



AMANDA FALCÃO DA SILVA

**BIODISPONIBILIDADE DE FLUORETO NO PLASMA SANGUÍNEO
E SALIVA APÓS INGESTÃO DE ÁGUA OU DE ALIMENTOS
PREPARADOS COM ÁGUA FLUORETADA**

PIRACICABA

2014



**Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba**

AMANDA FALCÃO DA SILVA

**BIODISPONIBILIDADE DE FLUORETO NO PLASMA SANGUÍNEO
E SALIVA APÓS INGESTÃO DE ÁGUA OU ALIMENTOS
PREPARADOS COM ÁGUA FLUORETADA**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutora em Odontologia, na área de Cariologia.

Orientadora: Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta

**Este exemplar corresponde à versão final
da tese defendida por Amanda Falcão da Silva,
e orientada pela Profa. Dra. Livia M.A. Tenuta**

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

Si38b Silva, Amanda Falcão da, 1986-
Biodisponibilidade de fluoreto no plasma sanguíneo e na saliva após a ingestão de água ou alimentos preparados com água fluoretada / Amanda Falcão da Silva. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Lívia Maria Andaló Tenuta.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Flúor. 2. Água. 3. Biodisponibilidade. I. Tenuta, Lívia Maria Andaló, 1976-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Fluoride bioavailability in blood plasma and saliva after ingestion of water or foods prepared with fluoridated water

Palavras-chave em inglês:

Fluoride

Water

Bioavailability

Área de concentração: Cariologia

Titulação: Doutora em Odontologia

Banca examinadora:

Lívia Maria Andaló Tenuta [Orientador]

Paulo Zárate Pereira

Mitsue Fujimaki Hayacibara

Ana Paula Pires dos Santos

Tarcísio Jorge Leitão de Oliveira

Data de defesa: 16-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Odontologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 16 de Janeiro de 2014, considerou a candidata AMANDA FALCÃO DA SILVA aprovada.

Livia M. A. Tenuta

Profa. Dra. LÍVIA MARIA ANDALÓ TENUTA

Ana Paula Pires dos Santos

Profa. Dra. ANA PAULA PIRES DOS SANTOS

Mitsue Fujimaki

Profa. Dra. MITSUE FUJIMAKI HAYACIBARA

Paulo Zarate Pereira

Prof. Dr. PAULO ZARATE PEREIRA

Tarcísio Jorge Leitão de Oliveira

Prof. Dr. TARCÍSIO JORGE LEITÃO DE OLIVEIRA

RESUMO

Há clara evidência da importância da água fluoretada como um meio coletivo de uso de fluoreto (F), responsável pelo decréscimo na incidência de cárie dental. Entretanto, ainda se discute a respeito de seu mecanismo de ação, quer seja relacionado ao aumento da concentração de F na saliva pelo contato com a água fluoretada, quer seja pelo retorno do íon à cavidade bucal, após sua absorção, pela secreção salivar. Além disso, não apenas a ingestão de água fluoretada, mas também de alimentos com ela preparados, tem potencial anticárie, porém desconhece-se se há diferença entre ambas as formas de utilização na capacidade de elevar a concentração salivar de F. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a biodisponibilidade de F proveniente da ingestão de água ou de alimentos preparados com água fluoretada. O estudo foi *in vivo* (n=20), cruzado, duplo cego, e realizado em 4 fases experimentais, nas quais os voluntários ingeriram: água não fluoretada ($< 0,01 \mu\text{g F/mL}$), água fluoretada ($1 \mu\text{g F/mL}$), refeição preparada com água não fluoretada ou refeição preparada com água fluoretada. A refeição foi composta por arroz, feijão, carne, vagem, cenoura, suco e gelatina, e o tempo para ingestão foi padronizado em 15 minutos. A dose de F ingerida foi baseada no peso corporal para atingir $0,8 \mu\text{g F/kg}$ peso corporal, quando da ingestão água ou da refeição preparada com água não fluoretada (dose correspondente ao F residual presente nos alimentos), e $12 \mu\text{g F /Kg}$ de peso corporal, quando da ingestão de água ou refeição preparada com água fluoretada. Imediatamente antes e 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos após a ingestão, amostras de sangue e saliva não estimulada foram coletadas para determinação da concentração de F. As amostras de sangue (de 1 a $10 \mu\text{L}$) foram obtidas por punção digital e a concentração de F foi determinada no plasma sanguíneo por eletrodo íon-específico, adaptado para microanálise. Na saliva, a concentração de F foi determinada após microdifusão facilitada com hexametildisiloxano. A biodisponibilidade de F foi estimada a partir da área sob a

curva (ASC) das concentrações plasmática e salivar de F em função do tempo. Os grupos foram comparados utilizando análise de variância, seguida de teste de Tukey. Significativo aumento na ASC da concentração de F no plasma e saliva foi observado quando da ingestão de água e da refeição preparada com água fluoretada em comparação com os grupos controles ($p < 0,05$), sem diferença entre as formas de utilização ($p > 0,05$). Conclui-se que tanto a ingestão de água quanto de alimento fluoretado aumentam a biodisponibilidade de F no plasma e na saliva e podem contribuir para seu benefício anticárie.

Palavras-chave: flúor, água, alimentos, biodisponibilidade.

ABSTRACT

There is clear evidence of the importance of fluoridated water as a public measure of fluoride (F) use, being responsible for the decrease in dental caries incidence. Nevertheless, its mechanism of action, whether related to the increase in salivary F concentration by the immediate contact with fluoridated water or by the return of the ion to the oral cavity by salivary secretion after its absorption, is still under discussion. Moreover, not only the ingestion of fluoridated water, but also of food cooked with it, has anticaries potential, but it is unknown whether there are differences between these two ways in respect to the ability to elevate salivary F concentration. Thus, the aim of this study was to evaluate the F bioavailability from drinking water or foods prepared with fluoridated water. The study was in vivo (n = 20), crossover, double blind, conducted in 4 experimental phases, in which volunteers ingested: non-fluoridated water (< 0.01 µg F / ml), fluoridated water (1 µg F / ml), meal prepared with non-fluoridated water and meal prepared with fluoridated water. The meal consisted of rice, beans, meat, beans, carrot, juice and gelatin, and the time for intake was standardized in 15 minutes. The dose of ingested F was based on body weight to achieve 0.8 µg F/kg body weight, considering the intake of the water or meal prepared with non-fluoridated water (corresponding to the residual F dose present in foods), and 12 µg F/kg of body weight, considering the intake of water or food prepared with fluoridated water. Immediately before and 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 and 180 minutes after ingestion, unstimulated saliva and blood samples were collected to determine the F concentration. Blood samples (1 to 10 µL) were obtained from finger draws and F concentration in blood plasma was determined by ion-specific electrode, adapted for microanalysis. In saliva, the F concentration was determined after microdiffusion with hexamethyldisiloxane. The F bioavailability was estimated from the area under the curve (AUC) of plasma and salivary F concentrations as a function of time. Groups were compared using analysis of variance followed by Tukey test. Significant increase in the AUC of plasma F and saliva concentrations

were observed when both water and meal prepared with fluoridated water were compared to control groups ($p < 0.05$), with no difference between the forms of use ($p > 0.05$). We conclude that both the intake of fluoridated water or foods prepared with it increase the F bioavailability in plasma and saliva and can have anticaries potential.

Key words: fluoride, drinking water, foods, bioavailability

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xv
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAIS E MÉTODOS	24
5 RESULTADOS	34
6 DISCUSSÃO	44
7 CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS	50
ANEXO	61

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha orientadora **Profa. Dra. Livia Maria Andaló Tenuta** por ter acreditado em mim e pela constante contribuição na minha formação intelectual e científica. Agradeço por todos os ensinamentos, incentivo, dedicação e competência durante todo esse tempo. Seu exemplo pessoal e profissional me inspiram.

AGRADECIMENTOS

Ao Magnífico Reitor da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do Diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**.

Ao **CNPq**, pela concessão da bolsa de doutorado, sem a qual a realização desse trabalho não seria possível.

À **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**, Coordenadora Geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, Coordenadora do Programa de Pós- Graduação em Odontologia da FOP-UNICAMP, pela contribuição na minha formação durante toda minha pós-graduação.

Ao **Prof. Dr. Jaime Aparecido Cury** pelos ensinamentos e diretrizes durante toda minha pós-graduação. Manifesto aqui minha admiração pelo seu exemplo único.

À **Profa. Dra. Branca Heloisa de Oliveira Martins Vieira**, minha orientadora de iniciação científica, pelo exemplo pessoal e profissional que sempre levarei em toda minha carreira.

Aos **Profs. Drs. Jaime Aparecido Cury, Cíntia Pereira Machado Tabchoury e Antônio Pedro Ricomini Filho** pelas considerações e contribuições realizadas no exame de qualificação.

À **Heloísa Navarro Pantaroto**, pela amizade construída nesses anos e pela imprescindível ajuda na realização deste trabalho.

Aos técnicos do laboratório de Bioquímica Oral da FOP-UNICAMP, **Waldomiro Vieira Filho** e **José Alfredo da Silva**, pela agradável convivência e pela ajuda sempre disponível.

Aos voluntários que participaram desta pesquisa, pela colaboração, cooperação e dedicação, indispensáveis para a realização deste trabalho.

À todos **amigos** que fiz em Piracicaba durante este período de pós-graduação, pelo companheirismo e amizade construída nesses anos de convivência.

À toda a minha família, em especial, meus pais **Nilton Pedro da Silva e Elba Falcão da Silva**, meus irmãos **Marcelle, Rodrigo e Camila Falcão** e minhas sobrinhas **Alice e Maria Eduarda Falcão**, pelo amor incondicional, pelo grande apoio ao longo destes anos e por entenderem as minhas ausências.

1 INTRODUÇÃO

O uso de fluoretos tem sido considerado um fator primordial para o declínio de cárie dental (Cury et al., 2004; Narvai et al., 2006) e dentre os meios de uso de fluoreto, a fluoretação da água de abastecimento público é considerada um meio de abrangência comunitária, independentemente do acesso a dentifrícios fluoretados (McDonagh et al., 2000; Narvai et al., 2006; Pizzo et al., 2007). A política de saúde bucal brasileira endossa fortemente a fluoretação de águas como meio de controle da cárie dental (Brasil, Ministério da Saúde, 2009) e os dados epidemiológicos confirmam que regiões com abastecimento de água fluoretada apresentam menor prevalência de cárie (Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, 2002; Brasil, 2004b).

Considerando que está consagrado na literatura que o mecanismo de ação do fluoreto é essencialmente tópico, quando disponível na cavidade bucal (Groeneveld et al., 1990; Thylstrup, 1990), considera-se que a água fluoretada aja mantendo concentrações ligeiramente elevadas de fluoreto na saliva/biofilme de indivíduos que a consomem continuamente (Oliveby et al., 1990; Cury & Tenuta, 2008). Esse aumento da concentração de fluoreto no meio bucal ocorreria como resultado do fluoreto absorvido no trato gastrointestinal, retornando a cavidade bucal por meio da secreção salivar. De fato, já foi demonstrado que a interrupção na fluoretação de água resulta em decréscimo na concentração de fluoreto no biofilme dental (Nobre dos Santos & Cury, 1988), retornando aos valores iniciais após a refluoretação (Ellwood et al., 2008). Entretanto, existem também dados na literatura de que o aumento da concentração de fluoreto nos fluidos bucais dos indivíduos que ingerem água fluoretada ocorre devido a sua retenção tópica na cavidade bucal minutos após a ingestão da água fluoretada (Brunn & Thylstrup, 1984).

Cabe ressaltar que não apenas a ingestão da água fluoretada (na forma líquida) tem efeito no aumento da concentração de fluoreto nos fluidos bucais, como também a ingestão de alimentos cozidos com água fluoretada, visto que o F

é incorporado aos alimentos quando do seu preparo (Jackson et al., 2002; Casarin et al., 2007; Zohoori et al., 2012). Dessa forma, logo após a ingestão de água ou uma refeição com alimentos cozidos com água fluoretada, ocorreria um aumento momentâneo na concentração de fluoreto na saliva, e cerca de 30 a 45 minutos após a ingestão, um novo incremento nessa concentração, como resultado do fluoreto ingerido, absorvido no trato gastrointestinal e que retorna à cavidade bucal pela secreção salivar (Maguire et al., 2005). No entanto, esse mecanismo não tem sido explorado na literatura, e, portanto, tendo em vista a importância da comparação entre a biodisponibilidade de fluoreto na saliva e plasma sanguíneo de indivíduos mediante a ingestão de água ou de uma refeição preparada com água fluoretada, o presente estudo foi realizado.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Inegavelmente, a fluoretação da água de abastecimento público é uma das intervenções de maior custo efetividade disponível que provê redução de desigualdades na saúde bucal uma vez que sua utilização ocorre em nível comunitário, apresentando alta abrangência, baixo custo. Seu efeito preventivo deve ser atribuído a um aumento da concentração de fluoreto na saliva, e conseqüentemente, no biofilme dental, onde, após a ingestão da água contendo fluoreto, este será absorvido no trato gastrointestinal e uma pequena parte será secretado pelas glândulas salivares retornando à saliva, disponibilizando o fluoreto para exercer sua ação local na cavidade bucal (McDonagh et al., 2000; Cury & Tenuta, 2008; Rugg-Gun & Do, 2012).

Sob esse aspecto, visando a uma melhor compreensão de seu mecanismo de ação, e conseqüentemente seu papel fundamental como medida de controle de saúde pública, a presente revisão da literatura será dividida em dois tópicos: farmacocinética do fluoreto e o papel da água fluoretada no controle do processo de cárie dental.

2.1 Farmacocinética do fluoreto

Em 1953, Dost propôs o termo farmacocinética para descrever o movimento de uma substância através do organismo. Atualmente, a farmacocinética pode ser mais bem definida como o estudo quantitativo dos processos de absorção, distribuição, biotransformação e eliminação das drogas no decurso do tempo (Silva, 2010a; Yagiela, 2011). A farmacocinética utiliza metodologia matemática para descrever as variações no tempo dos processos de administração, absorção, distribuição e eliminação. A variável básica desses estudos é a concentração da substância nos diferentes fluidos e excreções pelo organismo, sendo que a concentração está relacionada com a via de administração, a dose empregada e com a eliminação (Levine, 1991).

Portanto, o conhecimento dos processos envolvidos na farmacocinética é necessário para que se possa entender os efeitos biológicos do F no organismo humano.

2.1.1 Absorção e distribuição

A principal rota de absorção de F é através do trato gastrointestinal. Ao ser ingerido, o F é absorvido rapidamente e após alguns minutos atinge níveis detectáveis no plasma sanguíneo. O pico de F no plasma sanguíneo é proporcional à dose de F ingerida e ao grau de absorção. Por volta de 30 a 45 minutos após a ingestão, cerca de 90% do F encontra-se presente no sangue (Whitford, 1996).

Mais especificamente em relação à absorção, para que uma droga seja absorvida, atinja seu local de ação e, por fim, seja eliminada, a mesma deve atravessar uma ou mais barreiras, representadas pelas membranas biológicas (Silva, 2010b, Yagiela, 2011). O processo fisiológico pelo qual o F é absorvido parece ser a difusão passiva, um dos processos físico-químicos mais observados nos fluidos biológicos, sendo, portanto, o processo no qual a velocidade de transferência é proporcional ao gradiente de concentração através da membrana.

Como a membrana plasmática é composta por uma bicamada lipídica, a ausência de cargas iônicas constitui um importante fator que favorece a lipossolubilidade. Logo, a polaridade de certas moléculas tem grande importância na sua solubilidade e na sua absorção, especialmente quando essa se faz pela modalidade de difusão passiva ou simples (Nelson & Cox, 2008).

