**CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR NAS UNHAS E NA URINA:
COMPARAÇÃO ENTRE CRIANÇAS QUE RECEBERAM
ÁGUA NATURAL OU ARTIFICIALMENTE FLUORETADA,
SAL OU LEITE FLUORETADO**

MARIA HELOÍSA CORRÊA RODRIGUES

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru, da
Universidade de São Paulo, como
parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Odontologia, área
de Biologia Oral

Bauru

2007

***CONCENTRAÇÃO DE FLÚOR NAS UNHAS E NA URINA:
COMPARAÇÃO ENTRE CRIANÇAS QUE RECEBERAM
ÁGUA NATURAL OU ARTIFICIALMENTE FLUORETADA,
SAL OU LEITE FLUORETADO***

MARIA HELOÍSA CORRÊA RODRIGUES

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de Biologia Oral

**Orientadora: Profa. Dra. Marília
Afonso Rabelo Buzalaf**

Bauru
2007

R618c

Rodrigues, Maria Heloísa Corrêa

Concentração de flúor nas unhas e na urina: comparação entre crianças que receberam água natural ou artificialmente fluoretada, sal ou leite fluoretado / Maria Heloísa Corrêa Rodrigues. -- Bauru, 2007.

186 p. : il. ; 30 cm.

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

Orientadora: Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf

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

Assinatura da autora:

Data:

Comitê de Ética da FOB-USP

Processo n.º: 116/2004

Data: 19 de novembro de 2004

MARIA HELOÍSA CORRÊA RODRIGUES

14 de fevereiro de 1975	Nascimento - Presidente Prudente - SP
1993 – 1996	Curso de Odontologia – Universidade do Sagrado Coração – Bauru – SP
1997	Curso de Aperfeiçoamento em Odontologia Preventiva, ministrado na PREV
1998 – 1999	Curso de Especialização em Odontologia em Saúde Coletiva – Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo
2001 - 2003	Mestrado em Ortodontia e Odontologia em Saúde Coletiva, área de concentração Saúde Coletiva
Associações	CROSP – Conselho Regional de Odontologia de São Paulo SBPqO – Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

À Deus,

Pois sem Ele nada seria possível.

Possibilitando força e saúde para mais uma conquista,
nesta passagem, que é a vida.

Aos meus pais, *Mariano e Risoleta,*

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

Ao meu marido *Julio Cesar,*

Verdadeiro aliado em todos os momentos,
meu eterno agradecimento pelo companheirismo, compreensão e carinho.

Dedico este trabalho!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Dra Marília Afonso Rabelo Buzalaf,

a minha eterna gratidão e respeito.

Obrigada pela paciência, carinho e palavras de coragem com que sempre me orientou.

E principalmente pela oportunidade de compartilhar de seus conhecimentos e ter o privilégio de sua convivência e amizade.

AGRADECIMENTOS

Ao *Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio*

À *Profa. Dra Rita Sarmiento Villena*

À *Profa. Dra. Ana Arana*

Sem vocês a conclusão deste trabalho teria sido inatingível, muito obrigada pela dedicação e contribuição.

À *Aline Lima Leite*, obrigada pelo apoio, dedicação e disposição, que permitiram a realização deste trabalho.

À *Borrow Milk Foundation*, pelo apoio financeiro para a execução deste projeto.

À amiga, *Flávia Mauad Levy*, pela amizade que nos une e por poder compartilhar com você tantas alegrias e aflições.

Aos amigos de turma: *Flávia, Silvia, Ariadne, Ester, Ana Elisa, Tânia, Cláudia, Renato*, por participarem desta etapa da minha vida.

Aos *amigos do laboratório de Bioquímica*

“Nenhum caminho é longo demais quando um amigo nos acompanha”

Aos funcionários *Thelma, Ovídio, Flávia* do Departamento de Ciência Biológicas, Bioquímica pela boa vontade e simpatia.

À funcionária *Vera* do Departamento de Ciências Biológicas, Fisiologia, que sempre que precisei me ajudou com muito carinho.

Às funcionárias, *Zelma e Adriana*, do departamento financeiro da Faculdade de Odontologia Bauru, que realizaram com muita dedicação o seu trabalho.

Aos voluntários participantes deste estudo, pela fundamental e efetiva colaboração.

À *Faculdade de Odontologia de Bauru*, na pessoa de seu Excelentíssimo Diretor, *Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro*.

À *Prefeitura do Campus Administrativo de Bauru*, da Universidade de São Paulo, através de seu Prefeito, *Prof. Dr. José Roberto de Magalhães Bastos*, mestre que me incentivou a estar sempre me aperfeiçoando.

À *Comissão de Pós-Graduação* da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, através de sua presidente, *Profa. Dra. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado*

À *CAPES* pelo auxílio financeiro durante o curso

À todos que direta ou indiretamente colaboraram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

RESUMO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Fontes de flúor	27
2.1.1 Flúor Sistêmico	27
2.1.1.1 Água fluoretada	27
2.1.1.2 Sal fluoretado	33
2.1.1.3 Leite fluoretado	35
2.1.1.4 Suplementos fluoretados	40
2.1.1.5 Alimentos e bebidas	41
2.1.1.6 Produtos odontológicos fluoretados	44
2.2 Biomarcadores	47
2.2.1 Biomarcadores de flúor	48
2.2.2 A urina como biomarcador de exposição ao flúor	49
2.2.3 A unha como biomarcador de exposição ao flúor	52
3 PROPOSIÇÃO	61
4 MATERIAL E MÉTODOS	65
4.1 Material	65
4.1.1 Material utilizado na leitura da concentração de F das unhas, dentifrício, alimentos sólidos e outros líquidos	65
4.1.2 Material utilizado na leitura da concentração de F na água e urina.....	65
4.2 Métodos	66
4.2.1 Voluntários	66
4.2.2 Obtenção das amostras	69
4.2.2.1 Equipe envolvida no projeto	69
4.2.2.2 Estimativa da ingestão de F a partir da dieta	71

4.2.2.3 Coleta de água	72
4.2.2.4 Coleta de sal	72
4.2.2.5 Estimativa da ingestão de F a partir do dentifrício	72
4.2.2.6 Coletas de urina	75
4.2.2.7 Coletas de unhas	76
4.3 Procedimento analítico	76
4.3.1. Unhas, dieta e dentifrício	76
4.3.2 Água e urina	80
4.4 Análise estatística	80
5 RESULTADOS	85
6 DISCUSSÃO	101
7 CONCLUSÕES	115
ANEXOS	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167
ABSTRACT	185
APÊNDICES	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Influência da acidez urinária na absorção do F nos túbulos renais	51
FIGURA 2 -	Corte sagital esquemático de unha em um dedo da mão	53
FIGURA 3 -	Localização geográfica de Bauru, São Paulo	66
FIGURA 4 -	Localização geográfica de Brejo dos Santos, Paraíba	67
FIGURA 5 -	Localização geográfica de Lima, Peru	68
FIGURA 6 -	Localização geográfica de Trujillo, Peru	68
FIGURA 7 -	Localização geográfica de Pirajuí, São Paulo	69
FIGURA 8 -	Momentos das coletas das amostras	70
FIGURA 9 -	Método da dieta duplicada	72
FIGURA 10 -	Seqüência da técnica da estimativa de ingestão de F através do dentifrício	74
FIGURA 11 -	Seqüência da técnica de análise de F após difusão facilitada por HMDS (método de Taves modificado por Whitford)	78
FIGURA 12 -	Contribuição dos diferentes componentes da dieta para a ingestão total de F através da dieta de crianças de 4-6 anos de idade, recebendo diferentes fontes de F sistêmico	88

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Concentração de íon F recomendada na água de beber em relação à temperatura média da cidade	30
TABELA 2 -	Dosagem de suplemento fluoretado recomendada por dia em mg	40
TABELA 3 -	Gênero (M-masculino, F-feminino), idade média, peso médio (Kg), altura média (cm), e número de voluntários por comunidade	85
TABELA 4 -	Médias e desvios-padrão (amplitude) das concentrações de F (mg/L) na água de abastecimento público coletada nas residências dos voluntários durante os dois dias de coletas	86
TABELA 5 -	Quantidade média ($\pm$ DP) de F (mg) nos diferentes componentes da dieta (água, sólidos e outros líquidos, e leite somente para Trujillo), de crianças recebendo diferentes fontes de F sistêmico	87
TABELA 6 -	Médias e desvios-padrão (amplitude) da concentração de F no sal (mg/Kg), nas duas comunidades do Peru	89
TABELA 7 -	Médias e desvios-padrão (amplitude) da estimativa de ingestão de F (mg) através do dentifrício de crianças de 4-6 anos de idade recebendo diferentes fontes de F sistêmico	90
TABELA 8 -	Média (variação) da concentração de F nos dentifrícios utilizados por crianças de 4-6 anos de idade recebendo diferentes fontes de F sistêmico, de acordo com as análises laboratoriais e as informações constantes nos rótulos das embalagens	91
TABELA 9 -	Média e desvio-padrão (amplitude) da estimativa da ingestão diária de F (mg/Kg peso corporal) através da dieta e do dentifrício de crianças de 4-6 anos de idade, recebendo diferentes fontes de F sistêmico	92

TABELA 10 - Excreção urinária média de F (mg) em 24 h e desvios-padrão (amplitude) de crianças de 4-6 anos de idade recebendo diferentes fontes de F sistêmico	93
TABELA 11 - Média e desvio-padrão (amplitude) da concentração de F (mg/Kg) nas unhas das mãos e dos pés de crianças de 4-6 anos de idade, recebendo diferentes fontes de F sistêmico	94
TABELA 12 - Média ($\pm$ DP) da ingestão, excreção e concentração de F nas unhas de crianças de 4-6 anos recebendo diferentes fontes de F sistêmico	97
TABELA 13 - Correlação entre a ingestão de F (mg), excreção urinária de F (mg), concentração de F nas unhas das mãos (mg/Kg) e dos pés (mg/Kg) em crianças de 4-6 anos de idade, recebendo diferentes fontes de F sistêmico	98

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C	graus centígrados
>	maior
<	menor
µg	micrograma
%	por cento
CDTA	ácido ciclo-hexano diamino tetra acético
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPOD	dentes cariados perdidos e obturados
DP	desvio padrão
F	flúor
FUEF	excreção urinária fracional de F
g	grama
h	horas
HCl	ácido clorídrico
HF	ácido fluorídrico
HMDS	hexametil-disilazano ou hexametil-disiloxano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
L	litro
M	molar (mol/L)
mg	miligrama
mL	mililitro
mm	milímetros
mV	milivoltagem
NaF	fluoreto de sódio
NaOH	hidróxido de sódio
OH ⁻	Íon hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	nível de significância
ppm	partes por milhão
r	coeficiente de correlação

TF	índice de fluorose dentária Thysstrup e Ferjerskow
TISAB	<i>Total Ionic Exchange Adjustment Buffer</i>
TSIF	índice de fluorose dentária Horowitz

RESUMO

RESUMO

Este estudo comparou a ingestão de flúor (F) através da dieta e do dentifrício bem como a excreção urinária de F de 24 horas de crianças recebendo diferentes fontes de F sistêmico: água artificialmente fluoretada (A-Bauru, SP-Brasil, 0,6-0,8 mgF/L, água naturalmente fluoretada (B-Brejo dos Santos, PB-Brasil, 0,6-0,9 mgF/L), sal fluoretado (C-Lima, Peru, 180-200 mgF/Kg) e leite fluoretado (D-Trujillo, Peru, 250 mL de leite contendo 1,0 mgF/L). Crianças de 4-6 anos (n=21-26) participaram em cada comunidade. Uma comunidade com água não fluoretada (<0,1 mgF/L) (E-Pirajuí, SP-Brasil) foi incluída como controle (n=24). A quantidade de F ingerida através da dieta foi determinada pela “dieta duplicada”, considerando seus diferentes constituintes (água, outros líquidos e sólidos). A ingestão de F através do dentifrício foi determinada pela escovação simulada. A excreção urinária de F de 24 h e a concentração de F das unhas das mãos e dos pés também foram avaliadas. O F foi analisado por eletrodo, depois de difusão facilitada por hexametildiloxano ou após tamponamento com TISAB. A análise estatística foi feita pelos teste de Kruskal-Wallis, Dunn e regressão linear ($p < 0,05$). A média ($\pm$ DP) da ingestão total de F (mg/Kg peso corporal/ dia) foi $0,065 \pm 0,030^a$, $0,084 \pm 0,029^a$, $0,088 \pm 0,044^a$, $0,088 \pm 0,052^a$ e $0,027 \pm 0,022^b$ para A, B, C, D e E, respectivamente. Considerando somente a dieta, a média foi de $0,042 \pm 0,012^b$, $0,058 \pm 0,016^{a,b}$, $0,048 \pm 0,023^{a,b}$, $0,059 \pm 0,012^a$ e $0,007 \pm 0,004^c$, respectivamente. A maior contribuição através da dieta para A/B e C/D/E foram a água e os sólidos, respectivamente. A média da quantidade F ingerida através do dentifrício variou entre 0,020 (E) e 0,040 (C) mg/Kg peso corporal/ dia e não foi significativamente diferente entre as comunidades. A média ($\pm$ DP) da excreção urinária de F (mg) de 24 horas foi $0,693 \pm 0,198^a$, $0,625 \pm 0,297^{a,b}$, $0,808 \pm 0,305^a$,

$0,666 \pm 0,194^a$ e $0,478 \pm 0,321^b$ para A, B, C, D e E, respectivamente. Houve uma correlação significativa entre a excreção urinária de F e a ingestão de F através da dieta ($r=0,355$, $p<0,0001$) e ingestão total (dieta mais dentifrício) e excreção urinária ($r=0,278$, $p=0,002$). Houve uma correlação significativa entre a excreção urinária de F e concentração de F nas unhas das mãos ($r=0,237$, $p=0,010$) e dos pés ($r=0,221$, $p=0,016$) e uma forte correlação entre as concentrações de F nas unhas das mãos e dos pés ($r=0,730$, $p<0,0001$). Os resultados indicam que a ingestão total de F de crianças deve ser determinada antes que um método de fluoretação sistêmica seja implementado.

Palavras-Chaves: Fluoretação. Água. Sal de Cozinha. Marcadores Biológicos. Urina. Unhas.

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária tem muitas causas que são relacionadas às interações ao longo do tempo entre certos micro-organismos, carboidratos da dieta (que levam à produção de ácidos no biofilme dentário) e a substância dentária. A prevalência e severidade da cárie dentária na maioria dos países industrializados tem diminuído dramaticamente nas duas últimas décadas, atingindo valores tão baixos quanto um CPOD de 1,1 em crianças de 12 anos (MARTHALER⁷⁹, 1996). Entretanto, esta doença que pode ser prevenida ainda é comum e permanece como um problema de saúde pública para uma parcela significativa da população (BURT¹³, 1998).

Uma análise detalhada da situação da cárie em muitos países mostra que os níveis de cárie dentária variam consideravelmente entre os diferentes países e mesmo dentro de um mesmo país. As crianças dos níveis sócio-econômicos mais baixos têm índices maiores de cárie que aquelas dos níveis sócio-econômicos mais altos, e estas diferenças são consistentes em países industrializados e em países urbanizados em desenvolvimento (CHEN²⁷, 1995).

A fluoretação da água de abastecimento público é tanto uma medida preventiva primária quanto uma medida de saúde pública para o controle da cárie. A maior vantagem da fluoretação da água é que esta medida alcança toda a população, incluindo os grupos com deprivações sociais, que são os que no momento têm os maiores níveis de cárie. Uma revisão sistemática (McDONAGH⁸⁵, 2000) mostrou que a fluoretação da água reduz o CPOD, em média, em 2,25 dentes por criança e na média aumenta a proporção de crianças livres de cárie em 15%. Em adição, parece haver alguma evidência que a fluoretação da água reduz as inequidades em cárie dentária entre as diferentes classes sociais de indivíduos entre 5 e 12 anos de idade.

Entretanto, há razões políticas, geográficas e técnicas, que fazem com que os benefícios da fluoretação da água fiquem indisponíveis para uma grande proporção da população mundial. Desde que a cárie dentária permanece um problema de saúde pública, métodos alternativos de terapia com F são requeridos. Conseqüentemente, outros métodos comunitários de fluoretação têm sido sugeridos, como, por exemplo, sal, açúcar e leite (KUNZEL⁶³, 1993).

A fluoretação do leite, como uma possível maneira de uso sistêmico do F para a prevenção de cárie dentária, foi inicialmente proposta por um pediatra suíço (ZIEGLER¹⁴⁰, 1953). Desde então as características do leite fluoretado no que diz respeito à inibição de cáries têm sido investigadas a fim de se usar o leite em programas comunitários de prevenção de cárie. O uso do leite como um veículo de F em programas de saúde pública bucal tem algumas atrações interessantes. O leite é um importante componente da dieta das crianças e o provimento gratuito de leite nas escolas foi incluído numa lista de nove intervenções baseadas em evidências para reduzir as inequidades em saúde (SMITH¹¹², 1997). CADOGAN²⁴ (1997) relatou um estudo clínico randomizado com meninas adolescentes, que mostrou que o aumento do consumo de leite aumentou significativamente a aquisição de mineral ósseo e modificou de modo favorável a obtenção do pico de massa óssea. Um estudo clínico randomizado prévio (BAKER⁶, 1980) mostrou um benefício para o crescimento pequeno, mas estatisticamente significativo, em crianças deprivadas seguido à provisão de leite gratuito nas escolas durante dois anos. Tem sido demonstrado em análises econômicas (ESTUPINÁN-DAY⁴⁷ et al., 2001) que o leite é um veículo para o F de boa relação custo-benefício para a prevenção de cárie dentária. Esquemas de fluoretação do leite já existem em alguns países, como Bulgária, Federação Russa, Tailândia, Peru, Chile, Reino Unido e China.

A proposta do uso do sal como um veículo para o F na prevenção de cárie dentária é atribuída a WESPI¹³⁰ (1948). Desde então, a fluoretação do sal foi introduzida em muitos países e tem sido relatado que o F ingerido através do sal previne a cárie dentária e sua efetividade cariostática parece ser igual àquela fornecida pelo F presente na água quando a concentração de F no sal é ajustada de modo que os níveis de excreção urinária de F sejam similares àqueles associados com a água otimamente fluoretada (KUNZEL⁶³, 1993).

Deste modo, a comparação entre os níveis de ingestão e excreção de F quando diferentes métodos comunitários de fluoretação são usados é de grande interesse, bem como o desenvolvimento de biomarcadores de exposição crônica ao F que poderiam prever a atividade do F retido no organismo.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

É extremamente importante ressaltar que investigações recentes e revisões de literatura têm confirmado a segurança do F com relação à saúde humana, quando usado conforme recomendado para o controle da cárie. Entretanto, sabe-se há muito que a característica clínica mais precoce da exposição à ingestão crônica excessiva de F por crianças pequenas é a fluorose dentária, que, por sinal, aumentou desde a última metade do século passado (CLARK²⁸, 1994).

Este aumento na incidência e severidade da fluorose dentária tem sido atribuído à ingestão excessiva de F na fase de desenvolvimento dos dentes, em suas mais variadas fontes: água fluoretada, alimentos e bebidas, ingestão inadvertida de dentifrício fluoretado e o inapropriado uso de suplementos dietéticos.

A fim de dinamizar a leitura e compreensão desta revisão de literatura, serão abordados dois tópicos principais, a saber:

- fontes de ingestão de F;
- biomarcadores de exposição ao F.

2.1 Fontes de ingestão de flúor

2.1.1 Flúor sistêmico

2.1.1.1 Água fluoretada

Em 1901, John Macauley Eager escreveu um relato que foi depois conhecido como a primeira documentação científica no que diz respeito à

fluorose dentária (EAGER³⁹, 1901). Ele escreveu detalhadamente sobre uma descoloração marrom nos dentes, chamada “denti di chiaie”, baseado em observações de emigrantes italianos no porto de Nápoles. A causa de tais descolorações foi atribuída provavelmente à água de beber.

Em 1911, McKay⁸⁸ (1933) descreveu a presença de dentes com o esmalte mosqueado em crianças residentes na zona urbana de Colorado Springs, nos Estados Unidos, fato que não ocorria nas que habitavam a zona rural. Mais tarde, em 1916, McKay, juntamente, com Black, observaram que as pessoas que residiam na área urbana provida pela água de abastecimento de Colorado Springs e que estavam, naquele momento, no período de formação dentária, apresentavam o manchamento, caracterizando assim uma distrofia endêmica do esmalte dentário. Porém, os indivíduos da área rural desprovida de abastecimento de água não apresentavam os sinais do mosqueamento, sugerindo existir uma relação direta entre a defeito estrutural no esmalte e a presença de alguma substância na água. Também naquele momento, os autores verificaram que as crianças moradoras em áreas que apresentavam o esmalte mosqueado tinham uma prevalência menor de cárie dentária quando comparadas com aquelas residentes em locais desprovidos pelo abastecimento e que não tinham os mesmos sinais de mosqueamento do esmalte.

Em 1942, Dean realizou um relevante estudo conhecido como o “Estudo das 21 cidades”, que procurou responder qual concentração de F na água provocava o mosqueamento dentário, ao mesmo tempo em que buscou descobrir concentrações capazes de uma ação preventiva e eficaz na redução da cárie dentária. Os resultados deste estudo mostraram uma redução de 50% na experiência de cárie dentária em concentrações de 0,6 ppm quando comparada com a concentração de 0,2 ppm, e uma redução de mais de 60% em concentrações de 1,2 ppm, salientando a possibilidade de controle da cárie por meio da fluoretação controlada e de níveis adequados da água de abastecimento. Neste estudo foi determinado que o F presente na água em concentrações em torno de 1 ppm promovia a máxima redução no índice CPOD sem, no entanto, provocar o aparecimento de manchas antiestéticas e que, quando o nível de F na água excedia a 1,5 ppm, não ocorria queda

significativa no índice CPOD, porém havia um aumento na ocorrência e na severidade da fluorose (DEAN³⁷, 1950).

No entanto, os primeiros estudos controlados da fluoretação artificial datam de 1945. O “momento da verdade na história da fluoretação das águas”, conforme descrito por Frank McClure (McCLURE⁸⁴ 1970), teve início em 25 de janeiro de 1945, quando Grand Rapids, Michigan, Estados Unidos da América, tornou-se a primeira cidade do mundo a ajustar sua concentração de F na água visando à promoção da saúde dentária. Logo depois, a fluoretação foi implantada em outras cidades dos EUA e mais tarde em outros países.

No Brasil, a primeira cidade a fluoretar artificialmente suas água foi Baixo Guandu, no Espírito Santo, em 1953 (VIEGAS¹²⁴, 1987). No entanto, apenas em 24 de maio de 1974 a lei federal nº 6050 dispôs a respeito da fluoretação da água em sistemas públicos de abastecimento¹⁰, sendo devidamente regulamentada pelo Decreto Federal nº 76.872, de 22 de dezembro de 1975. A Portaria do Ministério da Saúde nº 635, de 26 de dezembro de 1975, aprovou e determinou normas e padrões a serem seguidos para a correta fluoretação das águas dos sistemas de abastecimento, desde a concentração de íon F a ser utilizada de acordo com a média das temperaturas máximas anuais de cada região (TABELA 1), até os compostos fluoretados recomendados. Ainda constituem a legislação pertinente, as portarias do Ministério da Saúde nº 3.313, de janeiro de 1998, e nº 1.469, de dezembro de 2000, que estabelecem os procedimentos e as responsabilidades relativas ao controle e à vigilância da qualidade da água para o consumo humano.

VIEGAS¹²⁴, em 1987, ressalta que a fluoretação das águas de abastecimento público é um método adequado, eficiente, seguro e prático, sendo uma medida ideal de saúde pública para a prevenção da cárie dentária em países onde existam serviços de abastecimento de água.

Tabela 1 - Concentração de íon F recomendada na água de beber em relação à temperatura média da cidade

Médias das temperaturas máximas diárias (°C)	Limites recomendados para a concentração de íon F em mg/L		
	Mínimo	Máximo	Ótimo
10-12,1	0,9	1,7	1,2
12,2-14,6	0,8	1,5	1,1
14,7-17,7	0,8	1,3	1,0
17,8-21,4	0,7	1,2	0,9
21,5-26,3	0,7	1,0	0,8
26,8-32,5	0,6	0,8	0,7

Muitos trabalhos têm sido realizados relacionando a água fluoretada com a ocorrência da fluorose dentária. Em 1995, CARMO et al.²⁶ realizaram um estudo que relacionou a prevalência de fluorose dentária em áreas com diferentes concentrações de F na água de consumo. Escolares (n=610) na idade de 10-14 anos, residentes em três cidades brasileiras, Piracicaba (0,7 ppm F), Iracemápolis (0,2 ppm F) e Pereiras (6,4 ppm F), foram avaliados para a fluorose dentária pelos índices de Dean e TF. Foram encontradas prevalências de 2,0%, 20,4% e 58,8%, utilizando-se o índice TF, e de 4,5%, 20,8% e 58,8%, com o índice de Dean, nas cidades de Iracemápolis, Piracicaba e Pereiras, respectivamente.

Por outro lado, MALTZ e FARIAS⁷² (1998) também avaliaram a prevalência de fluorose dentária em escolares de cidades brasileiras com e sem água de consumo artificialmente fluoretada, no ano de 1987, isto é, anteriormente ao uso disseminado de dentifrício fluoretado. Nas cidades sem água de abastecimento fluoretada, a prevalência de fluorose dentária foi praticamente inexistente. Nas duas cidades com água de consumo fluoretada, a prevalência e severidade da fluorose foram bastante baixas, sugerindo que somente o consumo de água artificialmente fluoretada, nas concentrações utilizadas (0,45-0,96 ppm F e 0,318-0,721 ppm F), não causa alta prevalência de fluorose dentária.

Numa revisão sistemática acerca da fluoretação da água, McDONAGH et al.⁸⁵ (2000), após análise de 214 estudos, observaram que a fluoretação da água estava associada com um aumento na proporção de crianças livres de cáries e uma redução no número de dentes afetados por cárie. Os autores encontraram ainda um aumento dose-dependente na fluorose dentária, sendo que com um nível de F de 1 ppm, estimou-se que 12,5% das pessoas expostas teriam fluorose dentária considerada preocupante do ponto de vista estético. Não foram encontradas evidências claras de outros possíveis efeitos colaterais. Os autores reforçaram a idéia de que qualquer decisão acerca da fluoretação das águas deve considerar não apenas a relação risco (fluorose dentária) – benefício (redução da cárie dentária), mas também aspectos éticos, ambientais, ecológicos, financeiros e legais.

Em Toronto, Canadá, no outono de 1999 a concentração de F na água de abastecimento foi reduzida em 2 estágios (de 1,2 ppm para 1,0 ppm e então para 0,8 ppm). Num levantamento realizado durante o ano escolar de 1999-2000, encontrou-se uma prevalência de fluorose moderada ($TSIF \geq 2$) em 14% das crianças de 7 anos de idade e de 12,3% em crianças de 13 anos. Os autores acreditam que esta prevalência deva cair conforme a redução na concentração de F na água de abastecimento começar a fazer efeito (LEAKE et al.⁶⁵, 2002).

Com os objetivos de avaliarem a concentração de F na água de abastecimento público e a prevalência de fluorose dentária RAMIRES et al.¹⁰⁴ (2006), realizaram um estudo com 52 escolares de 7 a 15 anos de idade, residentes em um bairro da periferia de Bauru. A concentração de F na água variou entre 0,62 e 1,15 mg/L, mantendo a média de 0,9 mg/L. A prevalência de fluorose dentária foi avaliada através do índice TF, e foi encontrada uma prevalência de 33%. Os graus de severidade variaram de TF1 a TF4: 11% TF1, 8% TF2, 12% TF3 e 2 % TF4. Para os autores as amostras de água indicaram uma concentração média de F acima do recomendado para Bauru e o índice de fluorose dentária foi maior que o esperado para um bairro de periferia, onde a água é a única das poucas fontes de ingestão de F.

Um aspecto importante quando se fala em fluoretação da água de abastecimento público diz respeito ao controle de qualidade da fluoretação.

Em Bauru-SP, BUZALAF et al.²⁰ (2002) monitoraram a qualidade da fluoretação da água de abastecimento público em diversos pontos de distribuição, no ano de 1999. O conteúdo de F variou de 0,01 a 9,35 ppm, havendo uma grande variação nas concentrações encontradas entre as diferentes áreas de abastecimento de água da cidade, bem como entre os diferentes dias de coleta de amostras. Diante dos resultados, foi implantado o heterocontrole da fluoretação da água na cidade. Através do heterocontrole, todos os meses e em dias aleatórios, estabelecidos por sorteio, são coletadas amostras de 60 pontos de abastecimento de água, distribuídos em toda a cidade. Os resultados obtidos após um ano do início do heterocontrole apontam para uma melhoria significativa na qualidade da fluoretação com cerca de 85% das amostras analisadas classificadas como aceitáveis (0,55 a 0,84 mgF/l), indicando ser o heterocontrole uma medida eficaz para este fim (RAMIRES et al.¹⁰⁵, 2006).

Em anos recentes, tem havido um aumento no consumo de água mineral no Brasil, bem como em outros países. O conteúdo de F presente em 104 marcas de água mineral comercialmente disponíveis no Brasil foi analisado por VILLENA; BORGES; CURY¹²⁶ (1996). Os valores encontrados variaram de 0 a 4,4 ppm, mas a grande maioria teve conteúdo de F abaixo de 0,1 ppm.

Em 2001, BASTOS et al.⁷ avaliaram a concentração de F existente nas fontes naturais e nas águas minerais das cidades de Águas de Lindóia, Lindóia e Serra Negra, região chamada de "Circuito das Águas". Todas as amostras apresentavam concentrações de F abaixo dos limites considerados preventivos de cárie, variando de 0 a 0,46 ppm. Os autores ressaltaram a necessidade de divulgação destes dados para que a população e os profissionais de saúde sejam alertados para tal fato, uma vez que tem ocorrido o aumento do consumo dessas águas minerais, que são vendidas em todo o território nacional. Além disso, a população da região, consome a água proveniente das fontes naturais, não sendo beneficiada pelo F presente na água de abastecimento público.

RAMIRES et al.¹⁰³ (2004), verificaram a porcentagem da população da cidade de Bauru que consumia água mineral, as marcas consumidas e sua concentração de F especificada no rótulo e a verificada na análise. De 1000 residências visitadas, em 312 (31,2%) consumia-se água mineral e em 688

(68,8%) não. Sendo assim, cerca de 29,72% da população da cidade consome água mineral e 70,28% não. Em algumas marcas de água mineral, a concentração de F especificada nos rótulos não foi a mesma encontrada nas análises de F. Segundo os autores os resultados deste estudo reforçam a importância e a necessidade de um controle bastante rigoroso, por parte da Vigilância Sanitária, na concentração de F nestas águas.

A água fluoretada provavelmente tem um impacto maior na prevalência da fluorose indiretamente, por ser usada na industrialização de leites em pó e outros alimentos e bebidas infantis (BURT¹², 1992), além de ser utilizada para reconstituir fórmulas infantis. BUZALAF et al.¹⁵ (2001) realizaram um estudo que avaliou o conteúdo de F em 10 amostras de fórmulas infantis disponíveis no mercado. As amostras foram preparadas com água deionizada, água mineral (0,02 a 0,69 ppm) e água fluoretada (0,9 ppm). Quando as fórmulas foram reconstituídas com água deionizada, somente a amostra da fórmula à base de soja apresentou uma concentração de F mais elevada (0,75 ppm). Segundo os autores este achado é coerente com a literatura em relação a produtos à base de soja. Ao utilizarem a água mineral como diluente da fórmula, apenas uma marca comercial de água mineral (Ibirá) apresentou alto teor de F. Mas, a água de abastecimento, o diluente mais utilizado no Brasil, especialmente pela população mais carente, tornou-se uma questão preocupante. Todas as marcas de fórmulas infantis, quando reconstituídas com água fluoretada, excederam a ingestão diária ótima de F recomendada e quase todas poderiam fornecer uma ingestão diária de F acima dos limites sugeridos para a fluorose em crianças jovens.

2.1.1.2 Sal Fluoretado

O sal foi inicialmente utilizado como veículo para suplementação de F na Suíça, onde está disponível para a venda desde 1955. Além da Suíça, o sal fluoretado tem sido disponibilizado em vários países, incluindo a França, Alemanha, Costa Rica, Jamaica, Colômbia e Hungria.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde¹³⁸, a maneira mais eficaz de empregar os fluoretos para a prevenção da cárie dentária é a fluoretação das águas de abastecimento público. O sal é apresentado como

veículo alternativo para localidades e grupos populacionais que não são beneficiados por estação de tratamento de água (PINTO¹⁰², 1982).

