3 Seleção dos voluntários	64
4.4 Obtenção de amostras dos voluntários	64
4.4.1 Coleta de amostras de água de consumo	64
4.4.2 Coleta de saliva total	65
4.4.3 Coleta de saliva do ducto da parótida	65
4.4.4 Coleta de unhas	66
4.4.4.1 Avaliação da concentração de F nas unhas dos diferentes dedos das mãos....	66
4.4.4.2 Avaliação da contaminação exógena das unhas	67
4.5 Avaliação da velocidade de crescimento das unhas	68
4.6 Análise de flúor.....	68
4.6.1 Água.....	68
4.6.2 Saliva total.....	68
4.6.3 Saliva do ducto da parótida	70
4.6.4 Unha.....	73
4.7 Análise estatística	76
5 Resultados	79
5.1 Concentração de F nas amostras de água de consumo	79
5.2 Concentração de F na saliva total	80
5.3 Concentração de F na saliva do ducto da parótida	82
5.4 Concentração de F nas unhas	84
5.5 Avaliação da velocidade de crescimento das unhas	88
5.6 Aplicação dos testes de regressão linear multivariada e correlação linear	92
5.7 Avaliação da concentração de F nas unhas dos diferentes dedos das mãos	95
5.8 Avaliação da contaminação exógena das unhas por F	96
6 Discussão.....	101
6.1 Água.....	101
6.2 Saliva total.....	102
6.3 Saliva do ducto da parótida	103
6.4 Concentração de F nas unhas e velocidade de crescimento das unhas.....	105
7 Conclusões.....	113
Referências	117
Anexos	135

1 *Introdução*

1 Introdução

O uso do flúor (F) tem promovido melhorias na saúde bucal e na qualidade de vida, através da redução dos índices de cárie dentária. (BURT, 1995). Entretanto, a maior exposição ao F na era moderna que tem levado ao declínio nos índices de cárie, contribuiu para o aumento na prevalência de fluorose dentária. (LEVERETT, 1986; DENBESTEN, 1994; BURT, 1995; JACKSON et al., 1999; MASCARENHAS, 2000; TABARI et al., 2000; TSUTSUI; YAGI; HOROWITZ, 2000).

A ingestão crônica de F durante o período de formação do esmalte dentário pode resultar em alterações clínicas do esmalte que variam de linhas brancas finas a opacidade severa, podendo ocorrer a quebra da estrutura logo após a erupção: trata-se da fluorose dentária. (FEJERSKOV; RICHARDS; DENBESTEN, 1996). A severidade da alteração no esmalte depende da ingestão total de F, independentemente da fonte, além da duração da exposição ao F durante a amelogenese. (AOBA; FEJERSKOV, 2002).

Entre os meios de distribuição de F, a fluoretação das águas é o método preventivo à cárie dentária de mais ampla distribuição, maior equidade, adesão, melhor custo-efetividade e segurança. (CANGUSSU et al., 2002). Em baixa concentração na água de beber, o F tem efeito benéfico nos dentes. No entanto, a exposição excessiva ao F na água ou associada com outras fontes pode levar a efeitos colaterais. Tais efeitos variam de fluorose dentária moderada a fluorose esquelética incapacitante, com o aumento do nível e período de exposição. A fluorose esquelética incapacitante é uma causa significativa de morbidade em várias regiões do mundo. (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2006). Desde os clássicos estudos epidemiológicos de Dean (1942) já se relatava que cerca de 10% das crianças residentes em áreas otimamente fluoretadas (1 mgF/L) desenvolveriam fluorose muito suave ou suave, contra apenas 1% das crianças que residiam em áreas com baixa concentração de F na água. Convém ressaltar que esta prevalência foi reportada antes da grande disponibilidade de produtos odontológicos fluoretados, quando a água fluoretada era a única fonte significativa de ingestão de F. Na América do Norte, a prevalência de fluorose gira em torno de 7,7 a 69% nas comunidades fluoretadas, e entre 2,9 e 42% nas não fluoretadas, sendo que os

estudos feitos depois dos anos 80 têm mostrado as maiores prevalências. Os estudos de Szpunar e Burt (1988) e Riordan (1993) concordam que o risco de fluorose em áreas onde a concentração de F na água é 0,8 mg/L é quatro vezes maior que nas comunidades não fluoretadas. Numa revisão sistemática de 214 estudos sobre fluoretação da água, McDonagh et al. (2000) estimaram que em áreas com uma concentração de F na água de abastecimento de 1 mg/L, 12,5% dos indivíduos expostos teriam fluorose dentária de preocupação estética, uma prevalência bem maior que a reportada por Dean (1942), que para este nível de F na água não reportou casos de fluorose dentária moderada ou severa.

O aumento na prevalência da fluorose dentária tem alertado a comunidade científica para a necessidade de um acompanhamento contínuo e efetivo da exposição ao F. Coloca-se então, a necessidade de avaliar os marcadores biológicos para o íon F. (CLARKSON, 2000).

Marcadores biológicos ou biomarcadores são indicadores que sinalizam eventos em sistemas biológicos ou amostras. Embora possam pertencer a mais de uma classe, são classificados como biomarcadores de: exposição, efeito e suscetibilidade. Os marcadores biológicos podem ser utilizados para classificar e quantificar exposições ambientais e seus efeitos. Em estudos epidemiológicos podem identificar e avaliar fatores de risco associados à doença. O biomarcador não é um teste diagnóstico, e sim um indicador da ocorrência de uma alteração que pode levar a uma futura doença clínica. (GRANDJEAN, 1995). Variações individuais em características fisiológicas como gênero, idade e estado de saúde geral podem afetar significativamente a absorção e distribuição do elemento químico. Por exemplo, a resposta individual à temperatura ambiental, com a ingestão de maior quantidade de água, pode afetar a dose do elemento absorvida. A exposição pode ser avaliada pelo monitoramento ambiental (análise de solo, ar, água) ou por marcadores biológicos de exposição (análises de fluidos corporais como sangue, urina, saliva, fluido amniótico, sêmen, além de análises de outras amostras biológicas como cabelo, fezes ou dente). O uso de marcadores biológicos é mais preciso para se estimar exposição do que o monitoramento ambiental, sendo o sangue e a urina as amostras mais utilizadas para este fim. (COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1987).

O uso de marcadores biológicos para o elemento F foi discutido em uma conferência da NIDR (National Institute of Dental Research) ocorrida em 1993. As

vantagens e limitações do uso de plasma, saliva dos ductos, urina, unhas, osso e dentina como indicadores da concentração total de F no organismo foram discutidas. (WHITFORD, 1994). Os biomarcadores de exposição ao F foram classificados segundo a perspectiva de tempo em: marcadores históricos (osso, dente), marcadores contemporâneos (urina, plasma, saliva) e marcadores recentes (cabelo, unha). (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1994).

Embora a correlação entre as concentrações de F no plasma e a fluorose esteja bem estabelecida, a coleta de sangue não é um procedimento ideal para ser realizado em humanos. Tal coleta exige punção venosa, o que impõe dificuldade no caso de avaliações dentárias. (SCHAMSCHULA et al., 1985). Indicadores dos níveis plasmáticos de F ao longo do tempo cuja coleta seja simples e não invasiva são de grande interesse.

Em substituição ao plasma, a saliva dos ductos representa um biomarcador de exposição ao F a ser considerado. Estudos conduzidos com adultos (EKSTRAND, 1977; WHITFORD, 1996) e crianças (WILSON E BAWDEN, 1991; WHITFORD; THOMAS; ADAIR, 1999) demonstraram haver correlação entre concentrações de F no plasma e na saliva do ducto da parótida. Whitford, Thomas e Adair (1999) mostraram que a concentração de F na saliva da parótida é significativamente relacionada aos níveis plasmáticos por uma constante de proporcionalidade de 0,80.

Em relação ao emprego de saliva total como indicador de exposição ao F, Oliveby et al. (1989) relataram que a concentração de F na saliva total refletiu o nível deste elemento no plasma depois da ingestão de 1 mg de fluoreto de sódio. Cury et al. (2005) encontraram correlação alta entre a quantidade de F ingerida através de dentifrícios e a área sob a curva de concentração de F na saliva total. Por outro lado, Whitford, Thomas e Adair (1999) avaliaram a concentração de saliva total sem ingestão prévia de F e concluíram que a saliva total não demonstrou ser um indicador apropriado para as concentrações de F na saliva da parótida ou no plasma. No entanto, estes autores não relataram o nível de F na água ao qual os participantes estavam expostos.

Ainda na conferência da NIDR onde se discutiu sobre os biomarcadores de F, foram estabelecidas algumas recomendações para pesquisas futuras, sendo uma delas a determinação das variáveis que afetam a concentração de F em cabelos e unhas. (REPORT FOR WORKING GROUP I, 1994). O uso de unhas como

indicadores de acúmulo de F é atrativo por duas razões: as amostras são facilmente obtidas e, teoricamente, o elemento nas unhas não se encontra em fluxo dinâmico, ou seja, vai refletir o ambiente metabólico durante a formação ungueal, permanecendo relativamente isolado quando a estrutura se completa e é expelida pela pele. (HOPPS, 1977; OPHAUG, 1994). Alguns estudos avaliaram o uso das unhas como biomarcadores de exposição ao F em animais (BUZALAF et al., 2002; BUZALAF et al., 2004a; BUZALAF et al., 2004b) e humanos. (SCHAMSCHULA et al., 1985; MACHOY, 1989; SCHIMDT; LEUSCHKE, 1990; CZARNOWSKI; KRECHNIAK, 1990; SPATE et al., 1994; WHITFORD et al., 1999; LEVY; BASTOS; BUZALAF, 2004; RODRIGUES; BASTOS; BUZALAF, 2004; PESSAN et al., 2005; WHITFORD, 2005; BUZALAF; PESSAN; ALVES, 2006; ALMEIDA; CARDOSO; BUZALAF, 2007). Tanto as unhas das mãos como as unhas dos pés têm sido usadas para este objetivo, mas a literatura é contraditória quando compara os níveis de F presentes nas unhas das mãos com as unhas dos pés. (MACHOY, 1989; WHITFORD et al., 1999; LEVY; BASTOS; BUZALAF, 2004; RODRIGUES; BASTOS; BUZALAF, 2004; BUZALAF; PESSAN; ALVES, 2006). Além disso, há outros fatores que necessitam de mais estudos a fim de se validar o uso das unhas como marcadores biológicos de exposição ao F. Whitford (2005) em uma revisão sobre o uso das unhas como biomarcadores de F, ressaltou que não há informações acerca das variáveis que podem afetar a taxa de incorporação de F nas unhas. Estes fatores incluem a velocidade de crescimento das unhas, idade e gênero do doador.

Atualmente há apenas dois trabalhos que consideram a velocidade de crescimento das unhas e o conteúdo de F das mesmas. No primeiro (MCDONNELL et al., 2004), foi avaliado o efeito da idade, gênero e exposição ao F na velocidade de crescimento das unhas de polegares de crianças de 2 a 3 anos, sob condições habituais de ingestão de F. Nenhuma das variáveis testadas influenciou o crescimento das unhas. Os autores ressaltaram que o baixo número de voluntários (n=52) limita a generalização dos resultados obtidos, sugerindo a repetição do estudo em larga escala. No segundo estudo (BUZALAF; PESSAN; ALVES, 2006), verificou-se a influência da velocidade de crescimento e comprimento de todas as unhas e avaliou-se o nível de F nas mesmas, após o aumento da ingestão de F em voluntários adultos de 20 a 35 anos. Observou-se que a velocidade de crescimento foi estatisticamente maior nas unhas das mãos do que nos pés, enquanto que as concentrações de F nas unhas de ambos os sítios foram similares.

Na maioria dos estudos prévios sobre o conteúdo de F nas unhas, os participantes eram crianças na faixa etária de 1 a 7 anos (WHITFORD et al., 1999; LEVY; BASTOS; BUZALAF, 2004; RODRIGUES; BASTOS; BUZALAF, 2004; PESSAN et al., 2005; ALMEIDA; CARDOSO; BUZALAF, 2007), devido ao período crítico para o desenvolvimento da fluorose dentária. (MASCARENHAS, 2000). A estimativa de exposição ao F é importante não só em idades mais tenras, devido à possibilidade de ocorrência da fluorose dentária, como também em idades mais avançadas, onde se tem associado a ingestão crônica de F ao risco de fraturas osteoporóticas. (FESKANICH et al., 1998). Além disso, existe a possibilidade de ocorrer um declínio da velocidade de crescimento das unhas com a idade. (HAMILTON et al., 1955)

A contaminação é uma preocupação quando se medem marcadores de exposição. (COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1987). Cabelos e unhas diferem de outros tecidos e fluidos comumente submetidos à análise de F, porque estão expostos diretamente ao ambiente e, por conseguinte, sujeitos à contaminação ambiental. (OPHAUG, 1994). Em relação às unhas, Ophaug (1994) atentou para a necessidade de estudos sobre o efeito do sítio de onde as amostras são obtidas e sobre a influência dos procedimentos de lavagem prévia à análise de F no conteúdo total deste elemento nas amostras. Existe na literatura apenas um estudo sobre a contaminação exógena das unhas por F, onde os fragmentos de unha foram expostos a uma solução de 1 mg/L de F, e não foi relatada a existência de contaminação. (WHITFORD et al., 1999). Uma vez que as unhas dos indivíduos podem estar expostas a concentrações de F maiores do que 1 mg/L, por exemplo durante a escovação dentária, a possibilidade de contaminação exógena por exposição a concentrações maiores de F deveria ser avaliada.

2 *Revisão de Literatura*

2 Revisão de Literatura

Nesta revisão de literatura, serão abordados os temas abaixo relacionados:

2.1 Ingestão de F e fluorose dentária

2.1.1 Água fluoretada

2.2 Marcadores biológicos

2.2.1 Marcadores biológicos de F

2.2.1.1 Saliva total como biomarcador de F

2.2.1.2 Saliva do ducto da parótida como biomarcador de F

2.2.1.3 Unhas como biomarcadores de F

2.1 Ingestão de flúor e fluorose dentária

O fluoreto tem um papel fundamental no início, progressão e paralisação da cárie dentária. Até meados do século passado, acreditava-se que para que o máximo efeito cariostático fosse exercido, o fluoreto deveria ser incorporado à estrutura do esmalte dentário durante o seu desenvolvimento. Assim, parecia inevitável certa prevalência e severidade de fluorose numa população, a fim de que a prevalência e a severidade da cárie dentária entre as crianças fossem minimizadas. A fluorose dentária era então considerada como um efeito colateral indesejado dos benefícios cárie-protetores do F.

Em 1981, foi proposta uma mudança no paradigma relacionado aos mecanismos cariostáticos do fluoreto (FEJERSKOV; THYLSTRUP; LARSEN, 1981), segundo o qual seu efeito predominante para o controle da lesão cariosa seria tópico, através de uma atuação nos processos de des e remineralização que acontecem na interface entre a superfície dentária e os fluidos bucais. Este conceito ganhou ampla aceitação (TEN CATE; DUIJSTERS, 1983; OGAARD et al., 1988; TEN CATE; FEATHERSTONE, 1991; ÖGAARD et al., 1991) e trouxe a possibilidade de se obter a máxima proteção contra a cárie dentária, sem que houvesse a necessidade de uma grande ingestão de fluoreto. Deste modo, voltou-se a atenção para o controle da quantidade de fluoreto ingerido, o que, associado ao aumento na prevalência de fluorose dentária tanto em regiões fluoretadas quanto não fluoretadas

(LEVERETT, 1986; JACKSON et al., 1999; PEREIRA et al. 2000; TABARI et al., 2000; TSUTSUI; YAGI; HOROWITZ, 2000; KHAN; MOOLA; CLEATON-JONES, 2005) levou muitos pesquisadores a buscarem os principais fatores de risco para a fluorose dentária (OSUJI et al., 1988; PENDRYS; KATZ; MORSE, 1994; PENDRYS; KATZ, 1989; PENDRYS; KATZ; MORSE, 1996; WANG; GROPEN; OGAARD, 1997; PENDRYS, 1995; SKOTOWSKI; HUNT; LEVY, 1995; GRIMALDO et al., 1995; LALUMANDIER; ROZIER, 1995; BUZALAF et al., 2002; JACKSON et al., 2002; BUZALAF et al., 2004).

O fator de risco mais importante para fluorose dentária é, de fato, a quantidade total de fluoreto ingerida a partir de todas as fontes, durante o período crítico de formação dos dentes (DEAN et al., 1942; DENBESTEN, 1999; EVANS, 1991; MASCARENHAS, 2000). Para os incisivos centrais superiores permanentes, que são os dentes mais relevantes do ponto de vista estético, o período crítico consiste entre 15 a 24 meses para os meninos e 21 a 30 meses para as meninas (EVANS; DARVELL, 1995). Por outro lado, uma meta-análise mostrou que o risco de fluorose está mais relacionado à exposição total cumulativa da dentição em desenvolvimento ao fluoreto, que a períodos críticos mais específicos (BARDBSEN, 1999). Portanto, deve-se ter bastante cuidado com a ingestão de fluoreto em crianças principalmente até os 3 anos de idade, a fim de se evitar o acometimento dos incisivos superiores.

A dose diária máxima de ingestão de fluoreto, acima da qual se acredite que o risco de fluorose dentária esteja elevado também ainda não está precisamente definida. Alguns autores relatam que esta dose seja 0,1 mg F/kg de peso (FORSMAN, 1977). Outros observaram fluorose dentária com uma ingestão menor que 0,3 mg F/kg de peso a partir da água (BAELUM et al., 1987). Neste último estudo, entretanto, os dentes foram secos a fim de que as formas mais suaves de fluorose pudessem ser detectadas. Apesar de sua gênese dúbia, baseada em evidências empíricas, uma ingestão diária de fluoreto entre 0,05 e 0,07 mg/Kg de peso corporal é usualmente considerada como ótima para o controle da cárie dentária e para evitar fluorose dentária de preocupação estética (OPHAUG; SINGER; HARLAND, 1980; BURT, 1992). Outros fatores que podem aumentar a susceptibilidade dos indivíduos à fluorose dentária são: altitude (WHITFORD, 1980; MANJI et al., 1986; ANGMAR-MANSSON; WHITFORD, 1990; MABELYA; KONIG; VAN PALENSTEIN HELDERMAN, 1992; IRIGOYEN; MOLINA; LUENGAS, 1995;

MABELYA et al., 1997; WHITFORD, 1997; YODER et al., 1998; RWENYONYI et al., 1999) insuficiência renal (JUNCOS; DONADIO, 1972; KAMINSKY et al., 1990; TURNER et al., 1996; PORCAR et al., 1998) e desnutrição (RUGG-GUNN; AL-MOHAMMADI; BUTLER, 1997; YODER et al., 1998). Alguns destes fatores, entretanto, podem levar a alteração do esmalte que lembra fluorose dentária na ausência de exposição significativa ao fluoreto.

Dados recentes mostram uma prevalência de fluorose dentária de 8,56% em adolescentes brasileiros de 12 anos de idade (MINISTERIO DA SAUDE, 2004). Entretanto, os estudos brasileiros têm mostrado que a prevalência de fluorose dentária é diferente nas diferentes comunidades, variando de 0,37 a 97,6% (CAPELLA et al., 1989). Um estudo recente revelou uma prevalência de fluorose dentária entre adolescentes de 12 a 15 anos residentes em Bauru, SP, de 36% (RAMIRES et al., 2007), sendo 28% referente ao escore TF (Thylstrup-Fejerskov) 1. Para os poucos estudos que têm encontrado casos de maior severidade, estes dizem respeito à fluorose endêmica, causada pela presença de altos níveis de fluoreto naturalmente encontrado na água de beber. Estes dados são bastante semelhantes aos dados encontrados nos Estados Unidos. Um estudo recente reportando dados da NHANES (National Health and Nutrition Examination Surveys) entre 1999 e 2004, mostrou que aproximadamente 41% dos adolescentes norte-americanos com idade entre 12 e 15 anos e 36% com idade entre 16 e 19 anos apresentavam fluorose dentária, sendo que as formas moderada e severa estavam presentes em menos que 4% de ambas as faixas etárias (BELTRAN, 2007). A preocupação com o aumento na prevalência de fluorose dentária tem levado muitos investigadores a avaliarem a concentração de fluoreto nas fontes em potencial, bem como a estimar a sua ingestão a partir de todas as fontes, especialmente em crianças (GUHA-CHOWDHURY; DRUMMOND; SMILLIE, 1996; KIMURA et al., 2001; LEVY et al., 2001; BUZALAF et al., 2004; ALMEIDA; CARDOSO; BUZALAF, 2007). Estes estudos têm identificado quatro fatores de risco maiores para a fluorose dentária: uso de água fluoretada, suplementos fluoretados, dentifrício fluoretado e fórmulas infantis (DENBESTEN, 1999). Alguns alimentos e bebidas infantis manufaturados também podem ser importantes contribuintes para a ingestão diária total de fluoreto. (BUZALAF; CURY; WHITFORD, 2001; BUZALAF et al., 2004; BUZALAF et al., 2006).

