

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO

MARIANA ALMEIDA MELLO PROENÇA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SULFATO
FERROSO SOBRE *STREPTOCOCCUS MUTANS*:
UM ESTUDO CLÍNICO**

SÃO LUÍS

2013

MARIANA ALMEIDA MELLO PROENÇA

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SULFATO FERROSO SOBRE
STREPTOCOCCUS MUTANS: UM ESTUDO CLÍNICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Profª. Dra. Cecília Cláudia Costa Ribeiro

SÃO LUÍS

2013

Almeida Mello Proença, Mariana.

Efeito da Suplementação com Sulfato Ferroso sobre
Streptococcus mutans: Um estudo clínico / Mariana Almeida
Mello Proença. - 2013.

44 f.

Coorientador(a): Silvana Amado Libério.

Orientador(a): Cecília Cláudia Costa Ribeiro.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Odontologia/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São
Luís, 2013.

1. Anemia por deficiência de ferro. 2. Cárie
dentária. 3. Ensaio clínico. 4. Imunoglobulina A. 5.
Sulfato ferroso. I. Amado Libério, Silvana. II.
Costa Ribeiro, Cecília Cláudia. III. Título.

Mariana Almeida Mello Proença

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SULFATO FERROSO SOBRE
STREPTOCOCCUS MUTANS: UM ESTUDO CLÍNICO**

A Comissão julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Odontologia, em sessão pública realizada no dia 27/ 02/ 2013, considerou a candidata:

APROVADA

REPROVADA

Profª Drª Cecília Cláudia Costa Ribeiro
Orientadora
Universidade Federal do Maranhão

Profª Drª Luciana Salles Branco de Almeida
Examinadora Externa
Universidade CEUMA

Prof. Dr. Tarcísio Jorge Leitão de Oliveira
Examinador Interno
Universidade Federal do Maranhão

*A Deus, por ter me dado coragem para
enfrentar esse desafio; e à minha mãe,
Larissa, que me ensinou a admirar a docência.*

AGRADECIMENTOS

- A **Deus**, por ter colocado na minha vida pessoas que me ajudaram a chegar até aqui;
- Aos meus pais, **Evandro e Larissa Proença**, que não somente acompanharam toda a minha trajetória até aqui, como também tornaram possível que ela acontecesse. Pelo amor, paciência, dedicação, doação, incentivo;
- Às minhas irmãs **Macela e Marina**, melhores amigas, torcedoras e grande incentivadoras, que tantas vezes ficaram até tarde na Universidade esperando minhas atividades terminarem;
- Ao meu noivo, **Claudio Freitas**, por me acalmar nos momentos de aflição; pela paciência, compreensão e companheirismo até nos dias e horários inusitados que precisei estar no Laboratório da Universidade;
- À minha orientadora, Professora Dra. **Cecília Claudia Costa Ribeiro**, pelo exemplo de inteligência, sabedoria e humildade. Obrigada pela paciência e disponibilidade;
- Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia**, representado pelos professores Dr. **Darlon Martins Lima** e Dra. **Cláudia Maria Coêlho Alves**; obrigada pela dedicação.
- À **Cadidja do Carmo e Pierre Adriano**, por tudo o que me ensinaram, pela ajuda que me deram; pela paciência, pelas palavras que muito me ajudaram a crescer;
- Aos demais professores que, de forma direta ou indireta, contribuíram para que eu chegasse até esse momento;
- Aos colegas de turma, que me ajudaram a tornar essa jornada mais prazerosa;
- À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior**, pela bolsa de estudos;
- À **Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico**, que financiaram o laboratório de Bioquímica e Microbiologia Oral, onde esse trabalho foi executado;
- A **Ivaldo Filho**, técnico responsável pelo Laboratório de Bioquímica Oral.

