



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CLAUDIA POLETTO

**ANÁLISE DA RELAÇÃO DOS NÍVEIS DE ELEMENTOS
TRAÇO NA SALIVA E CÁRIE DENTÁRIA EM
PRÉ-ESCOLARES**

Londrina
2018

ANA CLAUDIA POLETTO

**ANÁLISE DA RELAÇÃO DOS NÍVEIS DE ELEMENTOS
TRAÇO NA SALIVA E CÁRIE DENTÁRIA EM
PRÉ-ESCOLARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Odontologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Emerson José Venancio

Londrina
2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P765a Poletto, Ana Claudia.
Análise da relação dos níveis de elementos traço na saliva e cárie dentária em pré-escolares / Ana Claudia Poletto. – Londrina, 2018.
65 f.

Orientador: Emerson José Venancio.
Co-orientador: Sílvia Regina Rogatto.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, 2018.
Inclui bibliografia.

1. Cáries dentárias em crianças – Teses. 2. Saliva – Teses. 3. Elementos traços - análise – Teses. 4. Pré-escolares – Teses. I. Venancio, Emerson José. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314-002-053.2

ANA CLAUDIA POLETTO

**ANÁLISE DA RELAÇÃO DOS NÍVEIS DE ELEMENTOS
TRAÇO NA SALIVA E CÁRIE DENTÁRIA EM
PRÉ-ESCOLARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Odontologia da Universidade Estadual de Londrina, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração Clínica Odontológica.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emerson José Venancio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Avacir Casanova Andrello
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Luciana Tiemi Inagaki
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2018

À Deus, Senhor da minha vida, por ter conduzido e cuidado de todos os detalhes até a chegada desse momento. Por ser meu melhor amigo e luz do meu caminho.

Aos meus pais, Mara e Cláudio Poletto, desejo ter sido merecedora do esforço dedicado por vocês em todos os aspectos, especialmente quanto à minha formação. Mãe, obrigada por ser minha intercessora fiel, por não deixar sentir-me só em nenhum momento, obrigada por lutar por mim, eu amo você. Pai, obrigada pela sua presença, por seus ensinamentos e por seu amor.

Ao meu irmão, Daniel Poletto, meu amigo e agora colega de profissão. Agradeço por ser tão presente em minha vida, por me ajudar a ser mais, por ter sido essencial em todos os momentos para chegar até aqui, tenho certeza que esse sonho tornou-se possível devido a sua presença, obrigada por sonhá-lo comigo.

Aos meus avós Luiz e Eloisa, obrigada por todo o apoio. Vô, obrigada por ser meu amigo e me iluminar com sua imensa sabedoria.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Londrina.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação, Mestrado em Odontologia, **Professor Dr. Giovani Côrrea**.

A todos os Professores do Programa de Pós-graduação, Mestrado em Odontologia da Universidade Estadual de Londrina, **Professor Dr. Antonio Ferelle, Professora Dra. Cássia Cilene Dezan Carbelini, Professor Dr. Edwin Fernando Ruiz Contreras, Professor Dr. Emerson José Venancio, Professor Dr. Márcio Grama Hoepfner, Professora Dra. Maria José Sparça Salles, Prof. Dra. Solange de Paula Ramos, Professor Dr. Ricardo Sérgio Couto de Almeida, Prof Dr. Wilson Trevisan Júnior**.

Aos Professores **Luciana Tiemi Inagaki e Pablo Guilherme Caldarelli**, por aceitarem sem hesitar a fazer parte da banca examinadora de qualificação, ajudando de maneira singular no desenvolvimento desse trabalho.

Ao meu orientador **Emerson José Venancio**, por ter me apoiado durante esses dois anos e ter me acolhido como sua orientada, me incentivando no desenvolvimento do conhecimento e desse projeto.

A minha coorientadora **Professora Dra. Cássia Cilene Dezan Garbelini**, por não medir esforços em me ajudar. Obrigada por me auxiliar a construir minhas ideias e permitir que elas se realizassem.

Ao **Professor Dr. Avacir Casanova Andrello**, professor por todos os ensinamentos e pela paciência que teve comigo.

A Professora **Eliana Cristina Fosquiera**, obrigada por ser luz no meu caminho e porto seguro desde a graduação. Não teria chegado até aqui se não pudesse contar com você. Obrigada por sua amizade.

A Professora **Carla Cristiane da Silva**, por todo o apoio em todos os momentos da elaboração desse trabalho.

A minha amiga e colega **Paola Singi**, por ser o anjo da guarda que o Senhor colocou ao meu lado durante essa jornada.

Ao Professor **Dr. Alberto Zortéa Júnior**, que me possibilitou aprendizagens únicas, por meio do grande incentivo e colaboração durante essa fase de minha vida.

As residentes em Odontopediatria, **Maitê Soares, Teila Gonçalves, Ana Carolina Fernandes Couto, Patrícia Kochany, Paula Crystina Rizental e Ana Paula Matias** pela paciência, colaboração e apoio durante a realização da etapa clínica deste estudo.

Ao meu namorado, pela paciência, compreensão e apoio durante esse período distante.

As minhas amigas, **Lorena e Jéssica** por me mostrarem o verdadeiro sentido da amizade.

Aos meus colegas de Mestrado, **Rosário Mammani Barri, Gabriela Rocha, João Felipe Bessegato, Danielle Gregório, Igor Zen, Thaináh Bruna Zambrano** pelo apoio e companheirismo durante essa jornada.

As minhas amigas **Cassiana Koch Scott e Letícia Nadal**, por me ajudarem na construção do caminho para chegar até o Mestrado e pela amizade essencial.

Aos meus amigos **Leonardo, Juliana e Vinícius**, frutos de uma amizade nascida pela fé. Obrigado por me sustentar com suas orações e com tanto carinho e amor.

A **Bebê Clínica**, funcionários, professores e pacientes, obrigada pela oportunidade de desenvolver esse projeto nesse programa tão especial.

Ao **laboratório de Física Nuclear Aplicada** pela utilização do espaço e da infraestrutura para a obtenção dos espectros de fluorescência. E também a todos que fazem parte dele, especialmente, a **Daniele Maia Cleto**, por não ter medido esforços em me ajudar.

A **CAPES**, pelo apoio financeiro que foi fundamental para o desenvolvimento desse projeto.

Agradecer é admitir que houve um minuto em que se precisou de alguém. Agradecer é reconhecer que o homem jamais poderá ganhar para si o dom de ser autossuficiente.

Muito obrigada a todos!

Não te queixes, se sofres. Lapida-se a pedra que se estima, que tem valor. Dói-te?
Deixa-te lapidar, com agradecimento, porque Deus te tomou nas suas mãos como
um diamante. Não se trabalha assim um pedregulho vulgar.
São José Maria Escrivá

POLETTTO, Ana Claudia. **Análise da relação dos níveis de elementos traço na saliva e cárie dentária em pré-escolares**. 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

A cárie dentária é caracterizada como uma doença biofilme açúcar dependente complexa. Sua patogênese é um processo muito estudado e descrito na literatura, contudo a complexidade e correlação de fatores a tornam uma doença que deve ser analisada sob diversos prismas, como por exemplo: a composição salivar. A saliva é composta por substâncias orgânicas, inorgânicas e elementos traço. Estes elementos desempenham papel como cofatores e constituintes estruturais de algumas enzimas, também estão relacionados às funções metabólicas normais e ao adequado funcionamento do organismo. Estudos têm sido realizados abordando a relação entre os níveis de elementos traço presentes na saliva com a cárie dentária. Diante disso, o objetivo desse estudo foi determinar os níveis de Cu, Zn, Mn, Fe e Al presentes na saliva não estimulada de 120 crianças de 36 a 72 meses de idade de ambos os sexos com e sem experiência de cárie, participantes de um programa educativo preventivo em saúde bucal para crianças da Universidade Estadual de Londrina e verificar a relação desses elementos com a cárie dentária. Para análise dos níveis de elementos traço foi utilizada a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total. A análise estatística foi realizada pelos testes Mann-Whitney U e teste T de student ($P < 0,05$). A concentração de Fe no grupo de crianças com cárie foi maior 0,080 [0,031 – 0,239 mg/L], do que no grupo sem cárie 0,044 [0,023 – 0,107 mg/L], o mesmo aconteceu com o Mn, onde os níveis foram maiores no grupo com cárie 0,15 [0,007 - 0,020 mg/L] do que no grupo sem cárie 0,10 [0,001 – 0,017 mg/L]. Não houve diferenças entre os dois grupos nas concentrações de Cu, Zn e Al. Os níveis de Cu, Zn, Mn, Fe e Al na saliva das crianças não foram relacionados ao gênero nem a presença de restaurações. Conclui-se que embora os elementos Cu, Zn e Al apresentem importantes funções biológicas na saliva, não foi verificada relação desses elementos com a cárie dentária. Por outro lado, níveis aumentados dos elementos Mn e Fe foram observado no grupo de crianças com cárie evidenciando a relação desses elementos com a doença.

Palavras-chave: Cárie dentária. Elementos traço. Saliva.

POLETTTO, Ana Claudia. **Relationship between salivary trace elements and dental caries in preschool children**. 2018. 65 f. Dissertation (Master's Degree in Dentistry) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

Dental caries is considered as a complex dependent biofilm-sucrose disease. The dental caries pathogenesis has been widely described in literature, however there is complex process and factors which are related to it and turns it to a disease that needs to be analyzed under different perspectives, one of them is the salivary composition. The saliva is composed by organic, inorganic substances and trace elements. These elements are present in small amounts in the human body. In addition to their importance to body's normal metabolic functions, they also play a role as cofactors or as structural components of some specific enzymes. Previous studies have shown that there is some correlation between salivary trace elements and tooth decay. In front of this, the aim of this study was to determine the levels of Cu, Zn, Mn, Fe and Al and verify their relationship with dental caries in 3 to 6-year-old children, both genders that have or not suffered from tooth decay, who have been attended in an educational preventive program in oral health from State University of Londrina. The trace elements levels were determined by Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy. The statistical analysis was performed by the Mann-Whitney U and Student T test ($P < 0,05$). The concentration of Fe was higher in the caries group 0,080 [0,031 – 0,239 mg/L] than caries free 0,44 [0,023 – 0,107 mg/L], the same happened with Mn, were the levels were higher in caries group 0,15 [0,007 - 0,020 mg/L] than caries free 0,010 [0,001 – 0,017 mg/L]. There is no difference among the Cu, Zn, Al levels when compared children with and without dental caries. It was no relationship among Cu, Zn, Mn, Fe and Al levels and gender and restoration. It can be concluded although Cu, Zn and Al present important biological functions in the saliva, in our study, we didn't verify the relationships of this elements with dental caries. On the other hand, increased levels of Mn and Fe in dental caries children group highlighting the relationship with these elements with the disease.

Key words: Dental caries. Trace elements. Saliva.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos participantes do estudo.....	34
Tabela 2 – Concentração de elementos traço na saliva de crianças com e sem cárie dentária.....	35
Tabela 3 – Concentração de elementos traço na saliva de crianças com e sem restaurações.....	35
Tabela 4 – Concentração de elementos traço na saliva em relação ao gênero.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Atomic Absorption Spectrometry
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
Al	Alumínio
Ca ⁺²	Íon Cálcio
Ceo-d	Dentes decíduos Cariados, Extraídos, Obturados
Cl	Íon Cloreto
CPOD	Dentes permanentes Cariados, Perdidos, Obturados
Cr	Cromo
Cu	Cobre
F	Flúor
Fe	Ferro
Fe ⁺²	Íon ferroso
Fe ⁺³	Íon férrico
GBD	<i>Global Burden Diseases</i>
GbpC	<i>Glucan Binding protein C</i>
HCO ³⁻	Íon Bicarbonato
I	Iodo
ICDAS	<i>International Caries Detection and Assessment System</i>
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma Optical Spectrometry</i>
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
K ⁺	Íon Potássio
Mn	Manganês
Mo	Molibdênio
N	Nitrogênio
Na ⁺	Íon Sódio
O ₂	Oxigênio
pH	Potencial Hidrogeniônico
PO ₃ ⁻³	Íon Fosfato
Se	Selênio
SOD	Superóxido dismutase

SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TXRF	<i>Total Reflection X-Ray Fluorescence Spectroscopy</i>
XRF	<i>X-ray Fluorescence</i>
Z	Número atômico
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
	REFERÊNCIAS	22
2	ARTIGO – Relação dos níveis de elementos traço na saliva e cárie dentária em pré-escolares pela Técnica de Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF)	28
	APÊNDICE	44
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido	45
	ANEXOS	47
	ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina.....	48
	ANEXO 2 – Entrevista.....	51
	ANEXO 3 – Ficha clínica.....	54
	ANEXO 4 – Normas para publicação na revista <i>Journal of Trace Elements in Medicine and Biology</i>	55

1 INTRODUÇÃO

A cárie dentária é considerada o problema de saúde mais prevalente no mundo, com acometimento de 2.4 bilhões de adultos e 621 milhões de crianças (KASSEBAUM et al., 2015). Essa doença pode ter consequências importantes para qualidade de vida do indivíduo (FRENCKEN et al., 2017).