Dessa forma, o mecanismo e o grau de absorção gástrica de F estão intimamente relacionados com a acidez gástrica. Para os eletrólitos fracos, o pH do meio circundante afeta o grau de ionização e, por conseguinte, a absorção (Yagiela, 2011). Considerando tal fato, o suco gástrico possui pH ácido (entre 1,5 e 2,0) que favorecerá a formação de ácido fluorídrico (HF), que possui pKa de 3,45. Logo, o ácido fluorídrico formado atravessará facilmente a membrana das

células, como as da mucosa gástrica, devido a sua apolaridade, sendo então, enviado para a corrente sanguínea. O F não absorvido no estômago será então absorvido na primeira porção superior do intestino, que possui grande capacidade para absorção (Ekstrand, 1996), embora mais lentamente. O F não absorvido, por encontrar-se na forma insolúvel, como por exemplo, o fluoreto de cálcio e outros sais de baixa solubilidade, será excretado por meio das fezes, representando aproximadamente 10% da quantidade total ingerida de F em crianças e adultos (Withford, 1990; Withford, 1994; Ekstrand, 1996).

Experimentos têm comprovado que o pH, ou seja, a acidez gástrica, tem papel fundamental na absorção. Whitford *et al.* (1977) mostraram que ratos que receberam atropina, substância que reduz o grau de secreção de suco gástrico e motilidade gástrica, e que receberam logo em seguida solução de NaF, tiveram uma taxa de absorção reduzida quando comparados com ratos que só receberam a solução de NaF. Sugere-se, então, a existência de uma relação inversa entre pH e taxa de absorção gástrica de F.

Um aspecto importante a se enfatizar é que todo o processo de distribuição corporal e eliminação na urina ocorrem somente após o F atingir o plasma sanguíneo, que atua como um compartimento central. Em relação à distribuição corporal, faz-se necessário conhecer os aspectos quantitativos e qualitativos da distribuição de F em cada um dos principais tipos de tecido, para que se possa discernir o mecanismo por trás da distribuição entre os fluidos intracelulares e extracelulares. Na maioria dos tecidos, o F penetra rapidamente nos espaços intracelulares por uma razão T/P (tecido/plasma). Dentre eles, o rim possui a maior concentração de F, com uma razão T/P, em média, de 4,16. Tal fato é atribuído principalmente a altas concentrações de F presentes no fluido tubular e intersticial, devido aos processos de filtração glomerular e reabsorção tubular durante a excreção urinária. Normalmente, nos demais tecidos, essa razão encontra-se entre 0,4 e 0,9. As exceções são o cérebro e o tecido adiposo onde o valor T/P normalmente é menor que 0,2. Portanto, as diferentes concentrações da

razão T/P ocorrem devido a diferentes concentrações intracelulares de fluoreto (Whitford, 1996).

Dessa maneira, o F é distribuído pelo plasma para tecidos e órgãos. O fato de que as concentrações de F no plasma e no fluido extracelular são maiores do que aquelas do fluido intracelular consistem na hipótese de que o ácido fluorídrico (HF), e não o F iônico está em equilíbrio de difusão através das membranas celulares (Whitford *et al.*, 1979). Devido à facilidade de atravessar membranas na forma de HF, o F tenderá a se acumular nos compartimentos mais alcalinos, que favorecem a ionização do HF em H⁺ e F⁻, dificultando a posterior passagem do F⁻ através da membrana pela qual ele transitou na forma de HF.

As concentrações de F no plasma não são reguladas homeostaticamente, elas aumentam ou decrescem de acordo com o padrão de ingestão de F, também denominado de estado aparente de equilíbrio de F, no qual a flutuação da concentração de F no plasma sanguíneo depende além da dose de fluoreto ingerida, da frequência da dose e meia-vida do F no plasma (Ekstrand, 1996).

Sob esse aspecto, Ekstrand *et al.* (1981) estudaram a farmacocinética do F com o objetivo de avaliarem em mais detalhes seu efeito farmacológico e toxicológico. Para tal, analisaram F de amostras de plasma de ratos ingerindo 25, 50, 100 e 150 ppm F pela água fluoretada durante 79 dias. Dentre os resultados, foi encontrada relação entre a concentração de F na água fluoretada e no plasma. A partir deste estudo ainda constatou-se que, quando a administração de F era suspendida, um rápido declínio na concentração de F no plasma era notado em até 48 horas em todos os grupos de tratamento, sugerindo-se não haver uma regulação homeostática da concentração de F.

Ainda nesse contexto, durante seis meses, Richards *et al.* (1985) estudaram a farmacocinética do F em porcos, em um estudo longitudinal. A dose ingerida de F era adicionada a comida dos animais e correspondia a 2 mg F/kg de peso corporal/dia. Baseado em análises frequentes da concentração de F no plasma, os autores demonstraram que a exposição crônica a F resultava em

contínuo aumento dos níveis de F no plasma, e que um equilíbrio entre os níveis de F no plasma não pode ser alcançado, confirmando que não há regulação homeostática de F.

2.1.2 Eliminação

A principal via de excreção do F circulante no sangue é por meio da eliminação renal pela urina. Basicamente, a eliminação urinária é controlada pelo grau de filtração glomerular e reabsorção tubular (Silva, 2010c). A eliminação renal de F é caracterizada por filtração glomerular seguida por um grau variável de reabsorção renal. O grau de reabsorção renal depende principalmente do fluxo urinário e do pH do fluido tubular. Por exemplo, em uma situação de pH ácido na urina, haverá tendência de formação de ácido fluorídrico dentro do túbulo renal, que será reabsorvido pela membrana tubular sendo então enviado para a corrente sanguínea, havendo uma menor excreção urinária de F (Whitford, 1996).

Outro aspecto a ser considerado diz respeito aos níveis plasmáticos de F, que são influenciados pelos relativos graus de deposição e dissolução óssea e pela eliminação renal do íon flúor. Nesse sentido, há uma relação direta entre a concentração de F no osso e no plasma com a idade; em crianças, por exemplo, a retenção de F nos tecidos mineralizados é elevada, devido ao crescimento e o estágio de desenvolvimento esquelético, em torno de 80-90% (Whitford, 1996). Portanto, considerando que o grau de acúmulo de F em tecidos mineralizados é inversamente proporcional a idade, em adultos em contrapartida, a excreção renal de F é maior; aproximadamente em torno de 40-50% do F administrado é excretado na urina (Ekstrand *et al.*, 1990).

Recentemente, Villa *et al.* (2010) realizaram um estudo relacionando a ingestão total diária de F, a excreção urinária diária e a fração de F retida, em crianças e adultos, no sentido de prever a ingestão total diária a partir da excreção urinária de F. A fração diária de F retida foi estimada em função da ingestão em crianças e adultos, assumindo-se uma média de 90% de absorção de

F. Em torno de 65% e 36% foram excretados para crianças e adultos, com uma ingestão média diária de F de 0,5 e 2 mg de F, respectivamente. Os resultados mostraram que há uma relação linear entre ingestão e excreção urinária de F, assim como a respeito do F retido, com algumas diferenças entre crianças e adultos. Os autores ainda concluíram que a excreção urinária de F pode ser uma ferramenta útil para estimar dados de ingestão total e fração retida de F.

Posteriormente, Martins *et al.* (2011) avaliaram a utilização da urina como potencial biomarcador da ingestão de F pela dieta e pelo dentifrício fluoretado. Para tal, realizaram uma investigação prospectiva avaliando o efeito da liberação do F retido após a interrupção na ingestão de F pela água de abastecimento e pelo dentifrício fluoretado e seu efeito após a reexposição a F. Onze voluntários, de 2 a 4 anos de idade, participaram do estudo no qual urina de 24 horas foi coletada inicialmente (voluntários expostos à água fluoretada e dentifrício F) e nos posteriores 28 dias de interrupção da exposição a F, tendo sido realizadas nove coletas durante o período de interrupção. Quando da reexposição à água e à dentifrício F, mais duas coletas de urina de 24 horas foram realizadas. Os resultados do estudo apontaram que a urina como biomarcador pode detectar rapidamente variações na ingestão de F, uma vez que demonstrou que o F circulante no organismo rapidamente reduz nas primeiras 24 horas de interrupção da ingestão de F pela água e pelo dentifrício, e aumenta rapidamente após a reexposição às mesmas fontes.

2.1.3 Biodisponibilidade

A noção de biodisponibilidade foi criada em 1945, por Oser e colaboradores, quando estudaram a absorção relativa das vitaminas existentes em diferentes formulações farmacêuticas. Em Farmacologia, o termo pode ser definido como a porção da droga que atinge a circulação geral, após a sua administração. A biodisponibilidade ainda indica a velocidade com que a droga atinge o sangue, que posteriormente será utilizada pelo organismo. A importância

da biodisponibilidade é dada uma vez que é o primeiro de muitos fatores que determinam a relação entre a dose da droga e sua intensidade de ação (Silva, 2010d; Yagiela, 2011).

Quando se fala a respeito da biodisponibilidade de F, a mesma se refere a todo F ingerido e absorvido pelo plasma sanguíneo, estando então disponível para distribuição e deposição em tecidos.

Do ponto de vista da exposição a um meio coletivo de fluoreto, como, por exemplo, água fluoretada, a biodisponibilidade de F na saliva corresponderia ao F ingerido, absorvido e distribuído, sendo reciclado na saliva via secreção pelas glândulas salivares.

Ekstrand (1977) realizou um estudo com o objetivo de correlacionar a concentração de íon flúor na saliva e no plasma. Seis voluntários ingeriram tabletes de NaF contendo 3, 6 ou 10 mg de F e posteriormente, amostras de plasma e saliva estimulada da glândula parótida foram obtidas por até 12 horas após a ingestão. Os resultados apontaram que as curvas de concentração de F na saliva e no plasma sanguíneo eram paralelas, indicando que a análise de F na saliva poderia ser utilizada como substituto da análise de plasma sanguíneo em estudos a respeito da farmacocinética do F.

Posteriormente, em 1978, Ekstrand estudou a biodisponibilidade de F no plasma em três distritos apresentando concentrações distintas de F na água (0,25; 1,2 e 9,6 $\mu\text{g F/mL}$). Quinze voluntários participaram do estudo no qual foram coletadas amostras de sangue por meio de punção digital e urina durante 2 dias consecutivos. As amostras de sangue (aproximadamente 0,8 a 1,5 mL) foram coletadas às 8:00, 12:00, 14:00 e 20:00h e toda a urina produzida durante as 48 horas foi coletada. Os resultados demonstraram que houve flutuação na concentração de F no plasma nos indivíduos vivendo em regiões com alta concentração de F na água. Variações na concentração de F no plasma dos indivíduos residentes na região contendo 1,2 $\mu\text{g F/mL}$ na água também foram encontradas, porém, esta variação não era tão evidente. Para os dados de urina, foi encontrada correlação moderada positiva ($r=0.71$) entre o clearance renal de F

e o fluxo urinário. O estudo concluiu sobre a importância do desenvolvimento de metodologias para coleta e monitoramento da concentração de F no plasma sanguíneo para o estudo da biodisponibilidade de F.

Ekstrand & Ehrnebo (1979) utilizaram dados de excreção urinária e concentração plasmática de F para investigar a extensão na qual a biodisponibilidade de tabletes de fluoreto de sódio (NaF) é influenciada pela administração simultânea de leite, exclusivamente, ou em combinação com outros produtos da dieta. Haja vista que os alimentos possuem em sua composição cátions bi- ou trivalentes, o grau de absorção de F foi reduzido devido à formação de complexos insolúveis, de baixa solubilidade, como por exemplo, fluoreto de cálcio (CaF₂). As curvas de concentração de F no plasma sanguíneo foram consideravelmente menores quando o leite foi coadministrado e esta redução foi ainda maior quando outros produtos da dieta foram incluídos. Os autores sugeriram que a menor biodisponibilidade encontrada seria frente à formação de compostos de baixa solubilidade com o F, fato que deveria ser levado em consideração quando da determinação da dose de suplementos de F, ressaltando ainda que tabletes que contivessem fluoreto de sódio não deveriam ser ingeridos juntamente com produtos a base de leite.

A absorção do íon flúor no trato gastrointestinal pode estar sujeita a vários outros fatores além da acidez gástrica, como por exemplo, o tipo de formulação do dentifrício fluoretado e o conteúdo gástrico no momento da absorção. Ekstrand & Spak (1988) estudaram o efeito da ingestão de alimentos na biodisponibilidade de F ingerido na forma de dentifrício fluoretado. Em relação ao delineamento do estudo, os voluntários (n=6) ingeriram 3 mg de F nas seguintes ocasiões: em jejum, 15, 60 ou 120 minutos após ingerirem um café da manhã padrão. Em cada fase, 3 g de dentifrício (dentifrício contendo 0,76% de MFP) eram ingeridas na forma de suspensão de dentifrício. Amostras de plasma foram coletadas por até seis horas após a ingestão. Os resultados apontaram que a biodisponibilidade do F foi menor após 15 e 60 minutos da ingestão de alimentos; entretanto, após 120 minutos da ingestão, não houve diferença estatística em

relação à situação de jejum. Os autores concluíram que a implicação clínica do estudo seria de que, se a escovação ocorrer logo após as refeições, a absorção de F será inibida em algum grau e altos picos plasmáticos de F não irão ocorrer.

Cury *et al.* (2005) avaliaram o efeito combinado das refeições e de um dentífrico de baixa concentração de F na redução da absorção de F, testando-se a hipótese de que, se um dentífrico convencional fosse utilizado logo após as refeições seria tão seguro quanto um dentífrico de baixa concentração utilizado em jejum, em termos de risco de fluorose dental. Os dentífricos avaliados possuíam sílica como abrasivo, e continham 0, 550 e 1100µg F/g, na forma de NaF. Foram simuladas três condições de conteúdo gástrico: jejum, após café da manhã e após almoço. Os voluntários ingeriram suspensão do dentífrico (45 mg/kg de peso corporal) em jejum ou 15 minutos após as refeições, sendo realizadas coletas de amostras de saliva e urina para se avaliar a biodisponibilidade de F. Considerando-se os resultados encontrados, os autores sugeriram que, em relação ao risco de fluorose dental, a utilização de dentífrico convencional contendo 1000 a 1100 µg F/g logo após as refeições seria tão seguro quanto o de baixa concentração ingerido em jejum.

No mesmo ano, a biodisponibilidade de F foi avaliada após ingestão de diferentes tipos de água fluoretada (concentrações de aproximadamente 1 µg F/mL): naturalmente ou artificialmente fluoretadas, variando ou não sua dureza. A dureza da água é normalmente determinada pelas concentrações de íons cálcio e magnésio e pode ser expressa como concentração equivalente de carbonato de cálcio (CaCO₃). A respeito do delineamento experimental, 20 voluntários ingeriram, a cada fase experimental, 500 mL da respectiva água a ser avaliada antes e durante as oito horas seguintes à ingestão, amostras de sangue venoso foram coletadas. Os resultados apontaram que não houve diferença entre a biodisponibilidade de F no plasma nos diferentes tipos de águas avaliadas, considerando os parâmetros farmacocinéticos de área sob a curva da concentração de F no plasma, concentração e tempo máximo para se atingir a máxima concentração de F. Os autores concluíram que as diferenças na

biodisponibilidade de F entre águas com diferentes tipos de dureza é pequena se comparada com a variação intra- e interindividuais na absorção após a ingestão de águas fluoretadas contendo concentrações próximas de 1 µg F/mL (Maguire et al., 2005).

Com o objetivo de determinar a biodisponibilidade de F na saliva após a ingestão de uma refeição preparada com sal fluoretado (250 ppm F) foi desenvolvido um estudo in vivo, com delineamento cruzado, no qual 10 adolescentes, residindo em região contendo água naturalmente fluoretada (1,06 µg F/mL), ingeriram uma refeição padronizada de espaguete com carne moída, preparada com sal fluoretado e não fluoretado. Amostras de saliva total foram coletadas antes e após 10, 30 e 180 min da ingestão da refeição. Os resultados apontaram que a ingestão da refeição preparada com sal fluoretado elevou a concentração de F na saliva, sendo o pico de concentração atingido após 10 min da ingestão da refeição. Posteriormente, foi visualizada uma queda gradativa na concentração de F, entretanto, mesmo ao final de 180 min da ingestão a concentração salivar de F apresentava-se maior que a concentração baseline, demonstrando o efeito benéfico do sal fluoretado elevando os níveis salivares de F (Hedman et al., 2006).

