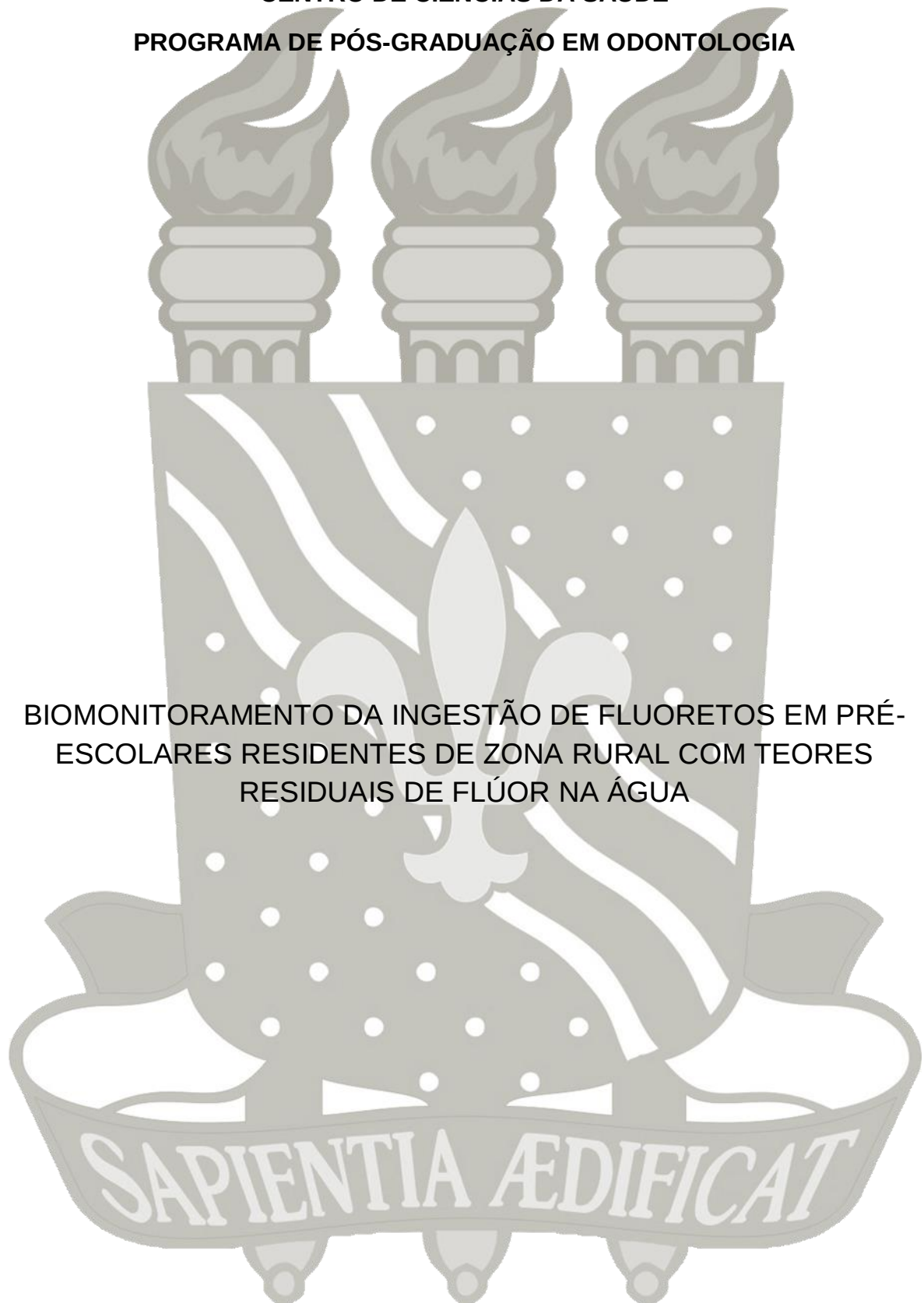


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**BIOMONITORAMENTO DA INGESTÃO DE FLUORETOS EM PRÉ-
ESCOLARES RESIDENTES DE ZONA RURAL COM TEORES
RESIDUAIS DE FLÚOR NA ÁGUA**



EMERSON TAVARES DE SOUSA

**BIOMONITORAMENTO DA INGESTÃO DE FLUORETOS EM PRÉ-
ESCOLARES RESIDENTES DE ZONA RURAL COM TEORES
RESIDUAIS DE FLÚOR NA ÁGUA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração em Epidemiologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio

João Pessoa

2015

S725b Sousa, Emerson Tavares de.
 Biomonitoramento da ingestão de fluoretos em pré-escolares residentes de zona rural com teores residuais de flúor na água / Emerson Tavares de Sousa.- João Pessoa, 2015.
 73f. : il.
 Orientador: Fábio Correia Sampaio
 Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS
 1. Odontologia. 2. Flúor - cinética - estudos de biomonitoramento - avaliação. 3. Água - concentração de fluoreto. 4. Fluorose dentária. 5. Biomarcador.

UFPB/BC

CDU: 616.314(043)

EMERSON TAVARES DE SOUSA

BIOMONITORAMENTO DA INGESTÃO DE FLUORETOS EM PRÉ-
ESCOLARES RESIDENTES DE ZONA RURAL COM TEORES
RESIDUAIS DE FLÚOR NA ÁGUA

Banca Examinadora



Prof. Dr. Fábio Correia Sampaio
Orientador



Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano
Examinador - UFPB



Prof. Dr. Raimundo Aprigio de Menezes Júnior
Examinador Externo

Este trabalho é dedicado a minha mãe que, com muito carinho e apoio, não mediu esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida. Mãe, seu cuidado e dedicação significaram segurança e certeza de que não estou sozinho nessa caminhada.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

À minha mãe, meu infinito agradecimento. Pela compreensão, pelo amor compartilhado e por sempre acreditar em minha capacidade e me estimular. Tenho-lhe como exemplo de mulher e de ser humano. Amo-te muito.

À minha família pelo apoio e por sempre confraternizar quando estou por perto

À meu primo Yago, que foi um porto seguro esses últimos anos de convivência. Por aguentar meus momentos de estresse e hiperatividade, por me estimular e acreditar em meu potencial, pela amizade, por ser um companheiro fiel nos momentos de alegria e tristeza, e por vibrar tanto em meus momentos de vitória.

Agradeço a todos os professores por me proporcionarem o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade no processo de formação profissional. Por tanto que se dedicaram, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender.

À Professor Franklin, pela amizade, pelo exemplo de ser humano e de professor. Obrigado pela paciência, por acreditar em meu

potencial, pelas palavras de apoio e incentivo, e por me fazer enxergar além dos laboratórios e da pesquisa.

Ao Professor Fábio Sampaio, pela paciência, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

Aos Mestrandos lindos: Mayra, Gabrielle, Andressa e Ingrid, que me acompanham desde a graduação, pela companhia e por escutar minhas lamentações e sempre rirem de minhas piadas sem graça. Hoje tenho vocês como uma das minhas grandes conquistas desse mestrado, já que apesar dos anos de convivência na graduação nunca provamos tal proximidade. Muito obrigado meninas, levo vocês pra sempre em meu coração.

As lindas Isabella, Karla e Izaura que tão sutilmente entraram na minha vida e se tornaram grandes amigas, vou morrer de saudades dos nossos momentos juntos, das nossas confraternizações e de nossas baladas da sexta à noite. Quero colocar vocês em minha mala e levar comigo pra sempre.

A Vanessa por sempre ser incansável em me ajudar, por se fazer tão presente e amiga numa fase de extremo apertado. Sinto-me lisonjeado em ter trabalhado com você, que é um exemplo de competência e dedicação. Meu muito obrigado, pela companhia, ajuda e caronas.

A Morgana pela paciência em me ensinar, pelo estímulo cotidiano, pela companhia e amizade, e acima de tudo por sempre me apoiar me fazer enxergar além do que os meus próprios olhos conseguem ver.

A Jaiza por sempre se fazer presente durante esses últimos 7 anos, me estimulando, apoiando e me fazendo sempre buscar mais.

A Jossária pelo apoio, pelas palavras amigas, por ter sido tão companheira durante a seleção do doutorando, sendo peça chave para minha aprovação. Muito obrigado.

A Mônica pela companhia, amizade e por ser sempre tão solícita, me ajudando sempre que precisei.

As minhas amigas Raísa, Thyala, Karol que tornaram minha trajetória bem mais leve, sempre me colocando para cima e tornando meus momentos de lazer mais divertidos e especiais. Amo muito vocês.

A minha turma do Mestrado e a Rebeca, pela companhia, escuta diária, risadas e apoio.

Aos meus amigos por darem sentido ao que faço, por me amarem apesar de tudo, por estarem presentes nos momentos de alegria e tristeza.

A todas as famílias que participaram do estudo, muito obrigado pela colaboração e pelo empenho.

A prefeitura da cidade de São João do Rio do Peixe-PB pelo incentivo a pesquisa e pelo compromisso social com a comunidade Brejo das Freiras.

A turma Labial pela companhia e ajuda.

A Dona Rita pelo esforço, dedicação ao trabalho e pelo exemplo de humildade e amor ao próximo.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa trajetória, o meu muito obrigado.

*“Gaste mais horas realizando que
sonhando, fazendo que planejando, vivendo
que esperando [...]”*

Luiz Fernando Veríssimo

RESUMO

Esse trabalho visa biomonitorar a ingestão de fluoretos em pré-escolares residentes de zona rural com teores residuais de flúor e em cidade não fluoretada, estimando o risco de fluorose e correlacionando à marcadores de exposição. Trinta pré-escolares de 24-71 meses, divididos em dois grupos, um com residentes de uma zona rural com alta concentração de fluoreto na água de abastecimento (G1-Brejo das Freiras/ São João do Rio do Peixe-PB) e outro representando uma cidade sem fluoretação (G2-João Pessoa-PB). Os voluntários foram monitorados quanto à ingestão (água, dieta sólida e líquida, e dentifrício) e retenção de flúor. A excreção de flúor em 24 horas, assim como amostras de unhas serviram como biomarcadores. Análises comparativas, de regressão e correlação foram significantes quando $p \leq 0,05$. A ingestão média de fluoreto foi $0,18 \pm 0,14$ (G1) e $0,05 \pm 0,04$ (G2) mg/kg/dia, $p < 0,05$. Em G1 há maior contribuição da água na ingestão diária ($0,1 \pm 0,07$ mg/kg/dia), ao contrario de G2, determinado pelo dentifrício ($0,04 \pm 0,04$ mg/kg/dia). A retenção foi diretamente proporcional à concentração de flúor na água em G1, seguindo a tendência da Fração Urinária de Excreção (FUFE), similar nos dois grupos. Observou-se correlação entre o flúor nas unhas das mãos e dos pés, sendo as unhas dos pés mais sensíveis às diferenças entre os grupos. Concluiu-se que há uma elevada ingestão de fluoretos em região com teores residuais de flúor correlacionadas à sensibilidade dos biomarcadores.

Palavras-chave: Flúor. Risco. Fluorose Dentária. Biomarcador

ABSTRACT

This work aimed biomonitoring intake of fluoride in preschool rural residents with residual fluoride levels and non-fluoridated city, estimating the risk of fluorosis and correlating exposure biomarkers. Thirty preschoolers 24-71 months, divided into two groups, one with residents of a rural area with a high concentration of fluoride in the water supply (G1-Brejo das Freiras/ São João do Rio do Peixe-PB) and another representing a city without fluoridation (G2-João Pessoa-PB). The volunteers were monitored for intake (water, solid and liquid diet, and dentifrice) and fluorine retention. The fluorine excretion in 24 hours, and samples fingernails served as biomarker. Comparative analysis, regression and correlation were significant when $p \leq 0.05$. The average fluoride intake was 0.18 ± 0.14 (G1) and 0.05 ± 0.04 (G2) mg/kg/day, $p < 0.05$. In G1 there were water contribution in daily intake (0.07 ± 0.1 mg/kg/day), as opposed to G2 determined according to the dentifrice (0.04 ± 0.04 mg/kg/day). Retention was directly proportional to the concentration of fluoride in the water in G1, following the trend of Urinary Excretion Fraction (FUFE), similar in both groups. A correlation between fluoride in the fingernails and toes, and the nails of the feet more sensitive to differences between the groups. It was concluded that there is a high intake of fluoride in the region with residual fluoride levels correlated with sensitivity of biomarkers.

Keywords: Fluoride. Risk. Dental fluorosis. Biomarker.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[**F**] Concentração de Flúor

[**FST**] Concentração de Flúor Solúvel Total

µg Micrograma

FUFE Fração Urinária de Excreção de Flúor

G1 Grupo 1: Localidade com teores residuais de fluoretos

G2 Grupo 2: Localidade sem fluoretação

HF Ácido Fluorídrico

HMDS Hexametildisiloxano

Kg Quilograma

mg Miligrama

mL Mililitros

NaF Fluoreto de Sódio

NaOH Hidróxido de Sódio

°C Grau Celsius

pH Potencial Hidrogeniônico

SB Brasil Levantamento Epidemiológico Nacional em Saúde Bucal

SPSS *Statistical Package for the Social Sciences*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
1. CAPÍTULO 1.....	5
Resumo	6
Abstract	7
Introdução	8
Materiais e Métodos	9
Resultados	12
Discussão	18
Conclusão	22
Referências	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS	27
Considerações éticas	27
Local de estudo	27
Delineamento amostral	28
Delineamento da pesquisa	29
Obtenção das Amostras	29
Dieta (água, sólidos e líquidos)	29
Dentifrício	30
Urina	31
Unhas.	32
Procedimentos analíticos do Flúor	33
Análise Indireta	34
Análise Direta.....	36
Análise estatística	36
3. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS*	39
APÊNDICE	47
Apêndice 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	47
Apêndice 2: Manuais de orientação e treinamento para coleta de material para pacientes menores de 07 anos (dieta, creme dental, saliva, urina) ...	48
ANEXO	52
Anexo 1: Instruções aos Autores da Revista Cadernos de Saúde Pública	52

Anexo 2: Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa	58
---	-----------

INTRODUÇÃO

O flúor é potencialmente conhecido por seu caráter protetor e estabilizador de lesões cariosas, fornecendo um aparato bioquímico importante em medidas de saúde bucal individual e coletiva, contribuindo como substrato para trocas iônicas em reações de desmineralização-remineralização na interface esmalte/dentina-biofilme (ROŠIN-GRGET et al., 2013; CLARK et al., 2014). No entanto, se por um lado há correlação positiva entre a redução da prevalência e severidade de cárie em crianças e o acesso a produtos fluoretados, por outro, quando em excesso, pode também apresentar efeitos negativos sobre os tecidos em fase de mineralização, causando a fluorose dentária ou óssea (IHEOZOR-EJIOFOR et al., 2015; NEWBRUN, 2010; SCHWENDICKE et al., 2015). A fluorose dentária, inicialmente descrita por Dean (1934), resulta da ingestão excessiva de flúor durante o período da amelogenese, representando risco apenas nas fases de desenvolvimento dos dentes permanentes (DENBESTEN; LI, 2011).

O desenvolvimento do esmalte fluorótico ocorre devido à retenção de amelogeninas do esmalte pelo fluoreto, que prejudicam o crescimento do cristal de hidroxiapatita, importante na fase de maturação do esmalte (WEI et al., 2013). Um achado morfológico importante visto no esmalte fluorótico é a presença de opacidades e/ou descolorações acastanhados, prejudicando, esteticamente e funcionalmente a depender do grau e da percepção do paciente (MOIMAZ et al., 2015). A prevalência e severidade de fluorose dentária dependem de fatores ambientais e individuais tais como: tempo de exposição à dose tóxica, resposta individual (metabolismo e predisposição genética), peso, atividade física, fatores nutritivos e de crescimento do osso (ALVAREZ et al., 2009; BUZALAF; WITHFORD, 2011; ARIF et al., 2013).