No Brasil, de acordo com a pesquisa nacional realizada em 2010 (BRASIL, 2012), a criança brasileira, aos 5 anos de idade apresenta um ceo-d (índice de dentes decíduos cariados, extraídos ou obturados) médio de 2,43 dentes com experiência de cárie, com predomínio do componente cariado. Embora a prevalência de cárie tenha diminuído no Brasil, existem grandes variações regionais para estes dados, sendo as médias do índice ceo-d mais elevadas nas regiões norte, centro-oeste e nordeste em comparação com as regiões sul e sudeste (BRASIL, 2012). Estas variações regionais ocorrem devido a fatores moduladores que influenciam indiretamente no desenvolvimento da cárie dentária, entre eles, fatores culturais, sociais, de escolaridade e precariedade de acesso aos serviços de saúde (NARVAI et al., 1999, NARVAI et al., 2006, SHEIHAM; JAMES, 2015).

Desta forma, no intuito de diminuir a prevalência de cárie, programas educativos e preventivos, com ênfase em saúde bucal, têm sido desenvolvidos e aplicados, principalmente pelos órgãos públicos. No estado do Paraná, a Clínica de Especialidades Infantis da Universidade Estadual de Londrina é um desses programas, sendo considerada referência nacional e internacional na atenção odontológica para bebês e crianças na faixa etária de 0 a 5 anos (PINTO et al., 2010, SCARPELI, et al., 2016). Os princípios desse programa são medidas educativas aos pais e preventivas às crianças, planejadas de acordo com avaliação do risco de cárie, como remoção mecânica de placa e aplicação de fluoretos, mostrando resultados satisfatórios com 71,1% dos egressos livres de cárie e índice ceo-d de $1,0 \pm 2,1$ (PINTO et al., 2010).

Em se tratando da etiologia da cárie dentária, esta é caracterizada como uma doença biofilme açúcar dependente complexa (SHEIHAM; JAMES 2015, GIACAMAN, 2017), resultante da dissolução mineral dos tecidos dentários, devido principalmente a produção de ácidos por bactérias que metabolizam carboidratos oriundos da dieta, em especial a sacarose (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2017). O biofilme é uma comunidade microbiana associada à superfície do dente ou de

qualquer outro material duro e não-descamativo (LINDHE et al., 2010). O desenvolvimento do biofilme no dente tem início logo após a escovação dentária com a formação da película adquirida sobre a superfície do esmalte, essa película é composta por glicoproteínas salivares, principalmente por mucinas e histatinas que se adsorvem sobre a superfície devido a interações eletrostáticas, essas proteínas alteram a carga e energia livre da superfície facilitando a adesão bacteriana (FEJERSKOV; NYVAD; KIDD, 2017). Em seguida, ocorre a adesão de microrganismos a receptores específicos presentes na película e posteriormente a multiplicação desses microrganismos. Nesse microecossistema acontece uma série de eventos fisiológicos, entre eles o processo de des-remineralização das estruturas dentárias (MALTZ et al., 2016). O metabolismo dos carboidratos fermentáveis pelas bactérias presentes no biofilme promove uma constante flutuação de pH e consequentemente a perda e ganho de minerais na superfície dentária (MARSH; ZAURA, 2017). A alta concentração de íons minerais na saliva e no fluido do biofilme impedem a dissolução dentária, além disso, a difusão dos íons cálcio, fosfato e fluoreto na estrutura dentária faz com que ocorra a formação de cristais mais resistentes a desmineralização em lesões não cavitadas, esse processo ocorre várias vezes durante o dia e é chamado de remineralização (FEATHERSTONE, 2004). Contudo, quando a frequência de ingestão de carboidratos aumenta, especialmente a sacarose, ocorre o rompimento da homeostase do processo de des-remineralização devido ao pH ácido do biofilme, com isso, ocorre o predomínio de bactérias acidúricas e acidogênicas (hipótese da placa ecológica, Marsh, 1994), como os *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus* e alguns lactobacilos responsáveis pela produção de ácidos orgânicos, entre eles, láctico, fórmico e acético que são capazes de dissolver as estruturas dentárias (MARSH; ZAURA, 2017).

Para que ocorra a desmineralização no esmalte é necessário a redução do pH a 5,5 e na dentina, o mesmo desequilíbrio ocorre em um pH de 6,5 (FEJERSKOV, 2004). Na dentição decídua este processo ocorre mais rápido, devido a menor concentração de minerais presentes na estrutura do esmalte, aumentando assim, a suscetibilidade destes dentes à cárie (KRZYSCIANK et al., 2014). De acordo com Maltz et al. (2016), o processo de desmineralização começa de forma subclínica, onde nenhuma intervenção é necessária. Contudo, para que a cárie seja considerada como uma doença é necessário a progressão da lesão até que se torne clinicamente visível. O primeiro aspecto clínico das lesões de cárie são as manchas

brancas, inicialmente rugosas e opacas, ou seja, lesões sem a presença de cavitação. Quando o processo de cárie persiste e o biofilme não é desorganizado, as lesões progridem formando cavidades, inicialmente em esmalte, depois em dentina podendo chegar a destruição total do dente. Deste modo, diante dos diferentes estágios das lesões, existem também múltiplas opções de tratamento, e a decisão deve levar em conta as evidências científicas, a experiência clínica do profissional e as necessidades do paciente (MALTZ et al., 2016).

Embora a patogênese da cárie seja um processo bem conhecido e descrito na literatura (FEJERSKOV, 2004, FEATHERSTONE, 2004, SHEIHAM; JAMES, 2015, GIACAMAN, 2017, JEPSEN et al., 2017), a complexidade e correlação de fatores a tornam uma doença que deve ser analisada sob diversos prismas, como por exemplo: a nutrição e hábitos de higiene bucal, exposição a fluoretos, os microrganismos bucais, a qualidade e integridade estrutural do esmalte, a suscetibilidade do hospedeiro e a composição da saliva (FEJERSKOV; NYVAD, KIDD, 2017).

Especificamente sobre a saliva, trata-se de uma secreção glandular que banha a cavidade bucal e que é responsável pela manutenção da saúde bucal por meio da proteção dos tecidos moles e dentes (FEJERSKOV, 2011). A saliva total contém células epiteliais descamadas e bactérias bucais (LIGTENBERG; VEERMAN, 2014) e é proveniente de fluidos de diferentes localizações como: glândulas salivares maiores (parótida, submandibular, sublingual); glândulas salivares menores (labial, lingual, bucal e palatina) e fluido crevicular. As principais funções da saliva estão relacionadas com as características do fluido e sua composição, sendo elas: lubrificação por intermédio das mucinas (glicoproteínas que conferem viscosidade à saliva e auxiliam na formação do bolo alimentar); proteção e hidratação das mucosas; digestão e paladar; ação antimicrobiana e de aglutinação bacteriana; limpeza e ação tamponante; manutenção da integridade dental e propriedades remineralizantes (EDGAR; DAWES; O'MULLANE, 2012).

Os fatores associados a variação da composição salivar estão relacionados a diferenças na secreção de cada glândula, período do dia (ritmo circadiano), estresse, radioterapia, hidratação corporal, doenças, exercício físico, natureza e duração dos estímulos, medicamentos e oscilações no fluxo salivar (CURY, et al., 2011). Estudos mostram que níveis menores de cárie estão relacionados com aumento do fluxo salivar enquanto pacientes com alto índice de CPOD (dentes permanentes cariados,

perdidos, obturados) e problemas periodontais com um menor fluxo salivar (AZEVEDO et al., 2005, PRABHAKAR; DODAWAD; RAJU, 2009). O fluxo salivar considerado normal da saliva não estimulada em adultos é em média 0,3 a 0,4 mL/min e de 1,5 a 2 mL/min para saliva estimulada (EDGAR; DAWES; O'MULLANE, 2012). Já para crianças de 6 anos a média de fluxo salivar de saliva não estimulada é de $0,48 \pm 0,37$ (BRETZ et al., 2001) e de $0,77 \pm 0,44$ mL/min para saliva estimulada (TORRES et al., 2006).

A saliva total apresenta 99% de água em sua composição e apenas 1% de substâncias orgânicas e inorgânicas (LLENA-PUY et al., 2006). Entre as substâncias orgânicas encontram-se uma variedade de carboidratos, enzimas e proteínas de ação não imunológica, tais como, as lisozimas, peroxidases (peroxidase salivar e mieloperoxidase), cistatinas, histatinas, aglutininas, mucinas, glicoproteínas salivares, lactoferrinas e proteínas imunológicas, como as imunoglobulinas, IgA secretória, IgG e IgM, que apresentam diferentes funções antimicrobianas como fagocitose, aglutinação e agregação bacteriana e algumas demonstram ação antifúngica e antiviral (AZEVEDO, et al., 2005, CURY, et al., 2011). Já, as principais substâncias inorgânicas presentes na saliva são representadas pelos íons cloreto (Cl^-), sódio (Na^+), potássio (K^+), fosfato (PO_3^{-3}), cálcio (Ca^{+2}), nitrogênio (N), oxigênio (O_2), bicarbonato (HCO_3^-) e elementos traço (LLENA-PUY et al., 2006). Essas substâncias apresentam um papel importante na capacidade tampão da saliva, nos fenômenos de remineralização das estruturas dentais, nos mecanismos de defesa e na atividade enzimática (BARDOW, LAGERLOF, NAUNTOFTE, 2011).

Os elementos traço são um grupo de micronutrientes, não sintetizados pelo organismo, responsáveis pelo adequado crescimento e desenvolvimento do corpo humano e na manutenção das funções metabólicas (NORDEBERG; NORDEBERG, 2016). De acordo com a World Health Organization (WHO), um elemento é considerado essencial para o organismo quando a diminuição de sua concentração no corpo a determinado limite resulta na redução de funções biológicas importantes, ou ainda, quando um elemento é parte integral de uma estrutura orgânica desenvolvendo uma função vital no organismo. Os elementos traço essenciais necessários para saúde humana são: Cromo (Cr), Cobalto (Co), Cobre (Cu), Ferro (Fe), Molibdênio (Mo), Selênio (Se), Zinco (Zn) e Manganês (Mn) (WHO, 1996). A obtenção desses elementos é proveniente dos nutrientes consumidos na dieta, na ingestão de água e, em menor proporção pela absorção através da pele ou inalação

(SRIRAM; LONCHYNA, 2009). A quantidade necessária desses elementos para o adequado funcionamento do organismo é muito pequena, em média 1 mg/kg do peso corporal (PATHAK; VITTALDAS; DHEERAJ, 2016). Embora a quantidade necessária seja mínima, a falta ou excesso desses elementos pode afetar o desenvolvimento do organismo como um todo (NIELSEN, 2003).

Os elementos traço que fazem parte da porção inorgânica da saliva, representam 0,2% de sua composição total (SEKHRI et al., 2017). São representados pelo Cobre (Cu), Cromo (Cr), Cobalto (Co), Ferro (Fe), Flúor (F), Iodo (I), Molibdênio (Mo), Manganês (Mn), Selênio (Se), Zinco (Zn), Alumínio (Al), Magnésio (Mg) e Sr (Estrôncio) (SRIRAM; LONCHYNA 2009, SEKHRI et al., 2017, QAMAR et al., 2017).