Em recente estudo, a excreção urinária de F em crianças recebendo leite fluoretado em uma área com baixa concentração de F na água (0,21 ppm F) foi comparada com a daquelas recebendo leite não-fluoretado e vivendo em região contendo água de abastecimento fluoretada (1,05 ppm F). Com esse objetivo, foi delineado um estudo cruzado com 3 fases, no qual 32 crianças entre os 6 e 7 anos de idade residindo em uma área sem adição de F à água foram recrutadas e a excreção de F na urina foi medida antes e depois da ingestão de 0.5 ou 0.9 mg de F no leite. Mantendo a dieta de costume e hábitos de higiene oral, as crianças foram submetidas a 2 semanas lead-in, sem ingestão de leite fluoretado. Urina de 24 horas foi coletada no quarto dia após o período de lead-in (baseline), e após a ingestão de leite fluoretado contendo ou (i) 0.5 mg ou (ii) 0.9 mg F (intervenção). Um grupo comparativo de treze crianças entre os 6 e 7 anos vivendo em áreas

contendo água fluoretada (1,05 ppm F) forneceram uma amostra de urina de 24 horas após lead-in de duas semanas utilizando leite não fluoretado. Os resultados encontrados apontaram que a excreção urinária de F para aqueles vivendo em região de água fluoretada foi de $0,393 \pm 0,209$ mg F/ dia. Para aqueles indivíduos consumindo leite F, o incremento na excreção de F (diferença com a coleta de urina baseline) foi de 0,130 e 0,153 mg F/dia após a ingestão de 0,5 e 0,9 mg F de leite F, respectivamente, não havendo diferenças significativas entre as duas concentrações de F no leite avaliadas. Os autores concluíram que o consumo de leite fluoretado aumentou significativamente a excreção urinária de F de indivíduos vivendo em região com água não fluoretada e que a mesma foi similar à excreção daqueles indivíduos vivendo em região com água de abastecimento fluoretada (Maguire et al., 2013).

2.2 Papel da água fluoretada no controle do processo de cárie dental

A adição de fluoreto na água para consumo humano tem sido utilizada como método de prevenção da cárie dentária em vários países há várias décadas, o que tem resultado em melhora significativa da saúde bucal das populações beneficiadas (McDonagh et al., 2000; Rugg-Gun & Do, 2012, Slade et al., 2013). Por essa razão, o processo de adição de fluoreto na água de abastecimento público foi considerado uma das dez maiores conquistas da saúde pública nos Estados Unidos, no século XX, por ser um método de grande abrangência, beneficiar todos os grupos socioeconômicos e ter uma excelente relação custo-benefício (CDC, 1995; CDC, 2001).

Historicamente, os primeiros relatos a respeito de fluoretos e água fluoretada ocorreram em 1901, quando John Mcauley Eager relatou manchas ou descolorações marrons observadas em emigrantes italianos de Nápoles, denominado “dentes de Chiaie”, ou “esmalte mosqueado”, como ficou conhecido posteriormente. Mas foi somente em 1916 que McKay e Black, ao analisarem e descreverem alterações histológicas observadas em pessoas residentes no

estado do Colorado, EUA, fizeram a associação da descoloração com a estrutura interna do dente em formação. McKay analisou as condições climáticas e os hábitos alimentares desta população e, intrigado com as razões dessa alteração dentária, percebeu que a água ingerida pelos indivíduos era a única diferença entre eles; alguns eram abastecidos por água proveniente de poços rasos, enquanto que outros grupos serviam-se de água retirada de poços profundos – estes apresentavam dentes manchados. Surgiu então a hipótese de que algum elemento químico existente na água seria responsável pela diferença (McKay & Black, 1916; McKay, 1928). Após a descoberta dos altos teores de F em fontes naturais de algumas cidades do estado (2,0 a 12,0 $\mu\text{g F/mL}$) e de outra comunidade americana rural (Oakley, Idaho) as pesquisas sobre o denominado “esmalte mosqueado” foram intensificadas nos Estados Unidos e a associação da fluorose dentária com a concentração de F na água de abastecimento foi estabelecida.

Dentre os estudos realizados, em 1942, Dean realizou um estudo conhecido como “Estudo das 21 cidades”, que procurou descobrir concentrações de F na água capazes de uma ação preventiva e eficaz na redução da cárie dentária, ao mesmo tempo em que buscou responder qual concentração de F na água provocava fluorose. Utilizando cálculos matemáticos para interpolar o efeito anticárie versus fluorose nas cidades com distintas concentrações de F, foi determinado que o melhor balanço entre benefício e risco seria obtido com concentrações em torno de 1 $\mu\text{g F/mL}$. A partir daí, seguiram-se vários estudos com adição de fluoreto à água, ou seja, fluoretação artificial, surgindo o desafio de ajustar o nível de fluoreto de forma a produzir a máxima proteção contra a cárie sem o prejuízo da fluorose.

Considerando, portanto, o efeito do F na prevenção de cárie, em 1945, o F foi adicionado pela primeira vez à água de abastecimento, na cidade de Grand Rapids, Michigan. Depois de mais de 10 anos, o número de dentes com experiência de cárie diminuiu de 12,5 em 1944 para 6,2 em 1959, com uma redução em torno de 50%. Esse resultado foi repetido em numerosos estudos por

todos os Estados Unidos e em outras partes do mundo, o que proveu uma evidência inquestionável da eficácia da fluoretação das águas (Arnold et al., 1962).

No Brasil, o município de Baixo Guandu, no Espírito Santo, foi o primeiro a adicionar F artificialmente na água, em 1953, com teor ajustado para 0,8 µg F /mL. Mantido como estudo piloto, foi pioneiro em comprovar, no Brasil, os benefícios obtidos em outros países na redução da cárie dentária. O índice de dentes permanentes cariados, perdidos e obturados (CPOD), aos 12 anos de idade, em 1967, após 7 anos de iniciada a fluoretação das águas, apresentou uma redução de 46% (Freire & Freire, 1962) e após 14 anos, 69,1% (Barros et al., 1993).

A Lei Federal nº 6.050, de 24 de maio de 1974, dispõe sobre a fluoretação da água em sistemas públicos de abastecimento, sendo devidamente regulamentada pelo Decreto Federal nº 76.872, de 22 de dezembro de 1975 (Brasil, 1974), que dispõe sobre a obrigatoriedade da fluoretação, estabelecendo que “os projetos destinados à construção ou ampliação de sistemas públicos de abastecimento de água, onde haja estação de tratamento, devem incluir previsões e planos relativos à fluoretação de água”. Por sua vez, a Portaria nº 635 do Ministério da Saúde, de 26 de dezembro de 1975 (Brasil, 1975), aprova e determina normas e padrões a serem seguidos, desde a concentração do íon flúor a ser utilizado, de acordo com as médias das temperaturas máximas anuais de cada região, até os compostos recomendados, para a correta execução da fluoretação das águas de abastecimento. No Estado de São Paulo, a Resolução SS-250/95, de 15/08/95 (São Paulo, 1995), estabelece que a água dos municípios deve conter 0,7 µg F/mL e define como aceitável uma concentração entre 0,6 e 0,8 µg F/mL. Utilizando-se uma fórmula de conversão que considera a temperatura média anual (Galagan & Vermillion, 1957), a concentração ótima de 0,7 µg F/mL (0,6-0,8 µg F/mL) também é estabelecida como ideal para a maioria das regiões do Brasil, e outros países de clima tropical/subtropical, considerando a maior ingestão de líquidos devido às maiores temperaturas (Lima & Cury, 2003).

Posteriormente por meio da Portaria 56/1977, foram aprovados normas e critérios de padrão de potabilidade da água. Do ponto de vista da presença de fluoreto em águas de consumo humano, agregado ou de ocorrência natural, 1,7 µg F/mL foi fixado como Valor Máximo Permissível. Esse valor foi alterado em 2000, com a publicação da Portaria 1.469, que definiu 1,5 µg F/mL como Valor Máximo Permitido (VMP). De acordo com a resolução, teor de F acima desse valor máximo caracteriza água fora do “Padrão de Potabilidade”, portanto, inaceitável para o consumo humano do ponto de vista de prevenção da cárie e o risco da fluorose dentária. Ainda com relação à legislação da água de abastecimento, é pertinente a Portaria do Ministério da Saúde nº 518, de 25 de março de 2004 (Brasil, 2004a), uma vez que define os procedimentos e as responsabilidades relativas ao controle e à vigilância da qualidade da água para o consumo humano e seu padrão de potabilidade. Esta portaria encontra-se em revisão, com a finalidade de, entre outros aspectos, aperfeiçoar os procedimentos de operacionalização e controle dos teores de F em âmbito nacional. Em 2004, o Ministério da Saúde lançou as Diretrizes da Política Nacional de Saúde Bucal, documento apresentado para a organização da atenção à saúde bucal no âmbito do Sistema Único de Saúde. A ampliação da cobertura da fluoretação das águas no Brasil foi tratada como prioridade governamental (Brasil, 2004b).

Recentemente, em 2011, considerando que a concentração de fluoreto é um parâmetro relevante para avaliação da qualidade nas águas de consumo e que o estabelecimento de níveis de segurança para fluoreto é uma medida imprescindível de proteção à saúde, uma revisão de literatura analisou a potabilidade da água para consumo humano quanto ao teor de fluoreto, considerando balanço entre benefícios e riscos de seu uso. Foram incluídas revisões sistemáticas sobre os benefícios e riscos da água fluoretada para a dentição e para a saúde óssea, publicadas entre os anos de 2000 e 2009 e, a partir dessa busca, 77 trabalhos foram encontrados, dos quais cinco abordavam as questões de interesse. Para determinar os teores ótimos de fluoreto no Distrito Federal e nas capitais brasileiras, dados de latitude, longitude, altitude e

temperatura (de 2008) foram obtidos do Instituto Nacional de Meteorologia. Além disso, foram consultados sítios eletrônicos de agências governamentais e documentos oficiais pertinentes ao tema, sendo que os resultados da análise focalizaram três tópicos: benefícios do fluoreto na água, seus riscos e padrões adotados em diferentes países. Diante dos conhecimentos revisados, observou-se que a maioria dos países adota 1,5 µg F/mL como valor máximo permissível (VMP) para flúor de ocorrência natural, sendo que, em 1984, a OMS definiu 1,5 µg F/mL como limite para água potável e segura. As temperaturas nas capitais brasileiras indicam que o fluoreto deveria variar de 0,6 a 0,8 µg F/mL para prevenir cárie dentária. Ainda, concentração de fluoreto natural de 1,5 µg F/mL é aceitável para consumo no Brasil se não houver tecnologia de custo-benefício aceitável para ajuste/remoção do seu excesso. A ingestão diária de água com fluoreto em concentração > 0,9 µg F/mL representa risco à dentição em menores de oito anos de idade e os consumidores deveriam ser expressamente informados desse risco. Portanto, tendo em vista a expansão do programa nacional de fluoretação da água de abastecimento público para locais de clima tipicamente tropical e considerando o maior conhecimento sobre as condições climáticas das diferentes regiões brasileiras, há uma necessidade da revisão da Portaria 635, aprovada em 1975, considerando a obrigatoriedade de prestação de informação à população nos quais as empresas de saneamento e demais interessados deveriam assegurar concentrações de fluoreto de ocorrência natural próximas dos teores ótimos (Frazão et al., 2011).

Atualmente, o Brasil dispõe do segundo maior sistema de fluoretação de águas de abastecimento público de todo o mundo (Brasil, 2009). Dados do levantamento de saúde bucal realizado no Brasil revelam que, em 2003, 115 dos 250 municípios brasileiros avaliados contavam com fluoretação nos sistemas de tratamento público de água, representando 46% da amostra. As regiões Sudeste e Sul eram as que estavam em melhor situação quanto à cobertura, com 66% e 88% respectivamente. Destaque para os municípios com mais de 50 mil habitantes que apresentaram coberturas maiores do que 70%. As regiões Norte e

Nordeste apresentaram 6% e 16% dos municípios com acesso à medida, respectivamente (Brasil, 2004b).

Vale ressaltar que é importante que haja sempre um equilíbrio entre os benefícios da utilização de da água fluoretada na prevenção da cárie dentária e o risco de desenvolvimento de fluorose (Do & Spencer, 2007). A partir dessa premissa, em uma revisão sistemática acerca da fluoretação da água, McDonagh *et al.*(2000), após análise de 214 estudos, observaram que a fluoretação da água de abastecimento estava associada com um aumento na proporção de crianças livres de cárie e uma redução no número de dentes afetados por cárie. Como único efeito colateral da exposição à água fluoretada, os autores encontraram um aumento dose-dependente na fluorose dental, sendo que com um nível de 1 ppm F, estimou-se que 12,5% das pessoas expostas teriam fluorose considerada preocupante do nível estético. Os autores reforçaram a ideia de que qualquer decisão acerca da fluoretação das águas não deve ser considerada apenas em relação a risco (fluorose dental) /benefício (redução da cárie dental), mas também considerando aspectos éticos, ambientais, ecológicos, financeiros e legais.

Todavia, existem inúmeras dificuldades para estimar uma relação dose-resposta em relação à fluorose dental válida, considerando que o tempo entre o período de exposição a fluoretos e seu efeito. De acordo com Fejerskov *et al.* (1996) a ingestão de água fluoretada equivalente a 0,02 mg F/kg peso corporal estaria associado a uma prevalência de fluorose em torno de 40-50%, reduzindo para 15-25% quando a classificação “questionável”, pelo Índice de Dean, é excluída. Nesse sentido, Richards *et al.*, (1989) em um estudo realizado com 7000 crianças de 18 áreas contendo diferentes concentrações de F na água, verificaram que a dose diária de F estava correlacionada positivamente com a prevalência de fluorose. Concomitantemente, Butler *et al.*(1985) verificaram em 2500 crianças de 16 comunidades do Texas, que outras fontes de F, além da água fluoretada, estavam associadas com a prevalência de fluorose. Esses estudos, portanto, sugeriram uma relação linear entre ingestão de F e fluorose resultante.

Em um estudo realizado em cidades com fluoretação da água de abastecimento e cidades sem fluoretação no ano de 1987, anteriormente ao uso disseminado de dentifrícios fluoretados no Brasil, Maltz & Farias (1998) avaliaram a prevalência de fluorose dental por meio do Índice Thylstrup & Fejerskov em 4 cidades localizadas em duas regiões com condições climáticas distintas. Dentre os resultados, os autores detectaram que a prevalência e a severidade de fluorose foram baixas nas cidades com água fluoretada, sugerindo que somente o consumo de água fluoretada não causava alta prevalência de fluorose, mesmo em cidades com clima tropical semiárido. No entanto, vale ressaltar que se observou uma grande variação na concentração de F presente nas cidades que possuíam água de abastecimento fluoretada ($0,45 \pm 0,26$ a $0,96 \pm 0,11$ ppm F, durante o período de 1979 a 1987) visto que não havia controle operacional da concentração de F na região.

Os estudos epidemiológicos desenvolvidos no mundo na década de 90 descrevem diferenças na prevalência da fluorose, que variam desde a quase ausência da doença nas populações – 2,2%, até proporções maiores que 90% (Downer, 1994). Observa-se, entretanto, que mesmo com altas prevalências, a proporção de indivíduos que apresentam as formas moderada e severa ainda é pequena, só aumentando significativamente nos locais onde a fluorose é endêmica e deve-se à alta concentração do F nas fontes naturais de água (Cangussu *et al.*, 2002).