No Brasil, segundo dados do SB Brasil (2012) realizado em 2010 nas capitais, a fluorose dentária acomete 16,7% da população aos 12 anos, entretanto, quando se avalia realidades particulares, com métodos variados, tem-se um quadro de maior prevalência dessa doença, principalmente em locais com teores residuais de flúor, que representam zonas endêmicas (RANGO et al., 2012; COSTA et al., 2013; FREITAS et al., 2013; JORDÃO et al., 2015; MOIMAZ et al., 2015; IRIGOYEN-CAMACHO et al., 2016).

Inúmeras pesquisas têm sido realizadas, modificando paradigmas e estabelecendo uma relação mais segura no uso de fluoretos, buscando maior poder cariostático com menor risco (BARBIER et al., 2010; DENBESTEN; LI, 2011; ROŠIN-GRGET et al., 2013; CAREY 2014; JARQUÍN-YAÑEZ et al., 2015). Sendo assim, estudos de biomonitoramento avaliam a cinética do flúor, relacionando fatores ambientais a quantidade de flúor ingerido e retido, assim como a fração urinária de excreção de fluoreto – FUFE (RANGO et al., 2014; ABUHALOOB, et al., 2015).

A cinética do flúor no organismo inicia com a absorção no trato gastrointestinal, por meio de difusão simples no estômago (sob a forma de ácido não dissociado - fluoreto de hidrogênio), e no intestino delgado por transportadores dependentes de gradiente de fluoreto. A taxa de absorção de fluoreto no estômago depende do pH, e da solubilidade do composto de fluoreto ingerido, sendo o fluoreto de sódio (NaF) e fluoreto de hidrogênio (HF) os mais solúveis. Assim que o flúor é absorvido, os níveis de flúor no plasma aumentam (em 10 minutos), atingindo níveis máximos em 60 minutos, com retorno aos níveis basais é alcançado dentro de 11 a 15 horas. Quando o flúor atinge o plasma, é rapidamente depositado nos tecidos mineralizados ou excretado na urina e em uma quantidade mínima nas fezes (MARTINEZ-MIER, 2011).

Tanto o fluxo urinário e o pH estão envolvidos na regulação da excreção renal de fluoreto. A proporção de fluoreto ingerido que é excretada na urina é influenciada pela idade, metabolismo e fatores comportamentais. Em adultos e crianças, dietas ricas em vegetais tornam o pH urinário mais alcalino, enquanto que dietas ricas em proteínas levam a acidificação da urina. Essas mudanças no pH urinário modificam a FUFE (MARTINEZ-MIER, 2011; AYLWARD et al., 2015).

Vários estudos de biomonitoramento têm sido publicados e evidenciam aspectos que possam prever o risco para fluorose dentária em pré-escolares residentes de localidades com e sem fluoretação (RODRIGUES et al., 2009; VILLA et al., 2010; MARTINS et al., 2011; ZOHORI et al., 2012; ZOHORI et al., 2013; AUGUSTSSON e BERGER, 2014; AYLWARD et al., 2015; LEVY et al., 2015; LIMA et al., 2015). Entretanto, formas alternativas de sinalizar eventos em sistemas biológicos são dadas por meio do uso de biomarcadores, sendo essa uma alternativa menos onerosa e com maior praticidade, facilmente empregada em estudos epidemiológicos.

Existem três tipos de biomarcadores para flúor: de efeito (fluorose dentária e óssea), de susceptibilidade (desnutrição, metabolismo do cálcio e magnésio, condição renal e genética), de exposição aguda (plasma, soro, saliva e urina) e de exposição crônica/subcrônica (osso, dentes, cabelos e unhas) (OMS, 1994; BUZALAF et al., 2011; ANTONIJEVIC et al., 2015). Nosso estudo utilizou os biomarcadores de exposição com possibilidade de prever o comportamento do íon flúor no mesmo momento que estava sendo realizada a estimativa da ingestão do flúor (urina) e em momentos anteriores (unhas).

A concentração de flúor nas unhas tem sido amplamente debatida quanto a seu poder preditivo quando no estudo do risco de fluorose dentária em crianças (FUKUSHIMA et al., 2009; BUZALAFF et al., 2011; PESSAN; BUZALAF, 2011; BUZALAFF et al., 2012), sendo uma alternativa interessante para quando se quer isolar a exposição ao fluoreto sem a interferência da ingestão nas últimas horas, diferenças na filtração glomerular, pH e fluxo urinário, como ocorre na urina (WHITFORD, 2005). Existem aspectos inerentes a natureza das fontes de ingestão que podem prejudicar a interpretação dos biomarcadores, que tem sido utilizado com maior sensibilidade em populações residentes de regiões com altas concentrações de flúor na água (FUKUSHIMA et al., 2009). A concentração de flúor em unhas com melhor poder de previsão para fluorose dentária é de 2,0 µg F/ mg (BUZALAFF et al., 2012).

Em regiões subdesenvolvidas e de climas tropicais, a dose de flúor potencialmente capaz de causar prejuízo estético é de 0,07 mg/kg/dia (SKOTOWSKI; HUNT; LEVY, 1995), sendo a contribuição majoritária do dentifrício e da água, quando fluoretada (MCGRADY et al., 2014; ZOHOORI et al., 2014; LIMA et al., 2015). Galagan e Vermillion (1957), em seu clássico estudo intitulado *Determining Optimum Fluoride Concentrations*, estabeleceram a concentração de flúor ideal, a partir de uma fórmula que considerou o flúor ingerido através da água, a temperatura de cada localidade e o peso corporal do indivíduo. Os autores concluíram que a concentração ideal para qualquer comunidade estaria dentro da faixa 0,7 – 1,2 mg/ mL, geralmente, recomendada para a fluoretação.

No Brasil, a Portaria 2.914/2011, do Ministério da Saúde, determina que a concentração máxima do flúor para consumo humano seja de 1,5 mg/ mL. No entanto, como o consumo de água varia com a sede, e esta com a temperatura, esse valor deve observar a legislação específica vigente em cada local (BRASIL,

2004). Ao considerar os critérios mencionados e as condições climáticas da região Nordeste e, mais especificamente, do estado da Paraíba, estabeleceram-se concentrações de íon fluoreto variando entre 0,6 e 0,7 mg/ mL, como ideais em água para consumo humano (CECOL/USP, 2011). As fontes de águas profundas de algumas áreas do sertão da Paraíba possuem teores residuais de fluoretos acima do permitido, variando de 1,7 a 9,2 mg/ mL e resultando em fluorose (CARVALHO et al., 2007; SAMPAIO et al., 2010). Estima-se uma prevalência de fluorose dentária em mais de 61% quando a água atinge 2 mg/ mL (SOUZA et al., 2013).

Sendo assim, nosso grupo de pesquisa em uma série de trabalhos vem avaliando a questão da fluorose dentária em uma comunidade endêmica no interior da Paraíba, por meio do desenvolvimento de pesquisas clínicas e laboratoriais, além de trabalhar no desenvolvimento de dispositivos tecnológicos eficazes na redução da concentração de flúor na água. Então, o objetivo desse trabalho foi biomonitorar a ingestão de fluoretos em pré-escolares residentes de zona rural com teores residuais de flúor e em cidade não fluoretada, estimando o risco de fluorose e correlacionando à marcadores de exposição.

Dessa forma, almeja-se fornecer parâmetro de comparação com estudos anteriores realizados na mesma comunidade (FUKUSHIMA et al., 2009; BUZALAF et al., 2011; MARTINS et al., 2012; LIMA JR, 2012; SOUZA et al., 2013; SOUZA, 2013), e contribuir para o melhor entendimento da ingestão de fluoretos em região rural endêmica, que utilizam a água de poço para suas expensas diárias, sendo essa uma realidade científica diferenciada e atual principalmente em regiões de clima semiárido e com baixo índice pluviométrico. Adicionalmente, a pesquisa viabiliza a documentação desses dados como *baseline* para o controle da ingestão de fluoretos na região não fluoretada, localizada na capital do estado da Paraíba, local com processo de implementação de fluoretação de águas em adiantado processo.

1. CAPÍTULO 1

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Cadernos de Saúde Pública” qualis A2(ANEXO 1)

Biomonitoramento da ingestão de fluoretos em Pré-Escolares Residentes de Zona Rural com Teores Residuais de Flúor

Biomonitoring of fluoride intake in Preschooler Rural Residents with Residual Levels of Fluoride

Emerson Tavares de Sousa^a, Vanessa Feitosa Alves^b, Fábio Correia Sampaio^c,
Franklin Delano Soares Forte^d

^a Mestrando em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal da Paraíba, Endereço: Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco, João Pessoa - PB, 58051-900. Telefone: [\(05583\)3216-7795](tel:(05583)3216-7795). E-mail: etsemerson@yahoo.com.br. Contribuição: Responsabilizou-se pela coleta, análise, interpretação dos dados, e escrita do artigo.

^b Mestranda em Ciências Odontológicas pela Universidade Federal da Paraíba, Endereço: Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco, João Pessoa - PB, 58051-900. Telefone: [\(05583\)3216-7795](tel:(05583)3216-7795). E-mail: vanessafalves@hotmail.com. Contribuição: Trabalhou na análise e interpretação dos dados, e escrita do artigo.

^c Professor Associado do Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba, Endereço: Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco, João Pessoa - PB, 58051-900. Telefone: [\(05583\)3216-7795](tel:(05583)3216-7795). E-mail: fcsampa@gmail.com. Contribuição: Trabalhou na concepção e projeto de pesquisa, e revisão crítica da estatística e conteúdo do artigo.

^d Professor Associado do Departamento de Clínica e Odontologia Social da Universidade Federal da Paraíba, Endereço: Cidade Universitária, s/n - Castelo Branco, João Pessoa - PB, 58051-900. Telefone: [\(05583\)3216-7795](tel:(05583)3216-7795). E-mail: fdsforte@terra.com.br. Contribuição: Trabalhou na concepção e projeto de pesquisa, e revisão crítica da estatística e conteúdo do artigo.

Resumo

Objetivou-se biomonitorar a ingestão de fluoretos em pré-escolares residentes de zona rural com teores residuais de flúor (G1) e cidade não fluoretada (G2). Trinta pré-escolares foram divididos em G1 e G2, e monitorados quanto à ingestão de flúor pelo método do prato duplicado. A excreção de flúor em 24 horas, assim como amostras de unhas serviram como biomarcador. Análises comparativas, de correlação e regressão foram significantes quando $p \leq 0,05$. A ingestão média de fluoreto foi $0,18 \pm 0,14$ (G1) e $0,05 \pm 0,04$ (G2) mg/kg/dia, $p < 0,05$. Em G1 há maior contribuição da água na ingestão diária ($0,1 \pm 0,07$ mg/kg/dia), ao contrario de G2, determinado pelo dentifrício ($0,04 \pm 0,04$ mg/kg/dia). A retenção foi diretamente proporcional à concentração de flúor na água em G1, seguindo a tendência da FUFEE, similar nos dois grupos. Houve correlação entre o flúor nas unhas das mãos e dos pés, sendo as unhas dos pés mais sensíveis às diferenças entre os grupos. Conclui-se então há uma elevada ingestão de fluoretos em zonas com teores residuais de flúor correlacionadas à sensibilidade dos biomarcadores.

Palavras-chave: Flúor. Risco. Fluorose Dentária. Biomarcador

Abstract

It aimed to biomonitoring the fluoride intake in preschool rural residents with residual fluoride content (G1) and city not fluoridated (G2). Thirty preschool children were divided into G1 and G2, and monitored for fluoride intake by duplicate plate method. The fluoride excretion in 24 hours, and samples fingernails served as biomarker. Comparative analysis, correlation and regression were significant when $p \leq 0.05$. The average fluoride intake was 0.18 ± 0.14 (G1) and 0.05 ± 0.04 (G2) mg/kg/day, $p < 0.05$. In G1 there were water contribution in daily intake (0.07 ± 0.1 mg/kg/day), as opposed to G2 determined according to the dentifrice (0.04 ± 0.04 mg/kg/day). Retention was directly proportional to the concentration of fluoride in the water in G1, following the trend of FUFEE, similar in both groups. There was a correlation between fluoride in the fingernails and toes, and the nails of the feet more sensitive to differences between the groups. In conclusion then there is a high intake of fluoride in areas with residual fluoride levels correlated with sensitivity of biomarkers.

Keywords: Fluoride. Risk. Dental fluorosis. Biomarkers.

Introdução

A fluorose dentária, inicialmente descrita por Dean ¹, resulta da ingestão excessiva de flúor durante a amelogenese, representando risco apenas nas fases de desenvolvimento da coroa dos dentes permanentes ². Esse processo ocorre devido à retenção de amelogeninas do esmalte pelo fluoreto, prejudicando o crescimento do cristal de hidroxiapatita, importante na fase de maturação do esmalte. Clinicamente, o esmalte fluorótico se apresenta demarcado por opacidades e/ou descolorações acastanhados, prejudicando a estética e, em casos mais severos, a função do aparelho estomatognático ³.

A prevalência e severidade de fluorose dentária dependem de fatores ambientais e individuais tais como: tempo de exposição à dose tóxica, resposta individual (metabolismo e predisposição genética), peso, atividade física, fatores nutritivos e de crescimento do osso ^{4,5,6}. Destes, o que exerce maior influência na determinação da fluorose dentária é o tempo de exposição à dose tóxica, sendo atribuído o valor de 0,07 mg/kg/dia ⁷, no qual a contribuição majoritária é do dentifrício, quando ingerido, e da água, quando fluoretada ^{8,9,10}. Tem sido descrito que um quadro de maior prevalência em locais com teores residuais de flúor, que representam zonas endêmicas ^{3,11,12,13}.

Sendo assim, estudos de biomonitoramento avaliam a cinética do flúor, relacionando fatores ambientais à quantidade de flúor ingerido e retido, assim como a fração urinária de excreção de fluoreto – FUFE ^{11,14}. Nesse sentido, estudos têm sido publicados e evidenciam aspectos que possam prever o risco para fluorose dentária em pré-escolares residentes de localidades com e sem fluoretação ^{10,15,16,17,18,19,20,21}. Então, o objetivo desse trabalho foi biomonitorar a ingestão de fluoretos em pré-escolares residentes de zona rural com teores residuais de flúor e em cidade não fluoretada, estimando o risco de fluorose e correlacionando à marcadores de exposição.

Materiais e Métodos

Esse estudo foi conduzido de acordo com as orientações da Declaração de Helsinki e todos os procedimentos envolvendo seres humanos foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal da Paraíba (protocolo 0544/14). Como o estudo trata de menores, todos os tutores legais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foi desenvolvido em uma zona rural com teores residuais de fluoreto na água de abastecimento no nordeste brasileiro (G1) e em uma cidade não-fluoretada (G2). Os voluntários foram monitorados quanto à ingestão (águas, dieta sólida e líquida, e dentifrícios) e excreção de flúor (urina), e retenção em unhas. Participaram do estudo 30 pré-escolares de 24-71 meses, obtidos por conveniência.

Amostras de Água e Dieta

Água e dieta foram coletados em um dia da semana pela técnica de prato duplicado. As instruções foram dadas aos pais quanto ao método de coleta de todos os alimentos sólidos, líquidos, e água num período de 24 horas ²². Enfatizou-se a importância da manutenção dos hábitos dietéticos usuais para reproduzir fielmente a exposição ao flúor.