Diante dos aspectos abordados e tendo em vista a importância da composição salivar no equilíbrio saúde-doença, e dos elementos traço no adequado funcionamento do organismo, estudos têm sido realizados abordando a relação entre a cárie dentária e os níveis de elementos traço presentes no dente (TANAKA et al., 2004), na placa dental (ARIRACHCHAKARAN et al., 2007) e na saliva (DUGGAL; CHAWLA; CURZON, 1991, BORELLA; FANTUZZI; AGGAZZOTTI 1993, ZAHIR; SARKAR, 2006, WATANABE et al., 2009, WATANABE et al., 2011, HUSSEIN et al., 2013, HEDGE et al., 2014, SEKHRI et al., 2017).

Um dos elementos traço estudados avaliados neste estudo foi o Al, embora não seja um elemento essencial e esteja presente em pequenas concentrações no corpo humano (WHO, 1996), estudos *in vitro* mostraram que sais de Al podem inibir o crescimento de bactérias bucais e reduzir sua capacidade de colonizar a superfície do esmalte (PATHAK; VITTALDAS; DHEERAJ, 2016). Em um estudo realizado por Tanaka e col. (2004) verificaram que dentes decíduos sem cárie apresentavam maior concentração de Al em esmalte e dentina do que dentes com presença de cárie ou restaurações. Além disso, constataram que não havia diminuição da concentração de Al com a progressão da lesão. Portanto, a concentração reduzida de Al nessas condições não era devido a desmineralização e diante disso, os autores sugeriram um possível efeito cariostático desse elemento.

O Mn é um elemento traço essencial, disponível no organismo pela dieta e após sua absorção é distribuído em todos os tecidos e também apresenta papel de ativação de várias enzimas como hidrolases, quinases e transferases. Este elemento está presente na saliva (WHO, 1996) e o seu papel no desenvolvimento da cárie

também tem sido estudado. Arirachakaran et al. (2007) pesquisaram a influência do Mn na expressão de alguns genes de virulência dos *S. mutans*, mais especificamente o da GbpC (proteína ligante de glucano C), e verificaram que a presença de Mn resulta no aumento da expressão desse gene, sugerindo um papel cariogênico para esse elemento. A GbpC age como um receptor de superfície para glucanos, contribuindo para formação da arquitetura sacarose-dependente do biofilme (BANAS; VICKERMAN, 2003). Tsanidou et al. (2015) verificaram a relação entre a concentração de Mn na água e a presença de cárie. Os resultados mostraram que o consumo de água com maior concentração de Mn estava associado a uma maior prevalência de cárie, dando suporte ao papel cariogênico do Mn.

O Cu é um elemento traço amplamente distribuído nos tecidos e está envolvido em diversas funções biológicas, incluindo a participação como cofator de algumas enzimas como a superóxido dismutase e citocromo oxidase (WHO, 1996). É estimado que um adulto apresenta em média 80 mg de Cu no organismo e o consumo basal necessário é de 0,6 mg/dia (WHO, 1996). Devido a participação de Cu em diversos processos fisiológicos, estudos foram realizados abordando a relação desse elemento presente na saliva com a cárie dentária (BORELLA; FANTUZZI; AGGAZZOTI, 1994, WATANABE et al., 2009, HEDGE et al., 2014; SEKHRI et al., 2017). Hedge et al. (2014) e Sekhri et al. (2017) verificaram os níveis de Cu em indivíduos com e sem cárie e observaram que os níveis de Cu estavam elevados no grupo com cárie. Hedge et al. (2014) sugeriram que o aumento da concentração de Cu em adultos está relacionado ao aumento da atividade de enzimas antioxidantes na presença de atividade de cárie. Outra hipótese sugerida por Watanabe et al. (2009), é que os níveis desses elementos podem estar aumentados na saliva de crianças devido ao processo de desmineralização dentária durante o processo de cárie. Os autores afirmaram que esse elemento é liberado da estrutura dentária, o que justifica sua maior concentração na saliva. Um estudo realizado avaliando os níveis de Cu no dente, verificou maior concentração de Cu em dentina cariada do que saudável (HARRIS et al., 2007), o que corrobora com o fato desse elemento estar em maior concentração na saliva de indivíduos com cárie.

O Zn é outro elemento traço considerado essencial. Ele está presente em todos os tecidos e fluidos do corpo humano com concentração total estimada de 2 g. Este elemento contribui para o desenvolvimento de funções bioquímicas importantes no

organismo, como síntese e degradação de carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (WHO, 1996), além de ser cofator de enzimas como a superóxido dismutase presentes no citosol de células eucarióticas (HEDGE et al., 2014). Essa enzima está também presente na saliva e tem sido relacionada a processos como a cárie dentária, pois catalisa a dismutação de íons superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, sendo esta uma reação importante, uma vez que a falta de equilíbrio entre os níveis de radicais livres, espécies reativas ao oxigênio e antioxidantes presentes na saliva podem estar relacionadas ao desenvolvimento da cárie dentária (BATTINO et al., 2002). O estudo realizado por Hedge et al. (2014), avaliou os níveis de Zn e atividade da superóxido dismutase em adultos com e sem cárie e constatou maiores níveis de Zn e maior atividade dessa enzima em indivíduos com cárie. No estudo realizado por Hussein et al. (2013) também foi verificado maior concentração desse elemento na saliva de crianças com cárie. Esses autores sugeriram que o aumento da concentração de Zn na saliva está relacionado ao processo de desmineralização dentária, o que corrobora o estudo de Faizal (2013) que verificou maior concentração de Zn em esmalte cariado do que saudável. Em relação ao papel do Zn na cárie dentária, um estudo realizado por Toledano et al. (2016) verificou a influência do Zn na redução da atividade das metaloproteinases na degradação das fibras colágenas presentes na camada híbrida. Para tanto, na realização de restaurações utilizaram sistemas adesivos com Zn em sua composição e verificaram melhores propriedades nano-mecânicas e maior concentração mineral na dentina de dentes restaurados com esse tipo de adesivo. Contudo, outros autores sugeriram que não há relação do Zn com a cárie dentária, uma vez que não encontraram diferenças significativas nos níveis salivares de Zn entre indivíduos com e sem cárie (DUGGAL; CHAWLA; CURZON, 1991).

O elemento traço essencial mais abundante no corpo humano é o ferro, sendo indispensável para maioria das atividades metabólicas dos seres vivos. A presença de Fe no corpo é proveniente da dieta, principalmente por meio da ingestão de vegetais verdes (WHO, 1996). Em relação aos níveis de Fe presentes na saliva de crianças com e sem experiência de cárie, Hussein et al. (2013) determinaram que não havia diferenças na concentração desse elemento nos dois grupos. No entanto, Watanabe et al. (2011) verificaram que meninas com dentes cariados apresentavam maior concentração de Fe na saliva do que aquelas com dentes livres de cárie.

Assim, diante da importância dos elementos traço em processos biológicos, a

quantificação desses elementos presentes na saliva pode ser realizada por uma variedade de técnicas e métodos analíticos de caracterização como por exemplo: Espectroscopia de Emissão Óptica com Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES) (SEKHRI, 2017), Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS) (DUGGAL; CHAWLA; CURZON, 1991, BORELLA; FANTUZZI; AGGAZZOTTI, 1993, ZAHIR; SARKAR, 2006, WATANABE et al., 2011, HUSSEIN et al., 2013, HEGDE et al., 2014), Fluorescência de Raios X (XRF), Fluorescência de Raios X por Reflexão Total (TXRF) (ABRAHAM et al., 2010, CLETO et al., 2016). Dentre as técnicas mencionadas, a TXRF apresenta vantagens em relação as demais, pois é uma análise multielementar rápida, com preparação simplificada e com pouca quantidade de amostra da ordem de μL , possui baixo custo de execução, além de permitir a preservação da integridade estrutural das amostras (SANCHEZ et al., 2008).

O método de TXRF consiste em quantificar os elementos químicos (partes por bilhão) pela interpretação da fluorescência emitida oriunda da mudança de camada dos elétrons quando há a incidência de Raios X, em que cada elemento químico possui um espectro de raios X característicos. Para provocar a emissão dos raios X característicos dos elementos que constituem a amostra, é possível excitar o material a ser analisado de várias formas: partículas aceleradas (elétrons, prótons ou íons), partículas alfa, raios X ou raios gama de baixa energia. Quando a amostra é excitada, os elétrons das camadas mais internas são ejetados do átomo (efeito fotoelétrico) ficando assim, vacâncias nos níveis eletrônicos mais internos. Para preencher essas vacâncias, elétrons das camadas mais externas realizam um salto quântico. Nesse salto, fótons com energia igual à diferença de energia entre esse níveis são emitidos. Os raios X característicos liberados pelos átomos que compõe a amostra quando atingem o detector geram pulsos de carga proporcionais às energias dos raios X. Esses pulsos são amplificados pela eletrônica conectada ao detector e, o analisador multicanal registra esses pulsos e separa de acordo com a quantidade de carga, gerando dessa forma picos de energia em que sua área é proporcional a intensidade de raios X emitido pelo elemento e, conseqüentemente proporcional a concentração na amostra. Estas informações são enviadas para um microcomputador que processa as informações utilizando softwares específicos. Através dos espectros de energias gerados pelos softwares pode-se determinar a área do pico e identificar os elementos juntamente com sua concentração (NASCIMENTO FILHO, 1999). O limite mínimo de detecção de um elemento químico

no TXRF está relacionado com o seu número atômico (Z). Para Z baixo tem-se um limite mínimo de detecção maior do que para Z médio, quando analisadas as linhas K.

Diante do assunto já exposto é importante ressaltar que atualmente não existe consenso na literatura em relação ao papel dos elementos traço no desenvolvimento da cárie dentária. Os resultados contraditórios e inconclusivos dos estudos existentes identificaram os níveis desses elementos e a sua relação com a cárie e justificaram a necessidade de novas pesquisas nesta área, uma vez que alguns elementos tem sido considerados cariostáticos e outros cariogênicos. Além disso, ainda não está descrita na literatura a utilização da técnica de TXRF para avaliação de elementos traço presentes na saliva de pré-escolares com e sem cárie.

OBJETIVO

Investigar a relação dos níveis de elementos traço presentes na saliva com a cárie dentária em pré-escolares atendidos no programa educativo preventivo em saúde bucal da UEL.

REFERÊNCIAS

ABRAHAM, J. A. et al., Influence of smoking on the elemental composition of oral fluids: a TXRF approach. **X-Ray Spectrometry**, v. 39, n. 6, p. 372-375, 2010.

ARIRACHAKARAN, P. et al., Manganese Affects Streptococcus mutans Virulence Gene Expression. **Caries Research**, v. 41, n. 6, p. 503-511, 2007.

AZEVEDO, L. F. et al. Evaluation of socioeconomic aspects, salivary factors and oral habits on the caries risk determination in 12-year-old students of a private school in Curitiba, PR, Brazil. **Revista de Clínica e Pesquisa Odontológica**. v. 2, n.1, p. 39-44, 2005.

BANAS, J. A.; VICKERMAN, M. M. Glucan-binding proteins of the oral streptococci. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, p. 89-99, 2003.

BARDOW, A.; LAGERLOF, F.; NAUNTOFTE, J., O papel da saliva. In: FEJERSKOV, O., KIDD, E., **Cárie dentária: A doença e seu tratamento Clínico**. 2ed. São Paulo: Santos, 2011.

BATTINO, M. et al., The antioxidant capacity of saliva. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 29, n. 3, p. 189-194, 2002.

BORELLA, P.; FANTUZZI, G.; AGGAZZOTTI, G. Trace elements in saliva and dental caries in young adults. **The Science of the Total Environment**, v. 153, n.3, p. 219-224, 1993.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Projeto SB Brasil 2010**. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal: resultados principais. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRETZ, W. et al., Unstimulated salivary flow rates of young children. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 91, p. 541-545, 2001.

CURY, J. A.; TENUTA, L. M. A.; TABCHOURY, C. P. M. Saliva goma de mascar e saúde bucal. In: SALLUM, A. W.; CICARELLI, A. J. **Centenário da APCD**. São Paulo: Napoleão, 2011. p.179-190.