Dados do levantamento das condições de saúde bucal do estado de São Paulo, realizado em 2002, apontaram que a prevalência de fluorose, aos 12 anos de idade, nos municípios com flúor na água de abastecimento, foi de 13,77%, enquanto que, nos municípios sem água fluoretada, essa porcentagem reduziu para 0,66%. Na faixa etária de 15 a 19 anos, 6,26% dos indivíduos que viviam em municípios com água fluoretada apresentaram fluorose, enquanto que naqueles sem flúor na água de abastecimento, a prevalência reduziu para 0,40% (Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, 2002).

De acordo com os dados do levantamento epidemiológico SB Brasil, em 2003, a prevalência de fluorose entre os examinados pode ser considerada baixa: 7,31% aos 12 anos e 19,15% entre os 15 e 19 anos, sendo que destes, somente 1,37% e 0,64% respectivamente apresentam fluorose severa. A presença de fluorose dentária (condições muito leve, leve, moderada e severa) foi identificada tanto em municípios com F na água de abastecimento quanto em municípios sem F na água, com uma maior prevalência nos municípios com F, entretanto, a maior parte dos casos foram classificados entre as condições muito leve e leve, que possuem pequena repercussão na estética e nenhuma na função dos dentes envolvidos. Comparativamente, ao relacionar-se os resultados encontrados para a prevalência de cárie dental e fluorose do presente levantamento, os dados epidemiológicos apontaram que CPO-D nas crianças de 12 anos e adolescentes dos municípios que têm água fluoretada foi de 2,27 e 5,69, respectivamente. Já nos municípios que não têm F na água, o CPO-D médio das crianças de 12 anos foi de 3,38 (49% maior) e dos adolescentes de 6,56 (15% maior) (Brasil, 2004b), reforçando a importância dos meios coletivos de uso de F para o controle da cárie.

A respeito do último levantamento realizado em 2010 no Brasil, 16,7% apresentavam fluorose aos 12 anos de idade, sendo que 15,1% foram representados pelos níveis de severidade muito leve (10,8%) e leve (4,3%). Fluorose moderada foi identificada em 1,5% das crianças. O percentual de examinados com fluorose grave pode ser considerado nulo. A maior prevalência de crianças com fluorose foi observado na região Sudeste (19,1%) e o menor valor, na região Norte (10,4%). Considerando-se dados para cárie dental, houve uma redução de 26% do índice CPO-D, aos 12 anos de idade, em relação ao último levantamento realizado (Brasil, 2011).

Clark *et al.* (2006) avaliaram as mudanças no perfil da prevalência da fluorose dental e na percepção estética depois de cessado o abastecimento de água fluoretada, no ano de 1992, na província de British Columbia, no Canadá. Nos anos de 1993-1994 foram examinadas crianças cujo desenvolvimento dos dentes permanentes ocorreu durante a época de abastecimento com água

fluoretada. Para quantificar a fluorose dental, foi utilizado o Índice de Thylstrup-Fejerskov (TF) e a percepção estética foi avaliada por meio de questionários respondidos pelos responsáveis. Em 1996-1997, os voluntários possuíam dentes permanentes expostos tanto à água fluoretada como a não fluoretada, e em 2002-2003, todos os participantes estavam expostos exclusivamente à água não fluoretada. O estudo mostrou que a prevalência de fluorose reduziu de 58% para 24% após dez anos de paralisação da fluoretação da água de abastecimento público. A distribuição do índice TF sugeriu que a severidade da fluorose também sofreu uma diminuição, com índices TF menores do que 3 após o período de paralisação da fluoretação das águas de abastecimento.

Catani *et al.* (2007) avaliaram a relação entre os níveis de fluoreto na água de abastecimento público e a prevalência de fluorose dentária em 386 escolares de sete anos de idade, moradores de dois municípios do estado de São Paulo, que realizaram heterocontrole da fluoretação de suas águas, resultando em concentrações homogêneas (0,6 – 0,8 ppm F) ou oscilantes (0,3 – 1,2 ppm F) durante os anos de realização do controle. A prevalência de fluorose no município com teores oscilantes de F na água foi de 31,4%, e no município com teores homogêneos de 79,9%. É importante destacar que, embora o percentual de crianças com fluorose no município com teores homogêneos de fluoreto na água tenha sido superior ao do município com concentrações oscilantes, não foram encontrados percentuais elevados de fluorose nos graus moderado e severo. Predominou o grau leve, que seria o esperado em locais com teores adequados de F na água de abastecimento. Os autores sugeriram a possibilidade de associação entre a regularidade da manutenção da concentração ótima de F na água com o aumento da prevalência de fluorose dentária, em consonância com revisão da literatura (Bardsen, 1999) que demonstrou que a exposição prolongada a F tem implicações na fluorose resultante.

Outro aspecto a ser levantado é que em regiões de água fluoretada, os alimentos cozidos com a mesma apresentam uma concentração de F mais elevada quando comparados aos preparados com água não fluoretada. Casarin *et*

al. (2007) analisaram a concentração de F no arroz, feijão e em alimentos industrializados infantis do comércio brasileiro a fim de estimar suas contribuições para o desenvolvimento de fluorose dental. Dentre os resultados, a quantidade de F ingerido numa refeição de arroz e feijão cozidos com água otimamente fluoretada foi considerada segura, pois corresponde a 29% do limite da dose de risco de fluorose dental. Os autores sugeriram que, considerando a concentração de F nos alimentos, a quantidade ingerida e a dose considerada como limiar para uma fluorose clinicamente aceitável (Burt, 1992), a maioria dos alimentos estudados não constituem motivo de preocupação quanto à toxicidade crônica do fluoreto, inclusive os alimentos típicos da dieta brasileira.

Em suma, considerando as evidências científicas disponíveis, pode-se concluir, portanto que, em vista do indiscutível benefício da utilização de fluoretos, e diante da baixa prevalência e severidade constatada, a fluorose não representa um risco à saúde dos indivíduos. Ainda é importante ressaltar que apesar de atualmente o impacto da água fluoretada em termos de benefício anticárie ser menor que no passado, pela utilização e disponibilização de outros produtos fluoretados, a mesma ainda apresenta grande importância para o controle da cárie dental, principalmente considerando as dimensões e diferenças sociais do país onde os que mais precisam não apenas poderiam obter o benefício, mas neles, o impacto preventivo tem mais força.

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a biodisponibilidade de fluoreto no plasma sanguíneo e saliva após a ingestão de água ou de uma refeição preparada com água fluoretada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos Éticos

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP (processo nº. 041/2012) (Anexo). Atendendo às considerações éticas, foi apresentado aos voluntários o termo de consentimento livre e esclarecido, para, após informação sobre o experimento, consentirem ou não em participar da pesquisa (de acordo com a Resolução nº 466 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, DF, 12/12/2012).

4.2 Delineamento Experimental

O estudo in vivo, do tipo cruzado, duplo cego, no qual 20 voluntários, em bom estado de saúde geral e bucal foram incluídos. Todos os voluntários eram residentes em Piracicaba, SP, cidade que apresenta regularidade na fluoretação da água de abastecimento público. Indivíduos apresentando qualquer alteração gástrica e/ou renal, que pudessem afetar os processos fisiológicos normais de absorção e excreção, foram excluídos da pesquisa. Durante 4 fases experimentais os voluntários ingeriram aleatoriamente: água não fluoretada ($< 0,01 \mu\text{g F/mL}$), água fluoretada ($1 \mu\text{g F/mL}$), refeição preparada com água não fluoretada ou refeição preparada com água fluoretada. A refeição foi composta por arroz, feijão, carne, vagem, cenoura, suco e gelatina, e o tempo para ingestão foi padronizado em 15 minutos. A dose de fluoreto ingerida foi baseada no peso corporal para atingir $0,8 \mu\text{g F/kg}$ peso corporal, quando da ingestão de água ou da refeição preparada com água não fluoretada (dose correspondente ao F residual presente nos alimentos), e $12 \mu\text{g F /Kg}$ de peso corporal, quando da ingestão de água ou refeição preparada com água fluoretada. Em todas as fases experimentais, imediatamente antes (tempo zero) e após 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos da ingestão, amostras de saliva não estimulada e amostras de sangue obtidas por

punção digital foram coletadas para determinar a concentração de fluoreto. Previamente ao início do estudo experimental, um estudo preliminar foi realizado com o objetivo de avaliar a concentração de fluoreto na saliva encontrada durante a mastigação de alimentos preparados com água fluoretada. Adicionalmente, um segundo estudo preliminar foi realizado para a validação da coleta de sangue e determinação da concentração de fluoreto no plasma sanguíneo. A concentração de fluoreto no plasma sanguíneo em todas as amostras foi determinada utilizando eletrodo íon específico adaptado para microanálise. A análise de F na saliva foi realizada pela técnica de microdifusão facilitada de F com hexametildisiloxano (Taves, 1968 adaptado por Martínez-Mier et al., 2011). A biodisponibilidade de fluoreto foi estimada a partir da área sob a curva (ASC) das concentrações plasmática e salivar de F em função do tempo. Os grupos foram comparados utilizando análise de variância, seguida de teste de Tukey, com nível de significância estabelecido em 5%.

4.3 Estudo Preliminar 1: Disponibilidade de fluoreto na saliva após mastigação de alimentos preparados com água fluoretada

Em um estudo in vivo, cruzado e duplo cego, composto por 8 fases experimentais, 6 voluntários adultos jovens mastigaram (durante 30 s) os seguintes alimentos típicos de uma refeição brasileira, preparados de forma padronizada com água fluoretada (0,6-0,8 µg F/mL) ou não-fluoretada (controle): mistura contendo arroz+feijão (3 g de cada), carne moída (6 g), legumes (vagem + cenoura; 3 g de cada) e gelatina (6 g). A quantidade de 6 g de alimento corresponde à quantidade de alimento encontrada em média em um garfo utilizado para alimentação. A análise da concentração de F encontrada na água e nos alimentos utilizados em todas as fases experimentais foi realizada com eletrodo íon-seletivo após microdifusão das amostras (Taves et al. 1968 adaptado por Martinez-Mier et al., 2011).

Durante todo o período experimental e pelo menos 3 dias antes do início do experimento, voluntários utilizaram dentifrício não-fluoretado. Ao início de cada fase, após pelo menos 2 horas de jejum, saliva não estimulada foi coletada, durante 3 minutos, antes da mastigação do alimento como medida basal. Em seguida, o alimento correspondente à determinada fase foi mastigado durante 30s e após esse período o bolo alimentar produzido foi expectorado e coletado em recipiente plástico pré-pesado e identificado. A fração líquida do bolo alimentar (FLBA) foi obtida por meio de centrifugação e a concentração de F presente na FLBA foi determinada (Figura 1).

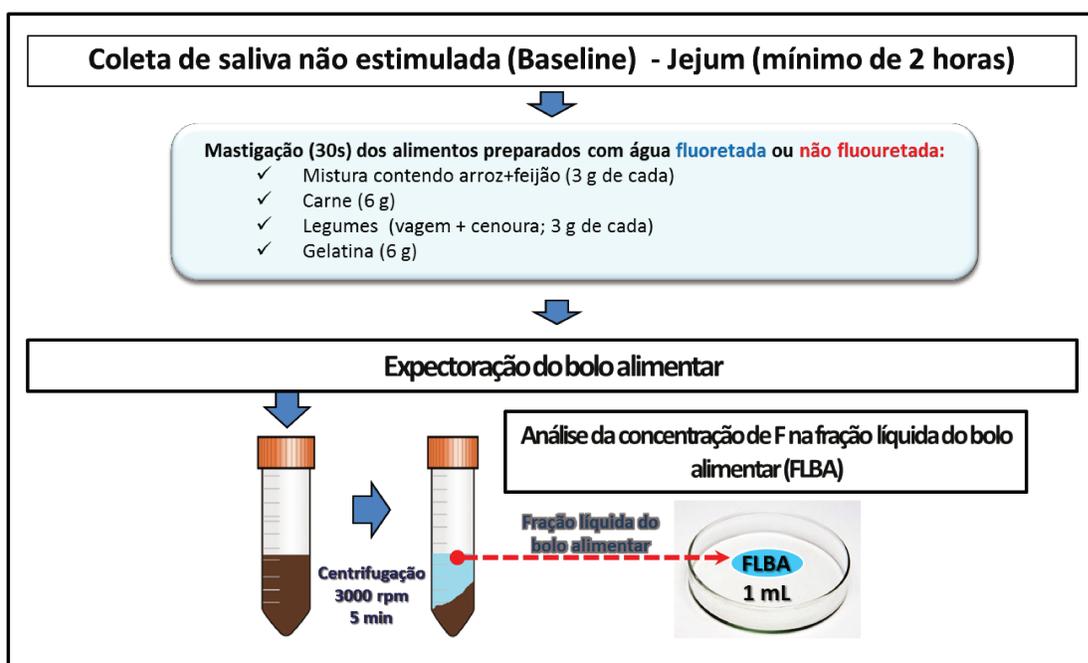


Figura 1. Esquema ilustrativo do delineamento experimental do estudo preliminar

4.4 Estudo Preliminar 2: Validação de microtécnica de coleta de sangue e determinação da concentração de fluoreto no plasma sanguíneo

A fim de validar a análise da concentração de F no plasma sanguíneo utilizando micro amostras obtidas por punção digital, um estudo preliminar foi realizado testando o efeito dose-resposta dessa medida. Neste estudo in vivo,

duplo cego e cruzado, composto por 4 fases experimentais, 3 voluntários adultos, ingeriram uma refeição brasileira (arroz, feijão, carne, vagem, cenoura, suco e gelatina), sendo expostos a doses crescentes de F de 0,8; 12; 60 e 120 $\mu\text{g F/Kg}$ peso corporal. Ressalta-se a segurança das doses ingeridas, mais de 40 vezes menores do que a dose provavelmente tóxica relacionada à intoxicação aguda por F (5 mg F/kg peso).

Todos os alimentos foram preparados de forma padronizada com água não fluoretada e as respectivas doses de F a serem ingeridas a cada fase foram obtidas pelo acréscimo de solução de NaF de acordo com o peso corporal de cada voluntário ao suco, que foi ingerido ao longo do período estipulado para a ingestão da refeição.

Ao início de cada fase, após jejum durante o período da noite, os voluntários ingeriram, durante um período de 15 minutos, a refeição oferecida. Antes da ingestão e após 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos, amostras de saliva não estimulada e sangue foram coletadas.

A coleta de sangue foi realizada com auxílio de dispositivo de punção digital para diagnóstico de glicemia. O volume de sangue obtido via punção foi coletado por meio de capilar de vidro previamente heparinizado, que foi, em seguida, imediatamente imerso em óleo mineral para evitar a evaporação da amostra (Figura 2). O plasma sanguíneo então foi obtido por meio de centrifugação, para análise da concentração de F, utilizando eletrodo íon-específico adaptado para microanálise (Tenuta et al., 2006).