Amostras de Saliva Expectorada e Limpeza de Escova Dental

A avaliação da ingestão pelo dentifrício foi realizada conforme descrito por Guha-Chowdhury, Drummond e Smillie ²². As coletas foram realizadas na casa do voluntário, procurando simular ao máximo as condições usuais. No momento da coleta o dentifrício foi colocado na escova pelo pai ou pela criança e pesado dando informação da quantidade de flúor colocada na escova. A escovação foi realizada, sob observação do examinador, e toda saliva expectorada foi coletada e analisada para flúor. A escova dental foi lavada abundantemente com quantidade conhecida de água deionizada. A quantidade de flúor deixada na escova e expelida será somada, fornecendo a quantidade total não deglutida, que foi deduzida da concentração de flúor inicial (valor de flúor solúvel total do dentifrício multiplicado pelo peso de dentifrício na escova) e multiplicada pela frequência de escovação, para estimar a exposição diária.

Amostras de Urina

Nos mesmos dias em que as estimativas de ingestão de flúor foram realizadas, coletaram-se amostras de 24 horas de urina. Os participantes foram orientados a fazerem suas necessidades em potes pré-lavados com água deionizada e fornecidos pelo pesquisador. No dia seguinte, o pesquisador coletou os potes com o material, e mediu o volume de urina excretado nas 24 horas com auxílio de uma proveta graduada de vidro e retirou 15 mL para análise de flúor.

Amostras de Unhas

Os voluntários foram orientados a não cortar as unhas e evitar o uso de esmalte ²³, por cerca de 2 semanas das coletas. Os recortes de unhas foram obtidos dos dedos da mão, assim como dos pés. Cada corte de unhas foi limpo com água deionizada usando uma escova interdental, colocados em ultrassom por 10 minutos e secos a 60 ± 5 °C, para posterior pesagem e análise.

Análise das Amostras

Análises dos alimentos sólidos e líquidos, dentifrício, saliva e unhas foram realizadas pelo método de leitura indireta, por meio da técnica do hexametildisiloxano – HMDS ¹⁶. As análises da água e da urina foram obtidas por leitura direta. Um eletrodo flúor-íon-específico (BN Modelo 9409, Orion, Cambridge, MA, EUA) e um potenciômetro (Modelo 720 A Orion) foram usados para medições de flúor. Curvas de calibração foram executadas, usando-se amostras padrão conhecidas, contendo entre 0,1 a 6,4 µg de flúor, para análises diretas e 0,019 a 1,9 µg de flúor para análises indiretas. As leituras em milivolts foram convertidas para concentração iônica de flúor por meio de uma curva padrão de correlação ($r^2 > 0,99$).

Análise Estatística

Para a análise estatística foram usados os softwares *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 e o *GraphPad Prism* 6. Os dados brutos foram inicialmente tabulados e convertidos de µg para valores de mg/ kg/ dia (dose diária). A conversão foi realizada por meio da multiplicação dos valores de flúor encontrados pelo peso da amostra obtida em 24 horas, e dividindo pelo peso da criança multiplicado por 1000. A Fração Urinária de Excreção de Flúor (FUFE) foi calculada em (%) como produto da divisão F excretado sobre F ingerido em

mg/ kg/ dia, multiplicado por 100. O flúor retido foi calculado subtraindo-se o valor de F ingerido pelo excretado em mg/ kg/ dia.

Os dados foram analisados por estatística descritiva e inferencial. A normalidade foi obtida pelo teste de Shapiro-Wilk para amostras menores que 50 casos. Análises comparativas entre as médias de ingestão e excreção foram obtidas pelo teste Mann-Whitney e t de Student, a depender da normalidade. O teste de Wilcoxon foi usado para comparar aos pares para as diferentes fontes de ingestão de fluoretos, assim como para aferir a diferença entre as concentrações de flúor em unhas dentro de um mesmo grupo.

O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para medir a intensidade da relação entre variáveis como a ingestão, excreção de flúor e FUFÉ, assim como a retenção de flúor em unhas. A regressão linear multivariada foi executada a fim de verificar as medidas do efeito de cada variável estudada em relação aos resultados.

A magnitude de efeito “*Cohen effect size*” foi calculada para o teste de diferença Mann-Whitney (magnitude de efeito “d”) e para a regressão linear múltipla (magnitude de efeito “r²”). Para a magnitude de efeito “d” utilizou software *Excel* e cálculo segundo Leech et al.²⁴:

$$d = \frac{M_1 - M_2}{0,75 - \left(\frac{DIQ_1 - DIQ_2}{2} \right)} \quad (1)$$

onde M₁ e M₂ é a mediana de G1 e G2, respectivamente e DIQ₁ e DIQ₂, as distâncias interquartis. A magnitude de efeito “r²” foi obtida pelo Programa SPSS. Valores de magnitude d superiores a 0,5 foram considerados alto, enquanto menores que 0,2 foram considerados desprezíveis.

O risco de fluorose foi aferido usando-se variáveis dicotômicas “< 0,07 ou ≥ 0,07 mg/kg/mL” e “> 2,0 ou < 2,0 µg” de flúor, para flúor ingerido total e retido em unhas, respectivamente. Esses dados serviram para medir o risco na amostra estudada e para aplicação do teste de concordância Kappa. Para todos os testes, opta-se como significativo o valor de p ≤ 0,05.

Resultados

A idade média dos voluntários foi de $3,73 \pm 1,27$ e $4,4 \pm 1,45$ anos para G1 e G2, respectivamente. A concentração média de fluoretos na água foi de $2,08 \pm 1,04$ mg/L em G1 e $0,01 \pm 0,01$ mg/L em G2 ($p=0,00$). A quantidade de água (mL) e de alimentos (mg) ingeridos não foram significativamente diferentes ($p>0,05$) nos dois grupos. Dos fatores comportamentais que poderiam estar associados à ingestão de flúor pelo dentífrico, a frequência de escovação e o peso do dentífrico na escova dental foram significantes ($p<0,05$) – TABELA 1.

TABELA 1: Análise contextual envolvida na Ingestão e Excreção total de Fluoretos

	G1	G2	p valor
Idade	$3,73 \pm 1,27$	$4,40 \pm 1,45$	0,93 ^b
[F] na água (mg/mL)	$2,38 \pm 1,63^*$	$0,03 \pm 0,04^*$	0,00 ^a
Água ingerida (mL)	$797 \pm 495,79$	$671,73 \pm 418,16$	0,46 ^b
Dieta Sólida (mg)	$477,15 \pm 309,59$	$469,01 \pm 219,92$	0,93 ^b
Dieta Líquida (mg)	$563,59 \pm 368,75$	$553,74 \pm 275,47$	0,74 ^b
Urina excretada (mL)	$311,78 \pm 111,84$	$474,60 \pm 140,09$	0,02 ^b
[FST] no dentífrico (mg/mL)	$0,92 \pm 0,59$	$1,00 \pm 0,51$	0,61 ^a
Nº de Escovações	$1,58 \pm 0,51$	$2,23 \pm 0,72$	0,02 ^a
Peso do dentífrico na escova dental (mg)	$0,57 \pm 0,32$	$0,81 \pm 0,51$	0,02 ^b

^aTeste Mann-Whitney ^bTeste T de Student

[F] Concentração de Flúor; [FST] Concentração de Flúor Solúvel Total

A Tabela 2 representa a dose diária média de fluoretos em função da dieta sólida, dieta líquida, água, dentífrico e ingestão total. Em G1 há uma maior contribuição da água na ingestão diária ($0,1 \pm 0,07$ mg/kg/dia), ao contrario de G2, o qual é determinado pelo dentífrico ($0,04 \pm 0,04$ mg/kg/dia). A ingestão total média de fluoreto foi $0,18 \pm 0,13$ e $0,05 \pm 0,01$ mg/kg/dia em G1 e G2 ($p<0,05$), respectivamente. Na análise intragrupo observa-se que em G1 não há diferença estatística entre a ingestão de flúor pela dieta sólida e líquida, assim como pela dieta e dentífrico, entretanto, em G2 a similaridade de *rankings* ocorre apenas entre as dietas sólida e líquida ($p>0,05$) - GRÁFICO 1. O modelo de regressão

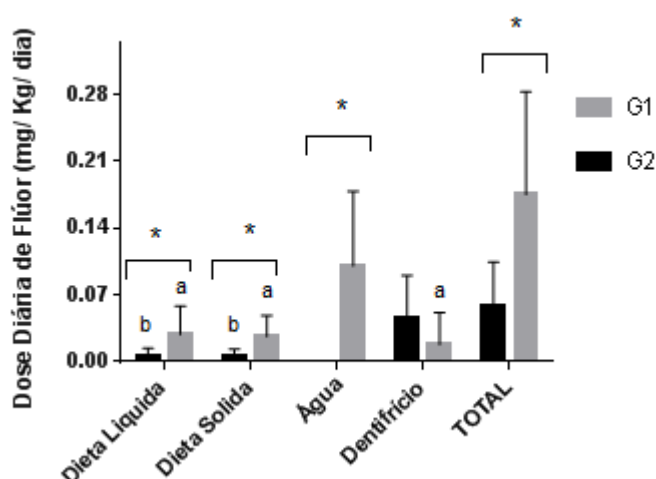
linear multivariada ($r^2 = 0,84$ e $p = 0,000$) prevê que para cada aumento em uma unidade da variável previsora (água) ocorre o aumento de $0,07 \pm 0,01$ mg de flúor na ingestão diária (TABELA 3).

TABELA 2: Ingestão total de fluoretos provenientes da dieta, água e dentifrício em regiões com teores residuais de fluoretos (G1) e sem fluoretação de águas (G2).

	G1			G2			p valor *	Magnitude do Efeito
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP		
Dieta Líquida	0,028	0,021	0,028	0,007	0,004	0,008	0,00	1,17
Dieta Sólida	0,028	0,024	0,021	0,005	0,004	0,005	0,00	1,17
Água	0,101	0,102	0,077	0,0007	0,0005	0,0007	0,00	1,92
Dentifrício	0,023	0,005	0,051	0,043	0,032	0,043	0,06	0,96
Total	0,181	0,138	0,132	0,057	0,044	0,045	0,00	1,08

*Teste Mann-whitney entre G1 e G2.

GRÁFICO 1: Dose diária de fluoretos em relação a dieta sólida e líquida, água e dentifrício em regiões com teores residuais de fluoretos (G1) e sem fluoretação de águas (G2)



^{a,b} Teste de Wilcoxon entre dieta sólida e líquida, água e dentifrício em cada um dos grupos aos pares quando $p \geq 0,05$; * Teste Mann-whitney entre G1 e G2 significativo ($p \leq 0,05$).

TABELA 3: Regressão linear múltipla para previsores da ingestão total de fluoretos em pré-escolares residentes de região com teores residuais de flúor na água e não fluoretada.

	Beta	Desvio Padrão	Valor de p
Idade	-0,003	0,011	0,77
Gênero	-0,014	0,021	0,51
Peso (Kg)	-0,002	0,004	0,63
[F] Água – mg/dia	0,077	0,014	0,00
[F] Dieta – mg/dia	0,039	0,027	0,16
[F] Dentifrício– mg/dia	0,032	0,013	0,02
Constante	0,079	0,061	

Variável Dependente: Flúor Total Ingerido (mg/dia)
 $r^2 = 0,84$; Valor de p (ANOVA) = 0,000

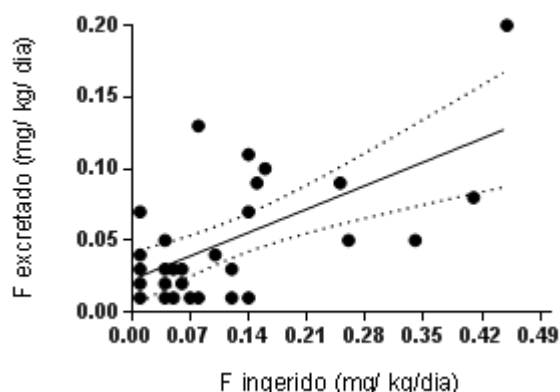
Diferenças entre as médias de G1 e G2 foram significantes nas medidas de excreção e retenção de flúor em mg/kg/dia, com uma maior retenção de flúor em crianças da região com teor residual de flúor na água de abastecimento. Apesar de haver uma similaridade entre os valores de FUFE nos dois grupos, o G1 possui valores menores (TABELA 2). O Gráfico 2 mostra que existe correlação entre o flúor ingerido e o excretado em mg/kg/dia, com $r = 0,70$ e $p=0,00$, assim como entre o flúor ingerido (mg/kg/dia) e a FUFE (%), $r = -0,40$ e $p=0,02$ (GRÁFICO 3).

TABELA 4: Dose total diária de flúor da dieta, água e dentifrício, flúor excretado e retido, fração urinária (FUFE) e [F] em unhas de pré-escolares de regiões com teores residuais de fluoretos (G1) e sem fluoretação de águas (G2)

	G1			G2			p valor*	Magnitude do Efeito
	Média	Mediana	DP	Média	Mediana	DP		
Flúor Total Ingerido	0,18	0,14	0,11	0,05	0,04	0,04	0,00	1,08
Flúor Excretado	0,07	0,07	0,04	0,02	0,02	0,02	0,00	1,08
Flúor Retido	0,11	0,11	0,09	0,03	0,02	0,04	0,00	3,01
FUFE (%)	38	40	16	46	45	33	0,85	0,10
[F] Unhas das Mãos	2,87	3,20	1,08	1,82	1,65	0,85	0,11	1,50
[F] Unhas dos Pés	2,85	2,63	1,35	1,46	1,43	0,27	0,03	1,31

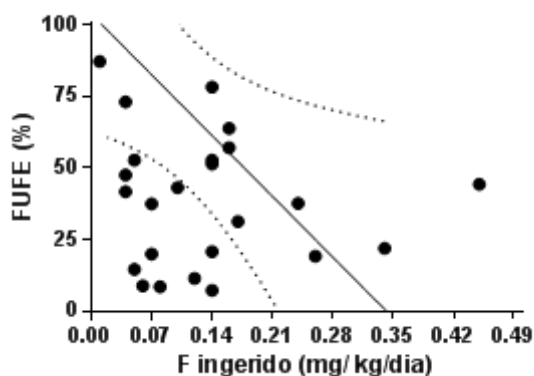
*Teste Mann-whitney entre G1 e G2.

GRÁFICO 2: Correlação entre flúor excretado e ingerido (mg/kg/dia) em regiões com teores residuais de fluoretos e sem fluoretação de águas



Coeficiente de Correlação de Pearson 0,70 ($p < 0,0001$)

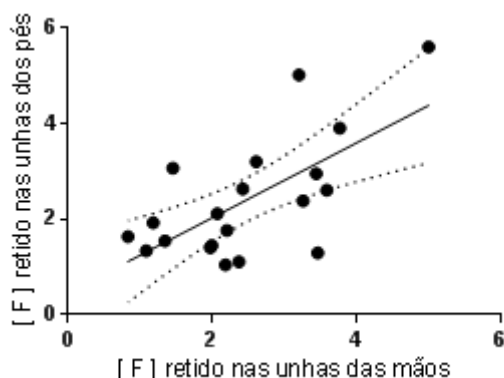
GRÁFICO 3: Correlação entre flúor ingerido e a FUFÉ (%) em regiões com teores residuais de fluoretos e sem fluoretação de águas



Coeficiente de Correlação de Pearson - 0,40 ($p = 0,02$)

Apesar da correlação entre a concentração de flúor nas unhas das mãos e dos pés ser observada ($r=0,66$ e $p=0,001$) - GRÁFICO 4. Não foram observadas diferenças entre as concentrações de flúor encontradas nas unhas das mãos e dos pés na análise intragrupo de cada localidade (teste de Wilcoxon com $p > 0,05$).

GRÁFICO 4: Correlação entre flúor retido nas unhas das mãos e dos pés em regiões com teores residuais de fluoretos e sem fluoretação de águas



Coeficiente de Correlação de Pearson 0,66 ($p=0,001$)

Na tabela 2 a diferença entre a retenção de flúor nas unhas dos pés foi significativa, com média de $2,85 \pm 1,35$ e $1,46 \pm 0,27$ em G1 e G2, respectivamente. Adicionalmente o modelo de regressão linear multivariada comprova que 64% da variabilidade da retenção de flúor nas unhas dos pés pode ser explicado pelo modelo de regressão proposto na tabela 5.