CLETO, D. A. M.; ANDRELLO, A. C.; NETTO, I. J. V.; APPOLONI, C. R. Analysis of saliva and gingival crevicular fluid by total reflection X-ray fluorescence (TXRF). **X-ray spectrometry**, v. 45, n. 4 p.220- 224, 2016.

DUGGAL, M.S.; CHAWLA, H.S.; CURZON, M. E. J. A study of the relationship between trace elements in saliva and dental caries in children. **Archives of Oral Biology**, v. 36, n.12, 881-884, 1991.

EDGAR, M.; DAWES C.; O'MULLANE, D. **Saliva and oral health**. 4. ed. Stephen Hancocks, 2012.

FAIZAL, C. P.; SURESH, K. V., MALARKODI, T. Estimation of trace elements in sound and carious enamel of primary teeth by atomic emission spectrometry. **Health Sciences**, v. 2, n.1, 2013.

FEATHERSTONE, J. D. B., The continuum of Dental Caries – Evidence for a Dynamic Disease Process. **Journal of Dental Research**, v. 83, 2004.

FEJERSKOV, O. Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care. **Caries Research**, v. 38. n.3, p. 182-189, 2004.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, E. **Cárie Dentária: A Doença e seu tratamento Clínico**. 2. ed. São Paulo: Santos, 2011.

FEJERSKOV, O.; NYVAD, B.; KIDD, E. **Cárie Dentária Fisiopatologia e Tratamento**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

FRENCKEN, J.E. et al., Global epidemiology of dental caries and severe periodontitis – a comprehensive review. **Journal of Clinical Periodontology**. v.18, n.44, 2017.

GIACAMAN, R. A. Sugars and beyond. The role of sugars and the other nutrients and their potential impact on caries. **Oral Diseases**, p.1-13, 2017.

HARRIS, et al., A link between copper and dental caries in human teeth identified by X-ray fluorescence elemental mapping. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, n.13, p.303-306, 2008.

HEGDE, M. N., et al., Biochemical Indicators of Dental Caries in Saliva: An in vivo Study. **Caries Research**, v. 48, p. 170-173, Feb, 2014.

HUSSEIN, A. S. et al., Salivary trace elements in relation to dental caries in a group of multi-ethnic schoolchildren in Shah Alam, Malaysia. **European Journal of Paediatric Dentistry**, v. 14, n. 2, p. 113-8, Jun. 2013.

JEPSEN, S. et al. Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases. **Journal Clinical Periodontology**, v. 44. n. 18, p. 85-93, 2017.

KASSEBAUM, N.J. et al., Global Burden of Untreated Caries: A systematic Review and Metaregression. **Journal of Dental Research**, 2015.

KRZYSCIAK, W.; JURCZAK, A.; KOSCIELNIAK, D.; BYSTROWSKA, B.; SKALNIAK, A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, n. 4, p. 499-515, abr. 2014.

LIGTENBERG, A. J. M.; VEERMAN, E.C.I., **Saliva: Secretion and functions**. Karger, 2014.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia**. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

LLENA-PUY, C. The role of saliva in maintaining oral health and as an aid to diagnosis. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal**, v.11, 2006.

MALTZ, M. et al. Decisão de tratamento restaurador baseada em evidências científicas. **In: Cariologia: Conceitos Básicos, Diagnóstico e Tratamento Não Restaurador**, São Paulo: Artes médicas, 2016.

MARSH, P.D.; ZAURA, E., Dental Biofilm: ecological interaction in health and disease. **Journal Clinical Periodontology**, v.44, n. 18, 2017.

NARVAI, P.C., FRAZÃO, P. CASTELLANOS, R.A., Declínio na Experiência de Cárie em Dentes Permanentes de Escolares Brasileiros no Final do Século XX. **Odontologia e Sociedade**, v.1, n. 1/2, p. 25-29, 1999.

NARVAI, P.C. et al. Cárie dentária no Brasil: declínio, polarização, iniquidade e exclusão social. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 19, n.6, p. 385-93, 2006.

NASCIMENTO FILHO, V. F. **Técnicas Analíticas nucleares de Fluorescência de Raios X por dispersão de energia (ED-XRF) e por Reflexão total (TXRF)**, CENA, junho, 1999.

NORDBERG, M.; NORDBERG, G. Trace element research-historical and future aspects. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 38, p. 46-52, 2016.

NIELSEN FH. Trace Elements. **Encyclopedia of Food Sciences and nutrition**. 2 ed. Londres: Academic Press, 2003.

PATHAK, M. U.; VITTALDAS, S.; DHEERAJ, K. Trace Elements and Oral Health: A Systematic Review. **Journal of Advanced Oral Res**, v. 7, n. 2, p. 12-20, may- aug. 2016.

PINTO, L. M. C. P. et al. Dental caries experience in children attending an infant oral health program. **Brazilian Journal of Oral Sciences**, v.9, n. 3, p. 345-350, 2010.

PRABHAKAR, A. R.; DODAWAD, R.; RAJU, O.S. Evaluation of Flow Rata, pH, Buffering capacity, Calcium, Total Protein and Total Antioxidant Levels of Saliva in Caries Free and Caries Active Children – An In Vivo Study. **International Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 2, n. 1, p. 9-12, jan-apr. 2009.

QAMAR, Z. et al., Influence of trace elements on dental enamel properties: A review. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v.87, n.1, Jan. 2017

SANCHEZ, H. J. Total Reflection X-Ray Fluorescence Analysis of Oral Fluids of Women Affected by Osteoporosis and Osteopenia. **Spectrochimica Acta Part B**, v. 63, n. 12, p. 1485-1488, 2008.

SCARPELLI, B. B. et al., Evaluation of a preventive educacional program for malocclusions: 7-year study, **Brazilian Oral Research**, v. 30, n.1, 2016.

SEKHRI, P. et al., Estimation of Trace Elements in Mixed Saliva of Caries Free and Caries Active Children. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v.42, n. 2/2018, p. 130-4, 2017.

SHEIHAM, A.; JAMES, W. P. T. Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized. **Journal of Dental Research**, v. 94, n. 10, p. 1341-1347, 2015.

SRIRAM, K., LONCHYNA, V. A. Micronutrient Supplementation in Adult Nutrition Therapy: Practical Considerations. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**. v.5, n.33, p.548-562, Sep-Oct, 2009.

TANAKA, T.; MAKI, K.; HAYASHIDA, Y.; KIMURA, M., Aluminum concentrations in human deciduous enamel and dentin related to dental caries. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**., v. 2, n. 18, p. 149-54, 2004.

TOLEDANO, M. et al., Advanced zinc-doped adhesives for high performance at the resin-cariou dentin interface. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 62, p. 247-267, 2016.

TORRES, S.R., Variation of salivary flow rates in Brazilian school children. **Brazilian Oral Research**, v. 20, n. 1, p. 8-12, 2006.

TSANIDOU, E. Caries prevalence and manganese and iron levels of drinking water in school children living in a rural/semi-urban region of North-Eastern Greece. **Environmental Health and Preventive Medicine**, v. 20, n.6, p. 404, 2015.

WATANABE, K. et al., Mn and Cu concentrations in mixed saliva of elementar school children in relation to sex, age, and dental caries. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, n. 23, p. 93-99, 2009.

WATANABE, K, et al., Al and Fe in mixed saliva of children related to elution behavior from teeth restorations. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 25, n.3, p. 143-8, 2011.

WHO, Trace Elements in Human Nutrition and Health, **World Health Organization**, Geneva, 1996.

ZAHIR, S.; SARKAR S. Study of trace elements in mixed saliva of caries free and caries active children. **Journal of Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry**, v.24, n. 1, Mar, 2006.

2. ARTIGO

Artigo formatado de acordo com as normas da revista Journal of Trace Elements in Medicine and Biology

Full Title: Relação dos níveis de elementos traço na saliva e cárie dentária em pré-escolares utilizando a Técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF)

Short Title: Elementos Traço e Cárie Dentária em crianças

Ana Claudia Poletto, Paola Singi, Rosário Mamani Barri, Avacir Andrello Casanova, Cássia Cilene Dezan Garbelini, Emerson José Venancio

RESUMO

O objetivo desse estudo foi determinar os níveis de elementos traço presentes na saliva de pré-escolares e verificar a relação desses elementos com a cárie dentária. Foram coletadas 120 amostras de saliva não estimulada de crianças de 36 a 72 meses de idade, de ambos os sexos, participantes do programa educativo preventivo em saúde bucal da Universidade Estadual de Londrina, Brasil. As crianças foram divididas em dois grupos, com cárie (n=60) e sem cárie (n=60). Os níveis de Cu, Zn, Mn, Fe e Al foram analisados por meio da técnica de fluorescência de raios X por reflexão total. A análise estatística foi realizada pelos testes Mann-Whitney U e teste T de Student ($P < 0,05$). Os resultados demonstraram que a concentração (mg/L) de Mn (0,015 [0,007-0,020]) e Fe (0,080 [0,031-0,239]) foram significativamente maiores no grupo com cárie ($P < 0,05$). Não houve diferença nos níveis de Cu, Zn, Al, quando comparadas crianças com e sem cárie. Além disso, os níveis Al, Fe, Cu, Zn e Mn não apresentaram diferença em relação ao gênero e a presença de restaurações. Os níveis aumentados de Fe e Mn mostraram associação

com a cárie dentária e níveis de Cu, Zn e Al não mostraram relação com a doença. Mais estudos devem ser realizados, uma vez que os elementos traço podem contribuir para o desenvolvimento de indicadores de risco da cárie dentária na primeira infância.

Palavras-chave: Cárie dentária; Elementos traço; Saliva.

ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the levels of salivary trace elements in saliva samples of preschool children and verify their relationship with dental caries. It was collected 120 samples of unstimulated saliva from 36-72 months of age children, from both genders, who participate in the preventive educational program in oral health to children at State University of Londrina, Brazil. The children were divided in two groups, caries (n=60) and caries-free (n=60). The Cu, Zn, Mn, Fe and Al levels were analyzed by total reflection X-ray fluorescence. The results demonstrate that the concentration of Mn (0.015 [0.007-0.020]) and Fe (0.080 [0.031-0.239]) were significantly higher in the caries group ($p < 0.05$). It was no difference among Cu, Zn, Al concentrations when compared children with and without caries. The Al, Fe, Cu, Zn and Mn levels present no difference in relation to gender and filled tooth. The increased Fe and Mn levels showed association to dental caries; Cu, Zn and Al didn't demonstrate relationship with the disease. More studies should be done, since the trace elements can contribute to the development of dental caries risk indicators in the early childhood.

Key words: Dental caries; trace elements; saliva.

INTRODUÇÃO

A cárie dentária é caracterizada como uma disbiose biofilme açúcar dependente complexa [1, 2], resultante da dissolução química dos tecidos dentários, provenientes da produção de ácidos por bactérias que metabolizam carboidratos oriundos da dieta, em especial a sacarose [3]. Fatores como nutrição e hábitos de higiene oral, exposição a fluoretos, microrganismos bucais, qualidade e integridade estrutural do esmalte, suscetibilidade do hospedeiro e a saliva podem influenciar no desenvolvimento da doença [1,2,3,4].

A saliva é uma secreção glandular que banha a cavidade bucal e que é responsável pela manutenção da saúde por meio da proteção dos tecidos moles e dentes [4]. Apresenta 99% de água em sua composição e apenas 1% de substâncias orgânicas e inorgânicas [5]. Entre as substâncias inorgânicas da saliva encontram-se os elementos traço, que são um grupo de micronutrientes responsáveis pelo adequado crescimento e desenvolvimento do corpo humano, envolvidos em diversas funções metabólicas [6]. A obtenção desses elementos é proveniente da dieta, ingestão de água e, em menor proporção, pela absorção através da pele ou inalação [7].

Devido a importância da composição salivar no equilíbrio saúde-doença, e dos elementos traço no adequado funcionamento do organismo, estudos têm sido realizados com adultos e crianças em diferentes países abordando a relação entre os níveis de elementos traço como Al, Mn, Fe, Cu e Zn presentes na saliva com a cárie dentária [8-15]. Contudo, os resultados desses estudos são contraditórios e inconclusivos em relação aos níveis desses elementos e a experiência de cárie. Tendo em vista a diversidade das populações estudadas, e a divergência dos resultados dos estudos, o objetivo desse estudo foi investigar os níveis de elementos traço presentes na saliva e a relação com a cárie dentária em crianças integrantes de um programa educativo preventivo em saúde bucal da Universidade Estadual de Londrina utilizando a técnica de fluorescência de raios X por reflexão total (TXRF).