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e
aprende o que ensina.”*

Cora Coralina

RESUMO

Um efeito *anti-mutans* do sulfato ferroso foi observado em modelos experimentais *in vitro*, em animais e *in situ*, mas seu efeito quando administrado via oral para tratamento de deficiência de ferro é desconhecido. O objetivo do presente experimento clínico foi avaliar o efeito do sulfato ferroso sobre *Streptococcus mutans* (SM) presentes no biofilme dentário e na saliva de crianças com cárie precoce da infância (CPI). A amostra foi constituída por 14 crianças com idade entre 36 e 71 meses diagnosticadas com anemia por deficiência de ferro (Hb < 11,0 g/dL ou ferritina sérica < 30 µg/L). Crianças portadoras de doenças sistêmicas debilitantes e/ou que tinham feito tratamento para anemia por deficiência de ferro nos últimos seis meses antes da coleta de amostra foram excluídas. A suplementação foi realizada com sulfato ferroso (4mg/kg/dia) durante 60 dias. As amostras de biofilme e saliva foram coletadas antes do início da suplementação com o sulfato ferroso (baseline) e 60 dias após o início do tratamento. Realizou-se a quantificação das unidades formadoras de colônias (UFC) de SM nas amostras de biofilme (UFC/mg) e saliva (UFC/ml), bem como análise por densidade óptica de imunoglobulina A anti-*mutans*. Para comparação dos efeitos antes e após a suplementação foi usado o teste t pareado (BIOESTAT 5.0), sendo o nível de significância fixado em 5%. A suplementação com sulfato ferroso não teve efeito sobre a redução da contagem de UFC de SM no biofilme ($p = 0,4$). Nas amostras salivares foi observado que a redução na contagem de UFC de SM ficou no limite da significância ($p = 0,053$). Entretanto, observou-se redução dos anticorpos IgA anti-*mutans* entre baseline e 60 dias ($p = 0,016$). Os resultados desse estudo sugerem que a suplementação com sulfato ferroso tenha um efeito *anti-mutans* na saliva de crianças com CPI.

Descritores: Sulfato ferroso; *Streptococcus mutans*; Imunoglobulina A; Ensaio Clínico

ABSTRACT

An *anti-mutans* effect of ferrous sulfate was observed in experimental models *in vitro*, in animals and *in situ*, but this effect is unknown when the ferrous sulfate is administered orally as a supplement for the treatment of anemia due to iron deficiency. The aim of this clinical trial was to evaluate the effect of ferrous sulfate on *Streptococcus mutans* (SM) present in dental plaque and saliva of children with early childhood caries (ECC). The sample consisted of 14 children aged 36 to 71 months diagnosed with iron deficiency anemia (Hb < 11.0 g/dl or serum ferritin < 30 µg/l). Children with debilitating systemic diseases and/or who had undergone treatment for iron deficiency anemia in the last six months prior to sample collection were excluded. The supplementation was carried out with ferrous sulphate (4mg/kg/day) for 60 days. The plaque and saliva samples were collected prior to the start of supplementation with ferrous sulfate (baseline) and 60 days after the start of treatment. Biofilm and salivary samples were collected before treatment start (baseline) and 60 days after. We carried out the quantification of colony forming units (CFU) in samples SM biofilm (CFU/mg) and saliva (CFU/ml) and optical density analysis of IgA *anti-mutans*. To compare the effects before and after supplementation was used paired t test (BioStat 5.0), with the significance level set at 5% test. Ferrous sulfate supplementation had no effect on count of MS biofilm's (p = 0.4). In the salivary samples was observed that the reduction in CFU count of SM was at the limit of significance (p = 0.053). However, there was a reduction of IgA antibodies *anti-mutans* between baseline and 60 days (p = 0.016). The results of this study suggest that supplementation with ferrous sulfate has an effect anti-mutans in saliva of children with ECC.

Descriptores: Ferrous sulfate; *Streptococcus mutans*; Immunoglobulin A; Clinical trial

SUMÁRIO

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
1 INTRODUÇÃO	11
2 CAPÍTULO I - Artigo a ser submetido à Revista <i>Brazilian Oral Research</i> (Efeito da suplementação com sulfato ferroso sobre <i>Streptococcus mutans</i> : um estudo clínico)	15
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	30
REFERÊNCIAS	31
APÊNDICE A – Resultado da análise microbiológica em biofilme	33
APÊNDICE B – Resultado da análise microbiológica em saliva	34
APÊNDICE C – Termo de consentimento livre e esclarecido	35
ANEXO A - Normas para publicação (<i>Brazilian Oral Research</i>)	36

1. INTRODUÇÃO

A anemia por deficiência de ferro representa a mais importante e severa deficiência nutricional no mundo atual e é considerada um dos principais problemas de saúde pública (WHO, 2008). É particularmente prevalente em crianças (WHO, 2001), atingindo sua máxima prevalência em populações de baixo poder aquisitivo (MANIOS *et al.*, 2007; COLE *et al.*, 2010).