TABELA 5: Regressão linear múltipla para previsores da retenção de flúor em unhas de pré-escolares residentes de região com teores residuais de flúor na água e não fluoretada.

	Unhas das Mãos (μg)			Unhas dos Pés (μg)		
	beta	Desvio Padrão	Valor de p	beta	Desvio Padrão	Valor de p
Idade	0,15	0,37	0,68	-0,32	0,26	0,23
Gênero	-0,43	0,68	0,50	-0,12	0,51	0,81
Peso (Kg)	-0,05	0,15	0,71	-0,02	0,09	0,84
[F] Água – mg/dia	0,53	0,48	0,29	0,02	0,38	0,94
[F] Dieta – mg/dia	-0,69	0,88	0,44	0,28	0,74	0,70
[F] Dentifrício– mg/dia	-0,32	0,42	0,46	-0,44	0,30	0,15
Constante	3,80	1,98	0,07	4,40	1,43	0,00

Variável Dependente: Flúor Retido na Unha das Mãos (μg)

Unhas Mãos ($r^2 = 0,20$; Valor de p (ANOVA) = 0,73)

Unhas Pés ($r^2 = 0,64$; Valor de p (ANOVA) = 0,11)

Na análise do comportamento dos biomarcadores de exposição sub-crônica quanto ao risco de fluorose prejudicial esteticamente, os resultados foram dicotomizados em $> 2,0 \mu\text{g}/\text{mg}$ e $\leq 2,0 \mu\text{g}/\text{mg}$ de flúor, representado valores nas categorias com e sem risco, respectivamente. A estatística Kappa para o risco aferido entre as unhas das mãos e dos pés foi de 0,48, sendo considerado regular. A análise da urina como biomarcador de exposição aguda em comparação com a ingestão de fluoretos em, usando como dose toxicológica os valores acima de 0,07 mg/kg/dia, mostra índice de concordância Kappa igual a 0,42.

Discussão

A fluorose dentária, caracterizada como uma doença que afeta estética e funcionalmente o equilíbrio do aparelho estomatognático tem sido alvo de inúmeras pesquisas que objetivam conhecer melhor sua distribuição, assim como os fatores que interferem nesse processo e que podem sinalizar a doença em idade precoce, evitando graus de severidade mais avançados ^{2,10,25,26,27}. Nesse sentido, nosso trabalho objetivou biomonitorar a ingestão de fluoretos em pré-escolares residentes de zona rural com teores residuais de flúor e em cidade não fluoretada, estimando o risco de fluorose, correlacionando marcadores de exposição, e prevendo a contribuição de cada componente envolvido na determinação da ingestão de flúor.

A metodologia utilizada foi da dieta duplicada para os alimentos e a água, que envolve a coleta de tudo que for ingerido num período de 24 horas; e o método da subtração para acessar a ingestão a partir do dentifrício ¹⁶. Esses métodos são amplamente difundidos e apresentam sensibilidade e bom poder preditivo ²⁸, entretanto, apresentam como limitação a dificuldade de realização em amostras grandes e a necessidade de extrema colaboração dos voluntários.

A pesquisa foi realizada em duas regiões geograficamente distintas, com concentrações de flúor na água de abastecimento substancialmente diferentes, estando uma com altas concentrações de fluoretos na água de abastecimento público (G1) e a outra servindo como o controle (G2), uma localidade sem fluoretação de águas. Em ambas as realidades são questionáveis os benefícios odontológicos provenientes do uso de flúor pelo método sistêmico, considerando a concentração de 0,7 mg/ mL de flúor na água de abastecimento público ²⁹, ideal em regiões tropicais.

A ingestão de flúor total foi de $0,18 \pm 0,13$ e $0,05 \pm 0,04$ mg/kg/dia em G1 e G2, respectivamente, estando os valores em G1 acima da dose diária recomendada ³⁰. Nota-se que a contribuição majoritária para ingestão de flúor em pré-escolares do G1 foi a água, com teores residuais de flúor na faixa de $2,38 \pm 1,63$ mg/mL, representando 56% da dose diária de flúor. Nesse caso, a contribuição da dieta representa 31% da ingestão diária, não havendo diferenças entre o que é ingerido na consistência sólida e líquida. Elevados valores de fluoretos em alimentos consumidos por crianças podem ocorrer devido o consumo

de produtos industrializados ^{21,31} e ao preparo de alimentos com água concentrada de fluoretos ³².

Comparativamente, as duas localidades representam realidades socioeconômicas diferentes. Portanto, nota-se um maior acesso aos serviços e à produtos industrializados em G2, onde há uma cultura de consumo de alimentos industrializados, sem haver repercussão expressiva nas concentrações estimadas de dieta sólida e líquida. Para a realidade de G1, não se observa o consumo constante de alimentos industrializados, devido aos fatores culturais e socioeconômicos. Os dados sugerem nesta população a utilização da água com elevados níveis de fluoreto no cozimento dos alimentos, podendo variavelmente estar associado a um risco aumentado de desenvolver fluorose dental esteticamente prejudicial ^{8,15,32}.

Apesar de haver uma similaridade entre a ingestão de flúor pelo dentífrico nas duas localidades, nota-se que a zona rural apresentou valores inferiores a esse respeito (13% da ingesta total), esse quantitativo pode ser explicado como o resultado de um programa educacional para o controle da fluorose dentária implantado na região desde o ano de 1999. Em contraste, o dentífrico em G2 representou a maior contribuição para ingestão total de fluoretos ($0,04 \pm 0,04$ mg/kg/dia), equivalente a 79%, que pode ser explicado pelo maior acesso à dentífricos flavorizados, pela quantidade de dentífrico na escova e pelo número de escovações. Estes dados suportam a informação sobre o uso inadequado de alta concentração de flúor creme dental entre as crianças dessa localidade ^{33,34}.

A ingestão de flúor após engolir o dentífrico é a via de exposição dominante para muitas crianças, no entanto, a viabilidade do fluoreto após a ingestão é muito menor, quando comparado ao consumo de água com teores residuais, por questões químicas de biodisponibilidade ^{19,35}. Oliveira et al. ³⁶ sugere que 0,50 g de dentífrico pode produzir um risco para o desenvolvimento de fluorose, estando os valores em nosso estudo acima nas duas realidades com $0,57 \pm 0,32$ mg e $0,81 \pm 0,51$ mg para G1 e G2, respectivamente.

Nosso estudo mostrou que existe uma correlação linear positiva entre a excreção urinária e a ingestão total de flúor, sugerindo que a urina pode ser utilizada como preditor da ingestão de fluoretos em pré-escolares, entretanto esses dados devem ser analisados com cautela já que não foi possível mensurar um valor de excreção de flúor que sinalizasse para o risco de fluorose. Essa

constatação se deve aos fatores intrínsecos a esse grupo de indivíduos que sofrem influências variadas no que diz respeito aos picos de crescimento, desenvolvimento dentário, dieta e hábitos ^{37,38}.

A FUFE foi similar nos dois grupos, o que denota uma tendência fisiológica para excreção o íon flúor, apesar de haver uma diferença na qualidade alimentar, que variavelmente poderia influir na cinética do flúor desde a absorção gastrointestinal com a formação de complexos insolúveis formados a partir de cátions di ou trivalentes, até a eliminação do flúor nos túbulos renais ^{20,39}. Esse achado é mais bem entendido no gráfico 3, que mostra uma correlação negativa entre a FUFE e o flúor ingerido, o que sugere o aumento da retenção de flúor com o aumento da ingestão.

A retenção de fluoreto foi de $0,11 \pm 0,09$ para G1 e $0,03 \pm 0,04$ mg/ kg/ dia para G2. Observa-se uma tendência à retenção em crianças expostas a uma ingestão de água com excessivas concentrações de fluoreto, que pode ser relacionado à supersaturação do íon flúor no plasma, graças à alta absorção do flúor, quando ingerido a partir da água ³⁹. A excreção fecal de fluoreto não foi medida, sendo prudente a dedução desse valor. No estudo de Villa et al. ¹⁶ a retenção de flúor fracionada foi estimada assumindo uma excreção fecal de 10% de fluoreto/dia, apesar de haver questionamentos quanto a aplicabilidade desse valor ¹⁸.

Na análise do biomarcador de exposição sub-crônica, as concentrações de flúor nas unhas das mãos e dos pés sofreram influência das concentrações de flúor na água, sendo demonstrado que havia uma maior retenção no G1, apesar de haver significância comprovada apenas para as unhas dos pés, como demonstra a tabela 3. Não houve diferença estatística entre o flúor das unhas das mãos e dos pés dentro de cada grupo, como foi também observado nos estudos de Buzalaf et al. ⁵, entretanto, a literatura é um pouco contraditória a esse respeito ⁴⁰.

Na tentativa de demonstrar os fatores que influenciam na retenção de flúor em unhas, o modelo matemático de regressão linear multivariada comprova que a variabilidade da retenção de flúor nas unhas dos pés pode ser explicada pelo modelo proposto, apesar de não haver nenhuma variável com influência significativa ($r^2 = 0,64$; $p = 0,11$).

Na análise geral do risco de fluorose, a estatística Kappa realizada para analisar a concordância entre o risco aferido pelas unhas das mãos e dos pés foi considerado regular, no entanto, tendo em vista a grande variabilidade intragrupo observada, achamos prudente a revisão desses parâmetros em realidades controladas e com um número maior de sujeitos, para produzir resultados mais conclusivos.

Conclusão

A ingestão de fluoretos em G1 foi superior a G2, sendo a contribuição do dentifrício estatisticamente significativa nos dois grupos, apesar de em G1 a água ingerida contribuir de forma mais significativa na determinação do risco de fluorose dentária. Nas duas localidades, a exposição às diferentes fontes de ingestão de fluoretos demonstra que há uma tendência a retenção de fluoretos, quanto maior a ingestão de flúor na água, apesar de serem notados que os valores fisiológicos da FUFE são constantes nas duas localidades. Adicionalmente, foi provado que há diferença entre as concentrações de flúor nas unhas dos pés nas duas localidades, no entanto, alguns aspectos são inconclusivos, sendo necessário o estudo em realidades controladas e com um número maior de sujeitos ou com maior tempo de coleta.

Referências

1. Dean HT, Arnold F, Elvone E. Domestic water and dental caries, Additional studies of relation of fluoride domestic waters to dental caries experience in 4425 white children, aged 12 to 14. Public Health Reports, 1942;57(1):1155-1160.
2. DenBesten P, Li W. Chronic Fluoride Toxicity: Dental Fluorosis. Monogr Oral Sci. 2011; 22: 81–96.
3. Moimaz SA, et al. Dental fluorosis and its influence on children's life. Braz Oral Res. 2015;29.
4. Alvarez JA, et al. Dental fluorosis: Exposure, prevention and management. J Clin Exp Dent. 2009;1(1):e14-18.
5. Buzalaf MA, Whitford GM. Fluoride metabolism. Monogr Oral Sci. 2011;22:20-36.
6. Arif M, et al. Assessment of fluoride level in groundwater and prevalence of dental fluorosis in Didwana block of Nagaur district, Central Rajasthan, India. Int J Occup Environ Med. 2013;4(4):178-84.
7. Skotowski MC, Hunt RJ, Levy SM. Risk factors for dental fluorosis in pediatric dental patients. J. Public Health. Dent. 1995;55(3):154-9.
8. McGrady M. Summary of: fluoride intake of infants living in non-fluoridated and fluoridated areas. Br Dent J. 2014;216(2):78-9.
9. Zohoori FV, et al. Fluoride intake of infants living in non-fluoridated and fluoridated areas. Br Dent J. 2014;216(2):E3.
10. Lima CV, et al. Total Fluoride Intake by Children from a Tropical Brazilian City. Caries Res. 2015;49(6):640-646.
11. Rango T, et al. Groundwater quality and its health impact: An assessment of dental fluorosis in rural inhabitants of the Main Ethiopian Rift Environ Int. 2012;43:37-47.
12. Costa SM, Abreu MH, Vargas AM, Vasconcelos M, Ferreira e Ferreira E, Castilho LS. Dental caries and endemic dental fluorosis in rural communities, Minas Gerais, Brazil. Rev Bras Epidemiol. 2013;16(4):1021-8.
13. Irigoyen-Camacho ME, García Pérez A, Mejía González A, Huizar Alvarez R. Nutritional status and dental fluorosis among schoolchildren in communities with different drinking water fluoride concentrations in a central region in Mexico. Sci Total Environ. 2016 Jan 15;541:512-9.

14. Abuhaloob L, Maguire A, Moynihan P. Fractional Urinary Fluoride Excretion (FUFE) of 3-4 year children in the Gaza Strip. *Community Dent Health*. 2015;32(1):8-15.
15. Rodrigues MHC, Leite AL, Arana A, Villena RS, Forte FDS, Sampaio FC, Buzalaf MAR. Dietary Fluoride Intake by Children Receiving Different Sources of Systemic Fluoride *J Dent Res* 2009;88(2):142-145,
16. Villa A, Anabalon M, Zohouri V, Maguire A, Franco Am, Rugg-Gunn A. Relationships between fluoride intake, urinary fluoride excretion and fluoride retention in children and adults: An analysis of available data. *Caries Res* 2010; 44: 60–68.
17. Martins ETL, Forte FDS, Sampaio FC. Mapeamento dos teores residuais de flúor de águas da zona rural do sertão nordestino do Brasil. *Revista de Odontologia da UNESP (Online)* 2012;3:147-153.
18. Zohoori FV, Buzalaf MAR, Cardoso CAB, Olympio KPK, Levy FM, Grizzo LT, Manguiera DFB, Sampaio FC, Maguire A. Total fluoride intake and excretion in children up to 4 years of age living in fluoridated and non-fluoridated áreas. *Eur J Oral Sci* 2013;121:457–464.
19. Augustsson A, Berger T. Assessing the risk of an excess fluoride intake among Swedish children in households with private wells— Expanding static single-source methods to a probabilistic multi-exposure-pathway approach *Environment International* 2014;68:192–199
20. Aylward LL, Hays SM, Vezina A, Deveau M, St-Amand A, Nong A. Biomonitoring Equivalents for interpretation of urinary fluoride. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015;72(1):158-67.
21. Levy FM, Olympio KP, Philippi ST, Buzalaf MA. Fluoride intake from food items in 2- to 6-year-old Brazilian children living in a non-fluoridated area using semiquantitative food frequency questionnaire. *Int J Paediatr Dent* 2013;23(6):444-51.
22. Guha-Chowdhuryl N, Drummond BK, Smillie AC. Total Fluoride Intake in Children Aged 3 to 4 Years-A Longitudinal Study. *Journal Dental Research*. 1996;7(75):1451-7.
23. Whitford GM. Monitoring fluoride exposure with fingernail clippings. *Schweiz Monatsschr Zahnmed*. 2005;115(8/2005):685-9.
24. Leech, N., Barrett, K., & Morgan, G. (2011). *IMB SPSS for Intermediate Statistics: Use & Interpretation* (4th Ed.). New York: Lawrence Erlbaum.
25. Buzalaf MA, et al. Validation of fingernail fluoride concentration as a predictor of risk for dental fluorosis. *Caries Res*. 2012;46(4):394-400.