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento experimental

Estudo transversal de crianças atendidas no programa educativo preventivo em saúde bucal infantil da UEL no período de maio a novembro de 2017.

Tamanho mínimo da amostra

A estimativa do tamanho mínimo da amostra utilizou confiança de 5% e poder de 80%. Os valores referentes a concentração dos elementos traço foram utilizados de acordo com o estudo de Hussein et al., 2013. Dessa forma, a amostra mínima estimada foi de 60 crianças para cada grupo no total de 120 participantes.

Sujeitos do estudo

A amostra desse estudo foi composta por 120 crianças de 36 a 72 meses de idade de ambos os sexos. Foram incluídas crianças com e sem experiência de cárie, participantes regulares do programa de prevenção. Os pais foram informados dos riscos e benefícios da pesquisa e daquelas que concordaram em participar do estudo foi obtido o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (apêndice A) antes do início da pesquisa. Foram excluídas crianças que faziam uso de qualquer tipo de medicamento ou que apresentavam alterações sistêmicas. Este estudo (CAAE: 59861216.2.0000.5231) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UEL (parecer: 1.748.208) (anexo 1).

Treinamento e calibração dos examinadores para o diagnóstico de cárie dentária

O treinamento teórico consistiu na realização de e-learning de 90 minutos na plataforma ICDAS (www.icdas.org), análise de fotografias intra-orais de dentes decíduos e dentes extraídos com diferentes estágios de cárie. Todo treinamento foi conduzido por um odontopediatra com 25 anos de experiência na área. A calibração foi realizada em 4 etapas com intervalo de 7 dias. Participaram do treinamento/calibração 20 crianças e 800 superfícies de molares foram avaliadas por dois examinadores e supervisionadas pelo examinador padrão-ouro.

Coleta de saliva

Os cuidadores foram orientados a não escovar os dentes das crianças na manhã da coleta a fim de evitar resíduos de dentífrico na saliva que eventualmente pudessem interferir nas análises. A coleta foi realizada no período da manhã entre 08:00 e 11:00h para evitar influências do ritmo circadiano. A amostra de saliva não estimulada (50 µL) foi obtida por aspiração do assoalho da cavidade bucal com auxílio de uma micropipeta e ponteiros estéreis. A amostra foi transferida para microtubos, identificada e congelada imediatamente após a coleta em freezer a - 20°C [17].

Avaliação da experiência de cárie

A condição dentária foi avaliada de acordo com os critérios do índice ICDAS (Sistema internacional de detecção e avaliação de lesões de cárie) [18] por dois examinadores previamente treinados e calibrados para esta metodologia. A concordância entre os examinadores foi avaliada pelo coeficiente kappa ponderado, o valor intra-examinador foi de 0,80 para o avaliador 1 e 0,79 para o avaliador 2 e a concordância inter-examinadores foi de 0,72. Previamente ao exame, foi realizada uma profilaxia de acordo com o protocolo preconizado pelo ICDAS, utilizando escova dental nova. O exame visual foi realizado sob luz artificial com auxílio de um espelho bucal plano e sonda exploradora com ponta romba. As superfícies dentárias foram secas com jatos de ar por 5 segundos e cada superfície examinada foi registrada em um odontograma por um anotador previamente treinado no preenchimento dos códigos do ICDAS (anexo 3). As crianças foram divididas em dois grupos, no grupo 1 foram incluídas crianças que não apresentavam lesões de cárie (código 0 ICDAS), com mancha branca visível somente após secagem (código 1 ICDAS) ou com mancha branca visível molhada (código 2 ICDAS). No grupo 2 foram alocadas as crianças que apresentavam cárie de esmalte e dentina em vários estágios de desenvolvimento (código 3, 4, 5 e 6 ICDAS).

Preparação das amostras

As amostras foram centrifugadas por 2 minutos em uma minicentrífuga (2000G – Fisherbrand) em seguida, permaneceram durante 30 minutos em repouso a temperatura ambiente para homogeneização. Para a preparação das amostras foi utilizado um disco cilíndrico de acrílico com diâmetro de 3 cm (Valorize – Londrina-PR, Brasil) com uma película protetora. Previamente a deposição das amostras, a película foi removida e então foi realizada uma leitura de 500 segundos do branco a fim de certificar-se que não havia contaminação de nenhum elemento sobre o disco. A seguir, o disco foi colocado sobre um suporte com uma marcação central, e com auxílio de uma micropipeta e ponteiros estéreis foi depositado no centro do disco 10 μ L de solução padrão (gálio 10 μ g/mL) e 10 μ L de saliva, os discos foram colocados sobre um porta amostra e levados para secagem em estufa a 50°C por 60 minutos. O protocolo seguido neste estudo foi descrito por Calle et al., 2013 [19]. Em seguida as amostras foram irradiadas por meio de um tubo de raios X com foco em linha reta que opera com uma potência de 30 W, voltagem de 50 kV e corrente de 602 μ A por um tempo de exposição de 500 segundos. As análises foram realizadas em triplicata, sendo que a cada leitura de 500 segundos o disco foi rotacionado em média 120°, resultando em 1500 segundos por amostra. Os espectros das amostras contendo os elementos Al, Cu, Zn, Mn, Fe, foram obtidos pelo sistema de TXRF S2 Picofox (Bruker – Berlim, Alemanha) localizado no Laboratório de Física Nuclear Aplicada na Universidade Estadual de Londrina e analisados pelo software SPECTRA (Bruker - Markham, Ontario, Canadá, 2010).

Análise estatística

Os participantes do estudo foram divididos em dois grupos, com e sem cárie e analisados quanto a relação da concentração dos elementos Al, Cu, Zn, Mn e Fe. Os dados foram expressos com número absoluto e a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk. Para as variáveis não paramétricas o teste de Mann-Whitney U foi utilizado para comparação entre os grupos, e para as variáveis paramétricas o teste t de Student. Os dados não paramétricos foram expressos em mediana e primeiro e terceiro quartil, e os dados paramétricos em média e desvio padrão. As análises foram realizadas no programa SPSS versão 21 (Inc, Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

A tabela 1 descreve as características dos participantes deste estudo quanto ao gênero, idade e fluxo salivar. A amostra foi composta por 120 crianças em idade pré-escolar (36 a 72 meses), sendo 66 meninos e 54 meninas. Os participantes foram selecionados por conveniência e alocados em dois grupos de acordo com a presença ou ausência de lesões cáries cavitadas. O Grupo 1, foi constituído de 60 crianças que não apresentavam lesões cavitadas, destas, 32 meninos (53,3%) e 28 meninas (46,7%). A idade média foi de $54,2 \pm 9,5$ meses e fluxo salivar de 0,50 mL/min. O Grupo 2 foi constituído por 60 crianças que apresentavam lesões de cárie cavitadas, 34 meninos (56,7%) e 26 meninas (43,3%), com idade média de $60,2 \pm 9,9$ meses e fluxo salivar de 0,48 mL/min.

Tabela 1 – Características dos participantes do estudo

	Sem cárie (n = 60)	Com cárie (n = 60)	P (<0,05)
Grupo			
Menino	32 (53,3%)	34 (56,7%)	0,714*
Menina	28 (46,7%)	26 (43,3%)	
Idade (meses)	$54,2 \pm 9,5$	$60,2 \pm 9,9$	0,567**
Fluxo salivar (mL/min)	0,50(0,31-0,80)	0,48(0,32-0,70)	0,504***

*Teste do qui-quadrado, dado expresso em n (%); **Teste t de Student, dado expresso em média e desvio padrão; *** Teste de Mann-Whitney U, dado expresso em mediana e Q1 e Q3.

Concentração de elementos traço em relação a condição dentária

A concentração dos elementos traço em cada grupo está descrita na Tabela 2. Os elementos analisados foram alumínio (Al), manganês (Mn), ferro (Fe), cobre (Cu) e zinco (Zn). Os resultados apresentados na tabela 2 foram estatisticamente significativos para os elementos Mn (0,010 mg/L - 0,015 mg/L) e Fe (0,044 mg/L - 0,080 mg/L), sendo maior no grupo com cárie para ambos elementos. Com relação aos outros elementos, Al, Cu e Zn, não foram identificadas diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 2 – Concentração de elementos traço na saliva (mg/L) das crianças com e sem cárie

	Sem cárie GRUPO 1	Com cárie GRUPO 2	P
	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	
Al	0,000 (0,000 – 3,800)	0,000 (0,000 – 2,350)	0,635
Mn	0,010 (0,001 – 0,017)	0,015 (0,007 – 0,020)	0,036*
Fe	0,044 (0,023 – 0,107)	0,080 (0,031 – 0,239)	0,027*
Cu	0,000 (0,000 – 0,003)	0,000 (0,000 – 0,003)	0,260
Zn	0,076 (0,066 – 0,089)	0,077 (0,071 – 0,091)	0,328

Teste de Mann-Whitney U. Diferença estatística $P < 0,05$. Os dados não apresentaram distribuição normal e foram descritos em mediana e Q1-Q3.

Concentração de elementos traço em relação a presença de restaurações

Nos pacientes com cárie, não houve diferença significativa na concentração de elementos traço entre os pacientes com e sem restauração como descrito na tabela 3.

Tabela 3 – Concentração de elementos traço na saliva (mg/L) em crianças com e sem restaurações

	Com restauração (n=10)	Sem restauração (n=43)	P
	Mediana (Q1 - Q3)	Mediana (Q1 - Q3)	
Al	1,150 (0,000 – 4,500)	0,000 (0,000 – 2,100)	0,252
Mn	0,015 (0,009 – 0,020)	0,015 (0,006 – 0,019)	0,982
Fe	0,069 (0,013 – 0,108)	0,085 (0,033 – 0,257)	0,301
Cu	0,000 (0,000 – 0,000)	0,001 (0,000 – 0,004)	0,077
Zn	0,074 (0,065 – 0,087)	0,076 (0,071 – 0,092)	0,510

Teste de Mann Whitney U. Diferença estatística $P < 0,05$. Os dados não apresentaram distribuição normal e foram descritos em mediana e Q1- Q3.

Concentração de elementos traço em relação ao gênero

Como demonstrado na tabela 4, não foram identificadas diferenças significativas na concentração dos elementos traço entre meninos e meninas.

Tabela 4 – Concentração de elementos traço na saliva (mg/L) em relação ao gênero

	Meninos (n=66) Mediana (Q1 - Q3)	Meninas (n=54) Mediana (Q1 - Q3)	P
Al	0,000 (0,000 – 2,900)	0,000 (0,000 – 3,600)	0,255
Mn	0,011 (0,003 – 0,017)	0,013 (0,008 – 0,019)	0,170
Fe	0,058 (0,024 – 0,136)	0,064 (0,023 – 0,182)	0,768
Cu	0,000 (0,000 – 0,003)	0,000 (0,000 – 0,005)	0,232
Zn	0,076 (0,066 – 0,089)	0,077 (0,069 – 0,094)	0,251

Dados expressos em mediana e Q1-Q3, valor de p referente ao teste Mann-Whitney U. Diferença estatística $P < 0,05$.

DISCUSSÃO

Na amostra estudada, os resultados obtidos mostram que níveis de Fe e Mn nas crianças com lesão de cárie foram maiores que no grupo sem lesão de cárie, sugerindo que esses elementos podem estar associados com a cárie dentária. A faixa etária escolhida nesse estudo, pré-escolar, é recomendada pela WHO para o monitoramento da prevalência de cárie dentária e dos padrões de saúde bucal. A opção por estudar crianças participantes de um programa de saúde bucal foi devido ao melhor controle de fatores relacionados com a doença, observados nessa população. Isso favoreceu a exploração de outras condições que possam influenciar no risco da cárie dentária como os níveis salivares de elementos traço. Além disso, não encontramos estudos dos níveis de elemento traço nesta faixa etária utilizando a técnica do TXRF.