Da mesma forma, a cárie em crianças se constitui num grave problema de saúde pública ao redor do mundo (BIRKELAND, HAUGEJORDEN & FEHR, 2000; STECKSÉN-BLICKS, SUNNEGÅRDH & BORSSÉN, 2004; TOMAR & REEVES, 2009; BRASIL, 2011). Quando acomete crianças menores de 71 meses resultando em lesões, cavidades ou não, é definida como Cárie Precoce da Infância (CPI) (AMERICAN ACADEMY OF PEDIATRIC DENTISTRY, 2002). Assim como a anemia por deficiência de ferro, a cárie é mais prevalente em populações com menores indicadores sociais (DINI, HOLT & BEDI, 2000; HALLETT & O'ROURKE, 2006; LIVNY, ASSALI & SGAN, 2007).

Estudos de Associação: Cárie Precoce e Deficiência de Ferro

Estudos de associação entre CPI e menores níveis de marcadores da anemia ferropriva têm sido mostrados na literatura. Neles, crianças com quadro grave de CPI (ceo > 6) apresentaram deficiência de ferro (CLARKE *et al.*, 2006; SHAOUL *et al.*, 2012). Há uma hipótese de que esse resultado esteja associado à redução do consumo de alimentos ricos em ferro ou devido à dor durante a mastigação (perda da função), ou à perda de sangue oculta, ocasionada por processo inflamatório e infecção local (SHAOUL *et al.*, 2012).

Uma outra hipótese é a de que esteja havendo um desequilíbrio na dieta, relacionado à maior ingestão de açúcar em vez de nutrientes importantes (JOYCE & GIBNEY, 2008; GIBSON & BOYD, 2009), entre eles o ferro (GIBSON & BOYD, 2009). Há evidências de que, assim como a CPI está claramente associada a uma maior ingestão de açúcares (ANDRESON *et al.*, 2009; NUNES *et al.*, 2012), a deficiência de ferro está associada a menor ingestão de micronutrientes (TYMPA-PSIRROPOULOU *et al.*, 2005; MANIOS *et al.*, 2007).

Estudos in vitro

Há décadas, estudos observam que compostos à base de ferro possivelmente apresentam um efeito local na doença cárie (LACY, 1979; TORELL, 1988). Um dos pioneiros nessa linha de pesquisa foi TORELL (1988) que observou em ratos, utilizando microscopia eletrônica de varredura, análises de fluorescência de raios-X, microscopia eletrônica de transmissão e difração de elétrons, que íons de ferro apresentavam-se precipitados na superfície do esmalte como uma camada ácido-resistente, contendo cristais amorfos de hidróxido de ferro. Além disso, o ferro pareceu ser capaz de nuclear a formação de apatita, atuando como mediador da reposição dos minerais dissolvidos devido à acidez do processo cariioso.

Outro efeito do ferro investigado na literatura foi sobre a glicosiltransferase (GTF), enzima-chave no desenvolvimento do processo cariioso. DEVULAPALLE & MOOSER (2001) sugeriram que é possível inativar essa enzima a partir de uma reação oxidativa, a qual depende da disponibilidade do íon ferro na cavidade oral.

BERLUTTI *et al.* (2004) observaram, em um estudo *in vitro*, que em uma saliva ferro-deprimida ($\text{Fe}^{3+} < 0,1 \mu\text{M}$) havia aumento do agregado de *Streptococcus mutans* (SM) e formação do biofilme, sendo que na saliva rica em ferro ($\text{Fe}^{3+} > 1 \mu\text{M}$) esse efeito foi reduzido.

Ao comparar diferentes concentrações de ferro (1, 10 e 100 ppm) sobre blocos de esmalte dentário bovino, RIBEIRO *et al.* (2012) evidenciaram um efeito dose-resposta inverso do ferro na contagem de SM. Além disso, o ferro em sua maior concentração demonstrou ser um inibidor da desmineralização tão eficaz quanto a clorexidina e o fluoreto de sódio, o que pode ter sido resultado da redução da colonização bacteriana.

Ainda em 2012, WANG *et al.* avaliaram, *in vitro*, o efeito da disponibilidade do ferro na cavidade oral sobre a composição da microbiota local. A análise de PCR combinada à eletroforese em gel de gradiente desnaturante demonstrou uma mudança drástica na composição das espécies microbianas em amostras de saliva humana. À medida que o íon ferro era retirado do meio de cultura, havia uma proliferação de bactérias hemolíticas – entre elas, SM.