26. Rošin-Grget K, Peroš K, Sutej I, Bašić K. The cariostatic mechanisms of fluoride. *Acta Med Acad.* 2013;42(2):179-88.
27. Jarquín-Yañez L, de Jesús Mejía-Saavedra J, Molina-Frechero N, Gaona E, Rocha-Amador DO, López-Guzmán OD, Bologna-Molina R. Association between urine fluoride and dental fluorosis as a toxicity factor in a rural community in the state of San Luis Potosi. *ScientificWorldJournal.* 2015;2015:647184.
28. Omid N, Maguire A, O'Hare WT, Zohoori FV. Estimation of daily dietary fluoride intake: 3-d food diary v. 2-d duplicate plate. *Br J Nutr.* 2015;114(12):2103-9.
29. Galagan DJ, Vermillion JR. Determining Optimum Fluoride Concentrations. *Public Health Reports* 1957; 6(72): 491-493.
30. Casarin RCV, et al. Concentração de Fluoreto em Arroz, Feijão e Alimentos Infantis Industrializados. *Rev. Saúde Pública* 2007;41(4):549-6.
31. Lodi CS, Ramires I, Pessan JP, Neves LT, Buzalaf MAR. Fluoride concentrations in industrialized Beverages consumed by children in the city of bauru, brazil. *J Appl Oral Sci.* 2007;15(3):209-12
32. Viswanathan G, Gopalakrishnan S, Siva Ilango S. Assessment of water contribution on total fluoride intake of various age groups of people in fluoride endemic and nonendemic areas of Dindigul District, Tamil Nadu, South India water re search 2010;44:6186-6200
33. Carvalho TS, Kehrle H, Sampaio FC. Prevalence and severity of dental fluorosis among students from João Pessoa, PB, Brazil. *Bras Oral Res* 2007;21:198-203.
34. Kobayashi CA, Belini MR, Italiani FM, Pauleto AR, Araújo JJ, Tesserolli V, Grizzo LT, Pessan JP, Machado MA, Buzalaf MA. Factors influencing fluoride ingestion from dentifrice by children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2011 Oct;39(5):426-32.
35. Barbiera O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity *Chemico-Biological Interactions* 2010;188(2):319–33
36. Oliveira MJ1, Paiva SM, Martins LH, Ramos-Jorge ML, Lima YB, Cury JA. Fluoride Intake by Children at Risk for the Development of Dental Fluorosis: Comparison of Regular Dentifrices and Flavoured Dentifrices for Children. *Caries Res.* 2007;41(6):460-6.
37. Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. *Monogr Oral Sci.* 1996;16(Rev 2):1-153.

38. Marthaler TM. Monitoring of renal fluoride excretion in community preventive programmes on oral health. World Health Organization. Geneva; 1999
39. Martínez-Mier A. Fluoride: Its Metabolism, Toxicity, and Role in Dental Health. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 2011;000(00):1-5.
40. Fukushima R, et al. Environmental and individual factors associated with nail fluoride concentration. *Caries Res.* 2009;43(2):147-54.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Considerações éticas

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), protocolo 0544/14 (ANEXO 2). Em cumprimento às normas vigentes das resoluções para pesquisa em seres humanos do Conselho Nacional de Saúde (CNS466/12), foram incluídos na amostra apenas indivíduos que assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (APÊNDICE 1).

Todos os voluntários foram devidamente esclarecidos quanto aos objetivos e à metodologia, e como o estudo trata de menores, o tutor ou acompanhante torna-se responsável pela autorização.

Local de estudo

O estudo foi desenvolvido nas cidades de São João do Rio do Peixe – PB e João Pessoa - PB (FIGURA 1) – (IBGE, 2010).

- O município de São João do Rio do Peixe (G1) está localizado no alto sertão do Estado da Paraíba, ocupa uma área de 474,4 km² e possui densidade demográfica 38,36 hab/km². Nessa cidade, o estudo será realizado na comunidade de Brejo das Freiras. Esta foi escolhida por apresentar elevadas concentrações residuais de flúor em seus poços ($2,38 \pm 1,63$ mg flúor/mL de flúor) e por ser uma área que concentra casos severos de fluorose dentária em crianças do estado da Paraíba
- O município de João Pessoa-PB (G2) sem fluoretação ($0,03 \pm 0,04$ mg/mL de flúor)), está localizado no litoral do Estado da Paraíba, ocupa uma área de 211.475 km² e possui densidade demográfica 3.421,28 hab/km².

FIGURA 1: Localização Geográfica dos municípios de São João do Rio do Peixe (G1) e João Pessoa (G2) – PB



Vermelho: São João do Rio do Peixe-PB (G1)

Vinho: João Pessoa-PB (G2)

Fonte: Google Imagens adaptado pelo próprio autor

Delineamento amostral

O cálculo amostral para comparação de subgrupos dentro de uma amostra depende do teste estatístico escolhido, das diferenças entre os grupos, da tolerância do pesquisador à detecção de diferenças quando elas não existem (erro tipo I), ou da falha na detecção de diferenças entre os subgrupos quando elas realmente existem (erro tipo II). As probabilidades associadas aos erros tipo I e II são convencionadas como α e β , e comumente são adotados valores de 5% (bilateralmente) e 20% respectivamente, mas outros valores podem ser utilizados de forma criteriosa (MIOT, 2011).

Para o cálculo amostral, partimos de nossas variáveis quantitativas, com o intuito de realizar comparações entre as médias. Determinou-se a amostra a partir do cálculo de um desvio-padrão da média de 0,03 (de Souza, 2011) e diferença a ser detectada de 0,07 (risco de fluorose), com poder de teste 95%, significância de 0,1%, obteve-se por meio da plataforma online do Laboratório de Epidemiologia e Estatística (<http://www.lee.dante.br/index.html>), uma amostra

mínima de 9 indivíduos por grupo. Entretanto, devido a possibilidade de perda amostral, nosso estudo avaliou um numero total de 30 pré-escolares, entre 24 e 72 meses, divididos em dois grupos:

- G1: residentes permanentes da comunidade de Brejo das Freiras = 15 voluntários
- G2: residentes permanentes de João Pessoa-PB = 15 voluntários

Delineamento da pesquisa

Foi desenvolvido um estudo por meio do método indutivo, o qual foi aplicado a técnica de documentação direta na forma de uma pesquisa de campo com experimento controlado e efeitos medidos em laboratório.

Todos os indivíduos incluídos na amostra foram monitorados quanto à ingestão e excreção de flúor. Os dados foram obtidos por meio de coleta e posterior análise físico-química do flúor nas fontes de ingestão (águas, dieta sólida e líquida, e dentifrícios) e de excreção (urina) conforme métodos já validados (PESSAN et al., 2008; FORTE et al., 2008).

Amostras de unhas das mãos e dos pés foram coletadas para fins de biomonitoramento de ingestão de flúor. A concentração de $>2 \mu\text{g/g}$ de flúor foi considerada como parâmetro para determinar o risco de fluorose em crianças (BUZALAF et al., 2012).

Obtenção das Amostras

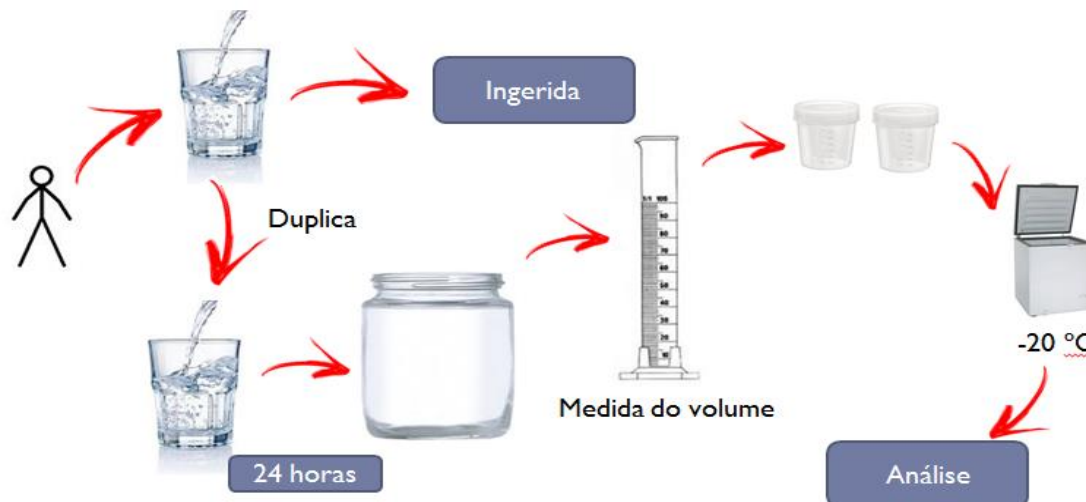
Dieta (água, sólidos e líquidos)

Os dados foram coletados em um dia da semana pela técnica de prato duplicado. As instruções foram dadas aos pais quanto ao método de coleta de todos os alimentos e bebidas ingeridos por seus filhos num período de 24 horas como descrito por Guha-Chowdhury, Drummond e Smillie (1996) – APÊNDICE 2. Coletores foram fornecidos aos participantes, sendo enfatizada a importância da manutenção dos hábitos dietéticos usuais para reproduzir fielmente os parâmetros de exposição ao flúor. As partes dos alimentos que geralmente não são ingeridas como sementes, cascas e ossos, foram excluídos antes da análise.

Todo material foi pesado, triturado (com volumes conhecidos de água deionizada) e depois quatro alíquotas de 50 ml foram armazenadas em coletores

universais estéreis da marca Embramed® e congeladas em freezer a -20°C (FIGURA 2 e 3).

FIGURA 2: Coleta de amostras referentes à estimativa de flúor na água



Fonte: Próprio autor

FIGURA 3: Coleta de amostras referentes à estimativa de flúor na dieta (sólida e líquida)



Fonte: Próprio autor

Dentifrício

Será realizada conforme descrito por Guha-Chowdhury, Drummond e Smillie (1996) - APÊNDICE 2. Simularam-se as condições de casa levando-se em consideração um questionário prévio, no qual questões como quem realiza a

escovação, tamanho da escova de dente, quanto de dentifrício é colocado na escova, se é colocado pelos pais ou pela criança, se a criança expectora após a escovação, duração da escovação e tipo de dentifrício foram acessadas. Adicionalmente, obtiveram-se informações quanto à frequência de escovação, que foi utilizada para se calcular a ingestão diária de flúor a partir do dentifrício para cada criança.

No momento da coleta a escova dental foi molhada e pesada na balança eletrônica. O dentifrício foi colocado na escova pelo pai ou pela criança, e então foi medido o peso da escova com o dentifrício, dando informação da quantidade de flúor colocada na escova. A escovação foi realizada sob observação do examinador. Dependendo do hábito, a criança expectorava ou não. Toda saliva expectorada foi coletada em recipiente de plástico de boca larga, pesada e analisada para flúor.

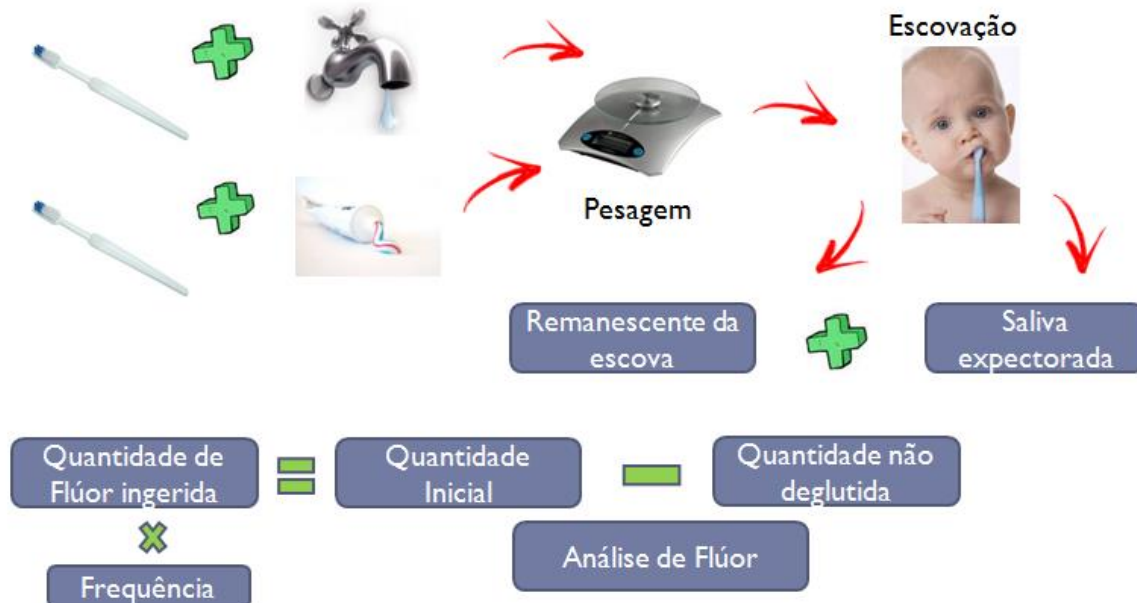
A escova dental foi lavada abundantemente com uma quantidade conhecida de água deionizada. A quantidade de flúor deixada na escova e expelida será somada, fornecendo a quantidade total não deglutida. A quantidade de flúor ingerida será então indiretamente derivada, subtraindo a quantidade de flúor expelida da quantidade inicial colocada na escova. As alíquotas foram codificadas e armazenadas em freezer (-20°C) até o momento da análise (FIGURA 4).

Urina

Nos mesmos dias em que as estimativas de ingestão de flúor foram realizadas, coletaram-se amostras de 24 horas de urina.

Distribuiu-se com antecedência potes com boca larga, datados e identificados com os nomes dos voluntários do estudo. Os participantes foram orientados a fazerem suas necessidades nos tais potes (com capacidade de 2000 mL) pré-lavados com água deionizada. No dia seguinte, o pesquisador coletou os potes com o material, e mediu o volume de urina excretado com auxílio de uma proveta graduada de vidro. Em tubos identificados e datados, retiraram-se alíquotas de 15 mL de urina para congelar a -20 °C até a análise de flúor (FIGURA 5).

FIGURA 4: Coleta de amostras referentes à estimativa de flúor no dentífrício.



Fonte: Próprio autor

FUGURA 5: Coleta de amostras referentes à estimativa de flúor na urina



Fonte: Próprio autor

Unhas.

Os voluntários foram orientados a não cortar as unhas e evitar o uso de esmalte, que podem conter flúor (WHITFORD, 2005), por cerca de 2 semanas das coletas. Os recortes de unhas foram obtidos dos dedos da mão, assim como dos pés. Cada corte de unhas foi limpo com água deionizada usando uma escova

interdental, colocados em ultrassom por 10 minutos e secos a 60 ± 5 °C, para posterior pesagem e análise.

Procedimentos analíticos do Flúor

As análises de flúor a partir de alimentos sólidos e líquidos, dentifrício, saliva e unhas foram realizadas pelo método de leitura indireta, através da técnica do hexametildisiloxano – HMDS (WHITFORD, 1996); ao passo que a análise da água e da urina foi por leitura direta.

Um eletrodo flúor-íon-específico (BN Modelo 9409, Orion, Cambridge, MA, EUA) e um potenciômetro (Modelo 720 A Orion) foram usados para medições de flúor. Curvas de calibração foram executadas, usando-se amostras padrão conhecidas, contendo entre 0,1 a 6,4 µg de F, para análises diretas e 0,019 a 1,9 µg de flúor para análises indiretas.

Na difusão por HMDS, as soluções-padrão foram preparadas por diluição seriada de um estoque padrão, contendo 0,1 M de flúor (Orion) e difundidos em triplicata, em comitância com as amostras que serão analisadas. Foi realizada a primeira leitura antes da interpretação das amostras da dieta, a segunda leitura quando a metade das amostras tenham sido lidas e a terceira após o término de leitura das amostras.

Padrões que não sofreram difusão serão preparados, usando-se as mesmas soluções (NaOH 0,05 M e ácido acético 0,20 M) que serão usados para preparar os padrões e as amostras que sofreram difusão. Os padrões não difundidos serão feitos de modo a ter exatamente a mesma concentração de flúor que os padrões que sofreram difusão, sendo um parâmetro confiável de comparação com os padrões difundidos em placa.

