UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

PRISCILA AP. TEIXEIRA DE MUNO BARRETA

**Influência da administração concomitante de fluoreto através da
água de beber no metabolismo e incorporação de chumbo em
ratos: estudo dose-resposta**

BAURU
2013

PRISCILA AP. TEIXEIRA DE MUNO BARRETA

**Influência da administração concomitante de fluoreto através da
água de beber no metabolismo e incorporação de chumbo em
ratos: estudo dose-resposta**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Estomatologia e Biologia Oral.

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

Versão Corrigida

BAURU
2013

B275i

Barreta, Priscila Ap. Teixeira de Muno

Influência da administração concomitante de fluoreto através da água de beber no metabolismo e incorporação de chumbo em ratos: estudo dose-resposta/Priscila Ap. T. de Muno Barreta – Bauru, 2013. 80 p. : il. ; 31cm.

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

Orientador: Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

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

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP
Protocolo nº:031/2010
Data:14/12/2010

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico todo este trabalho à **Deus**, que sempre esta comigo, me dando orientação, fé e a sabedoria para vencer os desafios da vida. Muito obrigada por ter colocado pessoas especiais em minha vida, que me ensinam valores e contribuem para que a cada dia eu tenha a oportunidade de ser melhor. Obrigada por sempre estar presente em todos os momentos de minha vida.

“ Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes ”

(Marthin Luther King)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Meus sinceros agradecimentos à minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Marília Afonso Rabelo Buzalaf**. Professora, não tenho palavras para descrever a senhora, que sempre se disponibilizou de muita paciência para me orientar. Pode ter certeza que a senhora tem todo meu carinho, respeito, gratidão e muita admiração. Meus agradecimentos provêm de todo esse tempo que trabalhamos juntas. A senhora, mesmo sem me conhecer, me recebeu de portas abertas na Laboratório de Bioquímica, quando vim pedir um estágio supervisionado em 2009 através da minha graduação. Te admiro pela sua simplicidade, mesmo sendo tao reconhecida no mundo científico, esta sempre a disposição para ajudar e orientar os alunos com um jeitinho materno. Tenha a certeza que todo esse reconhecimento no mundo acadêmico e científico é fruto do seu trabalho realizado com tanta dedicação, esforço e muito amor, quem teve a oportunidade de conhecer e trabalhar com a senhora sabe o quanto se dedica. Não tenho palavras para agradecer a oportunidade que me deu de ser sua aluna e crescer como profissional e como pessoa, aprendi valores que levarei para toda a vida. Quando alguém me perguntava o que eu fazia, era sempre um orgulho responder: “faço mestrado na FOB, no Departamento de Bioquímica e sou orientada pela Professora Dr. Marília Buzalaf”. Professora muito, mas muito obrigada, meus mais sinceros e profundos agradecimentos, a senhora é e sempre sera um exemplo para mim de profissional, de pessoa. Agradeço a Deus por ter dado a oportunidade em conhece-la e peço a Ele que continue a abençoando. Muito obrigada por tudo!

Gostaria de agradecer as pessoas que compartilharam essa fase importante em minha vida, seja de uma forma mais presente em meus dias ou simplesmente pelos gestos de carinho e preocupação ao longo desse tempo. A minha mãe **Cleide**, que sempre estava de braços abertos e palavras doces para me fortacer nas horas dificies, as suas palavras e seu amor são eternos em minha vida, como eu sempre falo: você é minha estrelinha e

---

---

preciso muito de seu brilho, não tenho palavras para agradecer mãe, eu simplesmente te amo da forma mais sincera que existe. A meu pai **Marcelo**, que mesmo não estando sempre presente em meus dias, ligava para saber se estava tudo bem e sempre demonstrava carinho, sinto sua falta mas aprendi que tudo nessa vida tem um motivo, como você mesmo fala: faço o que eu digo mas nem sempre faça o que eu faço, você me ensinou valores que vou levar para sempre, obrigada por tudo, e sei que posso contar com você, te amo. Ao meu esposo **Alison**, amor você é meu porto seguro, sempre me dando força e me alegrando depois de um dia difícil, obrigada por ser amigo, esposo, pela paciência e por se dedicar em nosso relacionamento, agradeço a Deus por ter você em minha vida, muito obrigada por tudo, eu te amo. A dona **Faride, Cristiane e Viviane**, que sempre demonstraram carinho e dedicação comigo, muito obrigada. A **Marcelo, Barbara e Marcelo Henrique, Tio Emilio e Elaine** por fazerem parte de minha vida.

A todos os amigos e amigas: **Melina, Taisa, Bruno, Claudia, Juliana, Janete, Milene, Meire, Daniela, Camila, Rubens, Maria Cecilia, Fernanda Zuck, Heloisa, Carina e Elcia** cada um de vocês sabem o quanto são especiais, obrigada pela amizade e o carinho !

Gostaria de agradecer de uma forma especial aos funcionários **Ovideo** e **Thelma**, que nunca mediram esforços para me ajudar. Eu me sentia segura com vocês auxiliando nos sacrifícios. Ovideo, obrigada pela enorme ajuda nos sacrifícios, mesmo com dor estava firme e disposto a ajudar. gada Thelma, pela paciência dia e noite a fora nas leituras de F. Não tenho palavras para agradecer, tenho muito respeito e admiração pelos profissionais e as pessoas que são, aprendi muito com vocês.

Muito obrigada!

Peço a Deus que continue abençoando, cada um que fez parte dessa etapa cumprida em minha vida, muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

À **CAPES** e **FAPESP**, processo:2010/13216-3, por todo auxílio financeiro fornecido através da bolsa de estudos, que viabilizou a realização e conclusão deste projeto.

À **Faculdade de Odontologia de Bauru**, na pessoa de seu Diretor **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, a qual confere uma estrutura formidável, meus agradecimentos pela oportunidade de cursar o mestrado nesta universidade. À **Comissão de Pós-Graduação**, na sua pessoa o presidente, Prof. Dr. **Paulo Rodrigues Conti**, e a **Biblioteca** pelo auxílio e orientação. Em especial, à **Vera Lucia**, secretária do Departamento de Ciências Biológicas, sempre tão prestativa e atenciosa !

Agradeço ao Professor Dr. **Fernando Barbosa Jr.**, do Laboratório de Ciências Farmacêuticas da USP de Ribeirão Preto, por ter cedido seu laboratório sem medir esforços para a realização das análises de chumbo nas amostras e a técnica de seu Laboratório **Vanessa**, pela atenção e dedicação em realizar as análises, sempre disposta a responder as minhas dúvidas. Agradeço também a Professora Dr. **Raquel**, pela atenção dada todas as vezes que precisamos. A ajuda de todos vocês foi essencial e de extrema importância para o andamento e desenvolvimento da pesquisa. Muito obrigada !

Agradeço aos professores **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso** , **Prof^a. Dr^a. Ana Carolina Magalhães** e **Ligia Subitoni Antonio** por serem pessoas de muito conhecimento. Também agradeço ao professor do Departamento de Farmacologia : **Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria**, por ter me supervisionado no PAE , jamais irei esquecer todos os ensinamentos, sou muito grata!. A todos os funcionários do Laboratório de Bioquímica: **Thelma, Aline e Larissa**, meus sinceros agradecimentos por toda ajuda!

Aos funcionários do Biotério da FOB: **Erasmus, Luiz, Elias e Richard**, pelo profissionalismo, pela atenção que sempre me receberam, tenho um profundo respeito e admiração pelos profissionais que são, muito obrigada.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os níveis de F e Pb circulantes, excretados e incorporados no tecido ósseo em ratos expostos simultaneamente ao F e Pb através da água de beber desde a gestação, levando-se em consideração diferentes doses de Pb e F e dois tipos de sais fluoretados. Para tal, 280 ratos *Wistar* machos foram divididos em 28 grupos contendo 10 animais cada. As diferenças entre os grupos foram as concentrações, na água de beber, de Pb (0, 1, 10 ou 30 mg/L) e de F (0, 5, 50 ou 100 mg/L), em dois tipos de sais (NaF ou H₂SiF₆). Os animais foram expostos ao tratamento desde a gestação até completarem 80 dias de vida, quando foram eutanasiados e o sangue foi removido para análise de Pb e F (no sangue total e plasma, respectivamente). Também foi coletado o fêmur direito, para análises de F e Pb. Ainda foram coletadas amostras de urina e fezes (24 horas) dos animais alojados em gaiolas metabólicas (n=6 por grupo) a cada 14 dias, desde o desmame até a eutanásia, para análises de F e Pb. As análises de Pb foram feitas por ICP-MS e as análises de F foram feitas com o eletrodo, após difusão facilitada por hemametildisiloxano (plasma, fêmur e fezes) ou pelo método direto (urina). Os dados foram analisados por ANOVA a 3 critérios, seguida pela teste de Tukey (p<0,05). Observou-se que o composto fluoretado, a concentração de F na água e a concentração de Pb na água interferiram na retenção de F e de Pb no organismo, indicando que a administração concomitante de F e Pb através da água de beber é capaz de aumentar a incorporação de F e de Pb no tecido ósseo e que a excreção urinária e fecal destes elementos não é suficiente para explicar a maior retenção dos mesmos no organismo. Quando o F foi adicionado à água na forma de H₂SiF₆, concentrações significativamente mais altas de F foram observadas no plasma e osso, e quantidades significativamente menores de F foram excretadas através da urina, aumentando a biodisponibilidade do F no organismo. Maior biodisponibilidade do Pb também foi observada quando o H₂SiF₆ foi utilizado em comparação ao NaF, com concentrações significativamente maiores de Pb no osso, a despeito de uma maior excreção urinária e fecal de Pb. Estes resultados confirmam achados de estudos epidemiológicos e de prova-de-conceito prévios de que a exposição concomitante a silicofluoretos e Pb é capaz de aumentar a biodisponibilidade do Pb, assim como também do F no organismo. Estudos adicionais devem ser conduzidos para investigar os mecanismos que levam a estes efeitos.

Palavras-Chave: Fluoreto de sódio, Ácido fluorossilícico, Metabolismo, Água, Ratos, Chumbo.

ABSTRACT

Influence of concomitant fluoride via drinking water in the metabolism and incorporation of lead in rats: dose-response study

The aim of this study was to evaluate the circulating levels of F and Pb, as well as the levels of F and Pb excreted and uptaken by bone, in rats co-exposed to F and Pb from the drinking water, taking into account different doses of Pb and F and two types of fluoridated salts. For this purpose, 280 male *Wistar* rats were divided into 28 groups (n=10). The differences among the groups were the concentrations of Pb (0, 1, 10 or 30 mg/L) and F [0, 5, 50 or 100 mg/L in two types of salts (NaF or H₂SiF₆)] added in the drinking water to which the females and their offspring were exposed, 1 week before mating until the pups completed 80 days of life. At 80 days of age, the animals were euthanized. Blood was collected for Pb and F analysis (whole blood and plasma, respectively). The right femur was also collected for Pb and F analyses. In addition, throughout the experimental period, urine and feces were collected from the animals housed in metabolic cages (n=6/group) every 14 days, for F and Pb analyses. Pb was analyzed by ICP-MS and F was measured with the electrode, after hexamethyldisiloxane-facilitated diffusion (plasma, femur and feces) or by the direct method (urine). Data were analyzed by 3-way ANOVA and Tukey's test (p<0.05). It was observed that the F compound, the F concentration and the Pb concentration in the drinking water interfered in the retention of Pb and F in the organism. These data indicate that co-exposure to F and Pb from the drinking water increases the F and Pb uptake by bone. This cannot be completely explained by the urinary and fecal excretion of F and Pb. When F was added to the water as H₂SiF₆, significantly higher F concentrations were observed in plasma and bone, while significantly lower amounts of F were excreted through urine, increasing the bioavailability of F in the organism. Also higher bioavailability of Pb was observed upon administration of H₂SiF₆ when compared to NaF (significantly higher concentrations of Pb were observed in bone, despite the excretion of Pb from feces and urine was higher). These results reinforce the findings of previous epidemiological and proof-of-concept studies that report increased bioavailability of Pb and F in the organism upon co-exposure to silicofluorides and Pb. Additional studies should be conducted to investigate the mechanisms that lead to these effects.

Keywords : Sodium Fluoride , Fluorosilicic Acid Metabolism, Water, Rats, Lead .

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** A) Punção cardíaca. B) Sangue total para análise de Pb. C) Plasma para análise de F. 32
- Figura 2.** A) Amostras nas placas de Petri com 3 gotas de NaOH na superfície interna da tampa. B) União das 3 gotas de NaOH contendo o F captado das amostras. C) Análise de F com o eletrodo íon-sensível, acoplado ao eletrodo de referência calomelano.....35
-

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Peso (g) dos ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H₂SiF₆) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação 42
- Tabela 2** - Concentração plasmática média (DP) de fluoreto (mg/L) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H₂SiF₆) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação 45
- Tabela 3** - Teste de Tukey para a variável concentração plasmática de fluoreto (mg/L) em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de Pb adicionados à água de beber 45
- Tabela 4** - Concentração de fluoreto média (DP) no osso (mg/Kg) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H₂SiF₆) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação 48
- Tabela 5** - Teste de Tukey para a variável concentração de fluoreto no osso (mg/Kg) em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de Pb adicionados à água de beber 48
- Tabela 6** - Quantidade média (DP) de fluoreto excretada através da urina (µg) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H₂SiF₆) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação. 50
- Tabela 7** - Teste de Tukey para a variável quantidade de fluoreto excretada através da urina (µg) em 24 horas em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de Pb adicionados à água de beber 50
-

Tabela 8 - Quantidade de fluoreto média (DP) excretadas nas fezes (μg) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação	53
Tabela 9 - Teste de Tukey para a variável quantidade de fluoreto excretada através das fezes (μg) em 24 horas em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de Pb adicionados à água de beber	53
Tabela 10 - Concentrações de chumbo médias (DP) no sangue total ($\mu\text{g/L}$) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação	55
Tabela 11 - Teste de Tukey para a variável concentração chumbo no sangue total ($\mu\text{g/L}$) em função da concentração de chumbo adicionado à água de beber	55
Tabela 12 - Concentrações de chumbo médias (DP) no osso ($\mu\text{g/g}$) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação	57
Tabela 13 - Teste de Tukey para a variável concentração chumbo no osso ($\mu\text{g/g}$) em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de chumbo adicionados à água de beber	58
Tabela 14 - Quantidade média (DP) de chumbo excretada através da urina (μg) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação.	59

Tabela 15-	Teste de Tukey para a variável quantidade de chumbo excretada na urina (μg) em função do tipo de composto fluoretado, concentração de chumbo adicionados à água de beber	59
Tabela 16-	Quantidade de chumbo média (DP) excretadas nas fezes (μg) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação	61
Tabela 17-	Teste de Tukey para a variável quantidade de chumbo excretada nas fezes (μg) em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de chumbo adicionados à água de beber	61

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

μL	Microlitros
μg	Microgramas
Pb	Chumbo
NaF	Fluoreto de sódio
H_2SiF_6	Ácido Fluorsilícico
mg	Miligramas
L	Litros
DP	Desvio Padrão
F	Flúor
Kg	Quilogramas
CDTA	Ácido ciclo-hexano diamino tetracético
g	gramas
M	Molar
mL	Mililitros
HMDS	Hexamethyldisilosane
NaOH	Hidroxido de sódio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E SÍNTESE DA LITERATURA.....	13
2	PROPOSIÇÃO	23
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	27
3.1	Animais	29
3.2	Obtenção das amostras.....	32
3.3	Análises de F	33
3.4	Análises de Pb	35
3.5	Análise estatística	36
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS	67
	ANEXOS.....	77

---

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE DA LITERATURA

---

1 INTRODUÇÃO E SÍNTESE DA LITERATURA

O chumbo (Pb) é um metal tóxico, de ocorrência natural na crosta terrestre e não possui nenhuma função fisiológica no organismo humano. É considerado um dos contaminantes mais comuns do ambiente, devido às inúmeras atividades industriais que favorecem a sua grande distribuição. Dentre as atividades industriais, podem se destacar as indústrias extrativa, petrolífera, de acumuladores, tintas, corantes, gráfica e bélica. Sendo assim, a contaminação pelo Pb pode ser derivada tanto de fatores industriais quanto ambientais, podendo ocorrer por inalação (ar atmosférico), ingestão (água, alimentos e solo contaminados) e pele (compostos lipossolúveis) [DeMichele, 1984; Moreira and Moreira, 2004; Toscano and Guilarte, 2005].