A fluoretação do sal como qualquer outro método de fluoretação apresenta suas vantagens e desvantagens. Como fatores positivos da fluoretação do sal podemos citar a disponibilidade do F, que é liberado em pequenas quantidades quando o alimento é consumido durante o dia. Além disto, seu uso requer pequena ou nenhuma modificação da rotina familiar. Outro fator positivo é que diferentemente do que acontece com a água, o consumidor tem a escolha de comprar ou não sal fluoretado. Por outro lado, o consumo de sal é bastante variável entre as famílias, e assim a adição do F poderia aumentar o risco de fluorose dentária para aqueles que consomem grandes quantidades. Além disso, o incentivo do consumo de sal para a prevenção da cárie dentária é contrário a outros conceitos de saúde, que sugerem que seu consumo deveria ser reduzido para minimizar cardiopatias (BERGMANN e BERGMANN⁸, 1995)

TOTH¹²⁰ (1976) avaliou a eficácia da fluoretação do sal na Hungria para a prevenção da cárie dentária. Foi reportada uma redução de 46% da cárie dentária com o uso de sal contendo 250 mg F/ Kg. Mais tarde, quando os níveis de F no sal foram aumentados para 350 mg/ Kg, a redução da cárie dentária foi em torno de 60%. As concentrações de F no sal variam de 90 a 350 mg/ Kg (MARTHALER⁷⁸, 1983). No entanto estudos sugerem uma concentração ótima em torno de 250 mg/ Kg (O'MULLANE⁹¹, 1994).

Vários estudos têm demonstrado o uso do sal como veículo de F para a prevenção da cárie dentária e também sua relação com a fluorose dentária. ESTUPINAN DAY et al.⁴⁷ (2001) avaliaram 1120 crianças para a cárie dentária na Jamaica, que iniciou um programa de fluoretação do sal em 1987. No baseline (1984) 27%, 2,8% e 0,3 das crianças de 6, 12 e 15 anos de idade, respectivamente, eram livres de cárie. Em 1995, quando todos os grupos etários foram avaliados, 90% das crianças apresentaram dentes permanentes saudáveis. Os autores concluíram que houve um declínio significativo da cárie dentária quando comparados os dados do baseline e oito anos após o início do programa de fluoretação.

VALLEJOS -SANCHES et al.¹²³ 2006, determinaram a prevalência e a severidade da fluorose dentária, bem como os fatores associados com a sua

ocorrência em 1373 crianças de 6-12 anos de idade em Campache, México, quando da implementação de um programa de fluoretação do sal em 1991. A prevalência de fluorose dentária foi de 51,9%, sendo, 84,7% para fluorose muito leve, 13,1% leve, 1,7% moderada e 0,6% severa. Também foi avaliada a relação entre a fluorose dentária e variáveis independentes, como: fontes adicionais de F, idade que iniciou a escovação dos dentes com dentífrico fluoretado e nível de escolaridade das mães. Observou-se que crianças nascidas durante o período em que se iniciou a fluoretação do sal foram mais propícias a ter fluorose dentária do que as nascidas antes da fluoretação. A frequência de escovação foi associada com a fluorose dentária. Os autores concluíram que há uma íntima relação entre o uso de dentífrico fluoretado e fluorose dentária e que a implementação do programa de fluoretação do sal aumentou o risco de fluorose dentária.

O Programa Nacional de fluoretação do sal no Peru, foi avaliado quanto à distribuição e a concentração de F por VILLENA, IANO e BUZALAF¹²⁷ (2006). A concentração média ($\pm$ DP) de F no sal da companhia Quimpac, autorizada pelo Ministério da Saúde para a distribuição em nível nacional foi de $181,2 \pm 29,9$ mg/Kg (variação 111,7 – 286,8) e $8,22 \pm 22,29$ mg/Kg (variação 0,69 – 103,37) para o sal fluoretado e não fluoretado, respectivamente. Em relação à distribuição, os produtos não fluoretados geralmente foram encontrados em regiões de renda baixa. Os autores concluíram que é necessário ter um controle periódico da concentração de F e da distribuição de sal fluoretado no Peru, para garantir os benefícios do seu efeito preventivo.

2.1.1.3 Leite fluoretado

Os benefícios do F no declínio da cárie dentária já estão bem estabelecidos, e a água e o sal têm sido considerados veículos eficazes para este fim. No entanto, há muitas comunidades onde, por motivos técnicos, políticos ou razões econômicas, estas medidas preventivas não são viáveis. O uso do leite como veículo alternativo de administração de F para a prevenção da cárie dentária em humanos foi proposto desde 1950. ZIEGLER¹⁴⁰ (1953) encontrou uma significativa redução na cárie dentária, tanto na dentição decídua como na permanente.

MARIÑO, VILLA e GUERREIRO⁷⁴ (2001) avaliaram a eficácia de um programa de prevenção da cárie dentária na dentição decídua de crianças de uma comunidade rural no Chile, que utilizavam leite em pó e seus derivados fluoretados. A dose diária de F através de leite em pó e leite com cereais foi de 0,25, 0,5 e 0,75 mg para crianças de 0-2, 2-3 e 3-6 anos de idade, respectivamente. Os resultados obtidos depois de 4 anos de fluoretação do leite indicaram que houve uma redução na prevalência e severidade da cárie dentária, especialmente nas crianças nascidas depois do início do programa ou que tinham por volta de 1 ano de idade quando o programa se iniciou. A redução no grupo de 3-6 anos de idade foi de 72%. A proporção de crianças livres de cárie depois de 4 anos da implementação do programa passou de 22% para 48,4%.

Estudos confirmam que a interrupção de um método sistêmico de fluoretação leva à perda dos benefícios adquiridos com sua implementação e isso não difere para o leite. Em Codega (Chile) foi estabelecido um programa de fluoretação do leite entre os anos de 1994 e 1999. Após três anos de interrupção, MARIÑO et al.⁷⁷ (2004) avaliaram a experiência de cárie de crianças de 3-6 anos de idade comparando a cidade de Codega (comunidade teste) com La Punta (comunidade controle). Houve um aumento significativo na experiência de cárie dentária em todos os grupos de idade da comunidade teste. Em adição, não houve diferença entre as duas comunidades quando comparadas após três anos de interrupção do programa. Os autores ressaltaram que a interrupção do programa de fluoretação do leite resulta na perda dos benefícios à saúde bucal das crianças. Após três anos, a experiência de cárie dentária foi mais alta do que a alcançada no fim do programa e equivalente à comunidade controle sem exposição ao F. Estes resultados enfatizam a necessidade de se estabelecer e manter um método alternativo de fluoretação para promover a eficácia da prevenção da cárie dentária em comunidades onde a fluoretação da água de abastecimento não é possível.

Em um outro estudo, MARIÑO et al.⁷⁶ (2003) avaliaram a prevalência e severidade da fluorose dentária de crianças de 6-9 anos de idades das mesmas cidades citadas anteriormente. Foram comparados dados obtidos na implementação do programa de fluoretação do leite (1994) com dados de três anos após interrupção do programa (2002). Foi observado que 16,4% das

crianças de Codega (comunidade teste) tinham fluorose questionável após a interrupção do programa, enquanto que em 1994, 10,3% foram classificadas nesta categoria. Cerca de 7,9% e 1,3% das crianças em 2002 e 1994, respectivamente, apresentaram fluorose leve. Estes aumentos não foram observados em La Punta (comunidade controle). Para os autores, se a ingestão diária de F for ajustada para doses mais apropriadas no período de mineralização dos incisivos, poderia minimizar o aumento na prevalência de fluorose dentária sem perder o efeito do F para a prevenção da cárie dentária.

MARIÑO, VILLA E WEITZ⁷⁵ (2006) apontaram as vantagens e limitações do uso do leite como veículo de F para a prevenção da cárie dentária:

Vantagens:

- (1) método alternativo de administração de F em áreas onde não é possível a fluoretação da água;
- (2) isto é particularmente importante para áreas rurais;
- (3) quando há um programa de distribuição de leite em escolas, nenhum custo adicional é necessário para o programa de fluoretação do leite;
- (4) não requer variações na composição da comida;
- (5) livre escolha na ingestão de F.

Limitações:

- (1) um sistema de distribuição de leite adequado é necessário;
- (2) quando um sistema de distribuição de leite já existente é utilizado, o leite fluoretado ficará limitado à parcela da população envolvida na distribuição do leite. Em adição, o intervalo de tempo no qual o leite é consumido também ficará limitado, já que a frequência de consumo do leite fluoretado será determinada pelas características do programa de distribuição de leite já existente.

A primeira comunidade a desenvolver um projeto de fluoretação do leite foi estabelecida em 1988, na Bulgária. Devido à experiência positiva neste

país, projetos similares foram desenvolvidos na Rússia, China, Chile, Reino Unido, Peru e Tailândia.

Bulgária

O primeiro programa de fluoretação do leite foi estabelecido na Bulgária em 1988, nas cidades de Polvdiv e Asenovgrad. A experiência positiva nesta duas comunidade, fez com que em 1996, o programa de fluoretação do leite fosse expandido para a cidade de Varna e mais recentemente para mais quatro comunidades, Shoumen, Veliko Turnovo, Stara Zagora e Bourgas. Hoje a fluoretação do leite na Bulgária inclui seis centros regionais e conta com a participação de 31.000 crianças. O programa é estabelecido em escolas de jardim da infância, e fornece 100 a 200 mL de leite ou iogurte fluoretados (2,5 ppm F – 5 ppm F) para crianças de 3 a 7 anos de idade aproximadamente 180 a 200 dias por ano.¹¹⁹

Rússia

Desde 1994 três programas de fluoretação do leite têm sido executados na Rússia nas cidade de Voronezh, Maikop e Smolensk. Estes programas são desenvolvidos em escolas, com a participação de 50.000 crianças de 3-6 ou 7 anos de idade que recebem 200 mL de leite fresco pasteurizado contendo 0,5 mg de F.¹¹⁹

China

Entre 1994 e 1999, um projeto piloto foi conduzido no distrito de Haidian em Beijing. Foi um projeto desenvolvido com crianças de jardim da infância de 3-6 anos de idade que receberam leite fluoretado. Os resultados positivos geraram um interesse para o uso do leite fluoretado na China. A Universidade fornece um curso que treina os cirurgiões-dentistas de acordo com os princípios de saúde pública e espera-se que este projeto forneça uma rede de dentistas de várias regiões com habilidades necessárias para ajudar no estabelecimento do projeto de fluoretação da leite na China.¹¹⁹

Chile

A fluoretação do leite foi introduzida primeiramente no Chile em 1994, quando um projeto piloto foi executado na comunidade rural de Codegua. O leite e seus produtos foram distribuídos através do Programa Nacional de Alimentação Complementar (PANC) para crianças de 0 a 6 anos de idade. O

sucesso deste projeto levou ao desenvolvimento de um esquema de escala maior, com crianças de 6-12 anos, com cerca de 180.000 crianças participantes do programa.¹¹⁹

Reino Unido

O leite foi inicialmente usado como veículo de F no Reino Unido em 1993 em St Helens, uma pequena cidade industrial localizada a 20 Km de Liverpool, uma região desfavorecida socialmente e com alta experiência de cárie dentária. Devido ao sucesso deste projeto, o programa tem sido expandido para comunidades do norte da Inglaterra, onde a fluoretação da água de abastecimento público não é possível. Em 1995, mais três programas foram estabelecidos em Wirral, Knowsley, Winsford, totalizando 14.500 crianças nestas quatro comunidades. Atualmente o programa de fluoretação no Reino Unido envolve 42.000 crianças de 3 – 11 anos de idade que recebem diariamente na escola leite contendo 0,5 mg de F, um fator primordial para o sucesso do programa foi o uso de sistemas estabelecidos de distribuição de leite nas escolas.¹¹⁹

Peru

Em 1999, a fluoretação do leite foi introduzida no Peru, na cidade de Trujillo. Um aspecto interessante do programa é o sistema de distribuição que é usado, o programa copo de leite, uma iniciativa nacional de nutrição que distribui leite através de uma rede bem organizada, o clube das mães. O leite é entregue todos os dias nestes locais e os beneficiados incluem crianças de 0-13 anos de idade, gestantes, lactantes e idosos. Em Trujillo, o leite com adição de F é fornecido para cerca de 4500 crianças.¹¹⁹

Tailândia

Na Tailândia, o primeiro projeto de fluoretação do leite foi iniciado em Bangkok em 2000 sob a direção do Departamento de Saúde. Atualmente o programa tem sido expandido em escolas de Bangkok, para crianças de 4 a 12 anos de idade e para as províncias de Khon Kaen e Chumphon envolvendo crianças de 6 a 10 anos de idade. No total são 80.000 participantes que recebem leite fresco pasteurizado e leite UHT fluoretados (200 mL, contendo 0,5 mg F).¹¹⁹

2.1.1.4 Suplementos fluoretados

Em um Workshop no Canadá em 1994 (Canadian Workshop Meeting) foi decidido que a suplementação de F não deveria ser recomendada para crianças mais jovens do que 3 anos de idade e que a dosagem para crianças de 3 a 5 anos deveria ser reduzida de 0,5 mg/dia para 0,25 mg/dia, uma vez que o uso do suplemento fluoretado é identificado como sendo o principal fator de risco para a fluorose dentária.

Os suplementos fluoretados são recomendados para crianças que moram em áreas com deficiência na fluoretação das águas. A dose diária recomendada é baseada na idade da criança e na concentração de F na água de beber (TABELA 2) (SPUZNAR; BURT¹¹⁵, 1988; PENDRYZ; MORSE⁹⁵, 1990; PENDRYZ; MORSE⁹⁶, 1995).

Tabela 2 - Dosagem de suplemento fluoretado recomendada por dia em mg

Idade	Concentração de F na água beber		
	< 0,3	0,3 – 0,6	>0,6
Nascimento até 6 meses	zero	zero	zero
6 meses a 3 anos	0,25	zero	zero
De 3 a 5 anos	0,50	0,25	zero
De 6 a 16 anos	1	0,50	zero

LALUMANDIER⁶⁴, em 1992, associou a ocorrência de fluorose dentária em indivíduos residentes em áreas com fluoretação deficiente com a freqüente suplementação e a idade em que as crianças iniciaram a escovação dos dentes, enquanto que para os indivíduos que bebiam água fluoretada a fluorose foi associada somente com a idade quando se iniciou a escovação dos dentes com dentifrício fluoretado. O autor sugeriu que suplementos fluoretados e escovação dos dentes em idade precoce aumentaram o risco para a fluorose dentária.

GUHA-CHOWDHURY; DRUMMOND; SMILLIE⁵¹ (1996) realizaram um estudo para testar a hipótese de que a quantidade total de F recebida através da dieta, dentifrício e suplementos fluoretados por crianças residentes em

áreas com baixos teores de F na água, era similar àquela recebida através da dieta e do dentifrício por crianças residentes em áreas fluoretadas. Os autores verificaram que, se algumas crianças da área de baixo teor de F recebessem 0,50 ou até mesmo 0,25 mg F/dia, receberiam uma quantidade total de F superior às recebidas pelas crianças das áreas fluoretadas. Desta maneira, este estudo suporta a redução das doses de F dos suplementos para diminuir o risco de fluorose nos dentes anteriores permanentes e primeiros molares.

O risco de fluorose dentária em áreas fluoretadas quando há a utilização de suplemento fluoretado é quase 4 vezes mais alto do que em áreas não fluoretadas (RIORDAN, BANKS¹⁰⁷, 1991; MASCARENHAS⁸², 2000).

2.1.1.5 Alimentos e bebidas

A maioria dos alimentos tem concentração de F menor que 0,5 ppm (TAVES¹¹⁸, 1983), com exceção dos produtos à base de frutos do mar e frango, que podem conter altos níveis de F, sendo que a inclusão de ossos, pele e conchas nestes produtos durante o processo de industrialização contribui muito para estes valores elevados. Os produtos à base de frango podem conter de 0,6 a 10,5 ppm de F (LEVY; KIRITSY; WARREN⁶⁷, 1995; HEILMAN et al.⁵³, 1997). Entretanto, TRAUTNER; SIEBERT¹²¹ (1986) observaram uma reduzida biodisponibilidade do F para a maioria dos produtos à base de carnes e peixes, provavelmente devido ao alto conteúdo de cálcio destes alimentos.

As bebidas incluem refrigerantes, sucos de frutas e chás, entre outras. As concentrações de F nas bebidas refletem aquelas encontradas na água usada para o seu preparo (HEILMAN et al.⁵⁴, 1999). Em geral, variam de 0,1 a 1,4 ppm, exceto para os chás, que podem conter até 7 ppm de F (CURY³⁴, 1981; CLOVIS; HARGREAVES³⁰, 1988; PANG; PHILIPPS; BAWDEN⁹³, 1992).

HEINTZE; BASTOS⁵⁵ (1996) avaliaram a concentração de F de diversas bebidas encontradas no mercado brasileiro como: refrigerantes de vários sabores, sucos, leite, chás. Os resultados indicaram que todas as bebidas, com exceção do chá preto (1,60 ppm) e uma água mineral com gás (2,6 ppm), apresentaram concentrações de F abaixo de 1 ppm, a maioria abaixo de 0,4 ppm.

O conteúdo de F de várias marcas comerciais de chás e sucos encontradas no mercado brasileiro foi avaliado por BUZALAF et al.¹⁹ (2002), que também relacionou com o risco de fluorose dentária. Foram avaliados os seguintes produtos: chá preto para infusão (n=12), chá industrializado pronto para o consumo (n=15), suco em pó (n=10), suco em pó contendo chá (n=3) e suco pronto para o consumo (n=4). Todas as amostras de chá preto para infusão e sucos em pó contendo chá, e duas amostras de chás industrializados pronto para o consumo apresentaram concentração de F mais alta do que 0,7 µg/mL. De qualquer modo, se as amostras dos outros produtos fossem reconstituídas com água fluoretada poderiam ser importantes contribuintes para a ingestão total diária de F. Assim, os autores concluíram que o consumo de alguns produtos analisados por crianças na idade de risco para a fluorose dentária deveria ser evitado e que a concentração de F destes produtos deveria ser informada em seus rótulos.

BUZALAF et al.²¹ (2003) analisaram a concentração de F em diversas marcas de chocolates e bolachas de chocolate encontradas no mercado nacional, visto que o chocolate e as bolachas de chocolate são bastante apreciados pelas crianças e que alguns dos alimentos analisados podem ser importantes contribuintes para a ingestão diária total de F. Neste caso foi observada em uma marca de bolacha (Danyt's) uma maior concentração de F, considerando que apenas 3 unidades poderiam fornecer 40% da ingestão diária máxima de F recomendada (0,07 mg/Kg peso corporal) para uma criança de 2 anos de idade (12 Kg), quando consumidas uma única vez por dia.

Em um estudo realizado por BUZALAF et al.¹⁶ (2002) com o objetivo de avaliar o conteúdo de F em produtos comumente utilizados por bebês e crianças jovens, foi encontrada na maioria dos produtos baixa concentração de F, exceto em dois cereais (Mucilon e Neston) que tiveram concentração média de F de 2,430 µg/g e 6,160 µg/g, respectivamente, e um achocolatado (Toddynho) que teve uma concentração média de F de 1,180 µg/g. Surpreendentemente, os produtos que tiveram concentrações de F mais altas (Mucilon e Neston) foram fabricados em áreas não fluoretadas. Isto significa que a fonte de F destes produtos não é a água. Com base nos resultados, os autores concluíram que alguns alimentos e bebidas infantis podem ser

importantes contribuintes para a ingestão diária total de F e que apenas uma porção de Neston (30g em 200 mL de leite) ou um frasco do Toddynho (200 mL) correspondem, isoladamente, a 30% da dose diária máxima de F para crianças de 2 anos. Os autores também ressaltaram que os rótulos dos produtos deveriam fornecer informações sobre seus conteúdos de F.

BUZALAF et al²³. (2006) avaliaram a quantidade de F fornecida para crianças pré-escolares de 44 Escolas Municipais de Ensino Infantil (EMEI's) da cidade de Bauru através da merenda. A quantidade de F na água utilizada no preparo da merenda também foi avaliada, além do seu impacto na quantidade de F encontrada nas amostras de merenda. Foram coletadas amostras de merenda e de água, durante duas semanas consecutivas. A concentração média de F encontrada nas amostras de água foi de 0,50 µg/mL, variando de não detectável a 1,42 µg/mL, enquanto que a quantidade média de F fornecida pela merenda foi 0,067 mg, variando de 0,007 a 0,580 mg. Uma correlação fraca, mas significativa foi observada entre a quantidade de F na merenda e a concentração de F na água de abastecimento público. Os autores concluíram que apesar de parecer pequena a contribuição da merenda para a ingestão diária total de F, ela poderia contribuir para a ingestão total de F, quando associada com outros produtos contendo F.

As concentrações de F de leites integrais, desnatados e achocolatados disponíveis no comércio do Brasil foram avaliadas por BUZALAF et al²². (2006) e a sua contribuição para ingestão de F foi estimada. Foram avaliadas 23 marcas de leites e a ingestão provável de F por Kg de peso corporal foi estimada, baseando-se em volumes sugeridos de consumo de fórmulas infantis, para crianças de 1 e 12 meses de idade. As concentrações de F variaram de 0,02 a 1,6 µg/mL para todas as marcas analisadas. Os leites integrais e desnatados apresentaram as menores concentrações de F, variando de 0,02 a 0,07 µg/mL. Três marcas de achocolatados apresentaram concentrações de F acima de 0,5 µg/mL. Em vista das altas concentrações de F encontradas em algumas marcas de leites achocolatados, os autores concluíram que muitos produtos podem contribuir significativamente para a ingestão total de F, reforçando a necessidade de se avaliar o conteúdo de F em alimentos e bebidas consumidos por crianças pequenas.

ALMEIDA, CARDOSO e BUZALAF² (2007) avaliaram a ingestão de F de 33 crianças de 2-3 anos de idade. Foram realizadas estimativas de ingestão de F a partir da dieta e da escovação. A média ($\pm$ DP) da ingestão de F a partir da dieta e escovação foi $0,025 \pm 0,013$ e $0,106 \pm 0,085$ mg/ Kg peso corporal/ dia, respectivamente. A fim de verificarem a contribuição na ingestão total de F dos diferentes componentes da dieta, os alimentos foram divididos em 3 grupos: sólidos, água e leite, e os outros líquidos. Dentre os grupos de alimentos, a água e o leite tiveram uma contribuição maior para ingestão total de F ($0,18 \pm 0,11$ mgF/dia) em relação aos alimentos sólidos ($0,07 \pm 0,05$ mgF/dia) e aos outros líquidos ($0,07 \pm 0,04$ mgF/dia).

2.1.3 Produtos odontológicos fluoretados

Os produtos odontológicos fluoretados têm concentrações de F variando entre 230 ppm nas soluções para bochecho até 23000 ppm nos vernizes fluoretados. Os dentifrícios, que são os produtos odontológicos mais freqüentemente usados, contêm uma concentração de F variando geralmente de 500 e 1500 ppm, tanto na forma de fluoreto de sódio quanto na forma de monofluorofosfato de sódio (WHITFORD¹³², 1994).

Em 1954, MUHLER et al.⁹⁰ publicaram o primeiro relato da capacidade de um dentifrício fluoretado em reduzir a incidência de cárie dentária em crianças. Seguindo-se à confirmação destes resultados, em 1964 foi aceito o primeiro dentifrício fluoretado pelo Conselho de Terapêutica Dentária da American Dental Association. A partir de então houve a disseminação do uso de dentifrícios fluoretados, sendo que em 1980, todos os dentifrícios vendidos nos EUA continham F.

No Brasil, a portaria nº 22¹¹, de 20 de dezembro de 1989 estabeleceu normas que regulamentam a incorporação de F nos dentifrícios (sem obrigatoriedade), estabelecendo uma concentração mínima de 1000 e máxima de 1500 ppm de F solúvel no momento da fabricação, um mínimo de 600 ppm de F solúvel após um ano desta data e um mínimo de 450 ppm de F pelo restante do prazo de validade.

A efetividade dos dentifrícios fluoretados na redução da incidência de cárie dentária tem sido extensivamente documentada em uma infinidade de

pesquisas clínicas publicadas e em muitas outras não publicadas, as quais foram revisadas em várias ocasiões na década de 80 (MELLBERG; RIPA⁸⁹, 1983; BIESWANGER; STOOKEY⁹, 1989). É claro que fica difícil documentar isto precisamente devido ao uso disseminado da água fluoretada e de outras fontes de consumo do F. No entanto, não pode ser considerada uma simples coincidência o fato de o primeiro relato de declínio de cárie dentária numa comunidade não fluoretada dos EUA (ZACHERL; LONG¹³⁹, 1979) ter ocorrido alguns anos após cerca de 90% das crianças escolares terem começado a usar dentifrícios fluoretados. Uma evidência ainda mais forte da importância dos dentifrícios fluoretados como medida de saúde pública foi trazida por estudos realizados na Inglaterra, onde menos que 10% da população ingere água fluoretada. Nesses estudos o declínio na prevalência de cáries coincidiu com o aumento do uso de dentifrícios fluoretados (ANDLAW; BURCHELL; TUCKER³, 1982; ALLEN; ASHLEY; NAYLOR¹, 1983; MANSBRIDGE; BROWN⁷³, 1985).

Vários estudos têm investigado o possível impacto do uso de dentifrício fluoretado no desenvolvimento da fluorose dentária. Muitos estudos sugerem uma relação entre o uso dos dentifrícios fluoretados por crianças jovens e o desenvolvimento de fluorose dentária (PENDRYS; KATZ⁹⁴, 1989; PENDRYS; KATZ; MORSE⁹⁸, 1996; PENDRYS; KATZ⁹⁷, 1998; MASCARENHAS; BURT⁸³, 1998; WARREN; LEVY¹²⁹, 1999; BUZALAF et al.¹⁷, 2002). Além do uso precoce de dentifrício fluoretado, outras variáveis na escovação têm sido relacionadas com o aumento de fluorose dentária, como: quantidade de dentifrício usado, frequência de escovação e quantidade de dentifrício ingerida (RIORDAN; BANKS¹⁰⁷, 1991; EVANS; STAMM,⁴⁸ 1991). De todas estas variáveis de uso de dentifrício fluoretado, o uso antes da idade de 2 anos é a mais associada com fluorose dentária. O risco de desenvolver fluorose dentária a partir do uso de dentifrício fluoretado antes de 2 anos varia desde um leve aumento até um aumento de 11 vezes. As razões para esta ampla variação são as múltiplas fontes de F e os diferentes índices de fluorose dentária empregados nos diferentes estudos (MASCARENHAS⁸², 2000). Um estudo onde somente o dentifrício fluoretado era a fonte de F mostrou uma associação entre o seu uso precoce e fluorose dentária (MASCARENHAS; BURT⁸³, 1998).

Também a concentração de F presente no dentifrício é um fator a ser considerado. O estudo de HOLT et al.⁵⁷ (1994), que avaliou o risco de fluorose dentária em crianças que tinham participado previamente de uma pesquisa clínica, envolvendo o efeito preventivo de cáries e o uso de dentifrícios com baixa concentração de F (550 ppm) na idade entre 2 e 5 anos, mostrou que as crianças que tinham usado este dentifrício tinham uma probabilidade significativamente menor de desenvolver fluorose dentária.

Segundo PESSAN; SILVA; BUZALAF¹⁰⁰ (2003) a ingestão de F através da escovação é de 0,034 mg/Kg peso para crianças de 4-5 anos e 0,041 mg/Kg para crianças de 6-7 anos de idade.

Em um estudo realizado por LIMA; CURY⁶⁹ (2001) com crianças de 20-30 meses de idade residentes em áreas com água fluoretada mostrou que as mesmas ingeriam em média 0,09 mg F/Kg/dia, tendo a dieta contribuído com 45%, e o dentifrício com 55% , deste modo excedendo a dose limite de 0,07 mg F/Kg/dia. Os autores sugeriram três alternativas para esta dose ser reduzida:

- ✓ redução da concentração ótima de F na água de abastecimento de 0,7 para 0,3-0,4 ppm;
- ✓ utilização de dentifrício contendo 600 ppm de F solúvel;
- ✓ utilização de, no máximo, 0,3 g de dentifrício por escovação.

Do ponto de vista de risco e benefício do uso do F, segundo os autores, a terceira possibilidade seria, a princípio, a mais viável. Na condição deste estudo, se as crianças utilizassem 0,3 g de dentifrício por escovação, seriam submetidas a uma dose segura para a fluorose dentária, considerando o limiar de 0,05 a 0,07 mg F/Kg/dia.

No entanto, segundo RICHARDS; BANTING¹⁰⁶ (1996) a quantidade média de dentifrício aplicado na escova por crianças menores que 6 anos é 0,55 g por escovação. Em média, 48% desta quantidade é ingerida por crianças de 2-3 anos, 42% por crianças de 4 anos e 34% por crianças de 5 anos (ERICSSON; FORSMAN⁴⁶, 1969; HARGREAVES; INGRAM; WAGG⁵², 1972; RICHARDS; BANTING¹⁰⁶, 1996). Assim, a quantidade de dentifrício usada na escova tende a aumentar com a idade, enquanto a quantidade ingerida tende a diminuir (LEVY; KIRITSY; WARREN⁵⁶, 1995).

No estudo de ALMEIDA, CARDOSO e BUZALAF² (2007), a ingestão somente a partir do dentifrício foi de 0,106 mgF/ Kg peso/ dia, sendo responsável por 81,5% da ingestão diária de F. Além disso, houve uma correlação positiva ($r=0,971$; $p<0,0001$) entre a quantidade de dentifrício utilizada ($0,488\pm0,303$ g) e a de F ingerido por escovação ($0,591\pm0,445$ mg).

Para que seja reduzido o risco de desenvolvimento de fluorose dentária, dentifrícios sem F ou então com concentrações mais baixas, em torno de 500 ppm, deveriam ser recomendados para crianças muito pequenas ou pré-escolares, ou então o dentifrício contendo níveis acima de 1000 ppm só deveria ser usado sob a supervisão dos pais, os quais deveriam colocar o dentifrício na escova (apenas uma porção do tamanho de uma ervilha) e supervisionar a escovação para assegurar que a criança está expectorando e lavando a boca após a escovação (WARREN; LEVY¹²⁹, 1999; MASCARENHAS⁸², 2000; TABARI et al.⁹¹ 2000).

2.2 Biomarcadores de exposição ao F

Para indicar uma alteração que poderia levar a uma doença clínica (GRANDJEAN⁵⁰, 1995) têm-se os marcadores biológicos ou biomarcadores, os quais são indicadores que sinalizam eventos em sistemas biológicos ou amostras (Committee on Biological Markers of the National Research Council³², 1987). O uso de biomarcadores em Epidemiologia não é uma idéia nova (HULKA⁵⁸, 1991), mas foi recentemente que os biomarcadores se tornaram importantes na toxicologia ambiental (CULLEN; REDLICH³³, 1995). Dependendo dos efeitos biológicos envolvidos, os biomarcadores podem ser úteis no monitoramento do estado de saúde, em determinar a relação dose-resposta, bem como em estimar os riscos (DeCAPRIO³⁸, 1997).

CAMPOS²⁵ (2002) utilizou as unhas para detectar exposição crônica à cocaína. Segundo a autora, amostras de urina são mais utilizadas para se detectar uma exposição recente, como em casos de “doping” e de análise periódica realizada em funcionários de empresas, onde o intuito é verificar se os atletas ou trabalhadores estão atuando sob efeito de drogas. Mas se for preciso verificar exposição crônica à droga, a análise da urina não é eficiente,

pois após 72 horas da exposição, torna-se difícil a detecção da cocaína e seus produtos de biotransformação, e é neste contexto que a análise da unha ganha importância. Entretanto, as unhas servem como alternativas para verificar casos de exposição prolongada, como em investigações forenses pós-morte.

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

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

Biomarcador de susceptibilidade: é definido como um indicador de que a saúde do sistema é especialmente sensível ao desafio da exposição a um composto xenobiótico (substância originada fora do organismo).

Biomarcador de exposição: pode ser a identificação de uma substância exógena ao sistema, o produto de interação entre um composto xenobiótico e componentes endógenos, ou outro evento no sistema biológico relacionado à exposição.

2.2.2 Biomarcadores de F

Num simpósio realizado pelo National Institute of Health, em Bethesda, Maryland, EUA, em 1999, foi estabelecida uma agenda internacional de necessidades de pesquisa envolvendo F. Entre os tópicos, estava a avaliação de possíveis biomarcadores, que fossem de fácil coleta e análise, para a exposição ao F em humanos (CLARKSON²⁹, 2000). As vantagens e limitações do plasma, saliva dos ductos e urina como biomarcadores para exposições recentes e do osso e dentina como biomarcadores teciduais para exposições crônicas foram discutidos. Também foi discutido o possível uso das unhas como indicadoras de exposições subcrônicas ao F, e possivelmente exposições crônicas se a ingestão permanecesse relativamente constante.

De acordo com o Comitê Nacional de Pesquisa dos EUA, 1997, os biomarcadores de F podem ser classificados em várias categorias:

Biomarcadores de efeito: as fluoroses dentária e esquelética são efeitos colaterais de uma exposição prévia a níveis de F moderados ou altos. Deste modo, as fluoroses dentária e esquelética são biomarcadores apropriados, uma vez que representam sinais de exposição prévia ao F.