Para análise direta, soluções-padrão foram preparadas por diluição seriada de um estoque-padrão contendo 100 mg F/ mL a partir de uma solução de NaF (Orion).

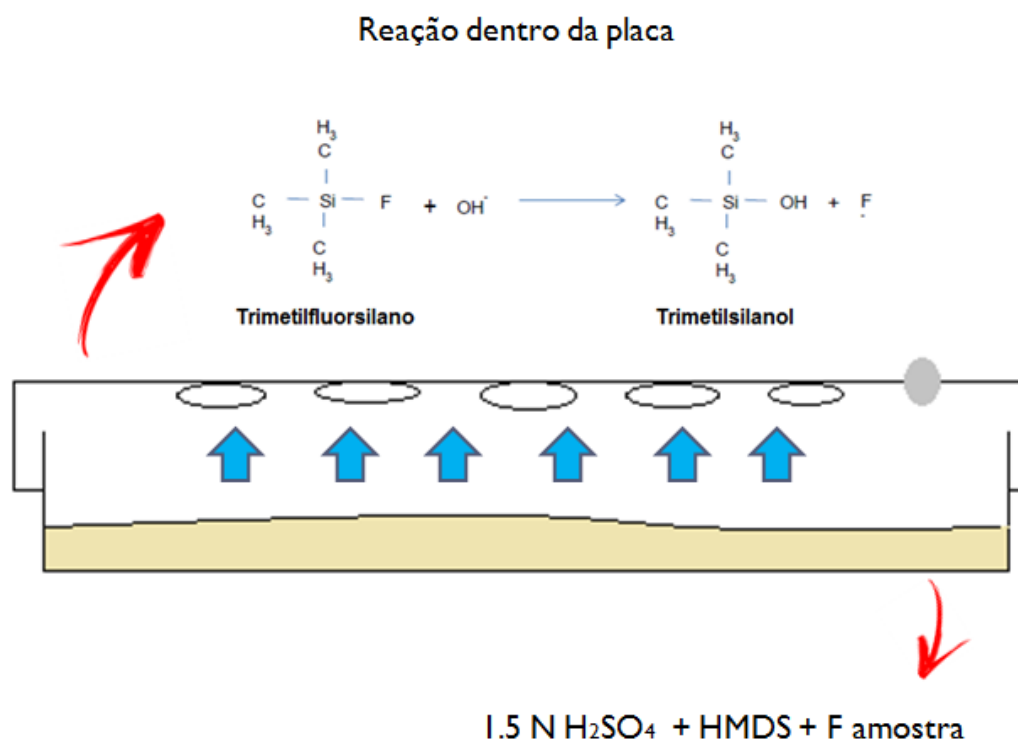
As leituras em milivolts foram convertidas para concentração iônica de flúor por meio de uma curva padrão de correlação ($r^2 > 0,95$) e os dados foram tratados em planilha do *Excel* (Microsoft Excel®) a partir da qual a média e os desvios-padrão foram calculados. Quando a repetibilidade das leituras em duplicata for inferior a 85%, as análises foram repetidas.

Análise Indireta

As Análises laboratoriais foram realizadas após difusão facilitada por HMDS (hexametildisiloxano), pelo método de Taves (1968) modificado por Whitford (1996).

O princípio químico do método baseia-se na dissociação de moléculas de HMDS, na presença de ácido forte numa placa de difusão. O flúor das amostras e das soluções padrão une-se aos radicais silano, formando um composto volátil, denominado trimetilfluorsilano. Esse composto se difundia para o NaOH, de natureza alcalina, localizado na tampa da placa de difusão. O flúor é trocado pelo íon hidroxila do NaOH, formando um novo composto, o trimetilsilanol, sendo o flúor liberado (FIGURA 6).

FIGURA 6: Representação esquemática da reação que acontece na técnica do HMDS



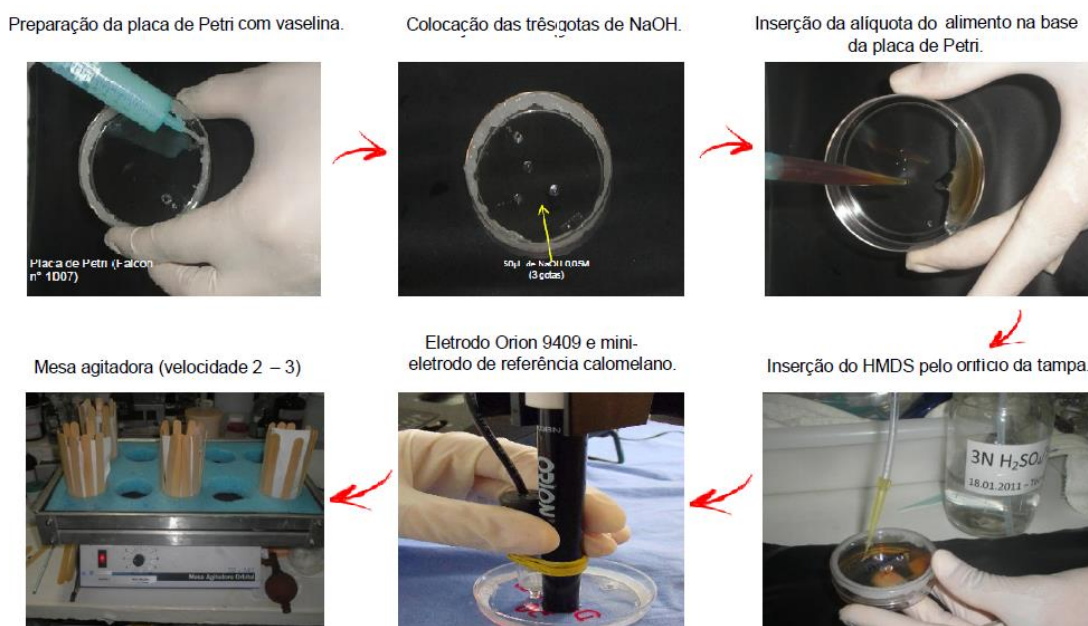
Fonte: Próprio autor

A técnica de difusão facilitada por HMDS apresenta as vantagens de separar o flúor da amostra, eliminando interferentes, e ao mesmo tempo, concentrando-os, o que incrementa a detecção de flúor pelo eletrodo sensível (0,02 µg/mL).

Para o desenvolvimento da técnica, pesou-se 1g da amostra da dieta (sólidos ou líquidos) em placas de petri plásticas (Falcon nº 1007), juntamente com 1 ml de água deionizada. No caso da saliva, pipetou-se 1 mL, e das unhas pesou-se uma quantidade que fosse superior a 15 mg, sendo adicionado 1 e 2 mL de água deionizada, respectivamente. Na tampa dessas placas foram colocadas 50 µL de NaOH 0,05 M, distribuídos em 5 gotas. As placas foram fechadas, seladas com vaselina e por um orifício feito previamente na tampa foi injetado o HMDS (Aldrich, 2,0 mL em ácido sulfúrico 3M). O orifício foi imediatamente fechado com vaselina e parafilme. As placas foram colocadas numa mesa agitadora (Nova Técnica, modelo NT 145) em velocidade 2-3, durante um período de 18-24 horas.

No dia seguinte, as tampas foram cuidadosamente removidas, invertidas, e as gotas de NaOH foram combinadas numa só gota. O NaOH foi tamponado pela ação de 25 µL de ácido acético 0,2 M. o volume total será ajustado para 75 µL com água deionizada, usando pipeta. A gota que continha todo flúor da amostra foi analisada com o eletrodo Orion 9409 e um microeletrodo de referencia calomelano (Accumet, numero de catalogo #13-620-79), ambos acoplados ao potenciômetro Orion (modelo 720 A). Durante as leituras 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 7).

FIGURA 7: Protocolo de preparação de placas para análise pela técnica do HMDS



Fonte: FERREIRA JR, 2012

Análise Direta

Amostras de água e urina foram realizadas pelo método direto (eletrodo específico + *Total Ionic Strength Adjusting Buffer* -TISAB), Tanto as soluções-padrão como as amostras de águas serão adicionadas ao TISAB II, que serve como tampão de ajuste de força iônica total. Já para urina, procedeu-se do mesmo modo, exceto pelo fato do tamponamento foi realizado com TISAB III na proporção 1:9 de urina, pois a urina apresenta maior concentração de flúor. A concentração de flúor presente nas amostras foi determinada em triplicata, usando o íon específico (Orion 9609).

Análise estatística

Para a análise estatística foram usados os softwares *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) versão 17.0 e o *GraphPad Prism 6*. Os dados brutos foram inicialmente tabulados e convertidos de μg para valores de mg/ kg/ dia (dose diária). A conversão foi realizada por meio da multiplicação dos valores de flúor encontrados pelo peso da amostra obtida em 24 horas, e dividindo pelo peso da criança multiplicado por 1000. A Fração Urinária de Excreção de Flúor (FUFE) foi calculada em (%) como produto da divisão F excretado sobre F ingerido em mg/ kg/ dia , multiplicado por 100. O flúor retido foi calculado subtraindo-se o valor de F ingerido pelo excretado em mg/ kg/ dia .

Os dados foram analisados por estatística descritiva e inferencial. A normalidade foi obtida pelo teste de Shapiro-Wilk para amostras menores que 50 casos. Análises comparativas entre as médias de ingestão e excreção foram obtidas pelo teste Mann-Whitney e t de Student, a depender da normalidade. O teste de Wilcoxon foi usado para comparar aos pares para as diferentes fontes de ingestão de fluoretos, assim como para aferir a diferença entre as concentrações de flúor em unhas dentro de um mesmo grupo.

O coeficiente de correlação de Pearson foi usado para medir a intensidade da relação entre variáveis como a ingestão, excreção de flúor e FUFE, assim como a retenção de flúor em unhas. A regressão linear multivariada foi executada a fim de verificar as medidas do efeito de cada variável estudada em relação aos resultados.

A magnitude de efeito "*Cohen effect size*" foi calculada para o teste de diferença Mann-Whitney (magnitude de efeito "d") e para a regressão linear

múltipla (magnitude de efeito “r²”). Para a magnitude de efeito “d” utilizou software *Excel* e cálculo segundo Leech et al. ²⁴:

$$d = \frac{M_1 - M_2}{0,75 - \left(\frac{DIQ_1 - DIQ_2}{2} \right)} \quad (1)$$

onde M₁ e M₂ é a mediana de G1 e G2, respectivamente e DIQ₁ e DIQ₂, as distâncias interquartis. A magnitude de efeito “r²” foi obtida pelo Programa SPSS. Valores de magnitude d superiores a 0,5 foram considerados alto, enquanto menores que 0,2 foram considerados desprezíveis.

O risco de fluorose foi aferido usando-se variáveis dicotômicas “< 0,07 ou ≥ 0,07 mg/kg/mL” e “> 2,0 ou < 2,0 µg” de flúor, para flúor ingerido total e retido em unhas, respectivamente. Esses dados serviram para medir o risco na amostra estudada e para aplicação do teste de concordância Kappa. Para todos os testes, opta-se como significativo o valor de p ≤ 0,05.

3. CONCLUSÃO

- A ingestão de fluoretos em G1 foi superior a G2, sendo a contribuição do dentifrício estatisticamente significativa nos dois grupos, apesar de em G1 a água ingerida contribuir de forma mais efetiva na determinação do risco de fluorose dentária.
- Nas duas localidades, a exposição às diferentes fontes de ingestão de fluoretos demonstra que há uma tendência a retenção de fluoretos, quanto maior a ingestão de flúor na água, apesar de serem notados que os valores fisiológicos da FUFÉ são constantes nas duas localidades.
- Foi provado que há diferença entre as concentrações de flúor nas unhas dos pés nas duas localidades, no entanto, alguns aspectos são inconclusivos, sendo necessário o estudo em realidades controladas e com um número maior de sujeitos ou com maior tempo de coleta.

REFERÊNCIAS*

Abuhaloob L, Maguire A, Moynihan P. Fractional Urinary Fluoride Excretion (FUFE) of 3-4 year children in the Gaza Strip. *Community Dent Health*. 2015;32(1):8-15.

Alvarez JA, et al. Dental fluorosis: Exposure, prevention and management. *J Clin Exp Dent*. 2009;1(1):e14-18.

Antonijevic E, Mandinic Z, Curcic M, Djukic-Cosic D, Milicevic N, Ivanovic M, Carevic M, Antonijevic B. "Borderline" fluorotic region in Serbia: correlations among fluoride in drinking water, biomarkers of exposure and dental fluorosis in schoolchildren. *Environ Geochem Health*. 2015;Sep:1-12

Arif M, et al. Assessment of fluoride level in groundwater and prevalence of dental fluorosis in Didwana block of Nagaur district, Central Rajasthan, India. *Int J Occup Environ Med*. 2013;4(4):178-84.

Augustsson A, Berger T. Assessing the risk of an excess fluoride intake among Swedish children in households with private wells— Expanding static single-source methods to a probabilistic multi-exposure-pathway approach *Environment International* 2014;68:192–199

Aylward LL, Hays SM, Vezina A, Deveau M, St-Amand A, Nong A. Biomonitoring Equivalents for interpretation of urinary fluoride. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2015;72(1):158-67.

Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo LM. Molecular mechanisms of fluoride toxicity. *Chem Biol Interact*. 2010;188(2):319-33.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diretrizes da política nacional de saúde bucal**. Brasília, 2004. Disponível em: <www.saude.gov.br/bucal>. Acesso em: 05 set. 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Secretaria de Vigilância em Saúde. Projeto SB Brasil 2010 – Pesquisa Nacional de saúde bucal: resultados principais, Brasília. 2012.

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

Buzalaf MAR, Rodrigues MHC, Pessan JP, Leite AL, Arana A, Villena RS, Forte FDS, Sampaio FC. Biomarkers of Fluoride in Children Exposed to Different Sources of Systemic Fluoride. *Journal of Dental Research* 2011;90:215-9.

Buzalaf MA, et al. Validation of fingernail fluoride concentration as a predictor of risk for dental fluorosis. *Caries Res.* 2012;46(4):394-400.

Carey CM. Focus on fluorides: update on the use of fluoride for the prevention of dental caries. *J Evid Based Dent Pract.* 2014;14 Suppl:95-102.

Carvalho TS, Kehrle H, Sampaio FC. Prevalence and severity of dental fluorosis among students from João Pessoa, PB, Brazil. *Bras Oral Res* 2007;21:198-203.

Casarin RCV, et al. Concentração de Fluoreto em Arroz, Feijão e Alimentos Infantis Industrializados. *Rev. Saúde Pública* 2007;41(4):549-6.

CECOL/USP. Centro Colaborador do Ministério da Saúde em Vigilância da Saúde Bucal. Consenso técnico sobre classificação de águas de abastecimento público segundo o teor de flúor. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo; 2011.

Clark MB, Slayton RL. Fluoride use in caries prevention in the primary care setting. *Pediatrics.* 2014;134(3):626-33.

Costa SM, Abreu MH, Vargas AM, Vasconcelos M, Ferreira e Ferreira E, Castilho LS. Dental caries and endemic dental fluorosis in rural communities, Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Epidemiol.* 2013;16(4):1021-8.

de Souza, CFM. Metabolismo de flúor e cálcio de indivíduos residentes em uma área de fluorose endêmica no estado da Paraíba antes e após a implantação de um sistema de desfluoretação. João Pessoa (PB). Dissertação [Mestrado em Odontologia] – Universidade Federal da Paraíba, 2011.

Dean HT, Arnold F, Elvone E. Domestic water and dental caries, Additional studies of relation of fluoride domestic waters to dental caries experience in 4425 white children, aged 12 to 14. *Public Health Reports,* 1942;57(1):1155-1160.

DenBesten P, Li W. Chronic Fluoride Toxicity: Dental Fluorosis. *Monogr Oral Sci.* 2011; 22: 81–96.