A absorção do metal pelo organismo depende da concentração, tempo de exposição, administração concomitante com alimentos, propriedades físico-químicas do composto, idade, estado fisiológico do indivíduo e níveis de Ca, Mg, Fe, P e vitamina D presentes na dieta [DeMichele, 1984; Fine et al., 1976; Forbes and Reina, 1972; Jugo et al., 1975; Rabinowitz et al., 1980; Rabinowitz et al., 1976; Ragan, 1977]. Cerca de 30 a 50% do metal é absorvido por via pulmonar, enquanto que 10 e 15% é absorvido pela via digestiva, podendo haver diferenças entre adultos (16%), crianças (50%) e mulheres grávidas (50%), assim como no caso de o indivíduo estar em jejum (80%). A grande variabilidade existente na absorção do chumbo pela via digestiva deve-se ao fato desta ser altamente dependente da dieta do indivíduo, ou seja, deficiências de Ca, Fe, P e proteínas aumentam a absorção do Pb pela via digestiva, bem como a acidez estomacal. Apenas as formas orgânicas do metal podem ser absorvidas pela via cutânea [ATDSR, 1999].

Uma vez absorvido e entrando na corrente sanguínea, o Pb é distribuído por diversos órgãos e sistemas, sendo encontrado no sangue, tecidos moles e tecidos mineralizados [ATDSR, 1999; Brito et al., 2005; Rabinowitz et al., 1976]. O principal sítio de armazenamento do Pb é o tecido ósseo, que contém de 90 a 95% do conteúdo corpóreo total em adultos e cerca de 70% em crianças [O'Flaherty, 1995; Smith et al., 1996]. O Pb é lentamente liberado do osso para o sangue. De acordo com Rabinowitz [Rabinowitz, 1991], a meia-vida do Pb no osso varia de 10 a 30

---

anos dependendo do *turnover* ósseo. Este varia em função do tipo de osso, sendo lento no osso compacto e rápido no osso trabecular [O'Flaherty, 1995; Rabinowitz et al., 1976]. A meia-vida do Pb no osso é também influenciada pelo nível de exposição a este elemento, sendo $6,5 \pm 0,7$, $13,6 \pm 1,0$ e $47,5 \pm 2,3$ anos em casos de exposição a longo termo baixa, média ou alta ao Pb, respectivamente [Brito et al., 2005]. Em crianças, devido ao crescimento contínuo, há uma constante remodelação óssea para o desenvolvimento esquelético [O'Flaherty, 1995], o que faz com que o Pb armazenado no osso seja constantemente liberado de volta ao compartimento sanguíneo, processo descrito como “contaminação endógena” [Gulson et al., 1996]. Este é um dos motivos pelos quais os efeitos deletérios do Pb são mais pronunciados em crianças jovens. Este processo também é significativo para mulheres grávidas, pois nesta condição também há um aumento na remodelação óssea.

As vias urinária e digestiva são as vias primárias de excreção do Pb, seguidas pelas vias secundárias (bile, suor, cabelo, unha, leite materno, entre outras) [Rabinowitz et al., 1976]. Cerca de 90% do Pb ingerido é eliminado pelas fezes e urina sob a forma de sulfetos insolúveis [Rabinowitz et al., 1976]. A excreção endógena fecal de Pb é cerca de 2,3 vezes maior que a excreção endógena urinária [O'Flaherty, 1993, 1995].

O biomonitoramento da exposição ao Pb reflete o nível atual de exposição de um indivíduo, o que é reflexo de uma exposição recente e/ou passada. Desta maneira, a seleção e a análise apropriadas de biomarcadores de exposição ao Pb são de grande importância para o gerenciamento de cuidados de saúde, tomada de decisões em saúde pública e atividades de prevenção primária [Barbosa et al., 2005]. Os biomarcadores mais comumente utilizados para se medir o nível de exposição ao Pb do organismo são o sangue e/ou a urina, embora também se tenha sugerido a utilização de saliva [Barbosa et al., 2006], unhas, cabelo, fezes [ATDSR, 1999; Barbosa et al., 2005; Sakai, 2000] e do esmalte dentário [Costa de Almeida et al., 2007; de Almeida et al., 2008; Gomes et al., 2004; Olympio et al., 2010a,b; Rabinowitz, 1995].

O sangue total tem sido o principal fluido biológico utilizado para avaliar a exposição ao Pb, tanto com propósitos de *screening* quanto de diagnóstico e monitoramento a longo termo [Barbosa et al., 2005]. Apesar de as análises de Pb no

---

sangue total refletirem a exposição recente, podem também representar exposição passada, como resultado da mobilização do osso [Gulson et al., 1996]. Em indivíduos sem exposição excessiva ao Pb, 45-75% do Pb encontrado no sangue deve ter vindo do osso [Gulson et al., 1995; Smith et al., 1996]. Entretanto, em crianças, tem sido relatado que a contribuição do osso para os níveis de Pb encontrados no sangue pode ser 90% ou mais [Gwiazda et al., 2005], o que dificulta o tratamento em casos de exposição ao Pb. Em 1991, o Centro de Prevenção e Controle de Doenças (CDC) americano estabeleceu que níveis de Pb no sangue acima de 10 µg/dL como um limite de exposição acima do qual deveria haver ações em saúde pública [CDC, 1991]. Apesar disto, há evidências claras de que concentrações de Pb no sangue menores que 10 µg/dL podem causar distúrbios de cognição, aprendizado e comportamento em crianças [Chiodo et al., 2007; Chiodo et al., 2004; Lanphear et al., 2000]. Desta maneira, qualquer fator que possa aumentar os níveis de Pb no sangue é de grande relevância. Recentemente, o relatório do Comitê Consultivo sobre Prevenção do Envenenamento por Chumbo em Crianças (*Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention - ACCLPP*) recomendou que seja adotado um valor de referência baseado no percentil 97,5 da distribuição dos níveis sanguíneos de chumbo em crianças com idade entre 1 e 5 anos, o qual, atualmente, é de 5 ug/dL (ACCLPP, 2012). Este relatório foi revisado pelo CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*), que concordou com estas recomendações (CDC, 2012).

A fluoretação das águas de abastecimento público foi considerada pelo CDC como uma das 10 maiores conquistas em Saúde Pública do século XX, uma vez que se trata de um método de baixo custo, cientificamente justificável e amplamente utilizado, com excelentes resultados para prevenir cárie dentária a nível comunitário [CDC, 1999]. De acordo com revisões sistemáticas, a fluoretação da água de abastecimento permanece como a mais efetiva e socialmente justa medida para levar os efeitos preventivos dos fluoretos à comunidade. Também é relatado que a fluoretação adequada das águas de abastecimento não causa efeitos adversos ao organismo, além da fluorose dentária [Yeung, 2008; McDonagh et al., 2000]. Entretanto, estudos epidemiológicos relativamente recentes têm relatado uma associação entre a utilização de água de abastecimento tratada com fluoreto de silício (SiF) e aumento das concentrações de Pb no sangue em crianças. A razão

---

disto seria o fato de que a presença simultânea de cloreto e SiF favoreceria a corrosão, liberando Pb a partir do encanamento e aumentando a absorção de Pb a partir da água [Maas et al., 2007]. Isto é mais comum em residências mais antigas, já que nas mais modernas o encanamento de Pb tem sido substituído pelo encanamento de cobre.

No estudo de Masters e Coplan [Masters and Coplan, 1999], os autores observaram que crianças residentes em comunidades com casas velhas tinham risco mais elevado de terem concentrações de Pb no sangue mais altas. Num estudo subsequente, o mesmo grupo analisou a concentração de Pb no sangue de 151.225 crianças de 0 a 6 anos de idade, que residiam em 105 comunidades com populações variando de 15.000 a 75.000 habitantes. Os testes foram parte de uma amostra coletada pelo Departamento de Saúde da Criança do Estado de Nova York, de 1994-1998. O estado da fluoretação água de abastecimento foi determinado pelo censo de fluoretação do CDC (1992). Os autores observaram, para cada grupo etário e de gênero, uma associação significativa consistente entre água comunitária tratada com SiF e níveis de Pb no sangue elevados, sendo que a maior probabilidade das crianças terem níveis de Pb no sangue maiores que 10 µg/dL acontecia quando as mesmas eram expostas tanto à água tratada com SiF quanto a outro fator de risco sabidamente associado com níveis altos de Pb no sangue (como, por exemplo, residir em casas velhas) [Masters et al., 2000].

Entretanto, outro grupo de pesquisa considerou que os estudos acima descritos têm importantes limitações, incluindo a falta de covariáveis a nível individual, métodos de amostragem não claros e utilização de dados de concentração de Pb no sangue com distribuição não homogênea e não transformados nos modelos de análise de variância [Macek et al., 2006]. Assim, os autores delinearam outro estudo para testar as possíveis associações entre o método de fluoretação da água e as concentrações de Pb no sangue em crianças americanas, utilizando uma amostra representativa e levando em conta as limitações acima descritas. Os autores utilizaram dados de concentração de Pb em 9.477 crianças (1-16 anos de idade) da Terceira Pesquisa de Exame de Saúde e Nutrição (NHANES) (1988-1994) e dados de fluoretação da água obtidos do censo de fluoretação de 1992. A principal variável de resposta foi a média geométrica da concentração de Pb no sangue e as covariáveis incluíam: idade, gênero, raça/etnia,

---

nível socioeconômico, residência rural ou urbana e intervalo de tempo na residência. A média geométrica das concentrações de Pb no sangue para cada método de fluoretação da água foi: 2,40 µg/dL (Na_2SiF_6), 2,34 µg/dL (H_2SiF_6), 1,78 µg/dL (NaF), 2,24 µg/dL (fluoreto natural ou ausência de fluoreto) e 2,14 µg/dL (estado de fluoretação desconhecido ou misto). No modelo de regressão linear e logística múltipla, houve uma interação significativa entre o método de fluoretação da água e o ano em que os encanamentos foram construídos. Controlando para as covariáveis, o método de fluoretação da água foi significativo apenas nos modelos que incluíam encanamentos construídos antes de 1946 ou de idade desconhecida. Utilizando modelos estrato-específicos para encanamentos de idade conhecida, nem o H_2SiF_6 e nem o Na_2SiF_6 foram associados com concentrações de Pb no sangue mais elevadas. Os próprios autores reconheceram 3 limitações importantes no seu estudo: a) potencial para classificação equivocada de exposição ao F (método de fluoretação); b) potencial para variáveis de confusão, como, por exemplo, ausência de dados sobre a concentração de Pb na água de abastecimento; c) habilidade restrita em rejeitar a hipótese alternativa da existência de diferenças pequenas, mas potencialmente importantes nas concentrações de Pb no sangue em função das categorias de fluoretação da água. Embora não tenham sido encontradas associações entre o método de fluoretação da água e concentrações de Pb no sangue em crianças residentes em casas com encanamentos de idade conhecida, é possível que aumentando-se o tamanho amostras poder-se-ia identificar diferenças significativas. Os autores sugeriram então que fossem realizados estudos adicionais e ressaltaram que outros estudos ecológicos teriam as mesmas limitações descritas por eles, sugerindo então que fossem feitos estudos toxicológicos com animais, que permitem um melhor controle das variáveis envolvidas.

Neste sentido, foi conduzido um estudo “prova-de-conceito” com animais [Sawan et al., 2010]. Os autores administraram a ratos, desde uma semana antes do acasalamento até os animais nascidos estarem com 81 dias, água controle (sem F ou Pb), contendo 30 mg Pb/L (Pb), 100 mg F/L (F) ou ambos (F + Pb, nas doses descritas anteriormente). Ao final do período de exposição, foram coletados sangue e tecidos calcificados (esmalte, dentina e osso) para análise de Pb e F. Foram observadas concentrações de Pb significativamente mais elevadas no sangue do grupo F+Pb ($76,7 \pm 11,0$ µg/dL) quando comparado ao Pb ($22,6 \pm 8,5$ µg/dL). Também

---

foram observadas concentrações de Pb 2 a 3 vezes mais elevadas nos tecidos calcificados no grupo F+Pb comparado ao grupo Pb ($p<0,001$), enquanto que as concentrações de F foram similares em ambos os grupos. Os autores concluíram que o F aumenta consistentemente os níveis de Pb no sangue e nos tecidos calcificados em animais expostos ao que chamaram de “baixas” concentrações de Pb, sugerindo que um efeito biológico ainda desconhecido deve estar por trás da associação epidemiológica que leva a níveis aumentados de Pb no sangue em crianças residentes em comunidades fluoretadas. Neste caso, não houve variáveis de confusão como nos estudos epidemiológicos descritos anteriormente. Os níveis aumentados de Pb no sangue dos animais expostos ao Pb foram atribuídos à interação entre F e Pb e não a um aumento da liberação de Pb a partir do encanamento na presença de F ou outros componentes presentes na água. Se esta interação realmente ocorre, pode trazer grande preocupação em Saúde Pública, uma vez que a adição de F à água de abastecimento é um procedimento seguro, com poucos efeitos adversos, os quais são restritos apenas à fluorose dentária [McDonagh et al., 2000]. Todavia, a presença de altos níveis de F na água, com potencial de elevar os níveis de Pb circulantes, é extremamente preocupante, devido ao grande potencial tóxico deste elemento [ATDSR, 1999; Brito et al., 2005]. No Brasil, à semelhança de outros países, o padrão de potabilidade em relação ao Pb para águas subterrâneas é de apenas 0,01 mg/L [BRASIL., 2004]. Com base neste limite de potabilidade, fica evidente que a concentração de Pb utilizada que foi descrita como “baixa” no estudo de Sawan et al. [Sawan et al., 2010] na verdade é muito alta quando se pensa na presença deste elemento na água de abastecimento. Em adição, a concentração de F utilizada no estudo de Sawan et al. [Sawan et al., 2010] também é muito elevada. Sabe-se que o metabolismo do F em ratos é de 4 a 5 vezes mais rápido que em humanos. Assim, os ratos têm que ingerir água com uma concentração de F 4-5 vezes maior que aquela presente na água ingerida por humanos, para que os níveis de F no sangue das duas espécies sejam similares [Angmar-Mansson and Whitford, 1984]. Desta maneira, água contendo 100 mgF/L para ratos é equivalente a água contendo 20 mgF/L para humanos, sendo que este nível de F muito raramente é encontrado na água e, quando o é, está associado à fluorose severa (tanto dentária quanto esquelética) em áreas endêmicas.