A seguir, alguns aspectos relacionados à ingestão de flúor através da água, por ser uma das variáveis estudadas no presente trabalho.

2.1.1 Água fluoretada

Em 1901, John Macauley Eager relatou em detalhes sobre uma peculiaridade dentária chamada “denti de chiaie”, comum em imigrantes italianos. Segundo o autor, a etiologia desta imperfeição estaria relacionada com as condições geológicas, devido a vapores vulcânicos liberados na atmosfera ou formando uma solução na água de beber. Em Nápoles, na Itália, a causa principal da doença foi atribuída à água. Este relato foi considerado a primeira documentação científica no que diz respeito à fluorose dentária (EAGER, 1901).

Em 1911, McKay (1933) descreveu a presença de dentes com o esmalte mosqueado em crianças residentes na zona urbana de Colorado Springs, nos Estados Unidos, fato que não ocorria nas que habitavam a zona rural. Mais tarde, em 1916, McKay juntamente, com Black, observaram que as pessoas que residiam na área urbana provida pela água de abastecimento de Colorado Springs e que estavam, naquele momento, no período de formação dentária, apresentavam a coloração, caracterizando assim uma distrofia endêmica do esmalte dentário. Porém, os indivíduos da área rural desprovida de abastecimento de água não apresentavam os dentes mosqueados, sugerindo existir uma relação direta entre o defeito estrutural no esmalte e a presença de alguma substância na água. Também naquele momento, os autores verificaram que as crianças moradoras em áreas que apresentavam o esmalte mosqueado tinham uma prevalência menor de cárie dentária quando comparadas com aquelas residentes em locais desprovidos pelo abastecimento e que não tinham os mesmos sinais de manchas no esmalte.

Em 1942, Dean realizou um relevante estudo conhecido como o “Estudo das 21 cidades”, que procurou responder qual a concentração de F na água provocava o mosqueamento dentário, ao mesmo tempo em que buscou descobrir concentrações capazes de uma ação preventiva e eficaz na redução da cárie dentária. Os resultados deste estudo mostraram uma redução de 50% na experiência de cárie dentária em concentrações de 0,6 mg/L quando comparada com a concentração de 0,2 mg/L, e uma redução de mais de 60% em concentrações de 1,2 mg/L, salientando a possibilidade de controle da cárie por meio da fluoretação controlada e

de níveis adequados da água de abastecimento. Neste estudo foi determinado que o F presente na água em concentrações em torno de 1 mg/L promovia a máxima redução no índice CPOD sem, no entanto, provocar o aparecimento de manchas antiestéticas e que, quando o nível de F na água excedia a 1,5 mg/L, não ocorria queda significativa no índice CPOD, porém havia um aumento na ocorrência e na severidade da fluorose (DEAN, 1950).

No entanto, os primeiros estudos controlados da fluoretação artificial datam de 1945. O “momento da verdade na história da fluoretação das águas”, conforme descrito por Frank McClure (McCLURE 1970), teve início em 25 de janeiro de 1945, quando Grand Rapids, Michigan, Estados Unidos da América, tornou-se a primeira cidade do mundo a ajustar sua concentração de F na água visando à promoção da saúde dentária. Logo depois, a fluoretação foi implantada em outras cidades dos EUA e mais tarde em outros países.

No Brasil, a primeira cidade a adotar a fluoretação artificial da água foi Baixo Guandu, no Espírito Santo, em 1953 (VIEGAS, 1987). No entanto, apenas em 24 de maio de 1974 a lei federal nº 6050 dispôs a respeito da fluoretação da água em sistemas públicos de abastecimento, sendo devidamente regulamentada pelo Decreto federal nº 76.872, de 22 de dezembro de 1975. A Portaria do Ministério da Saúde nº 635, de 26 de dezembro de 1975, aprovou e determinou normas e padrões a serem seguidos para a correta fluoretação das águas dos sistemas de abastecimento, desde a concentração de íon F a ser utilizada de acordo com a média das temperaturas máximas anuais de cada região até os compostos fluoretados recomendados. Ainda constituem a legislação pertinente, as portarias do Ministério da Saúde nº 3.313, de janeiro de 1998, e nº 1.469, de dezembro de 2000, que estabelecem os procedimentos e as responsabilidades relativas ao controle e à vigilância da qualidade da água para o consumo humano.

Viegas, em 1987, ressalta que a fluoretação das águas de abastecimento público é um método adequado, eficiente, seguro, prático e perene. Sendo uma medida ideal de saúde pública para a prevenção da cárie dentária em países onde existam serviços de abastecimento de água. Muitos trabalhos têm sido realizados relacionando a água fluoretada com a ocorrência da fluorose dentária. Em 1995, Carmo et al. realizaram um estudo que relacionou a prevalência de fluorose dentária em áreas com diferentes concentrações de F na água de consumo. Crianças de 610 escolas na idade de 10-14 anos foram avaliadas para o índice de Dean e T-F para a

fluorose dentária de três cidades brasileiras, Piracicaba, Itacemópolis, Pereiras (0,7; 0,2 e 6,4 mg/L F, respectivamente). Foram encontradas prevalências de 2,0%, 20,4% e 58,8%, utilizando-se o índice T-F, e de 4,5%, 20,8% e 58,8%, com o índice de Dean, nas cidades de Itacemópolis, Piracicaba e Pereiras, respectivamente.

Por outro lado, Maltz e Farias (1998) também avaliaram a prevalência de fluorose dentária em escolares de cidades brasileiras com e sem água de consumo artificialmente fluoretada, no ano de 1987, isto é, anteriormente ao uso disseminado de dentifrício fluoretado. Nas cidades sem água de abastecimento fluoretada a prevalência de fluorose dentária foi praticamente inexistente. Nas duas cidades com água de consumo fluoretada, a prevalência e a severidade da fluorose foram bastante baixas, sugerindo que somente o consumo de água artificialmente fluoretada, nas concentrações utilizadas (0,45-0,96 mg/L F e 0,32-0,72 mg/L F), não causa alta prevalência de fluorose dentária.

Numa revisão sistemática acerca da fluoretação da água, McDonagh et al. (2000), após análise de 214 estudos, observaram que a fluoretação da água estava associada com um aumento na proporção de crianças livres de cáries e uma redução no número de dentes afetados por cárie. Os autores encontraram ainda um aumento dose-dependente na fluorose dentária, sendo que com um nível de F de 1 mg/L, estimou-se que 12,5% das pessoas expostas teriam fluorose dentária considerada preocupante do ponto de vista estético. Não foram encontradas evidências claras de outros possíveis efeitos colaterais. Os autores reforçaram a idéia de que qualquer decisão acerca da fluoretação das águas deve considerar não apenas a relação risco (fluorose dentária) – benefício (redução da cárie dentária), mas também aspectos éticos, ambientais, ecológicos, financeiros e legais.

Em Toronto, Canadá, no outono de 1999 a concentração de F na água de abastecimento foi reduzida em 2 estágios (de 1,2 mg/L para 1,0 mg/L e então para 0,8 mg/L). Num levantamento realizado durante o ano escolar de 1999-2000, encontrou-se uma prevalência de fluorose moderada (TSIF $\geq$ 2) em 14% das crianças de 7 anos de idade e de 12,3% em crianças de 13 anos. Os autores acreditam que esta prevalência deva cair conforme a redução na concentração de F na água de abastecimento começar a fazer efeito (LEAKE et al., 2002).

Em Bauru-SP, Buzalaf et al. (2002) monitoraram a qualidade da fluoretação da água de abastecimento público em diversos pontos de distribuição. O conteúdo

de F variou de 0,01 a 9,35 mg/L. Diante dos resultados os autores recomendaram uma maior vigilância e monitoramento da água.

Em anos recentes, tem havido um aumento no consumo de água mineral no Brasil, bem como em outros países. O conteúdo de F presente em 104 marcas de águas minerais comercialmente disponíveis no Brasil foi analisado por Villena, Borges e Cury (1996). Os valores encontrados variaram de 0 a 4,4 mg/L, mas a grande maioria teve conteúdo de F abaixo de 0,1 mg/L.

Em 2001, Bastos et al. avaliaram a concentração de F existente nas fontes naturais e nas águas minerais das cidades de Águas de Lindóia, Lindóia e Serra Negra, região chamada de "Circuito das Águas". Todas as amostras apresentavam concentrações de F abaixo dos limites considerados preventivos de cárie, variando de 0 a 0,46 mg/L. Os autores ressaltaram a necessidade de divulgação destes dados para que a população e os profissionais de saúde fossem alertados para tal fato, uma vez que tem ocorrido o aumento do consumo das águas minerais, vendidas em todo o território nacional. Além disso, a população da região consome a água proveniente das fontes naturais, não sendo beneficiada pelo F presente na água de abastecimento público.

Grec et al. (2003), verificaram a porcentagem da população da cidade de Bauru que consumia água mineral, as marcas consumidas e sua concentração de F especificada no rótulo e a verificada na análise. De 1000 residências visitadas, em 312 (31,2%) consumia-se água mineral e em 688 (68,8%) não. Sendo assim, 29,72% da população da cidade faziam uso de água mineral e 70,28% não. Em algumas marcas de água mineral, a concentração de F especificada nos rótulos não foi à mesma encontrada nas análises de F. Segundo os autores os resultados deste estudo reforçam a importância e a necessidade de um controle bastante rigoroso, por parte da vigilância sanitária, na concentração de F nestas águas.

Em um estudo feito com crianças brasileiras de 2-3 anos, onde se avaliou a ingestão de fluoreto a partir dos diferentes constituintes da dieta (sólidos, água e leite e outros líquidos) e do dentífrico, este foi responsável por 81% da ingestão diária de fluoreto, enquanto que a dieta contribuiu apenas com 19%. Dentre os diferentes constituintes da dieta, a maior contribuição para a ingestão de fluoreto veio da água e do leite, que foram responsáveis por cerca de 60% da ingestão de fluoreto da dieta, quando comparada aos outros constituintes (ALMEIDA et al., 2006). No entanto, como a contribuição da dieta para a ingestão total de fluoreto é

pequena, a água fluoretada provavelmente tem seu maior impacto na prevalência de fluorose indiretamente, através de seu uso no preparo de fórmulas infantis e outros alimentos e bebidas infantis (BURT, 1992). Buzalaf et al. (2001) realizaram um estudo que avaliou o conteúdo de F em 10 amostras de fórmulas infantis disponíveis no mercado. As amostras foram preparadas com água deionizada, água mineral (0,02 a 0,69 mg/L) e água fluoretada (0,9 mg/L). Quando as fórmulas foram reconstituídas com água deionizada, somente a amostra da fórmula à base de soja apresentou uma concentração de F mais elevada (0,75 mg/L). Segundo os autores este achado é coerente com a literatura em relação a produtos à base de soja. Ao utilizarem a água mineral como diluente da fórmula, apenas uma marca comercial de água mineral (Ibirá) apresentou alto teor de F. Porém, a água de abastecimento, o diluente mais utilizado no Brasil, especialmente pela população mais carente, tornou-se uma questão preocupante. Todas as marcas de fórmulas, quando reconstituídas com água fluoretada, excederam a ingestão diária ótima de F recomendada e quase todas poderiam fornecer uma ingestão diária de F acima dos limiares sugeridos para a fluorose em crianças jovens.

Um grupo do Conselho de Pesquisa Médica (MEDICAL RESEARCH COUNCIL, 2002) estabelecido para determinar os pontos necessários para um melhor entendimento sobre F e a saúde, identificou a carência de estudos sobre a biodisponibilidade de F em água natural comparada com a artificial, assim como entre água com muito e pouco carbonato de cálcio. Sugeriu-se que a absorção de F pelo organismo poderia ser influenciada pelo tipo de composto de F e dos níveis de carbonato de cálcio presentes na água.

Em 2005, Maguire et al. compararam a biodisponibilidade de F em água natural e artificialmente fluoretada, bem como em água com muito (dura) ou pouco (mole) carbonato de cálcio, utilizando um modelo experimental humano. Os autores mensuraram as concentrações de F no plasma após a ingestão de água: naturalmente fluoretada mole, naturalmente fluoretada dura, artificialmente fluoretada mole, artificialmente fluoretada dura e de referência, não encontrando diferenças estatisticamente significativas entre os tipos.

Pinto et al. (2005) determinaram a biodisponibilidade relativa de F após sua ingestão pela água natural [$\text{CaF}_2/\text{Ca}^{2+}$ (ppm): A) 0,67/20; B) 5,45/18,5] ou artificialmente fluoretada [$\text{NaF}/\text{Ca}^{2+}$ (ppm): C) 0,67/0; D) 5,45/0 e $\text{H}_2\text{SiF}_6/\text{Ca}^{2+}$ (ppm): E) 1,1/19,8; F) 8/18,15]. Cada voluntário ingeriu 500 mL das diferentes águas, o

sangue foi coletado antes e durante 6 h experimentais e a urina nos dias controle e teste. Concluiu-se que a biodisponibilidade relativa de F através da água natural e artificialmente fluoretada foi equivalente e que ela parece não ser influenciada pela concentração de cálcio e forma do F em solução.

2.2 Marcadores biológicos

Para indicar uma alteração que poderia levar a uma doença clínica (GRANDJEAN, 1995) têm-se os marcadores biológicos ou biomarcadores, os quais são indicadores que sinalizam eventos em sistemas biológicos ou amostras (COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1987). O uso de biomarcadores em Epidemiologia não é uma idéia nova (HULKA, 1991), mas foi recentemente que os biomarcadores se tornaram importantes na toxicologia ambiental (CULLEN; REDLICH, 1995). Dependendo dos efeitos biológicos envolvidos, os biomarcadores podem ser úteis no monitoramento do estado de saúde, em determinar a relação dose-resposta, bem como em estimar os riscos (DECAPRIO, 1997).

Campos (2002) utilizou as unhas para detectar exposição crônica à cocaína. Segundo a autora, amostras de urina são mais utilizadas para se detectar exposições recentes, como em casos de “doping” e de análise periódica realizada em funcionários de empresas, onde o intuito é verificar se os atletas ou trabalhadores estão atuando sob efeito de drogas. Mas se for preciso verificar exposição crônica à droga, a análise da urina não é eficiente, pois após 72 horas da exposição, torna-se difícil a detecção da cocaína e seus produtos de biotransformação, e é neste contexto que a análise da unha ganha importância. Entretanto, as unhas servem como alternativas para verificar casos de exposição prolongada, como em investigação forense pós-morte.

Num simpósio realizado pelo *National Institute of Health*, em Bethesda, Maryland, EUA, em 1999, foi estabelecida uma agenda internacional de necessidades de pesquisa envolvendo F. Entre os tópicos, estava a avaliação de possíveis biomarcadores, que fossem de fácil coleta e análise, para a exposição ao F em humanos (CLARKSON, 2000). As vantagens e limitações do plasma, saliva dos ductos e urina como biomarcadores para exposições recentes e do osso e dentina como biomarcadores 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.

O Comitê de marcadores biológicos do Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos, em 1987, classificou os biomarcadores em 3 tipos:

- ✓ Biomarcadores de efeito: pode ser um indicador de um componente endógeno do sistema biológico, uma medida da capacidade funcional do sistema, ou um estado alterado de 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).
- ✓ 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.

2.2.1 Marcadores biológicos de F

Classificação dos biomarcadores de F de acordo com o Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos, em 1987:

- ✓ Biomarcadores de efeito: as fluoroses dentária e esquelética são efeitos colaterais de uma exposição prévia a níveis de F moderados ou altos. Deste modo, as fluoroses dentárias e esqueléticas são biomarcadores apropriados, uma vez que representam sinais de exposição prévia ao F.
- ✓ Biomarcadores de susceptibilidade: vários fatores podem afetar o modo como os indivíduos respondem a uma mesma dose de F. Como biomarcadores de susceptibilidade ao F têm-se desnutrição, metabolismo do cálcio e magnésio, condição renal e genética.
- ✓ Biomarcadores de exposição: Os biomarcadores de exposição podem refletir diferentes períodos de exposição a um evento. Ou seja, os marcadores conhecidos de meia-vida curta ou de curto tempo, indicam uma exposição que ocorreu poucos minutos ou horas atrás, enquanto

outros refletem dias, semanas ou muitos meses atrás. Como biomarcadores de meia vida-curta têm-se o plasma, soro, saliva e urina, que indicam exposições recentes ao F, enquanto que osso, dentes, cabelo e unhas podem refletir a exposição prévia de semanas ou vários meses, ou seja, indicam a exposição crônica ao F.

A Organização Mundial de Saúde classificou os biomarcadores de exposição ao F de acordo com a cronologia de sua marcação:

- ✓ Marcadores históricos: ossos e dentes são ferramentas úteis para o monitoramento da exposição crônica ao F.
- ✓ Marcadores contemporâneos: urina, plasma e saliva, podem refletir a exposição aguda ao F.
- ✓ Marcadores recentes: cabelo e unhas podem refletir exposições crônicas e subcrônicas ao F.

2.2.1.1 Saliva total como biomarcador de F

Após uma ingestão ou aplicação tópica de F, ocorre um aumento significativo nas concentrações do íon na saliva, o qual é diluído e posteriormente deglutido, havendo uma diminuição nas concentrações de F para valores basais dentro de poucas horas (DUCKWORTH; MORGAN; MURRAY, 1987; EKSTRAND; OLIVEBY, 1999). A eliminação de uma substância da saliva em função do tempo é usualmente referida como clearance salivar. (OLIVEBY; EKSTRAND; LAGERLOF, 1987; EKSTRAND; OLIVEBY, 1999).

Uma vez que a principal atividade anti-cárie do F se deve à via tópica, a retenção de F intrabucal após o tratamento tópico representa um fator importante para sua eficácia clínica. Numa mesma dose de F aplicada a um grupo de indivíduos, encontrou-se uma maior concentração de F na saliva em indivíduos com fluxo salivar reduzido do que em indivíduos com fluxo salivar considerado normal (OLIVEBY; EKSTRAND; LAGERLOF, 1987). Além do fluxo, outros fatores influenciam o clearance salivar do F. Vários trabalhos demonstraram que existe uma relação inversa entre os níveis de F salivares e o hábito de enxaguar a boca após a escovação, devido à diluição do F pela ação da água (DUCKWORTH; KNOOP, STEPHEN, 1991; SJOGREN; BIRKHED, 1994; ISSA; TOUMBA, 2004). Em adição, demonstrou-se que a duração do bochecho não influencia a retenção de F na saliva,

no fluido interdentário ou no biofilme interdentário (SJÖGREN; MELIN, 2001 apud ISSA; TOUMBA, 2004). Zero et al. (1992) demonstraram que indivíduos desdentados retêm mais F na saliva após uma aplicação tópica de F do que indivíduos dentados. Os autores encontraram uma correlação forte a moderada entre concentração de F na saliva total e os níveis deste elemento em sítios específicos de tecido mole intrabuciais, ressaltando a importância destes como sítios de retenção de F. O veículo utilizado para aplicação do F é outro fator que influencia o clearance salivar. Bruun et al. (1982) avaliaram as concentrações de F na saliva após o uso de diferentes substâncias fluoretadas, encontrando três curvas distintas de clearance do F na saliva: eliminação rápida, intermediária e lenta. A curva de eliminação rápida foi observada após o uso de dentifrícios, tabletes ou gomas de mascar contendo F, a de liberação intermediária foi observada quando do uso de bochechos, enquanto que a curva de eliminação lenta ocorreu quando da aplicação de um gel ou solução fluoretada. Da mesma forma, demonstrou-se que as concentrações salivares de F retornaram aos níveis basais 2 e 24 h após o uso de um bochecho ou verniz fluoretados, respectivamente (EAKLE et al., 2004).