Biomarcadores de susceptibilidade: vários fatores podem afetar o modo como os indivíduos respondem a uma mesma dose de F. Como biomarcadores de susceptibilidade ao F temos desnutrição, metabolismo do cálcio e magnésio, condição renal e genética.

Biomarcadores de exposição: Os biomarcadores de exposição podem refletir diferentes períodos de exposição a um evento. Ou seja, os marcadores conhecidos de meia-vida curta ou de curto tempo, indicam uma exposição que ocorreu poucos minutos ou horas atrás, enquanto outros refletem dias, semanas ou muitos meses atrás. Como biomarcadores de meia vida-curta podemos citar o plasma, soro, saliva e urina, que indicam exposições recentes ao F, enquanto que osso, dentes, cabelo e unhas podem refletir a exposição prévia de semanas ou vários meses, ou seja, indicam a exposição crônica ao F.

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

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

2.2.3 A urina como biomarcador de exposição ao F

Uma vez que a urina é a principal via de excreção para o F ingerido, a análise da concentração de F na urina é um bom meio para se estimar a ingestão total de F de uma população (WHO¹³⁸, 1994). Para este fim, a coleta de amostras de urina por 24 horas é mais confiável que a de amostras isoladas (HODGE; SMITH; GEDALIA⁵⁶, 1970), pois o F é rapidamente excretado após

sua ingestão, atingindo um pico em 2 horas e amostras isoladas podem não refletir a concentração média e muito menos a ingestão total. Vários estudos têm mostrado que a fração de F que é excretada pela urina varia de acordo com a massa corporal (WHITFORD¹³¹, 1990; EKSTRAND et al.⁴⁵, 1994). Assim, em crianças jovens tem-se relatado uma excreção menor em relação aos adultos, e isto é atribuído à maior capacidade que as crianças apresentam para depositar F nos tecidos duros. Para adultos jovens, a excreção urinária fracional de F (FUEF) tem sido reportada como sendo aproximadamente 50% (WHITFORD, 1990¹³¹; MARTHALER et al.⁸⁰, 1995), apesar de a variação dos valores experimentais relatados em vários estudos de farmacocinética estar entre 41 e 47% (EKSTRAND et al.⁴², 1977; EKSTRAND; EHRNEBO; BORÉUS⁴¹, 1978; EKSTRAND et al.⁴³, 1980; EKSTRAND; SPAK; EHRNEBO⁴⁴, 1982). Mais recentemente, um valor médio de 16,7% foi determinado para a FUEF entre crianças de 37 a 410 dias (EKSTRAND et al.⁴⁵, 1994) e de 30,7% para crianças de 3 a 5 anos (VILLA et al.¹²⁵, 1999).

Um aspecto importante a ser considerado na excreção do F pela via renal, é que existe a possibilidade da reabsorção pelos túbulos renais e, desta forma, o F volta para a corrente sanguínea. O pH da urina interfere neste processo. Quando o pH é neutro, praticamente todo o F presente na urina permanece na sua forma iônica, não atravessa as paredes dos túbulos e é excretado. Em um pH de 7,4, a relação do íon F para o íon H é de 10.000:1 (WHITFORD¹³¹, 1990). No entanto, quando a urina se torna ácida, com o pH em torno de 4,4, esta relação é alterada, passando para 10 F: 1 H, ou seja, 1000 vezes maior. Esta mudança gera a síntese de HF, torna permeável a membrana dos túbulos e aumenta a difusão do F para o fluido intersticial. Sendo assim, ocorre uma redução na quantidade de F a ser excretada (FIGURA 1). Cerca de 50% do F ingerido por um adulto é excretado pela via renal (WHITFORD¹³¹, 1990).

Figura 1 - Influência da acidez urinária na absorção do F nos túbulos renais

Em 2002, KETLEY et al.⁶¹ compararam a excreção urinária de F de 24 horas de crianças que recebiam diferentes regimes de F sistêmico. Para aquelas que consumiam água fluoretada (0,8 a 1,0 mg/ L), a excreção urinária de F foi de 0,36 mg, para crianças que recebiam leite fluoretado (0,5 mg F/ dia), a excreção foi de 0,30 mg e nas regiões não fluoretadas (< 0,1 mg/ L na água) foi de 0,21 mg.

Em 2004, KETLEY et al.⁶² avaliaram a excreção urinária de 24 horas de F de crianças de 1,5 - 3,5 anos de idade de uma região com água de abastecimento fluoretada (0,8-1,0 mg/ L) e cinco regiões não fluoretadas (< 0,15 mg/ L). As excreções urinárias de F foram de 0,23 mg ($\pm 0,19$) e 0,37 mg ($\pm 0,11$), para as regiões não fluoretadas e fluoretada, respectivamente.

Com o objetivo de comparar os níveis de excreção urinária de F na Jamaica, antes de iniciada a fluoretação do sal em 1987 e depois de 20 meses (1989), WARPEHA e MARTHALER¹²⁸ (1995) realizaram um estudo, com grupos de várias faixas etárias e de três localidades distintas: (1) uma área urbana (Kingston) com uma concentração baixa de F na água (< 0,25 ppm F); (2) uma comunidade rural com concentrações similarmente baixas; (3) uma

comunidade rural com uma concentração de F intermediária ($> 0,31$ e $< 0,51$). Foram avaliadas amostras de urina coletadas pela manhã e também de 24 h. As médias da excreção urinária de F das coletas da manhã variaram de 12,1-27,9 $\mu\text{g/h}$ para 23,7-67,4 $\mu\text{g/h}$, antes de iniciada e 20 meses após a fluoretação do sal, respectivamente. Já a excreção de 24 h foi de 169-489 $\mu\text{g/24h}$ antes da fluoretação e aumentou para 304-657 $\mu\text{g/24h}$ após 20 meses de iniciada a fluoretação do sal. Os autores ressaltam que os níveis de F na urina obtidos após 20 meses de iniciada a fluoretação do sal foram similares ao de crianças que tem uma ingestão de 1,2-1,7 mg F por dia ou consomem água fluoretada.

2.2.3 A unha como biomarcador de exposição ao F

As unhas são placas curvas queratinizadas, dispostas na superfície dorsal das falanges distais, com função protetora. Apresentam uma parte distal, exposta, o corpo e uma parte proximal oculta, a raiz (matriz). Esta é coberta por um prolongamento ou prega da camada córnea da epiderme. A unha repousa sobre o leito ungueal, que é abundantemente vascularizado e innervado. O crescimento das unhas é contínuo durante a vida, graças a um processo de proliferação e diferenciação de células epiteliais da raiz da unha, que gradualmente se queratinizam para formar a placa córnea (Figura 2), (O'RAHILLY⁹², 1964). As unhas variam no seu aspecto, forma, tamanho e resistência com a idade, não havendo diferença no que diz respeito ao sexo. As unhas de criança são mais finas e menores, e com a idade tornam-se mais grossas.

Figura 2 - Corte sagital esquemático de unha em um dedo da mão

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

SCHAMCHULA et al.¹¹⁰ (1985) fizeram hidrólise em base forte a alta temperatura e então usaram o eletrodo íon específico para analisar as unhas das mãos de 3 grupos de crianças húngaras, cuja concentração de F na água de beber variava de 0 a 0,11 ppm, de 0,5 a 1,1 ppm ou de 1,6 a 3,1 ppm. As concentrações médias de F encontradas nas unhas das mãos foram 0,79, 1,31 e 2,31 mg/Kg, respectivamente.

MACHOY⁷⁰ (1989) usou um método de cromatografia gasosa para avaliar se a quantidade variável de F no meio ambiente é refletida na concentração de F nas unhas das mãos de cinco grupos de crianças polonesas. Um dos grupos vivia numa comunidade sem água fluoretada, mas que possuía uma fábrica que processava “fosforitas e apatitas”. A concentração média de F nas unhas das mãos foi de 12,2 mg/kg. Três grupos residiam em comunidades sem água fluoretada, enquanto que o outro grupo tinha uma concentração de 0,64 ppm na água. A concentração média nas unhas das mãos do último grupo foi de 8,6 mg/Kg, enquanto que dos outros três grupos foi

de 2,5, 6,4 e 7,6 mg/Kg. Através destes resultados o autor concluiu que as influências ambientais alteram o conteúdo de F nas unhas das crianças. Também neste estudo foram analisadas as unhas das mãos e as dos pés de um único indivíduo, para avaliar as concentrações médias ($\pm$ DP) de F, que foram de 3,65 ($\pm$ 1,02) e 3,58 ($\pm$ 0,55) para as unhas das mãos e dos pés, respectivamente.

Em 1990, SCHIMIDT e LEUSCHKE¹¹¹ realizaram um estudo com o objetivo de determinar o conteúdo de F nas unhas das mãos de indivíduos com e sem exposição crônica ao F. As causas da exposição foram emissões de indústrias como, por exemplo, fábrica de ácido hidrofúorídrico. O conteúdo de F das unhas dos dois grupos foi extremamente baixo. As médias para os grupos sem e com exposição ao F foram 0,8 e 2,78 ppm, respectivamente. Neste estudo houve uma larga variação dos resultados que segundo os autores poderia ser explicada pela aderência de partículas de sujeira nas amostras de unhas.

SPATE et al.¹¹⁴ (1994) usaram análise por ativação neutra para determinar as concentrações de F em unhas dos pés obtidas de mulheres residentes em Holden ou Boston, Massachusetts, nos EUA onde a água continha 0,09 e 1,0 ppm, respectivamente. As concentrações médias (com as variações) foram de 4,2 (2,4-9,7) e 6,4 (2,7-10,1) mg/Kg.

WHITFORD et al.¹³⁵ (1999) analisaram a concentração de F existente nas unhas com o eletrodo através de difusão facilitada por HMDS. Os autores observaram que a área de superfície das unhas (intactas, cortadas em pequenos pedaços ou pulverizadas), imersão em água deionizada por 6 horas, imersão em água fluoretada (1 ppm) por 2 horas ou remoção de matéria orgânica das unhas por incineração não causaram alterações no conteúdo de F analisado. Os autores relataram ainda que o conteúdo de F presente nas unhas dos pés é aproximadamente a metade daquele presente nas unhas das mãos. Um dos autores do trabalho aumentou a ingestão de F durante 1 mês e observou um incremento significativo na concentração de F das unhas das mãos cerca de 3,5 meses depois. Foram, ainda, dosadas as concentrações de F presentes nas unhas das mãos de crianças brasileiras que residiam em áreas contendo 0,1, 1,6 ou 2,3 ppm de F na água, tendo-se encontrado médias

de 1,85, 5,28 e 7,52 mg/Kg, respectivamente, o que indicou que as concentrações de F nas unhas das mãos são boas indicadoras da ingestão de F.

BUZALAF et al.¹⁸ 2002 investigaram as mudanças na concentração de F no plasma e nas unhas de ratos que receberam diferentes concentrações de F na água de beber. Uma relação direta entre a concentração de F nas unhas e no plasma foi identificada ($r=0,67$, $p<0,001$), indicando que as unhas podem ser utilizadas como indicadores de concentração de F no plasma em ratos submetidos à ingestão crônica de F.

Em 2003, ARSATI⁴ realizou um estudo com o objetivo de avaliar a unha como um possível indicador biológico de exposição ao F para prever o risco de fluorose dentária. O trabalho foi composto por dois estudos distintos, ambos envolvendo crianças de 20 a 30 meses de idade. No primeiro estudo, a autora verificou a relação entre concentração de F nas unhas e na água de abastecimento de três cidades paulistas: Cordeirópolis, Piracicaba e Assistência, que possuem 0,03, 0,64 e 1,53 $\mu\text{g/g}$ de F na água, respectivamente. Os resultados da concentração de F nas unhas das crianças deste estudo foram 1,65, 2,85 e 4,14 $\mu\text{g/g}$ para Cordeirópolis, Piracicaba e Assistência, respectivamente. Estes resultados sugerem que a unha pode ser um indicador da ingestão de F através da água de abastecimento. O segundo estudo contou com a participação de 23 crianças de Piracicaba, e verificou se a unha poderia ser indicador biológico para diferenciar a somatória da exposição ao F pela dieta mais dentifrício fluoretado. Para isto, o estudo foi dividido em duas fases, que duraram cerca de três meses cada. Na primeira (Fase A= dieta-F + dentifrício-F), as crianças estavam expostas normalmente ao F, através da alimentação e da escovação com dentifrício fluoretado. Na segunda (Fase B = dieta-F), as crianças passaram a escovar os dentes com um dentifrício sem F. As concentrações de F ($\pm\text{DP}$) encontradas nas unhas das crianças foram 2,64 ($\pm 0,91$) e 2,80 ($\pm 0,94$) $\mu\text{g/g}$ para as fases A e fase B, respectivamente. Estes resultados indicaram que a concentração de F nas unhas das crianças na faixa etária de risco para a fluorose dentária, expostas à água fluoretada, não parece ser um indicador biológico para diferenciar o efeito somatório da exposição sistêmica ao F do dentifrício.

LEVY, BASTOS e BUZALAF⁶⁸ (2004) analisaram a concentração de F em unhas de crianças de 2 a 6 anos de idade em cidade fluoretada (Bauru) e não-fluoretada (Itápolis). As médias das concentrações de F ($\pm$ DP, unidade $\mu\text{g/g}$) obtidas para unhas das mãos foram 3,557 ($\pm$ 1,297) e 2,292 ($\pm$ 1,250) sendo para unhas dos pés 2,815 ($\pm$ 1,288) e 1,580 ($\pm$ 0,589), para Bauru e Itápolis, respectivamente. Comparando-se as duas cidades, tanto para unhas das mãos quanto para dos pés, a concentração de F nas unhas foi maior para a cidade fluoretada, sendo que as diferenças foram significantes.

RODRIGUES, BASTOS e BUZALAF¹⁰⁸ (2004) avaliaram a concentração de F em unhas de crianças de 2-3 anos de idade, residentes de área fluoretada (Bauru, variação 0,217 a 1,147 ppm). As crianças utilizaram dentifrício placebo (sem F), fluoretado (1570 ppm) e placebo respectivamente, por períodos de 28 dias cada. As unhas foram cortadas a cada 2 semanas, durante o período experimental e por mais 22 semanas. A média da concentração de F nas 4 primeiras semanas e nas últimas 6 semanas foi 2,709 e 2,698 $\mu\text{g/g}$ para unhas das mãos e dos pés, respectivamente. Os autores relataram que apesar da concentração de F média nas unhas das mãos ser ligeiramente maior que a dos pés, na maioria dos períodos experimentais esta diferença não foi estatisticamente significativa.

PESSAN et al.¹⁰¹ (2005) realizaram um estudo com 20 crianças de 4-6 anos de idade divididas em dois grupos (A e B), que utilizaram o dentifrício da mesma maneira que RODRIGUES, BASTOS e BUZALAF¹⁰⁸ (2004). No entanto, o grupo B também recebeu aplicação tópica de verniz (2,26% F), enquanto utilizava o dentifrício fluoretado. Os autores não encontraram uma variação significativa na concentração de F nas unhas.

McDONNELL e O'MULLANE⁸⁶ (2001) averiguaram a velocidade de crescimento e o comprimento no qual as unhas poderiam ser cortadas para a análise do conteúdo de F, em crianças de 2 a 3 anos de idade. As médias (variação) obtidas foram 0,7 mm/semana (0,5 – 0,9 mm) e 7,5 mm (6,4 – 9,2 mm) para velocidade de crescimento e comprimento, respectivamente.

Para determinar o tempo necessário para detecção do F em unhas de humanos, BUZALAF, PESSAN e ALVES¹⁴ (2006), realizaram um estudo que avaliou o crescimento e o comprimento de todas as unhas das mãos e dos pés

de voluntários de 20-35 anos de idade, que ingeriram 1,8 mg de F diariamente, durante 30 dias. Amostras de unhas foram coletadas no início do estudo e a cada duas semanas, totalizando 15 coletas. O crescimento foi maior nas unhas das mãos que dos pés. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as unhas do lado direito e esquerdo tanto das mãos como dos pés. O crescimento foi significativamente maior para o polegar dos pés do que para as outras unhas dos pés, o que não ocorreu para as unhas das mãos. O tempo médio para a detecção do F nas unhas das mãos e dos pés foi de 103 e 123 dias, respectivamente. Para unhas das mãos, o aumento na concentração de F ocorreu 84 dias depois de iniciado o estudo, no entanto este aumento não foi estatisticamente significativo em relação ao baseline. Por outro lado, para as unhas dos pés, houve uma diferença estatisticamente significativa em relação ao baseline, e o F foi detectado depois de 112 e 140 dias após o aumento da ingestão. Em vista dos resultados, os autores concluíram que as unhas dos polegares dos pés parecem ser biomarcadores de ingestão de F mais adequados.

No entanto, quanto se pretende utilizar as unhas como biomarcadores de exposição ao F para estimar o risco de fluorose dentária, a sensibilidade deste biomarcador deve ser considerada. SAMPAIO et al¹⁰⁸. (2003), numa tentativa de validar a concentração de F nas unhas das mãos como um biomarcador de exposição ao F, examinaram a severidade da fluorose dentária em crianças residentes em diferentes regiões do Estado da Paraíba, onde os níveis de F natural existentes na água de beber (poços particulares) eram 0,1, 1,6 e 2,3 mg/L. Estas crianças tinham sido previamente examinadas com relação à concentração de F nas unhas das mãos (WHITFORD et al¹³⁵., 1999). A concentração média de F nas unhas das mãos das crianças que apresentaram TF 0 foi significativamente menor que a concentração média das crianças que apresentaram TF 5. No entanto, esta diferença significativa não foi observada para crianças com TF 1, 2, 3 e 4.

Segundo WHITFORD¹³⁴ (2005) o uso das unhas para o monitoramento de exposição ao F apresenta desvantagens e vantagens que são:

Desvantagens:

- (1) ao contrário da urina que pode ser analisada pelo método direto, a unha necessita que o F seja extraído através de um método que aumenta o tempo e os custos;
- (2) algumas unhas não são, ou não podem ser, adequadas para análise. Como por exemplo, unhas com esmalte não podem ser analisadas, pois o esmalte soma-se ao peso da unha, o qual seria mais baixo para o cálculo da concentração. Além disso, alguns esmaltes podem conter F, sendo necessários mais estudos para se determinar se o esmalte pode ser removido, sem alterar a concentração de F nas unhas;
- (3) os possíveis efeitos de variáveis na incorporação do F, que incluem doenças nas unhas, o grau de velocidade de crescimento das unhas, idade e sexo do doador.

Vantagens:

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

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar a ingestão e a excreção de F de crianças recebendo F sistêmico de diferentes fontes (água natural ou artificialmente fluoretada, sal ou leite fluoretado). Os objetivos específicos foram:

- ✓ comparar a quantidade de ingestão de F pelas crianças;
- ✓ comparar a excreção urinária total e a excreção urinária fracional (FUEF) de F das crianças;
- ✓ comparar a concentração de F nas unhas das mãos e dos pés das crianças;
- ✓ determinar se as unhas são melhores preditores da ingestão total de F que a urina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1. Material utilizado na leitura da concentração de F das unhas, dentifrício, alimentos sólidos e outros líquidos

- ✓ Placa de Petri plástica (Falcon, n° 1007)
- ✓ Balança de precisão AND ($\pm 0,01$ mg)
- ✓ Mesa agitadora – Nova técnica modelo NT 145
- ✓ Eletrodo F-sensível Orion 9409
- ✓ Micro eletrodo de referência calomelano (Accumet, n° de catálogo # 13-620-79)
- ✓ Vaselina
- ✓ Parafilme
- ✓ Padrão de F contendo 0,1 M F (Orion)
- ✓ Água deionizada
- ✓ HMDS – hexametildisiloxano (Aldrich)
- ✓ Ácido sulfúrico concentrado
- ✓ NaOH 0,05 M
- ✓ Ácido acético 0,2 M

4.1.2 Material utilizado na leitura da concentração de F na água e urina

- ✓ Eletrodo F sensível Orion 9609
- ✓ Soluções padrão de fluoreto de sódio 100 ppm (Orion)
- ✓ Água deionizada
- ✓ Tisab (CDTA 0,4%, pH 5,0)

4.2 Métodos

4.2.1 Voluntários

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOB-USP sob protocolo nº 116/2004 e pelo CONEP sob registro 11174 (Apêndices 1 e 2, respectivamente).

Os voluntários participaram após assinatura pelos seus responsáveis de um termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndices 3 e 4 em português e espanhol, respectivamente).

O estudo foi realizado em 5 comunidades que diferiram pela forma de exposição dos seus moradores ao F sistêmico, a saber:

- ✓ Água artificialmente fluoretada com concentração de F estimada entre 0,6-0,8 ppm (Bauru, Estado de São Paulo, Brasil), n=25

Bauru é um município brasileiro, situado no estado de São Paulo. Possui uma população de 316.064 habitantes, área de 673,488 Km², altitude média de 526 metros (615–490 metros), clima subtropical e uma temperatura média de 26,3 °C, sendo a média no inverno de 17°C e no verão 30 °C.

Fonte : www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php

Figura 3 - Localização geográfica de Bauru, São Paulo

- ✓ Água naturalmente fluoretada com concentração de F estimada em 0,7 ppm (Brejo dos Santos, Estado da Paraíba, Brasil), n=21

Brejo dos Santos é um município no estado da Paraíba (Brasil), localizado na microrregião de Catolé do Rocha. Possui uma área de 120 Km², está a 445,7 Km da capital, a 328 metros de altitude. Segundo o Censo -2000 (IBGE), a população total residente é de 5.948 habitantes sendo que 4.056 (68%) são da área urbana e 1.892 da zona rural. O município de Brejo dos Santos está inserido no Polígono das Secas, sendo a distribuição das chuvas durante o ano irregular, com 84% de seu total concentrando-se em 4 meses. A temperatura média anual é de 26 a 27 °C.

Fonte : www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php

Figura 4 - Localização geográfica de Brejo dos Santos, Paraíba

- ✓ Sal fluoretado com concentração de F estimada em 200 ppm (Lima, Peru), n=26

Lima é a capital e a maior cidade do Peru, situada na costa do pacífico. Possui cerca de 8,4 milhões de habitantes, área de 2.664,67 Km², altitude de 154 metros e clima temperado. Possui uma variação de temperaturas muito pequena e temperatura média anual de 19 °C.

Fonte: www.wikipedia.org

Figura 5 - Localização geográfica de Lima, Peru

- ✓ Leite fluoretado (Trujillo, Peru, 250 mL de leite contendo 0,25 mg F/dia)
n=25

Trujillo é uma cidade do Peru (a maior do norte do país). Possui cerca de 747.000 habitantes, área de 1.768,68 Km², altitude de 34 metros, clima temperado e uma temperatura média anual de 19°C.

Fonte: www.wikipedia.org

Figura 6: Localização geográfica de Trujillo, Peru

- ✓ Comunidade não fluoretada (Pirajuí, estado de São Paulo, Brasil, foi incluída como controle negativo), n=24

Pirajuí é um município do estado de São Paulo (Brasil). Possui uma população estimada de 20.095 habitantes, área de 819,432 Km², altitude média de 468 metros, clima quente com inverno seco e uma temperatura média anual de 21 °C.

Fonte : www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php

Figura 7 - Localização geográfica de Pirajuí, São Paulo

Todas as crianças participantes (de ambos os gêneros) tinham idade entre 4 a 6 anos, eram residentes por toda a vida das respectivas comunidades e consumiam apenas água de abastecimento público. As crianças deveriam ainda apresentar uma boa higiene oral, não estarem usando medicamentos e não serem portadoras de problemas gastro-intestinais, ósseos ou renais que pudessem interferir no metabolismo do F.

4.2.2 Obtenção das amostras

4.2.2.1 Equipe envolvida no projeto

Por se tratar de um projeto envolvendo coleta simultânea de amostras em comunidades nacionais e internacionais, foram constituídas equipes responsáveis pelas coletas em cada região, a saber:

- a) Bauru e Pirajuí – equipe coordenada pela Profa. Dra. Marília Afonso Rabelo Buzalaf, FOB-USP;
- b) Brejo dos Santos – equipe coordenada pelo Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio, UFPB;

c) Lima – equipe coordenada pela Profa. Dra. Rita Sarmiento Villena, Universidade Peruana Cayetano Heredia;

d) Trujillo – equipe coordenada pela Profa. Dra. Ana Arana, Universidade Peruana Cayetano Heredia.

Para uma melhor padronização nas coletas das amostras, todas as equipes do projeto receberam um manual com as etapas da execução, bem como contendo o detalhamento das coletas e processamento das amostras até o seu envio para o laboratório analítico (Laboratório de Bioquímica da FOB-USP) (Anexo 1). Um fluxograma com todos os momentos das coletas está ilustrado na Figura 8.

Figura 8 - Momentos das coletas das amostras

4.2.2.2 Estimativa da ingestão de F a partir da dieta

A fim de se estimar a ingestão de F a partir da dieta, utilizou-se o método da dieta duplicada. Este procedimento foi realizado por dois dias consecutivos. As instruções dadas aos pais quanto ao método de coleta de todos os alimentos e bebidas ingeridos por seus filhos num período de 24 horas foram similares às descritas por GUHA-CHOWDHURRY⁵¹ et al. (1996), com exceção de que os componentes da dieta duplicada foram coletados separadamente em três grupos: água, sólidos e outros líquidos. A importância de se manter os hábitos dietéticos usuais em casa e de se duplicar a dieta o mais precisamente possível pela observação do que a criança realmente comeu e bebeu foi enfatizada. Pediu-se aos pais para removerem as partes dos alimentos que normalmente não são ingeridas, como sementes, cascas e ossos, antes de colocá-los no recipiente.

Os pais, por observação visual, estimaram a quantidade de alimentos consumidos o mais precisamente possível, usando medidas caseiras, como colher de chá, colher de sobremesa, xícara de chá, etc., para aproximar as quantidades de alimentos ingeridos. No caso das refeições, solicitou-se aos pais que servissem duas porções similares em dois pratos separados, esperassem até que a criança terminasse a sua refeição e então adicionassem ou removessem porções similares no prato que haviam separado (Figura 9). No dia seguinte a amostra de comida foi recolhida e pesada. As amostras foram então homogeneizadas com volumes conhecidos de água deionizada e uma alíquota de 15 mL foi armazenada em tubos tipo Falcon devidamente rotulados a -20°C até a análise de F.

As crianças foram pesadas em balança de precisão (Tanita, $\pm 0,1$ Kg) a fim de que o valor encontrado para ingestão de F pudesse ser expresso em mg/Kg peso corporal.

Figura 9 - Método da dieta duplicada

4.2.2.3 Coleta de água

Amostras da água da torneira das casas dos voluntários foram coletadas nos mesmos dias quando as dietas duplicadas foram coletadas. As amostras de água foram colocadas em frascos plásticos e armazenadas na temperatura de -20°C até a análise do F.

4.2.2.4 Coleta de sal

Em Lima e Trujillo, amostras de sal de cozinha utilizadas nas casas de cada voluntário também foram coletadas e armazenadas em tubos plásticos até a análise para o F.

4.2.2.5 Estimativa da ingestão de F a partir do dentífrício

Foi realizada conforme descrito por GUHA-CHOWDHURRY⁵¹ et al. (1996), nos mesmos dias das coletas de dieta duplicada. Procurou-se simular as condições de casa (se os pais ou a criança realiza a escovação, tamanho da escova de dente usada, quanto de dentífrício é colocado na escova, se é colocado pelos pais ou pela criança, se a criança expectora após a escovação e a duração da escovação). Pediu-se aos pais para trazer a escova de dente

utilizada em casa. A escova foi molhada e pesada numa balança eletrônica (AND, modelo EK-200, $\pm 0,01$ g). O dentifrício foi colocado na escova pelo pai ou pela criança e foi medido o peso da escova mais dentifrício, dando informação da quantidade de F colocada na escova. A escovação foi realizada pela criança com ou sem o auxílio do pais, sob a observação do examinador. Dependendo do seu hábito, a criança expectorou ou não, ou enxaguou a boca com água deionizada. Qualquer saliva expectorada foi coletada num recipiente plástico de boca larga. A escova de dente foi lavada abundantemente com volume conhecido de água deionizada (50 mL) e este lavado foi acrescentado no recipiente com a saliva expectorada pela criança anteriormente (Figura 10). Também foi coletada uma amostra de dentifrício utilizado pela criança para posterior análise de F, a fim de que pudesse fornecer informação acerca da quantidade de F colocada na escova. A análise do F forneceu informações acerca da quantidade de F não engolido, ou seja, a quantidade expectorada somada à quantidade de F deixada na escova. Foram obtidas informações quanto à frequência de escovação, as quais foram usadas para se calcular a ingestão diária de F a partir do dentifrício, para cada criança.

Figura 10 - Seqüência da técnica da estimativa de ingestão de F através do dentífrico

4.2.2.6 Coletas de urina

Nos mesmos dias (dias 1 e 2 da Figura 8) em que as estimativas de ingestão de F pela dieta e dentifrício forem feitas, amostras de 24 horas de urina foram coletadas, de acordo com as diretrizes da OMS (MARTHALER⁸¹, 1999).

Foram fornecidos quatro potes de bocas larga com capacidade de 1 L, sendo dois potes para cada dia, devidamente etiquetados com o nome da criança, data da coleta e cidade da coleta das amostras. As crianças foram orientadas a urinar em pinicos e os pais ou responsáveis deveriam transferir imediatamente a urina para os potes. A primeira urina do primeiro dia foi desprezada e a coleta só iniciou na segunda urina, o horário desta segunda urina foi anotado na etiqueta do pote. Este horário inicial foi utilizado como referência para o término da coleta do primeiro dia e início da coleta do segundo dia. Sendo assim, a urina excretada durante todo o dia até o mesmo horário que foi anotado no pote do dia seguinte em que se iniciou a coleta, ou seja, durante 24 horas, foi armazenada. Então, começou a coleta no outro pote até o mesmo horário do dia seguinte (mais 24 horas). Por exemplo, se a criança fez a primeira urina do primeiro dia às 8 h e a segunda às 10 h, esta urina das 10 h foi coletada e o horário das 10 h marcado no pote. O restante da urina feita neste dia, até às 10 h do dia seguinte foi todo colocado neste mesmo pote. Toda a urina feita a partir das 10:01 h do segundo dia, até às 10 h do terceiro dia foi colocada no segundo pote. Dois potes vazios ficaram na escola, sendo um para cada dia da coleta. Os pinicos e os potes foram lavados com água da torneira, com exceção de Bauru e Brejo dos Santos, onde a água é fluoretada. Neste caso, foram fornecidas aos pais dos voluntários garrafas de refrigerante (2 L) com água deionizada, para que os mesmos pudessem lavar os pinicos nos dias de coleta.

Depois de coletada, o volume de cada dia da urina foi medido (em mL) pelo pesquisador numa proveta graduada de vidro e o valor anotado. Em tubos identificados, foram colocadas alíquotas de 15 mL de urina, que foram congeladas (-20°C) até a análise de F.

4.2.2.7 Coletas de unhas

Coletas de amostras de todas as unhas das mãos e das unhas dos polegares dos pés foram realizadas no dia em que se iniciou o experimento. Após 75 dias do início do experimento foi realizada outra coleta, para que a coleta da unha correspondesse à ingestão de F referente à dieta e dentifrício que foi coletada (McDONNELL⁸⁷, 2004; BUZALAF¹⁴ et al., 2006). Este procedimento foi repetido depois de 15 dias, totalizando três amostras por voluntário. Quinze dias antes de cada coleta de unha os pais foram instruídos a deixarem as unhas das crianças crescerem. Todas as unhas após serem cortadas foram armazenadas em recipientes identificados e guardadas à temperatura ambiente até a análise para o F.

4.3. Procedimento analítico

4.3.1. Unhas, dieta e dentifrício

Preparo das unhas para a análise

Os fragmentos das unhas das mãos e dos pés de cada criança, em cada data, foram analisados conjuntamente, sendo que para cada data correspondente houve dois resultados por criança, ou seja, um resultado para as unhas das mãos e outro para as unhas dos pés. Antes da análise, os fragmentos foram limpos com o auxílio de uma escova interdental e também com um pedaço de tecido umedecido com água deionizada. Após este procedimento os fragmentos foram colocados em ultra-som com água deionizada por 10 minutos e secos em estufa a 60°C (2 a 3 horas). Finalizados os procedimentos de limpeza e secagem os fragmentos foram pesados (Balança de precisão AND, $\pm 0,01$ mg).