O Mn é um micronutriente que está diretamente relacionado aos estreptococos bucais e altas concentrações desse elemento foram relacionadas com o aumento da prevalência de cárie [22]. Arirachakaran et al. [23] pesquisaram *in vitro* a influência do Mn na expressão de alguns genes de virulência dos *S. mutans*, mais especificamente o da GbpC (proteína ligante de glucano C), e verificaram que a presença de Mn resulta no aumento da expressão desse gene quando comparado a sua ausência, sugerindo um papel cariogênico para esse elemento. Nossos resultados corroboram com esse estudo, uma vez que os níveis de Mn em crianças foram maiores no grupo com cárie que no grupo sem cárie. Outra possível explicação para o aumento da concentração de Mn no grupo com cárie, é a utilização desse elemento traço por certas espécies bacterianas como os lactobacilos bucais, que utilizam o Mn para o seu metabolismo como mecanismo

alternativo de sobrevivência em ambientes com privação de Fe [24], o que explicaria a concentração aumentada em nosso estudo.

Nós verificamos que, semelhante ao Mn, a concentração de Fe no grupo de crianças com cárie foi maior do que no grupo sem cárie. O Fe é um elemento traço essencial para as funções metabólicas bacterianas e pode modular a comunidade microbiana do hospedeiro pela influência em processos como a cárie [24]. A absorção de Fe pelas bactérias utiliza preferencialmente íons Fe^{+2} e Fe^{+3} que se encontram em baixas concentrações nas superfícies mucosas devido a ligação desse mineral às glicoproteínas salivares como a lactoferrina e transferrina ou intracelularmente associados a compostos heme ou ferretina gerando um mecanismo eficiente de defesa do hospedeiro contra o crescimento bacteriano. Por outro lado, os microrganismos desenvolveram mecanismos especializados em sequestrar o Fe das proteínas do hospedeiro, sintetizando moléculas quelantes de Fe, chamadas sideróforos [22]. Estes compostos alteram a solubilidade do Fe no meio extracelular e facilitam sua absorção para o interior da bactéria. Esse mecanismo faz com que as bactérias consigam sobreviver mesmo em condições deficientes de Fe [24].

Neste estudo, não houve associação do Cu, Zn e Al com a cárie dentária. O cobre é um elemento traço amplamente distribuído nos tecidos e está envolvido em diversas funções biológicas, incluindo a participação como cofator de algumas enzimas como a superóxido dismutase e citocromo oxidase [25]. Alguns estudos com resultados conflitantes avaliaram a concentração de Cu [8,9,12,14] em relação a cárie dentária. No presente estudo, verificamos que os níveis de Cu eram similares entre os grupos, o que corrobora com os dados encontrados por Zahir e Sarkar, 2006 [11]. Por outro lado, Watanabe, Hedge e Sekhri e Hussein [12,14,15], encontraram uma maior concentração desse elemento no grupo de crianças com cárie, Watanabe [12] verificaram que os níveis de Cu, aumentavam de acordo com o número de dentes cariados. Esses autores sugeriram que esse aumento pode estar relacionado ao processo de desmineralização. Esse dado concorda com o trabalho de Harris et al., [26] em que avaliaram a presença de Cu em dentes com e sem cárie e verificaram maior concentração de cobre em dentina cariada, o que explica o fato desse mineral estar em maior concentração na saliva devido a desmineralização. Essa diferença pode não ter sido verificada em nosso estudo devido ao número reduzido de crianças com superfícies dentárias cavitadas em dentina em nossa

amostra, quando comparada aos outros estudos, em que para um indivíduo fazer parte do grupo cariado precisava apresentar ao menos CPOD > 3 [14, 15].

O zinco é outro elemento traço considerado essencial devido sua contribuição em diversas funções bioquímicas importantes no organismo [25]. Foi descrito previamente na literatura também a importância desse elemento em processos como a cárie dentária. Em nosso estudo, não encontramos diferenças entre crianças com e sem cárie e os níveis de Zn presentes na saliva, o que corrobora com os resultados encontrados por Duggal, Zahir e Sarkar [9, 11]. Por outro lado, Hussein e Hedge et al. [8,14] encontraram maiores níveis desse elemento em indivíduos com cárie, Hedge et al. [14] sugeriram que esse aumento pode estar relacionado ao aumento da atividade da superóxido dismutase na saliva, devido a participação do Zn como cofator dessa enzima [27]. Embora os achados de Hedge et al. [14] sejam importantes, não é possível a comparação com nossos resultados, devido a diferença entre os indivíduos estudados. Hedge et al. [14] avaliaram a saliva estimulada de adultos de 25 a 50 anos, ao contrário do nosso estudo que a saliva foi obtida sem estimulação em crianças de 3 a 6 anos de idade. Hussein et al. [8] sugerem que os níveis de Zn estão aumentados na saliva devido ao processo de desmineralização na presença de cárie, portanto os níveis salivares de Zn aumentados poderiam estar relacionados a liberação desse elemento presente no dente para saliva. Mohamed et al. [28] verificaram que dentes permanentes apresentavam maior concentração Zn do que dentes decíduos. Em nosso estudo, as crianças incluídas apresentavam apenas dentes decíduos o que difere de Hussein [8] onde foram incluídas na amostra crianças de 8 a 12 anos, que já apresentavam dentes permanentes, esse pode ser um dos motivos de não ter sido verificada essa diferença em nosso estudo.

Embora o Al não seja um elemento traço essencial e esteja presente em pequenas concentrações no corpo humano [25] estudos mostraram que sais de Al podem inibir o crescimento de bactérias orais e reduzir sua capacidade de colonizar a superfície do esmalte [6]. Tanaka e col. [21] verificaram maior concentração de Al em esmalte e dentina de dentes decíduos sem cárie do que dentes com cárie ou restaurações. Além disso, constataram que não houve diminuição da concentração de Al com a progressão da lesão. Portanto, os autores sugeriram um possível efeito cariostático desse elemento. Em nosso estudo, não encontramos diferenças nos níveis de Al na saliva de crianças com e sem cárie, o que corrobora com os achados

por Watanabe [13]. De acordo com a Organização Mundial da Saúde [25] a concentração de Al no organismo é reduzida o que reflete diretamente na presença desse elemento na saliva. Embora a técnica de fluorescência de raios X permita a identificação de pequenas concentrações dos elementos presentes nas amostras, os níveis de Al presentes na saliva da maioria das crianças poderia estar abaixo do limite mínimo de detecção do aparelho, o que também dificultaria a quantificação desse elemento. Além disso, há uma dificuldade no entendimento do papel do Al na cárie dentária, devido ao reduzido número de trabalhos relacionando a presença desse elemento na saliva e sua relação com a cárie [13].

Em relação ao gênero, este estudo não mostrou diferenças nos níveis de elementos traço presentes na saliva entre meninos e meninas, o que corrobora parcialmente com o estudo de Hussein et al., [8] em que verificaram níveis semelhantes de Cu, Zn, Fe e Mn em crianças de 8 a 12 anos entre os sexos. Estudos com maior número de crianças em idade pré-escolar podem contribuir para o melhor entendimento dos níveis de elementos traço presentes na saliva, uma vez que não há estudos que avaliaram a quantificação dos elementos traço na composição salivar de pré-escolares. Além disso, a avaliação da dieta pode ser um auxiliar para o entendimento da concentração e função dos elementos na saliva.

Em conclusão, embora os elementos Cu, Zn e Al apresentem importantes funções biológicas na saliva, em nosso estudo não verificamos relação desses elementos com a cárie dentária. Por outro lado, houve níveis aumentados dos elementos Mn e Fe no grupo de crianças com cárie evidenciando a relação desses elementos com a doença. Sugerem um possível envolvimento desses elementos no metabolismo dos microrganismos envolvidos no processo cariioso. Nosso estudo contribuiu para melhor compreensão da influência dos níveis de elementos traço salivar no desenvolvimento da cárie dentária em pré-escolares. Contudo, mais estudos devem ser realizados, uma vez que os elementos traço podem contribuir para o desenvolvimento de indicadores de risco da doença cárie principalmente na primeira infância.

AGRADECIMENTOS

Os três primeiros autores agradecem à CAPES pelas bolsas de estudo (Números 1603586, 1763042, 1693076 respectivamente).

REFERÊNCIAS

- [1] R.A. Giacaman, Sugars and beyond. The role of sugars and the other nutrients and their potential impact on caries, *Oral Dis.* (2017) 1-13.
- [2] Sheiham, W.P.T. James, Diet and Dental Caries: The Pivotal Role of Free Sugars Reemphasized, *J. Dental Res.* 94 (2015) 1341-1347.
- [3] S. Jepsen, J. Blanco, W. Buchalla, J.C. Carvalho, T. Dietrich, C. Doerfer, K.A. Eaton, E. Figuero, J.E. Frencken, F. Graziani, S.M. Higham, T. Kocher, M. Maltz, A. Ortiz-Vigon, J. Schmoekel, A. Sculean, L.M.A. Tenuta, M. H. Van der Veen, V. Machiulskiene, Prevention and control of dental caries and periodontal diseases at individual and population level: consensus report of group 3 of joint EFP/ORCA workshop on the boundaries between caries and periodontal diseases, *J. Clin Per.* 44 (2017) 85-93.
- [4] O. Fejerskov, Changing paradigms in concepts on dental caries: consequences for oral health care, *Caries Res.* 38 (2004) 182–189.
- [5] J. A. Cury, L.M.A. Tenuta, C.P.M. Tabchoury, Saliva goma de mascar e saúde bucal, in: A.W. Sallum, A.J. Cicarelli, Centenário da APCD, Napoleão, São Paulo, 2011, pp. 179-190.
- [6] M.U. Pathak, S. Vittaldas, K. Dheeraj, Trace Elements and Oral Health: A Systematic Review, *J. Adv. Oral Res.* 7 (2016) 12-20.
- [7] K. Sriram, V. A. Lonchyna, Micronutrient Supplementation in Adult Nutrition Therapy: Practical Considerations, *J. Parent. Ent. Nut.* 5 (2009) 548-562.

- [8] A.S. Hussein, H.F. Ghasheer, N.M. Ramli, R.J. Schroth, M.I. Abu-Hassan, Salivary trace elements in relation to dental caries in a group of multi-ethnic schoolchildren in Shah Alam, Malaysia, *Eur. J. Paediatr. Dent.* 14 (2013) 113-118.
- [9] M.S. Duggal, H.S. Chawla, M.E.J. Curzon, A study of the relationship between trace in saliva and dental caries in children, *Arch. Oral Biol.* 36 (1991) 881-884.
- [10] P. Borella, G. Fantuzzi, G. Aggazzotti, Trace elements in saliva and dental caries in Young adults, *Sci. Total Environ*, 153 (1993) 219-224.
- [11] S. Zahir, S. Sarkar, Study of trace elements in mixed saliva of caries free and caries active children, *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent.* 24 (2006).
- [12] [14] K. Watanabe, T. Tanaka, T. Shigemi, Y. Hayashida, K. Maki, Mn and Cu concentrations in mixed saliva of elementary school children in relation to sex, age, and dental caries, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 23 (2009) 93-99.
- [13] K.Watanabe, T. Tanaka, T. Shigemi, K. Saeki, Y. Fujita, K. Morikawa, H. Nakashima, S. Takahashi, S. Watanabe, K. Makic, Al and Fe in mixed saliva of children related to elution behavior from teeth restorations, *J. Trace Elem. Med. Biol.* 25 (2011) 143-148.
- [14] M.N. Hegde, N.D. Hegde, A. Ashoka, S. Shetty, Biochemical Indicators of Dental Caries in Saliva: An in vivo Study, *Caries Res.* 48 (2014) 170-173.
- [15] P. Sekhri, M. Sandhu, V. Sachdev, R. Chopra, Estimation of Trace Elements in Mixed Saliva of Caries Free and Caries Active Children, *J. Clin. Pediatr. Dent.* 42 (2017) 130-134.
- [16] H. A. Miot, Tamanho da amostra em estudos clínicos e experimentais. *J. Vasc. Bras.* 4 (2011) 275-278.