Com relação à cinética do F na cavidade bucal, a mesma é descrita pelas seguintes frases: sob condições fisiológicas normais, as concentrações salivares de F são usualmente muito baixas e o clearance salivar de F é tido como um processo bifásico (DUCKWORTH; KNOOP; STEPHEN, 1991; DUCKWORTH; MORGAN; GILBERT, 1992) ou trifásico (OLIVEBY; EKSTRAND; LAGERLÖF, 1987). Considerando-se um sistema bifásico, ocorre uma diminuição inicial muito rápida, resultante dos sucessivos episódios de deglutição da saliva, decorrentes do fluxo salivar constante (BLOCH-ZUPAN, 2001). A segunda fase reflete a liberação de F inicialmente armazenado em reservatórios orais (tecidos moles, biofilme e dentes) (WHITFORD; THOMAS; ADAIR, 1999), sendo que níveis basais são alcançados nas próximas 3 a 6 h (DAWES; WEATHERELL, 1990).

Devido às diferenças no clearance salivar, é necessária a avaliação das concentrações de F na saliva por períodos de tempo curtos e longos, de modo a monitorar o destino do F na cavidade bucal. Duckworth e Morgan (1991) avaliaram a biodisponibilidade bucal do F durante 2 h e após 18 h do uso de dentifrícios fluoretados com concentrações entre 1000 e 2500 mg/L. Verificou-se que as concentrações de F na saliva aumentaram imediatamente após a aplicação do dentifrício fluoretado, decrescendo em duas fases distintas (como descrito

previamente) e que as mesmas permaneceram significativamente aumentadas 18 h após o uso do dentifrício, comparando-se com o uso de um dentifrício placebo. Numa área com água não fluoretada, esses achados foram confirmados, através da coleta de saliva e biofilme 12 h após o uso do dentifrício fluoretado, encontrando-se níveis de F significativamente maiores que o uso de um dentifrício placebo (WHITFORD et al., 2005). O mesmo não ocorreu numa área fluoretada, sugerindo que o F presente na água foi o maior responsável pela manutenção dos níveis intrabuciais de F durante a maior parte do dia (WHITFORD et al., 2002).

A saliva total tem sido utilizada como indicadora de biodisponibilidade de F, uma vez que se tem encontrado alta correlação com a concentração de F no plasma. (OLIVEBY et al., 1989). Além disso, a confiabilidade da saliva total para avaliar a absorção de F após ingestão de produtos fluoretados tem sido demonstrada. (CURY et al., 2005; DRUMMOND; CURZON; STRONG, 1990; ZERO et al., 1992; SEPPA; SALMENKIVI; HAUSEN, 1997).

No estudo de Zero et al. (1992), 10 adultos foram submetidos à profilaxia dos dentes e abstiveram-se de higiene oral por dois dias para acúmulo de placa. Após aplicação de dentifrício placebo (DP) e fluoretado (DF, 0,24% NaF), bochecho (BF, 0,05% NaF) e gel (GF, 1,1% NaF), coletou-se saliva total e placa por 24 h, além de saliva do ducto da parótida por 2 h. As concentrações de F na saliva total e na placa seguiram o mesmo padrão: GF>BF>DF>DP. As aplicações de F durante o período noturno resultaram em retenção prolongada de F na saliva total, mas não na placa. O nível de F na saliva da parótida ficou ligeiramente elevado depois da aplicação de F, porém retornou à concentração *baseline* dentro de 2 h. Os autores concluíram que o método de distribuição, a concentração e o período de aplicação de F (noturno vs. diurno) são fatores que influenciam o F retido na boca. Em adição, o F contido na saliva do ducto da parótida, como resultado da ingestão inadvertida de produtos fluoretados, parece não contribuir clinicamente de forma significativa com os níveis intrabuciais de F.

Seppa, Salmenkivi e Hausen (1997) analisaram a concentração de F na saliva total após a utilização de cinco métodos de utilização de F: enxaguatório (0,023% F), dentifrício (1,1% F), pastilha (0,25 mg F), goma de mascar (0,25 mg F) e uma solução de dentifrício com água. Foi coletada saliva não estimulada de catorze adultos em 0, 10, 20, 30, 45 e 60 min após utilização dos produtos. O enxaguatório e o dentifrício fluoretado aumentou significativamente a concentração de F na saliva

comparados à pastilha e à goma de mascar, sendo que com a utilização dos dois últimos produtos os níveis de F na saliva mantiveram-se elevados após 1 h. O bochecho com a solução de dentifrício e água foi mais efetivo do que a escovação com dentifrício, o que levou os autores a sugerir o bochecho com dentifrício e água como alternativa aos adultos que precisam da terapia do F, mas não gostam de escovar os dentes várias vezes ao dia.

Cury et al. (2005) utilizaram a saliva total como indicadora de absorção de F para avaliar a biodisponibilidade deste elemento após ingestão de “slurry” de dentifrício contendo 0, 550 e 1100 mg F/kg em três situações de conteúdo gástrico (jejum, após café-da-manhã e após almoço). Eles encontraram correlações altas entre a ingestão de F pelos dentifrícios e a área sob a curva da concentração de F na saliva, com valores de r em torno de 0.90 para as três condições gástricas. Eles concluíram que o dentifrício convencional usado logo após as refeições parece ser tão seguro em relação à fluorose dentária quanto o dentifrício de baixa concentração de F usado em jejum.

2.2.1.2 Saliva do ducto da parótida como biomarcador de F

Existe uma relação direta entre as concentrações de F na saliva do ducto e do plasma, embora os níveis de F na saliva representem aproximadamente dois terços dos níveis plasmáticos (EKSTRAND, 1977; RØLLA; EKSTRAND, 1996; WHITFORD; THOMAS; ADAIR, 1999). Qualquer aumento ocorrido no plasma pode ser verificado, quase que simultaneamente, na saliva dos ductos (DAWES; WHATHERELL, 1990; WHITFORD, 1996) e esta relação, em contraste com muitos eletrólitos, se mostra independente do fluxo salivar (OLIVEBY et al., 1989). Entretanto, há poucos trabalhos na literatura envolvendo o uso da saliva do ducto da parótida como biomarcador de exposição ao F.

Para indivíduos residentes em regiões com água não fluoretada, as concentrações de F na saliva do ducto são muito baixas, em torno de 0,01 mg/L (OLIVEBY; EKSTRAND; LAGERLÖF, 1987; RØLLA; EKSTRAND, 1996). Numa área fluoretada, esta concentração é pouco menor que 0,02 mg/L (OLIVEBY; TWETMAN; EKSTRAND, 1990). OLIVEBY; TWETMAN; EKSTRAND (1990), demonstraram que podem ocorrer variações nas concentrações de F na saliva durante o dia. Neste estudo, conduzido com crianças residentes em áreas não fluoretada (0,1 mg/L na

água) e fluoretada (1,2 mg/L na água), as concentrações de F na saliva variaram entre 0,5 e 1,8 $\mu\text{mol/L}$ (aproximadamente 0,01 e 0,03 mg/L, respectivamente), durante diferentes horas do dia, para os residentes da comunidade fluoretada. Estas variações não foram encontradas na saliva das crianças residentes na área não fluoretada.

2.2.1.3 Unhas como biomarcadores de F

As unhas são placas curvas queratinizadas, dispostas na superfície dorsal das falanges distais, com função protetora. Elas Apresentam uma parte distal, exposta, o corpo e uma parte proximal oculta, a raiz (matriz). Esta é coberta por um prolongamento ou prega da camada córnea da epiderme. A unha repousa sobre o leito ungueal, que é abundantemente vascularizado e innervado. O crescimento das unhas é contínuo durante a vida, graças a um processo de proliferação e diferenciação de células epiteliais da raiz da unha, que gradualmente se queratinizam para formar a placa córnea, (O'RAHILLY, 1964). As unhas variam no seu aspecto, forma, tamanho e resistência com a idade, não havendo diferença no que diz respeito ao sexo. As unhas da criança são mais finas e menores, e com a idade tornam-se mais grossas.

O número de trabalhos existentes na literatura relacionando-se os níveis de F presente nas unhas como biomarcadores da exposição de F é reduzido. Vários métodos de preparação e análise, bem como várias concentrações de F têm sido descritos na literatura. O uso das unhas como biomarcadores para exposição ao F tem ainda alguns pontos que necessitam ser mais estudados. Não há muitos relatos na literatura, e alguns são contraditórios.

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

Machoy (1989) usou um método de cromatografia gasosa para avaliar se a quantidade variável de F no meio ambiente é refletida na concentração de F nas 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 tinha uma concentração de 0,64 mg/L na água. 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. Através destes resultados o autor concluiu que as influências ambientais alteram o conteúdo de F nas unhas das crianças. Também neste estudo foram analisadas as unhas das mãos e as dos pés de um único indivíduo, para avaliar as concentrações médias ($\pm$ DP) de F, que foram de 3,65 ($\pm$ 1,02) e 3,58 ($\pm$ 0,55) para as unhas das mãos e dos pés, respectivamente.

Em 1990, Schmidt e Leuschke realizaram um estudo com o objetivo de determinar o conteúdo de F nas unhas das mãos de indivíduos com e sem exposição crônica ao F. As causas da exposição foram emissões de indústrias como, por exemplo, fábrica de ácido hidrofúorídrico. O conteúdo de F das unhas dos dois grupos foi extremamente baixo. As médias para os grupos sem e com exposição ao F foram 0,8 e 2,78 mg/L, respectivamente. Neste estudo houve uma larga variação dos resultados que segundo os autores poderia ser explicada pela aderência de partículas de sujeira nas amostras de unhas.

Spate et al. (1994) usaram análise por ativação neutra para determinar as concentrações de F em unhas dos pés obtidas de mulheres residentes em Holden ou Boston, Massachusetts, nos EUA onde a água continha 0,09 e 1,0 mg/L, respectivamente. As concentrações médias (com as variações) foram de 4,2 (2,4-9,7) e 6,4 (2,7-10,1) mg/Kg.

Whitford et al. (1999) analisaram a concentração de F existente nas unhas com o eletrodo através de difusão facilitada por HMDS. Os autores observaram que a área de superfície das unhas (intactas, cortadas em pequenos pedaços ou pulverizadas), imersão em água deionizada por 6 horas, imersão em água fluoretada (1 mg/L) por 2 horas ou 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 do trabalho aumentou a ingestão de F durante 1 mês e observou um incremento significativo na concentração de F das unhas das mãos 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 mg/L de F na água, tendo-se encontrado médias de 1,85,

5,28 e 7,52 mg/Kg, respectivamente, o que indica que, à semelhança das concentrações de F na urina, as concentrações de F nas unhas das mãos são boas indicadoras da ingestão de F.

Buzalaf et al. (2002) investigaram as mudanças na concentração de F no plasma e nas unhas de ratos que receberam diferentes concentrações de F na água de beber. Uma relação direta entre a concentração de F nas unhas e no plasma foi identificada ($r=0,67$, $p<0,001$), indicando que as unhas podem ser utilizadas como indicadores de concentração de F no plasma em ratos submetidos à ingestão crônica de F.

Em 2003, Arsati realizou um estudo com o objetivo de avaliar a unha como um possível indicador biológico de exposição ao F para prever o risco de fluorose dentária. O trabalho foi composto por dois estudos distintos, ambos envolvendo crianças de 20 a 30 meses de idade. No primeiro estudo, a autora verificou a relação entre concentração de F nas unhas e na água de abastecimento de três cidades paulistas: Cordeirópolis, Piracicaba e Assistência, que possuem 0,03, 0,64 e 1,53 $\mu\text{g/g}$ de F na água, respectivamente. Os resultados da concentração de F nas unhas das crianças deste estudo foram 1,65, 2,85 e 4,14 $\mu\text{g/g}$ para Cordeirópolis, Piracicaba e Assistência, respectivamente. Estes resultados sugerem que a unha pode ser um indicador da ingestão de F através da água de abastecimento. O segundo estudo contou com a participação de 23 crianças de Piracicaba, e verificou se a unha poderia ser indicador biológico para diferenciar a somatória da exposição ao F pela dieta e pelo dentífrico fluoretado. Para isto, o estudo foi dividido em duas fases, que duraram cerca de três meses cada. Na primeira (Fase A= dieta-F + dentífrico-F), as crianças estavam expostas normalmente ao F, através da alimentação e da escovação com dentífrico fluoretado. Na segunda (Fase B = dieta-F), as crianças passaram a escovar os dentes com um dentífrico sem F. As concentrações de F ($\pm\text{DP}$) encontradas nas unhas das crianças foram 2,64 ($\pm 0,91$) e 2,80 ($\pm 0,94$) $\mu\text{g/g}$ para as fases A e fase B, respectivamente. Estes resultados indicaram que a concentração de F nas unhas das crianças na faixa etária de risco para a fluorose dentária, expostas à água fluoretada, não parece ser um indicador biológico para diferenciar o efeito somatório da exposição sistêmica ao F do dentífrico.

Levy et al (2004) analisaram [F] em unhas de crianças de 2 a 6 anos de idade em cidade fluoretada (Bauru) e não-fluoretada (Itápolis). As médias das [F] ($\pm$ DP, unidade $\mu\text{g/g}$) obtidas para unhas das mãos foram 3,557 ($\pm$ 1,297) e 2,292 ($\pm$ 1,250) sendo para unhas dos pés 2,815 ($\pm$ 1,288) e 1,580 ($\pm$ 0,589), para Bauru e Itápolis, respectivamente. Comparando-se as duas cidades, tanto para unhas das mãos quanto para dos pés, a [F] nas unhas foi maior para a cidade de fluoretada, sendo que as diferenças foram significantes.

Rodrigues, Bastos e Buzalaf (2004) avaliaram a [F] em unhas de crianças de 2-3 anos de idade, residentes de área fluoretada (Bauru, variação 0,217 a 1,147 ppm). As crianças utilizaram dentifrício placebo (sem F), fluoretado (1570 ppm) e placebo respectivamente, por períodos de 28 dias cada. As unhas foram cortadas a cada 2 semanas, durante o período experimental e por mais 22 semanas. A média de [F] nas 4 primeiras semanas e nas últimas 6 semanas foi 2,709 e 2,698 $\mu\text{g/g}$ para unhas das mãos e dos pés, respectivamente. Os autores relataram que apesar da [F] média nas unhas das mãos ser ligeiramente maior que a dos pés, na maioria dos períodos experimentais esta diferença não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, Rodrigues, Bastos e Buzalaf mostraram correlação positiva ($r=0,571$) e significativa da [F] presente nas unhas das mãos e dos pés.

Pessan et al. (2005) realizaram um estudo com 20 crianças de 4-6 anos de idade divididas em dois grupos (A e B), que utilizaram o dentifrício da mesma maneira que RODRIGUES, BASTOS e BUZALAF (2004). No entanto, o grupo B também recebeu aplicação tópica de verniz (2,26% F), enquanto utilizava o dentifrício fluoretado. Os autores não encontraram uma variação significativa na concentração de F nas unhas.

McDonnell e O'Mullane (2001) averiguaram a velocidade de crescimento e o comprimento em que as unhas poderiam ser cortadas para a análise do conteúdo de F, em crianças de 2 a 3 anos de idade. As médias (variação) obtidas foram 0,7 mm/semana (0,5-0,9 mm) e 7,5 mm (6,4-9,2 mm) para velocidade de crescimento e comprimento, respectivamente.

Para determinar o tempo necessário para detecção do F em unhas de humanos, Buzalaf, Pessan e Alves (2006), realizaram um estudo que avaliou o crescimento e o comprimento de todas as unhas das mãos e dos pés de voluntários de 20-35 anos de idade, que ingeriram 1,8 mg de F diariamente, durante 30 dias.

Amostras de unhas foram coletadas no início do estudo e a cada duas semanas, totalizando 15 coletas. O crescimento foi maior nas unhas das mãos que dos pés. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as unhas do lado direito e esquerdo, tanto das mãos como dos pés. O crescimento foi significativamente maior para o polegar dos pés do que para as outras unhas dos pés, o que não ocorreu para as unhas das mãos. O tempo médio para a detecção do F nas unhas das mãos e dos pés foi de 103 e 123 dias, respectivamente. Para unhas das mãos, o aumento na concentração de F ocorreu 84 dias depois de iniciado o estudo, no entanto este aumento não foi estatisticamente significativo em relação ao baseline. Por outro lado, para as unhas dos pés, houve uma diferença estatisticamente significativa em relação ao baseline, e o F foi detectado depois de 112 e 140 após o aumento da ingestão. Em vista dos resultados, os autores concluíram que as unhas dos polegares dos pés parecem ser biomarcadores de ingestão de F mais adequados.

No entanto, quanto se pretende utilizar as unhas como biomarcadores de exposição ao F para estimar o risco de fluorose dentária, a sensibilidade deste biomarcador deve ser considerada. Sampaio et al. (2003), numa tentativa de validar a concentração de F nas unhas das mãos como um biomarcador de exposição ao F, examinaram a severidade da fluorose dentária em crianças residentes em diferentes regiões do Estado da Paraíba, onde os níveis de F natural existentes na água de beber (poços particulares) eram 0,1, 1,6 e 2,3 mg/L. Estas crianças tinham sido previamente examinadas com relação à concentração de F nas unhas das mãos (Whitford et al., 1999). A concentração média de F nas unhas das mãos das crianças que apresentaram TF 0 foi significativamente menor que a concentração média das crianças que apresentaram TF 5. No entanto, esta diferença significativa não foi observada para crianças com TF 1, 2, 3 e 4.

Segundo Whitford (2005) o uso das unhas para o monitoramento de exposição ao F apresenta desvantagens e vantagens que são:

Desvantagens

- (1) Ao contrário da urina que pode ser analisada pelo método direto, a unha necessita que o F seja extraído através de um método que aumenta o tempo e os custos;
- (2) Algumas unhas não são, ou não podem ser adequadas para análise. Como por exemplo, unhas com esmalte não podem ser analisadas, pois o esmalte soma-se ao peso da unha, o qual seria

mais baixo para o cálculo da concentração. Além disso, alguns esmaltes podem conter F, sendo necessários mais estudos para se determinar se o esmalte pode ser removido, sem alterar a concentração de F nas unhas;

- (3) Os possíveis efeitos de variáveis na incorporação do F, que incluem doenças nas unhas, o grau de velocidade de crescimento das unhas, idade e sexo do doador.

Vantagens

- (1) As unhas podem ser obtidas facilmente, através de um método não invasivo e sem objeção de virtualmente todos os doadores;
- (2) A concentração de F nas unhas reflete os níveis médios de ingestão e concentração de F no plasma por um período prolongado, geralmente 1-2 semanas, dependendo da frequência de corte das unhas. Já as análises de urina, plasma e saliva do ducto refletem mais a ingestão de F bastante recente, estando sujeitas a variações em função da ingestão de F e variáveis fisiológicas;
- (3) Ao contrário das concentrações de F na urina, as concentrações de F nas unhas não são afetadas por variáveis como ingestão de F recente nas últimas horas, diferenças na filtração glomerular, pH urinário ou fluxo urinário.

3 *Proposição*

3 Proposição

Os objetivos do presente trabalho foram:

- (1) Comparar as concentrações de F em: saliva total, saliva do ducto da parótida, unhas das mãos e unhas dos pés, além da velocidade de crescimento das unhas, em indivíduos de diferentes faixas etárias e expostos a diferentes níveis de F na água de consumo;
- (2) Verificar a influência da idade, gênero, concentração de F na água e velocidade de crescimento das unhas sobre as concentrações de F nas mesmas;
- (3) Avaliar a possibilidade de contaminação exógena das unhas pelo F.

4 *Material e Métodos*

4 Material e Métodos

4.1 Aspectos éticos

O presente estudo foi realizado após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP (Apêndice 1). Houve um primeiro encontro com os participantes e seus responsáveis, quando os mesmos foram devidamente esclarecidos quanto aos objetivos e à metodologia empregada no estudo, bem como orientados sobre a necessidade de se seguir corretamente o protocolo. Ficou claro que a qualquer momento os voluntários poderiam desistir de participar do experimento e que os dados obtidos seriam confidenciais. Todas estas informações constavam na Carta de Informação ao Paciente e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 2), que foram assinados em duas vias, sendo uma destinada aos pais ou responsáveis pela criança e outra ao pesquisador.