Outro estudo recente com animais avaliou se a co-exposição ao Pb e F alteraria a severidade da fluorose dentária [Leite et al., 2011]. Ratos *Wistar* foram alocados aos mesmos grupos descritos por Sawan et al. [2010]. Os autores observaram que os animais não expostos ao F e nem ao Pb ou expostos apenas ao Pb apresentaram esmalte normal, enquanto que o grupo exposto ao F e Pb apresentou defeitos de esmalte mais severos quando comparado ao grupo exposto apenas ao F. Estes resultados sugerem que o Pb exacerba a fluorose dentária em roedores e que a co-exposição ao Pb e F pode afetar a severidade da fluorose dentária.

Nos estudos de Sawan et al. [Sawan et al., 2010] e Leite et al., [2011], o composto fluoretado adicionado à água foi o ácido fluossilícico (H_2SiF_6), um SiF, que, junto com o fluossilicato de sódio (Na_2SiF_6), é utilizado em 92% dos sistemas de abastecimento de água dos Estados Unidos [CDC, 1993]. Acredita-se que água contendo SiF poderia aumentar os níveis de Pb no sangue por intensificar a corrosão do encanamento ou por facilitar a absorção do Pb [Coplan et al., 2007], o que, entretanto, necessita ser estudado através de um estudo metabólico. Adicionalmente, seria interessante averiguar se a interação do F com o Pb também acontece com outros compostos fluoretados. Neste sentido, seria muito importante avaliar o fluoreto de sódio (NaF), que é um sal fluoretado bastante comum, a partir do qual a biodisponibilidade do F é calculada como próxima de 100%.

Espera-se que, em doses de F e Pb próximas das que são encontradas geralmente nos sistemas de abastecimento, não haja interação entre estes elementos, o que irá dar respaldo adicional à fluoretação das águas de abastecimento público como uma importante medida de Saúde Pública para o controle da cárie dentária. Em virtude do exposto, é necessário que se faça um estudo dose-resposta tanto para F quanto para Pb, a fim de se elucidar se a interação entre estes elementos, que leva a exposição concomitante ao F a aumentar os níveis de Pb encontrados no sangue e tecidos calcificados, também ocorre com doses menores de F e Pb na água, mais próximas das que são normalmente encontradas.

---

2 PROPOSIÇÃO

---

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo é avaliar os níveis de F e Pb circulantes, excretados e incorporados no tecido ósseo em ratos expostos simultaneamente ao F e Pb através da água de beber desde a gestação, levando-se em consideração diferentes doses de Pb e F e dois tipos de compostos fluoretados.

As hipóteses nulas a serem testadas são:

- O tipo de composto fluoretado (NaF ou H_2SiF_6) administrado através da água de beber concomitantemente ao Pb não é capaz de alterar os níveis de Pb e F circulantes, excretados ou incorporados ao tecido ósseo;
  - A administração de diferentes concentrações de F através da água de beber concomitantemente ao Pb não é capaz de alterar os níveis de Pb circulantes, excretados ou incorporados ao tecido ósseo;
  - A administração de diferentes concentrações de Pb através da água de beber concomitantemente ao F não é capaz de alterar os níveis de F circulantes, excretados ou incorporados ao tecido ósseo.
-

3 MATERIAL E MÉTODOS

---

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com animais da FOB-USP (Anexos 1 e 2). Foram utilizados ratos *Wistar* de ambos os gêneros obtidos do Biotério da Faculdade de Odontologia de Bauru. Duzentos e vinte e quatro ratos *Wistar* (peso médio entre 190 e 210 g, 212 fêmeas e 42 machos) foram aleatoriamente divididos em 28 grupos de 6 fêmeas e 1 macho, de acordo com as concentrações de Pb (0, 1, 10 e 30 mg/L) e F (0, 5, 50 e 100 mg/L) administradas com a água de beber, bem como com relação ao composto fluoretado utilizado (NaF ou H_2SiF_6). Estas doses de F foram escolhidas pelo fato de o metabolismo do F em ratos ser mais rápido que em humanos, tendo sido relatado que os ratos devem consumir água contendo uma concentração de F 5 vezes maior que aquela presente na água consumida por humanos, de forma que ambos tenham a mesma concentração de F no plasma [Angmar-Mansson and Whitford, 1984, Dunipace et al., 1995]. Assim, a concentração de F de 5 mg/L na água de beber de ratos corresponde à concentração de 1 mg/L, que está usualmente presente na água artificialmente fluoretada consumida por humanos. Ainda a concentração de 50 mgF/L para ratos corresponde à concentração de 10 mg/L na água de humanos, que é encontrada em áreas de fluorose endêmica. Por outro lado, a concentração máxima de 100 mgF/L foi escolhida como controle positivo, porque nesta concentração um trabalho prévio encontrou efeito da mesma quando em associação ao Pb na dose 30 mg/L, tendo promovido um aumento nas concentrações de Pb no sangue total e nos tecidos calcificados de ratos [Sawan et al., 2010]. Com relação à menor concentração de Pb (1 mg/L), a mesma foi escolhida porque a concentração utilizada no estudo de Sawan et al. (30 mgPb/L) [Sawan et al., 2010] é muito alta quando se consideram as doses relacionadas à potabilidade da água. No Brasil, a Portaria 518, de 2004, estabelece como valor máximo permitido para potabilidade de águas profundas a concentração de 0,01 mg Pb/L [BRASIL., 2004]. A concentração mínima de Pb utilizada no presente estudo é maior que o limite estabelecido pela Portaria 518, pois acredita-se que se fosse utilizado o limite estabelecido pela

---

mesma haveria dificuldades na detecção de Pb nos fluidos e tecidos corporais, uma vez que o metabolismo do Pb em ratos deve, à semelhança de outros elementos, ser mais rápido que humanos, embora não existam dados comparativos na literatura assim como são encontrados para o F. Todas as águas preparadas foram checadas em relação às concentrações de Pb, F, bem como em relação ao pH (dados não mostrados). O acasalamento dos animais começou concomitantemente ao início da administração de F e Pb através da água e durou entre 1 e 2 semanas.

Durante todo o período experimental, os animais tiveram acesso à ração Presence (Purina, com teores de F e Pb menores que 1 mg/Kg e água com as diferentes concentrações de F e Pb acima descritas, *ad libitum*). Os animais, durante o acasalamento e lactação foram mantidos em caixas plásticas num ambiente com luminosidade (ciclos de 12 horas de claro/escuro), temperatura (24-26°C) e umidade (40-60%) controladas. Enquanto grávidas, as fêmeas foram separadas dos machos e assim mantidas em caixas separadas com seus filhotes durante o período de lactação. Foram mantidos 10 animais por caixa durante o período de lactação. Após a lactação, para cada grupo experimental, 6 animais foram mantidos em gaiolas metabólicas (em duplas), enquanto que os outros 4 animais foram mantidos em uma caixa plástica. O *n* de 6 é suficiente para as estudos que avaliam a excreção de F, sendo empregado em outro estudo [Carvalho et al., 2009]. O número de animais recém-nascidos utilizados por grupo foi 10, totalizando 280 animais machos para todas as condições experimentais (Quadro 1). Estes animais receberam, desde o desmame até 80 dias de vida, a mesma água que vinha sendo administrada aos seus pais.

Quadro 1. Alocação dos ratos *Wistar* machos aos diferentes grupos experimentais, em função das diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H₂SiF₆) e/ou chumbo administradas através da água de beber desde o começo da gestação.

Grupo	Composto Fluoretado	Concentração F	Concentração Pb
1	NaF	5 mg/L	1 mg/L
2	NaF	50 mg/L	1 mg/L
3	NaF	100 mg/L	1 mg/L
4	NaF	5 mg/L	10 mg/L
5	NaF	50 mg/L	10 mg/L
6	NaF	100 mg/L	10 mg/L
7	NaF	5 mg/L	30 mg/L
8	NaF	50 mg/L	30 mg/L
9	NaF	100 mg/L	30 mg/L
10	H ₂ SiF ₆	5 mg/L	1 mg/L
11	H ₂ SiF ₆	50 mg/L	1 mg/L
12	H ₂ SiF ₆	100 mg/L	1 mg/L
13	H ₂ SiF ₆	5 mg/L	10 mg/L
14	H ₂ SiF ₆	50 mg/L	10 mg/L
15	H ₂ SiF ₆	100 mg/L	10 mg/L
16	H ₂ SiF ₆	5 mg/L	30 mg/L
17	H ₂ SiF ₆	50 mg/L	30 mg/L
18	H ₂ SiF ₆	100 mg/L	30 mg/L
19	_____	_____	1 mg/L
20	_____	_____	10 mg/L
21	_____	_____	30 mg/L
22	NaF	5 mg/L	_____
23	NaF	50 mg/L	_____
24	NaF	100 mg/L	_____
25	H ₂ SiF ₆	5 mg/L	_____
26	H ₂ SiF ₆	50 mg/L	_____
27	H ₂ SiF ₆	100 mg/L	_____
28	_____	_____	_____

3.2 Obtenção das amostras

As fezes e a urina foram coletadas das gaiolas metabólicas 1 vez por semana a cada 2 semanas, desde o desmame dos animais, até a eutanásia. Cada coleta foi feita por um período de 24 horas. As amostras foram coletadas em tubos plásticos e armazenadas a -20°C até as análises de F e Pb.

Aos 80 dias de vida, os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/Kg) e xilazina (100 mg/Kg) por via intra-peritoneal e o sangue foi coletado por punção cardíaca em uma seringa livre de metal contendo heparina liofilizada (Figura 1A). O conteúdo de sangue coletado foi dividido em dois tubos (livres de elementos-traço), sendo um para análise de Pb (sangue total, Figura 1B). O outro foi centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma para análise de F (Figura 1C). Em sequência, os ratos foram eutanasiados com dose excessiva de anestésico e, após divulsão muscular, o fêmur direito foi coletado em tubos livres de elementos-traço para análise de Pb e F. As amostras de sangue total, plasma e fêmures foram armazenadas a -20 °C até as análises de F e Pb. Antes das análises, o fêmur foi colocado em estufa a 60°C e então pesado a cada 12 h, até que o seu peso ficasse constante. Este procedimento foi realizado para a remoção da água. Em sequência, os fêmures foram cortados pela metade no sentido transversal, sendo que uma das metades foi utilizada para análise de F e a outra metade foi utilizada para a análise de Pb.

Figura 1. A) Punção cardíaca. B) Sangue total para análise de Pb. C) Plasma para análise de F.

3.3 Análises de F

As amostras de plasma foram colocadas em placas de Petri (Falcon 1007) e o volume foi completado para 2 mL com água deionizada. A difusão seguiu como descrito por Taves [Taves, 1968], modificado por Whitford [Whitford, 1996]. Na tampa das placas, foi colocados 50 μ L de NaOH 0,05 M, distribuídos em 3 gotas (Figura 2A). As placas foram então fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado hexametil-disiloxano (HMDS, 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 (Figura 2B). 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. A gota, contendo todo o F foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa (Figura 2C). Foi feita curva de calibração com padrões contendo 0,00475, 0,0095, 0,019, 0,095 e 0,190 μ g F.

Os fêmures foram pesados e sua massa anotada. Em seguida os mesmos foram levados em um forno tipo mufla a 600°C *overnight*. No dia seguinte, as cinzas foram pesadas e divididas em frações de 5 mg. Essas frações foram submetidas à difusão facilitada por HMDS (TAVES, 1968) conforme modificado por WHITFORD (1996), como descrito para o plasma, no entanto, os padrões utilizados foram de concentrações diferentes, contendo 1,9, 3,8, 19,0 e 39,0 mg de F, além de não haver a pré-difusão.

Para a análise de F nas fezes, após homogenização em água deionizada, seguiu-se o mesmo protocolo descrito para o plasma e o fêmur [Carvalho et al., 2009]. Foi feita curva de calibração com padrões contendo 0,190, 0,950, 1,900, 4,750, 9,500 e 19,000 μ g F.

Validação das análises feitas pelo método indireto:

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o F da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do F pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 µg/mL, conforme consta no manual do fabricante.

As soluções-padrão empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de plasma analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras, a segunda foi feita quando a metade das amostras foram lidas e a terceira após o término da leitura das amostras.

As leituras obtidas em milivoltagem (mV) foram convertidas para µg de F, através do Programa Excel (Microsoft). A média das leituras obtidas a partir dos padrões foi inserida na planilha, e então 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 $r \geq 0,99$ foram aceitas, contemplando a exatidão do método.

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

Foi feita também uma sequência de padrões que não sofreram difusão, de maneira que as amostras e as leituras de mV foram as mesmas que as observadas para os padrões que sofreram difusão.

Todas as análises foram feitas em duplicata.

Figura 2. A) Amostras nas placas de Petri com 3 gotas de NaOH na superfície interna da tampa. B) União das 3 gotas de NaOH contendo o F captado das amostras. C) Análise de F com o eletrodo íon-sensível, acoplado ao eletrodo de referência calomelano.