Análise de F:

A análise de F foi feita após difusão facilitada por HMDS (hexametildisiloxano), pelo método de TAVES¹¹⁷ (1968), como modificado por WHITFORD¹³³ (1996). Para tanto, os fragmentos de unha foram colocados em placas de Petri plásticas (Falcon, nº 1007), juntamente com 2 mL de água deionizada (Figura 11a). No caso das amostras de dieta e dentifrício, o volume de amostra colocado nas placas de Petri foi de 1 mL, sendo o volume completado para 2 mL com água deionizada. Na tampa destas placas, foram colocados 50 µL de NaOH 0,05 M, distribuídos em 3 gotas (Figura 11b). As placas foram fechadas, seladas com vaselina, e por um orifício feito previamente na tampa foi colocado o HMDS (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3 M), (Figura 11c). O orifício foi imediatamente selado com vaselina e parafilme (Figura 11d). As placas foram colocadas numa mesa agitadora (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante toda a noite (12 a 14 horas). No dia seguinte, as tampas foram removidas, invertidas e as gotas de NaOH foram combinadas numa única gota. O NaOH foi tamponado pela adição de 25 µL de ácido acético 0,2 M. O volume total foi então ajustado para 75 µL com água deionizada usando uma pipeta (Figura 11e). A gota, que contém todo o F das unhas foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um micro-eletrodo de referência calomelano (Accumet, número de catálogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion EA 940. Durante a leitura, os dois eletrodos foram mantidos unidos através de bandas de borracha e colocados em contato com a gota na parte interna da tampa da placa (Figura 11f).

O princípio químico do método é baseado na dissociação de moléculas de HMDS na presença de ácido forte numa placa de difusão. O F (das amostras ou soluções-padrão) liga-se ao radical silano, formando um composto volátil, chamado trimetilfluorsilano. Este composto se difunde para o “trap”, de natureza alcalina (NaOH), localizado no interior da tampa fixada no fundo da placa de difusão. O F é trocado pelo íon hidroxila. Um novo composto é formado (trimetilsilanol), sendo o F liberado.

Figura 11 - Seqüência da técnica de análise de F após difusão facilitada por HMDS (Método de Taves modificado por Whitford)

Validação da análise

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o F da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo concentrá-la, o que incrementa o limite de detecção do F pelo eletrodo sensível, que é de 0,02 µg/mL, conforme consta no manual do fabricante. Uma vez que nossa amostra tem um volume final de 0,075 mL, após a difusão facilitada por HMDS, permitiu fazer a leitura em amostras com mais de 2,5 mg de unha com concentração de F superior a 3 µg/g.

As soluções-padrão (contendo 0,5, 1,0, 5,0, 10,0, 50,0 nm F para as unhas e 1,0, 5,0, 10,0, 50,0, 100,0 e 500,0 nm F para as amostras de dieta e dentifrício) empregadas na realização da curva de calibração foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 0,1 M F (Orion) e difundidas em triplicata, em concomitância com as amostras de unha analisadas. Foi feita a primeira leitura antes de se começar a ler as amostras de unhas, a segunda quando a metade das amostras já tinha sido lida e a terceira após o término da leitura das amostras.

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.

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 (Anexo 2), e então foi calculada a porcentagem de variação entre a quantidade de F medida e a esperada pelos padrões. Somente curvas de calibração com porcentagem de variação de até 5% para todos os padrões e $r \geq 0,99$ (linearidade) foram aceitas, contemplando a exatidão do método. Todas as análises, com exceção das unhas foram feitas em duplicatas. Sempre que a repetibilidade das leituras em duplicata era inferior a 90%, as análises foram repetidas. A repetibilidade média das leituras,

baseadas nas amostras em duplicata foi de 96,7% para os sólidos, 96,8% para outros líquidos, e 96,9% para as amostras provenientes da escovação.

4.3.2 Água e urina

A concentração de F presente nas amostras de água e urina foi determinada em duplicata, utilizando o íon específico (Orion 9609) após tamponamento com um volume idêntico de TISAB II.

Validação da análise

Soluções-padrão (contendo 0,1, 0,2, 0,4, 0,8, 1,6 and 3,2 mgF/L) foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 100mgF/L NaF (Orion). As curvas-padrão tinham coeficiente de correlação $\geq 0,99$. Todas as amostras foram analisadas em duplicata. Quando a repetibilidade de cada duplicata foi mais baixa do que 90%, as análises foram repetidas. A média da repetibilidade, baseada nas amostras em duplicata, foi 98,5% e 98,7% para água e urina, respectivamente.

4.4 Análise estatística

Foi utilizado o software GraphPad Instat. Todos os dados apresentaram distribuição normal. O teste de Bartlett sugeriu que, exceto para FUEF, não apresentavam homogeneidade entre os desvios-padrão. Assim, a análise estatística foi feita pelo teste não paramétrico de Kruskal Wallis, seguido pelo teste de Dunn para comparações individuais entre os grupos. Para FUEF, ANOVA e teste de Tukey foram utilizados. A correlação entre a ingestão de F através da dieta e excreção urinária de F, ingestão de F através do dentifrício e excreção urinária de F, ingestão total de F e excreção urinária de F, ingestão de F através da dieta e concentração de F nas unhas das mãos e dos pés, ingestão total de F e concentração de F nas unhas das mãos e dos pés, tão bem, como as concentrações de F das unhas das mãos e das unhas dos pés

foi feita utilizando o coeficiente de correlação de Pearson. O nível de significância de 5% foi selecionado *a priori*.

*

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

A Tabela 3 mostra as características da população estudada, em relação ao gênero, idade média, peso médio, altura média e número de voluntários (n) por comunidade.

Tabela 3 - Gênero (M-masculino, F-feminino), idade média, peso médio (Kg), altura média (cm), e número de voluntários por comunidade

		Bauru	Brejo dos Santos	Lima	Trujillo	Pirajuí
Gênero	M	16	11	15	15	15
	F	9	10	11	10	9
Idade		5,6	5,6	5,5	5,6	5,9
Peso		19,4	18,1	19,0	19,8	21,6
Altura		111,0	108,8	105,5	109,0	117,0
n		25	21	26	25	24

A tabela 4 mostra as concentrações médias ($\pm$ DP) e as variações de F na água de abastecimento público coletada nas residências dos voluntários, durante os dois dias de coletas. A concentração de F na água de abastecimento de Trujillo, comunidade que tem o leite como método de fluoretação, foi mais alta do que o esperado. Em Brejo dos Santos, cidade naturalmente fluoretada, houve uma grande variação nos níveis de F na água, diferentemente das outras comunidades.

Tabela 4: Médias e desvios-padrão (amplitude) das concentrações de F (mg/L) na água de abastecimento público coletada nas residências dos voluntários durante os dois dias de coletas

Comunidades	[F] na água (amplitude)
Bauru	0,70 $\pm$ 0,08
(Água artificialmente F, 0,6-0,8 mgF/L)	(0,55 - 0,79)
Brejo dos Santos	0,66 $\pm$ 0,20
(Água naturalmente F, 0,6-0,9 mgF/L)	(0,29 - 1,07)
Lima	0,04 $\pm$ 0,05
(Sal F, 180-200 mgF/Kg)	(0,00 - 0,19)
Trujillo	0,49 $\pm$ 0,03
(Leite F, 250 mL de leite contendo 1,0 mgF/L)	(0,40 - 0,54)
Pirajuí	0,08 $\pm$ 0,01
(não fluoretada)	(0,06 - 0,10)

A tabela com os valores das concentrações de F na água das residências dos voluntários nos dois dias de coletas, bem como suas respectivas médias, encontram-se no Anexo 3.

Na tabela 5 encontram-se as médias ($\pm$ DP) da estimativa de ingestão de F (mg) através da dieta de ambos os dias de coletas, das comunidades do estudo. A dieta foi avaliada através da contribuição dos seus diferentes constituintes como a água, os sólidos e outros líquidos, nos dois dias de coletas. Para a cidade de Trujillo, foi incluída a ingestão de F através do leite pelo fato de a comunidade ter este como veículo de fluoretação. A contribuição

percentual de cada componente da dieta (água, sólidos e outros líquidos) para a ingestão total de F pela dieta das comunidades está ilustrada na Figura 11. Para Trujillo, a contribuição dos outros líquidos foi somada com a do leite. Entre os constituintes da dieta, a água foi o que mais contribuiu para a ingestão de F a partir da dieta em Bauru e Brejo dos Santos. Já em Lima, Trujillo e Pirajuí, a maior contribuição foi dada pelos alimentos sólidos.

Tabela 5 - Quantidade média ($\pm$ DP) de F (mg) nos diferentes componentes da dieta (água, sólidos e outros líquidos, e leite somente para Trujillo), de crianças recebendo diferentes fontes de F sistêmico

	Água	Sólidos	Outros líquidos	Leite
Bauru	0,341 ($\pm$ 0,132)	0,327 ($\pm$ 0,129)	0,134 ($\pm$ 0,081)	-
Brejo dos Santos	0,660 ($\pm$ 0,199)	0,236 ($\pm$ 0,132)	0,153 ($\pm$ 0,160)	-
Lima	0,040 ($\pm$ 0,048)	0,751 ($\pm$ 0,405)	0,110 ($\pm$ 0,044)	-
Trujillo	0,125 ($\pm$ 0,080)	0,639 ($\pm$ 0,138)	0,140 ($\pm$ 0,085)	0,254($\pm$ 0,000)
Pirajuí	0,050 ($\pm$ 0,020)	0,095 ($\pm$ 0,070)	0,037 ($\pm$ 0,043)	-

Figura 12 - Contribuição dos diferentes componentes da dieta para a ingestão total de F através da dieta de crianças de 4-6 anos de idade, recebendo diferentes fontes de F sistêmico

Nos anexos 4, 5, 6, 7 e 8 encontram-se os valores individuais observados nos dois dias de coletas, para a ingestão de F (mg) pela dieta, considerando seus diferentes componentes (água, sólidos, outros líquidos, e leite para Trujillo) para Bauru, Brejo dos Santos, Lima, Trujillo e Pirajuí, respectivamente. Já as médias destes dois dias, estão demonstradas nos anexos 9, 10, 11, 12 e 13 para Bauru, Brejo dos Santos, Lima, Trujillo e Pirajuí, respectivamente.

Através da tabela 6 podem-se observar as médias das concentrações de F (mg/Kg) do sal de cozinha das duas comunidades do Peru. Em Lima, houve uma grande variação (107,0 – 354,4 mgF/Kg), sendo a média ($\pm$ DP) 209,4 mgF/Kg ($\pm$ 56,6). Já em Trujillo, comunidade que recebe leite fluoretado, duas crianças consumiam sal de cozinha com concentração alta de F (177,3 e 81,1 mgF/Kg) a média ($\pm$ DP) de todos os voluntários nesta cidade foi de 14,8 mgF/Kg ($\pm$ 39,0). Os resultados individualizados das concentrações de F no sal de cozinha das duas cidades estão no anexo 18.

Tabela 6 - Médias e desvios-padrão (amplitude) da concentração de F no sal (mg/Kg), nas duas comunidades do Peru

Comunidades	[F] no sal (amplitude)
Lima	209,4 $\pm$ 56,6
(Sal F, 180-200 mgF/Kg)	(107,0 – 354,4)
Trujillo	14,8 $\pm$ 39,0
(Leite F, 250 mL de leite contendo 1,0 mgF/L)	(177,3 – 1,6)

A tabela 7 demonstra as estimativas médias ($\pm$ DP) de ingestão de F (mg) através do dentífrico em todas as comunidades. As estimativas de ingestão de F (mg) através do dentífrico de todas as comunidades, nos dois dias de coletas, como também as médias de ambos os dias de cada voluntário encontram-se no anexo 15. Os valores encontrados demonstram uma grande variação entre as crianças, como também para algumas crianças nos dois dias de estimativa.

Tabela 7 - Médias e desvios-padrão (amplitude) da estimativa de ingestão de F (mg) através do dentifrício de crianças de 4-6 anos de idade recebendo diferentes fontes de F sistêmico

Comunidades	Ingestão de F pelo dentifrício (amplitude)
Bauru	0,440 ± 0,453
(Água artificialmente F, 0,6-0,8 mgF/L)	(0,000 – 1,680)
Brejo dos Santos	0,595 ± 0,421
(Água naturalmente F, 0,6-0,9 mgF/L)	(0,217 – 1,859)
Lima	0,833 ± 0,896
(Sal F, 180-200 mgF/Kg)	(0,000 – 3,377)
Trujillo	0,636 ± 0,921
(Leite F, 250 mL de leite contendo 1,0 mgF/L)	(0,000 – 4,674)
Pirajuí	0,443 ± 0,455
(não fluoretada)	(0,000 – 1,582)

Na tabela 8 verificam-se as médias (variação) das concentrações de F nos dentífricos analisados no laboratório, como também as concentrações especificadas nos rótulos nas embalagens.

Tabela 8 - Média (variação) da concentração de F nos dentífricos utilizados por crianças de 4-6 anos de idade recebendo diferentes fontes de F sistêmico, de acordo com as análises laboratoriais e as informações constantes nos rótulos das embalagens

Comunidades	F Analisado	F Rótulo
Bauru	1482,2	1488,6
(Água artificialmente F, 0,6-0,8 mgF/L)	(714,8 – 1895,2)	(1100 – 1500,0)
Brejo dos Santos	1448,8	1432,4
(Água naturalmente F, 0,6-0,9 mgF/L)	(1006,5 – 1678,5)	(1100,0 – 1500,0)
Lima	1285,6	1336,0
(Sal F, 180-200 mgF/Kg)	(508,7 – 1545,0)	(500,0 – 1500,0)
Trujillo	1260,4	1413,6
(Leite F, 250 mL de leite contendo 1,0 mgF/L)	(383,3 – 1584,5)	(500 – 1500,0)
Pirajuí	1320,5	1416,7
(não fluoretada)	(942,2 – 1728,0)	(1100,0 – 1500,0)

No anexo 16 podem-se observar os valores individualizados dos dentífricos analisados e um paralelo com as concentrações estabelecidas pelos fabricantes.

As médias e desvios-padrão (amplitude) da ingestão diária de F pela dieta e dentifrício (mg/Kg de peso corporal) de cada comunidade estão relatadas na Tabela 9. Os valores médios para ingestão através da dieta variaram de 0,007 (Pirajuí) a 0,059 (Trujillo) mg/Kg de peso corporal. Já para ingestão de F pelo dentifrício, variaram de 0,020 (Pirajuí) a 0,040 (Lima) mg/Kg de peso corporal. A tabela com os valores individuais de ingestão de F através da dieta e dentifrício por mgF/ Kg de peso corporal está no anexo 17. Em todas as comunidades fluoretadas, o maior contribuinte para a ingestão diária de F foi a dieta, enquanto que na comunidade não fluoretada, o maior contribuinte foi o dentifrício.

Tabela 9 - Média e desvio-padrão (amplitude) da estimativa da ingestão diária de F (mg/Kg peso corporal) através da dieta e do dentifrício de crianças de 4-6 anos de idade, recebendo diferentes fontes de F sistêmico

Comunidades	Dieta	Dentifrício
Bauru	0,042 ± 0,012	0,023 ± 0,021
(Água artificialmente F, 0,6-0,8 mgF/L)	(0,018 – 0,079)	(0,000 – 0,088)
Brejo dos Santos	0,058 ± 0,016	0,026 ± 0,024
(Água naturalmente F, 0,6-0,9 mgF/L)	(0,035 – 0,092)	(0,000 – 0,084)
Lima	0,048 ± 0,023	0,040 ± 0,037
(Sal F, 180-200 mgF/Kg)	(0,016 – 0,106)	(0,002 – 0,149)
Trujillo	0,059 ± 0,012	0,029 ± 0,049
(Leite F, 250 mL de leite contendo 1,0 mgF/L)	(0,042 – 0,083)	(0,000 – 0,240)
Pirajuí	0,007 ± 0,004	0,020 ± 0,021
(não fluoretada)	(0,003 – 0,020)	(0,000 – 0,067)

A tabela 10 demonstra as médias e desvios-padrão (amplitude) da excreção urinária (24 horas) de F (mg), de crianças que receberam diferentes fontes de F sistêmico. A excreção urinária de F (mg) 24 horas de cada criança em todas as comunidades está relatada no anexo 18.

Tabela 10 - Excreção urinária média de F (mg) em 24 h e desvio-padrão (amplitude) de crianças de 4-6 anos de idade recebendo diferentes fontes de F sistêmico

Comunidades	Excreção urinária F (amplitude)
Bauru	0,693 ± 0,198
(Água artificialmente F, 0,6-0,8 mgF/L)	(0,406 – 1,187)
Brejo dos Santos	0,625 ± 0,297
(Água naturalmente F, 0,6-0,9 mgF/L)	(0,199 – 1,464)
Lima	0,808 ± 0,305
(Sal F, 180-200 mgF/Kg)	(0,314 – 1,459)
Trujillo	0,666 ± 0,194
(Leite F, 250 mL de leite contendo 1,0 mgF/L)	(0,342 – 1,003)
Pirajuí	0,478 ± 0,321
(não fluoretada)	(0,172 – 1,369)

Na tabela 11 demonstram-se as médias e desvios-padrão (amplitude) das concentrações de F (mg/Kg) nas unhas das mãos e dos pés de crianças recebendo diferentes fontes de F sistêmico.

As concentrações de F (mg/Kg) nas unhas das mãos e dos pés dos voluntários de todas as comunidades, durante os três momentos de coletas, ou seja, na primeira coleta, depois de 75 dias da primeira coleta e após 90 dias da primeira coleta, como também as médias destas três coletas, encontram-se nos anexos 19, 20, 21 e 22, respectivamente.

Tabela 11: Média e desvio-padrão (amplitude) da concentração de F (mg/Kg) nas unhas das mãos e dos pés de crianças de 4-6 anos de idade, recebendo diferentes fontes de F sistêmico.

Comunidades	Unhas das mãos	Unhas dos pés
Bauru	2,11 ± 0,90	1,42 ± 0,54
(Água artificialmente F, 0,6-0,8 mgF/L)	(0,78 – 3,99)	(0,82 – 2,66)
Brejo dos Santos	3,38 ± 1,98	2,24 ± 0,82
(Água naturalmente F, 0,6-0,9 mgF/L)	(1,65 – 8,89)	(1,23 – 4,18)
Lima	6,09 ± 2,21	6,70 ± 3,03
(Sal F, 180-200 mgF/Kg)	(1,83 – 9,83)	(1,48 – 13,89)
Trujillo	2,62 ± 0,82	2,63 ± 0,58
(Leite F, 250 mL de leite contendo 1,0 mgF/L)	(1,46 – 4,46)	(1,72 – 3,68)
Pirajuí	1,93 ± 0,82	1,62 ± 0,47
(não fluoretada)	(0,67 – 4,32)	(0,62 – 3,20)

A tabela 12 resume os dados obtidos, incluindo a análise estatística.

Houve uma diferença significativa entre as comunidades com relação à ingestão de F através dos sólidos (KW=87,487). A ingestão de F através dos sólidos em Lima e Trujillo não foi significativamente diferente entre si, mas foi mais alta quando comparada com as outras comunidades. Apesar de Bauru ter níveis mais altos de ingestão de F através dos sólidos quando comparada com Brejo dos

Santos, esta diferença não foi significativa. Todas as comunidades, exceto Brejo dos Santos, tiveram níveis de ingestão de F através dos sólidos mais altos que Pirajuí.

Quando a ingestão de F através da água foi considerada isoladamente, diferenças significativas foram encontradas ($KW=93,977$). Os níveis mais altos ocorreram em Brejo dos Santos ($0,660 \pm 0,199$ mg) e apesar de estes níveis terem sido quase duas vezes maiores que os encontrados em Bauru ($0,341 \pm 0,132$ mg), a diferença não foi significativa. Os níveis mais baixos na ingestão de F através da água foram encontrados para Pirajuí ($0,050 \pm 0,020$ mg) e Lima ($0,040 \pm 0,048$ mg), os quais não diferiram estatisticamente. A ingestão de F pela água em Trujillo ($0,125 \pm 0,080$ mg) foi mais alta do que em Pirajuí, mas não diferiu estatisticamente.

Com relação à ingestão de F através dos outros líquidos, houve uma diferença significativa entre as comunidades ($KW=71,932$). Como esperado, os níveis de F encontrados em Trujillo ($0,394 \pm 0,085$ mg) foram significativamente mais altos quando comparados com as outras comunidades. Não houve uma diferença estatisticamente significativa entre Bauru, Brejo dos Santos e Lima, mas os valores encontrados para estas comunidades foram significativamente mais altos que aqueles encontrados em Pirajuí ($0,037 \pm 0,43$ mg).

Considerando-se a ingestão de F através da dieta (mg/Kg de peso corporal), houve uma diferença significativa ($KW=69,157$) entre as comunidades. Os níveis mais altos foram encontrados para Trujillo ($0,059 \pm 0,012$ mg/ Kg peso/ dia) e Brejo dos Santos ($0,058 \pm 0,016$ mg/ Kg peso/ dia) não havendo diferença significativa entre estas comunidades. Valores intermediários foram encontrados para Lima ($0,048 \pm 0,023$ mg/ Kg de peso corporal) e Bauru ($0,042 \pm 0,012$ mg/ Kg peso/ dia) não diferindo significativamente entre si. Os valores encontrados para Pirajuí ($0,007 \pm 0,004$ mg/ Kg peso/ dia) foram significativamente mais baixos quando comparados com as comunidades fluoretadas.

Quanto à ingestão de F através do dentifrício, os valores encontrados variaram de $0,020 (\pm 0,021)$ e $0,040 (\pm 0,037)$ mg/Kg peso corporal, para Pirajuí e Lima, respectivamente. Apesar da ampla variação, nenhuma diferença significativa entre as comunidades foi detectada ($KW=6,893$, $p=0,142$).

Quando a ingestão total de F (dieta mais dentifrício) foi considerada, diferenças significativas entre as cidades foram encontradas ($KW=45,459$). Pirajuí

teve os níveis mais baixos ($0,027 \pm 0,022$ mg/ Kg peso/ dia), os quais diferiram significativamente de todas as comunidades fluoretadas. Os níveis encontrados para Bauru ($0,065 \pm 0,030$ mg/ Kg peso/ dia), embora ligeiramente menores que os observados para as outras comunidades fluoretadas, não diferiram significativamente destas.

Houve diferenças estatisticamente significativas entre as cidades em relação à excreção urinária de F de 24 horas ($KW=21,054$). Os níveis mais altos foram observados para Lima ($0,808 \pm 0,305$ mg), mas não diferiram significativamente dos valores encontrados para as outras comunidades fluoretadas. Os valores mais baixos foram encontrados para Pirajuí ($0,478 \pm 0,321$ mg), que diferiu significativamente das comunidades fluoretadas, exceto Brejo dos Santos.

Para as concentrações de F das unhas das mãos, observou-se uma diferença significativa entre as comunidades ($KW=51,179$). Os níveis mais altos foram encontrados para Lima ($6,09 \pm 2,21$ mg/Kg) e os mais baixos foram encontrados para Pirajuí ($1,93 \pm 0,82$ mg/Kg) e estes foram significativamente diferentes. Os níveis encontrados em Brejo dos Santos ($3,38 \pm 1,98$ mg/Kg) também foram significativamente mais altos que os observados para Pirajuí, mas não diferiram significativamente de Trujillo ($2,62 \pm 0,82$ mg/Kg) e Bauru ($2,11 \pm 0,90$).

Similarmente, houve diferença estatisticamente significativa nas concentrações de F das unhas dos pés entre as comunidades ($KW=73,908$). Como para as unhas das mãos, os valores mais altos foram os de Lima ($6,70 \pm 3,03$ mg/Kg), diferindo de todas as outras comunidades. Os níveis mais baixos foram observados em Bauru ($1,42 \pm 0,54$ mg/Kg), não diferindo significativamente de Pirajuí ($1,62 \pm 0,47$ mg/Kg). Os valores encontrados para Trujillo ($2,63 \pm 0,58$ mg/Kg) foram significativamente mais altos do que os observados para Pirajuí, mas não houve uma diferença significativa para Brejo dos Santos ($2,24 \pm 0,82$ mg/Kg).

Com relação à FUEF, a ANOVA detectou diferença significativa entre as comunidades ($F=3,52$). A única diferença estatisticamente significativa foi detectada entre Brejo dos Santos e Pirajuí, que apresentaram os valores mais alto e baixo, respectivamente.

Tabela 12 - Média ($\pm$ DP) da ingestão, excreção e concentração de F nas unhas de crianças de 4-6 anos recebendo diferentes fontes de F sistêmico

Ingestão e Excreção de F	Bauru Água Artificialmente F (0,6-0,8 mgF/L)	Brejo dos Santos Água Naturalmente F (0,6-0,9 mgF/L)	Lima Sal F (180-200 mgF/Kg)	Trujillo Leite F (250 mL of 1,0 mgF/L leite)	Pirajuí Não fluoretada
Sólidos, <i>mg</i>	0,327 $\pm$ 0,129 ^a	0,236 $\pm$ 0,132 ^{a,d}	0,751 $\pm$ 0,405 ^b	0,634 $\pm$ 0,138 ^b	0,095 $\pm$ 0,070 ^{c,d}
Água, <i>mg</i>	0,341 $\pm$ 0,132 ^a	0,660 $\pm$ 0,199 ^a	0,040 $\pm$ 0,048 ^b	0,125 $\pm$ 0,080 ^{c,d}	0,050 $\pm$ 0,020 ^{b,d}
Outros líquidos, <i>mg</i>	0,134 $\pm$ 0,081 ^a	0,153 $\pm$ 0,160 ^a	0,110 $\pm$ 0,044 ^a	0,394 $\pm$ 0,085 ^c	0,037 $\pm$ 0,043 ^b
Dieta total, <i>mg/Kg p.c.</i>	0,042 $\pm$ 0,012 ^b	0,058 $\pm$ 0,016 ^{a,b}	0,048 $\pm$ 0,023 ^{a,b}	0,059 $\pm$ 0,012 ^a	0,007 $\pm$ 0,004 ^c
Dentifrício, <i>mg/Kg p.c.</i>	0,023 $\pm$ 0,021 ^a	0,026 $\pm$ 0,024 ^a	0,040 $\pm$ 0,037 ^a	0,029 $\pm$ 0,049 ^a	0,020 $\pm$ 0,021 ^a
Dieta + Dentifrício, <i>mg/Kg p.c.</i>	0,065 $\pm$ 0,030 ^a	0,084 $\pm$ 0,029 ^a	0,088 $\pm$ 0,044 ^a	0,088 $\pm$ 0,052 ^a	0,027 $\pm$ 0,022 ^b
24-h excreção urinária, <i>mg</i>	0,693 $\pm$ 0,198 ^a	0,625 $\pm$ 0,297 ^{a,b}	0,808 $\pm$ 0,305 ^a	0,666 $\pm$ 0,194 ^a	0,478 $\pm$ 0,321 ^b
FUEF, %*	53,7 $\pm$ 16,6 ^{a,b}	37,8 $\pm$ 17,6 ^a	49,1 $\pm$ 18,8 ^{a,b}	42,7 $\pm$ 16,1 ^{a,b}	58,6 $\pm$ 24,6 ^b
Unhas das mãos, <i>mg/Kg</i>	2,11 $\pm$ 0,90 ^{b,c}	3,38 $\pm$ 1,98 ^b	6,09 $\pm$ 2,21 ^a	2,62 $\pm$ 0,82 ^{b,c}	1,93 $\pm$ 0,82 ^c
Unhas dos pés, <i>mg/Kg</i>	1,42 $\pm$ 0,54 ^d	2,24 $\pm$ 0,82 ^{b,c}	6,70 $\pm$ 3,03 ^a	2,63 $\pm$ 0,58 ^b	1,62 $\pm$ 0,47 ^{c,d}
<i>n</i>	25	21	26	25	24

* Excreção urinária fracional

Na tabela 13 observamos as correlações entre a ingestão de F através da dieta e excreção urinária de F, ingestão de F através do dentifrício e excreção urinária de F, ingestão total de F e excreção urinária de F, ingestão de F através da dieta e concentração de F nas unhas das mãos e dos pés, ingestão total de F e concentração de F nas unhas das mãos e dos pés, bem como entre as concentrações de F das unhas das mãos e das unhas dos pés. Houve uma correlação significativa entre a ingestão de F através da dieta e as concentrações de F das unhas das mãos ($r=0,233$, $p=0,011$) e unhas dos pés ($r=0,226$, $p=0,014$), como também entre a ingestão total de F e as concentrações de F das unhas das mãos ($r=0,367$, $p<0,0001$) e das unhas dos pés ($r=0,360$, $p<0,0001$). As correlações entre a excreção urinária de F e as concentrações de F nas unhas das mãos ($r=0,237$) e unhas dos pés ($r=0,221$) também foram significativas ($p<0,05$). Houve ainda uma forte correlação entre as concentrações de F presentes nas unhas das mãos e dos pés ($r=0,730$, $p<0,0001$).

Tabela 13: Correlação entre a ingestão de F (mg), excreção urinária de F (mg), concentração de F nas unhas das mãos (mg/Kg) e dos pés (mg/Kg) em crianças de 4-6 anos de idade, recebendo diferentes fontes de F sistêmico

Correlações	r	p
Ingestão F da dieta X Excreção urinária F de 24 h	0,3554	<0,0001
Ingestão F do dentifrício X Excreção urinária F 24 h	0,1094	0,2322
Ingestão total F X Excreção urinária F 24 h	0,2782	0,0020
F unhas das mãos X F unhas dos pés	0,7299	<0,0001
F unhas das mãos X Excreção urinária F 24 h	0,2365	0,0096
F unhas dos pés X Excreção urinária F 24 h	0,2211	0,0161
F unhas das mãos X Ingestão F da dieta	0,2327	0,0109
F unhas dos pés X Ingestão F da dieta	0,2257	0,0136
F unhas das mãos X Ingestão total F	0,3669	<0,0001
F unhas dos pés X Ingestão total F	0,3604	<0,0001

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A dose de ingestão de F, em crianças na faixa etária de risco para a fluorose dentária vem sendo a preocupação desde o momento em que foi observada uma tendência de aumento na prevalência de fluorose dentária (JACKSON et al.⁶⁰ 1999, LEVERETT⁶⁶, 1986 e PEREIRA et al.⁹⁹, 2000). Para saber o risco de fluorose dentária, previamente ao aparecimento das alterações, tem-se estudado o uso de biomarcadores de exposição ao F. Em nosso estudo, associamos os níveis de ingestão de F com dois biomarcadores de exposição ao F: a urina (excreção urinária de 24 horas) e as unhas (concentração de F nas unhas das mãos e dos pés) de crianças de 4-6 anos de idade que receberam diferentes fontes de F sistêmico.

Os métodos de fluoretação avaliados neste estudo foram: água artificialmente e naturalmente fluoretadas (Bauru e Brejo dos Santos, respectivamente), sal fluoretado (Lima) e leite fluoretado (Trujillo), tendo sido inclusa uma quinta comunidade como controle, por não apresentar nenhum método de fluoretação sistêmica.

As concentrações de F na água das torneiras das casas dos voluntários de todas as comunidades foram avaliadas a fim de se verificar a possível ocorrência de F natural na água nas regiões que não possuíam a água como método de fluoretação. As médias ($\pm$ DP) das concentrações de F na água analisada foram de $0,70 \pm 0,08$, $0,66 \pm 0,20$, $0,04 \pm 0,05$, $0,49 \pm 0,03$ e $0,08 \pm 0,01$ mg/L para Bauru, Brejo dos Santos, Lima, Trujillo e Pirajuí, respectivamente. A comunidade de Trujillo obteve uma concentração de F na água muito mais alta do que o esperado para uma comunidade onde tenha sido implementado um programa de fluoretação do leite. Este fato é de extrema relevância em termos de saúde pública e ressalta a importância de se avaliar a concentração de F na água antes de um método sistêmico de fluoretação ser implementado.

Outro ponto que chama a atenção quando analisamos os dados das concentrações de F na água, é que houve uma grande variação nos níveis de F na água de Brejo dos Santos. Seria esperado que os níveis de F na água desta comunidade fossem mais constantes, já que esta comunidade tem F naturalmente presente na água. Esta variação pode ser explicada pelo fato de que as pessoas desta comunidade usualmente estocam água de beber para consumi-la nos períodos que não têm água suficiente, devido ao clima seco da região.

Muitos estudos analisaram a ingestão total de F através da dieta, analisando-a como um todo (LIMA e CURY⁶⁹, 2001, PESSAN, SILVA e BUZALAF¹⁰⁰, 2003). Devido ao fato de o leite e a água serem as bebidas mais consumidas por crianças canadenses CLOVIS e HARGREAVES³⁰ (1988), analisaram a ingestão total de F através da dieta, separando-a em sólidos, outros líquidos e água mais leite. O mesmo fizeram ALMEIDA et al.² (2007), com crianças brasileiras. Esta abordagem parece ser mais adequada, pois permite avaliar as contribuições individuais de cada um dos componentes da dieta, o que torna mais fácil a detecção de fatores de risco para fluorose dentária em comunidades com diferentes formas de exposição sistêmica ao F. Assim, neste estudo, a dieta também foi avaliada em seus diferentes constituintes, categorizados em água, sólidos e outros líquidos. Em Trujillo, os dados de ingestão de F através do leite também foram incluídos, pela particularidade de ser esta uma comunidade que emprega como veículo de fluoretação o leite.