4.2 Locais Amostrados

Cinco cidades distintas (Tabela 1) de dois Estados do Brasil (São Paulo e Paraíba, Figura 1) foram inclusas neste estudo. No Estado de São Paulo, participaram indivíduos residentes de Pirajuí, cidade cuja água de abastecimento não era fluoretada, e de Bauru, com água de abastecimento fluoretada artificialmente (0,7 mg/L, Figura 2). Já no Estado da Paraíba, participaram voluntários de três comunidades do sertão, sendo Cajazeirinhas (no município de Catolé do Rocha), município de Brejo dos Santos e Brejo das Freiras (no município de São João do Rio do Peixe), todas com água naturalmente fluoretada (0,2, 0,7 e 1,7 mg/L, respectivamente, Figura 3). As comunidades paulistas estão sob o clima Tropical de Altitude enquanto as paraibanas seguem o mesmo padrão climático de semi-árido quente e seco. (Ministério de Minas e Energia, 2005)

Tabela 1 - Aspectos fisiográficos e sócio-econômicos dos cinco municípios incluídos no estudo, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2001) e do Ministério de Minas e Energia (2005)

	PIRAJUÍ	BAURU	CATOLÉ DO ROCHA	BREJO DOS SANTOS	SÃO JOÃO DO RIO DO PEIXE
ALTITUDE MEDIA (m)	480	530	272	330	287
TEMPERATURA (°C)	22,7	22,6	26-27	26-27	23-30
ÁREA (km ²)	819	673	552	94	474
POP. ESTIMADA 2006 (HABITANTES)	20.745	344.258	27.691	5.802	17.784
RENDIMENTO MÉDIO MENSAL EM 2001 (REAIS)	466,49	917,70	245,47	191,55	231,29

Figura 1 - Mapa do Brasil e Estados participantes em destaque: Paraíba na região nordeste e São Paulo na região sudeste

Figura 2 - Localização das cidades do Estado de São Paulo que participaram do estudo e a capital São Paulo

Figura 3 - Localização das cidades do Estado da Paraíba que participaram do estudo e a capital João Pessoa

4.3 Seleção dos voluntários

Participaram deste estudo 300 indivíduos, distribuídos conforme a Tabela 2, pertencentes a quatro faixas etárias, a saber:

- a) 3-7 anos
- b) 14-20 anos
- c) 30-40 anos
- d) 50-60 anos

Os voluntários eram residentes permanentes das comunidades. Um critério de inclusão fundamental foi a ingestão de água de abastecimento público da cidade ou, no caso das comunidades rurais, água de poços ou cisternas.

Tabela 2 - Distribuição de 300 indivíduos que compuseram a amostra estatística, considerando as diferentes faixas etárias e comunidades

COMUNIDADES	FAIXAS ETÁRIAS (ANOS)			
	3-7	14-20	30-40	50-60
PIRAJUÍ	15	15	15	15
BAURU	15	15	15	15
CAJAZEIRINHAS	15	15	15	15
BREJO DOS SANTOS	15	15	15	15
BREJO DAS FREIRAS	15	15	15	15

4.4 Obtenção de amostras dos voluntários

As amostras foram obtidas por meio de visitas domiciliares conforme descritas a seguir.

4.4.1 Coleta de amostras de água de consumo

A fim de se checar a concentração de F presente na água de abastecimento da residência dos voluntários, já que flutuações nos teores de F na água poderiam ocorrer em Bauru (BUZALAF et al., 2002), foram coletadas 3 amostras de água da residência de cada voluntário de Bauru em 3 semanas distintas, e 2 amostras de água para as demais localidades. As amostras foram coletadas em frascos plásticos e armazenadas a -20 °C até a análise de F.

4.4.2 Coleta de saliva total

Foram obtidas duas amostras de saliva total por voluntário, em dias diferentes com intervalo de uma semana. No dia de coleta salivar, os voluntários escovaram os dentes pela manhã de modo habitual e não mais escovaram os dentes até o horário marcado para coleta da saliva. A alimentação foi mantida de modo usual. A coleta de saliva total foi padronizada para ser feita entre as 14 e 17 horas. Antes da coleta, foi realizada a escovação com dentifrício não fluoretado durante 3 minutos, com escova dental nova e bochecho com água deionizada. Em seguida coletou-se a saliva total não estimulada, por 3 minutos, em recipiente plástico pré-pesado. Durante a coleta, os voluntários permaneceram sentados e em silêncio. As amostras foram armazenadas a -20°C até a análise de F.

4.4.3 Coleta de saliva do ducto da parótida

O orifício do ducto da parótida do lado direito foi localizado e a mucosa circunjacente foi seca com gaze. A glândula Parótida direita foi escolhida em função da posição dos canalículos do coletor de saliva, a fim de propiciar o escoamento da saliva pela gravidade. Uma taça de Lashley foi colocada na mucosa bucal que circunda o ducto parotídeo. Nos dois ductos da taça foi acoplada uma sonda traqueal nº 6 (Embramed, São Paulo). À sonda ligada à saída da câmara externa do coletor, foi acoplada uma pêra de borracha para eletrocardiógrafo pequena. Uma vez pressionada, esta pêra promoveu a fixação do coletor à bochecha do voluntário, na altura da saída do ducto. Estando o coletor fixado à bochecha, acionou-se o cronômetro e 3 gotas de suco de limão foram depositadas na ponta da língua. A saliva fluíu naturalmente pela saída do orifício interno do coletor, passando pela sonda e sendo então recolhida em tubo plástico (Eppendorf, 2 mL). A Figura 4 ilustra o dispositivo utilizado para a coleta da saliva do ducto da parótida. As primeiras 2 gotas de saliva foram descartadas, a fim de se evitar a contaminação por F remanescente na mucosa bucal. A coleta foi realizada por 3 minutos. Durante este tempo, foram pingadas mais 3 gotas de suco de limão na ponta da língua dos voluntários. Após a coleta, as amostras foram armazenadas a -20°C para posterior análise de F. A coleta de saliva da parótida foi realizada em seguida à coleta de saliva total, e, portanto também em dois dias, com intervalo de uma semana.

Figura 4 - Taça de Lashley com pêra de eletrocardiograma acoplada à saída para o orifício externo

4.4.4 Coleta de unhas

Foram realizadas duas coletas de unhas das mãos e dos pés por voluntário. Na primeira visita domiciliar, os fragmentos foram obtidos de todas as unhas das mãos e dos pés, através de cortador de unhas ou tesouras, sendo armazenados separadamente em frascos identificados. Este procedimento foi feito mais uma vez na segunda visita, com intervalo de 1 semana. Os voluntários foram orientados a não utilizar esmalte de unhas e a não cortá-las neste período.

4.4.4.1 Avaliação da concentração de F nas unhas dos diferentes dedos das mãos

Houve a participação de cinco voluntários do sexo masculino, a fim de se evitar o contato com esmalte de unhas. Foram coletadas as unhas das mãos em dois dias, com intervalo de 1 semana. Em cada coleta, as amostras de unhas foram armazenadas separadamente, em relação aos diferentes dedos e mãos (mínimo direito, mínimo esquerdo, anular direito, anular esquerdo, médio direito, médio esquerdo, indicador direito, indicador esquerdo, polegar direito e polegar esquerdo), em frascos devidamente identificados, resultando em 10 amostras por indivíduo, por coleta. A análise de F foi realizada conforme descrito adiante, com a diferença de que foi preciso juntar as amostras das primeiras e segundas coletas, a fim de se obter o peso mínimo para análise de F, mantendo a separação por diferentes dedos/mão/ voluntário.

4.4.4.2 Avaliação da contaminação exógena das unhas

Experimento 1. Avaliar a concentração de F nas unhas após imersão das mesmas em soluções fluoretadas.

Amostras de unhas de 10 voluntários foram limpas conforme descrição abaixo, secas, divididas em três porções e o peso de cada porção foi mensurado. Uma porção foi imersa em 1 mL de “slurry” de 5 g de dentifrício Crest (Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, EUA) em 15 mL de água deionizada, por 3 minutos. A segunda porção foi imersa em solução de 1 mL de 100 ppm de F por 2 horas e a terceira porção serviu como controle, ou seja, não foi submetida a qualquer solução fluoretada. Durante o tempo de imersão, os frascos contendo as unhas permaneceram sob agitação, em mesa agitadora orbital plana (Nova Técnica, modelo NT 145). Concluído o tempo de imersão, as unhas foram lavadas brevemente apenas com água deionizada, conforme descrito por Whitford et al. (1999), secas em estufa a 60°C por 2 h. Seguiu-se a análise de F em unhas conforme descrito previamente.

Experimento 2. Avaliar a concentração de F nas unhas após imersão em soluções fluoretadas e limpeza com escovação e ultra-som após a imersão.

Este estudo foi feito conforme a parte 1, porém com a diferença de que após a imersão, as amostras de unhas foram limpas com escova interdental e água deionizada, seguido de sonificação por 10 minutos.

Experimento 3: Avaliar a influência do tempo na impregnação de F nas unhas.

Amostras de 3 voluntários foram utilizadas. As amostras referentes a 2 voluntários foram divididas em 3 porções. Duas porções foram imersas em 1 mL cada de “slurry” de 1 g dentifrício Crest para 3 mL de água deionizada, com a diferença de que uma porção ficou imersa por 30 minutos e a outra por 60 minutos. A Terceira porção serviu como controle, não sendo submetida a imersão. A amostra de um voluntário foi dividida em 6 porções, sendo uma para controle e as outras seis submetidas à imersão do mesmo “slurry” nos seguintes tempos: 3, 30, 60, 90 e 120 minutos. Após o tempo de imersão, as amostras foram lavadas com escova interdental e água deionizada e sonicadas por 10 minutos.

4.5 Avaliação da velocidade de crescimento das unhas

Junto à cutícula das unhas, foi feita uma marcação com estilete. Após uma semana, foi realizada a mensuração da distância entre marcação e cutícula, utilizando-se um paquímetro digital (WPI, Sarasota, FL, EUA, modelo 501601), com precisão de $\pm 0,01$ mm. As medições foram registradas individualmente nos dedos das mãos e dos pés, havendo, portanto, 20 resultados para cada voluntário. As distâncias mensuradas foram divididas pelo número de dias entre a realização da marcação e a medição, resultando na velocidade de crescimento das unhas, em mm/dia. A determinação do crescimento de unha foi feita uma única vez.

4.6 Análise de flúor

4.6.1 Água

A concentração de F presente nas amostras de água foi determinada em duplicata, usando-se o eletrodo íon-específico combinado (Orion Research, Cambridge, Mass, EUA, modelo 9609) após serem tamponadas com um volume idêntico de TISAB II (tampão de ajuste da força iônica total), contendo CDTA 0,4%, pH 5,0.

Validação da análise:

As soluções-padrão empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 100 mg/L F (Orion). Foram feitas curvas de calibração com 1 mL de soluções-padrão contendo entre 0,1 e 6,4 mgF/L.

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 $r \geq 0,99$ (linearidade) foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

4.6.2 Saliva total

As amostras de saliva total foram descongeladas até atingirem a temperatura ambiente. A análise foi realizada pelo método de difusão facilitada por HMDS, Taves

(1968) modificado por Whitford (1996). Entretanto, por se tratar de um fluido biológico contendo, portanto, CO_2 , foi feita uma pré-difusão para se eliminar CO_2 . Para tanto, 2 mL da amostra de saliva foi colocada numa placa de Petri (Falcon 1007) e sobre ela foi colocado ácido sulfúrico saturado em HDMS num volume que correspondesse a 20% do volume da amostra de saliva. Este ácido sulfúrico (chamado de ácido aquecido) foi previamente aquecido até que o seu volume fosse reduzido pela metade, a fim de eliminar qualquer F residual que pudesse contaminar a amostra. Após a adição do ácido aquecido, as placas foram deixadas abertas por 15 min para a saída do CO_2 , foram adicionados 2 mL de água deionizada. Na tampa destas placas, foram colocados 50 μL de NaOH 0,05 M, distribuídos em 5 gotas. 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). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. 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 foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 μL de ácido acético 0,2 M. O volume total foi então ajustado para 75 μL com água deionizada usando uma pipeta. Este ajuste do volume total é importante porque volumes variáveis de NaOH são perdidos durante o processo de difusão que ocorre durante a noite. 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. Outra vantagem deste método é que a solução a ser analisada nunca deixa a tampa da placa de difusão.

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 mg/L, 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 . As soluções-padrão empregadas na

realização da curva de calibração, contendo entre 0,005 e 0,95 μg F 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 saliva analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a analisar, a segunda quando a metade das amostras já tinha sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras. A curva de calibração foi realizada com os mesmos cuidados descritos para a validação da análise de F na água. 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 dos padrões que sofreram difusão. Assim, a comparação das leituras de mV mostrou que o F nos padrões difundidos foi completamente captado e analisado.

4.6.3 Saliva do ducto da parótida

As amostras de saliva do ducto da parótida foram submetidas à microanálise de F utilizando-se o eletrodo invertido (VOGEL, 1990), conforme ilustrado nas Figuras 5-8. Esta técnica é apropriada para amostras de pequenos volumes (até nanolitros).

Figura 5 - Microanálise de F pela técnica do eletrodo invertido

Para este tipo de análise, empregou-se o eletrodo F sensível (Orion 9409) adaptado, ou seja, fez-se um orifício na porção superior do eletrodo, de forma a permitir a remoção de quaisquer bolhas na solução interna do eletrodo, para que, quando o mesmo fosse invertido, houvesse solução interna em contato com a membrana do eletrodo. O volume da solução interna do eletrodo foi completado com uma mistura 1:1 de NaF 10 mg/L e KCl 1 M. Após o preparo inicial do eletrodo, o mesmo foi invertido ficando suspenso dentro de uma matriz de Teflon, imerso em óleo mineral (Lubrax Industrial, referência OB 440, densidade 29 centistokes a 40°C). A finalidade deste óleo é evitar a evaporação da amostra, já que o volume da mesma é bastante reduzido. Procedeu-se então ao preenchimento do eletrodo de referência (WPI, Sarasota, FL, EUA, vidro capilar 1,5 mm de diâmetro externo, 1,02 mm de diâmetro interno, nº TST150-6) já preparado por um “puller” (WPI, Sarasota, FL, EUA, preparador de micropipetas, modelo PUL-100). Este eletrodo de referência foi preenchido com uma solução de KCl 1M, cuidadosamente, para evitar a formação de bolhas. Este preenchimento foi feito com uma agulha não-metálica para preenchimento de micropipetas (WPI, Sarasota, FL, EUA, MF34G-5). Após o preenchimento da micropipeta, a mesma foi inserida no suporte apropriado (WPI, Sarasota, FL, EUA, MEH3SF), também preenchido com a mesma solução de KCl 1M. O conjunto foi então conectado ao potenciômetro (Orion EA 940). 0,1 µL de TISAB III (Thermo Electron Corporation, Beverly, MA, EUA, Orion 940911) foi colocado sobre o eletrodo invertido com uma pipeta. Sobre o TISAB foi adicionado 1 µL de amostra e/ou solução-padrão. As amostras com o TISAB ficaram imersas em óleo mineral. Então, com o auxílio de um estereomicroscópio (WPI, Sarasota, FL, EUA, PZMIII microscope) e de um micromanipulador (WPI, Sarasota, FL, EUA, modelo Kite-R) acoplados ao sistema, o microeletrodo foi colocado em contato com a amostra, permitindo a leitura da concentração de F presente.

Validação da análise:

As soluções-padrão empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 100 mg/L F (Orion). Foram feitas curvas de calibração com 1 µL de soluções-padrão contendo entre 0,005 e 1,6 mg F/L. As amostras foram analisadas em duplicata.

Figura 6 - Equipamentos utilizados para análise de F pela técnica do eletrodo invertido

Figura 7 - Superfície do eletrodo invertido, vista através do microscópio, com gotas de TISAB III

Figura 8 - Adição de 1 μL de amostra a cada gota de TISAB

4.6.4 Unha

Os fragmentos das unhas das mãos e dos pés de cada voluntário foram analisados isoladamente. Quando o peso das amostras foi superior a 20 mg, as análises foram feitas em duplicata e obteve-se a média das leituras. Os fragmentos foram limpos com água deionizada, usando-se uma escova interdentária, 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 por 10 minutos, secos a 60°C e pesados em balança ($\pm 0,01$ mg; AND, Tóquio, Japão)

Para análise, os fragmentos de unha foram colocados em placas de Petri plásticas (modelo Falcon, n° 1007), juntamente com 2 mL de água. Na tampa destas placas, foram colocados 50 μ L de NaOH 0,05 M, distribuídos em 5 gotas. 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). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme. 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 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 então ajustado para 75 μ L com água deionizada usando uma pipeta. Este ajuste do volume total é importante porque volumes variáveis de NaOH são perdidos durante o processo de difusão que ocorre durante a noite. 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. As Figuras 9 a 12 representam a análise de F nas unhas através deste método.

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 mg/L, 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 , o que é suficiente para amostras de unha pesando mais que 5 mg.

As soluções-padrão empregadas na realização da curva de calibração, contendo entre 0,005 e 0,95 μg F, 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 analisar 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. A curva de calibração foi realizada com os mesmos cuidados descritos para a validação da análise de F na água

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 dos padrões que sofreram difusão. Assim, a comparação das leituras de mV mostrou que o F nos padrões difundidos foi completamente captado e analisado.

Figura 9 - Placa de Petri vaselinada. Adição das amostras de unhas com 2 mL de água deionizada

Figura 10 - Adição de 50 μL de NaOH 0,05 M na tampa da placa de Petri

Figura 11 - Fechamento das placas e adição de 2 mL HMDS

Figura 12 - A leitura foi feita com eletrodo Orion 9409 e um micro eletrodo calomelano de referência

4.7 Análise estatística

Para a análise estatística foram empregados os softwares Statistica (StatSoft Inc., Tulsa, OK, EUA), InStat (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA) e SigmaStat (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Para comparação entre a concentração de F presente na água coletada em diferentes datas em cada comunidade foi utilizada ANOVA de medidas repetidas para Bauru e teste *t* pareado para as demais comunidades. A comparação entre a concentração de F presente na água coletada na casa dos voluntários das diferentes comunidades foi analisada por ANOVA e teste de Tukey para comparações individuais.

Para a análise da concentração de F na saliva total e saliva do ducto foram realizadas ANOVA a dois critérios (comunidade e faixa etária) e teste de Tukey para comparações individuais. Para comparação entre a concentração de F presente nas salivas coletadas nas duas datas em cada comunidade foi utilizado o teste *t* pareado.

A concentração de F nas unhas foi analisada por ANOVA a três critérios (comunidade, faixa etária, mão x pé). Nas avaliações de F nas unhas dos diferentes dedos e da contaminação exógena das unhas, utilizou-se ANOVA a um critério. O teste de Tukey foi realizado para comparações individuais.

Para a análise da velocidade de crescimento das unhas, foi considerada a média dos lados direito e esquerdo, para cada dedo. Os dados foram submetidos à ANOVA a três critérios (faixa etária, mão x pé e dedo) e teste de Tukey.

Aplicou-se o teste de regressão linear multivariado a fim de verificar a influência das variáveis: idade, gênero e F na água sobre a concentração de F na saliva total e saliva do ducto da parótida. Quando se utilizou como variável dependente a concentração de F nas unhas das mãos ou dos pés, testou-se os critérios idade, gênero, F na água e velocidade de crescimento das unhas.

Também foi avaliada a presença de correlações entre as concentrações de F presentes na água, na saliva total, na saliva do ducto da parótida, nas unhas das mãos, nas unhas dos pés, na velocidade de crescimento das unhas das mãos e dos pés. Foi empregado o coeficiente de correlação de Pearson.

Um nível de significância de 5% foi estabelecido como indicador de diferenças estatísticas, em todos os testes empregados.

5 *Resultados*

5 Resultados

5.1 Concentração de F nas amostras de água de consumo

Não foram encontradas diferenças significativas entre a concentração de F presente na água coletada nas residências dos voluntários de Bauru, em 3 diferentes datas ($F=0,294$, $p=0,746$), bem como não houve diferenças significativas entre as 2 diferentes datas de Pirajuí e Cajazeirinhas ($F=0,256$, $p=0,615$ e $F=2,977$, $p=0,090$; respectivamente). Já nas comunidades de Brejo dos Santos e Brejo das Freiras houve diferenças estatisticamente significativas entre as duas coletas em diferentes datas ($F=6,797$, $p=0,012$ e $F=9,789$, $p=0,003$, respectivamente), mas o pareamento entre as mesmas foi bastante efetivo ($r=0,714$, $p<0,0001$ e $r=0,964$, $p<0,0001$, respectivamente). Em vista destes achados, optou-se por comparar as médias das concentrações de F na água das diferentes comunidades.

As médias ($\pm DP$) da concentração de F presente na água estão representadas na Figura 13. A ANOVA detectou diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes comunidades ($F=302,730$, $p<0,0001$). Brejo das Freiras apresentou concentração de F na água significativamente maior que as demais comunidades. Bauru e Brejo dos Santos não diferiram significativamente entre si, porém apresentaram valores significativamente maiores quando comparados com Pirajuí e Cajazeirinhas, que por sua vez não diferiram entre si.