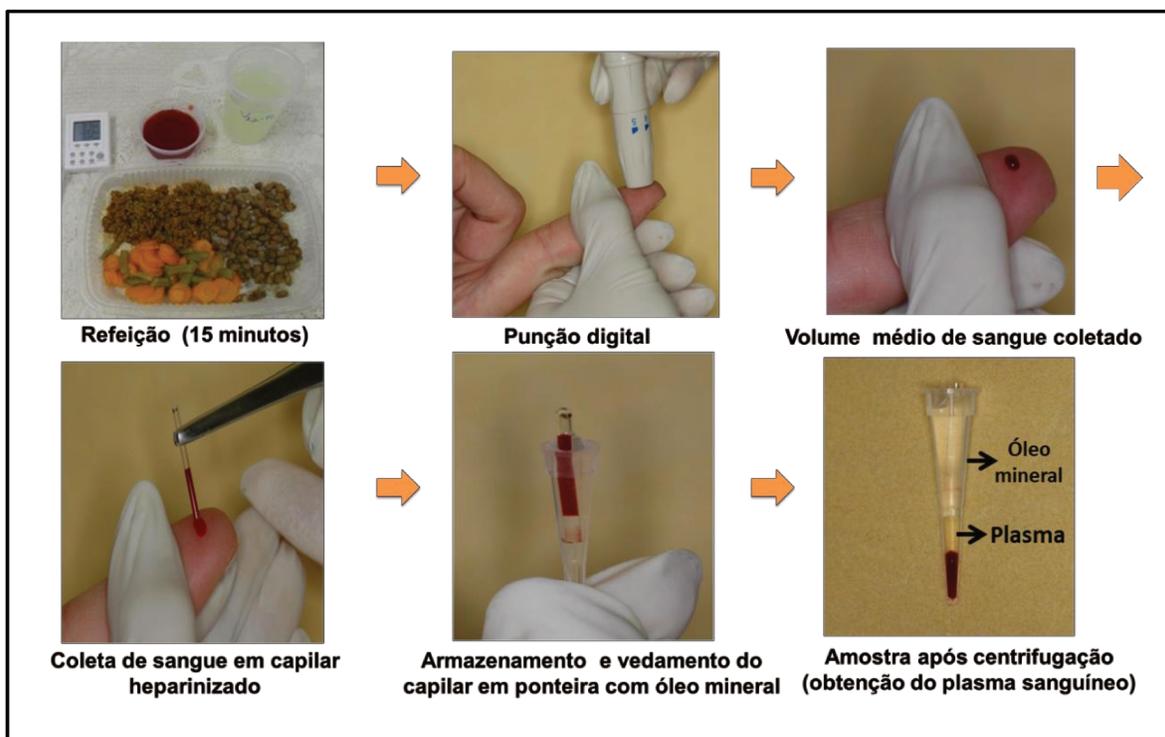


Figura 2. Esquema ilustrativo da metodologia de coleta de micro amostras de sangue para obtenção de plasma sanguíneo.

4.5 Estudo Experimental

Inicialmente, durante todo o período pré-experimental e no período de wash-out entre as fases, os voluntários utilizaram dentifrício não fluoretado fornecido pelos pesquisadores. Quanto à dieta, não houve padronização da mesma, entretanto os voluntários foram instruídos a evitar produtos e alimentos ricos em flúoreto, como chás e frutos do mar. Todos os indivíduos, por serem residentes em uma cidade que possui água otimamente fluoretada ingeriram a mesma e alimentos cozidos com água fluoretada durante o período do estudo.

Em cada fase experimental, após jejum durante o período da noite, os voluntários ingeriram refeição padronizada ou água representando a dose de ingestão correspondente de F, de $0,8 \mu\text{g F/kg}$ peso corporal, quando da ingestão água ou da refeição preparada com água não fluoretada (dose correspondente ao F residual presente nos alimentos), e $12 \mu\text{g F /Kg}$ de peso corporal, quando da ingestão de água ou refeição preparada com água fluoretada. Imediatamente

antes e após 5, 10, 15, 30, 45, 60, 120 e 180 minutos, amostras de sangue (Figura 2) e saliva não estimulada foram coletadas. Um intervalo de pelo menos uma semana foi aguardado entre cada fase experimental (Cury et al., 2005; Falcão et al., 2013).

4.6 Padronização do preparo dos alimentos

Em todos os estudos realizados, os alimentos consumidos foram preparados de forma padronizada como descrito a seguir (Figura 3), permitindo a reprodutibilidade e reduzindo a variabilidade entre as fases experimentais.

<p><u>Feijão</u></p> <ul style="list-style-type: none">- 500 g de feijão- 1,5 L água- 15 mL azeite de oliva- 3 colheres de sobremesa de alho- 3 colheres de sobremesa de sal	<p><u>Arroz</u></p> <ul style="list-style-type: none">- 400 g de arroz- 800 mL água- 10 mL azeite de oliva- 2 colheres de sobremesa de alho- 2 colheres de sobremesa de sal	<p><u>Carne</u></p> <ul style="list-style-type: none">- 500 g de coxão duro- 250 mL água- 10 mL azeite- 3 colheres de sopa de molho de tomate- 2 colheres de sobremesa de alho e sal
<p><u>Legumes</u></p> <ul style="list-style-type: none">- 3-4 cenouras- 200 g de vagem- 1 L água- 2 colheres de sobremesa de sal	<p><u>Gelatina</u></p> <ul style="list-style-type: none">- 1 pacote de gelatina sabor morango- 500 mL água	<p><u>Suco</u></p> <ul style="list-style-type: none">- 1 sachê de suco sabor limão- 1 L de água

Figura 3. Descrição das quantidades de água e alimentos utilizados para o preparo das refeições a serem ingeridas pelos voluntários

4.7 Determinação da concentração de fluoreto nos alimentos

Para análise da concentração de F, os alimentos foram triturados para obtenção de uma mistura homogênea e em seguida, as amostras (1 g de cada alimento) foram analisadas em triplicata, sendo a concentração de fluoreto determinada após microdifusão facilitada com HMDS (Taves, 1968 adaptado por Martínez-Mier et al., 2011) (Figuras 4 e 5). Posteriormente, para a dosagem da concentração de F nos alimentos, utilizou-se um eletrodo íon-específico (Orion modelo 96-09, Orion Research, Cambridge, MA, USA) acoplado a um analisador de íons (Orion EA-740). Duas regressões lineares foram calculadas utilizando uma série de padrões de concentração diferente de F, dos quais quantidades crescentes de F foram adicionadas ao teste (0,003125 a 0,03125 e 0,0625 a 2,0 μg F, respectivamente), para estimar a concentração de F em amostras de maior ou menor concentração. A acurácia das análises foi avaliada utilizando padrões internos (0,1 e 1,0 μg F) e um coeficiente de variação de 5% foi considerado como aceitável.

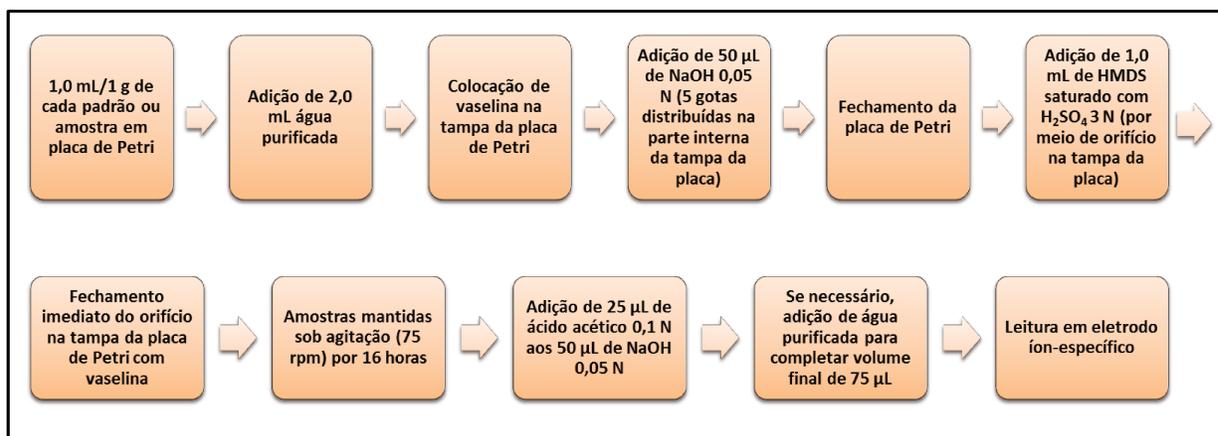


Figura 4. Fluxograma da metodologia de microdifusão facilitada com hexametildisiloxano (HMDS).

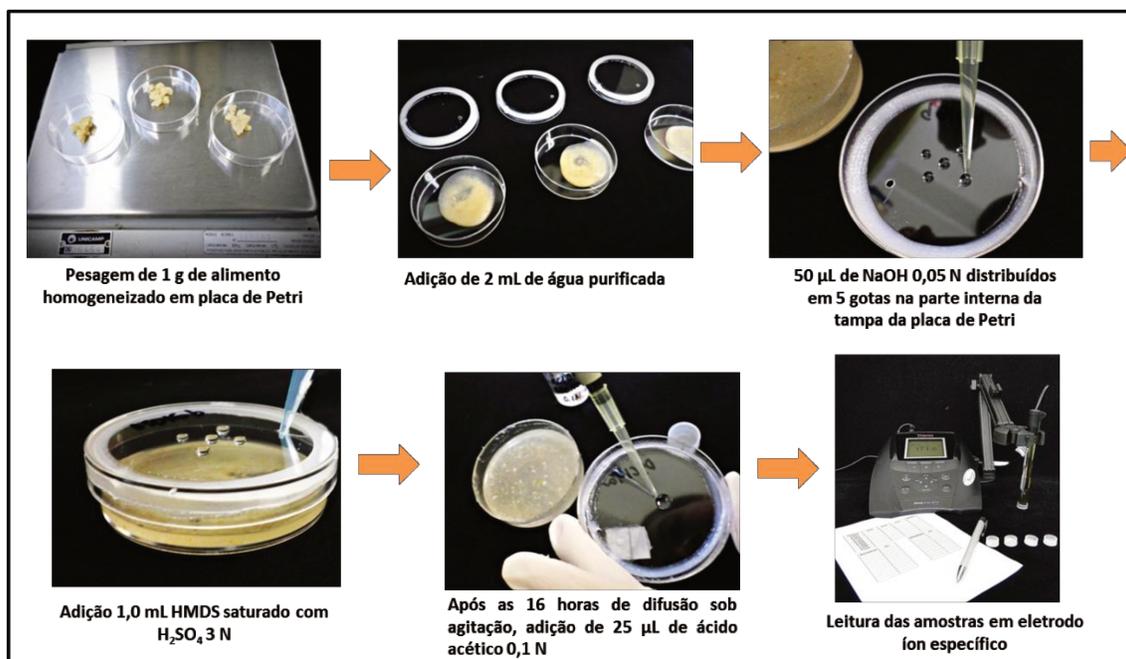


Figura 5. Esquema ilustrativo da metodologia de microdifusão facilitada com hexametildisiloxano (HMDS).

4.8 Coleta e determinação da concentração de fluoreto na saliva

Em todos os tempos avaliados, saliva não estimulada foi coletada em recipientes plásticos previamente pesados e identificados, durante 3 minutos. Em seguida, as amostras de saliva foram mantidas congeladas para posterior análise da concentração de F. Previamente a análise, as amostras coletadas foram centrifugadas a 16.000 *g* durante 3 minutos e o sobrenadante foi analisado quanto à concentração de fluoreto após microdifusão facilitada com hexametildisiloxano (HMDS) (Taves, 1968 modificado por Martínez-Mier et al., 2011).

4.9 Coleta e determinação da concentração de fluoreto no plasma

Da amostra de sangue obtida por punção digital (aproximadamente 1 a 10 µL), foi obtido por meio de centrifugação, o plasma, sanguíneo, que foi coletado

com auxílio de micropipetas de vidro sob microscópio, para a realização da análise de determinação da concentração de F .

As amostras de plasma foram aplicadas na superfície de um eletrodo específico para o íon fluoreto (Orion 94-09), adaptado para microanálise (Vogel et al., 1997) (Figura 6). O tamponamento com TISAB III foi realizado sob microscópio e as dosagens realizadas conforme descrito anteriormente (Tenuta et al., 2006).



Figura 6. Eletrodo íon específico invertido adaptado para microanálise da concentração de F em amostras.

4.10 Análise Estatística

Para o estudo preliminar 1, teste t pareado foi empregado para comparação inicial (baseline) e final da concentração de F na saliva após a mastigação dos alimentos analisados. Tanto para o experimento preliminar 2 e o estudo experimental, a área sob a curva da concentração de F no plasma ($\mu\text{M F}$) e saliva ($\mu\text{g F/L}$) em função do tempo (min) (ASC) foi calculada pelo programa Origin 9.0 (OriginLab[®], Northampton, Mass., USA). No experimento preliminar 2, a fim de se avaliar o efeito dose resposta da concentração de F no plasma a F, foi realizada análise de regressão linear entre a área sob a curva (ASC) da

concentração plasmática e salivar de F e a dose ingerida. Considerando o estudo experimental, os dados de ASC plasmática e salivar foram avaliados por meio de análise de variância, incluindo os voluntários como fonte de variação (blocos estatísticos), seguido de teste de Tukey. As pressuposições de equidade de variâncias e distribuição normal dos erros foram checadas considerando-se as variáveis respostas e os dados que não satisfizeram as pressuposições foram transformados.

Todas as análises foram executadas com auxílio do software BioEstat 5.3 (BioEstat[®], Belém, Pará, BR), com nível de significância estabelecido em 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo Preliminar 1: Disponibilidade de fluoreto na saliva após mastigação de alimentos preparados com água fluoretada

A Tabela 1 sumariza os resultados em termos de média e desvio padrão da concentração de fluoreto dos alimentos preparados com água não fluoretada ($<0,01 \mu\text{g F/mL}$) e fluoretada ($0,65 \pm 0,025 \mu\text{g F/mL}$). A partir dos dados, percebe-se que os alimentos preparados com água fluoretada apresentaram uma maior concentração de fluoreto, demonstrando a incorporação de F pelo preparo/cozimento.

Tabela 1. Concentração de fluoreto ($\mu\text{g F/g}$) dos alimentos preparados com água não-fluoretada ($<0,01 \mu\text{g F/mL}$) ou fluoretada ($0,65 \pm 0,025 \mu\text{g F/mL}$) ($n=3$; média \pm DP).

Alimentos	Não-Fluoretado	Fluoretado
Arroz	$0,02 \pm 0,001$	$0,72 \pm 0,05$
Feijão	$0,17 \pm 0,06$	$0,99 \pm 0,06$
Carne	$0,08 \pm 0,04$	$0,31 \pm 0,21$
Legumes	$0,02 \pm 0,003$	$0,54 \pm 0,02$
Gelatina	$0,02 \pm 0,002$	$0,63 \pm 0,004$

A Figura 7 apresenta os dados de concentração de fluoreto na saliva ($\mu\text{g F/mL}$) dos voluntários ($n=6$) antes (baseline) e após 30 segundos da mastigação dos alimentos. Para os alimentos preparados com água não fluoretada, houve um discreto, porém significativo aumento da concentração de F quando da mastigação de arroz+feijão, carne e gelatina ($p<0,01$). Por outro lado, quando se considera a mastigação dos alimentos com água fluoretada, pode-se visualizar um aumento considerável da concentração salivar de F, em relação ao

preparo com água não fluoretada, independente do tipo de alimento avaliado ($p < 0,01$).