Quando avaliamos a ingestão de F pela água isoladamente, diferenças significantes entre as comunidades foram encontradas, sendo que a água teve maior contribuição em Bauru (42,60%) e Brejo dos Santos (62,90%). Estes resultados foram esperados, já que estas comunidades são otimamente fluoretadas, seja esta fluoretação natural ou artificial. Embora a concentração média de F na água das 2 comunidades tenha sido bastante parecida, a quantidade de ingestão de F pela água em Brejo dos Santos foi quase duas vezes maior que em Bauru, embora esta diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Isto poderia ser explicado pelo fato de que a temperatura média em Brejo dos Santos é maior do que em Bauru, fazendo com que haja um maior consumo de água. De fato, o volume médio de água

ingerida nos dois dias de coletas foi maior para Brejo dos Santos, sendo de 534, 813, 271, 299 e 548 mL para Bauru, Brejo dos Santos, Lima, Trujillo e Pirajuí, respectivamente. Os níveis mais baixos na ingestão de F através da água foram encontrados para Pirajuí e Lima, sendo que Trujillo apresentou valores intermediários entre as comunidades sem fluoretação da água e com fluoretação ótima. Assim, os níveis de ingestão de F através da água refletiram as concentrações de F presentes nesta água. Entretanto, há que se considerar também as diferenças no volume de água ingerido por dia entre as comunidades. Os volumes de água ingeridos nas comunidades do Peru foram muito mais baixos do que os ingeridos nas comunidades brasileiras, o que pode ser explicado devido ao clima mais quente das comunidades brasileiras.

Com relação à contribuição dos sólidos para a ingestão de F, as cidades que apresentaram os maiores valores foram Lima (84,30%), Trujillo (54,90%) e Pirajuí (44,80%). No caso de Pirajuí isto foi devido ao fato de a água não ser fluoretada, o que proporcionalmente aumentou a contribuição dos sólidos. Este resultado era esperado também para Lima, a qual tem como veículo de fluoretação sistêmica o sal de cozinha. A alta contribuição dos sólidos na ingestão total de F através da dieta em Trujillo não era esperada, mas pode ser explicada pela utilização de sal fluoretado por algumas crianças que fizeram parte do estudo, conforme pode ser visualizado no anexo 14, onde se observa que para duas crianças a concentração de F no sal foi alta. Em adição, é possível que o efeito de difusão (halo) também esteja sendo observado, já que crianças que residem em Trujillo e usam sal não fluoretado em casa podem estar consumindo alimentos manufaturados em regiões que utilizam sal fluoretado. Este possível fator de difusão também deve ser levado em conta quando um programa de fluoretação, como a fluoretação do leite, é implementado numa comunidade. Outro fator que deveria ser melhor controlado é a distribuição do sal fluoretado no Peru, para que problemas semelhantes sejam evitados. Um trabalho recentemente realizado (VILLENNA et al.¹²⁷, 2006) mostrou que o sal fluoretado no Peru tem uma distribuição maior nas regiões economicamente mais favorecidas, privando as áreas de baixa renda deste importante benefício para o controle da cárie dentária.

No estudo de ALMEIDA et al.² (2007), a contribuição da água mais leite, sólidos e outros líquidos para a ingestão de F pela dieta em crianças de 1-3

anos residentes em Bauru foi de 54, 23 e 23%, respectivamente. Os resultados encontrados para a água do presente estudo (42,6%) são semelhantes, especialmente se for considerado que no estudo de ALMEIDA et al.², (2007) os valores de ingestão de F a partir do leite são somados aos valores de ingestão a partir da água. A baixa contribuição dos sólidos (23%) no estudo de ALMEIDA et al.² (2007) quando comparado com o presente estudo (40,7%) pode ser devido à diferença na faixa etária dos voluntários envolvidos em ambos.

Considerando-se a contribuição dos outros líquidos, como esperado, os níveis encontrados para Trujillo foram significativamente mais altos quando comparados com as outras comunidades, o que reflete o consumo de leite fluoretado. Se a ingestão de F a partir do leite for subtraída da ingestão de F dos outros líquidos em Trujillo, os níveis encontrados ficam similares aos encontrados nas outras comunidades. Os níveis encontrados em Bauru, Brejo dos Santos e Lima não foram diferentes estatisticamente, mas foram significativamente mais altos do que a ingestão de Pirajuí. A ingestão de F mais elevada através dos outros líquidos nas comunidades fluoretadas era esperada e pode ser devida ao uso da água fluoretada no preparo de outras bebidas, tal como o leite em pó (BUZALAF et al.¹⁵, 2001, BUZALAF et al.¹⁶, 2004), sucos em pó e chás (BUZALAF et al.¹⁹, 2002).

Com os valores individualizados de ingestão de F a partir dos diferentes constituintes da dieta conhecidos, foi possível calcular a ingestão total de F a partir da dieta. Os valores mais altos foram encontrados para Trujillo ($0,059 \pm 0,012$ mg/ Kg peso/ dia) e Brejo dos Santos ($0,058 \pm 0,016$ mg/ Kg peso), que não diferiram significativamente entre si. Os valores altos observados em Trujillo devem ser devidos à sobreposição de métodos de fluoretação sistêmica, ou seja, água, sal e leite, o que não deveria ocorrer. Antes que um programa de fluoretação sistêmica seja implementado numa comunidade, todas as fontes de ingestão de F para crianças em idade de risco para fluorose devem ser precisamente conhecidas. Já os valores altos de ingestão de F a partir da dieta encontrados em Brejo dos Santos claramente refletem a ingestão de F através da água naturalmente fluoretada. Como foi descrito, o esta região tem um clima bastante quente e o consumo médio de água foi maior que o observado para as outras comunidades. No caso de Brejo dos

Santos deveria ser feita uma avaliação da prevalência de fluorose dentária e, se a mesma for elevada, poder-se-ia pensar em estratégias para a redução desta ingestão de F, como defluoretação da água, ou mesmo mistura da água naturalmente fluoretada com outras de mais baixa concentração de F.

Ainda com relação à ingestão de F a partir da dieta, em estudos prévios conduzidos em Bauru com crianças de 4-7 (PESSAN et al.¹⁰¹, 2005), 2-6 (LEVY et al.⁶⁸, 2004) e 1-3 (ALMEIDA et al.², 2007) anos de idade, a ingestão média de F através da dieta foi $0,021 \pm 0,013$, $0,029 \pm 0,029$ e $0,025 \pm 0,013$ mg/Kg peso/ dia, respectivamente. Estes valores são mais baixos do que aqueles encontrados nas comunidades fluoretadas do nosso estudo, incluindo Bauru. Um possível fator responsável por estas diferenças pode ser a faixa etária dos voluntários, especialmente para os estudos de LEVY et al.⁶⁸ (2004) e ALMEIDA et al.² (2007). Para a comunidade não fluoretada (Pirajuí), a estimativa de ingestão de F através da dieta foi muito próximo do reportado por LEVY et al.⁶⁸ (2004) ($0,004 \pm 0,003$ mg/Kg peso/dia), para crianças de crianças de 2-6 anos de idade residindo em outra comunidade brasileira não fluoretada (Itápolis).

Quando foram avaliados os resultados da estimativa de ingestão de F através do dentifrício, observamos uma ampla variação tanto entre os diferentes voluntários quanto para o mesmo voluntário nos dois dias de estimativa. Apesar da grande variação ($0,020 \pm 0,021$ a $0,040 \pm 0,037$ mg/ Kg peso/ dia), não houve diferenças significativas entre as comunidades. Os valores encontrados para Bauru ($0,023 \pm 0,021$ mg/ Kg peso/dia) foram ligeiramente mais baixos do que os estimados por PESSAN et al.¹⁰¹ (2005) em um estudo prévio com crianças de 4-7 anos de idade na mesma cidade ($0,033 \pm 0,035$ mg/ Kg peso/ dia). A quantidade de F colocada na escova de dente foi em torno de 0,1 g para a maior parte das crianças e isto pode ter contribuído para a baixa ingestão de F através do dentifrício. No entanto, a metodologia utilizada para fazer a estimativa de ingestão de F pelo dentifrício merece alguns comentários. Apesar de durante as estimativas se tentar reproduzir ao máximo as condições normais da escovação usual, é possível que algumas diferenças em relação à da escovação normal tenham ocorrido, devido à presença dos pesquisadores. Em adição, a concentração de F nas amostras de dentifrício não ingeridas foi bastante variáveis. Seria interessante que fosse feito um *screening* prévio das amostras, para que as mesmas

fossem ordenadas de acordo com concentração de crescente de F na análise definitiva, como tem sido relatado por COCHRAN et al.³¹ (2004). Isto é particularmente relevante para as amostras de baixa concentração de F.

Considerando-se que a ingestão diária de F não deve exceder 0,05-0,07 mg/Kg peso/dia (BURT¹², 1992), então a massa de F ingerida a partir do dentífrico não deveria exceder 0.022-0.036 mg/Kg peso/dia (COCHRAN et al.³¹, 2004). De acordo com isto, exceto para Lima, em todas as outras comunidades a ingestão de F pelo dentífrico parece estar dentro da faixa considerada ótima. A estimativa da ingestão total de F, ou seja, dieta mais dentífrico, foi considerada, visando a estabelecer comparações com a dose de ingestão total de F recomendada para crianças na idade de risco para a fluorose dentária. A estimativa de ingestão total de F para Bauru ($0,065 \pm 0,030$ mg/ Kg peso corporal/ dia) foi similar a estudo de PESSAN et al.¹⁰¹ (2005) realizado na mesma comunidade com crianças de 4-7 anos de idade, o qual encontrou uma ingestão de $0,068 \pm 0,047$ mg/ Kg peso/dia. Levando-se em consideração a dose limite de 0,07 mg/ Kg peso corporal/ dia (BURT¹², 1992), os voluntários das comunidades de Brejos dos Santos ($0,084 \pm 0,029$ mg/ Kg peso corporal/ dia), Lima ($0,088 \pm 0,044$ mg/ Kg peso corporal/ dia) e Trujillo ($0,088 \pm 0,052$ mg/ Kg peso corporal/ dia) apresentaram uma média superior à recomendada.

Considerando-se a excreção urinária de F de 24 horas, os níveis mais altos foram encontrados em Lima ($0,808 \pm 0,305$ mg), que não diferiram das outras comunidade fluoretadas. Os níveis encontrados para Pirajuí ($0,478 \pm 0,321$) foram significativamente mais baixos quando comparados com as comunidades fluoretadas, exceto Brejo dos Santos. Tem sido sugerido que uma excreção de 0,400-0,500 mg F/ dia em crianças de 3-6 anos de idade poderia ser considerada como um indicativo de ingestão ótima de F (BAEZ et al.⁵, 2000). Se este parâmetro for considerado, em média para todas as comunidades fluoretadas este limite foi excedido. A excreção urinária de 24 h encontrada para Bauru ($0,693 \pm 0,198$ mg) foi superior à relatada por PESSAN et al.¹⁰¹. (2005) para crianças de 4-7 anos de idade residentes na mesma comunidade ($0,492 \pm 0,243$ mg). Isto foi refletido na FUEF, sendo que os valores encontrados para Bauru ($53,7 \pm 16,6\%$) também foram superiores aos

reportados por PESSAN et al.¹⁰¹ (2005) ($40,4 \pm 31,2\%$). Quando se pensa na utilização da urina como biomarcador de exposição ao F, a sensibilidade deste marcador deve ser considerada, já que vários fatores influenciam a excreção urinária de F, como: pH urinário, taxa de filtração glomerular e composição da dieta (WHITFORD¹³³, 1996). Outra dificuldade em se utilizar a urina como biomarcador é a necessidade de colaboração dos voluntários e/ou responsáveis para a realização das coletas.

O uso das unhas como biomarcadores de exposição ao F tem sido sugerido por vários autores (CZARNOWISKI, KRECHNIAK³⁵, 1990; CZARNOWISKI et al.³⁶, 1996; SPATE et al.¹¹⁴ 1994; WHITFORD et al.¹³⁵, 1999; RODRIGUES, BASTOS, BUZALAF¹⁰⁸, 2004), por algumas vantagens (WHITFORD¹³⁴, 2005), principalmente pelo fato de a coleta das amostras ser simples e não invasiva.

No presente estudo, os níveis mais elevados nas concentrações de F nas unhas tanto das mãos ($6,09 \pm 2,21$ mg/Kg) como dos pés ($6,70 \pm 3,03$ mg/Kg) foram encontrados na comunidade que tem o sal como veículo de F (Lima). De fato, esta comunidade também apresentou os mais altos níveis de ingestão total e excreção de F dentre as comunidades estudadas. Mesmo assim, a concentração de F nas unhas foi mais alta que o esperado. Um fato importante é que as amostras de unhas das mãos e dos pés de Lima enviadas para análise encontravam-se bastante sujas, diferentemente das outras comunidades. As amostras apresentavam um resíduo marrom, parecido com areia, que pode não ter sido removido completamente, mesmo após a exaustiva limpeza das amostras previamente à análise. Devido a isto, inicialmente se pensou que estes altos valores fossem devidos à contaminação das amostras. Assim, procedeu-se a uma nova coleta das amostras de unhas de algumas crianças participantes da pesquisa. A responsável por esta nova coleta fez uma limpeza prévia das unhas das crianças previamente ao corte, de forma que as amostras chegaram para análise bem mais limpas que primeira vez. Mesmo assim, os resultados da nova análise (dados não mostrados) foram bastante parecidos com os dados iniciais, sugerindo que não houve contaminação na primeira análise e o F encontrado é intrínseco às unhas. LEVY et al.⁶⁸ (2004) analisaram a concentração de F em unhas de crianças de 2 a 6 anos de idade também em Bauru e numa outra comunidade não

fluoretada (Itápolis), as médias das concentrações de F ($\pm$ DP, unidade mg/Kg) obtidas para unhas das mãos foram 3,557 ($\pm$ 1,297) e 2,292 ($\pm$ 1,250) sendo para unhas dos pés 2,815 ($\pm$ 1,288) e 1,580 ($\pm$ 0,589), para Bauru e Itápolis, respectivamente. Os valores observados para Bauru no presente estudo foram inferiores aos relatados por LEVY et al.⁶⁸ (2004), embora tenham sido bastante similares aos observados para a comunidade naturalmente fluoretada (Brejo dos Santos). Também os valores observados para a comunidade não fluoretada (Pirajuí) são bastante similares aos relatados por LEVY et al.⁶⁸ (2004) para a comunidade não fluoretada.

Vale a pena destacar que para a comunidade com água naturalmente fluoretada (Brejo dos Santos), a concentração de F nas unhas das mãos foi significativamente maior quando comparada com a comunidade não fluoretada. Ainda na comunidade de Brejo dos Santos, a FUEF foi a mais baixa entre todas as comunidades, diferindo significativamente da comunidade não fluoretada. Estes dados sugerem que a biodisponibilidade do F ingerido pelos voluntários de Brejo dos Santos foi maior, ou seja a excreção seria menor e o F circularia mais no organismo, sendo incorporado às unhas. Isto poderia a princípio ser atribuído a uma possível maior biodisponibilidade do F presente na água naturalmente fluoretada, devido aos seus outros componentes. Entretanto, um trabalho recentemente concluído (WHITFORD et al.¹³⁶, 2006) observou que as características principais do metabolismo do F não são afetadas pelos compostos químicos comumente usados para fluoretar a água, e também não são afetadas pelo fato de a água ser natural ou artificialmente fluoretada. Resultados semelhantes tinham sido relatados por MAGUIRE et al.⁷¹ (2005). Assim, se é que a biodisponibilidade do F se encontra realmente aumentada na comunidade de Brejo dos Santos, outros fatores que interferem na excreção urinária do F, como pH urinário, composição da dieta e fluxo urinário (WHITFORD et al.¹³⁶, 1996) devem ser os responsáveis.

Quando a correlação entre a estimativa de ingestão de F (através da dieta, dentifrício, e dieta mais dentifrício) e excreção urinária de F é considerada, valores significativos foram encontrados para a correlação entre a ingestão de F pela dieta e excreção urinária de F e ingestão total de F (dieta mais dentifrício) e excreção urinária, mas não entre ingestão de F através do

dentifrício e excreção urinária de F. A falta de correlação entre a ingestão de F através do dentifrício e excreção urinária de F pode ser explicada pelo fato de a metodologia usada para a determinação da ingestão de F poder apresentar falhas devido à combinação de alguns fatores: diferença na absorção de NaF comparada com MFP (TRAUTNER e EINWAG¹²², 1989, EKSTRAND e EHRNEBO⁴³, 1980, FORSMAN e ERICSSON⁴⁹, 1973), redução da biodisponibilidade se o F é ingerido logo depois de comer (TRAUTNER e EINWAG¹²², 1989; TRAUTNER e SIEBERT¹²¹, 1986), sobre-estimativa da frequência de escovação por parte das mães, retenção do dentifrício nos tecidos bucais, placa e dentes.

Em relação à correlação entre a estimativa de ingestão de F (pela dieta, dentifrício, e dieta mais dentifrício) e a concentração de F presente nas unhas (mãos e pés), houve correlação entre a ingestão de F através da dieta e unhas das mãos e dos pés, como também entre ingestão total de F e unhas das mãos e dos pés. A correlação entre a excreção urinária de F e concentração de F nas unhas das mãos e dos pés também foi significativa. Em adição, houve uma forte correlação entre as concentrações de F nas unhas das mãos e dos pés.

Quando todos os biomarcadores de exposição ao F envolvidos no estudo (excreção urinária de F de 24 horas, unhas das mãos e dos pés) foram analisados em conjunto, as unhas, tanto das mãos quanto dos pés, parecem ser biomarcadores de ingestão total de F mais apropriados que a urina de 24h, já que o coeficiente de correlação detectado quando a ingestão de total e F foi relacionado com as unhas foi maior que o encontrado para o dentifrício. BUZALAF, PESSAN, ALVES¹⁴, 2006 relatam serem as unhas dos pés biomarcadores de exposição ao F mais apropriados quando comparados com as unhas das mãos. Isto se deve ao fato de as unhas dos pés serem menos susceptíveis à contaminação exógena. Em adição, o tamanho das unhas do dedo polegar dos pés fornece uma grande quantidade de amostra e tem uma velocidade de crescimento mais rápida.

No entanto, há que se destacar que o coeficiente de correlação encontrado entre a ingestão total de F e excreção urinária de F, bem como concentração de F nas unhas (mãos e pés) foi baixo, apesar de ter sido possível diferenciar a comunidade não fluoretada da maioria das comunidades fluoretadas, quando a urina foi usada como um biomarcador. Também foi

possível diferenciar entre a comunidade que teve a ingestão de F mais alta e comunidade não fluoretada, pelo uso das unhas dos pés como biomarcadores. De fato, tem sido sugerido que unhas são bons preditores de exposição ao F quando as ingestões são altas. SAMPAIO et al.¹⁰⁹ (2003), tentando validar as concentrações de F nas unhas das mãos como biomarcadores de exposição ao F, avaliou a severidade da fluorose dentária em crianças residindo em uma região no estado da Paraíba, Brasil, onde os níveis de F natural na água de beber são 0,1, 1,6, 2,3 mg F/ mL. Estas crianças tinham sido examinadas anteriormente para concentração de F nas unhas das mãos (WHITFORD et al.¹³⁵, 1999). A média da concentração de F nas unhas das mãos das crianças que apresentaram TF 0 foi significativamente diferente da média da concentração de F das crianças que apresentaram TF 5. Portanto, não foram observadas diferenças significativas nas crianças com TF 1, 2, 3 e 4. ALMEIDA et al.² (2007) também reportaram que uma pequena variação na dose de ingestão diária de F não pode ser detectada em unhas das mãos e sugerem que as unhas das mãos indicam uma ingestão de F de um longo período, sendo improvável que possam distinguir pequenas variações na ingestão diária de F. Assim, a sensibilidade das unhas como biomarcadores de exposição ao F necessita ser melhor estudada.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada neste estudo realizado com crianças de 4-6 anos de idade que recebem diferentes fontes de F sistêmico, pôde-se concluir que:

- ✓ a ingestão de F foi significativamente mais baixa na comunidade não fluoretada comparada com as comunidades fluoretadas. Estas não diferiram significativamente entre si;
- ✓ a excreção urinária de 24 h não foi significativamente diferente entre as comunidades fluoretadas. Para as comunidades fluoretadas, com exceção de Brejo dos Santos, a excreção urinária de 24 h foi significativamente mais alta quando comparada com a comunidade não fluoretada;
- ✓ a FUEF foi significativamente mais baixa na comunidade que tinha a água naturalmente fluoretada quando comparada com a comunidade não fluoretada. As outras comunidade não diferiram significativamente umas das outras;
- ✓ as concentrações de F, tanto nas unhas das mãos como nas unhas dos pés, foram significativamente mais altas na comunidade que usa o sal como veículo de F, quando comparadas com todas as outras comunidades. Os níveis mais baixos para a concentração de F nas unhas das mãos foram para a comunidade não fluoretada, diferindo significativamente da comunidade com água naturalmente fluoretada.

Já para as unhas dos pés os níveis mais baixos foram na comunidade com água artificialmente fluoretada, não diferindo significativamente da comunidade não fluoretada;

✓ as unhas parecem ter um potencial como preditores de ingestão total de F ligeiramente superior à excreção urinária de F de 24 h;

✓ a ingestão total de F a partir de todas as fontes de uma comunidade deve ser cuidadosamente avaliada, antes que um método de fluoretação sistêmica seja implementado.

ANEXOS

ANEXO 1 - Manual elaborado para orientação dos coordenadores de cada região

Etapas da execução do projeto da BORROW

- 1- Selecionar os **25** voluntários da faixa etária de **4-6** anos. Para a inclusão da criança na pesquisa ela deverá ter os seguintes requisitos:
 - ser residente no local onde será realizada a pesquisa por toda a vida
 - consumir apenas água de abastecimento público.
 - não apresentar dentes com abscessos ou comprometimento pulpar
 - não estar usando medicamentos e nem fraldas
 - não ter problemas gastro-intestinais, ósseos ou renais
 - ter o termo de consentimento devidamente assinado pelos pais ou responsável.
 - Não roer unhas.

Esta informações iremos obtê-las com aplicação de um questionário (ficha do voluntário) elaborado para este fim, que será enviado junto com os materiais da pesquisa já xerocado e deverá ser preenchido pelo pesquisador.

2 – No dia em que o questionário for aplicado a data para a coleta já deverá estar estabelecida e ser o mais breve possível, pois neste dia já poderemos orientar os pais para nos ajudar nas coletas.

3 – Serão oferecidas fichas numeradas para cada etapa da pesquisa. Nestas as crianças deverão ser cadastradas sempre na mesma ordem, pois cada uma receberá um número que deverá ser o mesmo para todas as fichas. Estas fichas são para anotar os dados referentes a cada tipo de amostra.

4 – Será determinado um dia para o início da pesquisa em cada localidade, que estará a cargo do pesquisador de cada região. Acreditamos que teremos dificuldades em realizar a pesquisa com todos os voluntários no mesmo dia, no entanto, cada pesquisador deverá determinar seu ritmo de trabalho.

5- Determinado o dia em que serão realizadas as coletas, lembre-se que, quinze dias antes os pais deverão ser comunicados para que as unhas das crianças, tanto das mãos quanto dos pés, não sejam mais cortadas nem esmaltadas.

- 6- Vocês receberão um manual de orientação do projeto que contém:
 - orientações para os pesquisadores de cada coleta
 - fichas numeradas para serem anotados todos os dados das coletas
 - orientações para a pessoa (mãe) responsável pelas coletas em casa – serão enviados xerox no total de participantes
 - ficha de identificação do voluntário juntamente com o questionário – serão enviados xerox no total de participantes.

7- Estamos enviando junto com o material da pesquisa um disquete com estas orientações e fichas.

Orientadora: Professora Dra. Marília mbuzalaf@fob.usp.br

Doutorando: Maria Heloísa helocorrea@yahoo.com.br Tel: (14) 97119863

* Comunicar aos pais para não cortar as unhas nem esmaltá-las

** Para pesar as crianças iremos utilizar uma balança portátil (aquelas de banheiro)

Para medir utilizaremos uma fita métrica fixada numa parede

Instruções para a coleta da dieta

- O método utilizado será o da dieta duplicada (Guha-Chowdhury et al. 1996).
- A coleta da dieta será realizada durante dois dias consecutivos (dias 1 e 2, ver figura) .
- Serão oferecidos aos voluntários 3 potes (1L) para cada dia, que deverão ser devidamente etiquetados com: nome do voluntário, tipo de amostra: *dieta sólida, água e outros líquidos (sucos, chás, refrigerantes, leite etc...)*, data da coleta e local da coleta (Bauru, Lima, Catolé do Rocha etc...).

Lembre-se: as dietas não deverão ser misturadas, ou seja, para cada dia teremos um pote para coleta dos alimentos sólidos, um para a água e um terceiro para outros líquidos, caso seja necessário, poderemos oferecer mais potes.

- Os responsáveis pelos voluntários receberão instruções sobre a coleta por escrito. No entanto, é muito importante que façamos as orientações de forma falada para que haja um maior esclarecimento e seja possível tirar dúvidas.
- Como as crianças estarão freqüentando a escola, não nos esqueçamos que teremos que coletar amostras dos alimentos e bebidas que elas consumirem na escola. Para isso, será melhor esta coleta ser feita por uma pessoa devidamente orientada na escola também.
- Este método é realizado por observação visual. A quantidade de alimento e bebidas consumidos deverão ser estimados usando medidas caseiras (colher de chá, colher de sopa, xícara de chá, mamadeira etc...).

Continua

- Nas refeições, os pais deverão ser orientados a servirem dois pratos separados (um que para o que a criança vai comer e o outro para a coleta). Quando a criança terminar, o equivalente ao que ela comeu deverá ser retirado do prato e colocado no pote. Caso a criança repita o prato ou algum alimento, o mesmo deve ser feito.
- Os pais deverão ser orientados para conservar os potes em geladeira (se houver), e entregar na escola no dia seguinte da coleta. Se a criança não frequenta a escola, o pesquisador deverá recolher os potes na casa da criança no dia seguinte à coleta, pela manhã.
- As amostras de dieta sólida deverão ser homogeneizadas pelo pesquisador. Colocar a amostra num liquidificador juntamente com um volume conhecido (25ml, 50ml, 75ml, 100ml) de água deionizada, a fim de obtermos uma mistura homogênea. Deverá ficar na consistência de mingau. Anotar o volume usado de água deionizada na ficha número Se não for possível homogeneizar no mesmo dia, as amostras deverão ser congeladas para posterior homogeneização.
- Zerar a balança com o pote vazio. Transferir a amostra homogeneizada do liquidificador para o pote, tendo o cuidado de não deixar nada no liquidificador. Pesas as amostras sólidas homogeneizadas em gramas e com 2 casas após a vírgula. Anotar o peso nas **fichas número 1a (coleta do 1º dia) e 1b (coleta do 2º dia)**.
- As amostras de água e outros líquidos deverão ser medidas pelo volume. Para isso, deveremos utilizar uma proveta graduada de vidro e anotar o volume (em mL) nas **fichas número 1a (coleta do 1º dia) e 1b (coleta do 2º dia)**. A proveta deverá ser lavada com água de torneira e por último com água deionizada, antes de se medir o volume da próxima amostra. Obs. Cada risco da proveta equivale a 5 mL.

- Armazenar uma alíquota de ± 15 mL nos tubos de ensaio apropriados e congelar imediatamente, para que elas possam ser enviadas para a análise de flúor. *Lembre-se:* não nos esqueçamos de etiquetar estes potes com: nome do voluntário, tipo de amostra e data da coleta. Assim, teremos três tubos de alíquotas de 15 mL, um para dieta sólida, outro para água e um terceiro para outros líquidos, para cada dia de coleta. No total, portanto, haverá 6 tubos para cada criança.

Ficha número 1a: Anotar o peso (g) da dieta sólida depois de homogeneizada e o volume (mL) da água e de outros líquidos do **primeiro dia** de coleta.

Criança	Peso dieta sólida (g) e volume de água usado na homogeinização		Volume água (mL)	Volume outros líquidos (mL)
	Peso (g) (mL)	água		
1)				
2)				
3)				
4)				
5)				
6)				
7)				
8)				
9)				
10)				
11)				
12)				
13)				
14)				
15)				
16)				
17)				
18)				
19)				
20)				
21)				
22)				
23)				
24)				
25)				

Continua

Ficha número 1b: Anotar o peso (g) da dieta sólida depois de homogeneizada e o volume (mL) da água e de outros líquidos do **segundo dia** de coleta.

Criança	Peso dieta sólida (g) e volume de água usado na homogeinização		Volume água (mL)	Volume outros líquidos (mL)
	Peso (g) (mL)	água		
1)				
2)				
3)				
4)				
5)				
6)				
7)				
8)				
9)				
10)				
11)				
12)				
13)				
14)				
15)				
16)				
17)				
18)				
19)				
20)				
21)				
22)				
23)				
24)				
25)				

Continua

Instruções para coleta da água da torneira (casa e escola)

- Deveremos coletar amostra da água da torneira, tanto da casa das crianças quanto da escola, durante os dois dias de coleta.
- Para esta coleta serão enviados tubos apropriados. Para cada criança serão fornecidos dois tubos para coletar a água nos dois dias de coleta (dias 1 e 2, ver figura) e o pesquisador coletará a água da torneira da escola também nos dois dias. Para coletar a água da torneira, deixar escorrer por 1 min, lavar o tubo com a água e então fazer a coleta de aproximadamente 15 mL.
- Identificar corretamente os tubos e armazená-los em freezer (congelar) até serem enviados para Bauru.

Instruções para coleta de urina

- Será realizada nos mesmos dias da coleta de dieta e estimativa de ingestão de flúor pelo dentifrício (dias 1 e 2 da figura).
- Serão fornecidos 4 potes de 1 L, 2 para cada dia, que deverão ser devidamente etiquetados com o nome da criança, data da coleta e cidade da coleta da amostra.
- Os pais deverão ser devidamente orientados através de instruções escritas e também de forma verbal.
- A criança deverá urinar nos pinicos fornecidos e então os pais deverão transferir imediatamente a urina para os potes de 1 L com a ajuda de um funil
- A primeira urina do dia deverá ser jogada fora. A coleta vai iniciar na segunda urina e o horário deverá ser anotado na etiqueta do pote (este horário inicial será utilizado como referência para a outra coleta). Neste pote a urina excretada durante todo o dia até o mesmo horário que foi anotado no pote do dia seguinte em que se iniciou a coleta, ou seja, **durante 24 horas**, deverá ser armazenada. Então começar a coleta no outro pote até o mesmo horário do dia seguinte (mais 24 horas). Por exemplo, se a criança fez a primeira urina do dia às 8 h e a segunda às 10 h, esta urina das 10 h deverá ser coletada e o horário das 10 h marcado no pote. O restante da urina feita neste dia, até às 10 h do dia seguinte será todo colocado neste mesmo pote. Toda a urina feita a partir das 10:01 h do segundo dia, até às 10 h do terceiro dia será colocada no segundo pote.

- Dois potes vazios deverão ficar na escola, sendo um para cada dia da coleta. Lembrar os pais de enviarem para a escola o funil e o pinico para escola para que a urina excretada lá também seja coletada. Os pinicos e os potes poderão ser lavados com água da torneira, com exceção de Bauru e Catolé do Rocha, onde a água é fluoretada. Neste caso, deve ser fornecido aos pais dos voluntários garrafas de refrigerante (2L) com água deionizada para que os mesmos possam lavar os pinicos e os funis nos dias de coleta.
- Depois de coletada, o volume da urina deverá ser medido (em mL) pelo pesquisador numa proveta graduada de vidro e o valor anotado na **ficha número 2**. *Lembre-se*: teremos um volume para o 1º dia e outro para o 2º dia. Obs. Cada risco da proveta corresponde a 5 mL.
- *Lembre-se*: serão quatro potes para as alíquotas de urina, dois para a urina do 1º dia (um para casa e o outro para a escola) e dois para o 2º dia (um para casa e o outro para a escola). Estas urinas (casa + escola) deverão ser unidas num único recipiente e homogeneizadas bastante (juntar toda a urina numa jarra plástica grande e então despejar para outra jarra 5 vezes), o volume então deve ser medido e anotado na ficha nº2 e então será separada a alíquota.
- As jarras poderão ser lavadas com água da torneira, com exceção de Bauru e Catolé do Rocha, onde a água é fluoretada. Neste caso, devem ser lavadas com água deionizada.
- Em tubos devidamente identificados, colocar 15 mL da urina para ser enviada para a análise. Teremos então dois tubos para cada criança.
- Manter os tubos com as alíquotas congelados até enviá-los para a análise.
- O restante das amostras que não for utilizado para as alíquotas pode ser desprezado num vaso sanitário.

Continua

Ficha número 2: Anotar o volume (mL) da urina (casa + escola), separando o 1º do 2º dia.