Figura 13 - Concentração média de F ($\pm DP$, mg/L) na água de consumo das cinco comunidades ($n=60$). Letras distintas sobre as colunas indicam diferenças significativas ($p<0,05$)

5.2 Concentração de F na saliva total

A Tabela 3 e Figura 14 mostram a concentração média de F ($\pm$ DP) na saliva total dos voluntários das cinco comunidades e diferentes faixas etárias. Foi encontrada uma diferença significativa entre as comunidades ($F=71,875$, $p<0,0001$), porém não entre as faixas etárias ($F=0,753$, $p=0,521$). Houve interação significativa entre os critérios ($F=2,388$, $p=0,006$). A menor concentração média ($\pm$ DP, mg/L) de F foi encontrada na saliva total dos voluntários de Pirajuí de 3-7 anos ($0,014\pm0,007$), que não diferiu de forma significativa das outras faixas etárias da mesma comunidade, nem mesmo de todos os grupos etários de Cajazeirinhas e Bauru. A maior concentração média de F na saliva total foi encontrada nos voluntários de Brejo dos Santos de 14-20 anos ($0,297\pm0,222$), que embora não tenha apresentado diferença significativa entre as outras faixas etárias da mesma comunidade e entre Brejo das Feiras, 14-20 anos, mostrou-se elevada em relação às comunidades restantes ($p<0,05$).

Tabela 3 - Concentração média de F na saliva total ($\pm$ DP, mg/L) nas cinco comunidades e diferentes faixas etárias

COMUNIDADES	FAIXAS ETÁRIAS (ANOS)			
	3-7	14-20	30-40	50-60
PIRAJUÍ	0,014 $\pm$ 0,007 ^a	0,014 $\pm$ 0,005 ^a	0,018 $\pm$ 0,008 ^a	0,016 $\pm$ 0,006 ^a
CAJAZEIRINHAS	0,052 $\pm$ 0,030 ^{abc}	0,031 $\pm$ 0,014 ^{ab}	0,090 $\pm$ 0,021 ^{abc}	0,067 $\pm$ 0,038 ^{abc}
BAURU	0,073 $\pm$ 0,039 ^{abc}	0,029 $\pm$ 0,020 ^{ab}	0,037 $\pm$ 0,017 ^{ab}	0,036 $\pm$ 0,011 ^{ab}
BREJO DOS SANTOS	0,230 $\pm$ 0,122 ^{ef}	0,297 $\pm$ 0,222 ^f	0,200 $\pm$ 0,086 ^{def}	0,231 $\pm$ 0,096 ^{ef}
BREJO DAS FREIRAS	0,102 $\pm$ 0,033 ^{abcd}	0,208 $\pm$ 0,167 ^{def}	0,137 $\pm$ 0,084 ^{bcde}	0,171 $\pm$ 0,046 ^{cde}

n=15. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas considerando a interação entre comunidade e faixa etária ($p < 0,05$).

Figura 14 - Concentração média de F ($\pm$ DP) na saliva total dos voluntários das diferentes comunidades e faixas etárias (n=15). Letras distintas sobre as colunas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

5.3 Concentração de F na saliva do ducto da parótida

A Tabela 4 e a Figura 15 mostram a concentração média de F ($\pm$ DP) na saliva do ducto da parótida dos voluntários das cinco comunidades e diferentes faixas etárias. A ANOVA a dois critérios revelou diferença estatisticamente significativa entre as comunidades ($F=132,657$, $p<0,0001$), e entre as faixas etárias ($F=24,809$, $p<0,0001$), havendo interação significativa entre estes critérios ($F=22,735$, $p<0,0001$). Os voluntários de Pirajuí e Bauru apresentaram níveis de F similares e menores que os encontrados para as outras comunidades, entretanto esta diferença não foi estatisticamente significativa. Os voluntários de Brejo das Freiras (maior concentração de F na água) apresentaram níveis de F na saliva da parótida mais elevados do que os voluntários das outras comunidades, embora esta diferença só tenha sido estatisticamente significativa para as faixas etárias de 30-40 e 50-60 anos. A concentração média de F na saliva da parótida dos voluntários de Brejo das Freiras, faixa etária de 50-60 anos, foi estatisticamente maior do que todos os outros voluntários ($p<0,05$).

Tabela 4 - Concentração média de F ($\pm$ DP, mg/L) na saliva do ducto da parótida nas cinco comunidades e diferentes faixas etárias

COMUNIDADES	FAIXAS ETÁRIAS (ANOS)			
	3-7	14-20	30-40	50-60
PIRAJUÍ	0,009 $\pm$ 0,001 ^a	0,010 $\pm$ 0,002 ^a	0,010 $\pm$ 0,002 ^a	0,011 $\pm$ 0,002 ^a
CAJAZEIRINHAS	0,028 $\pm$ 0,008 ^{abc}	0,019 $\pm$ 0,005 ^{ab}	0,018 $\pm$ 0,003 ^{ab}	0,022 $\pm$ 0,004 ^{ab}
BAURU	0,014 $\pm$ 0,003 ^a	0,011 $\pm$ 0,002 ^a	0,009 $\pm$ 0,002 ^a	0,012 $\pm$ 0,002 ^a
BREJO DOS SANTOS	0,029 $\pm$ 0,004 ^{abc}	0,026 $\pm$ 0,004 ^{abc}	0,027 $\pm$ 0,004 ^{abc}	0,036 $\pm$ 0,011 ^{abc}
BREJO DAS FREIRAS	0,072 $\pm$ 0,027 ^c	0,065 $\pm$ 0,026 ^{bc}	0,134 $\pm$ 0,058 ^d	0,284 $\pm$ 0,148 ^e

n=15. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas considerando a interação entre comunidade e faixas etária ($p < 0,05$).

Figura 15 - Concentração média de F ($\pm$ DP) na saliva do ducto da parótida dos voluntários das diferentes comunidades e faixas etárias (n=15). Letras distintas sobre as colunas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

5.4 Concentração de F nas unhas

As Tabelas 5 e 6, assim como as Figuras 16 a 18, mostram a concentração média de F presente nas unhas das mãos e dos pés dos voluntários das cinco comunidades e de todas as faixas etárias. A ANOVA a três critérios detectou diferenças estatisticamente significativas entre as comunidades ($F=63,813$, $p<0,0001$), as faixas etárias ($F=12,157$, $p<0,0001$), bem como entre os sítios (mão ou pé, $F=4,476$, $p=0,035$). Houve interação significativa entre comunidades e faixas etárias ($F=4,577$, $p<0,0001$), comunidades e sítios ($F=2,872$, $p=0,023$), faixas etárias e sítios ($F=2,346$, $p=0,073$), e entre os três critérios ($F=2,131$, $p=0,015$).

Considerando-se as unhas das mãos, a menor concentração de F foi encontrada em Pirajuí, faixa etária de 50-60 anos, que não diferiu significativamente dos valores encontrados: nos outros grupos etários da mesma comunidade, em todas as faixas etárias de Cajazeirinhas e Bauru, em Brejo dos Santos, 3-7 e 14-20 anos e em Brejo das Freiras, 14-20 anos. A maior concentração de F nas unhas das mãos foi encontrada nos voluntários de Brejo dos Santos, faixa etária de 50-60 anos, que não diferiu significativamente dos voluntários de 30-40 anos da mesma comunidade e Brejo das Freiras, faixas etárias de 30-40 e 50-60 anos.

Para as unhas dos pés, a menor concentração foi encontrada na comunidade de Pirajuí, faixa etária de 14-20 anos, que não diferiu significativamente das concentrações dos outros grupos da mesma comunidade, nem mesmo de Cajazeirinhas e Bauru, para todas as faixas etárias. A maior concentração de F nas unhas dos pés foi encontrada nos voluntários de 50-60 anos de Brejo das Freiras, embora não tenha apresentado diferença significativa dos níveis encontrados nos voluntários de 3-7 e 30-40 anos da mesma comunidade, nem mesmo nas faixas etárias de 30-40 e 50-60 anos de Brejo dos Santos.

Comparando-se as concentrações de F nas unhas das mãos e dos pés, houve diferenças estatisticamente significativas ($p<0,05$) apenas nos voluntários de 3-7 e 14-20 anos de Pirajuí e 14-20 anos de Cajazeirinhas.

Tabela 5 - Concentração média de F ($\pm$ DP, mg/kg) presente nas unhas das mãos dos voluntários das cinco comunidades e diferentes faixas etárias

COMUNIDADES	FAIXAS ETÁRIAS (ANOS)			
	3-7	14-20	30-40	50-60
PIRAJUÍ	1,564 $\pm$	1,600 $\pm$	1,611 $\pm$	1,381 $\pm$
	0,707 ^a	0,902 ^a	1,010 ^a	0,558 ^a
CAJAZEIRINHAS	1,926 $\pm$	1,503 $\pm$	2,479 $\pm$	2,703 $\pm$
	0,536 ^{ab}	0,617 ^a	1,928 ^{ab}	1,404 ^{abc}
BAURU	1,998 $\pm$	1,845 $\pm$	1,521 $\pm$	2,359 $\pm$
	1,058 ^{ab}	0,844 ^{ab}	0,693 ^a	1,703 ^{ab}
BREJO DOS SANTOS	2,566 $\pm$	3,085 $\pm$	8,320 $\pm$	10,203 $\pm$
	1,256 ^{ab}	2,907 ^{abc}	6,409 ^{ef}	9,103 ^f
BREJO DAS FREIRAS	5,949 $\pm$	4,063 $\pm$	7,427 $\pm$	6,865 $\pm$
	4,033 ^{bcd}	3,177 ^{abcd}	4,164 ^{def}	4,886 ^{cdef}

n=15. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas considerando a interação entre comunidade e faixa etária ($p < 0,05$).

Tabela 6 - Concentração média de F ($\pm$ DP, mg/kg) presente nas unhas dos pés dos voluntários das cinco comunidades e diferentes faixas etárias

COMUNIDADES	FAIXAS ETÁRIAS (ANOS)			
	3-7	14-20	30-40	50-60
PIRAJUÍ	1,196 $\pm$	0,919 $\pm$	1,128 $\pm$	1,318 $\pm$
	0,457 ^{ab}	0,329 ^a	0,646 ^{ab}	0,561 ^{ab}
CAJAZEIRINHAS	1,968 $\pm$	2,068 $\pm$	2,337 $\pm$	2,718 $\pm$
	0,773 ^{ab}	0,512 ^{ab}	1,099 ^{ab}	1,403 ^{abc}
BAURU	2,148 $\pm$	2,071 $\pm$	1,967 $\pm$	1,744 $\pm$
	0,743 ^{ab}	0,966 ^{ab}	1,272 ^{ab}	0,724 ^{ab}
BREJO DOS SANTOS	3,172 $\pm$	3,103 $\pm$	6,212 $\pm$	5,344 $\pm$
	2,257 ^{bc}	1,638 ^{bc}	2,651 ^{de}	1,820 ^{de}
BREJO DAS FREIRAS	5,489 $\pm$	4,805 $\pm$	6,112 $\pm$	7,351 $\pm$
	1,756 ^{de}	2,849 ^{cd}	2,683 ^{de}	3,103 ^e

n=15. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas considerando a interação entre comunidade e faixa etária ($p < 0,05$).

Figura 16 - Concentração média de F nas unhas das mãos ($\pm$ DP, mg/kg) dos voluntários das diferentes comunidades e faixas etárias (n=15). Letras distintas sobre as colunas indicam diferenças significativas (p<0,05)

Figura 17 - Concentração média de F nas unhas dos pés ($\pm$ DP, mg/kg) dos voluntários das diferentes comunidades e faixas etárias (n=15). Letras distintas sobre as colunas indicam diferenças significativas (p<0,05)

Figura 18 - Concentração média de F nas unhas das mãos e dos pés dos voluntários das diferentes comunidades e faixas etárias. * Indica diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de F nas unhas das mãos comparada com as dos pés

5.5 Avaliação da velocidade de crescimento das unhas

Foi avaliado, isoladamente, cada dedo das mãos e dos pés, de modo que há 20 resultados (10 das unhas das mãos e 10 das unhas dos pés) para cada voluntário. Para a análise estatística, calculou-se a média dos lados direito e esquerdo de cada dedo, já que não houve diferença significativa entre ambos.

A análise dos dados sugere que as velocidades de crescimento para Bauru e Pirajuí foram maiores que aquelas observadas para as demais comunidades. Isto é devido ao fato de que os dados nas duas primeiras comunidades foram coletados por uma aluna de Iniciação Científica, enquanto que nas demais o foram pela aluna de Doutorado. Em ambos os casos, a marcação para análise era feita de maneira rente à cutícula, mas no primeiro caso foi acrescentada a espessura da cutícula, o que gerou a diferença. Por este motivo não foi feita comparação entre as diferentes comunidades, já que provavelmente o fato de o voluntário residir nas diferentes comunidades não alteraria a velocidade de crescimento das suas unhas.

A ANOVA a três critérios detectou diferenças significativas entre as faixas etárias ($F=5,222$, $p=0,002$), entre os sítios mão e pé ($F=318,941$, $p<0,0001$) e entre os dedos ($F=92,199$, $p<0,0001$). Houve interação significativa entre os critérios faixa etária e sítio ($F=3,954$, $p=0,009$), sítio e diferentes dedos ($F=27,129$, $p<0,0001$) e entre os três critérios ($F=1,816$, $p=0,041$). Assim, as Tabelas 7 a 10 mostram a velocidade de crescimento médio das unhas (mm/dia) por faixa etária, considerando os diferentes sítios e dedos. A faixa etária de 3-7 anos apresentou velocidade de crescimento das unhas significativamente menor do que: todos os dedos das mãos e dos pés do grupo de 14-20 anos, mínimo da mão e indicador e polegar do pé de 30-40 anos, e mínimo, indicador e polegar do pé de 50-60 anos. A faixa de 14-20 anos mostrou maior velocidade de crescimento do que a de 50-60 anos nos dedos médio, indicador e polegar das mãos. Entre os demais dedos, não houve diferenças significativas. Estes achados estão representados na Tabela 11. A velocidade de crescimento das unhas das mãos foi significativamente maior que a das unhas dos pés ($p<0,0001$), o que pode ser observado pela Figura 19.

Tabela 7 - Velocidade média de crescimento das unhas das mãos e dos pés ($\pm$ DP, mm/dia) dos voluntários de 3-7 anos

DEDOS	SÍTIO	
	MÃO	PÉ
MÍNIMO	0,129 $\pm$ 0,038 ^c	0,090 $\pm$ 0,033 ^a
ANULAR	0,149 $\pm$ 0,050 ^d	0,101 $\pm$ 0,033 ^b
MÉDIO	0,156 $\pm$ 0,053 ^d	0,106 $\pm$ 0,036 ^b
INDICADOR	0,155 $\pm$ 0,048 ^d	0,102 $\pm$ 0,036 ^b
POLEGAR	0,159 $\pm$ 0,051 ^d	0,121 $\pm$ 0,040 ^c

n=75. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas para unhas das mãos e pés ($p < 0,05$).

Tabela 8 - Velocidade média de crescimento das unhas das mãos e dos pés ($\pm$ DP, mm/dia) dos voluntários de 14-20 anos

DEDOS	SÍTIO	
	MÃO	PÉ
MÍNIMO	0,157 $\pm$ 0,063 ^b	0,123 $\pm$ 0,058 ^a
ANULAR	0,175 $\pm$ 0,074 ^c	0,124 $\pm$ 0,056 ^a
MÉDIO	0,188 $\pm$ 0,075 ^c	0,130 $\pm$ 0,063 ^a
INDICADOR	0,181 $\pm$ 0,070 ^c	0,126 $\pm$ 0,045 ^a
POLEGAR	0,184 $\pm$ 0,063 ^c	0,156 $\pm$ 0,050 ^b

n=75. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas para unhas das mãos e pés ($p < 0,05$).

Tabela 9 - Velocidade média de crescimento das unhas das mãos e dos pés ($\pm$ DP, mm/dia) dos voluntários de 30-40 anos

DEDOS	SÍTIO	
	MÃO	PÉ
MÍNIMO	0,151 $\pm$ 0,051 ^c	0,105 $\pm$ 0,052 ^a
ANULAR	0,166 $\pm$ 0,058 ^d	0,117 $\pm$ 0,048 ^{ab}
MÉDIO	0,174 $\pm$ 0,057 ^d	0,120 $\pm$ 0,050 ^b
INDICADOR	0,173 $\pm$ 0,053 ^d	0,123 $\pm$ 0,048 ^b
POLEGAR	0,170 $\pm$ 0,057 ^d	0,146 $\pm$ 0,054 ^c

n=75. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas para unhas das mãos e pés ($p < 0,05$).

Tabela 10 - Velocidade média de crescimento das unhas das mãos e dos pés ($\pm$ DP, mm/dia) dos voluntários de 50-60 anos

DEDOS	SÍTIO	
	MÃO	PÉ
MÍNIMO	0,141 $\pm$ 0,048 ^b	0,113 $\pm$ 0,052 ^a
ANULAR	0,158 $\pm$ 0,052 ^c	0,118 $\pm$ 0,050 ^a
MÉDIO	0,162 $\pm$ 0,055 ^c	0,126 $\pm$ 0,051 ^a
INDICADOR	0,156 $\pm$ 0,054 ^c	0,124 $\pm$ 0,050 ^a
POLEGAR	0,157 $\pm$ 0,052 ^c	0,156 $\pm$ 0,067 ^c

n=75. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas para unhas das mãos e pés ($p < 0,05$).

Tabela 11 - Dedos que apresentaram diferenças significativas quanto à velocidade de crescimento das unhas, considerando as faixas etárias

ANOS	3-7		14-20		30-40		50-60	
	MÃO	PÉ	MÃO	PÉ	MÃO	PÉ	MÃO	PÉ
3-7	-	-	mínimo	mínimo	mínimo	indicador	ns	mínimo
			anular	anular		polegar		indicador
			médio	médio				polegar
			indicador	indicador				
			polegar	polegar				
14-20	mínimo	mínimo	-	-	ns	ns	médio	ns
	anular	anular					indicador	
	médio	médio					polegar	
	indicador	indicador						
	polegar	polegar						
30-40	mínimo	indicador	Ns	ns	-	-	ns	ns
		polegar						
50-60	ns	mínimo	médio	ns	ns	ns	-	-
		indicador	indicador					
		polegar	polegar					

ns = não-significativo

Figura 19 - Velocidade média de crescimento das unhas (mm/dia), considerando as diferentes faixas etárias e dedos

5.6 Aplicação dos testes de regressão linear multivariada e correlação linear

Um modelo de regressão linear multivariado foi adotado a fim de se verificar a influência da idade, gênero e F na água sobre as concentrações de F na saliva total e na saliva da parótida. Já na tentativa de se explicar a concentração de F nas unhas, as seguintes variáveis independentes foram utilizadas: idade, gênero, exposição ao F pela água e velocidade de crescimento das unhas. Os dados estão representados nas Tabelas 12 a 15.

Tabela 12 - Modelo de regressão linear multivariada utilizado para a concentração de F na saliva total

	Coeficientes não-padronizados		Coeficientes padronizados	t	Sig.	R ²	R ² ajustado
	B	Erro padrão	Beta				
IDADE	0,000	0,000	-0,003	-0,056	0,95574		
GÊNERO	0,017	0,013	0,072	1,318	0,18836	0,170	0,162
[F] ÁGUA	0,075	0,010	0,403	7,583	0,00000		

Tabela 13 - Modelo de regressão linear multivariada utilizado para a concentração de F na saliva do ducto da parótida.

	Coeficientes não-padronizados		Coeficientes padronizados	t	Sig.	R ²	R ² ajustado
	B	Erro padrão	Beta				
IDADE	-0,007	0,006	-0,051	-1,169	0,24348		
GÊNERO	0,001	0,000	0,203	4,688	0,00000	0,476	0,470
[F] ÁGUA	0,073	0,005	0,649	15,368	0,00000		

Tabela 14 - Modelo de regressão linear multivariada utilizado para a concentração de F nas unhas das mãos

	Coeficientes não-padronizados		Coeficientes padronizados	t	Sig.	R ²	R ² ajustado
	B	Erro padrão	Beta				
IDADE	0,032	0,011	0,149	2,843	0,00478		
GÊNERO	-2,023	0,441	-0,240	-4,588	0,00001	0,241	0,231
[F] ÁGUA	2,141	0,353	0,332	6,065	0,00000		
VEL MÃO	-8,460	4,283	-0,108	-1,975	0,04916		

Tabela 15 - Modelo de regressão linear multivariada utilizado para a concentração de F nas unhas dos pés

	Coeficientes não-padronizados		Coeficientes padronizados	t	Sig.	R ²	R ² ajustado
	B	Erro padrão	Beta				
IDADE	0,018	0,006	0,139	3,100	0,00212		
GÊNERO	-0,666	0,227	-0,130	-2,932	0,00363	0,459	0,451
[F] ÁGUA	2,335	0,176	0,594	13,290	0,00000		
VEL PÊ	-8,550	2,569	-0,150	-3,328	0,00099		

A Tabela 16 e as Figuras 20 e 21 mostram as correlações entre as concentrações de F na água de consumo, na saliva total, na saliva do ducto da parótida, nas unhas das mãos e nas unhas dos pés. Essas correlações foram positivas e estatisticamente significativas ($p < 0,0001$). Também verificou-se a correlação entre concentração média de F e velocidade média de crescimento das unhas das mãos ($r = -0,230$, $p < 0,0001$, Figura 22), bem como entre concentração média de F e velocidade média de crescimento das unhas dos pés ($r = -0,288$, $p < 0,0001$, Figura 23). Em ambos os casos, encontrou-se correlação negativa significativa.