- [17] D.A.M. Cleto, A.C. Andrello, I.J.V. Netto, C.R. Appoloni, Analysis of saliva and gingival crevicular fluid by total reflection X-ray fluorescence (TXRF), Xray Spectrom. 45 (2016) 220-224.
- [18] A.I. Ismail, W. Sohn, M. Tellez, A. Amaya, A. Sen, H. Hasson, N.B. Pitts, The International Caries Detection and Assessment System (ICDAS): an integrated system for measuring dental caries. Community Dent. Oral Epidemiol. 35 (2007) 170–178.
- [19] I. Calle, Sample Pretreatment Strategies for Total Reflection X-ray Fluorescence. Spectrochimica Acta Part B 90 (2013) 23–54.
- [20] M. Edgar, C. Dawes, D. O’Mullane, Saliva and oral health, fourth ed. Stephen, Hancocks, 2012.
- [21] T. Tanaka, K. Maki, Y. Hayashida, M. Kimura, Aluminum concentrations in human deciduous enamel and dentin related to dental caries, J. Trace Elem. Med. Biol. 2 (2004) 149-154.
- [22] E. Rolerson, A. Swick, L. Newlon, C. Palmer, Y. Pan, B. Keeshan, G. Spatafora, The SloR/Dlg Metalloregulator Modulates *Streptococcus mutans* Virulence Gene Expression, J. Bacteriol. 188 (2006) 5033-5044.
- [23] P. Arirachakaran, E. Benjavongkulchaia, S. Luengpailinb, D. Ajdićc, J.A. Banas, Manganese Affects *Streptococcus mutans* Virulence Gene Expression. Caries Res. 41 (2007) 503-511.
- [24] R. Wang, A. Kaplan, L. Guo, W. Shi, X. Zhou, R. Lux, X. He, The influence of iron availability on human salivary microbial community composition, Microb. Ecol. 64 (2012) 152-161.
- [25] WHO, Trace Elements in Human Nutrition and Health, World Health Organization, Geneva, (1996).

[26] H.H. Harris, S. Vogt, H. Eastgate, P.A. Lay, A link between copper and dental caries in human teeth identified by X-ray fluorescence elemental mapping, *J. Biol. Inorg. Chem.* (2008) 303-306.

[27] M. Battino, M.S. Ferreiro, I. Gallardo, H.N. Newman, P. Bullon, The antioxidant capacity of saliva, *J. Clin. Periodontol.* (2002) 189–194.

[28] A.A. Mohamed, A.F.I. Helal, Analysis of Trace Elements in Teeth by ICP-MS: Implications for Caries, *J. Physical Sci.* 21 (2010) 1–12.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Termo de Consentimento Livre Esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

“ESTUDO DOS NÍVEIS DE ELEMENTOS TRAÇO NA SALIVA E NA DIETA E A INCIDÊNCIA DE CÁRIE DENTÁRIA EM CRIANÇAS”

Prezado (a) Senhor (a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) para participar da pesquisa “ESTUDO DOS NÍVEIS DE ELEMENTOS TRAÇO NA SALIVA E NA DIETA E A INCIDÊNCIA DE CÁRIE DENTÁRIA EM CRIANÇAS”, a ser realizada na Bebê-Clínica (situada na rua Benjamin Constant, 800 Centro, telefone 3321-6336). O objetivo da pesquisa é avaliar a presença de cárie nas crianças de 3 a 5 anos de idade que estão sendo acompanhadas na Bebê-Clínica, e investigar a associação da cárie e níveis de elementos traço através do estudo da saliva dessas crianças. A participação do seu filho (a) é muito importante e ela se daria da seguinte forma: primeiramente será realizada uma análise do prontuário do seu filho (a) desde o primeiro atendimento na Bebê-Clínica até o presente momento, depois será feita uma entrevista sobre a condição de saúde bucal e hábitos alimentares de seu filho (a), um exame clínico bucal e coleta de uma amostra de saliva. Todos esses procedimentos são simples, rápidos e indolores. Informamos que os riscos durante a coleta da saliva são mínimos, podendo causar um leve incômodo, que eventualmente pode resultar em choro da criança, neste caso a coleta será interrompida e o paciente excluído da amostra. Durante a entrevista, os riscos eventualmente podem estar relacionados ao constrangimento que as perguntas do questionário possam ocasionar aos pais e cuidadores. Caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pela pesquisadora.

Esclarecemos que a participação da criança é totalmente voluntária, podendo o (a) senhor (a): recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento, sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo a seu filho (a). Esclarecemos, também, que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a identidade da criança. As amostras de saliva que porventura restarem após a análise serão congeladas para utilização em pesquisas futuras. Informamos que esta pesquisa atende e respeita os direitos previstos no Estatuto da Criança e do Adolescente-ECA, lei Federal nº 8069 de 13 de julho de 1990, sendo eles: à vida, à saúde, à alimentação, à educação, ao esporte, ao lazer, à profissionalização, à cultura, à dignidade, ao respeito, à liberdade e à convivência familiar e comunitária. Garantimos também que será atendido o Artigo 18 do ECA: “É dever de todos velar pela dignidade da criança e do adolescente, pondo-os a salvo de qualquer tratamento desumano, violento, aterrorizante, vexatório ou constrangedor”. Esclarecemos ainda, que o (a) seu filho (a) não pagará e nem será remunerado (a) por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão

ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação. Os benefícios esperados são o conhecimento da incidência de cárie na população estudada e melhor conhecimento de elementos traço que possam estar ligados a cárie. Caso o(a) senhor(a) tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos poderá nos contatar, **Prof. Dr. Emerson José Venâncio (emersonjvst@gmail.com) no Laboratório de Imunologia IV (salas 39 e 40) Departamento de Ciências Patológicas, no Campus Universitário, telefone (43) 3371- 5766**, ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, situado junto ao LABESC - Laboratório Escola, no Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445 KM 380 telefone 3371-5455, e-mail: cep268@uel.br. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas devidamente preenchida, assinada e entregue ao (à) senhor (a).

Londrina, ___ de _____ de 2017.

Pesquisador Responsável: Emerson José Venancio
RG: 4488253-1 SSP-PR

_____ (Nome por extenso da criança), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo que meu filho(a) participe **voluntariamente** da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica) dos pais ou responsáveis:

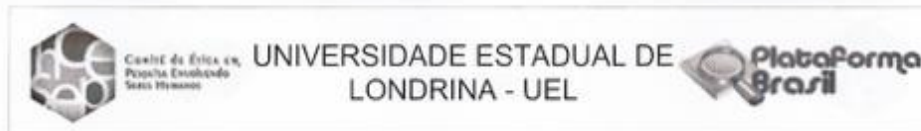
R.G: _____

Data: _____

ANEXOS

ANEXO 1

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da
Universidade Estadual de Londrina



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DOS NÍVEIS DE ELEMENTOS TRAÇO NA SALIVA E NA DIETA E A INCIDÊNCIA DE CÁRIE DENTÁRIA EM CRIANÇAS

Pesquisador: Ana Claudia Poletto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 59861216.2.0000.5231

Instituição Proponente: CCS - COU - Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.748.208

Apresentação do Projeto:

O presente projeto visa buscar maiores informações sobre a relação entre estes elementos e a incidência de cárie utilizando a saliva de crianças de 3 a 5 anos atendidas na Bebê-Clinica da Universidade Estadual de Londrina. Participarão da pesquisa 300 crianças, serão coletadas dados das fichas de prontuários, saliva e aplicado questionário sobre dados socio-econômicos e hábitos alimentares e de higiene bucal.

Objetivo da Pesquisa:

Geral:

Avaliar a relação dos níveis de elementos traço salivar e a incidência de cárie dentária em crianças.

Específicos:

Realizar uma revisão sistemática sobre a relação dos níveis de elementos traço e a incidência de cárie dentária em crianças;

Caracterizar a população estudada com relação aos domínios traumatismo dentário, saúde bucal, comportamento e histórico médico;

Determinar a prevalência de cárie na população estudada;

Investigar a relação dos fatores ambientais e socioeconômicos relacionados a experiência de cárie;

Determinar os níveis de elementos traço presentes na saliva;

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Centro de Ética em
Pesquisas Envolvendo
Seres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.748.208

Avaliar os níveis de elementos traço presentes na dieta consumida pelas crianças;
Investigar a influência da dieta e a incidência de cárie;

Avaliar a relação entre os níveis de elementos traço presentes na saliva e a incidência de cárie;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Quanto os riscos a pesquisadora relata que são mínimos e que a coleta de saliva pode causar um leve incômodo, que eventualmente pode resultar em choro da criança, neste caso a coleta será interrompida e o paciente excluído da amostra. Durante a entrevista, os riscos eventualmente podem estar relacionados ao constrangimento que as perguntas do questionário possam ocasionar ao pais e cuidadores. Caso ocorra algum tipo de desconforto o participante será prontamente atendido e amparado pela pesquisadora.

Quanto aos benefícios: Identificar se há relação entre a incidência de cárie e os níveis de elementos traço presentes na saliva e na dieta de crianças. Além de contribuir para conhecimento sobre a relação dos elementos traço e cárie dentária, uma vez que estabelecida essa relação, os resultados obtidos poderão ser utilizados para a definição de novas estratégias para prevenção ou tratamento da cárie. Estabelecer a relação dos fatores ambientais e socioeconômicos relacionados a experiência de cárie e investigar a influência da dieta e a incidência de cárie.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante visto que a cárie é uma doença multifatorial e existe na literatura controvérsia quanto a relação entre os níveis de elementos traço salivares e cárie dentária.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta folha de rosto preenchida e assinada adequadamente. Apresenta autorização da Bebe-Clinica para pesquisa, termo de sigilo e confidencialidade assinado, termo de armazenamento de material biológico assinado, TCLE adequado e de acordo com a resolução, instrumentos para coleta de dados. A data prevista para coleta de dados é 07/11, apresentação orçamento de R\$ 5.000,00 que será custeado pela própria pesquisadora.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado (a) Pesquisador (a),

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: cep268@uel.br



Comitê de Ética em
Pesquisas Envolvendo
Seres Humanos

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE
LONDRINA - UEL



Continuação do Parecer: 1.748.268

Este é seu parecer final de aprovação, vinculado ao Comitê de Ética em Pesquisas Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina. É sua responsabilidade imprimi-lo para apresentação aos órgãos e/ou instituições pertinentes.

Coordenação CEP/UEL.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_782605.pdf	13/09/2016 13:44:23		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	13/09/2016 13:42:18	Ana Claudia Poletto	Aceito
Outros	termo_de_confidencialidade.pdf	13/09/2016 13:37:30	Ana Claudia Poletto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PDF.doc	31/08/2016 14:04:36	Ana Claudia Poletto	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto.pdf	31/08/2016 13:52:02	Ana Claudia Poletto	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	material_biologico.pdf	30/08/2016 08:47:51	Ana Claudia Poletto	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	instituicao_cooparticipante.pdf	30/08/2016 08:47:14	Ana Claudia Poletto	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	30/08/2016 08:41:06	Ana Claudia Poletto	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: LABESC - Sala 14

Bairro: Campus Universitário

UF: PR

Município: LONDRINA

CEP: 86.057-970

Telefone: (43)3371-5455

E-mail: csp268@uel.br

ANEXO 2

Entrevista



1) Formulário N.: _____ 2) Data: ____/____/____

I – DADOS PESSOAIS

- 3) Nome completo: _____
- 4) Data de nascimento: _____ 5) Idade: _____ meses
- 6) Altura: _____ 7) Peso: _____
- 8) IMC: _____
- 9) Gênero: () M () F
- 10) Endereço: _____
- 11) Cidade: _____
- 12) Telefone fixo: _____
- 13) Celular: _____
- 14) Telefone de um parente para contato: _____
- 15) Nome da mãe: _____
- 16) Idade: _____ anos
- 17) Escolaridade da mãe:
 1-() 1º grau completo 2-() 1º grau incompleto 3-() 2º grau completo
 4-() 2º grau incompleto 5-() 3º grau (completo ou cursando)
- 19) Nome do pai: _____
- 20) Idade: _____ anos
- 21) Escolaridade do pai:
 1-() 1º grau completo 2-() 1º grau incompleto 3-() 2º grau completo
 4-() 2º grau incompleto 5-() 3º grau (completo ou cursando)
- 23) Moradia: 1-() própria 2-() própria em aquisição 3-() alugada
 4-() cedida 5-() outros
- 24) Quantas pessoas residem na casa? _____
- 25) Quantas pessoas tem algum tipo de renda (trabalho remunerado, pensão, aposentadoria). Listar os moradores e a renda mensal de cada um

Morador	Renda



27) Qual a cor de sua pele ou raça da criança?