Criança	Volume 1º dia	Volume 2º dia
1)		
2)		
3)		
4)		
5)		
6)		
7)		
8)		
9)		
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		
20)		
21)		
22)		
23)		
24)		
25)		

Continua

Instruções para realização da estimativa de ingestão de flúor pelo dentifrício

- Será realizada conforme Guha-Chowdhury et al (1996) no primeiro e segundo dias do experimento, juntamente com a coleta da urina, dieta e unha (dias 1 e 2, ver figura). Se a criança escova os dentes em casa e também na escola teremos que fazer duas simulações em cada dia, uma na presença da pessoa que escova os dentes da criança em casa, e outra simulando a escovação que é feita na escola. No dia da coleta, a criança não deverá escovar os dentes em casa pela manhã, pois esta escovação será feita na escola, na presença dos pesquisadores. A escovação da escola, se for o caso, será feita na presença do pesquisador.
- Será realizado um questionário (ficha do voluntário) com os pais das crianças antes de iniciarmos o experimento.
- O questionário (será enviado junto com o material da pesquisa na quantidade necessária) nos fornecerá informações sobre os hábitos de escovação da criança necessárias para esta etapa, como frequência de escovação e tipo de dentifrício utilizado.
- Para realizar a simulação da escovação, os pais deverão ser avisados anteriormente que neste dia eles deverão levar para a escola a pasta e a escova de dente que a criança usa em casa.
- No dia da simulação quem coloca a pasta na escova da criança em casa deverá comparecer à escola e levar a pasta de dentes que a criança usa em casa e os pesquisadores devem armazenar em um pote devidamente rotulado com o nome da criança uma quantidade pequena de pasta (em torno de 2 g, ou seja, equivalente a encher 2 vezes a escova no sentido longitudinal). Se for necessário fazer a simulação na

Continua

escola, quem auxilia a criança na escovação deverá participar desta fase do experimento. Se a criança escova os dentes sozinha, a estimativa deve ser feita com ela própria colocando a pasta na escova.

Lembre-se: o importante é que a escovação seja feita exatamente como é feita rotineiramente.

- O pote (500 mL) que utilizaremos nesta etapa deverá ser pesado (em gramas, com 2 casas decimais) antes de iniciarmos a simulação e seu peso deverá ser anotado na **ficha número 3ª - primeiro dia ou na ficha 3b para o segundo dia** (pesar sem a tampa e já com a etiqueta).
- Antes de pesar a escova esta deverá ser lavada com água deionizada. Colocar cerca de 30mL de água deionizada num copinho plástico e limpar a escova, fazendo movimentos circulares. Remover o excesso de água deionizada da escova.
- Em seguida, pesar na balança eletrônica. Pesar em gramas com 2 casas decimais. Não esquecer de anotar este valor na **ficha número 3a para o primeiro dia e a ficha 3b para o segundo dia**.
- Colocar o dentifrício na escova (dentifrício que a mãe levou, ou seja, a pasta que a criança usa em casa). *Lembre-se:* como é uma simulação tudo deverá transcorrer da maneira que a criança está acostumada, por exemplo, se em casa a mãe coloca a pasta na escova, nesta simulação a mãe deverá colocar a pasta. Se a própria criança coloca a pasta ela mesma que terá que colocar.
- Pesar agora a escova com a pasta (em gramas com duas casas decimais). Anotar o valor na **ficha número 3a para o primeiro dia e a ficha 3b para o segundo dia**.
- A criança iniciará a escovação.

- Toda a saliva que a criança expectorar deverá ser coletada no pote de 500g devidamente etiquetado com o nome da criança, data da coleta, tipo de amostra e cidade em que foi coletada a amostra. Se a criança enxaguar a boca este enxágüe deverá ser realizado com água deionizada e também expectorado no pote.
- A escova será lavada com 50 mL de água deionizada que será armazenado no mesmo pote que a criança expectorou a saliva.
- Para lavar a escova deveremos utilizar um copo plástico descartável com $\pm$ 30mL da água deionizada, assim iremos lavar a escova realizando movimentos circulares (veja figura abaixo). Despejar esta água no pote que a criança expectorou a pasta e com os 20mL restantes lavar o copo plástico e também despejar no pote. Lembre-se de dar algumas “batidas” com a escova o pote para que todo o excesso de água e pasta sejam removidos.

Despejar a água que a escova foi lavada no pote da criança, utilizar os 20 mL restantes para dar uma lavada no copo e despejar esta água no pote da criança. Lembre-se que os copos são descartáveis, então, cada criança deverá usar um e depois ser jogado fora

Continua

- Terminado o enxágüe, o pote deverá ser homogeneizado. Para isto, agitar manualmente o pote fechado por umas 10 vezes. Pesar (em g, 2 casas decimais) e anotar o valor na **ficha número 3ª para o primeiro dia e 3b para o segundo dia**.
- Coletar uma alíquota de 10 mL no tubo apropriado e congelar as amostras para serem enviadas para a análise.
- A **ficha 3c** só será utilizada se a criança tiver o hábito de realizar a escovação na escola. Caso contrário anule esta ficha.

Ficha número 3a: Anotar os pesos em gramas, com duas casas decimais do pote vazio (500g) sem a tampa, da escova, da escova com o dentífrico e do pote com toda a amostra sem a tampa, do primeiro dia

Crianças	Pote vazio	Escova	Escova + dentífrico	Pote com as amostras
1)				
2)				
3)				
4)				
5)				
6)				
7)				
8)				
9)				
10)				
11)				
12)				
13)				
14)				
15)				
16)				
17)				
18)				
19)				
20)				
21)				
22)				
23)				
24)				
25)				

Continua

Ficha número 3b: Anotar os pesos em gramas, com duas casas decimais do pote vazio (500g) sem a tampa, da escova, da escova com o dentifrício e do pote com toda a amostra sem a tampa, do segundo dia.

Crianças	Pote vazio	Escova	Escova + dentifrício	Pote com as amostras
1)				
2)				
3)				
4)				
5)				
6)				
7)				
8)				
9)				
10)				
11)				
12)				
13)				
14)				
15)				
16)				
17)				
18)				
19)				
20)				
21)				
22)				
23)				
24)				
25)				

Continua

Instruções para a coleta das unhas

- Realizaremos três coletas de unhas
- Coletaremos todas as unhas das mãos e apenas as unhas dos polegares dos pés.
- Serão oferecidos 2 potinhos de filme fotográfico para cada coleta. As unhas das mãos deverão todas ser colocadas no mesmo pote e as dos polegares dos pés, no outro pote.
- Os potes deverão ser devidamente identificados com: nome do voluntário, data da coleta, tipo de amostra (unha das mãos ou dos pés) e cidade em que foi coletada a amostra.
- A primeira coleta será realizada no dia em que iniciaremos o experimento (dia 1, ver figura), ou seja, no mesmo dia em que iremos coletar a primeira coleta de dieta, urina e estimativa de ingestão de dentifrício.
- Lembre-se: é necessário comunicar aos pais para deixarem as unhas crescerem 15 dias antes da coleta e também não esmaltá-las. Este comunicado poderá ser feito da maneira mais conveniente para cada região. Ou seja, por telefone, por escrito, sendo enviado pela professora da escola, etc...
- A segunda coleta será realizada 75 dias após a primeira coleta. Não deveremos nos esquecer do comunicado aos pais 15 dias antes da coleta para que as unhas não sejam cortadas nem esmaltadas. Neste dia já deveremos comunicar para que os pais não cortem nem esmaltem as unhas pois...

Continua

- ... a terceira e última coleta será realizada 15 dias após a segunda coleta.
- Serão apenas três dias de coleta de unhas, no entanto, será mais conveniente que estas coletas sejam feitas pelo pesquisador, para minimizarmos o risco de perder amostras.
- Para cortar as unhas, os pesquisadores deverão forrar a mesa de trabalho com um pano preto, a fim de não perder as amostras. Os cortes poderão ser feitos com tesoura ou trim. É importante cortar a maior extensão possível.
- Como não faremos as coletas das unhas com todas as crianças no mesmo dia, a **ficha número 4** nos orientará em relação às datas das coletas de cada criança.
- As amostras devem ser armazenadas à temperatura ambiente, até o seu envio para Bauru.

Continua

Ficha número 4: Anotar as datas das coletas de unha.

Criança	Data da 1ª coleta	Data da 2ª coleta (75d)	Data da 3ª coleta (90d)
1)			
2)			
3)			
4)			
5)			
6)			
7)			
8)			
9)			
10)			
11)			
12)			
13)			
14)			
15)			
16)			
17)			
18)			
19)			
20)			
21)			
22)			
23)			
24)			
25)			

Continua

Ficha número 5: Anotar o peso (Kg) e altura (m) de cada criança.

Criança	Peso	Altura
1)		
2)		
3)		
4)		
5)		
6)		
7)		
8)		
9)		
10)		
11)		
12)		
13)		
14)		
15)		
16)		
17)		
18)		
19)		
20)		
21)		
22)		
23)		
24)		
25)		

Continua

FICHA DO VOLUNTÁRIO

Nome: _____

Data de nascimento: ____/____/____

Idade: ____ anos ____ meses

Sexo: () F () M

Peso: ____ Kg

Altura: ____ m ____ cm

Pai: _____

Mãe: _____

Endereço: _____ nº: _____

Bairro: _____ CEP: _____

Telefone: _____ Telefone para recado: _____

1- Há quanto tempo mora nesta cidade?

2- E neste endereço?

3- Está usando algum medicamento? () Sim () Não

Qual? _____

4- Tem algum problema gastro-intestinal? () Sim () Não

5- Tem algum problema ósseo? () Sim () Não

6- Tem algum problema renal? () Sim () Não

7- Já foi ao dentista? () Sim () Não

8- Já fez aplicação de flúor profissional? () Sim () Não

Que tipo? _____

9- Faz bochecho com flúor? () Sim () Não

Onde? () só em casa () só na escola () ambos

Continua

10- Tem escova de dente? () Sim () Não

Qual a marca e tipo? _____

11- Tem pasta de dente? () Sim () Não

Qual a marca? _____

12- A criança escovou os dentes hoje? () Sim () Não

13- A criança escovou os dentes ontem? () Sim () Não

14- Quantas vezes a criança escova os dentes por dia? _____

Em que momentos? _____

15- Com que idade começou a escovar os dentes? _____

16- Quem realiza a escovação da criança? _____

17- Quanto de pasta é colocado na escova?

18- Quem coloca a pasta na escova? _____

19- A criança tem o hábito de engolir a pasta em outros momentos além da escovação?

☐ Sim ☐ Não

20- Que tipo de água bebe?

☐ água mineral ☐ água da torneira

☐ água de poço ☐ mais de um tipo

21- A criança foi amamentada? () Sim () Não

Até que idade? _____

22- Costuma tomar qual tipo de leite?

☐ leite de vaca	☐ leite em pó
☐ leite de soja	☐ mais de um tipo

23- Costuma consumir bebidas industrializadas, como refrigerantes, sucos, chás, leites achocolatados, iogurte líquido? () Sim () Não
Qual? _____ Com que frequência? _____

24- Costuma comer cereais tipo Neston, Mucilon? () Sim () Não
Quando? _____ Quanto? _____

25- A renda familiar equivale a aproximadamente:

- () 1 salário mínimo
- () 2 salários mínimos
- () 3 salários mínimos
- () 4 salários mínimos
- () 5 ou mais salários mínimos

26- Quem contribui para esta renda?

- () só o pai
- () só a mãe
- () ambos
- () outros. Especificar _____

27- Quantas pessoas vivem desta renda? _____

28- Marque um "x" nos itens que você possui e anote a respectiva quantidade:

() automóvel	() máquina de lavar roupa
() TV a cores	() vídeo cassete
() banheiro	() aspirador
() em pregada mensalista	() geladeira
() rádio	

29- Qual a escolaridade do pai

- ☐ analfabeto/ primário incompleto
- ☐ primário completo/ 1º grau incompleto
- ☐ 1º grau completo/ 2º grau incompleto
- ☐ 2º grau completo/ superior incompleto
- ☐ superior completo

30- Qual a escolaridade da mãe?

- ☐ analfabeto/ primário incompleto
- ☐ primário completo/ 1º grau incompleto
- ☐ 1º grau completo/ 2º grau incompleto
- ☐ 2º grau completo/ superior incompleto
- ☐ superior completo

31- A criança rói unhas?

- ☐ sim ☐ não

Data:_____

Assinatura do responsável:_____

ANEXO 2 - Curva de calibração

6/9/2005

Curva de Calibração p/ Análise de Flúor na Água - BAURU

Tisab II

ppm F	vol. mL	µg F	Log F	mV	Log F. Calc.	µg F calc.	% variação
0,200	1	0,2	-0,698970	66,1	-0,6940405	0,202	-1,14
0,400	1	0,4	-0,397940	50,2	-0,4085813	0,390	2,42
0,800	1	0,8	-0,096910	32,9	-0,0970895	0,800	0,04
1,600	1	1,6	0,204120	15,3	0,2179929	1,652	-3,25
3,200	1	3,2	0,505150	-0,3	0,4971684	3,142	1,82

intercepção 0,4926801

inclinação -0,0179534

Rquad. 0,999566

	mV	Log F. Calc.	µg F calc.	µg F esp.	ppm F	%
Blanck1	113,2	-1,5396463	0,029	0	0,03	
Teste	15,9	0,2072208	1,611	1,60	1,61	-0,72

Amostra	mV	Log F. Calc.	µg F calc. (ppm)	média	repetibilidade %
1	36,7	-0,1662102	0,68	0,68	99,6
1	36,6	-0,1644148	0,68		
2	35,9	-0,1518475	0,70	0,71	99,2
2	35,7	-0,1482568	0,71		
3	38,6	-0,2003217	0,63	0,63	100,0
3	38,6	-0,2003217	0,63		
4	38	-0,1895496	0,65	0,65	99,6
4	37,9	-0,1877543	0,65		
5	35,7	-0,1482568	0,71	0,71	99,2
5	35,5	-0,1446661	0,72		
6	36	-0,1536428	0,70	0,71	98,8
6	35,7	-0,1482568	0,71		
7	35,2	-0,1392801	0,73	0,73	100,0
7	35,2	-0,1392801	0,73		
8	34,9	-0,1338940	0,73	0,74	100,4
8	34,8	-0,1320987	0,74		
9	34,6	-0,1285080	0,74	0,75	98,4
9	34,2	-0,1213267	0,76		
10	33,9	-0,1159406	0,77	0,77	100,0
10	33,9	-0,1159406	0,77		
11	35,2	-0,1392801	0,73	0,73	98,4
11	34,8	-0,1320987	0,74		
12	35,2	-0,1392801	0,73	0,73	99,6
12	35,1	-0,1374847	0,73		
		Médias		0,71	99,42

ANEXO 3 - Concentração de F na água de abastecimento público (mg/L) coletada nas residências dos voluntários durante os dois dias de coletas

Voluntários	Bauru			Brejo dos Santos			Lima			Trujillo			Pirajuí		
	Dia 1	Dia 2	Média	Dia 1	Dia 2	Média	Dia 1	Dia 2	Média	Dia 1	Dia 2	Média	Dia 1	Dia 2	Média
1	0,71	0,56	0,64	0,81	1,28	1,04	0,09	0,04	0,06	0,41	0,53	0,47	0,07	0,08	0,07
2	0,68	0,41	0,55	0,51	0,75	0,63	0,01	0,00	0,01	0,45	0,52	0,48	0,07	0,10	0,09
3	0,62	0,64	0,63	0,62	1,01	0,81	0,02	0,00	0,01	0,47	0,54	0,50	0,06	0,10	0,08
4	0,65	0,71	0,68	0,23	1,18	0,70	0,00	0,00	0,00	0,50	0,49	0,49	0,06	0,10	0,08
5	0,66	0,73	0,70	0,28	0,78	0,53	0,06	0,03	0,05	0,46	0,46	0,46	*	*	*
6	0,52	0,63	0,58	0,44	0,44	0,44	0,00	0,00	0,00	0,52	0,50	0,51	0,09	0,10	0,10
7	0,53	0,64	0,59	0,45	1,03	0,74	0,02	0,05	0,04	0,54	0,45	0,50	0,04	0,08	0,06
8	0,73	0,73	0,73	0,52	0,51	0,52	0,04	0,04	0,04	0,51	0,44	0,48	0,04	0,08	0,06
9	0,57	0,68	0,63	0,76	0,63	0,70	0,09	0,12	0,10	0,47	0,50	0,49	0,05	0,08	0,06
10	0,71	0,67	0,69	0,37	0,56	0,46	0,15	0,17	0,16	0,47	0,43	0,45	0,05	0,09	0,07
11	0,77	0,65	0,71	0,25	0,57	0,41	0,00	0,00	0,00	0,55	0,51	0,53	0,05	0,09	0,07
12	0,73	0,74	0,74	0,14	0,44	0,29	0,03	0,00	0,02	0,52	0,49	0,51	0,07	0,10	0,09
13	0,67	0,72	0,70	0,45	1,40	0,93	0,03	0,01	0,02	0,37	0,43	0,40	0,06	0,08	0,07
14	0,58	0,66	0,62	0,35	0,83	0,59	0,00	0,11	0,05	0,45	0,48	0,46	0,06	0,10	0,08
15	0,78	0,79	0,79	0,30	1,25	0,78	0,04	0,00	0,02	0,53	0,50	0,51	0,05	0,09	0,07
16	0,72	0,76	0,74	0,45	0,86	0,65	0,00	0,00	0,00	0,47	0,44	0,46	0,06	0,09	0,08
17	0,79	0,78	0,79	0,66	0,76	0,71	0,00	0,00	0,00	0,48	0,44	0,46	0,06	0,09	0,08
18	0,76	0,74	0,75	0,55	0,65	0,60	0,00	0,00	0,00	0,55	0,52	0,54	0,04	0,09	0,07
19	0,78	0,77	0,78	0,58	0,43	0,51	0,05	0,04	0,05	0,52	0,54	0,53	0,06	0,10	0,08
20	0,75	0,76	0,76	0,80	0,66	0,74	0,08	0,08	0,08	0,51	0,47	0,49	0,05	0,09	0,07
21	0,7	0,75	0,73	1,40	0,44	1,07	0,00	0,02	0,01	0,54	0,50	0,52	0,07	0,12	0,10
22	0,75	0,7	0,73	*	*	*	0,30	0,07	0,19	0,53	0,54	0,54	0,06	0,09	0,08
23	0,75	0,75	0,75	*	*	*	0,06	0,03	0,04	0,48	0,48	0,48	0,04	0,08	0,06
24	0,77	0,77	0,77	*	*	*	0,03	0,01	0,02	0,51	0,52	0,51	0,06	0,09	0,08
25	0,72	0,63	0,68	*	*	*	0,00	0,01	0,01	0,55	0,52	0,53	0,06	0,09	0,08
26	*	*	*	*	*	*	0,07	0,06	0,07	*	*	*	*	*	*

* Nestas comunidades o número de voluntários é menor

ANEXO 4 - Estimativa da ingestão de F (mg) das crianças de Bauru (água artificialmente fluoretada), Brasil, através da água, sólidos e outros líquidos, nos dois dias de coletas

Voluntários	Água		Sólidos		Outros líquidos	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	0,37	0,37	0,214	0,119	0,114	0,052
2	0,66	0,46	0,102	0,450	0,003	0,052
3	0,60	0,34	0,365	0,152	0,003	0,294
4	0,29	0,17	0,519	0,330	0,032	0,133
5	0,37	0,13	0,304	0,112	0,078	0,002
6	0,33	0,43	0,182	0,266	0,055	0,052
7	0,44	0,35	0,162	0,198	0,219	0,209
8	0,41	0,40	0,372	0,360	0,106	0,160
9	0,38	0,16	0,156	0,261	0,229	0,300
10	0,50	0,31	0,439	0,345	0,176	0,279
11	0,43	0,46	0,384	0,290	0,139	0,106
12	0,29	0,23	0,386	0,185	0,264	0,267
13	0,17	0,11	0,128	0,207	0,024	0,014
14	0,31	0,06	0,378	0,451	0,203	0,129
15	0,20	0,32	0,284	0,367	0,245	0,313
16	0,21	0,20	0,992	0,067	0,114	0,137
17	0,23	0,32	0,368	0,401	0,130	0,244
18	0,22	0,26	0,392	0,177	0,060	0,353
19	0,66	0,68	0,386	0,308	0,037	0,053
20	0,20	0,10	0,647	0,266	0,052	0,049
21	0,33	0,35	0,375	0,185	0,165	0,103
22	0,37	0,37	0,350	0,349	0,017	0,257
23	0,36	0,23	0,308	0,315	0,028	0,326
24	0,64	0,45	0,251	0,240	0,004	0,009
25	0,43	0,40	0,676	0,833	0,170	0,156

ANEXO 5 - Estimativa da ingestão de F (mg) das crianças de Brejo dos Santos (água naturalmente fluoretada), Brasil, através da água, sólidos e outros líquidos, nos dois dias de coletas

Voluntários	Água		Sólidos		Outros líquidos	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	0,81	1,28	0,201	0,334	0,043	0,106
2	0,51	0,75	0,214	0,199	0,289	0,121
3	0,62	1,01	0,292	0,300	0,111	0,106
4	0,23	1,18	0,406	0,321	0,096	0,174
5	0,28	0,78	0,530	0,417	0,127	0,140
6	0,44	0,44	0,371	0,287	0,007	0,030
7	0,45	1,03	0,178	0,023	0,038	0,043
8	0,52	0,51	0,088	0,096	0,042	0,054
9	0,76	0,63	0,316	0,213	0,355	0,096
10	0,37	0,56	0,036	0,063	0,068	0,039
11	0,25	0,57	0,218	0,153	0,004	0,000
12	0,14	0,44	*	0,179	0,000	0,003
13	0,45	1,40	*	0,511	0,062	0,209
14	0,35	0,83	*	0,371	0,528	0,245
15	0,30	1,25	0,300	0,419	0,519	0,262
16	0,45	0,86	0,249	0,271	0,917	0,247
17	0,66	0,76	0,024	0,305	0,499	0,307
18	0,53	0,65	0,017	0,125	0,015	0,080
19	0,58	0,43	0,056	0,095	0,047	0,051
20	0,82	0,66	0,341	0,124	0,090	0,178
21	1,40	0,74	0,000	0,224	0,018	0,049

* Amostras perdidas

ANEXO 6 - Estimativa da ingestão de F (mg) das crianças de Lima (sal fluoretado), Peru, através da água, sólidos e outros líquidos, nos dois dias de coletas

Voluntários	Água		Sólidos		Outros líquidos	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	0,09	0,04	0,410	0,741	0,052	0,040
2	0,01	0,00	0,323	0,669	0,043	0,048
3	0,02	0,00	0,686	0,184	0,111	0,116
4	0,00	0,00	0,618	0,647	0,089	0,033
5	0,06	0,03	0,130	0,551	0,100	0,104
6	0,00	0,00	0,691	*	0,069	0,065
7	0,02	0,05	1,481	0,927	0,149	0,083
8	0,04	0,04	1,341	1,461	0,152	0,168
9	0,09	0,12	0,864	0,873	0,019	0,079
10	0,15	0,17	1,439	1,081	0,148	0,045
11	0,00	0,00	2,158	1,038	0,102	0,100
12	0,03	0,00	0,744	1,412	0,077	0,163
13	0,03	0,01	0,297	0,896	*	0,080
14	0,00	0,11	0,470	0,470	0,073	0,029
15	0,04	0,00	0,424	0,870	0,091	0,160
16	0,00	0,00	0,516	1,549	0,240	0,101
17	0,00	0,00	0,171	*	0,105	0,237
18	0,00	0,00	0,826	0,571	0,091	0,136
19	0,05	0,04	0,567	0,398	0,093	0,091
20	0,08	0,08	0,678	0,686	0,122	0,082
21	0,00	0,02	1,734	1,709	0,075	0,057
22	0,30	0,07	0,845	0,308	0,114	0,208
23	0,06	0,03	0,578	0,513	0,179	0,080
24	0,03	0,01	0,061	0,573	0,124	0,069
25	0,00	0,01	0,451	0,233	0,076	0,095
26	0,07	0,06	0,941	0,409	0,076	0,048

* Amostras perdidas

ANEXO 7 - Estimativa da ingestão de F (mg) das crianças de Trujillo (leite fluoretado), Peru, através da água, sólidos, outros líquidos e leite, nos dois dias de coletas

Voluntários	Água		Sólidos		Outros líquidos		Leite	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	0,05	0,00	0,747	0,343	0,090	0,165	0,254	0,254
2	0,31	0,23	0,544	0,379	0,107	0,306	0,254	0,254
3	0,12	0,08	1,029	0,763	0,168	0,113	0,254	0,254
4	0,14	0,10	0,795	0,512	0,111	0,085	0,254	0,254
5	0,08	0,07	0,372	0,496	0,219	0,218	0,254	0,254
6	0,09	0,14	0,721	0,751	0,241	0,177	0,254	0,254
7	0,11	0,13	0,726	0,636	0,152	0,149	0,254	0,254
8	0,18	0,15	0,786	0,516	0,356	0,137	0,254	0,254
9	0,13	0,00	0,262	1,004	0,031	0,043	0,254	0,254
10	0,07	0,00	0,216	1,097	0,050	0,049	0,254	0,254
11	0,14	0,06	0,813	0,962	0,149	0,089	0,254	0,254
12	0,08	0,15	0,885	0,470	0,479	0,100	0,254	0,254
13	0,00	0,00	0,524	0,345	0,047	0,075	0,254	0,254
14	0,17	0,05	0,620	0,596	0,345	0,354	0,254	0,254
15	0,29	0,29	0,641	0,571	0,119	0,116	0,254	0,254
16	0,16	0,18	0,895	0,341	0,083	0,098	0,254	0,254
17	0,21	0,14	0,828	0,356	0,033	0,089	0,254	0,254
18	0,50	0,00	0,905	0,637	0,304	0,072	0,254	0,254
19	0,23	0,19	0,210	0,560	0,312	0,228	0,254	0,254
20	0,11	0,00	0,788	0,281	0,180	0,021	0,254	0,254
21	0,14	0,24	0,657	0,778	0,095	0,023	0,254	0,254
22	0,10	0,14	0,741	0,436	0,067	0,107	0,254	0,254
23	0,25	0,15	0,889	0,479	0,065	0,053	0,254	0,254
24	0,05	0,07	0,749	0,431	0,100	0,032	0,254	0,254
25	0,00	0,00	0,883	0,951	0,098	0,092	0,254	0,254

ANEXO 8 - Estimativa da ingestão de F (mg) das crianças de Pirajuí (não-fluoretada), Brasil, através da água, sólidos e outros líquidos, nos dois dias de coletas

Voluntários	Água		Sólidos		Outros líquidos	
	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2	Dia 1	Dia 2
1	0,02	0,02	0,063	0,048	0,062	0,026
2	0,08	0,11	0,058	0,048	0,022	0,008
3	0,06	0,07	0,108	0,094	0,008	0,012
4	0,03	0,04	0,200	0,129	0,006	0,007
5	0,09	0,07	0,112	0,160	0,032	0,078
6	0,04	0,05	0,026	0,030	0,012	0,011
7	0,07	0,07	0,163	0,035	0,018	0,009
8	0,04	0,03	0,040	0,014	0,016	0,009
9	0,04	0,02	0,032	0,049	0,024	0,066
10	0,08	0,06	0,032	0,010	0,031	0,022
11	0,06	0,06	0,037	0,021	0,022	0,017
12	0,04	0,04	0,069	0,030	0,018	0,022
13	0,05	0,08	0,042	0,029	0,062	0,006
14	0,07	0,03	0,066	0,011	0,036	0,033
15	0,05	0,05	0,031	0,063	0,019	0,021
16	0,04	0,04	0,040	0,063	0,019	0,019
17	0,04	0,02	0,062	0,028	0,028	0,016
18	0,04	0,05	0,008	0,010	0,073	0,049
19	0,05	0,04	0,106	0,131	0,079	0,080
20	0,02	0,02	0,114	0,058	0,058	0,012
21	0,03	0,04	0,172	0,047	0,020	0,013
22	0,09	0,06	0,049	0,041	0,077	0,017
23	0,08	0,06	0,079	0,122	*	0,038
24	0,03	0,03	0,049	0,052	0,027	0,012

*Amostra perdida

ANEXO 9 - Média da estimativa de ingestão de F (mg) das crianças de Bauru (água artificialmente fluoretada), Brasil, através da água, sólidos e outros líquidos e a contribuição dos diferentes constituintes da dieta para a ingestão total de F através da dieta

Voluntários	Água	Sólidos	Outros líquidos
1	0,37	0,167	0,083
2	0,56	0,276	0,028
3	0,47	0,259	0,149
4	0,23	0,425	0,083
5	0,25	0,208	0,040
6	0,38	0,224	0,054
7	0,40	0,180	0,214
8	0,41	0,366	0,133
9	0,27	0,209	0,265
10	0,41	0,392	0,228
11	0,45	0,337	0,123
12	0,26	0,286	0,266
13	0,14	0,168	0,019
14	0,19	0,415	0,166
15	0,26	0,326	0,279
16	0,21	0,530	0,126
17	0,28	0,385	0,187
18	0,24	0,285	0,207
19	0,67	0,347	0,045
20	0,15	0,457	0,051
21	0,34	0,280	0,134
22	0,37	0,350	0,137
23	0,30	0,312	0,177
24	0,55	0,246	0,007
25	0,42	0,755	0,163

* As médias referem-se às coletas dos dois dias consecutivos

ANEXO 10 - Média da estimativa de ingestão de F (mg) das crianças de Brejo dos Santos (água naturalmente fluoretada), Brasil, através da água, sólidos e outros líquidos e a contribuição dos diferentes constituintes da dieta para a ingestão total de F através da dieta

Voluntários	Água	Sólidos	Outros líquidos
1	1,04	0,267	0,074
2	0,63	0,206	0,205
3	0,81	0,296	0,108
4	0,70	0,363	0,135
5	0,53	0,473	0,133
6	0,44	0,329	0,018
7	0,74	0,101	0,040
8	0,52	0,092	0,048
9	0,70	0,265	0,226
10	0,46	0,049	0,054
11	0,41	0,185	0,002
12	0,29	0,179	0,002
13	0,93	0,511	0,135
14	0,59	0,371	0,387
15	0,78	0,360	0,391
16	0,65	0,260	0,582
17	0,71	0,164	0,403
18	0,59	0,071	0,047
19	0,51	0,076	0,049
20	0,74	0,233	0,134
21	1,07	0,112	0,034

*As médias referem-se às coletas dos dois dias consecutivos

ANEXO 11 - Média da estimativa de ingestão de F (mg) das crianças de Lima (sal fluoretado), Peru, através da água, sólidos e outros líquidos e a contribuição dos diferentes constituintes da dieta para a ingestão total de F através da dieta

Voluntários	Água	Sólidos	Outros líquidos
1	0,06	0,576	0,046
2	0,01	0,496	0,046
3	0,01	0,435	0,114
4	0,00	0,633	0,061
5	0,05	0,341	0,102
6	0,00	0,691	0,067
7	0,04	1,204	0,116
8	0,04	1,401	0,160
9	0,10	0,869	0,049
10	0,16	1,260	0,097
11	0,00	1,598	0,101
12	0,02	1,078	0,120
13	0,02	0,597	0,080
14	0,05	0,465	0,051
15	0,02	0,647	0,126
16	0,00	1,033	0,171
17	0,00	0,171	0,171
18	0,00	0,699	0,114
19	0,05	0,483	0,092
20	0,08	0,682	0,102
21	0,01	1,722	0,066
22	0,19	0,577	0,161
23	0,04	0,546	0,130
24	0,02	0,317	0,097
25	0,01	0,342	0,086
26	0,07	0,675	0,062

*As médias referem-se às coletas dos dois dias consecutivos

ANEXO 12 - Média da estimativa de ingestão de F (mg) das crianças de Trujillo (leite fluoretado), Peru, através da água, sólidos, outros líquidos e leite e a contribuição dos diferentes constituintes da dieta para a ingestão total de F através da dieta

Voluntários	Água	Sólidos	Outros líquidos	Leite
1	0,03	0,545	0,127	0,254
2	0,27	0,462	0,207	0,254
3	0,10	0,896	0,140	0,254
4	0,12	0,654	0,098	0,254
5	0,07	0,434	0,218	0,254
6	0,12	0,736	0,209	0,254
7	0,12	0,681	0,150	0,254
8	0,17	0,651	0,246	0,254
9	0,06	0,633	0,037	0,254
10	0,04	0,657	0,050	0,254
11	0,10	0,888	0,119	0,254
12	0,11	0,678	0,290	0,254
13	0,00	0,435	0,061	0,254
14	0,11	0,608	0,349	0,254
15	0,29	0,606	0,117	0,254
16	0,17	0,618	0,090	0,254
17	0,18	0,592	0,061	0,254
18	0,25	0,771	0,188	0,254
19	0,21	0,385	0,270	0,254
20	0,05	0,535	0,100	0,254
21	0,19	0,718	0,059	0,254
22	0,12	0,589	0,087	0,254
23	0,20	0,684	0,059	0,254
24	0,06	0,590	0,066	0,254
25	0,00	0,917	0,095	0,254