Estudos em animais

Foi demonstrado, em ratos, que a atividade de bactérias cariogênicas pode interferir na disponibilidade do ferro na cavidade oral (ROSALEN, PEARSON & BOWEN, 1996; MIGUEL, BOWEN & PEARSON, 1997). Nessa linha de pesquisa, a fim de avaliar os efeitos da combinação do cobre, ferro e fluoreto co-cristalizados com a sacarose sobre o desenvolvimento da cárie, ROSALEN, PEARSON & BOWEN (1996) utilizaram um modelo experimental no qual ratos foram divididos em grupos que receberam variados padrões dietéticos relacionados aos íons em questão. Os resultados encontrados sugerem que combinações de cobre, ferro e flúor co-cristalizados com sacarose podem afetar a formação do ácido láctico, reduzindo a colonização bacteriana e, conseqüentemente, o potencial cariogênico da sacarose.

Foi observado também que grupos de ratos expostos a frequências diárias distintas de ferro a 88 ppm co-cristalizado com sacarose tiveram padrões de desenvolvimento da doença cárie diferentes. Aqueles ratos alimentados mais vezes com ferro apresentaram redução significativa da incidência de cárie dentária em comparação àqueles ratos que não tiveram a dieta suplementada pelo íon (MIGUEL, BOWEN & PEARSON, 1997).

ESGHI *et al.* (2012) analisaram histologicamente dentes de ratos submetidos uma dieta cariogênica, comparando aqueles que recebiam ferro na alimentação aos que eram ferro-deprimidos. Observaram uma menor perda mineral nos ratos alimentados por uma dieta rica no íon, sugerindo que o sulfato ferroso reduz a progressão da cárie dentária em ratos.

Estudos *in situ*

A partir de um modelo *in situ*, PECHARKI *et al.* (2005) demonstraram o efeito da sacarose contendo Fe^{++} sobre SM do biofilme dental e sobre a desmineralização do esmalte. Blocos de esmalte dental humano aplicados em dispositivos palatinos foram submetidos a diferentes tratamentos, entre os quais Fe^{++} em concentrações de 18 e 70 ppm. Foi observada uma redução das populações de SM no biofilme dental formado, além de um efeito do ferro sobre a desmineralização do esmalte dental dose-dependente.

Considerando que crianças com CPI possuem maior prevalência de anemia ferropriva, que o ferro parece ter um efeito antibacteriano sobre SM e que essa resposta foi mostrada apenas *in vitro*, em modelos animais e em ensaios *in situ*, o presente estudo foi conduzido a

fim de avaliar o efeito da suplementação via oral de sulfato ferroso sobre os SM no biofilme dental e saliva de crianças com deficiência de ferro e CPI.

2. CAPÍTULO I

Efeito da Suplementação via Oral com Sulfato Ferroso sobre *Streptococcus mutans*: Um estudo clínico

(a ser submetido à Revista *Brazilian Oral Research*)

Pesquisa Original – Cariologia

**Efeito da Suplementação com Sulfato Ferroso via Oral sobre *Streptococcus mutans*:
Um estudo clínico**

Mariana Almeida Mello Proença¹, +559887074440, maripr0enca@hotmail.com

Cadidja Dayane Sousa do Carmo¹, +559881517658, cadidjadayane@yahoo.com.br

Cecília Cláudia Costa Ribeiro², +559832729507, cecilia_ribeiro@hotmail.com

¹ Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Maranhão - São Luís, Maranhão, Brasil.

² Departamento de Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Maranhão – São Luís, Maranhão, Brasil.

Autor de Correspondência:

Cecília Cláudia Costa Ribeiro

Av dos Portugueses, s/n – Campus Universitário do Bacanga CEP 65.080-040

+559832729507

cecilia_ribeiro@hotmail.com

Resumo

O ferro pode ter um efeito antibacteriano sobre *Streptococcus mutans* (SM), mas isso só foi demonstrado em experimentos *in vitro*, *in situ* ou em animais. O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito da suplementação com sulfato ferroso sobre a contagem de SM no biofilme e na saliva de crianças com anemia por deficiência de ferro (ADF) e cárie precoce da infância (CPI). Quatorze crianças com ADF (hemoglobina < 11,0 g/dL e ferritina sérica < 30µg/L) e CPI foram suplementadas com sulfato ferroso (4 mg/kg) durante 60 dias. Biofilme e saliva foram coletados antes da suplementação e 60 dias após o início do tratamento. As amostras foram analisadas a partir da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) de SM e imunoglobulina A anti-*mutans*. A suplementação com sulfato ferroso não mostrou efeito sobre biofilme dental ($p = 0,4$) e ficou no limite da significância em relação às amostras salivares ($p = 0,053$) em relação à contagem unidades formadoras de colônias de *S. mutans*. Entretanto, houve uma redução significativa de Ig A anti-*mutans* salivar ($p = 0,0165$), confirmando a redução da exposição ao antígeno relacionado. Os resultados obtidos a partir da análise imunológica sugerem que a suplementação com sulfato ferroso tenha efeito sobre colônias bacterianas presentes na saliva de crianças com ADP e CPI.

Descritores: Anemia por deficiência de ferro; Cárie dentária; Sulfato ferroso; Imunoglobulina A; Ensaio Clínico.

INTRODUÇÃO

A anemia por deficiência de ferro (ADF) é a consequência da carência de ferro devido à síntese de hemoglobina¹. Representa a mais importante e severa deficiência nutricional no mundo atual e é considerada um dos principais problemas de saúde pública². Atingindo sua máxima prevalência em populações de baixo poder aquisitivo³, é particularmente prevalente em crianças⁴. Da mesma forma, a cárie em crianças se constitui num grave problema de saúde pública ao redor do mundo^{5,6}.

A cárie é uma doença multifatorial cujo maior fator contribuinte é a saliva. Componentes salivares como fluxo, viscosidade e capacidade-tampão desempenham o maior papel na prevenção, início e progressão da doença cárie. Esses fatores ajudam na prevenção da cárie devido ao seu efeito antibacteriano⁷. Quando acomete crianças menores de 71 meses resultando em lesões, cavitadas ou não, é definida como Cárie Precoce da Infância (CPI)⁸. Assim como a anemia por deficiência de ferro, a cárie é mais prevalente em populações com menores indicadores sociais⁹.

Estudos de associação entre CPI e menores níveis de marcadores da anemia ferropriva têm sido mostrados na literatura. Neles, crianças com quadro grave de CPI (ceo > 6) apresentaram deficiência de ferro^{10,11}.

A razão para esses achados poderia estar numa dieta desequilibrada: maior ingestão de açúcar em vez de nutrientes importantes^{12,13}, entre eles o ferro¹³. Assim como a CPI está claramente associada a uma maior ingestão de açúcares^{14,15}, a deficiência de ferro está associada à menor ingestão de micronutrientes^{3,16}.

Compostos à base de ferro tem mostrado um possível efeito local na doença cárie, agindo no fenômeno da des-remineralização^{17,18}. Ademais, estudos *in vitro* e experimentos com animais mostraram o efeito do ferro na redução de *Streptococcus mutans* (SM), que são os principais microrganismos relacionados à etiologia da doença cárie¹⁹⁻²².

Em um modelo *in situ* também foi observada uma redução das populações de SM no biofilme dental formado sobre os blocos tratados com sacarose Fe⁺⁺ a 70 ppm co-cristalizado com sacarose, sugerindo que esse íon pode reduzir o potencial cariogênico da sacarose. Nesse estudo também foi demonstrado um efeito anticárie do Fe⁺⁺ naquela dose, sendo sugerido que esse pareceu estar relacionado à redução das populações de SM no biofilme dental formado²³.

Estudos anteriores já mostraram um efeito anti-*mutans* em concentrações do íon ferro entre 70 e 151 ppm^{19,21,23} e a resposta parece ser dose dependente^{21,23}. Pressupõe-se aqui que,

durante a suplementação para tratamento da ADF, esse efeito anti-*mutans* possa ser observado, haja vista que a concentração do ferro elementar no suplemento utilizado para o tratamento da ADF é em torno de 25000 ppm.

Considerando que crianças com CPI possuem maior prevalência de anemia por deficiência de ferro, que o ferro parece ter um efeito antibacteriano dose-dependente sobre SM e que essa resposta foi mostrada apenas *in vitro*, em modelos animais e em ensaios *in situ*, o presente estudo foi conduzido para avaliar o efeito da suplementação com sulfato ferroso sobre os SM na saliva e no biofilme dental de crianças com anemia por deficiência de ferro e CPI.