A concentração de F presente nas amostras de urina foi determinada em triplicata pelo método direto, usando-se o eletrodo Orion 9609, após tamponamento com um volume idêntico de TISAB II (Tampão de ajuste da força iônica total), contendo CDTA (ácido ciclo-hexano diamino tetracético) 0,4%, pH 5,0. As amostras de urina foram deixadas à temperatura ambiente para descongelar durante a noite anterior à dosagem. A curva de calibração foi realizada com os mesmos cuidados descritos para a validação da análise de F pelo método indireto. Foi feita uma curva de calibração com 1,0 mL de soluções-padrão contendo 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 e 3,2 μg F [Carvalho et al., 2009]. Em adição, medições de F em 10% das amostras foram repetidas para se determinar a reprodutibilidade das análises.

3.4 Análises de Pb

As análises de chumbo no sangue total, fêmur, fezes e urina foram realizadas no Laboratório de Toxicologia e Essencialidade de Metais, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

Para isto, foi utilizado um Espectrômetro de Massas com plasma indutivamente acoplado, equipado com uma célula de reação (DRC-ICP-MS ELAN DRCII, Perkin Elmer, Sciex, Norwalk, CT, EUA), conforme descrito por BATISTA et al [2009]. Em resumo, as amostras e materiais de referência certificados (CRMs) (aproximadamente 75 mg) foram pesados em tubos Falcon® de polipropileno de

15 mL (Becton Dickinson). Então, 1 mL de solução de hidróxido de tetrametilamônio (TMAH) 50% (v/v) foi adicionado às amostras e incubado à temperatura ambiente por 12 h num homogenizador rotacional. Após solubilização, o volume foi trazido para 10 mL com uma solução diluída contendo HNO_3 0,5% (v/v), 10 $\mu\text{g/L}$ Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). Padrões de calibração analíticos foram preparados numa concentração variando entre 0 e 20 $\mu\text{g/L}$, num diluente contendo TMAH 5% (v/v), HNO_3 0,5% (v/v), 10 $\mu\text{g/L}$ Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). O limite de detecção para o Pb foi de 0.0066 $\mu\text{g/L}$.

Para as amostras de sangue, 200 μL de cada amostra foram colocadas em tubos Falcon® de polipropileno de 15 mL (Becton Dickinson), para um volume final de 10 mL (diluição de 50 vezes) com uma solução contendo HNO_3 0,5% (v/v), 10 $\mu\text{g/L}$ Rh e Triton X-100 0,01% (v/v). Padrões de calibração analíticos foram preparados numa concentração variando entre zero e 20 $\mu\text{g/L}$, no mesmo diluente. A curva foi feita por ajuste de matriz, a qual continha os padrões de calibração, sangue ovino diluído 50 vezes (sangue base) e diluente.

Após a preparação da amostra, a mesma foi diretamente injetada no equipamento. O controle de qualidade para as análises de Pb foi assegurado por meio da análise de materiais de referência do Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia americano (NIST 955c). Em adição, outros materiais de referência fornecidos tanto pelo Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque (NYSDOH programa de teste de proficiência para elementos traço em sangue total) quanto pelo Instituto Nacional de saúde Pública de Quebec, Canadá (INSP – esquema de análise de qualidade externa (EQAS) para elementos traço no sangue) foram também analisados.

3.5 Análise estatística

Foi utilizado o *software Statistica 11.0*. Cada uma das variáveis de resposta (peso dos animais, concentração de F no plasma, concentração de F no osso, quantidade de F excretada através da urina, quantidade de F excretada através das fezes, concentração de Pb no sangue total, concentração de Pb no osso, quantidade de Pb excretada através da urina, quantidade de F excretada através das fezes) foi

---

analisada individualmente por ANOVA a 3 critérios (tipo de composto fluoretado, concentração de F e concentração de Pb na água) e pelo teste de Tukey para comparações individuais. O nível de significância adotado, em todos os casos, foi de 5%.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

---

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Estudos epidemiológicos relativamente recentes têm relatado uma associação entre a utilização de água de abastecimento tratada com SiF e o aumento das concentrações de Pb no sangue em crianças. Especula-se que a causa deste fato deve-se à presença simultânea de cloreto e SiF, que favorece a corrosão, liberando Pb a partir do encanamento e aumentando a absorção de Pb a partir da água (Maas et al., 2007). Isto é mais comum em residências mais antigas, já que nas mais modernas o encanamento de Pb tem sido substituído pelo de cobre (Masters & Coplan, 1999). Um aumento das concentrações plasmáticas de Pb em função da administração simultânea de H_2SiF_6 através da água de beber foi observado mais recentemente em um estudo prova-de-conceito conduzido com ratos que receberam água contendo F, Pb ou ambos, desde a gestação (Sawan et al., 2010). Entretanto, tanto a dose de Pb (30 mg/L) quanto a de H_2SiF_6 (100 mg/L) empregadas foram muito altas, bem acima das doses que poderiam ser encontradas na água de abastecimento público. A fim de se avaliar a associação entre presença concomitante de F e Pb na água e o aumento da biodisponibilidade do Pb no organismo foi delineado o presente estudo. Dentre as concentrações de F adicionadas à água de beber, a concentração de 5 mg/L simula aquela presente na água artificialmente fluoretada (1 mg/L), uma vez que, sendo o metabolismo do F por ratos cerca de 5 vezes mais acelerado em relação ao metabolismo do F por humanos, é necessário que ratos ingiram água contendo uma concentração de F 5 vezes maior para que sejam alcançados níveis plasmáticos de F semelhantes àqueles encontrados em humanos (Dunipace et al., 1992). Já a dose de 50 mgF/L é equivalente a aproximadamente 10 mgF/L na água para humanos, concentração esta que pode ser encontrada naturalmente na água em áreas de fluorose endêmica (Souza et al., 2013). A dose de 100 mgF/L foi incluída como um controle positivo, pois com esta dose, Sawan et al (2010) encontraram um aumento da concentração de Pb nos ossos de animais que receberam F e Pb concomitantemente através da água de beber.

Ao final do período experimental, os animais foram pesados (Tabela 1). A ANOVA a 3 critérios encontrou diferença significativa entre as concentrações de F

($F=13,2$, $p<0,0001$), mas não entre os compostos fluoretados ($F=3,0$, $p=0,084$) nem entre as concentrações de Pb ($F=1,8$, $p=0,145$). Houve interação significativa entre composto fluoretado e concentração de F ($F=4,1$, $p<0,01$) e entre concentração de F e concentração de Pb ($F=4,2$, $p<0,0001$). O teste de Tukey revelou que o peso dos animais foi significativamente menor quando os mesmos receberam água contendo 100 mgF/L em comparação àqueles que receberam água sem fluoreto ou com menores concentrações, diferentemente dos resultados de Sawan et al. (2010), onde não foram encontradas diferenças significativas no peso corporal dos animais ao final do estudo, mesmo para os animais que receberam Pb (30 mg/L), F (100 mg/L) ou combinação de ambos através da água de beber.

Tabela 1. Peso médio (DP, g) dos ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação

Pb/F	0 mg/L		5 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6
0 mg/L	334,30 (28,34) n=10	334,30 (28,34) n=10	327,60 (54,32) n=10	292,40 (37,11) n=10	308,30 (30,27) n=10	295,70 (42,84) n=10	279,40 (98,46) n=10	253,80 (25,74) n=10
1 mg/L	326,67 (38,61) n=9	326,67 (38,61) n=9	288,70 (21,20) n=10	343,00 (40,63) n=9	319,10 (30,99) n=10	344,50 (28,49) n=8	283,30 (36,79) n=10	271,20 (59,41) n=10
10 mg/L	278,44 (27,26) n=9	278,44 (27,26) n=9	328,20 (35,76) n=10	318,40 (44,12) n=10	306,67 (50,76) n=9	312,13 (28,66) n=8	303,90 (32,06) n=10	240,70 (29,79) n=10
30 mg/L	343,60 (39,29) n=10	343,60 (39,29) n=10	306,25 (32,24) n=8	315,90 (26,92) n=10	288,00 (16,19) n=7	328,00 (32,39) n=10	311,11 (35,41) n=9	270,80 (14,99) n=5

A tabela 2 mostra a concentração plasmática de F nos animais expostos a diferentes concentrações de F (NaF ou H_2SiF_6) ou Pb. A ANOVA a 3 critérios encontrou diferença significativa entre os compostos fluoretados ($F=91,5$, $p<0,0001$), entre as concentrações de F ($F=579,9$, $p<0,0001$), bem como entre as concentrações de Pb ($F=10,6$, $p<0,0001$). Interações significativas foram encontradas entre os critérios composto fluoretado e concentração de F ($F=50,9$, $p<0,0001$), composto fluoretado e concentração de Pb ($F=29,8$, $p<0,0001$), concentração de F e concentração de Pb ($F=9,2$, $p<0,0001$), bem como para os 3 critérios avaliados ($F=23,9$, $p<0,0001$).

O resultado do teste de Tukey para cada um dos critérios avaliados no estudo é apresentado na Tabela 3. Considerando-se a concentração de F utilizada no tratamento dos animais, foi observada uma dose-resposta em relação às concentrações plasmáticas de F, com diferenças significativas entre todas as concentrações de F empregadas (médias de 0,014, 0,029, 0,058 e 0,176 mgF/L para as concentrações de 0, 5, 10 50 e 100 mgF/L, respectivamente, adicionadas à água de beber), conforme detectado pelo teste de Tukey. A dose-resposta entre as concentrações de F administradas através da água de beber e as concentrações plasmáticas de F tem sido descrita em outros estudos conduzidos com animais, embora em alguns trabalhos prévios não tenha sido encontrada diferença significativa entre todas as doses de F avaliadas, especialmente quando se compara a dose de 5 ou 10 mg/L com o grupo controle (Kobayashi et al., 2009; Carvalho et al., 2009, 2013; Pereira et al., 2013). No presente trabalho o F foi administrado desde a gestação, enquanto que nos demais trabalhos iniciou-se a administração apenas após o desmame dos animais (21 dias de vida), o que pode ter contribuído para tornar as diferenças entre os tratamentos mais evidentes no presente estudo.

Em relação ao composto fluoretado, o teste de Tukey (Tabela 3) revelou concentrações plasmáticas de F significativamente maiores quando foi utilizado o H_2SiF_6 (média 0,090 mgF/L) quando comparado ao NaF (média 0,057 mgF/L). A literatura é contraditória em relação ao metabolismo do F quando ingerido na forma de NaF ou de um composto fluoretado contendo Si. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os achados de Kick et al. (1935), que observaram que quando Na_2SiF_6 ou NaF foram adicionados à dieta de ratos, houve uma maior absorção pelo trato gastrointestinal e uma maior excreção urinária de F no caso do Na_2SiF_6 , o que implicaria em níveis plasmáticos maiores quando o F é ingerido nesta forma. Entretanto, nos estudos de McClure (1950) e Zipkin & McClure (1956), nos quais ratos receberam água contendo NaF ou Na_2SiF_6 , não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de F presentes no osso ou nos dentes. Estes achados vão de encontro a estudos farmacocinéticos mais recentes conduzidos em humanos (Maguire et al., 2005; Whitford et al., 2008), nos quais não houve diferença nas concentrações plasmáticas de F quando os voluntários receberam água contendo estes dois compostos fluoretados. Deve ser ressaltado que, dentre os estudos que avaliaram estes compostos fluoretados, o presente

---

estudo é o único no qual o F foi administrado desde a gestação, bem como o que apresenta o maior número amostral. No estudo de Whitford et al. (2008) houve participação de 10 voluntários e no de Maguire et al. (2005), de 20 voluntários. Em comentário sobre o estudo de Maguire et al. (2005), relatou-se que neste estudo houve um aumento de 16% na área sob a curva da concentração plasmática de F em função do tempo (AUC em 8 h) quando os participantes ingeriram água artificialmente fluoretada (SiF) quando comparado com água naturalmente fluoretada, mas este aumento não foi estatisticamente significativo porque a força do estudo não estava adequada (seriam necessários 85 participantes para uma força de 90%) (Sheldon & Holgate, 2008). Portanto, mais estudos merecem ser conduzido sobre este tema de grande importância para a Saúde Pública, por envolver fluoretação artificial das águas.

Já para o critério concentração de Pb adicionado à água, o teste de Tukey revelou concentrações plasmáticas significativamente maiores de F para o grupo que recebeu água contendo 10 mgPb/L (média de 0,109 mgF/L), que diferiu de todos os demais, seguido pelo grupo controle (média 0,075 mgF/L), que também diferiu de todos os demais (Tabela 3). As menores concentrações plasmáticas de F foram observadas para o grupos que receberam água contendo 30 mgPb/L (média de 0,057 mgF/L) e 1 mgPb/L (média de 0,061 mgF/L), que não diferiram significativamente entre si, mas foram significativamente menores que os demais grupos. Não há na literatura outros trabalhos que avaliaram a influência da concentração de Pb na água sobre os níveis plasmáticos de F, ressaltando a importância do presente estudo. Os resultados do presente trabalho sugerem que a exposição a níveis intermediários de Pb (10 mg/L) é capaz de aumentar os níveis plasmáticos de F, enquanto que a exposição a níveis baixos (1 mg/L) ou altos (30 mg/L) provoca uma redução dos níveis plasmáticos de F. Estes resultados são diferentes daqueles observados por Leite et al. (2011). Estes autores observaram que a exposição ao Pb através da água de beber (30 mg/L) exacerba a fluorose dentária em roedores. Este fenômeno deve ser avaliado por outros trabalhos e, se realmente for confirmado, pode ter implicações na ocorrência de fluorose dentária e esquelética, pela elevação dos níveis plasmáticos de F em função da administração concomitante de determinadas doses de Pb.

Tabela 2. Concentração plasmática média (DP) de fluoreto (mg/L) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H₂SiF₆) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação

Pb/F	0 mg/L		5 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
	NaF	H ₂ SiF ₆	NaF	H ₂ SiF ₆	NaF	H ₂ SiF ₆	NaF	H ₂ SiF ₆
0 mg/L	0,015 ^{ab} (0,050) n=5	0,015 ^{ab} (0,050) n=5	0,024 ^{abc} (0,008) n=5	0,037 ^{abc} (0,017) n=10	0,044 ^{abc} (0,005) n=9	0,058 ^{bcd} (0,007) n=7	0,101 ^{def} (0,005) n=9	0,230 ⁱ (0,028) n=9
1 mg/L	0,014 ^{ab} (0,001) n=6	0,014 ^{ab} (0,001) n=6	0,025 ^{abc} (0,006) n=10	0,016 ^{abc} (0,002) n=5	0,066 ^{cde} (0,011) n=7	0,048 ^{abc} (0,016) n=6	0,139 ^{tg} (0,015) n=10	0,203 ^{hi} (0,111) n=5
10 mg/L	0,015 ^{ab} (0,004) n=5	0,015 ^{ab} (0,004) n=5	0,017 ^{abc} (0,009) n=4	0,031 ^{abc} (0,016) n=7	0,044 ^{abc} (0,005) n=4	0,099 ^{def} (0,004) n=8	0,105 ^{ef} (0,020) n=9	0,333 ^j (0,051) n=10
30 mg/L	0,015 ^a (0,007) n=9	0,015 ^a (0,007) n=9	0,022 ^{abc} (0,002) n=7	0,042 ^{abc} (0,018) n=10	0,042 ^{abc} (0,012) n=7	0,058 ^{bc} (0,010) n=10	0,159 ^{gh} (0,023) n=9	0,113 ^f (0,012) n=8

Letras distintas indicam diferença significativa (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, p<0,05).