* As médias referem-se às coletas dos dois dias consecutivos

ANEXO 13 - Média da estimativa de ingestão de F (mg) das crianças de Pirajuí (não fluoretada), Brasil, através da água, sólidos e outros líquidos e a contribuição dos diferentes constituintes da dieta para a ingestão total de F através da dieta

Voluntários	Água	Sólidos	Outros líquidos
1	0,02	0,056	0,044
2	0,10	0,053	0,015
3	0,06	0,101	0,010
4	0,04	0,165	0,006
5	0,08	0,136	0,055
6	0,04	0,028	0,011
7	0,07	0,099	0,013
8	0,04	0,027	0,013
9	0,03	0,041	0,045
10	0,07	0,021	0,026
11	0,06	0,029	0,019
12	0,04	0,050	0,020
13	0,07	0,036	0,034
14	0,05	0,039	0,034
15	0,05	0,047	0,020
16	0,04	0,052	0,019
17	0,03	0,045	0,022
18	0,05	0,009	0,061
19	0,04	0,119	0,080
20	0,02	0,086	0,035
21	0,03	0,110	0,017
22	0,08	0,045	0,047
23	0,07	0,101	0,038
24	0,03	0,051	0,020

* As médias referem-se às coletas dos dois dias consecutivos

ANEXO 14 - Concentração de F no sal de cozinha (mg/Kg), nas duas comunidades do Peru

Voluntários	Lima, Peru	Trujillo, Peru
1	254,3	2,5
2	184,9	2,2
3	271,7	2,0
4	208,3	2,3
5	227,9	2,0
6	189,7	2,2
7	354,4	2,3
8	223,1	7,0
9	246,0	6,8
10	162,5	7,4
11	283,1	8,6
12	270,1	177,3
13	190,0	2,4
14	297,3	81,1
15	168,7	3,1
16	134,2	6,7
17	196,5	7,1
18	173,7	2,4
19	107,0	8,8
20	209,5	2,3
21	151,2	2,0
22	220,9	2,0
23	223,1	2,0
24	177,1	1,7
25	168,0	1,6
26	171,7	*

* Nesta comunidade o número de voluntários foi menor

ANEXO 15 - Estimativa da ingestão de F (mg) através do dentífrício, nos dois dias de coleta e médias de ambos os dias

Voluntários	Bauru			Brejo dos Santos			Lima			Trujillo			Pirajuí		
	Dia 1	Dia 2	Média	Dia 1	Dia 2	Média	Dia 1	Dia 2	Média	Dia 1	Dia 2	Média	Dia 1	Dia 2	Média
1	1,037	0,248	0,642	0,492	0,045	0,268	0,650	0,434	0,542	0,000	0,125	0,063	0,182	0,351	0,267
2	1,487	0,000	0,744	1,859	0,414	1,136	0,000	0,000	0,000	0,180	0,018	0,099	0,168	0,688	0,428
3	0,000	0,000	0,000	0,887	0,583	0,735	0,676	1,731	1,203	0,473	0,670	0,571	0,940	1,959	1,450
4	0,193	0,742	0,467	0,477	0,236	0,356	0,000	0,995	0,498	0,782	0,860	0,821	1,544	1,619	1,582
5	0,453	0,182	0,317	0,719	0,161	0,440	1,849	2,212	2,030	0,011	0,107	0,059	*	*	*
6	1,005	0,712	0,859	**	**	**	1,040	0,832	0,936	0,619	0,273	0,446	0,000	1,713	0,856
7	0,571	0,586	0,578	0,007	0,428	0,217	0,348	0,000	0,174	0,129	0,059	0,094	0,000	0,520	0,260
8	0,112	0,000	0,056	0,992	1,012	1,002	1,542	1,672	1,607	***	0,672	0,672	0,244	0,378	0,311
9	0,402	0,239	0,320	0,000	1,526	0,763	0,066	0,275	0,170	0,000	0,000	0,000	0,000	0,134	0,067
10	0,585	0,760	0,673	***	0,740	0,740	1,204	1,612	1,408	0,534	0,236	0,385	0,529	0,391	0,460
11	1,041	0,370	0,706	**	**	**	2,088	0,450	1,269	0,388	0,264	0,326	0,757	1,870	1,313
12	0,371	0,000	0,185	**	**	**	0,435	0,224	0,329	5,971	3,377	4,674	0,000	0,000	0,000
13	0,472	0,033	0,253	0,376	0,331	0,354	0,862	0,000	0,431	***	0,837	0,837	0,000	0,000	0,000
14	1,735	1,625	1,680	0,814	0,001	0,407	0,572	0,050	0,311	0,372	0,254	0,313	0,031	0,000	0,015
15	0,000	0,230	0,115	0,217	0,430	0,323	0,818	1,543	1,181	0,093	0,102	0,097	0,332	0,291	0,312
16	0,423	0,399	0,411	0,584	0,000	0,292	0,748	0,420	0,584	1,455	0,033	0,744	1,246	0,000	0,623
17	0,098	0,033	0,065	0,528	0,327	0,428	0,105	0,066	0,086	0,709	0,638	0,674	0,000	0,805	0,402
18	0,134	1,840	0,987	0,452	0,175	0,314	0,000	0,468	0,234	0,537	0,673	0,605	0,000	0,644	0,322
19	0,223	0,243	0,233	0,504	0,468	0,486	0,205	0,000	0,102	0,097	0,315	0,206	0,000	0,171	0,086
20	0,000	0,000	0,000	2,447	1,271	1,859	0,063	0,000	0,032	0,000	0,119	0,060	0,000	0,016	0,008
21	0,000	0,058	0,029	**	**	**	0,000	0,553	0,276	0,000	1,403	0,701	0,000	0,457	0,229
22	0,037	0,000	0,018	*	*	*	5,863	0,892	3,377	2,375	0,915	1,645	0,110	0,000	0,055
23	0,175	0,194	0,184	*	*	*	2,781	3,175	2,978	0,000	0,517	0,258	0,042	1,206	0,624
24	0,000	0,000	0,000	*	*	*	0,000	0,488	0,244	1,752	0,000	0,876	0,473	0,000	0,236
25	1,486	1,469	1,477	*	*	*	0,162	0,164	0,163	0,633	0,699	0,666	0,156	1,290	0,723
26	*	*	*	*	*	*	1,908	1,085	1,497	*	*	*	*	*	*

* Nestas comunidades o número de voluntários foi menor

** Estes voluntários não escovavam os dentes

*** Amostras perdidas

ANEXO 16 - Concentração de F especificado no rótulo e analisado

Voluntários	Bauru		Brejo dos Santos		Lima		Trujillo		Pirajuí	
	Água artificialmente F (0,6-0,8 mgF/L)		Água naturalmente F (0,6-0,9 mgF/L)		Sal F (180-200 mgF/Kg)		Leite F (250 mL de 1,0 mgF/L)		Não F	
	Rótulo	Analisado	Rótulo	Analisado	Rótulo	Analisado	Rótulo	Analisado	Rótulo	Analisado
1	1500,00	1683,80	1500,00	1456,50	1500,00	1157,30	1450,00	1330,20	1450,00	1566,70
2	1500,00	1539,40	1500,00	1559,70	1500,00	1177,60	1100,00	975,20	1450,00	***
3	1450,00	1534,10	1500,00	1678,50	1500,00	1431,40	1450,00	1288,40	1500,00	1601,50
4	1500,00	1643,80	1500,00	1571,70	1500,00	1518,20	1450,00	1584,50	1500,00	1601,50
5	1500,00	933,10	1500,00	1471,30	1500,00	1398,00	1450,00	1074,80	*	*
6	1500,00	1633,80	**	**	1450,00	1184,40	1500,00	1285,80	1500,00	1412,70
7	1500,00	1895,20	1100,00	1006,50	1450,00	1424,50	1500,00	1279,90	1500,00	***
8	1450,00	714,80	1500,00	1445,00	1500,00	1475,10	1500,00	1285,50	1500,00	1412,70
9	1500,00	1895,20	1500,00	1500,00	1500,00	1454,80	1500,00	1056,00	1100,00	***
10	1450,00	1605,10	1500,00	1531,50	1500,00	***	1500,00	1319,20	1450,00	1604,70
11	1500,00	1656,80	**	**	1500,00	1446,40	1450,00	1438,00	1500,00	1551,60
12	1500,00	1452,10	**	**	1450,00	1363,8	1450,00	1371,40	1100,00	1073,10
13	1500,00	1508,10	1500,00	1422,20	1500,00	1513,60	1500,00	1347,30	1500,00	942,20
14	1500,00	1362,00	1500,00	1380,90	1500,00	1503,60	1500,00	1395,90	1500,00	1098,10
15	1500,00	1624,40	1500,00	1452,60	1500,00	1509,80	500,00	494,80	1500,00	1728,00
16	1500,00	1472,30	1500,00	1380,90	1500,00	1365,40	1500,00	1401,40	1500,00	981,40
17	1500,00	1538,60	1200,00	1228,40	550,00	541,00	1450,00	1481,40	1500,00	981,40
18	1450,00	1631,50	1500,00	1519,30	1500,00	1426,90	1450,00	1548,00	1500,00	1567,30
19	1450,00	1406,70	1100,00	1597,50	500,00	508,70	1500,00	1507,70	1100,00	1028,90
20	1100,00	1098,00	1450,00	1427,80	500,00	***	1500,00	1533,30	1100,00	***
21	1100,00	1004,00	**	**	1500,00	1545,00	1450,00	383,30	1450,00	1340,40
22	1500,00	1496,20	*	*	1500,00	1480,50	1450,00	1487,20	1500,00	***
23	1500,00	1351,80	*	*	1500,00	1500,80	1500,00	1123,80	1500,00	***
24	1500,00	1700,70	*	*	1500,00	882,70	1450,00	1326,20	1100,00	1202,80
25	1500,00	1673,40	*	*	500,00	606,40		939,30	1500,00	***
26	*	*	*	*	1500,00	1310,40	*	*	*	*

* Nestas comunidades o número de voluntários foi menor

** Estes voluntários não escovavam os dentes

*** Amostras perdidas

ANEXO 17 - Média da estimativa da ingestão diária de F (mg/Kg p,c,) através da dieta e do dentifrício de crianças de 4-6 anos de idade recebendo deferentes fontes de F sistêmico

Voluntários	Bauru Água artificialmente F (0,6-0,8 mgF/L)		Brejo dos Santos Água naturalmente F (0,6-0,9 mgF/L)		Lima Sal F (180-200 mgF/Kg)		Trujillo Leite F (250 mL of 1,0 mgF/L)		Pirajuí Não F	
	Dieta	Dentifrício	Dieta	Dentifrício	Dieta	Dentifrício	Dieta	Dentifrício	Dieta	Dentifrício
1	0,036	0,037	0,077	0,015	0,034	0,027	0,043	0,000	0,005	0,012
2	0,040	0,034	0,069	0,076	0,032	0,022	0,075	0,006	0,008	0,018
3	0,044	0,000	0,061	0,037	0,035	0,075	0,068	0,028	0,008	0,067
4	0,050	0,032	0,067	0,020	0,046	0,033	0,066	0,048	0,008	0,064
5	0,028	0,018	0,036	0,014	0,029	0,119	0,050	0,003	*	*
6	0,029	0,038	0,061	0,000	0,038	0,047	0,069	0,023	0,013	0,042
7	0,040	0,029	0,042	0,010	0,085	0,019	0,064	0,005	0,004	0,013
8	0,051	0,000	0,039	0,058	0,073	0,073	0,075	0,038	0,007	0,012
9	0,034	0,015	0,074	0,044	0,068	0,011	0,058	0,000	0,004	0,000
10	0,058	0,038	0,043	0,056	0,080	0,074	0,043	0,017	0,007	0,028
11	0,047	0,036	0,046	0,000	0,077	0,058	0,073	0,014	0,005	0,061
12	0,032	0,007	0,043	0,000	0,067	0,018	0,068	0,240	0,005	0,000
13	0,018	0,014	0,092	0,021	0,047	0,053	0,047	0,052	0,004	0,000
14	0,036	0,079	0,069	0,021	0,032	0,017	0,083	0,020	0,006	0,001
15	0,048	0,006	0,073	0,015	0,044	0,066	0,060	0,005	0,007	0,017
16	0,044	0,021	0,075	0,015	0,071	0,034	0,056	0,037	0,004	0,024
17	0,053	0,004	0,066	0,017	0,016	0,004	0,046	0,029	0,006	0,000
18	0,035	0,048	0,040	0,017	0,048	0,014	0,070	0,029	0,003	0,012
19	0,060	0,013	0,035	0,027	0,033	0,005	0,056	0,010	0,005	0,004
20	0,036	0,000	0,050	0,084	0,032	0,002	0,045	0,000	0,011	0,000
21	0,044	0,000	0,067	0,000	0,106	0,011	0,061	0,000	0,006	0,010
22	0,045	0,001	*	*	0,037	0,036	0,054	0,084	0,010	0,003
23	0,032	0,007	*	*	0,036	0,149	0,051	0,000	0,008	0,031
24	0,035	0,000	*	*	0,023	0,006	0,042	0,002	0,020	0,012
25	0,079	0,088	*	*	0,021	0,008	0,056	0,030	0,006	0,040
26	*	*	*	*	0,036	0,071	*	*	*	*

* Nestas comunidades o número de voluntários foi menor

ANEXO 18 - Excreção urinária de F de 24 h (mg) de crianças de 4-6 anos de idade recebendo diferentes fontes de F sistêmico

Voluntários	Bauru Água artificialmente F (0,6-0,8 mgF/L)	Brejo dos Santos Água naturalmente F (0,6-0,9 mgF/L)	Lima Sal F (180-200 mgF/Kg)	Trujillo Leite F (250 mL of 1,0 mgF/L)	Pirajuí Não F
1	0,420	0,296	1,230	0,804	0,374
2	0,561	0,571	0,617	0,576	0,210
3	0,605	0,575	0,559	0,827	0,479
4	0,406	0,803	0,363	0,390	0,257
5	0,515	0,595	0,529	0,512	*
6	0,424	0,303	0,795	0,672	0,406
7	0,768	0,603	0,802	0,681	0,438
8	0,599	1,464	0,712	0,721	0,248
9	1,059	0,199	0,950	0,391	0,172
10	1,045	**	0,924	0,413	0,419
11	0,702	0,658	1,406	1,003	1,253
12	0,736	0,426	1,238	0,739	0,324
13	0,680	0,967	0,652	0,342	0,732
14	0,884	0,838	0,530	0,702	1,037
15	0,564	0,810	0,956	0,750	0,281
16	0,568	0,766	1,059	0,949	0,612
17	0,696	0,891	1,086	0,412	1,369
18	1,187	0,471	0,775	0,741	0,363
19	0,691	0,624	0,314	0,504	0,270
20	0,568	0,394	0,503	0,531	0,364
21	0,687	0,708	1,459	0,667	0,292
22	0,589	*	0,817	0,694	0,254
23	0,736	*	0,734	0,726	0,242
24	0,773	*	0,543	0,954	0,447
25	0,865	*	0,527	0,977	0,622
26	*	*	0,922	*	*

* Nestas comunidades o número de voluntários foi menor

** Amostras perdidas

ANEXO 19 - Concentração de F nas unhas das mãos e dos pés de crianças de 4-6 anos de idade recebendo diferentes fontes de F sistêmico, no primeiro dia de coleta

Voluntários	Bauru Água artificialmente F (0,6-0,8 mgF/L)		Brejo dos Santos Água naturalmente F (0,6-0,9 mgF/L)		Lima Sal F (180-200 mgF/Kg)		Trujillo Leite F (250 mL of 1,0 mgF/L)		Pirajuí Não F	
	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés
1	3,18	3,76	**	3,10	3,47	7,43	2,78	**	1,34	1,81
2	1,57	1,25	2,26	2,20	9,11	9,55	**	**	2,00	1,38
3	1,19	1,59	4,64	4,04	3,60	4,39	**	2,75	2,19	2,31
4	1,29	**	3,34	2,18	9,54	7,96	**	2,02	1,74	2,48
5	**	0,96	**	2,44	5,46	9,58	5,36	3,14	*	*
6	1,20	1,32	4,49	2,97	**	5,63	2,27	3,13	3,66	1,67
7	1,38	3,11	**	3,08	5,25	7,44	1,70	2,44	1,00	1,57
8	1,79	1,27	6,72	1,29	2,78	**	2,32	3,99	1,61	1,25
9	1,64	3,31	2,94	2,37	6,10	9,80	1,46	2,28	3,51	1,76
10	**	3,24	2,01	2,60	5,58	**	4,67	**	1,56	1,83
11	1,78	2,48	6,31	5,75	7,62	5,69	0,46	3,16	1,23	1,51
12	0,80	1,13	3,30	4,00	3,64	5,78	1,98	3,21	2,00	1,04
13	1,11	2,36	1,89	1,93	2,50	6,43	2,77	3,62	2,77	0,93
14	3,95	1,41	2,24	1,14	4,83	7,19	2,63	2,58	2,24	**
15	1,24	1,15	3,43	1,88	**	9,67	2,68	2,88	**	3,20
16	**	1,75	2,51	2,58	6,02	6,25	1,51	**	1,30	2,33
17	1,54	0,52	4,07	2,75	7,10	**	3,89	1,80	2,57	1,47
18	0,98	0,94	8,89	1,49	5,44	6,61	2,69	**	1,67	2,08
19	1,85	1,19	7,13	3,95	6,58	2,39	1,73	3,19	0,72	0,61
20	1,69	0,95	3,49	3,97	2,68	2,66	3,48	2,23	1,25	0,98
21	0,73	0,71	1,67	2,12	8,30	5,28	1,68	2,88	**	1,66
22	**	1,63	*	*	6,41	4,84	2,37	3,53	1,35	0,72
23	**	1,12	*	*	9,06	8,77	3,32	2,63	0,94	1,25
24	2,37	1,62	*	*	2,57	2,15	1,62	3,07	1,31	**
25	1,24	1,36	*	*	3,72	7,60	2,29	2,28	1,39	0,50
26	*	*	*	*	1,98	*	*	*	*	*

* Nestas comunidades o número de voluntários foi menor

** Outliers excluídos

ANEXO 20 - Concentração de F nas unhas das mãos e dos pés de crianças de 4-6 anos de idade recebendo diferentes fontes de F sistêmico, depois de 75 dias da primeira coleta

Voluntários	Bauru Água artificilmente F (0,6-0,8 mgF/L)		Brejo dos Santos Água naturalmente F (0,6-0,9 mgF/L)		Lima Sal F (180-200 mgF/Kg)		Trujillo Leite F (250 mL of 1,0 mgF/L)		Pirajuí Não F	
	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés
1	***	***	4,19	**	7,39	**	2,11	1,75	***	***
2	***	***	2,51	2,94	8,02	5,13	4,29	3,52	***	***
3	***	***	4,20	0,94	5,25	7,20	2,18	3,33	***	***
4	***	***	5,12	1,55	7,98	10,13	4,32	2,19	***	***
5	***	***	1,52	1,66	6,69	***	4,36	1,93	*	*
6	***	***	2,06	2,40	6,38	4,10	3,87	3,67	***	***
7	***	***	**	2,62	**	**	2,50	1,71	***	***
8	***	***	9,67	1,17	5,16	10,73	4,45	0,25	***	***
9	***	***	1,57	**	9,93	9,48	1,52	**	***	***
10	***	***	2,45	2,35	8,19	**	1,98	2,47	***	***
11	***	***	2,26	5,33	5,82	6,22	2,55	2,73	***	***
12	***	***	2,48	2,53	3,83	5,27	1,47	2,48	***	***
13	***	***	1,70	2,03	5,98	6,79	2,07	3,00	***	***
14	***	***	2,30	1,97	3,80	**	2,76	2,63	***	***
15	***	***	1,09	0,81	5,46	8,71	4,33	1,93	***	***
16	***	***	1,68	3,73	7,72	8,68	1,52	2,22	***	***
17	***	***	8,08	2,22	**	6,33	3,35	2,94	***	***
18	***	***	**	**	8,26	6,63	1,81	**	***	***
19	***	***	9,36	6,24	1,74	1,35	4,01	**	***	***
20	***	***	6,41	3,91	1,61	4,26	6,06	**	***	***
21	***	***	2,59	**	4,31	7,29	1,48	5,00	***	***
22	***	***	*	*	7,99	1,90	3,52	3,78	***	***
23	***	***	*	*	3,37	3,02	2,52	2,58	***	***
24	***	***	*	*	1,97	1,30	2,82	2,43	***	***
25	***	***	*	*	1,38	1,59	1,80	2,66	***	***
26	*	*	*	*	**	**	*	*	*	*

* Nestas comunidades o número de voluntários foi menor

** Outliers excluídos

*** Valores excluídos

ANEXO 21 - Concentração de F nas unhas das mãos e dos pés de crianças de 4-6 anos de idade recebendo diferentes fontes de F sistêmico, depois de 90 dias da primeira coleta

Voluntários	Bauru Água artificialmente F (0,6-0,8 mgF/L)		Brejo dos Santos Água naturalmente F (0,6-0,9 mgF/L)		Lima Sal F (180-200 mgF/Kg)		Trujillo Leite F (250 mL de 1,0 mgF/L)		Pirajuí Não F	
	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés
1	3,53	0,98	1,99	1,13	6,74	5,20	1,83	4,62	3,28	1,27
2	2,37	0,80	3,32	1,99	11,21	13,22	2,32	3,29	2,94	1,44
3	0,57	1,77	2,10	1,65	5,00	5,67	1,58	1,59	1,22	1,18
4	5,54	**	2,89	1,22	11,98	8,82	3,33	1,83	1,93	1,51
5	1,95	1,14	1,79	0,93	8,28	5,36	2,13	2,53	*	*
6	1,11	0,97	2,85	1,45	10,02	2,41	2,58	1,88	1,54	1,37
7	4,89	1,45	1,96	2,27	10,08	6,24	1,67	1,34	1,28	1,63
8	1,36	0,63	3,34	**	10,83	17,05	**	2,31	**	1,47
9	3,62	2,00	1,66	2,13	10,96	11,99	1,39	1,16	3,95	2,27
10	1,30	1,73	0,79	2,12	7,22	9,32	1,32	1,67	2,38	2,06
11	4,03	1,13	1,63	1,05	8,15	4,53	1,86	1,72	1,19	0,95
12	1,16	**	2,36	1,47	5,30	4,41	**	1,65	1,57	0,78
13	1,02	1,21	1,57	0,67	5,33	4,58	1,98	4,42	0,95	1,27
14	1,94	0,87	2,15	1,32	10,44	11,97	2,35	2,82	0,60	0,95
15	0,32	0,87	1,86	1,54	11,39	5,28	**	4,57	2,57	**
16	3,99	0,39	0,93	1,85	11,75	1,71	1,39	1,78	2,80	2,04
17	3,76	1,93	4,12	1,22	4,85	12,02	2,91	1,62	1,39	1,25
18	2,88	1,47	**	1,02	**	9,49	2,67	3,22	2,06	2,35
19	2,09	1,14	4,08	2,34	1,63	1,46	2,67	1,75	0,61	0,64
20	2,36	1,36	1,26	1,94	1,21	1,54	3,85	3,91	1,16	1,86
21	2,70	0,93	1,48	1,27	4,78	4,54	2,72	3,12	4,32	2,83
22	3,10	1,22	*	*	3,77	2,54	2,36	2,71	1,99	3,49
23	1,22	0,67	*	*	3,38	2,38	2,61	1,99	1,91	1,86
24	1,84	0,59	*	*	1,31	0,98	2,06	1,61	1,21	2,28
25	2,54	1,68	*	*	1,91	3,74	1,64	1,49	1,46	3,53
26	*	*	*	*	7,95	11,62	*	*	*	*

* Nestas comunidades o número de voluntários foi menor

** Outliers excluídos

ANEXO 22 - Média da concentração de F nas unhas das mãos e dos pés de crianças de 4-6 anos de idade recebendo diferentes fontes de F sistêmico

Voluntários	Bauru Água artificialmente F (0,6-0,8 mgF/L)		Brejo dos Santos Água naturalmente F (0,6-0,9 mgF/L)		Lima Sal F (180-200 mgF/Kg)		Trujillo Leite F (250 mL de 1,0 mgF/L)		Pirajúi Não F	
	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés	Mãos	Pés
1	3,36	2,37	3,09	2,12	5,87	6,32	2,24	3,19	2,31	1,54
2	1,97	1,02	2,69	2,38	9,45	9,30	3,31	3,41	2,47	1,41
3	0,88	1,68	3,65	2,21	4,62	5,75	1,88	2,56	1,71	1,74
4	3,42	**	3,78	1,65	9,83	8,97	3,83	2,01	1,84	1,99
5	1,95	1,05	1,65	1,68	6,81	7,47	3,95	2,53	*	*
6	1,16	1,15	3,14	2,27	8,20	4,05	2,91	2,89	2,60	1,52
7	3,14	2,28	1,96	2,66	7,66	6,84	1,96	1,83	1,14	1,60
8	1,58	0,95	6,58	1,23	6,26	13,89	3,38	2,18	1,61	1,36
9	2,63	2,66	2,06	2,25	9,00	10,42	1,46	1,72	3,73	2,01
10	1,30	2,48	1,75	2,36	7,00	9,32	2,65	2,07	1,97	1,94
11	2,91	1,80	3,40	4,05	7,20	5,48	1,62	2,53	1,21	1,23
12	0,98	1,13	2,71	2,67	4,26	5,15	1,72	2,45	1,78	0,91
13	1,07	1,78	1,72	1,54	4,60	5,93	2,27	3,68	1,86	1,10
14	2,95	1,14	2,23	1,48	6,36	9,58	2,58	2,68	1,42	0,95
15	0,78	1,01	2,12	1,41	8,43	7,89	3,51	3,13	2,57	3,20
16	3,99	1,07	1,71	2,72	8,50	5,55	1,47	2,00	2,05	2,19
17	2,65	1,23	5,42	2,06	5,98	9,18	3,39	2,12	1,98	1,36
18	1,93	1,20	8,89	1,25	6,85	7,58	2,39	3,22	1,87	2,21
19	1,97	1,16	6,86	4,18	3,32	1,73	2,80	2,47	0,67	0,62
20	2,03	1,16	3,72	3,27	1,83	2,82	4,46	3,07	1,21	1,42
21	1,72	0,82	1,91	1,70	5,80	5,70	1,96	3,67	4,32	2,25
22	3,10	1,43	*	*	6,06	3,09	2,75	3,34	1,67	2,10
23	1,22	0,89	*	*	5,27	4,72	2,82	2,40	1,43	1,56
24	2,11	1,11	*	*	1,95	1,48	2,17	2,37	1,26	2,28
25	1,89	1,52	*	*	2,34	4,31	1,91	2,14	1,42	2,01
26	*	*	*	*	4,97	11,62	*	*	*	*

* Nestas comunidades o número de voluntários foi menor

** Outliers excluídos

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

1. ALLEN, C.D.; ASHLEY, F.D.; NAYLOR, M.N. Caries experience in 11- years-old schoolchildren between 1962 and 1981. **Brit. dent. J.**, v.154, n.6, p.167-70, Mar. 1983.
2. ALMEIDA, B.S.; CARDOSO, V.E.S.; BUZALAF, M.A.R. Fluoride ingestion from toothpaste and diet in 1-3-year-old Brazilian children. **Community Dent. oral Epidem.**, v.35, p.53-63, 2007.
3. ANDLAW, R.J.; BURCHELL, C.K.; TUCKER, G. Comparison of dental health in 11- years-old children in 1970 and 1979, and of 14- years-old children in 1973-1979, studies in Bristol, England. **Caries Res.**, v.16, n.3, p.257-64, 1982.
4. ARSATI, Y. B .de O .L. **A unha como indicador biológico de exposição a fluoreto para prever risco de fluorose dental.** Piracicaba, 2003. 75p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade de Campinas.
5. BAEZ, R.J.; BAEZ, M.X.; MARTHALER, T.M. Urinary fluoride excretion by children 4-6- years old in south Texas community. **Rev Panam Salud Publica**, v.7, n.4, p.242-8, 2000.
6. BAKER, I.A. et al. A randomized controlled trial of the effect of the provision of free school milk on the growth of children. **J Epidemiol Comm Hlth**, v.34, p.31-4, 1980.

7. BASTOS, J.R. de M. et al. Concentração de flúor em água mineral engarrafada e de fontes naturais das cidades de Lindóia, Águas de Lindóia e Serra Negra, Brasil. **Rev. Univ. Fed. Passo Fundo**, v.6, n.1, p.15-19, jan./jun. 2001.
8. BERGMANN K.E.; BERGMANN, R.L. Salt fluoridation and general health. **Advanc. dent. Res.**, v.9, n.2, p.138-43, July 1995.
9. BIESWANGER, B.B.; STOOKEY, G.K. The comparative clinical cariostatic efficacy of sodium fluoride and sodium monofluorophosphate dentifrice: a review of trials. **ASDC J. dent Child**, v.57, n.5, p.337-47, Sept./Oct. 1989.
10. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Lei n º6050, de 24 de maio de 1974. Disponível na Internet. www.saude.gov.br/sp/areastecnicas/bucal/dados/fluor/lei6050.htm
11. BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 22 de dezembro de 20 de dezembro de 1989. Disponível na Internet. www.saude.gov.br/sps/areastecnicas/bucal/dados/fluor/port22vig.htm.
12. BURT, B.A. The changing patterns of systemic fluoride intake. **J. dent. Res.**, v.1, n. 5, p.1228-37, May 1992.
13. BURT, B.A. Prevention policies in the light of the changed distribution of dental caries. **Acta odontol scand.**, v.56, p.179-86, 1998.
14. BUZALAF, M.A.R. ; PESSAN, J.P.; ALVES, K.M.R.P. Influence of growth rate and length on fluoride detection in human nails. **Caries Res.**, v.40, n.3, p.231-238, 2006.
15. BUZALAF, M.A.R. et al. Fluoride content of infant formulas prepared with deionized, bottled mineral and fluoridated drinking water. **ASDC J. dent Child**, v.68, n.1, p.37-41, Jan./Feb. 2001.

16. BUZALAF, M.A.R. et al. Fluoride content of infant foods in Brasil and risk of dental fluorosis. **ASDC J. dent Child**, v.69, n.2, p.196-200, May/Aug. 2002.
17. BUZALAF, M.A.R. et al. Association between the early use of toothpaste and other variables with dental fluorosis: a transversal retrospective study. **Rev. FOB**, v.10, n.3, p.196-200, jul./set. 2002.
18. BUZALAF, M.A.R. et al. Correlation between plasma and nail fluoride concentrations in rats given different levels of fluoride in water. **Fluoride**, v.35, n.3, p.185-192, Aug. 2002.
19. BUZALAF, M.A.R. et al. Fluoride content of several brands of teas and juices found in Brasil and risk of dental fluorosis. **Rev. FOB**, v.10, n.4, p.263-7, out./dez. 2002.
20. BUZALAF, M.A.R. et al. Fluctuations in public water fluoride level in Bauru, Brazil. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v.62, n.3, p.173-6, Summer 2002.
21. BUZALAF, M.A.R. et al. Fluoride content of several brands of chocolate bars and chocolate cookies found in Brazil. **Pesqi Odonto Bras**, v.17, n.3, p.223-7, jul./set. 2003.
22. BUZALAF, M.A.R. et al. Fluoride content of UHT milks commercially available in Bauru, Brazil. **Journal Of Applied Oral Science**, v.14, n.1, p.38-42, 2006.
23. BUZALAF, M.A.R. et al. Availability of fluoride from meals given to kindergarten children in Brazil. **Community Dent. oral Epidem.**, v.34, n.2, p.87-92, 2006.
24. CADOGAN J. et al. Milk intake and bone mineral acquisition in adolescent girls: randomized, controlled intervention trial. **Brit. med. J.**, v.315, p.1255-60, 1997.

25. CAMPOS, S.V. Amostra de unha indicam presença de cocaína. Referência obtida via base de dados: USP, 2002. disponível na Internet. www.usp.br/agenciausp/bols/2002/rede1055.htm
26. CARMO, do M.D. et al. Localidades com diferentes concentrações de flúor nas águas de consumo e sua relação com a prevalência de fluorose. **Odont. mod.**, v.22, n.4, p.18-21, out./dez. 1995.
27. CHEN, M.S. Disease prevention and oral health promotion. *In*: Cohen LK, Gift HC (eds). Oral health of disadvantaged populations. Munksgaard, Copenhagen, p. 153-212, 1995.
28. CLARK, D.C. Trends in prevalence of dental fluorosis in North America. **Community Dent. oral Epidem.**, v.22, p.148-52, 1994.
29. CLARKSON, J. J. International collaborative research on fluoride. **J. dent. Res.**, v.79, n.4, p.893-904, Apr. 2000.
30. CLOVIS, J.; HARGREAVES, J.A. Fluoride intake from beverage consumption. **Community Dent. oral Epidem.**, v.16, n.1, p.11-5, Feb. 1988.
31. COCHRAN, J.A. et al. Development of a standardized method for comparing fluoride ingested from toothpaste by 1.5-3.5-year-old children in seven European countries. Part 2: ingestion results. **Community Dent. oral Epidem.**, v.32, n.1, p.47-53, 2004.
32. COMMITTEE ON BIOLOGICAL MARKERS OF THE NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Biological markers in environmental health research. **Environ. Health Perspec.**, v.74, p.3-9, 1987.
33. CULLEN, M.R.; REDLICH, C.A. Significance of individual sensitivity to chemicals: elucidation of host susceptibility by use of biomarkers in environmental health research. **Clin. Chem.**, v.12, p.1809-13, Dec. 1995.