1-() branca 2-() preta 3-() amarela 4-() parda 5-() indígena 6-() ignorado

28) Classificação econômica (ABEP)

	Quantidade de itens				
	0	1	2	3	4 ou +
Televisão em cores	0	1	2	3	4
Rádio	0	1	2	3	4
Banheiro	0	4	5	6	7
Automóvel	0	4	7	9	9
Empregada mensalista	0	3	4	4	4
Máquina de lavar	0	3	2	2	2
Vídeo cassete ou DVD	0	3	2	2	2
Geladeira	0	4	4	4	4
Freezer (independente ou parte da geladeira duplex)	0	2	2	2	2

II- SAÚDE GERAL

30) A saúde de seu filho (a) é:

1-() excelente 2-() muito boa 3-() boa 4-() razoável 5-() ruim

31) Seu filho(a) teve problemas de saúde nos últimos seis meses?

1-() sim 2-() não

32) Se sim, qual o tipo de problema? _____

33) Seu filho(a) está tomando algum medicamento?

1-() sim 2-() não



42) Nos últimos meses seu filho (a) tiveram dor de dente ou na gengiva?

1-() nenhuma dor 2-() pouca dor 3-() média dor 4-() muita dor

43) Quantas vezes ao dia seu filho (a) escova os dentes?

1-() uma 2-() duas 3-() três 4-() quatro 5-() cinco 6-() mais de cinco

44) Você costuma passar fio dental nos dentes do seu filho (a)?

1-() sim 2-() não

45) Quando usa?

1-() uma vez ao dia 2-() duas vezes ao dia 3-() quando se lembra

4-() quando percebe restos alimentares

46) Seu filho (a) teve algum trauma nos dentes decíduos?

1-() sim 2-() não

47) Qual a dimensão do trauma? Especificar

48) Seu filho frequenta creche/escola? () SIM

() NÃO

49) Nome da creche/ escola? _____

50) Período: 1-() Matutino 2-() Vespertino 3-() Integral

51) Desde qual idade? _____

52) Seu filho frequenta mais de uma escola? () SIM

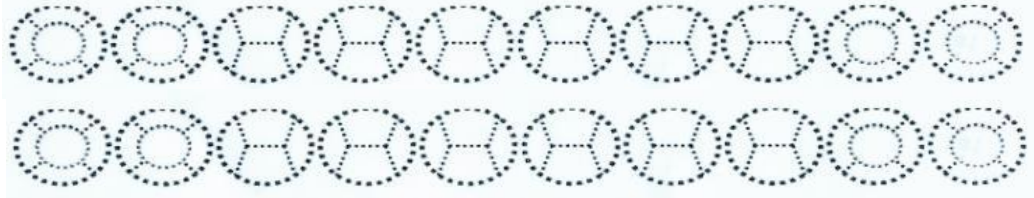
() NÃO

53) Período: 1-() Matutino 2-() Vespertino 3-() Integral

ANEXO 3

Ficha Clínica

Paciente: _____ Idade: _____ Examinador: _____ Data: ____/____/2017



1º Dígito Código ICDAS

- 0. Sem restauração
- 1. Selante parcial
- 2. Selante total
- 3. Restauração estética (Resina, ART)
- 4. Amálgama
- 5. Coroa de aço
- 6. Coroa de ouro, cerâmica
- 7. Restauração ausente ou fraturada
- 8. Restauração provisória

- 97. Ausente por cárie
- 98. Ausente por outras razões
- 99. Não – irrompido

CÁRIE ATIVA +
CÁRIE INATIVA -

2º Dígito Código ICDAS

- 0. Hígido
- 1. Alteração restrita à fissura ou vista apenas após secagem
- 2. Alteração mais larga que a fissura ou vista com dente molhado
- 3. Cavidade localizada e restrita ao esmalte
- 4. Sombra sugestiva de lesão em dentina
- 5. Cavidade nítida em dentina (menos de 50% da face envolvida)
- 6. Cavidade extensa em dentina (mais de 50% da face envolvida)

CARS

- 0. Sem alteração/ defeito marginal < 0,5mm/ margem pigmentada
- 1. Opacidade de cárie com dente seco
- 2. Opacidade de cárie com dente molhado
- 3. Opacidade de cárie com dente molhado + defeitos < 0,5mm
- 4. Opacidade de cárie com dente molhado + sombra na dentina
- 5. Cavidade na dentina com defeito marginal > 0,5mm
- 6. Dentina visível nas paredes e bases da cavidade

ANEXO 4

Normas para publicação na revista Journal of Trace Elements in Medicine and Biology

GUIDE FOR AUTHORS**INTRODUCTION**

The Journal of Trace Elements in Medicine and Biology will publish original papers, reviews, clinical notes, technical notes and short communications concerning trace elements in medicine and biology, including analytical methods, biochemistry, pathobiochemistry of metabolic processes, molecular biology, nutrition, toxicology, environmental toxicology, epidemiology, clinical applications in diagnosis, therapy, food chain and veterinary medicine. Manuscripts will be accepted in English only.

Page charges

This journal has no page charges.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our [Support Center](#).

BEFORE YOU BEGIN**Ethics in publishing**

Please see our information pages on [Ethics in publishing](#) and [Ethical guidelines for journal publication](#).

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with [The Code of Ethics of the World Medical Association](#) (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; [Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals](#). Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the [ARRIVE guidelines](#) and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, [EU Directive 2010/63/EU for animal experiments](#), or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. [More information.](#)

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service [CrossCheck](#).

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

This journal offers authors a choice in publishing their research: open access and subscription.

For subscription articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <http://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>). Permitted reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <http://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Retained author rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights. For more information on author rights for:

Subscription articles please see <http://www.elsevier.com/journal-authors/author-rights-and-responsibilities>.
Open access articles please see <http://www.elsevier.com/OAauthoragreement>.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see [more information](#) on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. [Permission](#) of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has [preprinted forms](#) for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' ([more information](#)). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of [user license](#).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. [More information](#).

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can [share your research](#) published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of [existing agreements](#) are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our [universal access programs](#).
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following [Creative Commons user licenses](#):

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 1800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our [green open access page](#) for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. [Find out more](#).

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the [English Language Editing service](#) available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the [Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals](#). Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission of Manuscripts

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts source files to a single PDF file of the article, which is used in the peer-review process. Please note that even though manuscript source files are converted to PDF files at submission for the review process, these source files are needed for further processing after acceptance. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, takes place by e-mail removing the need for a paper trail.

In exceptions, manuscripts can also be sent electronically to the **Editorial Assistant**:

Christine Weidl

E-mail: jtemb@redaktionsbuero-weidl.de

Manuscripts should be submitted with an accompanying covering letter with permission to use illustrations that may identify human subjects and to use previously published illustrations. "Original Papers" should not exceed 20 double spaced typewritten pages. Maximum length of "Short Communications" is 6 typewritten pages including tables and figures.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/jtemb>.

PREPARATION

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. [More information on types of peer review.](#)

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the [Guide to Publishing with Elsevier](#)). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Title page

The first page should contain: a concise title; the complete name(s) of the author(s); the name of the laboratory where the work was carried out; the postal address and e-mail-address to which correspondence (including proofs) should be sent; the full postal address(es) of (all) the author(s) in the language of the country of origin (in Latin transliteration); a short title (maximum 70 letters incl. spaces); a dedication (if any). • **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• **Author names and affiliations.** Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that phone numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address. Contact details must be kept up to date by the corresponding author.**

• **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when cross-referencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

This should define the problem and, if possible, the frame of existing knowledge. Please ensure that people not working in your particular field will be able to understand the intention. The word length of the introduction should be 150 to 300 words.

Material and methods

Please be as precise as possible to enable other scientists to repeat your work. It is necessary to send a description of the applied methodology of the analysis of Trace Elements, in particular, the results of the accuracy checks must be provided

Results

Only material pertinent to the subject must be included. Data must not be repeated in figures and tables.

Discussion and Conclusion

This part should interpret the results in view of the problem outlined in the introduction and of related observations by yourself or others. Implications for further studies or application may be discussed. A conclusion should be added if results and discussion are combined.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view [Example Graphical Abstracts](#) on our information site.

Authors can make use of Elsevier's [Illustration Services](#) to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Highlights are a short collection of bullet points that convey the core findings of the article. Highlights are optional and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view [example Highlights](#) on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Nomenclature

The journal will follow the nomenclature rules of IUPAC and of the IUPAB-IUB Commission on Biochemical Nomenclature, the recommendations of this commission for abbreviations and symbols, and the recommendations of the International Federation of Clinical Chemistry.

Abbreviations not recommended by IUPAC, IUB and IFCC commissions should be kept to a minimum and should be listed on a separate page.

Units

SI units should be used except in a few cases where non-SI units are more common, e.g. liter for volume (see the following table):

jtemb-symbols.gif Selected symbols for quantities and units

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Image manipulation

Whilst it is accepted that authors sometimes need to manipulate images for clarity, manipulation for purposes of deception or fraud will be seen as scientific ethical abuse and will be dealt with accordingly. For graphical images, this journal is applying the following policy: no specific feature within an image may be enhanced, obscured, moved, removed, or introduced. Adjustments of brightness, contrast, or color balance are acceptable if and as long as they do not obscure or eliminate any information present in the original. Nonlinear adjustments (e.g. changes to gamma settings) must be disclosed in the figure legend.

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed [guide on electronic artwork](#) is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

The *maximum* type area is 17.7 cm width and 21.6 cm height. Figures should be designed to fit either one-column size (8.4 cm) or two-columns size (17.7 cm) in width.

Figures must be *ready for reproduction* with clear lettering in suitable size. In addition to the printed version figures can be supplied in digital format (EPS or TIFF format, final resolution 300 dpi for halftones. 1270 dpi for black/white line drawings). For other formats (BMP, CDR, AI, FH, PDF, PS, PICT) all imported figures and type fonts need to be supplied as accompanying data.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. [Further information on the preparation of electronic artwork.](#)

Illustration services

[Elsevier's WebShop](#) offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Tables must be preceded by a concise and self-explanatory heading. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support [Citation Style Language styles](#), such as [Mendeley](#) and [Zotero](#), as well as [EndNote](#). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-trace-elements-in-medicine-and-biology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

Example: '..... as demonstrated [3,6]. Barnaby and Jones [8] obtained a different result'

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] J. van der Geer, J.A.J. Hanraads, R.A. Lupton, The art of writing a scientific article, *J. Sci. Commun.* 163 (2010) 51–59.

Reference to a book:

[2] W. Strunk Jr., E.B. White, *The Elements of Style*, fourth ed., Longman, New York, 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] G.R. Mettam, L.B. Adams, How to prepare an electronic version of your article, in: B.S. Jones, R.Z. Smith (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*, E-Publishing Inc., New York, 2009, pp. 281–304.

Reference to a website:

[4] Cancer Research UK, *Cancer statistics reports for the UK*. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/>, 2003 (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] [5] M. Oguro, S. Imahiro, S. Saito, T. Nakashizuka, Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions, *Mendeley Data*, v1, 2015. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the [List of Title Word Abbreviations](#).

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly

relate to the video file's content. . In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including [ScienceDirect](#). Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our [video instruction pages](#). Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the [research data](#) page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the [database linking page](#).

For [supported data repositories](#) a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the [Mendeley Data for journals page](#).

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the [Data Statement page](#).

AFTER ACCEPTANCE**Availability of accepted article**

This journal makes articles available online as soon as possible after acceptance. This concerns the accepted article (both in HTML and PDF format), which has not yet been copyedited, typeset or proofread. A Digital Object Identifier (DOI) is allocated, thereby making it fully citable and searchable by title, author name(s) and the full text. The article's PDF also carries a disclaimer stating that it is an unedited article. Subsequent production stages will simply replace this version.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized [Share Link](#) providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's [Webshop](#). Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the [Elsevier Support Center](#) to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also [check the status of your submitted article](#) or find out [when your accepted article will be published](#).

© Copyright 2014 Elsevier | <http://www.elsevier.com>