Tabela 16 - Correlações entre as concentrações média de F das diferentes amostras, sendo que para todas as correlações testadas $p < 0,0001$

		ÁGUA	UNHA MÃO	UNHA PÉ	SALIVA TOTAL
ÁGUA	r	1	0,364	0,631	0,407
UNHA MÃO	r	0,364	1	0,590	0,362
UNHA PÉ	r	0,631	0,590	1	0,409
SALIVA TOTAL	r	0,407	0,362	0,409	1
SALIVA PARÓTIDA	r	0,654	0,252	0,526	0,236

Figura 20 - Correlação entre concentração de F nas unhas das mãos e dos pés

Figura 21 - Correlação entre concentração de F na saliva total e saliva do ducto da parótida

Figura 22 - Correlação entre a velocidade de crescimento e a concentração de F nas unhas das mãos

Figura 23 - Correlação entre a velocidade de crescimento e a concentração de F nas unhas dos pés

5.7 Avaliação da concentração de F nas unhas dos diferentes dedos das mãos

Não houve diferença estatisticamente significativa entre a concentração de F nas unhas dos diferentes dedos das mãos ($p=0,719$), conforme pode ser observado na Figura 24.

Figura 24 - Concentração média de F ($\pm$ DP, mg/kg) nas unhas dos diferentes dedos das mãos (n=5)

5.8 Avaliação da contaminação exógena das unhas por F

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações de F nas unhas do grupo controle e do grupo submetido à imersão por 3 minutos em “slurry” de dentifrício fluoretado com 1100 ppm (1:3). No entanto, houve diferenças significativas entre os grupos controle e submetido à solução de 100 ppm F por 2h, bem como entre os grupos submetidos a “slurry” de dentifrício e à solução de 100 ppm F. Tal resultado foi encontrado tanto no experimento 1 com limpeza breve das unhas com enxágue de água deionizada após a imersão, quanto no experimento 2 com limpeza vigorosa por escovação com água deionizada e ultra-som ($p=0,0007$ e $p<0,0001$, respectivamente). A Tabela 17 e a Figura 25 representam a concentração média de F ($\pm$ DP, mg/kg) nas unhas com as diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A Tabela 18 e a Figura 26 representam o experimento 3, que verificou o efeito do tempo na contaminação das unhas. Observou-se uma tendência de aumento na concentração de F nas unhas com o aumento do tempo de exposição ao F, mesmo com a lavagem pós-imersão vigorosa das amostras com escovação e ultra-som.

Tabela 17 - Concentração média de F ($\pm$ DP, mg/kg) nas unhas e intervalo de confiança a 95%, após imersão em solução fluoretada seguida de lavagem breve ou vigorosa

	PÓS-LAVAGEM BREVE		PÓS-LAVAGEM VIGOROSA	
	MÉDIA $\pm$ DP	IC 95%	MÉDIA $\pm$ DP	IC 95%
CONTROLE	3,078 $\pm$ 1,552 ^a	1,968 a 4,188	3,530 $\pm$ 1,759 ^A	2,272 a 4,788
“SLURRY”	6,135 $\pm$ 1,833 ^a	4,824 a 7,446	6,866 $\pm$ 4,944 ^A	3,329 a 10,403
DENTIFRÍCIO				
SOLUÇÃO DE 100 ppm	47,967 $\pm$ 44,223 ^b	16,334 a 79,600	14,402 $\pm$ 4,349 ^B	11,291 a 17,513

n=10. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

Tabela 18 - Concentração média de F nas unhas ($\pm$ DP, mg/kg) e intervalo de confiança a 95%, após imersão em solução fluoretada de dentifrício por 30 ou 60 minutos

	TEMPO DE IMERSÃO DAS UNHAS (MINUTOS)		
	CONTROLE	30	60
MÉDIA $\pm$ DP	2,345 $\pm$ 1,280 ^a	4,760 $\pm$ 0,212 ^{ab}	10,625 $\pm$ 2,807 ^b
IC 95%	-9,154 a 13,844	2,854 a 6,666	-14,596 a 35,846

n=2. Letras sobrescritas distintas indicam diferenças significativas ($p<0,05$).

Figura 25 - Concentração de F nas unhas sem imersão em solução fluoretada (controle) e após imersão por 3 minutos em “slurry” de dentifrício contendo 1100 ppm F e por 2h em solução de 100 ppm F, com limpeza breve ou vigorosa das unhas após imersão. (n=10). Letras distintas sobre as colunas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Figura 26 - Concentração de F nas unhas em relação ao tempo de imersão em solução fluoretada (“slurry” de dentifrício com 1100 ppm F)

6 *Discussão*

6 *Discussão*

6.1 Água

Nas residências dos voluntários de Bauru, foram coletadas três amostras por voluntário. A realização de três coletas em datas diferentes foi proposta por motivo de controle, pois trabalhos prévios revelaram que a fluoretação da água de abastecimento de Bauru, que deveria estar entre 0,6 e 0,8 mg F/L, mostrou-se irregular (Buzalaf et al., 2002). Entretanto, a partir de março de 2004 foi implementado o heterocontrole da fluoretação da água de abastecimento público da cidade. Para o heterocontrole, em dias aleatórios de cada mês, são coletadas amostras de água de abastecimento em 60 pontos, cobrindo toda a rede de distribuição de águas da cidade. Um trabalho recentemente publicado, descrevendo resultados após 12 meses do início do heterocontrole, demonstrou que o mesmo tem sido efetivo, uma vez que a fluoretação tem se mostrado bastante adequada (Ramires et al., 2006). De fato, não foram encontradas diferenças significativas entre a concentração de F presente na água coletada nas residências dos voluntários de Bauru em 3 diferentes datas.

Já para as outras comunidades foram coletadas apenas duas amostras por voluntário, visto que não há fluoretação artificial da água de abastecimento. As comunidades de Brejo dos Santos e Brejo das Freiras apresentaram diferença significativa na concentração de F na água entre as duas diferentes datas de coleta. Isto se deveu ao fato de que são comunidades com água naturalmente fluoretada, portanto passível de flutuação no nível de F. Como era esperado, Brejo das Freiras apresentou concentração de F na água significativamente maior que as demais cidades, Bauru e Brejo dos Santos não diferiram significativamente entre si, mas apresentaram valores significativamente maiores quando comparados com Pirajuí e Cajazeirinhas, que não diferiram entre si. Estes achados reforçaram o delineamento experimental deste estudo, que pretendeu incluir comunidades não fluoretadas e otimamente fluoretadas, natural e artificialmente, além de uma comunidade com super fluoretação.

6.2 Saliva total

A saliva total não tem sido reconhecida como um bom indicador da concentração plasmática de F. Whitford et al. (1999) investigaram a relação entre a concentração de F na saliva total, saliva do ducto da parótida e plasma em crianças de 5-10 anos. Os autores coletaram uma amostra de saliva total das crianças e antes que a segunda amostra fosse coletada, cada criança enxaguou a boca com um total de 100 mL de água deionizada. Ainda foi coletada uma amostra de saliva do ducto da parótida e outra de plasma sanguíneo destas crianças. A concentração média de F ($\pm$ EP) presente na saliva total antes e depois dos enxágües foi de $7,86 \pm 2,75$ e $5,92 \pm 2,15$ $\mu\text{mol/L}$, não havendo uma redução significativa do nível de F. Também não houve correlação entre as concentrações de F presentes na saliva total e saliva do ducto da parótida ($0,72 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/L}$), nem entre saliva total e plasma ($0,89 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/L}$). As concentrações de F na saliva da parótida, entretanto, mostraram-se positivamente correlacionadas com aquelas presentes no plasma ($r=0,916$, $p<0,0001$) por uma constante de proporcionalidade de 0,8. Em estudos com adultos, correlações similares foram relatadas (EKSTRAND, 1977). Assim, a concentração de F na saliva do ducto da parótida poderia ser utilizada como um biomarcador da concentração plasmática de F em indivíduos numa ampla faixa etária. O fato de múltiplos bochechos com água deionizada não terem diminuído a concentração de F na saliva total no estudo de Whitford et al. (1999a), indica que existe um grande “pool” de F na cavidade bucal que não pode ser facilmente removido. Este “pool” estaria provavelmente associado com os tecidos moles bucais ou com a placa dentária. Isto poderia explicar a razão pela qual no presente estudo as concentrações de F encontradas na saliva total não refletiram, em todas as situações, aquelas presentes na água de abastecimento dos voluntários. Por exemplo, os voluntários de Bauru (comunidade fluoretada artificialmente) apresentaram concentrações de F similares aos de Cajazeirinhas (comunidade com baixo nível de F na água). Outrossim, os valores encontrados para Brejo das Freiras não foram superiores aos observados para Brejo dos Santos. Embora a utilização de F a partir de outros veículos, como dentifrício, géis e soluções para bochecho, bem como da dieta em geral não tenha sido avaliada é bastante provável que as mesmas sejam responsáveis por estes achados. Em relação ao dentifrício fluoretado, é possível que os indivíduos residentes nas comunidades menores usem uma

quantidade maior de dentifrício na escovação. Isso se deve ao fato de que a única informação que estes voluntários têm acerca do uso de dentifrício é oriunda dos comerciais de televisão, onde se observa a colocação de uma grande quantidade do produto na escova dentária, a fim de se sugerir o aumento do consumo do mesmo. Em Bauru, há três Faculdades de Odontologia e um programa de saúde coletiva (Sorria Bauru), de forma que a população recebe mais instruções relativas à saúde bucal em geral, incluindo o uso de dentifrício fluoretado em quantidades adequadas. O fato de que os voluntários de Brejo dos Santos apresentaram uma concentração maior de F na saliva total quando comparados com os de Bauru (com níveis médios de F na água semelhantes) poderia ser devido, em parte, ao maior consumo de água em Brejo dos Santos, devido ao clima mais quente. Por outro lado, a observação de que valores mais elevados foram encontrados para Brejo dos Santos quando comparados com Brejo das Freiras (que tem uma concentração média de F na água maior) sugere a utilização de uma grande quantidade de dentifrício durante a escovação ou ingestão de algum alimento ou bebida com alta concentração de F. Assim, uma avaliação da ingestão de F a partir dos diferentes componentes da dieta (sólidos e líquidos em separado) deveria ser conduzida em Brejo dos Santos, bem como uma avaliação da quantidade de dentifrício utilizada na escovação. Estas possíveis fontes alternativas de F tenderiam a aumentar os reservatórios intrabucais de F, mantendo os níveis na saliva total mais elevados.

Schamschula et al. (1985) analisaram a concentração de F na saliva total de três grupos de voluntários húngaros, com idade média de 14 anos, que diferiam quanto à água de beber: 0,06-0,11; 0,5-1,1 ou 1,6-3,1 mg/L. Os valores encontrados foram 0,006; 0,011 e 0,016 mg/L para os grupos de baixo, intermediário e alto nível de F na água,

6.3 Saliva do ducto da parótida

Considerando a saliva do ducto da parótida como um biomarcador da quantidade de F absorvido, e, portanto, presente no plasma (EKSTRAND, 1977, WHITFORD et al., 1999), o aumento na concentração de F na saliva da parótida em função da idade, observado em Brejo das Freiras, pode ser facilmente compreendido. Hanhijarvi et al. (1981) encontraram correlação positiva entre os níveis de F no plasma e a idade em estudos realizados em humanos. Cerca de 99%

do F retido no organismo encontra-se armazenado no tecido ósseo. O aumento na concentração plasmática de F com a idade pode ser explicado pela distribuição do F em estado de equilíbrio (“steady-state”) entre o fluido extracelular e a camada de hidratação dos cristalitos ósseos (WHITFORD, 1996). A camada de hidratação dos cristalitos é contínua, ou pelo menos disponível, aos fluidos extracelulares. Presumivelmente, o F neste “pool” é rapidamente passível de trocas podendo, deste modo, sofrer migração em qualquer uma das direções, dependendo das concentrações relativas no fluido extracelular e na camada de hidratação (WHITFORD, 1996). Assim, havendo um aumento na concentração de F no osso com a idade, devido à contínua incorporação de F ao longo da vida, espera-se que haja um aumento também na concentração de F no plasma e, conseqüentemente, na saliva do ducto da parótida. Isto poderia ter refletido, inclusive, nas concentrações de F nas unhas. No presente estudo, apenas para Brejo das Freiras, onde há uma concentração média de F na água de 1,68 mg/L, foi observado o aumento de F na saliva da parótida com a idade. É provável que se o número de voluntários em cada faixa etária fosse maior, diferenças significativas pudessem ter sido encontradas também para as outras comunidades, onde o nível de exposição ao F é menor. Por outro lado, o fato desta relação não ter sido válida para a faixa etária de 3-7 anos pode ser devido à grande ingestão de F a partir do dentifrício por crianças desta faixa etária, o que aumentaria consideravelmente a sua ingestão diária total de F quando comparado aos voluntários mais velhos. De fato, na grande maioria dos estudos que estimam a ingestão de F de crianças brasileiras, o dentifrício é o maior contribuinte, participando com 50 a 80% da ingestão diária total (PAIVA et al., 2003; PESSAN et al., 2005; ALMEIDA et al., 2006).

Segundo o modelo de regressão linear multivariada adotado, a concentração de F na água exerceu maior influência no nível de F na saliva da parótida. De fato, foi observada uma correlação significativa entre a concentração de F na água e na saliva da parótida, bem como entre saliva total e da parótida. O valor de r quadrado ajustado sugere que a concentração de F na saliva da parótida pode ser mais bem explicada pelo modelo adotado do que a saliva total. Estes dados em conjunto corroboram a utilização da saliva do ducto da glândula parótida, mas não a saliva total, como um biomarcador de exposição ao F, com a vantagem de sua coleta ser simples e menos invasiva do que a do biomarcador considerado “padrão-ouro”, que é o plasma sangüíneo (WHITFORD et al., 1999).

6.4 Concentração de F nas unhas e velocidade de crescimento das unhas

A concentração de F na água foi a variável que mais exerceu influência sobre os níveis deste elemento nas unhas das mãos e dos pés. De fato, muitos estudos empregaram as unhas como biomarcadores de exposição ao F através da água de consumo. Schamschula et al. (1985) analisaram a concentração de F nas unhas das mãos e na saliva total de três grupos de voluntários húngaros com idade média de 14 anos, que diferiam quanto à água de beber: 0,06-0,11; 0,5-1,1 ou 1,6-3,1 mg/L. As médias de concentração de F nas unhas foram 0,79; 1,31 e 2,31 mg/kg e na saliva total foram 0,006; 0,011 e 0,016 mg/L para os grupos de baixo, intermediário e alto nível de F na água. Esses valores apresentaram-se menores do que os obtidos no presente estudo para a faixa etária de 14-20 anos de Pirajuí e Cajazeirinhas (nível baixo de F), Bauru e Brejo dos Santos (nível intermediário de F) e Brejo das Freiras (nível alto de F), tanto para F nas unhas quanto na saliva total. Tal diferença se deve principalmente pela ausência do uso de dentifrício fluoretado por parte dos voluntários húngaros. Spate et al. (1994) usaram análise por ativação neutra para determinar as concentrações de F em unhas dos pés obtidas de mulheres residentes em Holden ou Boston, Massachusetts, EUA, onde a água continha 0,09 e 1,0 ppm, respectivamente. As concentrações médias (com as variações) foram de 4,2 (2,4-9,7) e 6,4 (2,7-10,1) mg/Kg, valores maiores do que os encontrados no presente estudo. Tal diferença pode ser devido aos tipos de análise de F, pois Spate et al. (1994) usaram análise por ativação neutra para determinar as concentrações de F em unhas. Whitford et al. (1999) analisaram as concentrações de F presentes nas unhas das mãos de crianças que residiam em áreas contendo 0,1, 1,6 ou 2,3 mg/L de F na água, tendo-se encontrado médias de 1,85, 5,28 e 7,52 mg/kg, respectivamente. Os autores concluíram que as unhas são boas indicadoras de ingestão de F. Em 2003, Arsati realizou um estudo com crianças de 20 a 30 meses de idade onde a autora verificou a relação entre concentração de F nas unhas e na água de abastecimento de três cidades paulistas: Cordeirópolis, Piracicaba e Assistência, que possuem 0,03, 0,64 e 1,53 mg/kg de F na água, respectivamente. Os resultados da concentração de F nas unhas das crianças deste estudo foram 1,65, 2,85 e 4,14 mg/kg para Cordeirópolis, Piracicaba e Assistência, respectivamente. Os autores sugeriram que a unha pode ser um indicador da ingestão de F através da água de abastecimento. Levy et al. (2004) analisaram a

concentração de F em unhas de crianças de 2 a 6 anos de idade em cidade fluoretada (Bauru) e não fluoretada (Itápolis). As médias (mg/kg) obtidas para unhas das mãos foram 3,56 e 2,29 e para unhas dos pés 2,81 e 1,58 para Bauru e Itápolis, respectivamente. Tanto para unhas das mãos quanto para dos pés, a concentração de F nas unhas foi significativamente maior na cidade fluoretada. Ao contrário desse resultado, os voluntários da faixa etária de 3 a 7 anos de Bauru, comparados com os de Pirajuí e Cajazeirinhas (comunidades não fluoretadas), não apresentaram diferenças significativas nos níveis de F tanto nas unhas das mãos como nos pés. As concentrações de F nas unhas das mãos dos residentes de Brejo dos Santos e Brejo das Freiras foram maiores do que as dos outros voluntários. Realmente, essas foram as comunidades que apresentaram maior exposição ao F na água de consumo, sendo que Brejo das Freiras mostrou nível mais alto que as demais comunidades. Entretanto, a concentração média de F na água de Brejo dos Santos, embora mais elevada, não diferiu significativamente de Bauru. Curiosamente, os voluntários de Brejo dos Santos também tiveram níveis de F na saliva total maiores do que os de Brejo das Freiras. Estes dados sugerem que os voluntários de Brejo dos Santos tiveram um contato tópico com o F, o que levou à contaminação das unhas das mãos. O principal candidato seria o dentifrício fluoretado. Whitford et al. (1999) imergiram fragmentos de unhas das mãos em solução contendo 1 mg F/L e não observaram incorporação de F nestas unhas, sugerindo que as mesmas não estariam sujeitas a contaminação exógena. No entanto, é possível que soluções com concentrações de F mais altas do que 1 mg/L, como por exemplo a espuma do dentifrício durante a escovação, possam servir como fontes de contaminação. Por este motivo, no presente estudo também foi avaliada a possibilidade de contaminação exógena das unhas. Os dados obtidos, ao contrário de Whitford et al. (1999), indicam que pode ocorrer a contaminação das unhas e que quanto maior o tempo de exposição das unhas ao F, maior será a impregnação deste elemento nas mesmas. Além disso, o F exógeno parece ligar-se firmemente às unhas, uma vez que a limpeza mecânica com escovação e água deionizada, seguida de ultra-som, não foi suficiente para remover o F aderido. Este achado chama a atenção para a importância da limpeza das unhas previamente à análise de F. A limpeza com escova interdental e água deionizada, seguida de ultra-som, geralmente é empregada nos estudos com amostras de unhas. No entanto, foi mostrado que a contaminação exógena pode mascarar o F de origem sistêmica, que é o de interesse

quando se pensa na unha como biomarcador. Portanto, sugere-se a utilização de um método de limpeza das unhas que seja eficaz na remoção do F de origem externa. O modelo adotado na regressão linear multivariada foi duas vezes mais representativo para unhas dos pés do que das mãos. Isto se deve em parte à menor contaminação das unhas dos pés em relação às das mãos.