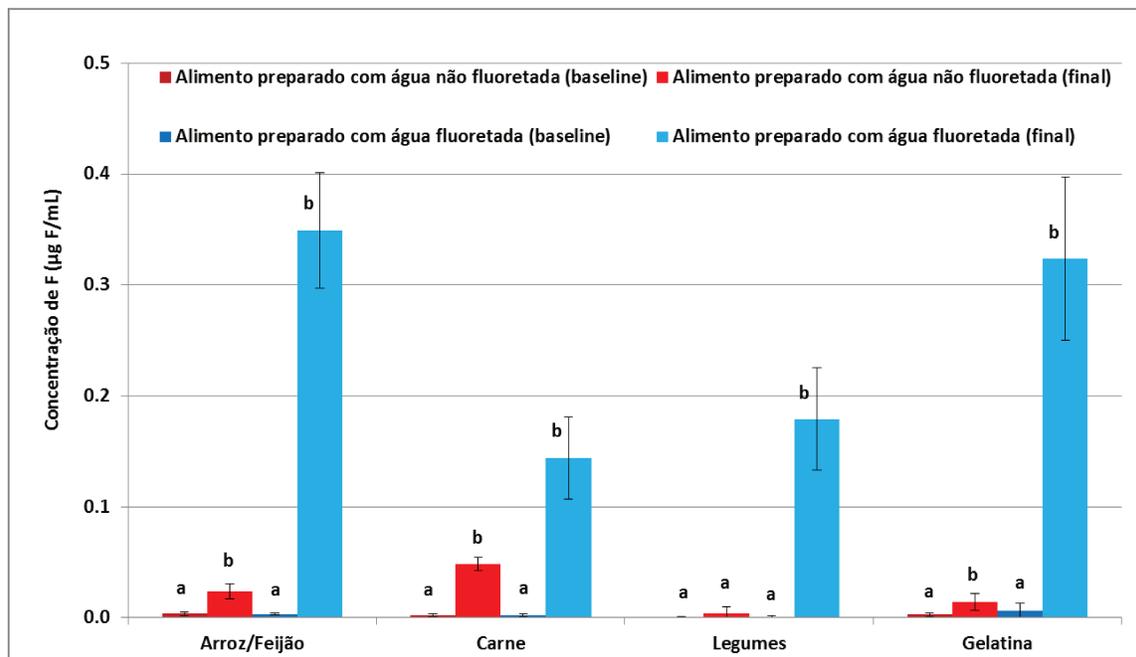


Figura 7. Média (\pm DP) da concentração de fluoreto na saliva (baseline) e FLBA (final) ($\mu\text{g F/mL}$) dos voluntários ($n=6$) antes (baseline) e após a mastigação de alimentos preparados com água não-fluoretada ($<0,01 \mu\text{g F/mL}$) e fluoretada ($0,65 \pm 0,025 \mu\text{g F/mL}$). Para a análise estatística, os dados de ASC foram transformados (transformação \log_{10}). Letras minúsculas distintas indicam diferença entre as condições baseline e final, de cada condição avaliada (preparo com água não fluoretada e água fluoretada).

5.2 Estudo Preliminar 2: Validação de microtécnica de coleta de sangue e determinação da concentração de fluoreto no plasma sanguíneo

A respeito da concentração de fluoreto ($\mu\text{g F/g}$) dos alimentos preparados para o presente estudo, a Tabela 2 indica que não houve aparentemente diferenças na concentração dos alimentos após preparo com água purificada (não fluoretada), todos apresentaram reduzidas concentrações basais de F.

Tabela 2. Concentração de fluoreto ($\mu\text{g F/g}$) dos alimentos preparados com água não-fluoretada ($0,01 \pm 0,0004 \mu\text{g F/mL}$) ($n=3$; média \pm DP).

Alimentos	Água não-Fluoretada
Arroz	$0,01 \pm 0,001$
Feijão	$0,05 \pm 0,002$
Carne	$0,06 \pm 0,05$
Legumes	$0,01 \pm 0,003$
Gelatina	$0,01 \pm 0,003$
Suco	$0,04 \pm 0,004$

Dados da curva de cinética de incremento da concentração de F no plasma (diferença entre todos os tempos avaliados da concentração baseline) demonstraram um maior aumento da concentração de F quanto maior a dose de F ingerida. Posteriormente, houve uma progressiva diminuição na concentração de F. Entretanto, mesmo após 180 min, a concentração de F ainda foi maior do que a concentração inicial quando das doses de ingestão de maior concentração de F avaliadas (60 e 120 $\mu\text{g F/kg}$ peso corporal).

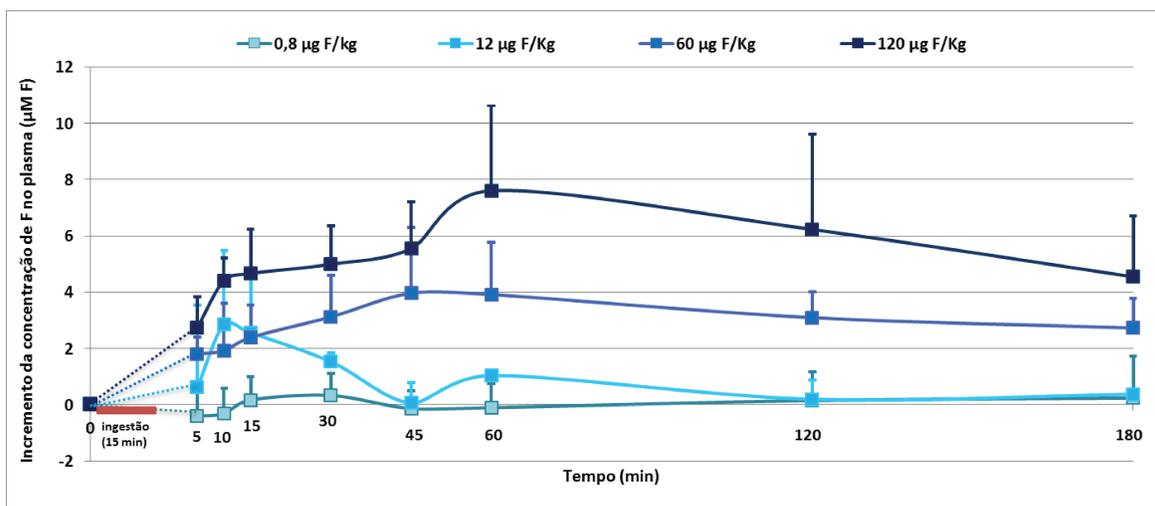


Figura 8. Incremento da concentração de fluoreto no plasma sanguíneo ($\mu\text{M F}$) em função do tempo (min), de acordo com as doses de ingestão de fluoreto avaliadas ($n=3$; média \pm DP).

A análise de regressão linear, mostrada na figura 9, demonstra um ajuste linear significativo ($p=0.0008$) entre a área sob a curva (ASC) da concentração plasmática de F ($\mu\text{M F} \times \text{min}$) e as crescentes doses de F ingeridas, mostrando efeito dose-resposta a F.

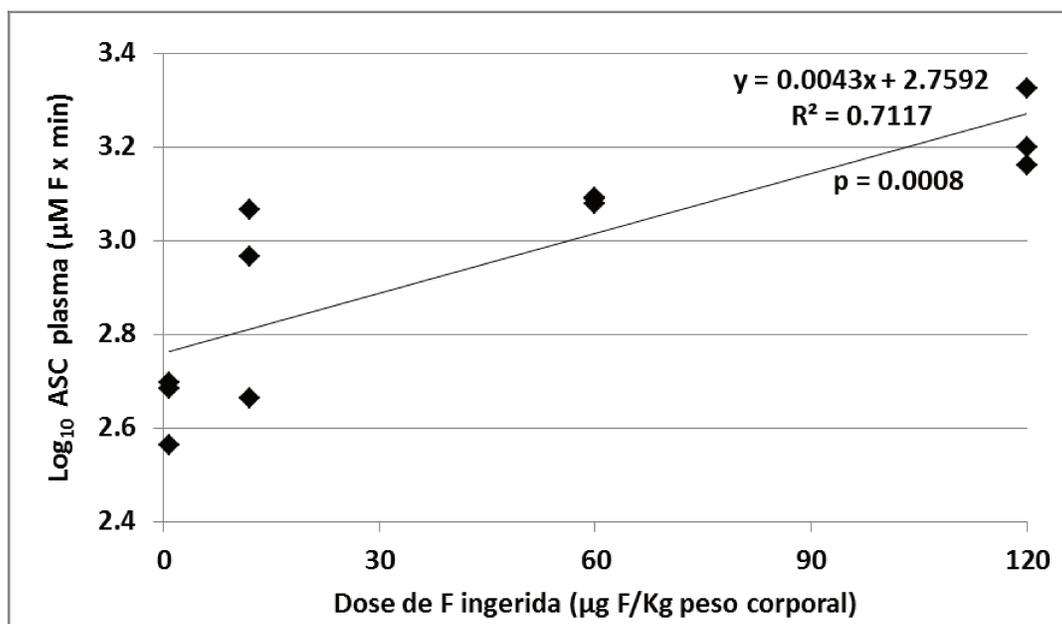


Figura 9. Análise de regressão linear entre a área sob a curva (ASC) da concentração plasmática de F ($\mu\text{M F} \times \text{min}$) e a dose ingerida ($\mu\text{g F/kg}$ peso corporal). Para a análise estatística, os dados de ASC foram transformados (transformação log_{10}).

Para os dados de saliva, a curva de cinética do incremento da concentração salivar de F em função do tempo, apresentada na Figura 10, ilustra uma maior concentração de F 5 min após a ingestão da refeição, quando se considera o crescente aumento na dose de ingestão de F. Esse rápido aumento é seguido de uma rápida redução na concentração de F na saliva. Após 60 min, esses valores encontram-se próximos dos valores basais.

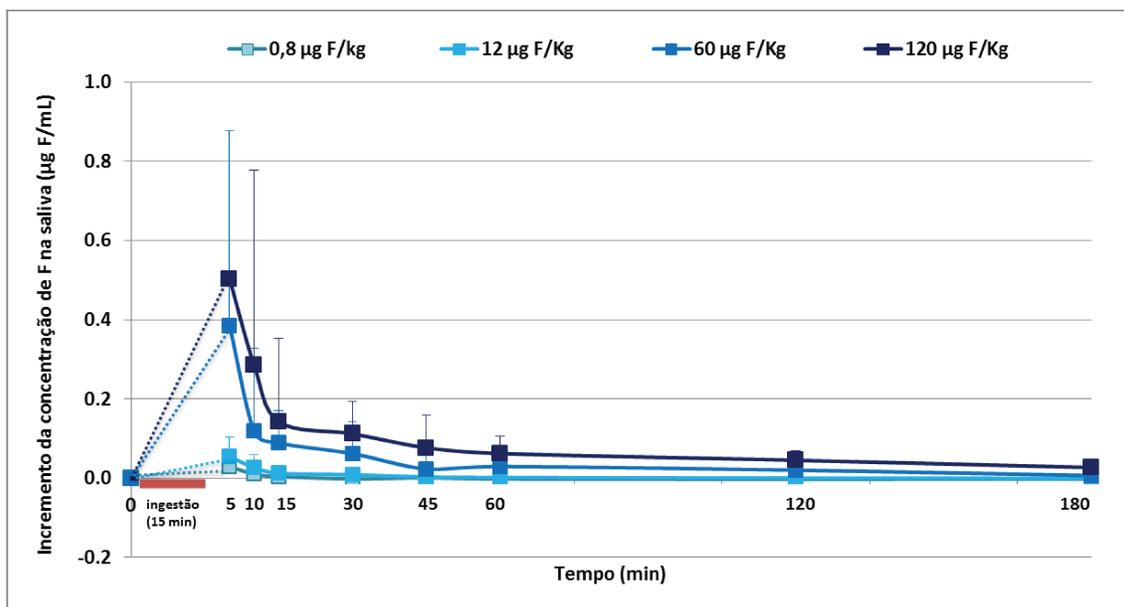


Figura 10. Incremento da concentração de fluoreto na saliva ($\mu\text{g F/mL}$) em função do tempo (min), de acordo com as doses de ingestão de fluoreto avaliadas ($n=3$; média \pm DP).

Da mesma forma que na análise do plasma sanguíneo, a área sob a curva da concentração de F na saliva está positiva e significativamente relacionada com o aumento na dose de ingestão de F pelos voluntários ($p = 0.0001$), como visto a seguir na análise de regressão linear apresentada na Figura 11.

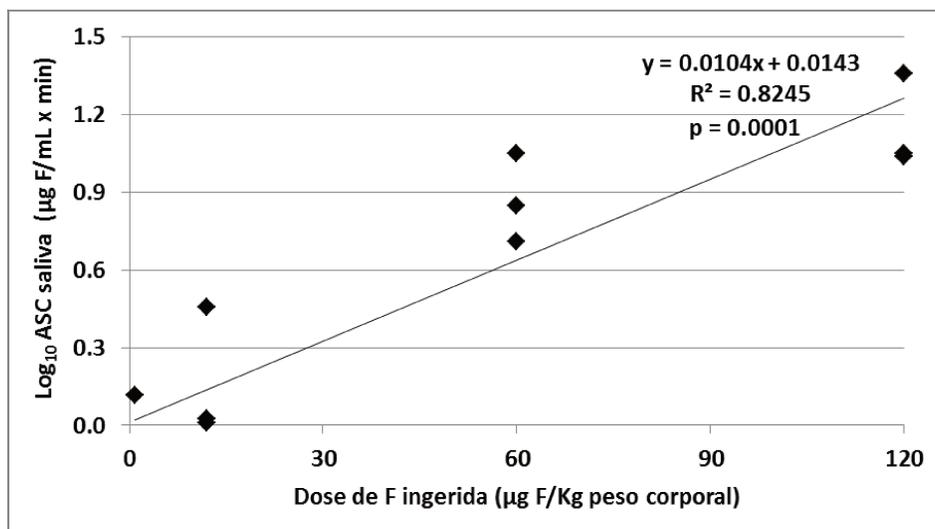


Figura 11. Análise de regressão linear entre a área sob a curva (ASC) da concentração salivar de F ($\mu\text{g F/mL} \times \text{min}$) e a dose de F ingerida ($\mu\text{g F/kg}$ peso corporal). Para a análise estatística, os dados de ASC foram transformados (transformação \log_{10}).

5.3 Estudo Experimental

De acordo com os resultados das análises da concentração de F nos alimentos, descritos na Tabela 3, verificou-se que o preparo dos alimentos com água fluoretada ($0,95 \pm 0,04 \mu\text{g F/mL}$; preparada em laboratório, simulando a concentração de $1 \mu\text{g F/mL}$) levou ao aumento da concentração de F em todos os alimentos preparados quando comparado ao preparo realizado no controle com água não fluoretada ($0,02 \pm 0,01 \mu\text{g F/mL}$).

Tabela 3. Concentração de fluoreto ($\mu\text{g F/g}$) dos alimentos preparados com água não-fluoretada ($<0,01 \mu\text{g F/mL}$) ou fluoretada ($0,95 \pm 0,04 \mu\text{g F/mL}$) ($n=3$; média \pm DP).

Alimentos	Água não-Fluoretada	Água fluoretada
Arroz	$0,02 \pm 0,02$	$0,81 \pm 0,10$
Feijão	$0,06 \pm 0,04$	$0,93 \pm 0,10$
Carne	$0,06 \pm 0,03$	$0,27 \pm 0,03$
Legumes	$0,02 \pm 0,01$	$0,66 \pm 0,05$
Gelatina	$0,02 \pm 0,004$	$0,98 \pm 0,02$
Suco	$0,04 \pm 0,01$	$1,04 \pm 0,01$

Em relação ao incremento da concentração de F no plasma sanguíneo, as curvas de cinética de concentração de F apontam que tanto quando da ingestão de água ou de alimento fluoretado há uma maior concentração de F em função do tempo quando comparados com seus respectivos controles, como pode ser visualizado na Figura 12. Adicionalmente, pode se observar que não há um pico de concentração de F no plasma definido quando da ingestão, seja na forma de água ou de alimento, de água fluoretada com concentração ótima de F.

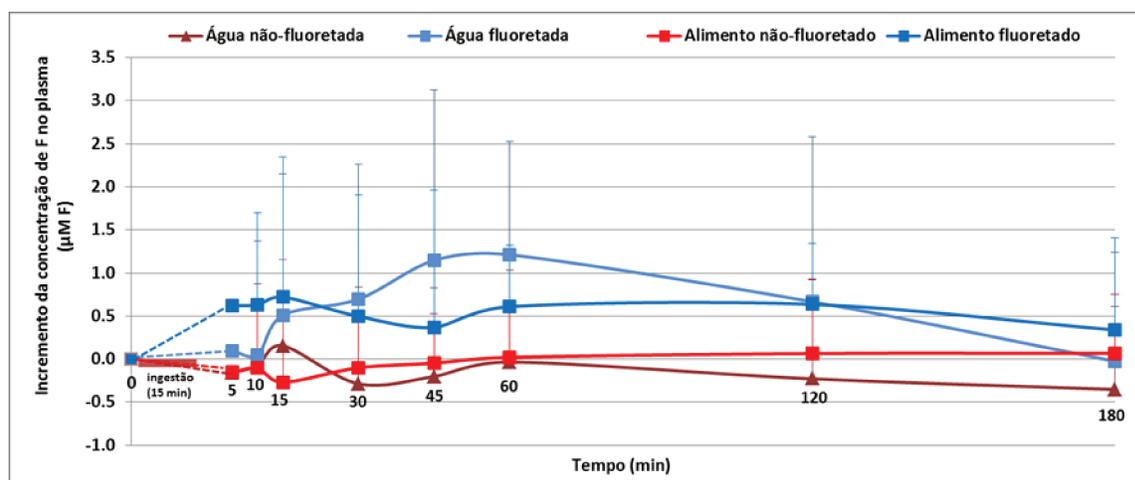


Figura 12. Incremento da concentração de fluoreto no plasma sanguíneo ($\mu\text{M F}$) em função do tempo (min), de acordo com as diferentes condições avaliadas ($n=20$; média \pm DP).