Tabela 3. Teste de Tukey para a variável concentração plasmática de fluoreto (mg/L) em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de Pb adicionados à água de beber

Critérios	Níveis	Média fluoreto plasmático
Composto fluoretado	NaF	0,057 ^a
	H ₂ SiF ₆	0,091 ^b
Concentração fluoreto	0 mg/L	0,015 ^a
	5 mg/L	0,029 ^b
	50 mg/L	0,059 ^c
	100 mg/L	0,176 ^d
Concentração Chumbo	30 mg/L	0,058 ^a
	1 mg/L	0,061 ^a
	0 mg/L	0,076 ^b
	10 mg/L	0,109 ^c

Para cada critério, letras distintas indicam diferença significativa entre os níveis (p<0,05).

Em relação à concentração média de F no osso, os resultados obtidos (Tabela 4) seguiram um padrão similar àquele encontrado para as concentrações plasmáticas de F. A ANOVA a 3 critérios encontrou diferença significativa entre os compostos fluoretados ($F=25,3$, $p<0,0001$), entre as concentrações de F ($F=2155,7$, $p<0,0001$), bem como entre as concentrações de Pb ($F=106,3$, $p<0,0001$). Interações significativas foram encontradas entre os critérios composto fluoretado e concentração de F ($F=14,4$, $p<0,0001$), composto fluoretado e concentração de Pb ($F=49,8$, $p<0,0001$), concentração de F e concentração de Pb ($F=46,4$, $p<0,0001$), bem como para os 3 critérios avaliados ($F=40,5$, $p<0,0001$).

A tabela 5 mostra o resultado do teste de Tukey para cada um dos critérios avaliados no estudo. Quando foi considerada a concentração de F utilizada no tratamento dos animais, de maneira similar aos resultados obtidos para as concentrações plasmáticas de F, foi observada uma dose-resposta em relação às concentrações de F no fêmur, com diferenças significativas entre todas as concentrações de F empregadas (médias de 138,6, 375,0, 1057,9 e 1974,3 mgF/Kg para as concentrações de 0, 5, 10 50 e 100 mgF/L, respectivamente, adicionadas à água de beber), conforme detectado pelo teste de Tukey. Esta dose-resposta foi observada em outros estudos com animais (Carvalho et al., 2006, 2008; Leite et al., 2008) e era esperada, uma vez que o osso é considerado um marcador histórico de exposição ao F (Pessan & Buzalaf, 2011), uma vez que 99% do F armazenado no organismo está localizado nos tecidos duros (Buzalaf & Whitford, 2011).

Em relação ao composto fluoretado, o teste de Tukey (Tabela 5) revelou concentrações de F no osso significativamente maiores quando foi utilizado o H_2SiF_6 (média 897,5 mg/Kg) quando comparado ao NaF (média 841,2 mgF/Kg). Como já mencionado, a literatura é contraditória em relação ao metabolismo do F quando ingerido na forma de NaF ou de um composto fluoretado contendo Si, o que afeta a concentração de F encontrada no osso. Apenas estudos antigos avaliaram a incorporação de F nos ossos de animais expostos a compostos fluoretados contendo Si quando comparado ao NaF e nestes estudos não houve diferença entre estes compostos na concentração de F encontrada no osso (McClure, 1950; Zipkin & McClure, 1956). Uma vez que o osso é o principal local de armazenamento de F no organismo, e que existe uma relação de equilíbrio estacionários entre os níveis plasmáticos de F e aqueles presentes na superfície óssea (Buzalaf & Whitford,

---

2011), é de se esperar que haja relação entre os níveis de F plasmáticos e aqueles encontrados no osso. No presente estudo, chama a atenção o fato de que quando foi utilizado o H_2SiF_6 nas concentrações de 50 e 100 mgF/L, simultaneamente ao Pb na concentração de 1 mg/L, as concentrações de F no osso foram significativamente maiores que aquelas observadas quando não foi empregado Pb concomitantemente, ou este foi empregado nas doses maiores (10 e 30 mg/L). Estes achados não foram observados para os níveis plasmáticos de F, mas sugerem que a interação entre F e Pb parece ser complexa e não seguir um padrão típico de dose-resposta.

Já para o critério concentração de Pb adicionado à água, as maiores concentrações de F no osso foram observadas para os grupos que receberam 0 ou 10 mgPb/L na água. Entretanto, para o plasma, os maiores níveis de F foram observados para o grupo que recebeu água contendo 10 mgPb/L, enquanto que para o osso, os maiores níveis (média de 1062,3 mgF/Kg) foram vistos para o grupo que recebeu água sem Pb (0 mg/L), que diferiu significativamente de todos os demais (Tabela 5). Concentrações intermediárias de F no osso foram observadas para os grupos que receberam 10 (média de 901,4 mgF/Kg) e 30 mgPb/L (média de 839,8 mgF/Kg) na água, que não diferiram significativamente entre si mas foram significativamente maiores que aquelas observadas para o grupo que recebeu água contendo 1 mgPb/L (média de 657,4 mgF/Kg). Estes dados mais uma vez reforçam a complexidade da interação que parece acontecer quando F e Pb são ingeridos concomitantemente. Infelizmente não há como comparar estes dados com a literatura, pois este é o primeiro estudo que investigou a dose-resposta da administração concomitante de F e Pb, nos níveis de F encontrados no osso.

Tabela 4. Concentração de fluoreto média (DP) no osso (mg/Kg) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H₂SiF₆) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação

Pb/F	0 mg/L		5 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
	NaF	H ₂ SiF ₆	NaF	H ₂ SiF ₆	NaF	H ₂ SiF ₆	NaF	H ₂ SiF ₆
0 mg/L	97,1a (26,3) n=10	97,1a (26,3) n=10	216,1a (24,9) n=10	458,9d (91,9) n=10	1242,0e (264,3) n=10	1232,6e (164,5) n=10	2100,8gh (208,5) n=10	2661,8i (214,5) n=10
1 mg/L	147,7a (43,9) n=9	147,7a (43,9) n=9	220,3a (23,0) n=10	327,3bc (53,9) n=9	800,9cd (238,5) n=10	669,3cd (60,1) n=10	1897,5fg (309,7) n=10	690,3cd (146,1) n=8
10 mg/L	159,3a (12,9) n=9	159,3a (12,9) n=9	208,3a (36,5) n=10	284,2a (60,6) n=10	892,3d (276,1) n=10	1230,9e (150,6) n=8	1843,6f (211,50) n=10	2349,2h (285,5) n=10
30 mg/L	153,2a (43,5) n=10	153,2a (43,5) n=10	293,6a (35,4) n=10	347,4ab (48,3) n=10	1263,4e (43,8) n=7	1211,7e (172,1) n=10	1909,7fg (121,8) n=9	2182,9gh (112,0) n=5

Letras distintas indicam diferença significativa (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, p<0,05).

Tabela 5. Teste de Tukey para a variável concentração de fluoreto no osso (mg/Kg) em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de Pb adicionados à água de beber

Critérios	Níveis	Média fluoreto osso
Composto fluoretado	NaF	841,2 ^a
	H ₂ SiF ₆	897,5 ^b
Concentração fluoreto	0 mg/L	138,6 ^a
	5 mg/L	375,0 ^b
	50 mg/L	1057,9 ^c
	100 mg/L	1974,3 ^d
Concentração Chumbo	1 mg/L	657,4 ^a
	30 mg/L	839,8 ^b
	10 mg/L	901,3 ^b
	0 mg/L	1062,3 ^c

Para cada critério, letras distintas indicam diferença significativa entre os níveis (p<0,05).

Para a quantidade média de F excretada através da urina (Tabela 6), a ANOVA a 3 critérios encontrou diferença significativa entre os compostos fluoretados ($F=4,8$, $p=0,029$), entre as concentrações de F ($F=129,2$, $p<0,0001$), bem como entre as concentrações de Pb ($F=13,7$, $p<0,0001$). Interações significativas foram encontradas entre os critérios composto fluoretado e concentração de F ($F=33,9$, $p<0,0001$), concentração de F e concentração de Pb ($5,6$, $p<0,0001$), bem como para os 3 critérios avaliados ($F=4,2$, $p<0,0001$).

A tabela 7 mostra o resultado do teste de Tukey para cada um dos critérios avaliados no estudo. Quando foi considerada a concentração de F utilizada no tratamento dos animais, de maneira similar aos resultados obtidos para as concentrações plasmáticas e ósseas de F, foi observada uma dose-resposta em relação às quantidades de F excretadas através da urina, com diferenças significativas entre todas as concentrações de F empregadas (médias de 2,18, 13,11, 30,48 e 76,07 μg F para as concentrações de 0, 5, 50 e 100 mgF/L, respectivamente, adicionadas à água de beber), conforme detectado pelo teste de Tukey. Esta dose-resposta foi observada em outro estudo com animais (Carvalho et al., 2009) e era esperada, uma vez que a urina é considerada a principal via de excreção do F, sendo responsável pela eliminação de cerca de 60% e 45% do F absorvido em adultos e crianças, respectivamente (Villa et al., 2010).

Quanto ao composto fluoretado, o teste de Tukey (Tabela 7) mostrou concentrações plasmáticas de F significativamente maiores quando foi utilizado o NaF (média 32,39 μg) quando comparado ao H_2SiF_6 (média 26,07 μg). Estes resultados dão suporte a uma maior biodisponibilidade do F quando administrado na forma de H_2SiF_6 quando comparado ao NaF, o que é consistente com os dados relativos à concentração de F no plasma (Tabela 2) e no osso (Tabela 4), onde foram observadas concentrações maiores quando o F foi administrado como H_2SiF_6 .

Em relação à concentração de Pb na água (Tabela 7), as maiores excreções urinárias de F foram observadas para os grupos que receberam 1 ou 10 mgPb/L na água (40,04 e 33,54 μg , respectivamente), que não diferiram significativamente entre si, mas diferiram dos grupos que receberam 30 (23,26 μg) e 0 mgPb/L (19,59 μg), que, por sua vez, não diferiram significativamente entre si. As maiores concentrações de F no plasma e no osso foram encontradas para os animais que receberam água sem Pb (0 mg/l) ou contendo 10 mgPb/L e seria esperado que os

animais destes grupos tivessem menores excreções de F através da urina. Isto ocorreu para os grupos que receberam água sem Pb, mas não para os grupos que receberam água contendo 10 mgPb/L. Portanto, uma menor excreção urinária de F não parece ser a explicação para os mais altos níveis de F no plasma e osso encontrados para os animais que receberam água contendo 10 mgPb/L.

Tabela 6. Quantidade média (DP) de fluoreto excretada através da urina (μg) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação

Pb/F	0 mg/L		5 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6
0 mg/L	2,504a (2,181) n=11	2,504a (2,181) n=11	3,369a (0,875) n=12	3,846ab (1,608) n=11	22,684abcd (10,677) n=12	25,775abcde (13,842) n=12	52,068def (22,828) n=12	49,932cdef (51,242) n=8
1 mg/L	1,742a (0,731) n=12	1,742a (0,731) n=12	6,922abc (3,637) n=12	29,352abcde (29,318) n=12	43,850bcde (16,792) n=11	33,427abcde (5,930) n=12	150,506h (83,553) n=11	64,290ef (61,044) n=11
10 mg/L	3,070a (0,687) n=12	3,070a (0,687) n=12	3,747ab (2,421) n=12	18,470abcd (19,119) n=10	23,108abcde (13,736) n=11	59,024def (19,673) n=10	114,412gh (50,981) n=11	54,546def (33,920) n=10
30 mg/L	1,354a (0,717) n=11	1,354a (0,717) n=11	2,824ab (1,124) n=11	35,631abcde (26,070) n=11	7,715abc (7,933) n=9	27,262abcde (13,687) n=10	85,928fg (28,168) n=11	19,773abcd (12,852) n=9

Dados se referem a 2 animais alojados em cada gaiola metabólica por 24 h, sendo os dados coletados a cada 14 dias. Letras distintas indicam diferença significativa (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 7. Teste de Tukey para a variável quantidade de fluoreto excretada através da urina (μg) em 24 horas em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de Pb adicionados à água de beber

Critérios	Níveis	Média fluoreto urina
Composto fluoretado	H_2SiF_6	26,07 ^a
	NaF	32,39 ^b
Concentração fluoreto	0 mg/L	2,18 ^a
	5 mg/L	13,11 ^b
	50 mg/L	30,48 ^c
	100 mg/L	76,07 ^d
Concentração Chumbo	0 mg/L	19,59 ^a
	30 mg/L	23,26 ^a
	10 mg/L	33,54 ^b
	1 mg/L	40,04 ^b

Para cada critério, letras distintas indicam diferença significativa entre os níveis ($p < 0,05$).

Para a quantidade média de F excretada através das fezes (Tabela 8), a ANOVA a 3 critérios não encontrou diferença significativa entre os compostos fluoretados ($F=0,003$, $p=0,955$), mas foi observada diferença significativa entre as concentrações de F ($F=134,3$, $p<0,0001$), bem como entre as concentrações de Pb ($F=14,13$, $p<0,0001$). Interações significativas foram encontradas entre os critérios composto fluoretado e concentração de F ($F=3,1$, $p=0,028$), concentração de F e concentração de Pb ($F=2,3$, $p=0,016$), bem como para os 3 critérios avaliados ($F=4,6$, $p<0,0001$).