Em relação a concentração de F nas unhas, foram encontrados alguns valores discrepantes durante a leitura de F de duplicatas da mesma amostra. A fim de se esclarecer tal diferença, foi desenvolvido um experimento para avaliar a concentração de F nas unhas de cada dedo da mão separadamente. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o conteúdo de F nas unhas dos diferentes dedos das mãos. Sendo assim, a diferença obtida nas leituras de duplicatas não foram devido a “pool” de unhas dos diferentes dedos como se poderia pensar, parecendo refletir problema metodológico.

Em ordem decrescente de influência, nas unhas das mãos constaram o gênero, a idade e a velocidade de crescimento das unhas; já nas unhas dos pés foram a velocidade de crescimento das unhas, a idade e o gênero.

Em ambos os casos o gênero feminino apresentou maior concentração de F nas unhas do que o masculino. Provavelmente, devido à utilização de esmalte de unhas pelas mulheres, que contém F em sua formulação. Apesar da orientação de se evitar o uso de esmalte durante o período experimental e verificar a ausência do mesmo durante as coletas, este parece ser um fator de contaminação externa das unhas.

Considerando o fator idade, nas comunidades de Brejo dos Santos e Brejo das Freiras, as concentrações de F nas unhas dos indivíduos de 30-40 e 50-60 anos foram maiores do que nos demais grupos etários. Parece existir uma tendência para aumento na concentração de F encontrada em função da idade, nas comunidades com nível mais elevado de F na água. No entanto, as diferenças encontradas não foram significativas, devido à variabilidade dos resultados. É provável que se o número de voluntários em cada faixa etária fosse maior, diferenças significativas pudessem ter sido encontradas. Assim, sugere-se que quando se pretende utilizar as unhas como biomarcadores de exposição ao F, a faixa etária dos voluntários seja levada em consideração.

Quando foram comparadas as concentrações de F nas unhas das mãos com as dos pés, os valores encontrados foram em geral semelhantes. De acordo com este resultado, Machoy (1989), Rodrigues et al. (2004) e Buzalaf et al. (2006) também obtiveram concentrações de F semelhantes para unhas das mãos e dos pés. Machoy (1989) analisou as unhas das mãos e as dos pés de um único indivíduo e encontrou níveis médios de 3,65 e 3,58 mg/kg para as unhas das mãos e dos pés, respectivamente. Rodrigues et al. (2004) encontraram uma correlação positiva ($r=0,571$, $p<0,05$) entre a concentração de F presente nas unhas das mãos e dos pés, cujo coeficiente de correlação foi similar ao encontrado neste estudo ($r=0,590$). Em contrapartida, Whitford et al. (1999) relataram que os valores encontrados para concentração de F nas unhas das mãos foram aproximadamente 50% maiores do que os obtidos para as unhas dos pés, e que tal resultado pode estar relacionado com o menor fluxo sanguíneo na região dos pés e/ou devido ao crescimento mais lento das unhas dos pés. De fato, os dados mostram que as unhas dos pés apresentaram crescimento mais lento que as das mãos, porém este critério isolado não foi suficiente para explicar os níveis de F encontrados nas unhas das mãos e dos pés, que permaneceram semelhantes. Na literatura, há relatos controversos sobre qual sítio (mão ou pé) apresentaria maior concentração de F nas unhas. Analisando os dados disponíveis até o momento e considerando o presente estudo como aquele com maior tamanho amostral, pode-se sugerir que não há diferenças entre a concentração de F presente nas unhas das mãos e dos pés.

Foi encontrada uma correlação negativa entre velocidade de crescimento das unhas e seu conteúdo de F, tanto para mãos quanto para pés. A velocidade de crescimento das unhas interfere nos níveis de F e quanto menor a velocidade de crescimento, maior a concentração deste elemento. Isto faz sentido, já que neste caso há mais tempo para o F circulante ser incorporado à unha em crescimento. Foi estimado por Mc Donnell; O' Mullane (2004) que o crescimento médio das unhas dos polegares das mãos de crianças (2-3 anos) até o ponto onde elas poderiam ser cortadas e analisadas quanto ao conteúdo de F foi $0,10\pm0,02$ mm/dia, enquanto que no atual estudo este dado para crianças de 3-7 anos foi $0,16\pm0,05$ mm/dia. Esta diferença pode ser devido a variações na metodologia de análise e à diferença de idade dos voluntários dos dois estudos. Buzalaf et al. (2006) avaliaram a velocidade de crescimento das unhas das mãos e dos pés de indivíduos adultos, através de marcações de referência feitas com uma lâmina de bisturi na margem da cutícula de

cada unha e medindo-se a distância da margem da cutícula até a marcação após 8 semanas. À semelhança dos dados aqui obtidos, a velocidade de crescimento foi significativamente maior para as unhas das mãos quando comparadas às dos pés. Também foi observada uma velocidade de crescimento significativamente maior para as unhas dos dedos polegares dos pés, quando comparadas às demais unhas dos pés. Isto corrobora a sugestão de que as unhas dos polegares dos pés sejam utilizadas para se avaliar a exposição subcrônica e crônica ao F, devido à sua velocidade de crescimento mais rápida, massa adequada, e principalmente porque as unhas dos pés são menos sujeitas a contaminações exógenas.

Estes dados analisados em conjunto sugerem que as unhas dos pés são marcadores mais apropriados de exposição ao F que as unhas das mãos, pelos seguintes motivos:

- Parece não haver diferença significativa entre a concentração de F presente nas unhas das mãos e dos pés;
- Os coeficientes de correlação encontrados entre a concentração de F existente nas unhas dos pés e: na água de consumo, na saliva total e na saliva do ducto da parótida são maiores que aqueles observados para as unhas das mãos;
- As unhas dos pés são mais protegidas de contaminação exógena que as das mãos.

No entanto, quanto se pretende utilizar as unhas como biomarcadores de exposição ao F para estimar o risco de fluorose dentária, a sensibilidade deste biomarcador deve ser considerada. Sampaio et al. (2003), numa tentativa de validar a concentração de F nas unhas das mãos como um biomarcador de exposição ao F, examinaram a severidade da fluorose dentária em crianças residentes em diferentes regiões do Estado da Paraíba onde os níveis de F natural existentes na água de beber (poços particulares) eram 0,1, 1,6 e 2,3 mg/L. Estas crianças tinham sido previamente examinadas com relação à concentração de F nas unhas das mãos (WHITFORD et al., 1999). A concentração média de F nas unhas das mãos das crianças que apresentaram TF 0 foi significativamente menor que a concentração média das crianças que apresentaram TF 5. Porém, esta diferença não foi observada para crianças com TF 1, 2, 3 e 4. Estes achados foram de certa forma corroborados no presente estudo, onde se observou que não foram detectadas diferenças significativas na concentração de F das unhas dos voluntários de Pirajuí,

Cajazeirinhas e Bauru, onde supostamente a exposição total ao F é menor. Isto indica que unhas são bons preditores da exposição ao F quando os níveis de ingestão são altos, sendo necessários mais estudos para se definir e refinar este parâmetro.

7 *Conclusões*

7 Conclusões

A análise dos dados permite concluir que:

- Em relação à concentração de F na saliva total, não houve diferenças entre as faixas etárias, mas sim entre as comunidades. A maior concentração foi encontrada para Brejo dos Santos e a menor para Pirajuí.
- Quanto à saliva do ducto da parótida, os voluntários de Bauru e Pirajuí apresentaram níveis de F similares e menores que os encontrados para as demais comunidades. Os voluntários de Brejo das Freiras apresentaram concentração de F na saliva da parótida maior que os voluntários. Com exceção da faixa etária de 2-7 anos, foi observada uma tendência de aumento na concentração de F na saliva do ducto da parótida em função da idade na comunidade com nível alto de F na água.
- Considerando-se as unhas das mãos, a maior concentração de F foi encontrada para os voluntários de Brejo dos Santos, 50-60 anos, e menor concentração na comunidade de Pirajuí, 50-60 anos.
- Considerando-se as unhas dos pés, a maior concentração de F foi encontrada nos voluntários de Brejo das Freiras, 50-60 anos, e a menor na comunidade de Pirajuí, 14-20 anos.
- Quando se compararam as unhas das mãos com as dos pés, os valores encontrados foram em geral semelhantes.
- Quanto maior a velocidade de crescimento das unhas, menor foi o nível de F nas mesmas.
- A velocidade de crescimento das unhas das mãos foi maior que a das unhas dos pés.
- Os fatores idade, gênero e velocidade de crescimento das unhas exerceram influência sobre o conteúdo de F das mesmas, porém foi a

concentração de F na água a variável que mais influenciou a concentração de F nas unhas.

- As unhas foram passíveis de contaminação exógena por F e quanto maior o tempo de exposição, maior foi a retenção de F nas mesmas.
- As unhas se mostraram boas indicadoras da exposição ao F em indivíduos sujeitos a alto nível de F na água, sendo necessários mais estudos para se refinar este parâmetro.
- Os dados analisados em conjunto corroboram a utilização da saliva do ducto da glândula parótida, mas não a saliva total, como biomarcador de exposição ao F.

Referências

Referências

- Almeida BS, Cardoso VES, Buzalaf MAR. Fluoride ingestion from toothpaste and diet in 1- to 3-year-old Brazilian children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007;35(1):53-63.
- Angmar-Månsson B, Jong E, Sundstrom F, Bosch J. Strategies for improving the assessment of dental fluorosis: focus on optical techniques. *Adv Dent Res.* 1994;8(1):75-9.
- Angmar-Månsson B, Whitford GM. Environmental and physiological factors affecting dental fluorosis. *J Dent Res.* 1990;69(Spec):706-13.
- Aoba T, Fejerskov O. Dental fluorosis: chemistry and biology. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(2):155-70.
- Arsati YBOL. A unha como indicador biológico de exposição a fluoreto para prever risco de fluorose dental. Piracicaba, 2003, 75p, Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas.
- Baelum V, Fejerskov O, Manji F, Larsen MJ. Daily dose of fluoride and dental fluorosis. *Tandlaegebladet,* 1987;91(10):452-6.
- Bardsen A. "Risk periods" associated with the development of dental fluorosis in maxillary permanent central incisors: a meta-analysis. *Acta Odontol Scand.* 1999;57(5):247-56.
- Bastos JRM, Buzalaf MAR, Levy FM, Ribeiro TTT, Mazzone FHR. Concentração de flúor em água mineral engarrafada e de fontes naturais das cidades de Lindóia, Águas de Lindóia e Serra Negra, Brasil. *Rev Fac Odont Univ Passo Fundo.* 2001;6:15-9.
- Beltran E. Prevalence of enamel fluorosis among 12-19 year-olds, US, 1999-2004. [2755]. *J Dent Res.* 2007; 86(Spec Issue A). Presented at IADR/AADR/CADR 85th General Session and Exhibition; 2007 mar 21-24; New Orleans, LA.
- Bijella MF, Brighenti FL, Bijella MF, Buzalaf MA.. Fluoride kinetics in saliva after the use of a fluoride-containing chewing gum. *Pesqui Odontol Bras.* 2005;19(4):256-60.

Bloch-Zupan A. Is the fluoride concentration limit of 1,500 ppm in cosmetics (EU guideline) still up-to-date? *Caries Res.* 2001;35(suppl):22-5.

Burt BA. Introduction to the symposium. *J Public Health Dent.* 1995;55(1):37-8.

Burt BA. The changing patterns of systemic fluoride intake. *J Dent Res.* 1992;71(5):1228-37.

Buzalaf MAR, Almeida BS, Cardoso VE, Olympio KP, Furlani TA. Total and acid-soluble fluoride content of infant cereals, beverages and biscuits from Brazil. *Food Addit Contam.* 2004;21(3):210-5.

Buzalaf MAR, Caroselli EE, Cardoso de Oliveira R, Granjeiro JM, Whitford GM. Nail and bone surface as biomarkers for acute fluoride exposure in rats. *J Anal Toxicol.* 2004;28(4):249-52.

Buzalaf MAR, Cury JA, Whitford GM. Fluoride exposures and dental fluorosis: a literature review. *Rev FOB.* 2001;9(1/2):1-10.

Buzalaf MAR, Damante CA, Trevizani LM, Granjeiro JM. Risk of fluorosis associated with infant formulas prepared with bottled water. *J Dent Child.* 2004;71(2):110-3.

Buzalaf MAR, Fukushima R, Granjeiro JM, Cury JA. Correlation between plasma and nail fluoride concentrations in rats given different levels of fluoride in water. *Fluoride.* 2002;35(3):185-92.

Buzalaf MAR, Granjeiro JM, Damante CA, Ornelas F. Fluctuations in public water fluoride level in Bauru, Brazil. *J Public Health Dent.* 2002;62(3):173-6.

Buzalaf MAR, Granjeiro JM, Duarte JL, Taga ML. Fluoride content of infant foods in Brazil and risk of dental fluorosis. *ASDC J Dent Child.* 2002;69(2):196-200.

Buzalaf MA, Granjeiro JM, Damante CA, Ornelas F. Fluoride content of infant formulas prepared with deionized, bottled mineral and fluoridated drinking water. *ASDC J Dent Child.* 2001;68(1):37-41.

Buzalaf MAR, Linardi MM, Carvalho JG, Cardoso VE, Cury JA. Nail and bone surface as indicators of acute exposure to fluoride in rats. *J Appl Oral Sci.* 2004;12(4):285-9.

Buzalaf MAR, Pessan JP, Fukushima R, Dias A, Rosa HM. Fluoride content of UHT milks commercially available in Bauru, Brazil. *J Appl Oral Sci.* 2006;14(1):38-42.

Buzalaf MAR, Pessan JP, Alves KM. Influence of growth rate and length on fluoride detection in human nails. *Caries Res.* 2006;40(3):231-8.

Buzalaf MAR, Pinto CS, Rodrigues MHC, Levy FM, Borges AS, Furlani TA, Cardoso VES. Availability of fluoride from meals given to kindergarten children in Brazil. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2006;34(2):87-92.

Campos SV. Amostra de unha indicam presença de cocaína. Referência obtida via base de dados: USP, 2002, disponível na Internet, www.usp.br/agenciausp/bols/2002/rede1055.htm

Cangussu MC, Narvai PC, Castellanos Fernandez R, Djehizian V. Dental fluorosis in Brazil: a critical review. *Cad Saude Publica.* 2002;18(1):7-15.

Capella LF, Carcereri DL, Paiva SM, Rosso RA, Paixão RF, Saltori EK. Ocorrência de fluorose dentária endêmica. *Rev Gaúcha Odontol.* 1989;36:371-5.

Soares MDCM, Gaspar MR, Pereira AC, Moreira BHW. Localidades com diferentes concentrações de flúor nas águas de consumo e sua relação com a prevalência de fluorose. *Odont mod.* 1995;22(4):18-21.

Clarkson JJ. International collaborative research on fluoride. *J Dent Res.* 2000;79(4):893-904.

Committee on biological markers of the national research council. Biological markers in environment health research. *Environ Health Perspect.* 1987;74:3-9.

Cullen MR, Redlich CA. Significance of individual sensitivity to chemicals: elucidation of host susceptibility by use of biomarkers in environmental health research. *Clin Chem.* 1995; 41(12): 1809-13.

Cury JA, Del Fiol FS, Tenuta LMA, Rosalen PL. Low-fluoride dentifrice and gastrointestinal fluoride absorption after meals. *J Dent Res.* 2005;84(12):1133-7.

Dawes C, Weatherell JA. Kinetics of fluoride in oral fluids. *J Dent Res.* 1990;69(spec):638-44.

Dean HT. The investigation of physiological effects by the epidemiological method, In: Moulton FR, Fluorine and dental health, Washington DC: American Association for the Advancement of Science; 1942, 23-31.

Dean HT, Arnold FA, Elvove E. Domestic water and dental caries. V. Additional studies of the relation of fluoride domestic waters to dental caries experience in 4,425 white children aged 12-14 years in 13 cities in 4 states. Public Health Rep. 1942; 57:1155-79.

Dean HT, Arnold FA, Jay P, Knutson JW. Studies on mass control of dental caries through fluoridation of the public water supply. Public Health Rep. 1950 ;65(43):1403-8.

DenBesten PK. Biological mechanisms of dental fluorosis relevant to the use of fluoride supplements. Community Dent Oral Epidemiol. 1999;27(1):41-7.

DenBesten PK. Dental fluorosis: its use as a biomarker. Adv Dent Res. 1994;8(1):105-10.

Drummond BK, Curzon ME, Strong M. Estimation of fluoride absorption from swallowed fluoride toothpastes. Caries Res. 1990;24(3):211-5.

Duckworth RM, Knoop DT, Stephen KW. Effect of mouthrinsing with a fluoride dentifrice on human salivary fluoride levels. Caries Res. 1991;25(4):287-91.

Duckworth RM, Morgan SN, Gilbert RJ. Oral fluoride measurements for estimation of the anti-caries efficacy of fluoride treatments. J Dent Res. 1992;71(spec):836-40.

Duckworth RM, Morgan SN, Murray AM. Fluoride in saliva and plaque following use of fluoride-containing mouthwashes. J Dent Res. 1987;66(12):1730-4.

Eager JM. Public Health Reports, November 1, 1901: Denti di Chiaie (Chiaie teeth), Public Health Rep. 1976;91(3):284-5.

Ekstrand J. A micromethod for the determination of fluoride in blood plasma and saliva. Calcif Tissue Res. 1977;23(3):225-8.

Ekstrand J. Fluoride concentrations in saliva after single oral doses and their relation to plasma fluoride. Scand J Dent Res. 1977;85(1):16-7.

Ekstrand J. Relationship between fluoride in the drinking water and the plasma fluoride concentration in man. *Caries Res.* 1978;12(3):123-7.

Ekstrand J, Oliveby A. Fluoride in the oral environment. *Acta Odontol Scand.* 1999;27(6):330-3.

Evans DJ. A study of developmental defects in enamel in 10-year-old high social class children residing in a non-fluoridated area. *Community Dent Health.* 1991;8(1):31-8.

Evans RW, Darvell BW. Refining the estimate of the critical period for susceptibility to enamel fluorosis in human maxillary central incisors. *J Public Health Dent.* 1995;55(4):238-49.

Fejerskov O, Richards A, DenBesten P. The effect of fluoride on tooth mineralization. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA, Fluoride in dentistry, 2nd ed, Copenhagen: Munksgaard; 1996, 112-52.

Fejerskov O, Thylstrup A, Larsen MJ. Rational use of fluorides in caries prevention. A concept based on possible cariostatic mechanisms. *Acta Odontol Scand.* 1981;39(4):241-9.

Feskanich D, Owusu W, Hunter DJ, Willett W, Ascherio A, Spiegelman D, et al. Use of toenail fluoride levels as an indicator for the risk of hip and forearm fractures in women. *Epidemiology.* 1998;9(4):412-6.

Forsman B. Early supply of fluoride and enamel fluorosis. *Scand J Dent Res.* 1977;85(1):22-30.

Grandjean P. Biomarkers in epidemiology. *Clin Chem.* 1995;41(12):1800-3.

Grimaldo M, Borja-Aburto VH, Ramirez AL, Ponce M, Rosas M, Diaz-Barriga F. Endemic fluorosis in San Luis Potosi, Mexico. I. Identification of risk factors associated with human exposure to fluoride. *Environ Res.* 1995;68(1):25-30.

Guha-Chowdhury N, Drummond BK, Smillie AC. Total fluoride intake in children aged 3 to 4 years – a longitudinal study. *J Dent Res.* 1996;75(7):1451- 7.

Hamilton JB, Terada H, Mestler GE. Studies of growth throughout the lifespan in Japanese: growth and size of nails and their relationship to age, sex, heredity, and other factors. *J Gerontol*. 1955;10(4):401-15.

Hanhijarvi H. Ionic serum fluoride concentrations and age in a low-fluoride community. *Proc Finn Dent Soc*. 1981;77(4):222-7.

Hanhijarvi H, Penttila I, Pekkarinen A. Human ionic plasma fluoride concentrations and age in a fluoridated community. *Proc Finn Dent Soc*. 1981;77(4):211-21.

Hewitt DJ, Millner GC, Nye AC, Simmons HF. Investigation of arsenic exposure from soil at a superfund site. *Environ Res*. 1995;68(2):73-81.

Hopps HC. The biologic bases for using hair and nail for analyses of trace elements. *Sci Total Environ*. 1977;7(1):71-89.

Hulka BS. ASPO Distinguished Achievement Award Lecture, Epidemiological studies using biological markers: issues for epidemiologists. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1991;1(1):13-9.

Irigoyen ME, Molina N, Luengas I. Prevalence and severity of dental fluorosis in a Mexican community with above-optimal fluoride concentration in drinking water. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1995;23(4):243-5.