Considerando a variável de área sob a curva da concentração de F no plasma, os resultados, apresentados na Figura 13, apontaram que a adição de F resulta em um aumento significativo na biodisponibilidade de F ($p < 0,01$). Entretanto, não há diferenças significativas na biodisponibilidade de F quando a água F é ingerida na forma líquida (água) ou sólida (refeição; alimentos preparados com água F) ($p > 0,05$).

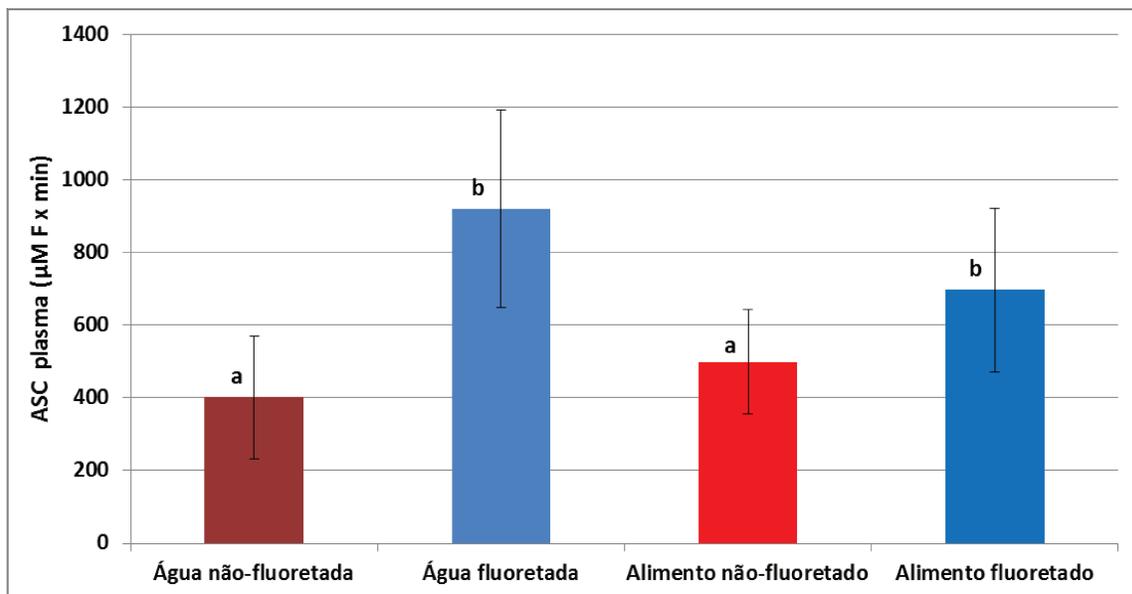


Figura 13. Média e desvios padrão ($n=20$) da área sob a curva (ASC) da concentração plasmática de F ($\mu\text{g F/mL} \times \text{min}$) considerando as diferentes condições avaliadas. Para a análise estatística, os dados de ASC foram transformados (transformação \log_{10}). Letras indicam diferença entre as condições avaliadas.

Para os dados de concentração de F na saliva, da mesma forma que no estudo dose-resposta, a adição de F à água levou a um pico na concentração salivar de F por volta de 5 minutos da ingestão tanto de alimento quanto de água fluoretada. Em acréscimo, o perfil verificado nos grupos controles ilustra não haver variação na concentração de F na saliva em função do tempo, mantendo-se aproximadamente próximos aos valores basais.

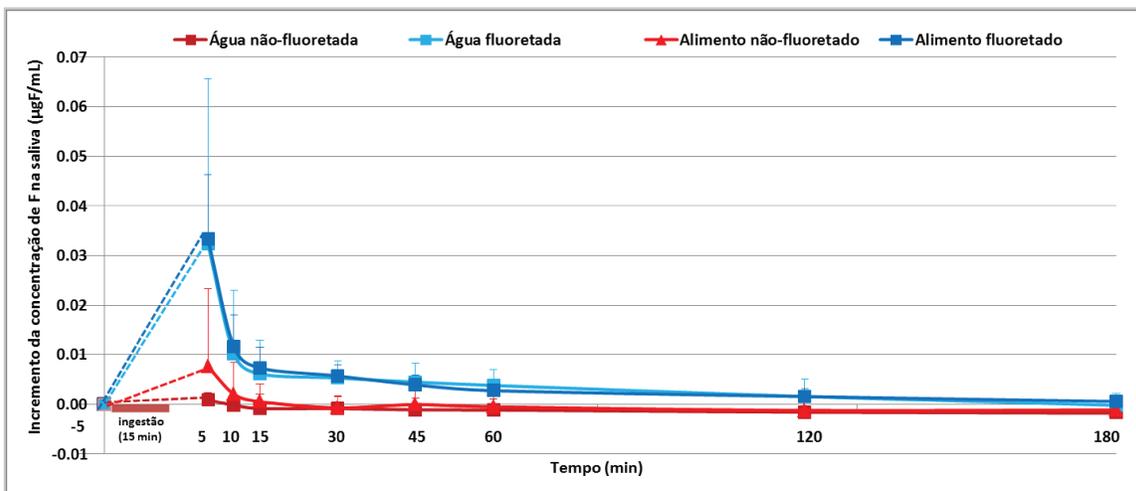


Figura 14. Incremento da concentração de fluoreto na saliva ($\mu\text{g F/mL}$) em função do tempo (min), de acordo com as diferentes condições avaliadas ($n=20$; média \pm DP).

Adicionalmente, a análise da variável ASC da concentração de F na saliva sugere que há um aumento significativo na ASC dos grupos utilizando água fluoretada ($1,4\pm 0,6$ e $1,1\pm 0,6 \mu\text{g F/mL} \times \text{mim}$, água e alimento fluoretado, respectivamente) quando comparados com aqueles preparados com água não fluoretada ($0,5\pm 0,2$ e $0,5\pm 0,3 \mu\text{g F/mL} \times \text{mim}$, água e alimento não fluoretado, respectivamente) ($p<0,01$).

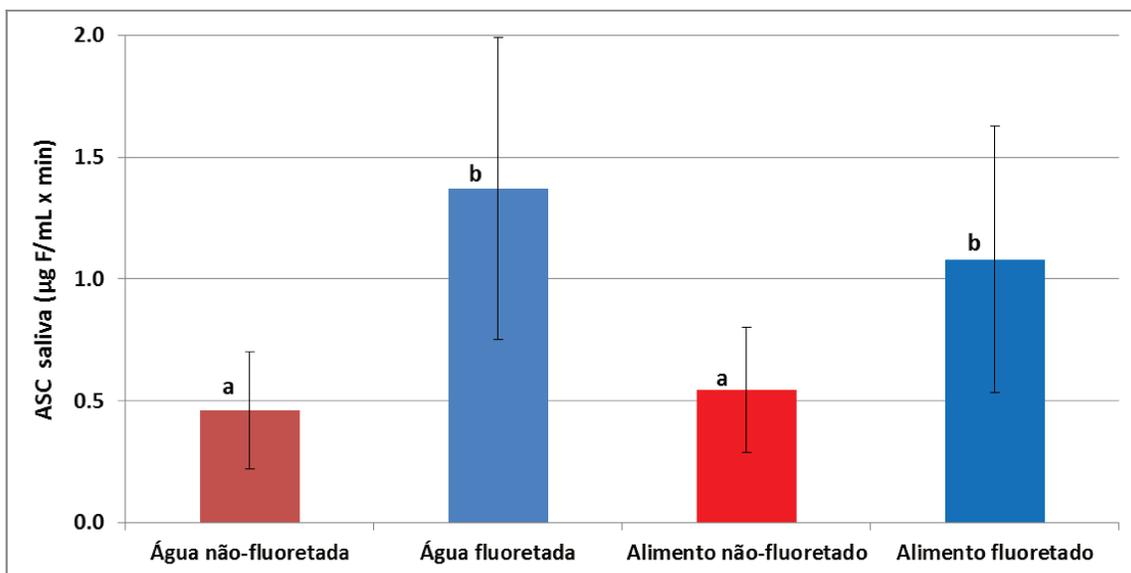


Figura 15. Média e desvios padrão (n=20) da área sob a curva (ASC) da concentração salivar de F ($\mu\text{g F} \times \text{min}$) considerando as diferentes condições avaliadas. Para a análise estatística, os dados de ASC foram transformados (transformação \log_{10}). Letras indicam diferença entre as condições avaliadas.

6 DISCUSSÃO

Em termos de controle da cárie dental é indispensável que o fluoreto esteja presente constantemente na cavidade bucal para exercer seu efeito nos processos de redução da desmineralização e ativação da remineralização. Sob esse aspecto, o efeito preventivo da água fluoretada pode ser atribuído a um aumento na concentração de F na saliva e, conseqüentemente no biofilme dental (Nobre dos Santos et al., 1998). Após a ingestão da água contendo F, este será absorvido no trato gastrointestinal e distribuído pelo sangue aos tecidos e uma pequena parte desse F será excretada através da saliva (Ekstrand & Oliveby, 1999; Featherstone, 1999; Elwood et al., 2008). Dessa forma, após a ingestão de água F, espera-se que a biodisponibilidade de F no plasma seja maior (Ekstrand et al., 1978) assim como na saliva. A compreensão em mais detalhes dessa cinética de biodisponibilidade plasmática e salivar de F foi o objeto de estudo deste trabalho.

Está estabelecido na literatura, que o preparo/cozimento de alimentos com água fluoretada leva ao aumento da concentração de F nesses alimentos até valores próximos à concentração de F presente na água em que foram cozidos (Jackson et al., 2002; Casarin et al., 2007; Zohoori et al., 2012). Em concordância, todos os alimentos preparados nos estudos desenvolvidos no presente trabalho de fato corroboraram com os achados prévios, visto que apresentaram concentrações de F próximas as da concentração de F presente na água utilizada para o preparo. Excetua-se, porém, a concentração de F encontrada após o preparo e cozimento da carne moída, que foi abaixo do esperado. Tal fato poderia ser explicado pelo modo preparo do alimento, onde o proporcionamento de água:carne foi de ½ porção de água para 1 do alimento.

A respeito da biodisponibilidade de F na saliva logo após a mastigação de alimentos preparados com água fluoretada, os resultados obtidos no estudo preliminar 1 apontaram que há uma significativa elevação da concentração de F na saliva durante 30s da mastigação dos alimentos. Considerando que foi utilizada

água fluoretada advinda diretamente do abastecimento público ($0,65 \pm 0,025 \mu\text{g F/mL}$) e que a concentração de F dos alimentos encontrada foi próxima à da água, logo após 30 s, verificou-se que a concentração de F encontrada na saliva representava em torno de 50% da concentração de F no alimento, que poderia ser explicado pela diluição que a concentração de F no alimento sofre pela ação da saliva (Dawes, 2004). Entretanto, esse aumento imediato promovido apenas durante a mastigação é mais do que suficiente para que o F possa exercer seu efeito anticárie, uma vez que concentrações de F na saliva de 0,02 ppm F são relevantes em termos de prevenção da cárie, ou seja, suficientes para manter a saliva supersaturante em relação à fluorapatita (Featherstone, 1999).

Para que a cinética da biodisponibilidade de F no plasma fosse estudada foi desenvolvida uma metodologia de coleta e análise que permitisse a realização de várias coletas por um período de tempo de modo viável, atraumático, com o objetivo de minimizar os desconfortos e possivelmente, aumentar a aderência dos participantes ao estudo. Para tal, a coleta de sangue foi realizada com auxílio de dispositivo de punção digital para diagnóstico de glicemia, onde aproximadamente de 1 a 10 μL de sangue foram obtidos e coletados em capilares de vidro previamente heparinizados. Já foi descrito na literatura a utilização de punção digital para a obtenção de plasma sanguíneo e estudo da biodisponibilidade (Ekstrand et al., 1978). Todavia, um volume maior de sangue foi coletado (0,8 a 1,5 mL) por Ekstrand et al., 1978, uma vez que era necessário um maior volume de plasma para que a análise da concentração de F fosse realizada. No presente estudo preliminar, as amostras de sangue obtidas foram centrifugadas e o plasma sanguíneo resultante foi coletado sob microscópio para determinação da concentração de F por meio da microanálise (Tenuta et al., 2006), representando inovação tecnológica.

Os resultados do estudo preliminar 2 indicaram que houve um aumento no incremento da concentração de fluoreto no plasma em função do aumento da dose de ingestão de fluoreto, que foi comprovado estatisticamente por meio de análise de regressão linear, o que demonstra a adequação da metodologia para

estudar a concentração de F no plasma sanguíneo após a ingestão de uma refeição preparada com água F, já que efeito dose-resposta a F foi observado. Adicionalmente, amostras de saliva total não estimulada foram coletadas considerando que no estudo da farmacocinética do F, a biodisponibilidade de F na saliva assemelha-se a do plasma (Oliveby et al., 1989) e tem sido utilizada para avaliar, por exemplo, a biodisponibilidade de F após a ingestão de alimentos preparados com sal fluoretado (Hedman et al., 2006) e dentifrícios fluoretados (Cury et al., 2005; Falcão et al., 2013). De fato, houve uma maior biodisponibilidade de F na saliva após a ingestão de doses crescentes de F, que foram confirmadas igualmente, após ajuste da análise de regressão da ASC da concentração salivar de F em função das doses crescentes de F ingeridas.

Em seguida, foi realizado o estudo experimental para estudar a cinética de biodisponibilidade F no plasma e na saliva após a ingestão de água fluoretada ou alimentos preparados com a mesma, utilizando como controle, água não fluoretada. Ao analisar os perfis das curvas de cinética de concentração plasmática de F após a ingestão tanto de água quanto de alimento fluoretado, verificou-se um progressivo aumento da concentração de F onde uma maior concentração plasmática de F é visualizada por volta de 60 min após a ingestão de água fluoretada, enquanto que para os grupos em que houve ingestão da refeição contendo F o maior aumento da concentração de F no plasma parece ocorrer entre 10 a 15 min após a ingestão. Entretanto, considerando a variabilidade experimental, não é possível determinar picos de concentração ou efeito significativo. Ekstrand et al. (1978), ao analisarem a concentração de F no plasma ao longo do dia de um grupo de indivíduos vivendo em uma área contendo 1,2 ppm F na água, da mesma forma que no presente estudo, verificaram um aumento gradual na absorção de F, apresentando maiores concentrações nos períodos entre as refeições.

Adicionalmente, em relação à análise da concentração de F na saliva em função do tempo, a adição de F à água levou ao aumento da concentração salivar de F, já observado no primeiro momento de coleta, 5 minutos após o

término da ingestão, tanto de alimento quanto da água fluoretada. Com base nos resultados do estudo preliminar 1, é esperado que esse aumento seja resultado do fluoreto residual que permanece na boca após a ingestão do alimento ou água fluoretada. Além disso, este aumento poderia ser atribuído ao fato de que parte do F ingerido e absorvido está retornando à saliva, visto que os voluntários realizaram a ingestão durante um período de 15 min, ou seja, este pico de concentração aos 5 min após a ingestão corresponderia a 20 minutos após o início da ingestão. Portanto, o aumento pode ser representativo da absorção de F e reciclagem pela saliva, considerando que absorção plasmática de F é relativamente rápida, uma vez que por volta de 30 a 45 minutos após a ingestão, cerca de 90% do F encontra-se presente no sangue (Whitford, 1996).