34. CURY, J.A. Concentração de fluoreto em chás brasileiros e seu significado na prevenção de cárie. **Rev. gaúcha Odont.**, v.29, n.2, p.136-8, abr./jun. 1981.
35. CZARNOWSKI, W.; KRECHNIAK, J. Fluoride in urine, hair and nails of phosphate fertilizer workers. **Brit. J. Ind. Med.**, v.47, n.5, p.329-51, 1990.
36. CZARNOWSKI, W. et al. Fluoride in drinking water and human urine in northern and central Poland. **Sci. Total Environ.**, v.191, n.1 /2, p.177-84, Nov. 1996.
37. DEAN, H.T. et al. Studies on mass control of dental caries through fluoridation of the public water supply. **Publ. Hlth Rep.**, v.65, p.1403-8, 1950.
38. DeCAPRIO, A.P. Biomarkers: coming age for environmental health and risk assessment. **Environ. Science Tech.**, v.31, p.1837-48, 1997.
39. EAGER, J.M. Denti di Chiaie. **Publ. Hlth Rep.**, v.91, n.3, p.284-5, May /June, 1976.
40. EKSTRAND, J.; EHRNEBO, M. Absorption of fluoride from fluoride dentifrice. **Caries Res.**, v.14, n.2, p.96-102, 1980.
41. EKSTRAND, J.; EHRNEBO, M.; BOREÚS, L. Fluoride bioavailability after intravenous and oral administration: importance of renal clearance and urine flow. **Clin. Pharmacol. Ther.**, v.23, p.329-37, 1978
42. EKSTRAND, J. et al. Pharmacokinetics of fluoride in man after single and multiple oral dosages. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v.12, p.311-7, 1977.
43. EKSTRAND, J. et al. Fluoride pharmacokinetics during acid-base balance changes in man. **Eur. J. Clin. Pharmacol.**, v.18, p.189-94, 1980.

44. EKSTRAND, J.; SPAK, C.J.; EHRNEBO, M.; Renal clearance of fluoride in a steady state condition in man: influence of urinary flow and pH changes by diet. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v.50, p.321-5, 1982.
45. EKSTRAND, J. et al. Fluoride pharmacokinetics in infancy. **Pediatr Res.**, v.35, p.157-63, 1994.
46. ERICSSON, Y.; FORSMAN, B. Fluoride retained from mouthrinses and dentifrices in preschool children. **Caries Res.**, v.3, n.3, p.290-9, 1969.
47. ESTUPINÁN-DAY S.R. et al. Salt fluoridation and dental caries in Jamaica. **Community Dent. oral Epidem.**, v.29, p.247-52, 2001.
48. EVANS, R.W.; STAMM, J.W. Dental fluorosis following downward adjustment of fluoride in drinking water. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v.51, n.2, p.91-8, Spring 1991.
49. FORSMAN, B.; ERICSSON, Y. Fluoride absorption from swallowed fluoride toothpaste. **Community Dent. oral Epidem.**, v.1, n.3, p.115-20, 1973.
50. GRANDJEAN, P. Biomarkers in Epidemiology. **Clin. Chem.**, v.41, n.12, p.1800-3, Dec. 1995.
51. GUHA-CHOWDHURY, N.; DRUMMOND, B. K.; SMILLIE, A.C. Total fluoride intake in children aged 3 to 4 years – a longitudinal study. **J. dent. Res.**, v.75, n.7, p.1451-7, July 1996.
52. HARGREAVES, J.A.; INGRAM, G.S.; WAGG, B.J. A gravimetric study of the ingestion of toothpaste by children. **Caries Res.**, v.6, n.3, p.237-43, 1972.
53. HEILMAN, J.R. et al. Fluoride concentration of infant foods. **J. Amer. dent. Ass.**, v.128, n.7, p.857-63, July 1997.
54. HEILMAN, J.R. et al. Assessing fluoride levels of carbonated soft drinks. **J. Amer. dent. Ass.**, v.130, n.11, p.1593-9, Nov. 1999.

55. HEINTZE, S.D.; BASTOS, J.R.de M. Avaliação do teor de flúor e pH em bebidas no mercado nacional. **Rev. Ass. paul. cirurg. Dent.**, v.50, n.4, p.339-45, jul./ago. 1996.
56. HODGE, H.C.; SMITH, F.A.; GEDALIA, I. Excretion of fluorides. **In: Fluorides and human health**. Geneva: WHO; p. 141-61, 1970.
57. HOLT, R.D. et al. Enamel opacities and dental caries in children who used a low fluoride toothpaste between 2 and 5 years of age. **Int. dent J.**, v. 44, n.4, p.331-41, Aug. 1994.
58. HULKA, B.S. Epidemiological studies using biological markers: issues for epidemiologists. **Cancer Epidem. Biomarkers Prev.**, v.1, n.1, p.13-9, Nov./Dec. 1991.
59. INSTITUTO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Mapas, color. Tamanhos inderterminaveis. Disponível em: www.ibge.gov.br/cidadesat/default.php. Acesso em: jan. 2007.
60. JACKSON, R.D. et al. Dental fluorosis in children residing in communities with different water fluoride levels: 33-month follow-up. **Pediat. Dent.**, v.21, n.4, p.248-54, July/Dec. 1999.
61. KETLEY, C.E. et al. Urinary fluoride excretion of young children espoused to different fluoride regimes. **Community Dent. oral Epidem.** v.19, n.1, p.12-7, 2002.
62. KETLEY, C.E. et al. Urinary fluoride excretion by preschool children in six European countries. **Community Dent. oral Epidem.** v.32, n.1, p.62-8, 2004.
63. KUNZEL W. Systemic use of fluoride – other methods: salt, sugar, milk, **Caries Res.**, Suppl 1, p. 16-22, 1993.

64. LALUMANDIER, J.A. The prevalence and risk factors of fluorosis among children in a padiatric practice in Asheville, North Carolina. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v.52, n.3, p.188-9, 1992.
65. LEAKE, J. et al. Has the level of dental fluorosis among Toronto children changed? **J Canad. dent. Ass**, v.68, n.1, p.21-5, Jan. 2002.
66. LEVERETT, D.H. Prevalence of dental fluorosis in fluoridated and in non-fluoridated communities-a preliminary investigation. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v.46, n.4, p.184-7, Fall 1986.
67. LEVY, S.M.; KIRITSY, M.C.; WARREN, J.J. Sources of fluoride intake in children. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v.55, n.1, p.39-52, Winter 1995.
68. LEVY, F.M.; BASTOS, J.R.M; BUZALAF, M.A.R. Nails as biomarkers of fluoride in children of fluoridated communities. **J. Dent. Child.**, v.71, n.2, p.121-5, May/Aug. 2004.
69. LIMA, Y.B.O.; CURY, J.A. Ingestão de flúor por crianças através da água e dentifrício. **Rev. Saúde públ.**, v.35, n.6, p.576-81, dez. 2001.
70. MACHOY, Z. Effects of environment upon fluoride content in nails in children. **Fluoride**, v.22, n.4, p.169-73, Oct. 1989.
71. MAGUIRE A. et al. Bioavailability of fluoride in drinking water: a human experimental study. **J. dent. Res.**, v.84, p.989-993, 2005.
72. MALTZ, M.; FARIAS, C. Fluorose dentária em escolares de quarto cidades brasileiras com e sem água artificialmente fluoretada. **Rev. Fac. Odont. Porto Alegre**, v.39, n.2, p.18-21, dez. 1998.
73. MANSBRIDGE, J.N.; BROWN, M.D. Changes in dental caries prevalence in Edinburgh children over three decades. **Community dent. Hlth.**, v.2, n.1, p.3-13, Mar. 1985.

74. MARIÑO, R.; VILLA, A.; GUERREIRO, S. A community trial of fluoridated powdered milk in Chile. **Community Dent. oral Epidem.**, v.29, p.435-42, 2001.
75. MARIÑO, R.; VILLA, A.; WEITZ, A. **Dental caries prevention using milk as the vehicle for fluorides: the chilean experiences.** Melbourne: The University of Melbourne, 2006. 78 p.
76. MARIÑO, R. et al. Prevalence of fluorosis in children aged 6-9 years-old who participated in a milk fluoridation programme in Codega, Chile. **Community dent. Hlth.**, v.20, p.143-8, Aug. 2003.
77. MARIÑO, R. et al. Caries prevalence in a rural Chilean community after cessation of a powdered milk fluoridation program. **J. Publ. Hlth Dent.**, v.64, n.2, p.101-5, 2004.
78. MARTHALER, T. Practical aspects of salt fluoridation. **Schweiz Monatsschr Zahnheilk.** V.93, p.1197-1214, 1983.
79. MARTHALER, T.M.; O'MULLANE, D.M.; VRBIC, V. The prevalence of dental caries in Europe 1990-1995. ORCA Saturday afternoon symposium 1995. **Caries Res.**, v.30, p.237-55, 1996.
80. MARTHALER, T.M. et al. Urinary fluoride excretion in children with low fluoride intake or consuming fluoridated salt. **Caries Res.**, v.29, p.26-34, 1995.
81. MARTHALER T.M. Monitoring of renal fluoride excretion in community preventive programs on oral health. **World Health Organization.** Geneva, 1999. 69 pp.
82. MASCARENHAS, A.K. Risk factors for dental fluorosis: A review of the recent literature. **Pediat. Dent.**, v.22, n.4, p.269-77, July/Aug. 2000.

83. MASCARENHAS, A.K.; BURT, B.A. Fluorosis risk from early exposure to fluoride toothpaste. **Community Dent. oral Epidem.**, v.26, n.4, p.241-8, Aug. 1998.
84. McCLURE, F.J. **Water fluoridation. The search and the victory.** Washington, DC, Us Government Printing Office, 1970.
85. McDOGNAGH, M. et al. Systematic review of water fluoridation. **Brit. med. J.**, v.321, n.7265 p.855-9, Oct. 2000.
86. McDONNELL, S.T.; O'MULLANE, D. Fingernails, a fluoride biomarker – relevance of growth rate and length. **J. dent. Res.**, v.80, n.4, p.1145, 2001. /Abstract n.29/
87. McDONNELL S.T. et al. Relevant factors when considering fingernail clippings as a fluoride biomarker. **Community dent. Hlth.**, v.21, p.19-24, 2004.
88. McKAY, F.S. Mottled enamel: The prevetion of its further production though a chance of water supply at Oakley, IDA. **J. Amer. Dent. Ass.**, v.20, n.7, p.1137-49, July 1933.
89. MELLBERG, J.R.; RIPA, L.W. Self-applied topical fluoride Fluoride in preventive dentistry: theory and clinical implications. Chicago, Quintessence Publishing Co., p. 243-77, 1983.
90. MUHLER, J.C. et al. The effect of a stannous fluoride-containing dentifrice on caries reduction in children. **J. dent. Res.**, v.33, n.5, p.606-12, Oct. 1954.
91. O'MULLANE, D.M. Systemic fluoride. **Advanc. dent. Res**, V.8, n.2, p.181-84, 1994.

92. O'RAHILLY, R. Cútis, pelos e unhas. In: GARDNER, E.; GRAY, D.J.; O'RAHILLY, R. **Anatomia estudo regional do corpo humano**. 2.ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1964. Cap.8, p. 66-74.
93. PANG, D.T.Y.; PHILIPPS, C.L.; BAWDEN, J.W. Fluoride intake from beverage consumption in a sample of North Carolina children. **J. dent. Res.**, v.71, n.7, p.1382-8, July 1992.
94. PENDRYS, D.G.; KATZ, R.V. Risk of enamel fluorosis associated with fluoride supplementation, infant formula, and fluoride dentifrice use. **Amer. J. Epidemiol.**, v.130, n.6, p.1199-208, Dec. 1989.
95. PENDRYS, D.G.; MORSE, D.E. Use of fluoride supplementation by children living in fluoridated communities. **ASDC J. Dent. Child.**, v.57, n.5, p.343-7 Sept. / Oct. 1990.
96. PENDRYS, D.G.; MORSE, D.E. Fluoride supplement use by children in fluoridated communities. **J. Publ. Hlth. Dent.**, v.55, n.3, p.160-4, Summer 1995.
97. PENDRYS, D.G.; KATZ, R.V. Risk factors for enamel fluorosis in optimally fluoridated children born after the US manufacturer's decision to reduce the fluoride concentration of infant formula. **Amer. J. Epidemiol.**, v.148, n.10, p.967-74, Nov. 1998.
98. PENDRYS, D.G.; KATZ, R.V.; MORSE, D.E. Risk factors for enamel fluorosis in a nonfluoridated population. **Amer. J. Epidemiol.**, v.143, n.8, p.808-15, Apr. 1996.
99. PEREIRA, A.C. et al. Dental caries and fluorosis prevalence study in a nonfluoridated Brazilian community: trend analysis and toothpaste association. **ASDC J. Dent. Child.**, v.67, n.2, p.132-5, Mar./Apr. 2000.

100. PESSAN, J.P.; SILVA, S.M.B.; BUZALAF, M.A.R. Evaluation of the total fluoride intake of 4-7-years-old children from diet and dentifrice. **J. Appl. Oral Sci.**, v.11, n.2, p.150-6, 2003.
101. PESSAN, J.P. et al. Analysis of fingernails and urine as biomarkers of fluoride exposure from dentifrice and varnish in 4- to 7- years-old children. **Caries Res.**, v.39, n.5, p.363-70, Sept./Oct. 2005.
102. PINTO, V.G. Prevenção da cárie dentária: a questão do sal. **Rev. Saúde públ.**, v.16, p.66-72, 1982.
103. RAMIRES, I. et al. Evaluation of the fluoride concentration and consumption of mineral water. **Rev. Saúde públ.**, v.38, n.5, p.459-65, jun. 2004.
104. RAMIRES, I. et al. Fluoridation of the public water supply and prevalence of dental fluorosis in a peripheral district of the municipality of Bauru, SP. **J. Appl. Oral Sci.**, v.14, n.2, p.136-141, 2006.
105. RAMIRES, I. et al. Heterocontrole da fluoretação da água de abastecimento público em Bauru, SP, Brasil. **Rev. Saúde públ.**, v.40, n.5, p.883-889, 2006.
106. RICHARDS, A; BANTING, D.W. Fluoride toothpastes. In: Fejerskov, O.; Ekstrand, J.; Burt, B.A. **Fluoride in dentistry**. 2.ed. Copenhagen, Munksgaard, 1996, p. 328-46.
107. RIORDAN, P.J.; BANKS, J.A. Dental fluorosis and fluoride exposure in Western Australia. **J. dent. Res.**, v.70, n.7, p.1022-8, July 1991.
108. RODRIGUES, M.H.C.; BASTOS, J.R.M.; BUZALAF, M.A.R. Fingernails and toenails of subchronic exposure fluoride from dentifrice in 2-to3 year old children. **Caries Res.**, v.38, n.2, p.109-14, Mar/Apr. 2004.

109. SAMPAIO, F.C. et al. Validation of fingernails fluoride as a biomarker for dental fluorosis. **Caries Res.**, v.37, p.291-2, 2003. /Abstract n.72/
110. SCHAMSCHULA, R.G. et al Physiological indicators of fluoride exposure and utilization: an epidemiological study. **Community Dent. oral Epidem.**, v.13, n.2, p.104-7, Apr. 1985.
111. SCHMIDT, C.W.; LEUSCHKE, W. Fluoride content in fingernails of individuals with and without chronic fluoride exposure. **Fluoride**, v.23, n.2, p.79-82, Apr. 1990.
112. SMITH R. Doctors can reduce the harmful effects of poverty. **Brit. med. J.**, v.314, p.698, 1997.
113. SPAK, C.K.; EKSTRAND, J.; ZYLBERSTEIN, D. Bioavailability of fluoride added by baby formula and milk. **Caries Res.**, v.16, n.3, p.249-56, 1982.
114. SPATE, V.L. et al. Determination of fluoride in human nails via cyclic instrumental neutron activation. **J. Radioanalyt. Nucl. Chem.**, v.170, p.27-33, 1994.
115. SPUZNAR, S.M.; BURT, B.A. Dental caries, dental fluorosis, and fluoride exposure in Michigan schoolchildren. **J. dent. Res.**, v.67, n.5, p.802-6, May 1988.
116. TABARI, E.D. et al. Dental fluorosis in permanent incisor teeth in relation to water fluoridation, social deprivation and toothpaste use in infancy. **Brit. dent. J.**, v.189, n.4, p.216-20, Aug. 2000.
117. TAVES, D.R. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexamethyldisiloxane. **Talanta**, v.15, p.969-74, 1968.

118. TAVES, D.R. Dietary fluoride intake of fluoride ashed (total fluoride) unashed (inorganic fluoride) analysis of individual foods. **Brit. dent. J.**, v.49, n.3, p.295-301, May 1983.
119. THE BORROW FOUNDATION. International programme. Referência obtida via base de dados. Disponível na Internet. <http://www.borrowfoundation.org>
120. TOTH K. A study of 8 years domestic salt fluoridation for the prevention of caries. **Community Dent. oral Epidem.** v.4, p.106-10, 1976.
121. TRAUTNER, K.; SIEBERT, G. An experimental study of bioavailability of fluoride from dietary source in man. **Arch. oral Biol.**, v.31, n.4, p.223-8, 1986.
122. TRAUTNER, K.; EINWAG, J. Influence of milk and food on fluoride bioavailability from NaF and Na₂FPO₃ in man. **J. dent. Res.**, v.68, n.1, p.72-7, Jan. 1989.
123. VALLEJOS-SANCHES et al. Dental fluorosis in cohorts born before, during, and after the national salt fluoridation program in a community in Mexico. **Acta odontol. scand.**, v.64, n.4, p.209-13, 2006.
124. VIEGAS, A.R. et al. Fluoretação da água de abastecimento público. **Rev. Ass. paul. cirurg. Dent.**, v.41, n.4, p.202-4, jul./ago. 1987.
125. VILLA, A. et al. Estimation of the fraction of an ingested dose of fluoride excreted through urine in pre-school children. **Comm. Dent. oral Epidemiol.**, v.25, p.305-12, 1999.
126. VILLENA, R.S.; BORGES, D.G.; CURY, J.A. Avaliação da concentração de flúor em águas minerais comercializadas no Brasil. **Rev. Saúde públ.**, v.30, n.6, p.512-8, dez. 1996.

127. VILLENA, R.S.; IANO, F.G.; BUZALAF, M.A.R. Programa nacional de fluoretação de sal no Peru: distribuição e concentração de flúor. **Brazilian Oral Research**, v.20, p.33, 2006 /Abstract n. PO023/
128. WARPEHA, R.A.; MARTHALER, T.M. Urinary fluoride excretion in Jamaica in relation to fluoridate salt. **Caries Res.**, v.29, n.1, p.35-41, 1995.
129. WARREN, J.J.; LEVY, S.M.A. A review of fluoride dentifrice related to fluorosis. **Pediat. Dent.**, v.21, n.4, p.265-71, July /Aug. 1999.
130. WESPI H.J. Gedanke zur Frage der optimalen Ernährung in der Schwangerschaft: Salz und Brot als Träger zusätzlicher Nahrungsstoffe. **Schweiz Med Wochenschr**, v.78, p.153-5, 1948.
131. WHITFORD, G.M. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. **J. dent. Res.**, v.69, p.539-49, Feb. 1990. Special issue.
132. WHITFORD, G.M. Intake and metabolism of fluoride. **Advanc. dent. Res.**, v.8, n.1, p.5-14, June 1994.
133. WHITFORD, G. M. **The metabolism and toxicity of fluoride**. 2.ed. Basel, Karger, 1996.
134. WHITFORD, G.M. Monitoring fluoride exposure with fingernail clippings. **Schweiz Monatsschr Zahnmed**, v.115, n.8, p.685-9, 2005.
135. WHITFORD, G. M. et al. Fingernail fluoride: a method for monitoring fluoride exposure. **Caries Res.**, v.33, n.6, p.462-7, Nov./ Dec. 1999.
136. WHITFORD, G.M. et al. Fluoride pharmacokinetics following ingestion of water containing different fluoride compounds. **Caries Res.**, v.40, n.4, p.308, 2006. /Abstract n. 14/

137. WIKIPÉDIA. A enciclopédia livre. Disponível em: www.wikipedia.org. Acesso em: jan. 2007.

138. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Fluorides and oral health. Technical Report Series No. 846. Geneva: WHO; 1994.

139. ZACHERL, W.A.; LONG, D.M. Reduction in caries attack rate – non-fluoridated community. **J. dent. Res.**, v. 58, p. 227, 1979. /Abstract n. 535/

140. ZIEGLER E. Kariesprophylaxe durch Fluoridierung der Milch. **Schweiz Med Wochenschr**, v.83, p.723-4, 1953.

ABSTRACT

ABSTRACT

“Fingernail and urine fluoride: comparison between children receiving naturally fluoridated water, artificially fluoridated water, fluoridated salt or fluoridated milk”

This study compared the fluoride (F) intake from diet and dentifrice, as well as 24-hour urinary F excretion of children receiving systemic F from different sources: artificially fluoridated water (A-Brazil, 0.6-0.8 mgF/L), naturally fluoridated water (B-Brazil, 0.6-0.9 mgF/L), fluoridated salt (C-Peru, 180-200 mgF/Kg) and fluoridated milk (D-Peru, 250 mL of milk containing 1.0 mgF/L). Children (n=21-26) aged 4-6 years old participated in each community. A non-fluoridated (<0.1 mgF/L) Brazilian community (E) was evaluated as control (n=24). Children had their F intake from diet monitored by the “duplicate plate” method, considering its different constituents (water, other liquids and solids). F ingested from dentifrice was determined by simulated toothbrushings. Twenty-four hour urinary F excretion was also evaluated. F was analyzed with the electrode, after hexamethyldisiloxane-facilitated diffusion or after buffering with TISAB. Data were tested by Kruskal-Wallis and Dunn’s post hoc tests and linear regression ($p < 0.05$). Mean ($\pm$ SD) total F intake (mg/Kg b.w./day) was 0.065 ± 0.030^a , 0.084 ± 0.029^a , 0.088 ± 0.044^a , 0.088 ± 0.052^a and 0.027 ± 0.022^b for A, B, C, D and E, respectively. Considering diet only, it was 0.042 ± 0.012^b , $0.058 \pm 0.016^{a,b}$, $0.048 \pm 0.023^{a,b}$, 0.059 ± 0.012^a and 0.007 ± 0.004^c , respectively. The main dietary contributors for A/B and C/D/E were water and solids, respectively. Mean F intake from dentifrice ranged between 0.020 (E) and 0.040 (C) mg/Kg b.w./day and was not significantly different among the communities. Mean ($\pm$ SD) 24-h urinary F excretion (mg) was 0.693 ± 0.198^a , $0.625 \pm 0.297^{a,b}$, 0.808 ± 0.305^a , 0.666 ± 0.194^a and 0.478 ± 0.321^b for A, B, C, D and E, respectively. There was a significant correlation between daily F intake from diet and urinary F excretion ($r = 0.355$, $p < 0.0001$) and total intake (diet and dentifrice) and urinary F excretion ($r = 0.278$, $p = 0.002$). There was a significant correlation between urinary F excretion and fluoride concentration in fingernails ($r = 0.237$, $p = 0.010$) and toenails ($r = 0.221$, $p = 0.016$) and a strong correlation between F

concentration from fingernails and toenails ($r=0.730$, $p<0.0001$). The results indicate that the total F intake of children must be taken into account before a systemic method of fluoridation is implemented.

Keywords: Fluoridation. Water. Milk. Salt. Biological markers. Urine. Nails.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Carta de aceite do Comitê de Ética em Pesquisa

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

Comitê de Ética em Pesquisa (3235-8356)

Processo nº 116/2004

Bauru, 19 de novembro de 2004.

Senhora Professora,

Informamos que após o envio da documentação solicitada referente ao projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa **“Concentração de flúor nas unhas e na urina: comparação entre crianças que receberam água naturalmente ou artificialmente fluoretada, sal ou leite fluoretado”**, de sua autoria e Profª Drª Marília Afonso Rabelo Buzalaf, Fábio Correia Sampaio, Rita Villena Sarmiento e Ana Arana foi novamente avaliado e considerado **APROVADO** nesta data.

Comunicamos que por contar com participação estrangeira, referido protocolo de pesquisa será encaminhado para avaliação ética da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP e dessa forma, V.Sª deverá aguardar manifestação daquele órgão para o início da pesquisa.

Sendo o que nos apresenta para o momento, despedimo-nos,

Atenciosamente,

Prof. Dr. José Henrique Rubo
Coordenador

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

APÊNDICE B - Carta de aprovação pelo CONEP (Comissão Nacional de ética em Pesquisa

MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 266/2005

Registro CONEP: 11174 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro CEP: 116/2004

Processo nº 25000.173163/2004-73

Projeto de Pesquisa: "Concentração de flúor nas unhas e na urina: comparação entre crianças que receberam água naturalmente ou artificialmente fluoretada, sal ou leite fluoretado".

Pesquisador Responsável: Dra. Prof.a Marília Afonso Rabelo Buzalef

Instituição: Faculdade de Odontologia Bauru/USP

Área Temática Especial: Cooperação Estrangeira

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 2567/2004, cabem as seguintes considerações:

a) as informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, tendo sido apresentada nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido explicitada a colaboração estrangeira, não cabendo a aprovação do estudo no país de origem.

b) o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Entretanto, as seguintes recomendações devem ser observadas:

- Preencher o item 5 da Folha de Rosto referente à área temática.
- Em se tratando de estudo multicêntrico, embora nacional, informar os demais centros envolvidos.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, com a recomendação acima citada, devendo esta ser acompanhada pelo CEP, para posterior início da pesquisa.

Situação: Projeto aprovado com recomendação.

Brasília, 14 de fevereiro de 2005.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

APÊNDICE C - Termo de consentimento livre e esclarecido

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O flúor é bastante usado na Odontologia para prevenção de cáries. A forma mais comum de uso do flúor, principalmente no Brasil, é a sua colocação na água de abastecimento. Em alguns lugares, a água já é naturalmente fluoretada. Em outros países, como é o caso do Peru, por exemplo, ao invés de o flúor ser colocado na água, ele é colocado no sal de cozinha ou no leite. Neste estudo, compararemos a ingestão, eliminação de flúor pela urina e sua concentração nas unhas das mãos de crianças brasileiras ou peruanas em contato com estes diferentes agentes de flúor. Assim, os senhores pais deverão guardar todas as comidas e bebidas que seus filhos ingerirem durante 48 horas. Os dias desta coleta serão definidos pelos pesquisadores e comunicados a vocês com antecedência. Também toda a urina de seu filho eliminada neste período de 48 horas será guardada em frascos plásticos que nós iremos fornecer. O seu filho ainda realizará uma escovação dentária na presença dos pesquisadores e toda a pasta que não for engolida pela criança será coletada. Setenta e cinco dias após a coleta da dieta, vocês deverão cortar as unhas das mãos e dos pés de seus filhos e guardá-las em recipientes fornecidos por nós. Todos os gastos com as soluções com Flúor, potes para coleta de alimentos, urina e unhas além de outros gastos envolvidos no trabalho, ficarão por conta dos pesquisadores. Nada do que for realizado trará qualquer tipo de risco ou dor para o seu filho. Haverá ressarcimento de despesas relativas à participação na pesquisa, no valor de R\$ 30,00 para cada vez que a coleta da dieta for realizada, a fim de repor os alimentos coletados. Os pesquisadores estarão sempre à disposição para o esclarecimento de quaisquer dúvidas sobre o trabalho de pesquisa, pelo telefone (14)32358246 (Profa Marília). Qualquer reclamação referente aos aspectos éticos da pesquisa deverá ser feita com a Sra. Maristela, pelo Fone (14)3235-8356.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pelo presente instrumento que atende às exigências legais, o Sr. (a) _____, portador da cédula de identidade _____, após leitura minuciosa das informações acima, devidamente explicadas pelos profissionais em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e explicado, firma seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** concordando que seu filho _____ participe da pesquisa proposta.

Fica claro que o responsável pelo sujeito pode, a qualquer momento, retirar seu **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO** e deixar de participar desta pesquisa e ciente de que todas as informações prestadas tornaram-se confidenciais e guardadas por força de sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética Odontológica).

Por estarem de acordo assinam o presente termo.

Bauru-SP, _____ de _____ de _____.

Assinatura do Responsável
pelo Sujeito da Pesquisa

Profª. Drª Marília A. R. Buzalaf
Coordenadora

APÊNDICE D - Declaración de consentimiento bajo conocimiento y libre elección

Universidade de São Paulo

Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 - Bauru-SP - CEP 17012-901 -C.P. 73

PABX (0XX14)235-8000 - FAX (0XX14)223-4679

DECLARACIÓN DE CONSENTIMIENTO BAJO CONOCIMIENTO Y LIBRE ELECCIÓN

El flúor es bastante usado en la Odontología para la prevención de caries dental. La manera más común de utilizarlo en el Brasil es por medio del agua de abastecimiento público. En algunos lugares, el agua ya contiene naturalmente flúor y no es necesario colocarlo y en otros países, como es por ejemplo el caso del Perú, debido a no ser posible colocarlo en el agua, el flúor se adiciona a la sal de cocina y en lugares donde no es posible usar esta sal fluorada se opta por adicionarlo en la leche. En este estudio se comparará la ingestión, eliminación del flúor por la orina y su concentración en las uñas de las manos de niños brasileros y peruanos que se encuentren en contacto con estos diferentes medios de contacto con flúor. Debido a ello, los padres o encargados deberán guardar todas las comidas y bebidas que sus hijos ingieran durante 48 horas. Los días de esta colecta serán definidos por los investigadores y comunicados a Ustedes con anticipación. También toda la orina eliminada por su hijo durante este período de 48 horas, será almacenado en frascos plásticos que les entregaremos. Su hijo también realizará un cepillado dental en la presencia de los investigadores y toda la pasta dental que no sea ingerida por el niño, será colectada. Setenta y cinco días después de la colecta de la dieta, Ustedes deberán cortar las uñas de las manos y de los pies de sus hijos y guardarlas en recipientes que les entregaremos previamente. Todos los gastos de las soluciones con flúor, recipientes para la colecta de alimentos, orina y uñas, además de otros gastos que estén relacionados con el estudio serán afrontados por los investigadores. Ninguno de los procedimientos a ser realizados podrá traer algún tipo de riesgo o dolor a su hijo. Con el propósito de cubrir los gastos ocasionados por la recolección de alimentos, habrá un pago de S/. 30.00 , cada vez que la colecta de la dieta sea realizada. Los investigadores estarán siempre a su disposición para aclarar cualquier duda sobre el trabajo de investigación. Ustedes pueden llamar al telf. (1) 4459651/ 99366400 (Dra Rita) o al (1) 4224151 (Dra Ana). Cualquier reclamo respecto a aspectos éticos podrán ser realizados con la Sra Mercedes al teléfono 319-0000 anexo 2252.

AUTORIZACIÓN DE LIBRE CONSENTIMIENTO Y ESCLARECIMIENTO

Debido a las exigencias de orden legal y ético se presenta este documento, en el que: el Sr. (a) _____, con D.N.I. _____, después de realizada la lectura minuciosa de la información presentada al inicio de este documento y haber sido explicado el proyecto con los mínimos detalles por los profesionales, se encuentra conciente de los servicios y procedimientos a los que intervendrá. No me restan dudas respecto a lo leído y explicado, por lo tanto, al firmar la **AUTORIZACIÓN DE LIBRE PARTICIPACIÓN CON ESCLARECIMIENTO** de saber mi conformidad para que mi hijo (s) _____ participe de la investigación propuesta.

Queda claro que el responsable por el niño puede retirar en cualquier momento su **AUTORIZACIÓN DE LIBRE CONSENTIMIENTO Y ESCLARECIMIENTO** y dejar de participar de la investigación. También es conciente de que todo tipo de información que pueda ser administrada, es de total reserva y confidencial de acuerdo a las bases éticas de la profesión.

Mediante firma mostramos conformidad.

Lima, _____ de _____ de _____.

Firma del Adulto a cargo
del niño

Profª. Drª Rita Villena
Coordinadora - Lima

Profª. Ana Arana
Coordinadora - Trujillo