Issa AI, Toumba KJ. Oral fluoride retention in saliva following toothbrushing with child and adult dentifrices with and without water rinsing. *Caries Res*. 2004;38(1):15-9.

Jackson RD, Brizendine EJ, Kelly SA, Hinesley R, Stookey GK, Dunipace AJ. The fluoride content of foods and beverages from negligibly and optimally fluoridated communities. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002;30(5):382-91.

Jackson RD, Kelly SA, Katz B, Brizendine E, Stookey GK. Dental fluorosis in children residing in communities with different water fluoride levels: 33-month follow-up. *Pediatr Dent*. 1999;21(4):248-54.

Juncos LI, Donadio JV Jr. Renal failure and fluorosis. *JAMA*. 1972;222(7):783-5.

Kaminsky LS, Mahoney MC, Leach J, Melius J, Miller MJ. Fluoride: benefits and risks of exposure. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1990;1(4):261-81.

Khan A, Moola MH, Cleaton-Jones P. Global trends in dental fluorosis from 1980 to 2000: a systematic review. *SADJ*. 2005;60(10):418-21.

Kimura T, Morita M, Kinoshita T, Tsuneishi M, Akagi T, Yamashita F, Watanabe T. Fluoride intake from food and drink in Japanese children aged 1-6 years. *Caries Res*. 2001;35(1):47-9.

Lagerlof F, Oliveby A, Ekstrand J. Physiological factors influencing salivary clearance of sugar and fluoride. *J Dent Res*. 1987;66(2):430-5.

Lalumandier JA, Rozier RG. The prevalence and risk factors of fluorosis among patients in a pediatric dental practice. *Pediatr Dent*. 1995;17(1):19-25.

Leake J, Goettler F, Stahl-Quinlan B, Stewart H. Has the level of dental fluorosis among Toronto children changed? *J Can Dent Assoc*. 2002;68(1):21-5.

Leverett D. Prevalence of dental fluorosis in fluoridated and nonfluoridated communities - a preliminary investigation, *J Public Health Dent*, 1986;46(4):184-7,

Levy SM, Warren JJ, Davis CS, Kirchner HL, Kanellis MJ, Wefel JS. Patterns of fluoride intake from birth to 36 months. *J Public Health Dent*. 2001;61(2):70-7.

Levy FM, Bastos JR, Buzalaf MAR. Nails as biomarkers of fluoride in children of fluoridated communities. *J Dent Child*. 2004;71(2):121-5.

Mabelya L, König KG, van Palenstein Helderman WH. Dental fluorosis, altitude, and associated dietary factors (short communication). *Caries Res*. 1992;26(1):65-7.

Mabelya L, van Palenstein Helderman WH, van't Hof MA, König KG. Dental fluorosis and the use of a high fluoride-containing trona tenderizer (magadi). *Community Dent Oral Epidemiol*. 1997;25(2):170-6.

Machoy Z. Effects of environment upon fluoride content in nails in children. *Fluoride*. 1989;22(4):169-73.

Maguire A, Zohouri FV, Mathers JC, Steen IN, Hindmarch PN, Moynihan PJ. Bioavailability of fluoride in drinking water: a human experimental study. *J Dent Res*. 2005;84(11):989-93.

- Maltz M, Farias C. Fluorose dentária em escolares de quatro cidades brasileiras com e sem água artificialmente fluoretada. *Rev Fac Odont Porto Alegre*. 1998;39(2):18-21.
- Manji F, Baelum V, Fejerskov O, Gemert W. Enamel changes in two low-fluoride areas of Kenya. *Caries Res*. 1986;20(4):371-80.
- Mascarenhas AK. Risk factors for dental fluorosis: a review of the recent literature. *Pediatr Dent*. 2000;22(4):269-77.
- McClure FJ. Water fluoridation. The search and the victory. Washington, DC, Us Government Printing Office. 1970.
- McDonagh MS, Whiting PF, Wilson PM, Sutton AJ, Chestnutt I, Cooper J, et al. Systematic review of water fluoridation. *BMJ*. 2000;321(7265):855-9.
- McDonnell ST, O'Mullane D, Cronin M, MacCormac C, Kirk J. Relevant factors when considering fingernail clippings as a fluoride biomarker. *Community Dent Health*. 2004;21(1):19-24.
- Mckay FS. Mottled enamel: The prevetion of its further production though a chance of water supply at Oakley, IDA. *J Am Dent Assoc*. 1933;20(7):1137-49.
- Medical Research Council (2002). MRC Working Group report on: Water fluoridation and health, London: MRC, 11-7.
- Ministério da Saúde, Projeto SB Brasil 2003: Condições bucal da população brasileira 2002-2003 [na internet], Brasília (DF); 2004 [acesso em 2007 ago 3]. Disponível em: http://www.apcd.org.br/prevencao/arquivos/projeto_sb_brasil.pdf
- Nagra MS, Pallah BS, Sahota GPS, Singh H, Sahota HS. A study of trace-elements in scalp hair and fingernails of industrial workers of Ontario, Canada. *J Radioanalyt Nucl Chem*. 1992;162(2):283-8.
- Ogaard B, Rolla G, Dijkman T, Ruben J, Arends J. Effect of fluoride mouthrinsing on caries lesion development in shark enamel: an in situ caries model study. *Scand J Dent Res*. 1991;99(5):372-7.

Ogaard B, Rolla G, Ruben J, Dijkman T, Arends J. Microradiographic study of demineralization of shark enamel in a human caries model. *Scand J Dent Res*. 1988 Jun;96(3):209-11.

Oliveby A, Ekstrand J, Lagerlöf F. Effect of salivary flow rate on salivary fluoride clearance after use of a fluoride-containing chewing gum. *Caries Res*. 1987;21(5):393-401.

Oliveby A, Lagerlof F, Ekstrand J, Dawes C. Influence of flow rate, pH and plasma fluoride concentrations on fluoride concentration in human parotid saliva. *Arch Oral Biol*. 1989;34(3):191-4.

Oliveby A, Lagerlof F, Ekstrand J, Dawes C. Studies on fluoride concentrations in human submandibular/sublingual saliva and their relation to flow rate and plasma fluoride levels. *J Dent Res*. 1989;68(2):146-9.

Oliveby A, Lagerlof F, Ekstrand J, Dawes C. Studies on fluoride excretion in human whole saliva and its relation to flow rate and plasma fluoride levels. *Caries Res*. 1989;23(4):243-6.

Oliveby A, Twetman S, Ekstrand J. Diurnal fluoride concentration in whole saliva in children living in a high- and a low-fluoride area. *Caries Res*. 1990;24(1):44-7.

Ophaug R. Determination of fluorine in biological materials: reaction paper. *Adv Dent Res*. 1994;8(1):87-91.

Ophaug RH, Singer L, Harland BF. Estimated fluoride intake of 6-month-old infants in four dietary regions of the United States. *Am J Clin Nutr*. 1980;33(2):324-7.

O'rahilly R. Cútis, pelos e unhas. In: Gardner E, Gray DJ, O'rahilly R. *Anatomia estudo regional do corpo humano*. 2.ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1964, Cap.8, 66-74.

Osuji OO, Leake JL, Chipman ML, Nikiforuk G, Locker D, Levine N. Risk factors for dental fluorosis in a fluoridated community. *J Dent Res*. 1988; 67(12):1488-92.

Paiva SM, Lima YBO, Cury JA. Fluoride intake by Brazilian children from two communities with fluoridated water. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2003;31(3):184-91.

Pendrys DG. Risk of fluorosis in a fluoridated population. Implications for the dentist and hygienist. *J Am Dent Ass.* 1995;126(12):1617-24.

Pendrys DG, Katz RV. Risk of enamel fluorosis associated with fluoride supplementation, infant formula, and fluoride dentifrice use. *Am J Epidemiol.* 1989; 130(6):1199-208.

Pendrys DG, Katz RV. Risk factors for enamel fluorosis in optimally fluoridated children born after the US manufacturer's decision to reduce the fluoride concentration of infant formula. *Am J Epidemiol.* 1998;148(10):967-74.

Pendrys DG, Katz RV, Morse DE. Risk factors for enamel fluorosis in a fluoridated population. *Am J Epidemiol.* 1994; 140(5):461-71.

Pendrys DG, Katz RV, Morse DE. Risk factors for enamel fluorosis in a nonfluoridated population. *Am J Epidemiol.* 1996; 143(8):808-15.

Pereira AC, Cunha FL, Meneghim MC, Werner CW. Dental caries and fluorosis prevalence study in a nonfluoridated Brazilian community: trend analysis and toothpaste association. *ASDC J Dent Child.* 2000;67(2):132-5.

Pessan JP, Pin ML, Martinhon CC, de Silva SM, Granjeiro JM, Buzalaf MAR. Analysis of fingernails and urine as biomarkers of fluoride exposure from dentifrice and varnish in 4- to 7-year-old children. *Caries Res.* 2005;39(5):363-70.

Pessan JP, Sicca CM, de Souza TS, da Silva SM, Whitford GM, Buzalaf MAR. Fluoride concentrations in dental plaque and saliva after the use of a fluoride dentifrice preceded by a calcium lactate rinse. *Eur J Oral Sci.* 2006;114(6):489-93.

Pinto CS, Maria AG, Cardoso VES, Sampaio FC, Buzalaf MAR. Biodisponibilidade do flúor na água natural e artificialmente fluoretada: influência da concentração de Ca e do F em solução. *Braz Oral Res.* 2005;19(suppl):96. Apresentado na 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica: 2005 setembro 4-7; Águas de Lindóia, SP.

Porcar C, Bronsoms J, Lopez-Bonet E, Valles M. Fluorosis, osteomalacia and pseudohyperparathyroidism in a patient with renal failure. *Nephron.* 1998;79(2):234-5.

Ramires I, Grec RH, Cattán L, Moura PG, Lauris JR, Buzalaf MA. Evaluation of the fluoride concentration and consumption of mineral water. *Rev Saude Publica*. 2004;38(3):459-65.

Ramires I, Olympio KPK, Maria AG, Pessan JP, Cardoso VES, Lodi CS, Buzalaf MAR. Fluoridation of the public water supply and prevalence of dental fluorosis in a peripheral district of the municipality of Bauru, SP. *J Appl Oral Sci*. 2006;14(2) 136-41.

Ramires I, Maia LP, Rigolizzo Ddos S, Lauris JR, Buzalaf MAR. External control over the fluoridation of the public water supply in Bauru, SP, Brazil. *Rev Saude Publica*. 2006;40(5):883-9.

Ramires I, Pessan JP, Levy FM, Rodrigues MHC, Almeida BS, Kato MT, et al. Prevalence of dental fluorosis in Bauru, São Paulo, Brazil. *J Appl Oral Sci*. 2007;15(2):140-3.

Report for working group I. Strategies for improving the assessment of fluoride accumulation in body fluids and tissues. *Adv Dent Res*. 1994;8(1):113-5.

Riordan PJ, Banks JA. Dental fluorosis and fluoride exposure in Western Australia. *J Dent Res*. 1991;70(7):1022-8.

Riordan, PJ. Dental fluorosis, dental caries and fluoride exposure among 7-year-olds. *Caries Res*. 1993;27(1):71-7.

Rodrigues MHC, Bastos JRM, Buzalaf MAR. Fingernails and toenails as biomarkers of subchronic exposure to fluoride from dentifrice in 2- to 3-year-old children. *Caries Res*. 2004;38(2):109-14.

Rølla G, Ekstrand J. Fluoride in oral fluids and dental plaque. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA. *Fluoride in dentistry*. 2nd ed, Copenhagen: Munksgaard; 1996, 215-29.

Rugg-Gunn AJ, Al-Mohammadi SM, Butler TJ. Effects of fluoride level in the drinking water, nutritional status and socio-economic status on the prevalence of developmental defects of dental enamel in permanent teeth in Saudi 14-year-old boys. *Caries Res*. 1997;31(4):259-67.

Rwenyonyi C, Bjorvatn K, Birkeland J, Haugejorden O. Altitude as a risk indicator of dental fluorosis in children residing in areas with 0,5 and 2,5 mg fluoride per litre in drinking water. *Caries Res.* 1999;33(4):267-74.

Sampaio FC. Fluoride exposures and biomarkers in humans. Oslo, Norway: Faculty of Dentistry, University of Oslo; 2000.

Sampaio FC, Von der Fehr FR, Arneberg P, Gigante DP, Hatloy A. Dental fluorosis and nutritional status of 6- to 11-year-old children living in rural areas of Paraiba, Brazil. *Caries Res.* 1999;33(1):66-73.

Sampaio FC, Whitford GM, Arneberg P, von der Fehr FR. Validation of fingernail fluoride as a biomarker for dental fluorosis. *Caries Res.* 2003;37:291-2 (Abs 72).

Schamschula RG, Sugar E, Un PS, Toth K, Barmes DE, Adkins BL. Physiological indicators of fluoride exposure and utilization: an epidemiological study. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1985;13(2):104-7.

Schmidt CW, Leuschke W. Fluoride content in fingernails of individuals with and without chronic fluoride exposure. *Fluoride.* 1990;23(2):79-82.

Seppa L, Hanhijarvi H. Fluoride concentration in whole and parotid saliva after application of fluoride varnishes. *Caries Res.* 1983;17(5):476-80.

Seppa L, Salmenkivi S, Hausen H. Salivary fluoride concentration in adults after different fluoride procedures. *Acta Odontol Scand.* 1997;55(2):84-7.

Shannon IL, Chauncey HH. A parotid fluid collection device with improved stability characteristics. *J Oral Ther Pharmacol.* 1967;4(2):93-7.

Sjögren K, Birkhed D. Effect of various post-brushing activities on salivary fluoride concentration after toothbrushing with a sodium fluoride dentifrice. *Caries Res.* 1994;28(2):127-31.

Skotowski MC, Hunt RJ, Levy SM. Risk factors for dental fluorosis in pediatric dental patients. *J Public Health Dent.* 1995;55(3):154-9.

Spate VL, Morris JS, Baskett CK, Mason MM, Reams CL, Hunter D, et al. Determination of fluoride in human nails via cyclic instrumental neutron activation analysis. *J Radioanalyt Nucl Chem.* 1994;179:27-33.

Szpunar SM, Burt BA. Dental caries, fluorosis, and fluoride exposure in Michigan schoolchildren. *J Dent Res.* 1988;67(5):802-6.

Tabari ED, Ellwood R, Rugg-Gunn AJ, Evans DJ, Davies RM. Dental fluorosis in permanent incisor teeth in relation to water fluoridation, social deprivation and toothpaste use in infancy. *Br Dent J.* 2000;189(4):216-20.

Taves DR. Determination of submicromolar concentrations of fluoride in biological samples. *Talanta.* 1968;15:1015-23.

Ten Cate JM, Duijsters PP. Influence of fluoride in solution on tooth demineralization. II. Microradiographic data. *Caries Res.* 1983;17(6):513-9.

Ten Cate JM, Featherstone JD. Mechanistic aspects of the interactions between fluoride and dental enamel. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1991;2(3):283-96.

Tsutsui A, Yagi M, Horowitz AM. The prevalence of dental caries and fluorosis in Japanese communities with up to 1,4 ppm of naturally occurring fluoride. *J Public Health Dent.* 2000;60(3):147-53.

Turner CH, Owan I, Brizendine EJ, Zhang W, Wilson ME, Dunipace AJ. High fluoride intakes cause osteomalacia and diminished bone strength in rats with renal deficiency. *Bone.* 1996;19(6):595-601.

Viegas AR, Viegas I, Castellanos RA, Rosa AGF. Fluoretação da água de abastecimento público. *Rev Ass Paul Cir Dent.* 1987;41(4):202-4.

Villena RS, Borges DG, Cury JA. Avaliação da concentração de flúor em águas minerais comercializadas no Brasil. *Rev Saúde Publ.* 1996;30(6):512-8.

Vogel GL, Carey CM, Chow LC, Ekstrand J. Fluoride analysis in nanoliter- and microliter-size fluid samples. *J Dent Res.* 1990;69(Spec):522-8.

Wang NJ, Gropen AM, Ogaard B. Risk factors associated with fluorosis in a non-fluoridated population in Norway. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1997;25(6):396-401.

Whitford GM. Determinants and mechanisms of enamel fluorosis. *Ciba Found Symp.* 1997;205:226-41.

Whitford GM. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res.* 1994;8(1):8-14.

Whitford GM. Monitoring fluoride exposure with fingernail clippings. *Schweiz Monatsschr Zahnmed.* 2005;115(8):685-9.

Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. Basel: Karger; 1996.

Whitford GM. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *J Dent Res.* 1990;69(Spec):539-49.

Whitford GM, Buzalaf MA, Bijella MF, Waller JL. Plaque fluoride concentrations in a community without water fluoridation: effects of calcium and use of a fluoride or placebo dentifrice. *Caries Res.* 2005;39(2):100-7.

Whitford GM, Sampaio FC, Arneberg P, von der Fehr FR. Fingernail fluoride: a method for monitoring fluoride exposure. *Caries Res.* 1999;33(6):462-7.

Whitford GM, Thomas JE, Adair SM. Fluoride in whole saliva, parotid ductal saliva and plasma in children. *Arch Oral Biol.* 1999;44(10):785-8.

Whitford GM, Wasdin JL, Schafer TE, Adair SM. Plaque fluoride concentrations are dependent on plaque calcium concentrations. *Caries Res.* 2002;36(4):256-65.

Wilson AC, Bawden JW. Salivary fluoride concentrations in children with various systemic fluoride exposures. *Pediatr Dent.* 1991;13(2):103-5.

World Health Organization. Fluorides and oral health, Report of a WHO expert committee and oral health status and fluoride use. WHO Technical Report Series 846, Geneva: WHO; 1994.

World Health Organization. Fluoride in drinking water, Geneva: IWA; 2006.

Yoder KM, Mabelya L, Robison VA, Dunipace AJ, Brizendine EJ, Stookey GK. Severe dental fluorosis in a Tanzanian population consuming water with negligible fluoride concentration. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1998;26(6):382-93.

Zero DT, Raubertas RF, Fu J, Pedersen AM, Hayes AL, Featherstone JD. Fluoride concentrations in plaque, whole saliva, and ductal saliva after application of home-use topical fluorides. *J Dent Res.* 1992;71(11):1768-75.

Anexos

Anexos

ANEXO A - Carta de informação ao paciente

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Comitê de Ética em Pesquisa

Carta de Informação ao Voluntário

Nome do voluntário: _____

As informações contidas nesta carta serão fornecidas pela aluna de Doutorado Rejane Fukushima, sob a orientação da Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf e do Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio, com o intuito de informar ao voluntário 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

Unhas humanas como marcadores biológicos de exposição ao flúor: Correlação com a saliva da parótida e influência da idade.

2 - Objetivo

O objetivo deste trabalho é avaliar se existe relação entre a concentração de flúor presente nas unhas e na saliva da glândula parótida de voluntários de quatro faixas etárias diferentes. Além disso, serão comparadas unhas das mãos com unhas dos pés.

3 - Procedimentos da Fase Experimental

O experimento será feito em 2 dias distintos previamente estabelecidos, sendo que em cada dia serão repetidos os mesmos procedimentos. Os voluntários

deverão escovar os dentes pela manhã de modo habitual e então não escovar mais os dentes até o horário marcado para coleta da saliva. A alimentação será mantida de modo usual. Para coleta da saliva será pingado suco de limão na língua e então toda a saliva produzida será coletada por 3 minutos. Depois disto, será colocado um coletor na bochecha e coletada uma amostra de saliva diretamente da glândula salivar, por 3 minutos. Neste dia os voluntários deverão fornecer amostras das unhas das mãos e dos pés.

4 - Benefícios do Experimento

Essa pesquisa fornecerá dados importantes com relação ao uso da unha e da saliva do ducto da glândula parótida como indicadores da exposição ao flúor.

5 - Informações

Os voluntários, 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 3235-8246 (Laboratório de Bioquímica).

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

_____, ____ de _____ de 200__

Local e data

Nome do voluntário, pai/mãe ou responsável

Assinatura do voluntário, pai/mãe ou responsável

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Comitê de Ética em Pesquisa
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o senhor(a) _____, portador(a) da cédula de identidade número _____, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pela profissional em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível.

Fica claro que o voluntário ou seu representante legal pode a qualquer momento retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art, 9º do Código de Ética Odontológica),

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo,
_____, ____ de _____ de 200__

Assinatura do voluntário, pai/mãe ou responsável

Profa. Dra. Marília Afonso R. Buzalaf

Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

Orientadores

Rejane Fukushima
Pesquisadora responsável