Quando da avaliação da ASC da concentração plasmática e salivar de F dos indivíduos, os resultados foram similares ao indicarem que há significativamente uma maior biodisponibilidade de F quando da utilização de água fluoretada (seja na forma líquida ou pelo preparo do alimento) em comparação com água não fluoretada. Estudos comparando grupos populacionais de regiões de diferentes exposições à água fluoretada também confirmaram os achados do presente estudo seja pela análise da biodisponibilidade pela saliva (Bruun & Thylstrup, 1984) seja pelo plasma sanguíneo (Ekstrand et al., 1978). Vale ressaltar que não foi encontrada diferença entre a biodisponibilidade de uma mesma dose de F ingerida na forma líquida (água) ou sólida (refeição). Alguns estudos apontam que a presença de cátions di- e trivalentes, presente em alguns alimentos poderiam reduzir a absorção de F (Ekstrand & Ehnrebo, 1979) ou que ainda o conteúdo gástrico poderia levar a uma redução no grau de absorção de F (Whitford, 1996). Todavia, uma hipótese que poderia ser levantada seria a de que as variações intra- e interindividuais na absorção de F na saliva e plasma após a ingestão de água ou do alimento não permitiram que fosse caracterizada essa diferença na absorção quanto ao tipo da dieta (se líquida ou sólida), sendo mais importante na biodisponibilidade de F, o efeito da dose total de F quando da utilização de água com concentração de 1 µg F/mL.

Dessa forma, dada a importante contribuição que a dieta pode ter no efeito preventivo da água fluoretada, parece ser adequada a indicação de não apenas a frequente ingestão de água fluoretada como também a utilização da mesma no preparo e cozimento de alimentos, visto dos seus benefícios na prevenção da cárie dental.

7 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que tanto a ingestão de água fluoretada como de alimentos preparados com a mesma são similarmente capazes de aumentar a biodisponibilidade de F no plasma e na saliva.

REFERÊNCIAS*

Arnold FA, Likins RC, Russell AL, Scott DB. Fifteenth year of the Grand Rapids fluoridation study. In: Fluoride drinking waters. Bethesda, MA: National Institute of Dental Research. 1962; 253-256.

Barros ERC, Tovo MF, Scapini C. Resultados da fluoretação da água. RGO. 1993;41(5):303-8.

Bardsen A. "Risk periods" associated with the development of dental fluorosis in maxillary permanent central incisors: a meta-analysis. Acta Odontol Scan. 1999; 57(5): 247-56.

Brasil. Lei Federal nº 6.050 de 24 de maio de 1974. Dispõe sobre a fluoretação da água em sistemas de abastecimento quando existir estação de tratamento [internet]. 1974. Disponível em:

http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/legislacao/lei6050_24_05_74.pdf

Brasil. Decreto no 76.872 de 22 de dezembro de 1975. Regulamenta a Lei n. 6.050, de 24 de maio de 1974, que dispõe sobre a fluoretação da água em sistemas públicos de abastecimento [internet]. 1975. Disponível em:

http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/legislacao/decreto76842_22_12_75.pdf

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à saúde. Diretrizes da Política Nacional de Saúde Bucal [documento na internet]. Brasília, DF; 2004. Disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_nacional_brasil_sorridente.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Portaria no 518 , de 25 de março de 2004. Estabelece os procedimentos e responsabilidades relativos ao controle e vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade, e dá outras providências [portaria na internet]. Diário Oficial da União.26 mar 2004; seção I:266. 2004a. Disponível em:

http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/portaria_518_2004.pdf

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Projeto SB Brasil 2003: condições de saúde bucal da população brasileira 2002-2003: resultados principais [documento na internet]. Brasília (DF): 2004b. Disponível em:

<http://dtr2004.saude.gov.br/dab/cnsb/publicacoes.php>

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à saúde. Guia de Recomendações para o uso de Fluoretos no Brasil. Brasília, DF; 2009

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Projeto SBBrasil 2010: Pesquisa Nacional de Saúde Bucal – Resultados Principais.

Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 92p.

Bruun C, Thylstrup A. Fluoride in whole saliva and dental caries experience in areas with high or low concentrations of fluoride in the drinking water. Caries Res 1984;18:450-456.

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

Butler WJ. Prevalence of Dental Mottling in School-aged Lifetime Residents of 16 Texas Communities. Am J of Public Health. 1985; 75:1408-12.

Cangussu MCT, Narvai PC, Fernandez RC, Dehejizian V. A fluorose dentária no Brasil: uma revisão crítica. Rev Saúde Pub. 2002; 18(1):7-15.

Casarin RCV, Fernandes DRM, Lima-Arsati YBO, Cury JA. Fluoride concentrations in typical Brazilian foods and in infant foods. Rev Saúde Pública 2007;41(4):549-56

Catani DB, Hugo FH, Cypriano S, Sousa MLR, Cury JA. Relationship between fluoride levels in the public water supply and dental fluorosis. Rev Saúde Pública. 2007; 41 (5): 732-39.

CDC- Center for Disease Control and Prevention. Engineering and administrative recommendations for water fluoridation, 1995. Morbidity and Mortality Weekly Reports. 1995; 44(RR-13):1-40

CDC- Centers for Disease Control and Prevention. Recommendations for using fluoride to prevent and control dental caries in the United States. Morbidity and Mortality Weekly Reports. Recomm Rep 2001; 50(RR-14):1-42.

Clark DC, Shulman JD, Mapoumé G, Levy SM. Changes in dental fluorosis following the cessation in water fluoridation. Community Oral Dent Epidemiol. 2006; 34: 197-204.

Cury JA, Tenuta LM, Ribeiro CC, Paes Leme AF. The importance of fluoride dentifrices to the current dental caries prevalence in Brazil. *Braz Dent J* 2004;15:167-74.

Cury JA, Del Fiol FS, Tenuta LMA, Rosalen PL. Low-fluoride and gastrointestinal fluoride absorption after meals. *J Dent Res*. 2005; 84(12); 1133-1137.

Cury JA, Tenuta LM. How to maintain a cariostatic fluoride concentration in the oral environment. *Adv Dent Res* 2008 Jul;1:20(1):13-6

Dawes C. Salivary clearance and its effects on oral health. In: Edgar M, Dawes C, O'Mullane D. *Saliva and oral health*. 3. ed. Londres, BDJ Books, 2004. Cap. 5, p.71-85.

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

Do LG, Spencer AJ. Risk-benefit balance in the use of fluoride among young children. *Journal of Dental Research* 2007; 86(8): 723-8.

Downer MC. Dental caries experience and defects of dental enamel among 12-year-old children in north London, Edinburgh, Glasgow and Dublin. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1994; 22:283-285.

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

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

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

Ekstrand J, Ehrnebo M. Influence of milk products on fluoride bioavailability in man. *Eur J Clin Pharmacol.* 1979; 16: 211-5.

Ekstrand J, Ehrnebo M. Absorption of fluoride from fluoride dentifrices. *Caries Res.* 1980; 14(2): 96-102.

Ekstrand J, Lange A, Ekberg O, Hammarström L. Relationship between plasma, dentin and bone fluoride concentrations in rats following long-term fluoride administration. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 1981;48(5):433-7.

Ekstrand J, Spak CJ. Fluoride toothpaste-content, absorption and toxicological aspects. *Tandlakartidningen.* 1988. 79(22): 1249-52.

Ekstrand J, Spak CJ, Vogel G. Pharmacokinetic of fluoride in man and its clinical relevance. *J Dent Res.* 1990; 69(Spec Iss):550-555.

Ekstrand J. Fluoride metabolims. In: *Fluoride in dentistry. Munksgaard textbook;* 1996, p.55-65.

Ekstrand J, Oliveby A. Fluoride in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 1999; 57:330-333.

Ellwood R, Fejerskov O, Cury JA, Clarkson B: Fluorides in caries control; in: Fejerskov O, Kidd E (eds): *Dental caries: the disease and its clinical management.* 2nd ed. Oxford, Blackwell Munksgaard, 2008;18:287-327.

Falcão A, Tenuta LM, Cury JA. Fluoride gastrointestinal absorption from $\text{Na}_2\text{FPO}_3/\text{CaCO}_3$ - and NaF/SiO_2 -based toothpastes. *Caries Res* 2013;47(3):226-33.

Featherstone JD. Prevention and reversal of dental caries: role of low level fluoride. *Community Dent Oral Epidemiol* 1999; 27:31-40.

Fejerskov O, Baelum V, Richards A. Dose response and dental fluorosis. In: Fejerskov O, Ekstrand J, Burt BA, editors. *Fluoride in Dentistry*. 2 ed. Copenhagen: Munksgaard; 1996. p. 153-66.

Frazão P, Peres MA, Cury JA. Drinking water quality and fluoride concentration. *Rev Saude Pública* 2011; 45(5):964-73.

Freire PS, Freire AS. Resultados de sete anos de fluoretação de água no Brasil. *Rev Bras Odontol*. 1962; 21:31-41.

Galagan DJ, Vermillion JR. Determining optimum fluoride concentration. *Public Health Rep*. 1957; 68: 497-508.

Groeneveld A, Van Eck AA, Backer Dirks O. Fluoride in caries prevention: is the effect pre- or post-eruptive? *J Dent Res*. 1990;69 Spec No:751-5.

Hedman J, Sjöman R, Sjöström I, Twetman S. Fluoride concentration in saliva after consumption of a dinner meal prepared with fluoridated salt. *Caries Res* 2006; 40(2):158-62.

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

Levine RR. Pharmacology drug actions and reactions. 3rd. ed. Little Brown. 1991.

Lima YBO, Cury JA. Seasonal variation of fluoride intake by children in a subtropical region. *Caries Res.* 2003; 37(5): 335-8.

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

Maguire A, Walls R, Steen N, Teasdale L, Landes D, Omid N, Moynihan P, Zohoori FV. Urinary fluoride excretion in 6- to 7-year-olds ingesting milk containing 0.5 or 0.9 mg fluoride. *Caries Res* 2013;47(4):291-8

Maltz M, Farias C. Fluorose dentária em escolares de quatro cidades brasileiras com e sem água artificialmente fluoretada. *Rev Fac Odontol da UFRGS.* 1998; 39(2): 18-21.

Martínez-Mier EA, Cury JA, Heilman JR, Katz BP, Levy SM, Li Y et al. Development of gold standard of ion-selective electrode-based methods for fluoride analysis. *Caries Research.* 2011;45:3-12.

Martins CC, Oliveira MJ, Pordeus IA, Cury JA, Paiva SM. Association between socioeconomic factors and the choice of dentifrice and fluoride intake by children. *Int J Environ Res Public Health.* 2011; 8: 4284-4299.

McDonagh MS, Whithing PF, Wilson PM, Sutton AJ, Chestnut I, Copper J *et al.* Systematic review of water fluoridation. *BMJ.* 2000; 321(7): 855-859.

Narvai PC, Frazão P, Roncalli AG, Antunes JL. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. *Rev Panam Salud Publica*. 2006; 19(6):385-93.

Nelson DL, Cox MM. Biological membranes and transport. In: *Principles of Biochemistry*. 2008. 5 ed. Ed. Freeman. p.372-380.

Nobre dos Santos M, Cury JA. Dental plaque fluoride is lower after discontinuation of water fluoridation. *Caries Res* 1998;22(5):316-7.

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

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

Pizzo G, Piscopo MR, Pizzo I, Giuliana G. Community water fluoridation and caries prevention: a critical review. *Clin Oral Investig*. 2007 Sep;11(3):189-93

Richards A, Kragstrup J, Nielsen-Kudsk F. Pharmacokinetics of chronic fluoride ingestion in growing pigs. *J Dent Res*. 1985; 64: 425-430.

Richards A, Fejerskov O, Baelum V. Enamel fluoride in relation to severity of human dental fluorosis. *Adv Dent Res*. 1989; 3:147-53.

Roldi CR, Cury JA. Metabolismo do flúor após a ingestão de dentifrícios. *Rev Gaúcha Odontol*. 1986; 34(5): 425-7.

Rugg-Gunn AJ, Do L. Effectiveness of water fluoridation in caries prevention. *Community Dent Oral Epidemiol* 2012; 40 Suppl 2:55-64.

São Paulo (estado). Resolução SS-250/95. Define teores de concentração do íon fluoreto nas águas para consumo humano, fornecidas por sistemas públicos de abastecimento. Diário Oficial do Estado de São Paulo. 15 ago 1995; Seção1:3.

Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo. Condições de saúde bucal no estado de São Paulo em 2002: relatório final. Núcleo de Estudos e Pesquisas de Sistema de Saúde, 2002;41p.

Silva P. Farmacocinética. In: Farmacologia. 8 ed. Editora Guanabara Koogan. 2010a. p.27-29.

Silva P. Absorção das drogas. In: Farmacologia. 8 ed. Editora Guanabara Koogan. 2010b. p.44-53.

Silva P. Excreção das drogas. In: Farmacologia. 8 ed. Editora Guanabara Koogan. 2010c. p.79-83.

Silva P. Biodisponibilidade das drogas. In: Farmacologia. 8 ed. Editora Guanabara Koogan. 2010d. p.54-57.

Slade GD, Sanders AE, Do L, Roberts-Thomson K, Spencer AJ. Effects of fluoridated drinking water on dental caries in Australian adults. J Dent Res 2013;92(4):376-82.

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

Tenuta LMA, Del Bel Cury AA, Bortolin MC, Vogel GL and Cury JA. Ca, Pi, and F in the Fluid of Biofilm Formed under Sucrose. J Dent Res 2006;85(9):834-838.

Thylstrup A. Clinical evidence of the role of pre-eruptive fluoride in caries prevention. *J Dent Res.* 1990;69 Spec No:742-50.

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: and analysis of available data. *Caries Res.* 2010; 44: 60-8.

Vogel GL, Mao Y, Carey CM, Chow LC. Increased overnight fluoride concentrations in saliva, plaque, and plaque fluid after a novel two-solution rinse. *J Dent Res.* 1997;76(3):761-7.

Whitford GM, Pashley DH, Reynolds KE. Fluoride absorption from the rat urinary bladder: a pH-depedent event. *Am J Physiol.* 1977; 232:10-15.

Whitford GM, Pashley DH, Reynolds KE. Fluoride tissue distribution: short term kinetics. *Am J Physiol.* 1979; 236:141-148.

Whitford GM. The physiological and toxicological characteristics of fluoride. *J Dent Res.* 1990; 69(Spec Issue): 539-549.

Whitford, GM. Intake and metabolism of fluoride. *Adv Dent Res.* 1994; 8(1):5-14

Whitford GM. The metabolism and toxicity of fluoride. In: *Monographs in Oral Science*; 1996.

Yagiela JA. Pharmacokinetics: the absorption, distribution and fate of drugs. In: *Pharmacology and therapeutics for dentistry.* 6 ed. Ed. Mosby Elsevier. 2011. p 17-47.

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 Dent Oral Epidemiol* 2012; 40(5):432-40.

ANEXO

PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Biodisponibilidade de fluoreto no plasma sanguíneo e saliva após ingestão de alimentos preparados com água fluoretada", protocolo nº 041/2012, dos pesquisadores Lívia Maria Andaló Tenuta, Amanda Falcão da Silva, Héloisa Navarro Pantaroto, Jaime Aparecido Cury e Jeronimo Aparecido Ribeiro Junior, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 02/10/2012.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Bioavailability of fluoride in blood plasma and saliva after ingestion of foods prepared with fluoridated water", register number 041/2012, of Lívia Maria Andaló Tenuta, Amanda Falcão da Silva, Héloisa Navarro Pantaroto, Jaime Aparecido Cury and Jeronimo Aparecido Ribeiro Junior, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 10/02/2012.


Prof. Dra. Lívia Maria Andaló Tenuta
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP



Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.