Forte FDS, Moimaz SAS, Sampaio FC. Urinary fluoride excretion in children exposed to fluoride toothpaste and to different water fluoride levels in a tropical area of Brazil. *Brazilian Dental Journal* 2008;3:214-18.

Freitas CHSM, Sampaio FC, Roncalli AG, Moysés SJ. Reflexões metodológicas sobre prevalência da fluorose dentária nos inquéritos de saúde bucal. *Rev Saúde Pública* 2013;47(Supl 3):138-47.

Fukushima R, et al. Environmental and individual factors associated with nail fluoride concentration. *Caries Res.* 2009;43(2):147-54.

Galagan DJ, Vermillion JR. Determining Optimum Fluoride Concentrations. *Public Health Reports* 1957;6(72):491-493.

Guha-Chowdhuryl N, Drummond BK, Smillie AC. Total Fluoride Intake in Children Aged 3 to 4 Years-A Longitudinal Study. *Journal Dental Research.* 1996;7(75):1451-7.

Iheozor-Ejiofor Z, et al. Water fluoridation for the prevention of dental caries. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015;6:1-11.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (BR). IBGE Cidades@. 2010 [citado 18/12/2015]. Disponível em: <www.ibge.gov.br>.

Irigoyen-Camacho ME, García Pérez A, Mejía González A, Huizar Alvarez R. Nutritional status and dental fluorosis among schoolchildren in communities with different drinking water fluoride concentrations in a central region in Mexico. *Sci Total Environ.* 2016;541:512-9.

Jarquín-Yañez L, de Jesús Mejía-Saavedra J, Molina-Frecherro N, Gaona E, Rocha-Amador DO, López-Guzmán OD, Bologna-Molina R. Association between urine fluoride and dental fluorosis as a toxicity factor in a rural community in the state of San Luis Potosi. *ScientificWorldJournal.* 2015;2015:6471-84.

Jordão LM, Vasconcelos DN, Moreira Rda S, Freire Mdo C. Dental fluorosis: prevalence and associated factors in 12-year-old schoolchildren in Goiânia, Goiás. *Rev Bras Epidemiol.* 2015;18(3):568-77.

Kobayashi CA, Belini MR, Italiani FM, Pauleto AR, Araújo JJ, Tessarolli V, Grizzo LT, Pessan JP, Machado MA, Buzalaf MA.

Factors influencing fluoride ingestion from dentifrice by children. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2011 Oct;39(5):426-32.

Leech, N., Barrett, K., & Morgan, G. (2011). *IMB SPSS for Intermediate Statistics: Use & Interpretation* (4th Ed.). New York: Lawrence Erlbaum.

Levy FM, Olympio KP, Philippi ST, Buzalaf MA. Fluoride intake from food items in 2- to 6-year-old Brazilian children living in a non-fluoridated area using a semiquantitative food frequency questionnaire. *Int J Paediatr Dent* 2013;23(6):444-51.

Lima CV, et al. Total Fluoride Intake by Children from a Tropical Brazilian City. *Caries Res.* 2015;49(6):640-646.

Lima Júnior JF. Avaliação de sistemas de desfluoretação de águas para comunidades rurais do semi-árido (2012). 234f. Tese [Doutorado]. Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da RENORBIO/UFPB. Paraíba. 2012.

Lodi CS, Ramires I, Pessan JP, Neves LT, Buzalaf MAR. Fluoride concentrations in industrialized Beverages consumed by children in the city of bauru, brazil. *J Appl Oral Sci.* 2007;15(3):209-12

Marthaler TM. Monitoring of renal fluoride excretion in community preventive programmers on oral health. World Health Organization. Geneva; 1999

Martínez-Mier A. Fluoride: Its Metabolism, Toxicity, and Role in Dental Health. *Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine* 2011;000(00):1-5.

Martins CC, Saul MP, Cury JA. Effect of Discontinuation of Fluoride Intake from Water and Toothpaste on Urinary Excretion in Young Children. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2011;8:2132-41.

Martins ETL, Forte FDS, Sampaio FC. Mapeamento dos teores residuais de flúor de águas da zona rural do sertão nordestino do Brasil. *Revista de Odontologia da UNESP (Online)* 2012;3:147-53.

McGrady M. Summary of: fluoride intake of infants living in non-fluoridated and fluoridated areas. *Br Dent J.* 2014;216(2):78-9.

Ministério da Saúde (BR). Gabinete do Ministro. Portaria MS nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União, Brasília (DF) 2012, sessão 1: 40-84.

Miot Hélio Amante. Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. J. vasc. bras. 2011;10(4):275-8.

Moimaz SA, et al. Dental fluorosis and its influence on children's life. Braz Oral Res. 2015;29.

Newbrun E. What we know and do not know about fluoride. Journal of Public Health Dentistry 2010; 70:227–233.

Oliveira MJ1, Paiva SM, Martins LH, Ramos-Jorge ML, Lima YB, Cury JA. Fluoride Intake by Children at Risk for the Development of Dental Fluorosis: Comparison of Regular Dentifrices and Flavoured Dentifrices for Children. Caries Res. 2007;41(6):460-6.

Omid N, Maguire A, O'Hare WT, Zohoori FV. Estimation of daily dietary fluoride intake: 3-d food diary v. 2-d duplicate plate. Br J Nutr. 2015;114(12):2103-9.

OMS, Organização Mundial da Saúde. Fluorides and Oral Health. Report of a WHO expert committee and oral health status and fluoride use. WHO Technical Report Series 846. Geneva: WHO, 1994.pp 37.

Pessan JP, et al. Fluoride uptake by plaque from water and from dentrifice. Journal of Dental Research 2008;5(87):461- 65.

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

Rango T, et al. Groundwater quality and its health impact: An assessment of dental fluorosis in rural inhabitants of the Main Ethiopian Rift Environ Int. 2012;43:37-47.

Rodrigues MHC, Leite AL, Arana A, Villena RS, Forte FDS, Sampaio FC, Buzalaf MAR. Dietary Fluoride Intake by Children Receiving Different Sources of Systemic Fluoride J Dent Res 2009;88(2):142-145,

Rošin-Grget K, Peroš K, Sutej I, Bašić K. The cariostatic mechanisms of fluoride. Acta Med Acad. 2013;42(2):179-88.

Sampaio FC et al. Natural Fluoride Levels in the Drinking Water, Water Fluoridation and Estimated Risk of Dental Fluorosis in a Tropical Region of Brazil. Oral Health Preventive Dentistry 2010; 8:71-75.

Schwendicke F, et al. Dental caries, fluorosis, and oral health behavior of children from Herat, Afghanistan. Community Dent Oral Epidemiol. 2015;43(6):521-31.

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

Souza CFM, Lima JF, Adriano MSPF, Carvalho, FG, Forte FDS, Farias Oliveira R, Silva AP, Sampaio FC. Assessment Of Groundwater Quality In A Region Of Endemic Fluorosis In The Northeast Of Brazil. Environmental Monitoring And Assessment (Dordrecht. Online) 2013;185:4735-43.

Taves DR. Separation of fluoride by rapid diffusion using hexametildisiloxane. Talanta 1968;15:969-74.

Villa A, Anabalon M, Zohouri V, Maguire A, Franco Am, Rugg-Gunn A. Relationships between fluoride intake, urinary fluoride excretion and fluoride retention in children and adults: An analysis of available data. Caries Res 2010; 44: 60–68.

Viswanathan G, Gopalakrishnan S, Siva Ilango S. Assessment of water contribution on total fluoride intake of various age groups of people in fluoride endemic and nonendemic areas of Dindigul District, Tamil Nadu, South India water re search 2010;44:6186-6200

Wei W, et al. Excessive fluoride induces endoplasmic reticulum stress and interferes enamel proteinases secretion. Environ Toxicol. 2013;28(6):332-41.
Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. Monogr Oral Sci. 1996;16 (Rev 2):1-153.

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

Zohoori FV, Moynihan PJ, Omid N, Abuhaloob L, Maguire A. Impact of water fluoride concentration on the fluoride content of infant foods and drinks requiring preparation with liquids before feeding. *Community Dentistry and Oral Epidemiology* 2012;40:432–40.

Zohoori FV, Buzalaf MAR, Cardoso CAB, Olympio KPK, Levy FM, Grizzo LT, Manguiera DFB, Sampaio FC, Maguire A. Total fluoride intake and excretion in children up to 4 years of age living in fluoridated and non-fluoridated areas. *Eur J Oral Sci* 2013;121:457–464.

Zohoori FV, et al. Fluoride intake of infants living in non-fluoridated and fluoridated areas. *Br Dent J.* 2014;216(2):E3.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

APÊNDICE

Apêndice 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Prezado (a) Senhor (a),

Essa pesquisa é sobre a avaliação de um sistema desfluoretador a base de alumina e cério+carvão ativado na comunidade rural do município de São João do Rio do Peixe-PB, e está sendo desenvolvido por Emerson Tavares de Sousa, mestrando do Programa de Pós Graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, sob a orientação da Profª Dr. Franklin Delano Soares Forte.

A finalidade deste trabalho é oferecer um mecanismo prático e eficaz de redução dos níveis de flúor na água, reduzindo assim doenças que são frequentes na comunidade, como a fluorose. Para tanto, necessitamos de 15 voluntários menores de 6 e maiores de 20 anos, residentes permanentes da comunidade de Brejo das Freiras para participar do estudo, que será realizado em duas etapas: uma antes da implantação do filtro desfluoretador (retira flúor da água), e outra após três meses de uso do filtro. Os voluntários deverão cooperar quanto a coleta de uma pequena parcela de alimentos, água e creme dental como fonte de ingestão de flúor. Para coleta de urina, todos os recipientes de coleta deverão ser individualizados e para isto se avaliará o volume total de urina produzido em 24 horas. Para coleta da saliva será pingado suco de limão na língua e então será colocado um coletor na bochecha e coletada uma amostra de saliva diretamente da glândula salivar, por 3 minutos. Os recortes das unhas também deverão ser doados.

Não haverá nenhum custo evidente ou quaisquer compensações financeiras. Os envolvidos na pesquisa não estarão correndo qualquer risco, excetuando-se os casos de constrangimento durante a atividade de coleta de dados. Adicionalmente afirmamos que a sua participação na pesquisa é confidencial, sendo protegida sua identidade quando na publicação científica dos resultados obtidos. Como benefício ressaltamos que essa pesquisa fornecerá dados importantes com relação a aplicação de uma tecnologia que permite a redução de flúor na água de beber reduzindo o risco de fluorose nas futuras gerações. Além disso, o monitoramento da qualidade da água permitirá uma avaliação quanto ao nível de contaminação microbiológica.

Sr(a) receberá uma cópia deste termo onde consta o celular/e-mail do pesquisador responsável, e demais membros da equipe, podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua anuência, agora ou a qualquer momento. Desde já agradecemos!

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o minha anuência para o desenvolvimento da pesquisa e para publicação dos resultados.

Poderei consultar o pesquisador responsável Emerson Tavares de Sousa, ou o CEP-CCS- UFPB, com endereço na UFPB\CCS, Campus I, Cidade Universitária – CEP. 58059-900, João Pessoa - PB, Fone: (83) 3216-7791, no e-mail: eticaccsufpb@hotmail.com sempre que julgar necessário obter informações ou esclarecimentos sobre o projeto de pesquisa e minha participação no mesmo.

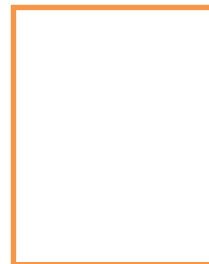
Contato com o Pesquisador (a) Responsável:

Em caso de dúvidas entrar em contato com Emerson Tavares de Sousa através do e-mail: etsemerson@yahoo.com.br ou telefone: (83) 9633-7949

João Pessoa, ____ de _____ de 20__.

Assinatura do Voluntário, pai/mãe ou responsável

Emerson Tavares de Sousa (Pesquisador Responsável)



Apêndice 2: Manuais de orientação e treinamento para coleta de material para pacientes menores de 07 anos (dieta, creme dental, saliva, urina)

- 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 24 horas consecutivas.
- Serão oferecidos aos voluntários 2 potes (1L) para cada dia (método de dois dias de coleta), 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.
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.
- 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...).
- 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.
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. Pesar as amostras sólidas homogeneizadas em gramas e com 2 casas após a vírgula. Anotar o peso .
- 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). 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.

- 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).
- 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 serão lavados com água deionizada e por este motivo, será 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.

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, e então será separada a alíquota.

• As jaras poderão 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.

- Instruções para realização da estimativa de ingestão de flúor pelo dentífrico

- 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). 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 dentífrico utilizado.
 - 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 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 (pesar sem a tampa e já com a etiqueta)
 - Molhar a escova com água deionizada e pesar na balança eletrônica. Pesar em gramas com 2 casas decimais. Não esquecer de anotar este valor.
 - Colocar o dentífrico na escova (dentífrico 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) e anotar o valor
 - 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 uma almotolia (pisseta) com os 50 mL de água deionizada. Lembre-se que no cabo da escova pode haver resto de pasta. Então, comece a lavar a escova pelo cabo em seguida vá para as cerdas. Não utilize toda a água de uma vez só, lave um pouco, dê umas batidas com a escova no pote para que saia toda a pasta da escova. A escova deve ser lavada no pote de 500 mL.
- Terminado o enxágüe, o pote deverá ser homogeneizado. Para isto, agitar manualmente o pote fechado por umas 10 vezes. Pesá-lo (em g, 2 casas decimais) e anotar o valor na ficha.
- Coletar uma alíquota de 10 mL no tubo apropriado e congelar as amostras para serem enviadas para

ANEXO

Anexo 1: Instruções aos Autores da Revista Cadernos de Saúde Pública

Cadernos de Saúde Pública/Reports in Public Health (CSP) publica artigos originais com elevado mérito científico, que contribuem com o estudo da saúde pública em geral e disciplinas afins. Recomendamos aos autores a leitura atenta das instruções antes de submeterem seus artigos a CSP.

Como o resumo do artigo alcança maior visibilidade e distribuição do que o artigo em si, indicamos a leitura atenta da recomendação específica para sua elaboração. ([leia mais](#))

1. CSP ACEITA TRABALHOS PARA AS SEGUINTE SEÇÕES:

1.1 - Artigo: resultado de pesquisa de natureza empírica (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações). Dentro dos diversos tipos de estudos empíricos, apresentamos dois exemplos: artigo de pesquisa etiológica na epidemiologia e artigo utilizando metodologia qualitativa;

1.2 - Revisão: Revisão crítica da literatura sobre temas pertinentes à Saúde Coletiva, máximo de 8.000 palavras e 5 ilustrações. ([leia mais](#));

1.3 - Ensaio: texto original que desenvolve um argumento sobre temática bem delimitada, podendo ter até 8.000 palavras ([leia mais](#));

1.4 - Comunicação Breve: relatando resultados preliminares de pesquisa, ou ainda resultados de estudos originais que possam ser apresentados de forma sucinta (máximo de 1.700 palavras e 3 ilustrações);

1.5 - Debate: análise de temas relevantes do campo da Saúde Coletiva, que é acompanhado por comentários críticos assinados por autores a convite das Editoras, seguida de resposta do autor do artigo principal (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações);

1.6 - Seção temática: seção destinada à publicação de 3 a 4 artigos versando sobre tema comum, relevante para a Saúde Coletiva. Os interessados em submeter trabalhos para essa Seção devem consultar as Editoras;

1.7 - Perspectivas: análises de temas conjunturais, de interesse imediato, de importância para a Saúde Coletiva (máximo de 1.600 palavras);

1.8 - Questões Metodológicas: artigos cujo foco é a discussão, comparação ou avaliação de aspectos metodológicos importantes para o campo, seja na área de desenho de estudos, análise de dados ou métodos qualitativos (máximo de 6.000 palavras e 5 ilustrações); artigos sobre instrumentos de aferição epidemiológicos devem ser submetidos para esta Seção, obedecendo preferencialmente as regras de Comunicação Breve (máximo de 1.700 palavras e 3 ilustrações);

1.9 - Resenhas: resenha crítica de livro relacionado ao campo temático de CSP, publicado nos últimos dois anos (máximo de 1.200 palavras);

1.10 - Cartas: crítica a artigo publicado em fascículo anterior de CSP (máximo de 700 palavras).