A tabela 9 mostra o resultado do teste de Tukey para cada um dos critérios avaliados no estudo para os quais a ANOVA a 3 critérios encontrou diferença significativa. Para a concentração de F utilizada no tratamento dos animais, como foi observado para as concentrações plasmáticas e ósseas de F, bem como para as quantidades de F excretadas através da urina, foi observada uma dose-resposta em relação às quantidades de F excretadas através das fezes, com diferenças significativas entre todas as concentrações de F empregadas (médias de 16,05, 28,88, 53,57 e 69,31 $\mu\text{g F}$ para as concentrações de 0, 5, 50 e 100 mgF/L , respectivamente, adicionadas à água de beber). A excreção fecal de F, em condições normais, corresponde geralmente a 10-15% da quantidade total de F ingerida diariamente e está relacionada ao F que não foi absorvido pelo trato gastrointestinal (Buzalaf & Whitford, 2011). É esperado, portanto, que seja menor que a excreção urinária de F, que é a principal via de excreção do F, sendo responsável pela eliminação de em torno de 50% do F absorvido (60% em adultos e 45% em crianças (Villa et al., 2010). Entretanto, no presente estudo, as quantidades de F excretadas através das fezes foram em geral maiores que aquelas excretadas através da urina, o que também foi relatado em outro estudo metabólico (Carvalho et al., 2009). Isto pode ser devido à perda de parte do volume urinário durante a coleta.

Quanto ao composto fluoretado (Tabela 8), diferentemente do observado para as concentrações plasmáticas (Tabela 2) e ósseas de F (Tabela 4), bem como para a excreção urinária (Tabela 6) deste elemento, não houve diferença significativa entre os compostos, sugerindo que a maior biodisponibilidade do F quando administrado na forma de H_2SiF_6 quando comparado ao NaF ocorre provavelmente devido a eventos que acontecem após a absorção gastrointestinal do F, (distribuição pelo organismo, incorporação nos tecidos duros, principalmente mas também moles

---

e excreção urinária), uma vez que o F presente nas vezes em condições normais corresponde ao F que não foi absorvido (Buzalaf & Whitford, 2011).

Já em relação à concentração de Pb na água (Tabela 9), foi observada uma tendência para aumento na excreção fecal quando o Pb estava presente na água. A maior excreção fecal de F foi observada para o grupo que recebeu 10 mg/L na água (51,22 µg) que diferiu de todos os demais grupos. Valores intermediários foram observados para os grupos que receberam 1 e 30 mgPb/L na água (37,20 e 42,62 µgF, respectivamente) que não diferiram significativamente entre si, mas diferiram dos demais. A menor excreção fecal foi observada para o grupo controle (33,73 µgF), que diferiu de todos os demais, com exceção do grupo que recebeu água contendo 1 mgPb/L. O grupo controle foi o que também teve a menor excreção urinária de F (Tabela 7), dentre todos os grupos. Esta menor excreção total de F (fezes mais urina) observada para o grupo controle é consistente com as concentrações mais altas de F observadas no osso para este grupo (Tabela 5) e sugerem que a presença de Pb na água parece reduzir a incorporação de F no osso. Entretanto, vale lembrar que para a concentração de 10 mg/L de Pb na água, as concentrações plasmáticas de F foram significativamente maiores que aquelas encontradas para o grupo controle (sem chumbo na água), o que é, de certa forma, inconsistente com a menor incorporação de F no osso na presença de Pb na água de beber.

Tabela 8. Quantidade de fluoreto média (DP) excretadas nas fezes (μg) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação

Pb/F	0 mg/L		5 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6
0 mg/L	6,554a (6,941) n=11	6,554a (6,941) n=11	22,211abcd (28,876) n=11	25,560abcde (11,711) n=12	37,462bcdef (17,443) n=11	56,303fghij (20,401) n=11	74,015ghij (25,152) n=10	46,793cdefghi (15,875) n=10
1 mg/L	11,633ab (4,862) n=12	11,633ab (4,862) n=12	8,563ab (0,702) n=11	27,201abcdef (1,629) n=9	51,972efghij (7,578) n=12	44,986bcdefg (5,236) n=12	76,798hij (8,622) n=8	76,421ghij (42,817) n=11
10 mg/L	29,702abcdef (12,395) n=12	29,702abcdef (12,395) n=12	34,141abcdef (15,879) n=11	47,086defgi (17,74) n=12	78,407j (20,424) n=11	56,258fghij (34,556) n=12	57,832fghij (2,595) n=8	79,693j (36,221) n=12
30 mg/L	15,245abc (7,013) n=8	15,245abc (7,013) n=8	31,581abcdef (14,696) n=12	32,496abcdef (9,148) n=12	49,018dfghi (12,234) n=11	54,831fghij (16,394) n=11	78,848j (27,735) n=12	51,425cdefghi (10,600) n=6

Dados se referem a 2 animais alojados em cada gaiola metabólica por 24 h, sendo os dados coletados a cada 14 dias. Letras distintas indicam diferença significativa (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 9. Teste de Tukey para a variável quantidade de fluoreto excretada através das fezes (μg) em 24 horas em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de Pb adicionados à água de beber

Critérios	Níveis	Média fluoreto fezes
Concentração fluoreto	0 mg/L	16,05 ^a
	5 mg/L	28,88 ^b
	50 mg/L	53,57 ^c
	100 mg/L	69,31 ^d
Concentração Chumbo	0 mg/L	33,73 ^a
	1 mg/L	37,20 ^{ab}
	30 mg/L	42,62 ^b
	10 mg/L	51,22 ^c

Para cada critério, letras distintas indicam diferença significativa entre os níveis ($p < 0,05$). A ANOVA a 3 critérios não encontrou diferença significativa entre os compostos fluoretados.

A Tabela 10 mostra a concentração plasmática de Pb nos animais expostos a diferentes concentrações de F (NaF ou H_2SiF_6) ou Pb. Cabe ressaltar que não são apresentados os dados referentes às concentrações de F de 5 e 50 mg/L na água, uma vez que várias amostras destes grupos foram perdidas, o que inviabilizaria a realização da ANOVA a 3 critérios. Esta análise mostrou diferença significativa apenas para o critério concentração de Pb na água ($F=49,79$, $p < 0,0001$), mas não entre os compostos fluoretados ($F=1,62$, $p=0,207$), concentrações de F na água

($F=1,28$, $p=0,261$) ou interações entre os critérios. O resultado do teste de Tukey para a variável concentração de Pb na água é apresentado na Tabela 11. Foi observada uma dose-resposta para as concentrações de Pb encontradas no sangue total em função da concentração de Pb presente na água de beber. Entretanto, o grupo que recebeu água contendo a menor concentração de Pb (1 mg/L) não diferiu significativamente do controle. Em todos os outros casos, diferenças significativas foram encontradas. O único trabalho existente na literatura que avaliou, em ratos, as concentrações de Pb existentes no sangue total de ratos quanto foram administrados concomitantemente Pg (30 mg/L) e F (100 mg/L) através da água de beber, foi o de Sawan et al. (2010). Neste trabalho, o Pb e o F foram empregados na forma de acetato de Pb e H_2SiF_6 , compostos similares aos que foram utilizados no presente estudo. O tempo experimental também foi semelhante, assim como o método analítico do Pb (ICP-MS). No estudo de Sawan et al. (2010), quando o Pb foi administrado concomitantemente com o F, concentrações médias de Pb no sangue total foram cerca de 3,5 vezes maiores que aquelas encontradas com o Pb foi administrado sozinho ($76,7 \pm 11,0 \mu\text{g/dL}$ X $22,6 \pm 8,5 \mu\text{g/dL}$), sendo esta diferença significativa. Já nos grupos controle e que recebeu apenas F na água de beber as concentrações de Pb no sangue total foram bem baixas ($<0,5 \mu\text{g/dL}$). No presente estudo, entretanto, a administração concomitante de F não afetou significativamente as concentrações de Pb no sangue total (Tabela 10). As concentrações de Pb encontradas no sangue total quando foi administrada água contendo 30 mgPb/L foram próximas de 50 $\mu\text{g/L}$ (ou 5 $\mu\text{g/dL}$), independentemente da concentração de F na água ou do composto fluoretado utilizado (Tabela 11). Estes valores são, portanto, aproximadamente 10 vezes menores que aqueles relatados por Sawan et al. (2010), mas estão de acordo com estudos onde foi utilizada água contendo 100 mgPb/L (sem F) por um tempo de tratamento menor (6 semanas), que encontraram concentrações de F no sangue total próximas de 10 $\mu\text{g/dL}$ (Wang et al., 2007; Duarte, 2013). Devido ao fato que há, até o presente momento, apenas dois trabalhos que avaliam, em modelo animal, o possível efeito da administração concomitante de F e Pb nas concentrações de Pb encontradas no sangue total (o de Sawan et al., 2010 e o presente estudo) e os resultados são contraditórios (Sawan et al., 2010 encontraram que a administração concomitante de F aumenta significativamente as concentrações de Pb no sangue total e no nosso estudo o F não interferiu nos níveis de Pb encontrados no sangue total), mais estudos são

---

necessários para se chegar a conclusões inequívocas em relação a este tópico. Deve ser destacado o grande desvio-padrão obtido, que torna mais difícil a detecção de diferenças significativas entre os grupos (Tabela 10).

Tabela 10. Concentrações de chumbo médias (DP) no sangue total ($\mu\text{g/L}$) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação

Pb/F	0 mg/L		100 mg/L	
	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6
0 mg/L	0,800ab (0,929) n=3	0,800ab (0,929) n=3	0,366a (0,307) n=8	0,873a (0,953) n=5
1 mg/L	3,112ab (1,363) n=3	3,112ab (1,363) n=3	1,910a (0,556) n=9	19,074abc (13,896) n=4
10 mg/L	26,43abcd (13,589) n=5	26,43abcd (13,589) n=5	21,127abc (14,808) n=6	34,102bcd (25,001) n=7
30 mg/L	45,380cd (15,151) n=8	45,380cd (15,151) n=8	50,543d (22,083) n=7	52,055cd (13,884) n=4

Letras distintas indicam diferença significativa (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$)

Tabela 11. Teste de Tukey para a variável concentração de chumbo no sangue total ($\mu\text{g/L}$) em função da concentração de chumbo adicionada à água de beber

Critérios	Níveis	Média chumbo sangue total
Concentração Chumbo	0 mg/L	0,637 ^a
	1 mg/L	5,903 ^a
	10 mg/L	47,707 ^b
	30 mg/L	27,381 ^b

Para cada critério, letras distintas indicam diferença significativa entre os níveis ($p < 0,05$). A ANOVA a 3 critérios não encontrou diferença significativa entre os compostos fluoretados e nem para a concentração de fluoreto presente na água de beber.

Em relação à concentração média de Pb no osso (Tabela 12), a ANOVA a 3 critérios encontrou diferença significativa entre os compostos fluoretados ($F=16,7$, $p < 0,0001$), entre as concentrações de F ($F=2155,7$, $p < 0,0001$), bem como entre as concentrações de Pb ($F=535,5$, $p < 0,0001$). Interações significativas foram encontradas entre os critérios composto fluoretado e concentração de F ($F=6,3$, $p < 0,0001$), composto fluoretado e concentração de Pb ($F=12,9$, $p < 0,0001$),

concentração de F e concentração de Pb (21,3, $p < 0,0001$), bem como para os 3 critérios avaliados ($F = 3,15940,5$, $p < 0,01$).

A tabela 13 mostra o resultado do teste de Tukey para cada um dos critérios avaliados no estudo. Em relação ao composto fluoretado, o teste de Tukey (Tabela 13) revelou concentrações de Pb no osso significativamente maiores quando foi utilizado o H_2SiF_6 (média 1,655 $\mu g/g$) quando comparado ao NaF (média 1,346 $\mu g/g$). A concentração de F no osso também foi significativamente maior quando foi utilizado o H_2SiF_6 quando comparado ao NaF (Tabela 4). É possível que o pH mais acidulado do H_2SiF_6 possa favorecer uma maior absorção do F e do Pb, aumentando sua circulação no organismo, e, conseqüentemente, sua incorporação no tecido ósseo, embora para a concentração de Pb no sangue total não tenha havido influência do tipo de composto fluoretado. Este é o primeiro estudo que avaliou a diferença na incorporação de Pb no osso em função do tipo de composto fluoretado (NaF ou H_2SiF_6), de forma que não há como comparar o presente resultado com outros trabalhos.

Já para o critério concentração de Pb adicionado à água, o padrão observado foi semelhante àquele visto para a concentração de Pb no sangue total. Foi observada uma dose-resposta, embora o grupo que recebeu água contendo a menor concentração de Pb (1 mg/L) não diferiu significativamente do controle. Em todos os outros casos, diferenças significativas foram encontradas (Tabela 13).

Quando foi considerada a concentração de F utilizada no tratamento dos animais, diferentemente do observado para o plasma, foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de Pb no osso, que foram menores no grupo controle quando comparado aos demais (Tabela 13). A administração concomitante de F através da água aumentou significativamente as concentrações de Pb no osso, entretanto não foi observada dose-resposta, já que as maiores concentrações de Pb no osso foram encontradas nos grupos que receberam 5 e 100 mg/L de F na água (médias de 1,903 e 1,991 $\mu g/g$, respectivamente), que não diferiram significativamente entre si, mas foram significativamente maiores que aquelas observadas para o grupo que recebeu água contendo 50 mgF/L (média de 1,458 $\mu g/g$). Nossos resultados, são numericamente menores que aqueles observados por Sawan et al. (2010). Estes autores encontraram concentrações médias de Pb no osso total de $14,2 \pm 2,6$ e $6,8 \pm 1,7$ $\mu g/g$ para os grupos que receberam Pb (30 mg/L) +

F (100 mg/L) ou apenas Pb (30 mg/L), ou seja, um aumento nas concentrações de Pb no osso da ordem de 2 vezes pela exposição concomitante ao F. No nosso estudo, os valores médios ($\pm$ DP) correspondentes foram $7,318 \pm 2,612$ e $2,269 \pm 0,902$ $\mu\text{g/g}$, respectivamente, ou seja, foram cerca de 3,2 vezes maiores quando a exposição ao F foi associada à exposição ao Pb. Estes resultados confirmam os achados de Sawan et al. (2010), bem como dão suporte aos achados de estudos epidemiológicos que relataram uma associação entre o uso de sílicofluoretos para tratar água de abastecimento e o aumento da concentração de Pb no sangue de crianças (Masters & Coplan, 1999; Masters et al., 2000; Macek et al. (2006). O Pb encontrado presente na água de abastecimento geralmente é liberado da tubulação presente nas residências mais antigas. Os achados do presente estudo sugerem que estas tubulações devem ser substituídas para se evitar o risco de contaminação. Deve ser destacado que no sangue total não foi observada esta capacidade do F em aumentar a concentração de Pb no sangue, provavelmente devido ao desvio-padrão elevado das análises. Em adição, pode-se dizer que o osso é um biomarcador mais apropriado, porque reflete a exposição durante um longo período de tempo, ao contrário do sangue, que é um marcador contemporâneo e, portanto, mais susceptível a flutuações devido, por exemplo, a ingestões recentes do analito a ser analisado (OMS, 1994).