2. NORMAS PARA ENVIO DE ARTIGOS

2.1 - CSP publica somente artigos inéditos e originais, e que não estejam em avaliação em nenhum outro periódico simultaneamente. Os autores devem declarar essas condições no processo de submissão. Caso seja identificada a publicação ou submissão simultânea em outro

periódico o artigo será desconsiderado. A submissão simultânea de um artigo científico a mais de um periódico constitui grave falta de ética do autor.

2.2 - Serão aceitas contribuições em Português, Inglês ou Espanhol.

2.3 - Notas de rodapé e anexos não serão aceitos.

2.4 - A contagem de palavras inclui somente o corpo do texto e as referências bibliográficas, conforme item 12.13.

2.5 - Todos os autores dos artigos aceitos para publicação serão automaticamente inseridos no banco de consultores de CSP, se comprometendo, portanto, a ficar à disposição para avaliarem artigos submetidos nos temas referentes ao artigo publicado.

3. PUBLICAÇÃO DE ENSAIOS CLÍNICOS

3.1 - Artigos que apresentem resultados parciais ou integrais de ensaios clínicos devem obrigatoriamente ser acompanhados do número e entidade de registro do ensaio clínico.

3.2 - Essa exigência está de acordo com a recomendação do Centro Latino-Americano e do Caribe de Informação em Ciências da Saúde (BIREME)/Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS)/Organização Mundial da Saúde (OMS) sobre o Registro de Ensaio Clínicos a serem publicados a partir de orientações da OMS, do International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) e do Workshop ICTPR.

3.3- As entidades que registram ensaios clínicos segundo os critérios do ICMJE são:

- [Australian New Zealand Clinical Trials Registry \(ANZCTR\)](#)
- [ClinicalTrials.gov](#)
- [International Standard Randomised Controlled Trial Number \(ISRCTN\)](#)
- [Netherlands Trial Register \(NTR\)](#)
- [UMIN Clinical Trials Registry \(UMIN-CTR\)](#)
- [WHO International Clinical Trials Registry Platform \(ICTRP\)](#)

4. FONTES DE FINANCIAMENTO

4.1 - Os autores devem declarar todas as fontes de financiamento ou suporte, institucional ou privado, para a realização do estudo.

4.2 - Fornecedores de materiais ou equipamentos, gratuitos ou com descontos, também devem ser descritos como fontes de financiamento, incluindo a origem (cidade, estado e país).

4.3 - No caso de estudos realizados sem recursos financeiros institucionais e/ou privados, os autores devem declarar que a pesquisa não recebeu financiamento para a sua realização.

5. CONFLITO DE INTERESSES

5.1 - Os autores devem informar qualquer potencial conflito de interesse, incluindo interesses políticos e/ou financeiros associados a patentes ou propriedade, provisão de materiais e/ou insumos e equipamentos utilizados no estudo pelos fabricantes.

6. COLABORADORES

6.1 - Devem ser especificadas quais foram as contribuições individuais de cada autor na elaboração do artigo.

6.2 - Lembramos que os critérios de autoria devem basear-se nas deliberações do [ICMJE](#), que determina o seguinte: o reconhecimento da autoria deve estar baseado em contribuição

substancial relacionada aos seguintes aspectos: 1. Concepção e projeto ou análise e interpretação dos dados; 2. Redação do artigo ou revisão crítica relevante do conteúdo intelectual; 3. Aprovação final da versão a ser publicada; 4. Ser responsável por todos os aspectos do trabalho na garantia da exatidão e integridade de qualquer parte da obra. Essas quatro condições devem ser integralmente atendidas.

7. AGRADECIMENTOS

7.1 - Possíveis menções em agradecimentos incluem instituições que de alguma forma possibilitaram a realização da pesquisa e/ou pessoas que colaboraram com o estudo, mas que não preencheram os critérios para serem coautores.

8. REFERÊNCIAS

8.1 - As referências devem ser numeradas de forma consecutiva de acordo com a ordem em que forem sendo citadas no texto. Devem ser identificadas por números arábicos sobrescritos (p. ex.: Silva ¹). As referências citadas somente em tabelas e figuras devem ser numeradas a partir do número da última referência citada no texto. As referências citadas deverão ser listadas ao final do artigo, em ordem numérica, seguindo as normas gerais dos *(Requisitos Uniformes para Manuscritos Apresentados a Periódicos Biomédicos)*.

8.2 - Todas as referências devem ser apresentadas de modo correto e completo. A veracidade das informações contidas na lista de referências é de responsabilidade do(s) autor(es).

8.3 - No caso de usar algum software de gerenciamento de referências bibliográficas (p. ex.: EndNote), o(s) autor(es) deverá(ão) converter as referências para texto.

9. NOMENCLATURA

9.1 - Devem ser observadas as regras de nomenclatura zoológica e botânica, assim como abreviaturas e convenções adotadas em disciplinas especializadas.

10. ÉTICA EM PESQUISAS ENVOLVENDO SERES HUMANOS

10.1 - A publicação de artigos que trazem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos está condicionada ao cumprimento dos princípios éticos contidos na *Declaração de Helsinki* (1964, reformulada em 1975, 1983, 1989, 1996, 2000 e 2008), da Associação Médica Mundial.

10.2 - Além disso, deve ser observado o atendimento a legislações específicas (quando houver) do país no qual a pesquisa foi realizada.

10.3 - Artigos que apresentem resultados de pesquisas envolvendo seres humanos deverão conter uma clara afirmação deste cumprimento (tal afirmação deverá constituir o último parágrafo da seção Métodos do artigo).

10.4 - Após a aceitação do trabalho para publicação, todos os autores deverão assinar um formulário, a ser fornecido pela Secretaria Editorial de CSP, indicando o cumprimento integral de princípios éticos e legislações específicas.

10.5 - O Conselho Editorial de CSP se reserva o direito de solicitar informações adicionais sobre os procedimentos éticos executados na pesquisa.

11. PROCESSO DE SUBMISSÃO ONLINE

11.1 - Os artigos devem ser submetidos eletronicamente por meio do sítio do Sistema de Avaliação e Gerenciamento de Artigos (SAGAS), disponível

em: <http://cadernos.ensp.fiocruz.br/csp/index.php>.

11.2 - Outras formas de submissão não serão aceitas. As instruções completas para a submissão são apresentadas a seguir. No caso de dúvidas, entre em contato com o suporte sistema SAGAS pelo e-mail: csp-artigos@ensp.fiocruz.br.

11.3 - Inicialmente o autor deve entrar no sistema SAGAS. Em seguida, inserir o nome do usuário e senha para ir à área restrita de gerenciamento de artigos. Novos usuários do sistema SAGAS devem realizar o cadastro em “Cadastre-se” na página inicial. Em caso de esquecimento de sua senha, solicite o envio automático da mesma em “Esqueceu sua senha? Clique aqui”.

11.4 - Para novos usuários do sistema SAGAS. Após clicar em “Cadastre-se” você será direcionado para o cadastro no sistema SAGAS. Digite seu nome, endereço, e-mail, telefone, instituição.

12. ENVIO DO ARTIGO

12.1 - A submissão *online* é feita na área restrita de gerenciamento de artigos <http://cadernos.ensp.fiocruz.br/csp/index.php>. O autor deve acessar a "Central de Autor" e selecionar o link "Submeta um novo artigo".

12.2 - A primeira etapa do processo de submissão consiste na verificação às normas de publicação de CSP. O artigo somente será avaliado pela Secretaria Editorial de CSP se cumprir todas as normas de publicação.

12.3 - Na segunda etapa são inseridos os dados referentes ao artigo: título, título resumido, área de concentração, palavras-chave, informações sobre financiamento e conflito de interesses, resumos e agradecimentos, quando necessário. Se desejar, o autor pode sugerir potenciais consultores (nome, e-mail e instituição) que ele julgue capaz de avaliar o artigo.

12.4 - O título completo (nos idiomas Português, Inglês e Espanhol) deve ser conciso e informativo, com no máximo 150 caracteres com espaços.

12.5 - O título resumido poderá ter máximo de 70 caracteres com espaços.

12.6 - As palavras-chave (mínimo de 3 e máximo de 5 no idioma original do artigo) devem constar na base da Biblioteca Virtual em Saúde BVS.

12.7 - *Resumo*. Com exceção das contribuições enviadas às seções Resenha, Cartas ou Perspectivas, todos os artigos submetidos deverão ter resumo no idioma original do artigo, podendo ter no máximo 1.100 caracteres com espaço. Visando ampliar o alcance dos artigos publicados, CSP publica os resumos nos idiomas português, inglês e espanhol. No intuito de garantir um padrão de qualidade do trabalho, oferecemos gratuitamente a tradução do resumo para os idiomas a serem publicados.

12.8 - *Agradecimentos*. Possíveis agradecimentos às instituições e/ou pessoas poderão ter no máximo 500 caracteres com espaço.

12.9 - Na terceira etapa são incluídos o(s) nome(s) do(s) autor(es) do artigo, respectiva(s) instituição(ões) por extenso, com endereço completo, telefone e e-mail, bem como a colaboração de cada um. O autor que cadastrar o artigo automaticamente será incluído como autor de artigo. A ordem dos nomes dos autores deve ser a mesma da publicação.

12.10 - Na quarta etapa é feita a transferência do arquivo com o corpo do texto e as referências.

- 12.11** - O arquivo com o texto do artigo deve estar nos formatos DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format) ou ODT (Open Document Text) e não deve ultrapassar 1 MB.
- 12.12** - O texto deve ser apresentado em espaço 1,5cm, fonte Times New Roman, tamanho 12.
- 12.13** - O arquivo com o texto deve conter somente o corpo do artigo e as referências bibliográficas. Os seguintes itens deverão ser inseridos em campos à parte durante o processo de submissão: resumos; nome(s) do(s) autor(es), afiliação ou qualquer outra informação que identifique o(s) autor(es); agradecimentos e colaborações; ilustrações (fotografias, fluxogramas, mapas, gráficos e tabelas).
- 12.14** - Na quinta etapa são transferidos os arquivos das ilustrações do artigo (fotografias, fluxogramas, mapas, gráficos e tabelas), quando necessário. Cada ilustração deve ser enviada em arquivo separado clicando em "Transferir".
- 12.15** - *Ilustrações*. O número de ilustrações deve ser mantido ao mínimo, conforme especificado no item 1 (fotografias, fluxogramas, mapas, gráficos e tabelas).
- 12.16** - Os autores deverão arcar com os custos referentes ao material ilustrativo que ultrapasse esse limite e também com os custos adicionais para publicação de figuras em cores.
- 12.17** - Os autores devem obter autorização, por escrito, dos detentores dos direitos de reprodução de ilustrações que já tenham sido publicadas anteriormente.
- 12.18** - *Tabelas*. As tabelas podem ter até 17cm de largura, considerando fonte de tamanho 9. Devem ser submetidas em arquivo de texto: DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format) ou ODT (Open Document Text). As tabelas devem ser numeradas (números arábicos) de acordo com a ordem em que aparecem no texto.
- 12.19** - *Figuras*. Os seguintes tipos de figuras serão aceitos por CSP: Mapas, Gráficos, Imagens de Satélite, Fotografias e Organogramas, e Fluxogramas.
- 12.20** - Os mapas devem ser submetidos em formato vetorial e são aceitos nos seguintes tipos de arquivo: WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics). Nota: os mapas gerados originalmente em formato de imagem e depois exportados para o formato vetorial não serão aceitos.
- 12.21** - Os gráficos devem ser submetidos em formato vetorial e serão aceitos nos seguintes tipos de arquivo: XLS (Microsoft Excel), ODS (Open Document Spreadsheet), WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics).
- 12.22** - As imagens de satélite e fotografias devem ser submetidas nos seguintes tipos de arquivo: TIFF (Tagged Image File Format) ou BMP (Bitmap). A resolução mínima deve ser de 300dpi (pontos por polegada), com tamanho mínimo de 17,5cm de largura.
- 12.23** - Os organogramas e fluxogramas devem ser submetidos em arquivo de texto ou em formato vetorial e são aceitos nos seguintes tipos de arquivo: DOC (Microsoft Word), RTF (Rich Text Format), ODT (Open Document Text), WMF (Windows MetaFile), EPS (Encapsuled PostScript) ou SVG (Scalable Vectorial Graphics).
- 12.24** - As figuras devem ser numeradas (números arábicos) de acordo com a ordem em que aparecem no texto.
- 12.25** - Títulos e legendas de figuras devem ser apresentados em arquivo de texto separado dos

arquivos das figuras.

12.26 - Formato vetorial. O desenho vetorial é originado a partir de descrições geométricas de formas e normalmente é composto por curvas, elipses, polígonos, texto, entre outros elementos, isto é, utilizam vetores matemáticos para sua descrição.

12.27 - Finalização da submissão. Ao concluir o processo de transferência de todos os arquivos, clique em “Finalizar Submissão”.

12.28 - Confirmação da submissão. Após a finalização da submissão o autor receberá uma mensagem por e-mail confirmando o recebimento do artigo pelos CSP. Caso não receba o e-mail de confirmação dentro de 24 horas, entre em contato com a secretaria editorial de CSP por meio do e-mail: csp-artigos@ensp.fiocruz.br.

13. ACOMPANHAMENTO DO PROCESSO DE AVALIAÇÃO DO ARTIGO

13.1 - O autor poderá acompanhar o fluxo editorial do artigo pelo sistema SAGAS. As decisões sobre o artigo serão comunicadas por e-mail e disponibilizadas no sistema SAGAS.

13.2 - O contato com a Secretaria Editorial de CSP deverá ser feito através do sistema SAGAS.

14. ENVIO DE NOVAS VERSÕES DO ARTIGO

14.1 - Novas versões do artigo devem ser encaminhadas usando-se a área restrita de gerenciamento de artigos <http://www.ensp.fiocruz.br/csp/> do sistema SAGAS, acessando o artigo e utilizando o link "Submeter nova versão".

15. PROVA DE PRELO

15.1 - Após a aprovação do artigo, a prova de prelo será enviada para o autor de correspondência por e-mail. Para visualizar a prova do artigo será necessário o programa Adobe Reader ou similar. Esse programa pode ser instalado gratuitamente pelo site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>.

15.2 - A prova de prelo revisada e as declarações devidamente assinadas deverão ser encaminhadas para a secretaria editorial de CSP por e-mail (cadernos@ensp.fiocruz.br) ou por fax +55(21)2598-2514 dentro do prazo de 72 horas após seu recebimento pelo autor de correspondência.

Anexo 2: Declaração do Comitê de Ética em Pesquisa

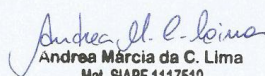


UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 10ª Reunião realizada no dia 23/10/2014, o Projeto de pesquisa intitulado: **“AVALIAÇÃO DE SISTEMA DESFLUORETADOR (ALUMINA) E PRÉ-FILTRO (CÉRIO + CARVÃO ATIVADO) EM UMA COMUNIDADE RURAL”**, do Pesquisador Emerson Tavares de Sousa. Protocolo 0544/14. CAAE: 36916614.8.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Andrea Márcia da C. Lima
Mat. SIAPE 1117510
Secretária do CEP-CCS-UFPB

Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba
Campus I – Cidade Universitária - 1º Andar - CEP 58051-900 – João Pessoa – PB
☎ (83) 3216 7791 – E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com