Tabela 12. Concentrações de chumbo médias (DP) no osso ($\mu\text{g/g}$) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação

Pb/F	0 mg/L		5 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6
0 mg/L	0,033a (0,032) n=10	0,033a (0,032) n=10	0,029a (0,015) n=10	0,361a (0,221) n=10	0,045a (0,070) n=10	0,134a (0,164) n=10	0,007a (0,007) n=10	0,502ab (0,716) n=10
1 mg/L	0,152a (0,085) n=9	0,152a (0,085) n=9	0,239a (0,095) n=10	0,405ab (0,312) n=9	0,235a (0,064) n=10	0,486ab (0,408) n=8	0,206a (0,043) n=10	0,596abd (0,991) n=10
10 mg/L	0,290a (0,053) n=9	0,290a (0,053) n=9	1,728bcd (0,692) n=10	1,720bcd (0,453) n=10	1,960cd (0,514) n=9	0,424ab (0,144) n=8	1,955c (0,638) n=10	2,351c (0,457) n=10
30 mg/L	2,269c (0,902) n=10	2,269c (0,902) n=10	4,244e (0,793) n=8	6,828g (1,520) n=10	3,854e (0,431) n=7	4,891ef (1,924) n=10	5,661 (1,477) ^{fg} n=9	7,318 (2,612) ^g n=5

Letras distintas indicam diferença significativa (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 13. Teste de Tukey para a variável concentração de chumbo no osso ($\mu\text{g/g}$) em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de chumbo adicionados à água de beber

Critérios	Níveis	Média chumbo osso
Composto fluoretado	NaF	1,345 ^a
	H ₂ SiF ₆	1,655 ^b
Concentração fluoreto	0 mg/L	0,711 ^a
	50 mg/L	1,458 ^b
	5 mg/L	1,903 ^c
	100 mg/L	1,991 ^c
Concentração Chumbo	0 mg/L	0,148 ^a
	1 mg/L	0,315 ^a
	10 mg/L	1,357 ^b
	30 mg/L	4,447 ^c

Para cada critério, letras distintas indicam diferença significativa entre os níveis ($p < 0,05$).

Para a quantidade média de Pb excretada através da urina (Tabela 14), a ANOVA a 3 critérios não encontrou diferença significativa em função das concentrações de F ($F=2,270$, $p=0,081$), mas sim entre os compostos fluoretados ($F=54,6$, $p<0,0001$), bem como entre as concentrações de Pb ($F=133,9$, $p<0,0001$). Interações significativas foram encontradas entre os critérios composto fluoretado e concentração de F ($F=13,5$, $p<0,0001$), composto fluoretado e concentração de Pb (10,8, $p<0,0001$), bem como para os 3 critérios avaliados ($F=5,024$, $p<0,0001$).

A tabela 14 mostra o resultado do teste de Tukey para cada um dos critérios avaliados no estudo para os quais a ANOVA a 3 critérios encontrou diferença significativa. A excreção de Pb através da urina foi significativamente maior quando o F foi ingerido na forma de H₂SiF₆ (média de 0,099 μg) do que quando na forma de NaF (média de 0,058 μg), assim como foi observado para o tecido ósseo. Portanto, a maior concentração de Pb no osso quando o fluoreto é administrado na forma de H₂SiF₆ não pode ser explicada por uma menor excreção urinária de Pb nesta situação, já que a excreção urinária de Pb também foi maior.

Já para o critério concentração de Pb adicionado à água, o padrão observado foi semelhante àquele visto para a concentração de Pb no sangue total e no osso. Foi observada uma dose-resposta, embora o grupo que recebeu água contendo a menor concentração de Pb (1 mg/L) não tenha diferido significativamente do

controle. Em todos os outros casos, diferenças significativas foram encontradas (Tabela 15). Esta dose-resposta indica que o tratamento com chumbo foi adequado.

Tabela 14. Quantidade de chumbo média (DP) excretada na urina (μg) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação

Pb/F	0 mg/L		5 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6
0	0,032abcd (0,021) n=12	0,032abcd (0,021) n=12	0,029abc (0,022) n=12	0,027ab (0,021) n=12	0,030abcd (0,024) n=11	0,028abc (0,013) n=11	0,017a (0,010) n=12	0,022abcd (0,010) n=7
1	0,027ab (0,025) n=12	0,027ab (0,025) n=12	0,021ab (0,014) n=10	0,032abcde (0,033) n=4	0,025abcd (0,016) n=8	0,111cdefg (0,026) n=7	0,012a (0,005) n=9	0,099abcdefg (0,041) n=5
10	0,095bcdefg (0,054) n=12	0,095bcdefg (0,054) n=12	0,056abcdef (0,027) n=5	0,113defg (0,062) n=7	0,054abcde (0,022) n=12	0,133fg (0,032) n=12	0,052abcde (0,019) n=8	0,076abcdefg (0,001) n=2
30	0,171gh (0,075) n=7	0,171gh (0,075) n=7	0,125efg (0,086) n=10	0,251hi (0,116) n=8	0,076abcdefg (0,049) n=6	0,291i (0,087) n=8	0,143fg (0,065) n=12	0,149fg (0,079) n=8

Letras distintas indicam diferença significativa (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 15. Teste de Tukey para a quantidade de chumbo excretada na urina (μg) em função do tipo de composto fluoretado e concentração de Pb adicionada à água de beber

Critérios	Níveis	Média chumbo urina
Composto fluoretado	NaF	0,058 ^a
	H_2SiF_6	0,099 ^b
Concentração Chumbo	0 mg/L	0,027 ^a
	1 mg/L	0,038 ^a
	10 mg/L	0,088 ^b
	30 mg/L	0,172 ^c

Para cada critério, letras distintas indicam diferença significativa entre os níveis ($p < 0,05$).

Em relação à excreção média de Pb através das fezes (Tabela 16), a ANOVA a 3 critérios encontrou diferença significativa entre os compostos fluoretados ($F=155,0$ $p < 0,0001$), entre as concentrações de F ($F=40,4$, $p < 0,0001$), bem como entre as concentrações de Pb ($F=315,6$ $p < 0,0001$). Interações significativas foram encontradas entre os critérios composto fluoretado e concentração de F ($F=25,2$, $p < 0,0001$), composto fluoretado e concentração de Pb ($F=57,6$, $p < 0,0001$),

concentração de F e concentração de Pb (20,2, $p < 0,0001$), bem como para os 3 critérios avaliados ($F = 9,4$ $p < 0,0001$).

A tabela 13 mostra o resultado do teste de Tukey para cada um dos critérios avaliados no estudo. Em relação ao composto fluoretado, os resultados seguiram o mesmo padrão visto para a excreção urinária de Pb, ou seja, a excreção de Pb através das fezes foi significativamente maior quando o F foi ingerido na forma de H_2SiF_6 (média de 61,200 μg) do que quando na forma de NaF (média de 29,972 μg), assim como foi observado para o tecido ósseo. Portanto, a maior concentração de Pb no osso quando o fluoreto é administrado na forma de H_2SiF_6 não pode ser explicada por uma menor excreção (urinária e fecal) de Pb nesta situação, já que a excreção urinária e fecal de Pb também foi maior quando foi empregado o H_2SiF_6 . Este é o primeiro estudo que avaliou a diferença na incorporação de Pb no osso em função do tipo de composto fluoretado (NaF ou H_2SiF_6), de forma que não há como comparar o presente resultado com outros trabalhos.

Tem sido relatado que cerca de 90% do Pb ingerido é excretado através das fezes (Hunder et al., 2000), o que está de acordo com o presente estudo, no qual as quantidades de Pb excretadas através das fezes (Tabela 16) foram substancialmente maiores que aquelas excretadas através da urina (Tabela 14). Quando o critério concentração de Pb adicionado à água foi considerado, foi observada uma dose-resposta, com diferença significativa entre todas as concentrações de Pb avaliadas (Tabela 17).

Enquanto que a concentração de F utilizada no tratamento dos animais não influenciou na excreção urinária de Pb (Tabela 15), interferiu significativamente na excreção fecal de Pb (Tabela 17). Entretanto, não foi observada uma dose-resposta. O grupo controle (sem F na água) foi o que apresentou a mais baixa excreção fecal de Pb (média de 22,381 μg), diferindo significativamente dos demais. Valores intermediários de excreção fecal de Pb foram observados para o grupo que recebeu a mais alta concentração de F na água (100 mgF/L, 39,860 μg), que também diferiu significativamente de todos os demais. As maiores excreções fecais de Pb foram observadas para os grupos que receberam 50 e 5 mgF/L (54,367 e 62,292, respectivamente), que não diferiram significativamente entre si. Os resultados do presente estudo indicam que quando o F e o Pb são administrados simultaneamente, em diferentes concentrações, a interação entre ambos é

---

complexa. Assim, a concentração de F no osso não pode ser explicada com base no seu padrão de excreção urinária (Tabela 15) e/ou fecal (Tabela 17), já que o grupo controle (sem F na água) por exemplo, foi o que apresentou as menores concentrações de F no osso e também as menores excreções fecais.

Tabela 16. Quantidade de chumbo média (DP) excretada nas fezes (μg) em ratos machos de 80 dias de idade expostos a diferentes concentrações de fluoreto (como NaF ou H_2SiF_6) e/ou chumbo através da água de beber desde o começo da gestação

Pb/ F	0 mg/L		5 mg/L		50 mg/L		100 mg/L	
	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6	NaF	H_2SiF_6
0 mg/L	8,049abcd (3,012) n=11	8,049abcd (3,012) n=11	6,327abc (3,481) n=11	8,276abcd (3,052) n=12	4,655a (3,165) n=12	5,469ab (2,064) n=11	3,649a (2,709) n=12	5,199abc (3,093) n=10
1 mg/L	9,407abcd (6,024) n=12	9,407abcd (6,024) n=12	7,813abcd (4,689) n=11	42,825bcde fg (18,701) n=11	7,651abcd (0,654) n=11	31,993abcd ef (17,757) n=11	5,938abcd (3,244) n=8	18,745abc de (13,134) n=11
10 mg/L	39,562abcde fg (23,230) n=11	39,562abcde fg (23,230) n=11	43,243cde fg (9,738) n=12	63,815fghi (12,735) n=11	45,184def g (9,242) n=11	92,651i (21,078) n=12	44,679abcdef gh (17,761) n=7	49,567efg h (16,463) n=9
30 mg/L	37,922abcde fg (7,133) n=8	37,922abcde fg (7,133) n=8	75,437l (17,251) n=12	239,903ghi (72,622) n=12	60,201fgh i (29,297) n=12	187,638j (54,784) n=11	84,203hi (62,313) n=10	159,898j (16,525) n=6

Letras distintas indicam diferença significativa (ANOVA a 3 critérios e teste de Tukey, $p < 0,05$).

Tabela 17. Teste de Tukey para a quantidade de chumbo excretada nas fezes (μg) em função do tipo de composto fluoretado, concentração de fluoreto e concentração de Pb adicionados à água de beber

Critérios	Níveis	Média chumbo osso
Composto fluoretado	NaF	29,972 ^a
	H_2SiF_6	61,200 ^b
Concentração fluoreto	0 mg/L	22,380 ^a
	100 mg/L	39,860 ^b
	50 mg/L	54,367 ^c
	5 mg/L	62,292 ^c
Concentração Chumbo	0 mg/L	6,198 ^a
	1 mg/L	16,926 ^b
	10 mg/L	53,082 ^c
	30 mg/L	113,654 ^d

Para cada critério, letras distintas indicam diferença significativa entre os níveis ($p < 0,05$).

5 CONCLUSÕES

---

5 CONCLUSÕES

No presente estudo observou-se que tanto o composto fluoretado, quanto a concentração de F na água e a concentração de Pb na água interferiram na retenção de F e de Pb no organismo, o que levou à rejeição de todas as hipóteses nulas formuladas. Os dados obtidos reforçam achados de estudos prova-de-conceito prévios que relataram que a administração concomitante de F e Pb através da água de beber é capaz de aumentar a retenção de F (Leite et al., 2011) e de Pb no organismo (Sawan et al., 2010). Nossos resultados indicam ainda que a excreção urinária e fecal de F e Pb não é suficiente para explicar a maior retenção deste elementos no organismo. Estes resultados têm uma grande implicação em Saúde Pública. Primeiramente, deve ser destacado que o H_2SiF_6 é o composto mais utilizado na fluoretação artificial das águas de abastecimento. Os resultados do presente estudo mostraram que quando o F é adicionado à água na forma de H_2SiF_6 , concentrações significativamente mais altas de F são observadas no plasma e no osso, e quantidades significativamente menores de F são excretadas através da urina. Isto leva a uma maior biodisponibilidade do F no organismo, em comparação ao NaF. Maior biodisponibilidade do Pb também é observada quando o F é administrado na forma de H_2SiF_6 em comparação ao NaF, com concentrações significativamente maiores de Pb no osso, a despeito de uma maior excreção urinária e fecal de Pb. Estes resultados confirmam os achados de Sawan et al. (2010) e de Leite et al. (2011), bem como dão suporte aos achados de estudos epidemiológicos que relataram uma associação entre o uso de sílicofluoretos para tratar água de abastecimento e o aumento da concentração de Pb no sangue de crianças (Masters & Coplan, 1999; Masters et al., 2000; Macek et al. (2006). O Pb encontrado presente na água de abastecimento geralmente é liberado da tubulação das residências mais antigas. Os achados do presente estudo sugerem que estas tubulações devem ser substituídas para se evitar o risco de contaminação por Pb, bem como o maior risco de ocorrência de fluorose dentária, já que a administração concomitante de F e Pb parece aumentar a biodisponibilidade de ambos no organismo. Estudos adicionais devem ser conduzidos para se confirmar se nas concentrações de Pb e F normalmente presente nos sistemas de abastecimento de

---

água os resultados obtidos são semelhantes, bem como para elucidar os mecanismos que levam aos efeitos observados.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ACCLPP Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. Low level lead exposure harms children: a renewed call for primary prevention. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC, Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention; 2012.

Angmar-Mansson B, Whitford GM: Enamel fluorosis related to plasma f levels in the rat. *Caries Res* 1984;18:25-32.

ATDSR: Toxicological profile for lead; in. Atlanta (GA), Agency for Toxic Substances and Diseases Registry, 1999.

Barbosa F, Jr., Correa Rodrigues MH, Buzalaf MR, Krug FJ, Gerlach RF, Tanus-Santos JE: Evaluation of the use of salivary lead levels as a surrogate of blood lead or plasma lead levels in lead exposed subjects. *Arch Toxicol* 2006;80:633-637.

Barbosa F, Jr., Tanus-Santos JE, Gerlach RF, Parsons PJ: A critical review of biomarkers used for monitoring human exposure to lead: Advantages, limitations, and future needs. *Environ Health Perspect* 2005;113:1669-1674.

Bezerra de Menezes LM, Volpato MC, Rosalen PL, Cury JA: Bone as a biomarker of acute fluoride toxicity. *Forensic Sci Int* 2003;137:209-214.

BRASIL.: Estabelece os procedimentos e responsabilidaeds relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão d epotabilidade , e dá outras providências.; in Saúde Md (ed). Brasil, Diário Oficial da União, 2004, vol Portaria 518.

Brito JA, McNeill FE, Webber CE, Chettle DR: Grid search: An innovative method for the estimation of the rates of lead exchange between body compartments. *J Environ Monit* 2005;7:241-247.

Buzalaf MA, Whitford GM. Fluoride metabolism. *Monogr Oral Sci.* 2011;22:20-36.

Carvalho JG, Cestari TM, de Oliveira RC, Buzalaf MA. Fluoride effects on ectopic bone formation in young and old rats. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2008;30(4):287-94

Carvalho JG, de Oliveira RC, Buzalaf MA. Plasma as an indicator of bone fluoride levels in rats chronically exposed to fluoride. *J Appl Oral Sci.* 2006 ;14(4):238-41.

Carvalho JG, Leite AL, Peres-Buzalaf C, Salvato F, Labate CA, Everett ET, Whitford GM, Buzalaf MA. Renal proteome in mice with different susceptibilities to fluorosis. *PLoS One.* 2013;8(1):e53261.

Carvalho JG, Leite AL, Yan D, Everett ET, Whitford GM, Buzalaf MA: Influence of genetic background on fluoride metabolism in mice. *J Dent Res* 2009;88:1054-1058.

CDC Center for Disease Control and Prevention. CDC response to Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention recommendations in "Low level lead exposure harms children: a renewed call for primary prevention." Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, CDC; 2012.

CDC: Achievements in public health 1900-1999: Fluoridation of drinking water to prevent dental caries. ; in., *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 1999, vol 48, pp 933-944.

CDC: Fluoridation census 1992; in. Atlanta, GA, 1993.

CDC: Preventing lead poisoning in young children; in. Atlanta (GA), US Centers for Disease Control e Prevention; 1991.

Chiodo LM, Covington C, Sokol RJ, Hannigan JH, Jannise J, Ager J, Greenwald M, Delaney-Black V: Blood lead levels and specific attention effects in young children. *Neurotoxicol Teratol* 2007;29:538-546.

Chiodo LM, Jacobson SW, Jacobson JL: Neurodevelopmental effects of postnatal lead exposure at very low levels. *Neurotoxicol Teratol* 2004;26:359-371.

Coplan MJ, Patch SC, Masters RD, Bachman MS: Confirmation of and explanations for elevated blood lead and other disorders in children exposed to water disinfection and fluoridation chemicals. *Neurotoxicology* 2007;28:1032-1042.

Costa de Almeida GR, Pereira Saraiva Mda C, Barbosa F, Jr., Krug FJ, Cury JA, Rosario de Sousa Mda L, Rabelo Buzalaf MA, Gerlach RF: Lead contents in the surface enamel of deciduous teeth sampled in vivo from children in uncontaminated and in lead-contaminated areas. *Environ Res* 2007;104:337-345.

de Almeida GR, de Souza Guerra C, Tanus-Santos JE, Barbosa F, Jr., Gerlach RF: A plateau detected in lead accumulation in subsurface deciduous enamel from

---

individuals exposed to lead may be useful to identify children and regions exposed to higher levels of lead. *Environ Res* 2008;107:264-270.

DeMichele SJ: Nutrition of lead. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol* 1984;78:401-408.

Duarte JL. Potencial evocado auditivo cortical, análise bioquímica e morfológica em cérebro de ratos submetidos a tratamento subcrônico com chumbo: efeito protetor da suplementação com ferro. Tese de Doutorado. Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, 2013.

Dunipace AJ, Brizendine EJ, Zhang W, Wilson ME, Miller LL, Katz BP, Warrick JM, Stookey GK. Effect of aging on animal response to chronic fluoride exposure. *J Dent Res*. 1995 Jan;74(1):358-68.

Fine BP, Barth A, Sheffet A, Lavenhar MA: Influence of magnesium on the intestinal absorption of lead. *Environ Res* 1976;12:224-227.

Forbes GB, Reina JC: Effect of age on gastrointestinal absorption (fe, sr, pb) in the rat. *J Nutr* 1972;102:647-652.

Gomes VE, Rosario de Sousa Mda L, Barbosa F, Jr., Krug FJ, Pereira Saraiva Mda C, Cury JA, Gerlach RF: In vivo studies on lead content of deciduous teeth superficial enamel of preschool children. *Sci Total Environ* 2004;320:25-35.

Gulson BL, Mahaffey KR, Mizon KJ, Korsch MJ, Cameron MA, Vimpani G: Contribution of tissue lead to blood lead in adult female subjects based on stable lead isotope methods. *J Lab Clin Med* 1995;125:703-712.

Gulson BL, Mizon KJ, Korsch MJ, Howarth D, Phillips A, Hall J: Impact on blood lead in children and adults following relocation from their source of exposure and contribution of skeletal tissue to blood lead. *Bull Environ Contam Toxicol* 1996;56:543-550.

Gwiazda R, Campbell C, Smith D: A noninvasive isotopic approach to estimate the bone lead contribution to blood in children: Implications for assessing the efficacy of lead abatement. *Environ Health Perspect* 2005;113:104-110.

Hunder G, Javdani J, Elsenhans B, Schumann K. Use of gamma-spectrometry for simultaneous determination of Pb-210, As-73, Cd-109, Hg-203 and Fe-59 distribution and excretion in rats. *Toxicology* 2000;150:69–82.

Jugo S, Maljkovic T, Kostial K: Influence of chelating agents on the gastrointestinal absorption of lead. *Toxicol Appl Pharmacol* 1975;34:259-263.

Kick CH, Bethke RM, Edgington BH, Wildre OHM, Record PR, Wilder W et al. Fluorine in animal nutrition. *Ohio Agric Exp Stat* 1935;558:59-60.

Kobayashi CA, Leite AL, Silva TL, Santos LD, Nogueira FC, Oliveira RC, Palma MS, Domont GB, Buzalaf MA. Proteomic analysis of kidney in rats chronically exposed to fluoride. *Chem Biol Interact.* 2009 Jul 15;180(2):305-11.

Lanphear BP, Dietrich K, Auinger P, Cox C: Cognitive deficits associated with blood lead concentrations <10 microg/dl in us children and adolescents. *Public Health Rep* 2000;115:521-529.

Leite AL, Caroselli EE, Maria AG, Fernandes MS, Buzalaf MA. Kinetics of fluoride removal from plasma and bone of rats after chronic intake of fluoride. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2008;30(3):209-14.

Leite GA, Sawan RM, Teófilo JM, Porto IM, Sousa FB, Gerlach RF. Exposure to lead exacerbates dental fluorosis. *Arch Oral Biol.* 2011;56(7):695-702.

Maas RP, Patch SC, Christian AM, Coplan MJ: Effects of fluoridation and disinfection agent combinations on lead leaching from leaded-brass parts. *Neurotoxicology* 2007;28:1023-1031.

Macek MD, Matte TD, Sinks T, Malvitz DM: Blood lead concentrations in children and method of water fluoridation in the united states, 1988-1994. *Environ Health Perspect* 2006;114:130-134.

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 Nov;84(11):989-93.

Masters RD, Coplan MJ, Hone BT, Dykes JE: Association of silicofluoride treated water with elevated blood lead. *Neurotoxicology* 2000;21:1091-1100.

Masters RD, Coplan MJ: Water fluoridation with silicofluorides and lead toxicity. *Int J Environ Stud* 1999;56:15.

McClure FJ. Availability of fluorine in sodium fluoride vs. sodium fluorosilicate. *Public Health Rep* 1950:1175-86.

McDonagh MS, Whiting PF, Wilson PM, Sutton AJ, Chestnutt I, Cooper J, Misso K, Bradley M, Treasure E, Kleijnen J: Systematic review of water fluoridation. *BMJ* 2000;321:855-859.

Moreira FR, Moreira JC: [effects of lead exposure on the human body and health implications]. *Rev Panam Salud Publica* 2004;15:119-129.

O'Flaherty EJ: Physiologically based models for bone-seeking elements. Iv. Kinetics of lead disposition in humans. *Toxicol Appl Pharmacol* 1993;118:16-29.

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

Olympio KP, Oliveira PV, Naozuka J, Cardoso MR, Marques AF, Gunther WM, Bechara EJ: Surface dental enamel lead levels and antisocial behavior in Brazilian adolescents. *Neurotoxicol Teratol* 2010a;32:273-279.

Olympio KPK, Naozuka J, Magalhães AC, Garcia VPM, Oliveira PV, Buzalaf M, Bechara EJH, Günther WMR. Microbiopsies of surface dental enamel as a tool to measure body lead burden. *J Toxicol Environ Health A*. 2010b;73(9):627-636.

Organização Mundial da Saúde. Fluoride and Oral health. Report of a WHO expert committee on oral health status and fluoride use. *WHO Tech Rep Ser* 1996;846:37.

Pereira HA, Leite Ade L, Charone S, Lobo JG, Cestari TM, Peres-Buzalaf C, Buzalaf MA. Proteomic analysis of liver in rats chronically exposed to fluoride. *PLoS One*. 2013 Sep 17;8(9):e75343.

Pessan JP, Buzalaf MR. Historical and recent biological markers of exposure to fluoride. *Monogr Oral Sci*. 2011;22:52-65.

Rabinowitz MB, Kopple JD, Wetherill GW: Effect of food intake and fasting on gastrointestinal lead absorption in humans. *Am J Clin Nutr* 1980;33:1784-1788.

Rabinowitz MB, Wetherill GW, Kopple JD: Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J Clin Invest* 1976;58:260-270.

Rabinowitz MB: Relating tooth and blood lead levels in children. *Bull Environ Contam Toxicol* 1995;55:853-857.

Rabinowitz MB: Toxicokinetics of bone lead. *Environ Health Perspect* 1991;91:33-37.

Ragan HA: Effects of iron deficiency on the absorption and distribution of lead and cadmium in rats. *J Lab Clin Med* 1977;90:700-706.

Sakai T: Biomarkers of lead exposure. *Ind Health* 2000;38:127-142.

Sawan RM, Leite GA, Saraiva MC, Barbosa F, Jr., Tanus-Santos JE, Gerlach RF: Fluoride increases lead concentrations in whole blood and in calcified tissues from lead-exposed rats. *Toxicology* 2010;271:21-26.

Sheldon T, Holgate ST. Is artificial fluoride absorbed to the same extent as natural fluoride? *J Dent Res*. 2008;87(1):8.

Smith DR, Osterloh JD, Flegal AR: Use of endogenous, stable lead isotopes to determine release of lead from the skeleton. *Environ Health Perspect* 1996;104:60-66.

Souza CF, Lima JF Jr, Adriano MS, de Carvalho FG, Forte FD, de Farias Oliveira R, Silva AP, Sampaio FC. Assessment of groundwater quality in a region of endemic fluorosis in the northeast of Brazil. *Environ Monit Assess*. 2013;185(6):4735-43

Taves DR: Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. *Talanta* 1968;15:969-974.

Toscano CD, Guilarte TR: Lead neurotoxicity: From exposure to molecular effects. *Brain Res Brain Res Rev* 2005;49:529-554.

Villa A, Anabalon M, Zohouri V, Maguire A, Franco AM, Rugg-Gunn A. Relationships between fluoride intake, urinary fluoride excretion and fluoride retention in children and adults: an analysis of available data. *Caries Res*. 2010;44(1):60-8.

Wang Q, Luo W, Zheng W, Liu Y, Xu H, Zheng G. et al. Iron supplement prevents lead-induced disruption of the blood-brain barrier during rat development. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007a;219(1):33-41.

Whitford GM, Sampaio FC, Pinto CS, Maria AG, Cardoso VE, Buzalaf MA. Pharmacokinetics of ingested fluoride: lack of effect of chemical compound. *Arch Oral Biol*. 2008;53(11):1037-41.

Whitford GM: Some characteristics of fluoride analysis with the electrode; in Myers EM (ed): The metabolism and toxicity of fluoride. Monographs in oral science. Basel, Karger, 1996, pp 24-29.

Yeung CA: A systematic review of the efficacy and safety of fluoridation. Evid Based Dent 2008;9:39-43.

Zipkin I, McClure FJ. Complex fluorides: caries reduction and fluorine retention in the bones and teeth of white rats. Public Health Rep 1951;23:1523-32.

ANEXOS

ANEXO 1

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Fone: (14)3235-8356

e-mail: mferrari@fob.usp.br

CEEPA-Proc. Nº 031/2010

Bauru, 14 de dezembro de 2010.

Senhora Professora,

O projeto de pesquisa encaminhado a esta Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais, denominado **Influência da administração concomitante de fluoreto através da água de beber no metabolismo e incorporação de chumbo em ratos: estudo dose-resposta**, de autoria Priscila Aparecida Teixeira de Muno Barreta, sob sua orientação, foi aprovado "*ad referendum*", desta Comissão, nesta data.

Solicitamos que ao final da pesquisa seja enviado, para avaliação desta Comissão, um Relatório com os resultados obtidos para análise ética e emissão de parecer final, o qual poderá ser utilizado para fins de publicação científica.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet
Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª. Drª. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas

ANEXO 2

Universidade de São Paulo Faculdade de Odontologia de Bauru

Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

CEEPA-Proc. Nº 031/2010

Bauru, 04 de dezembro de 2012.

Senhora Professora,

Em atenção à solicitação de Vossa Senhoria (pedido de 30 animais: Ratos Wistar, sendo 10 machos e 20 fêmeas em idade de acasalamento) para o término do projeto de pesquisa denominado **Influência da administração concomitante de fluoreto através da água de beber no metabolismo e incorporação de chumbo em ratos: estudo dose-resposta**, de autoria de Priscila Aparecida Teixeira de Muno Barreta, sob sua orientação, informamos que referida solicitação foi encaminhada ao relator para avaliação e considerada **APROVADA** em reunião desta Comissão, realizada no dia **19 de novembro de 2012**.

Solicitamos que ao término da pesquisa seja enviado um relatório final com os resultados obtidos para análise e emissão de parecer, o qual poderá ser utilizado para publicação em revistas científicas.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Gustavo Pompermaier Garlet

Presidente da Comissão de Ética no Ensino e Pesquisa em Animais

Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf

Docente do Departamento de Ciências Biológicas da FOB/USP