METODOLOGIA

Delineamento Experimental

O presente estudo clínico foi realizado em quatro etapas: **T1** - diagnóstico de cárie precoce da infância e seleção aleatória da amostra; **T2** - coleta baseline de amostras salivares e de biofilme para análise baseline microbiológica e imunológica; **T3** - coleta e análise microbiológica e imunológica das amostras de saliva e biofilme 30 dias após o início da suplementação com sulfato ferroso; **T4** - coleta e análise microbiológica e imunológica das amostras de saliva e biofilme 60 dias após o início da suplementação com sulfato ferroso.

A análise microbiológica foi realizada imediatamente após a coleta das amostras, enquanto amostras salivares foram armazenadas para posterior análise dos níveis de Ig A anti-*mutans*.

Para o cálculo do tamanho da amostra, realizou-se um estudo piloto com cinco crianças. A partir da média (0,9) e o desvio-padrão (1,21) das diferenças da variável Ig A anti-*mutans* na saliva antes e depois da suplementação com o ferro, foi considerado o poder do teste 90% e $\alpha = 0,05$. O n alcançado foi igual a 8 voluntários que, acrescido um valor de 20% de perdas, totalizou uma amostra composta por 10 crianças.

Questões Éticas e Amostragem

O presente estudo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital

Universitário da Universidade Federal do Maranhão - UFMA (Protocolo nº 33104-019/2007). A participação de todas as crianças foi autorizada previamente pelos pais/responsáveis através da assinatura, em duas vias, do termo de consentimento livre e esclarecido.

As crianças foram recrutadas em treze creches/escolas comunitárias, selecionadas por conveniência nos diferentes distritos sanitários do município de São Luís, Maranhão, Brasil. Todas as crianças matriculadas nas creches e escolas foram convidadas a participar do estudo. Foram elegíveis crianças com no máximo 71 meses de idade e dentição decídua composta pelos quatro segundos molares. Foram excluídas crianças com doenças sistêmicas debilitantes e que tinham feito tratamento de deficiência de ferro nos últimos seis meses antes da coleta de dados. Em seguida, foi realizado um tratamento pré-experimental para atividade da doença cárie: orientação sobre higiene oral e disponibilização de creme dental fluoretado a 1100 ppm a todas as crianças.

Após um mês, realizou-se um novo exame clínico e as crianças que permanecerem em atividade de cárie foram selecionadas para a etapa seguinte de coleta de sangue para o diagnóstico da anemia.

As crianças diagnosticadas com deficiência de ferro foram encaminhadas para o pediatra e receberam o tratamento adequado para a doença. Aquelas com cárie foram encaminhadas para a clínica de Odontopediatria da Universidade Federal do Maranhão.

Diagnóstico de Cárie e Deficiência de Ferro

Um examinador calibrado ($k > 0,8$) realizou o exame clínico com auxílio de espelho bucal e sonda exploradora. Foram diagnosticadas as lesões cariosas ativas²⁴ e, em seguida, realizados os exames de sangue para posterior avaliação por médico pediatra. As crianças foram consideradas anêmicas quando os níveis de hemoglobina no sangue estavam abaixo de 11 g/dL³. O médico, em seguida, prescreveu a suplementação para aquelas crianças que precisavam do tratamento.

Dentre as crianças avaliadas, 14 foram selecionadas para o estudo por apresentarem diagnóstico de cárie precoce e de anemia.

Tratamento para Deficiência de Ferro

Após a pesagem das crianças, o pediatra prescreveu sulfato ferroso (FeSO_4) 125 mg/mL, correspondendo a 25 mg de ferro elementar, segundo informado pelo fabricante (Masferol, Natulab – Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil^{***}). Durante a semana, as crianças eram suplementadas na escola por suas professoras e, aos finais de semana, a suplementação era realizada em casa pelos responsáveis. Os responsáveis foram orientados a darem o sulfato ferroso puro para as crianças, a uma dose de 4 mg/kg/dia. As crianças não deveriam beber água ou alimentar-se por pelo menos trinta minutos após a suplementação, a fim de prolongar a permanência do Fe^{++} na cavidade oral.

Coleta de material biológico

As amostras de biofilme e saliva eram coletadas entre as 7 e 9 horas da manhã, com as crianças em jejum. A coleta foi realizada após um intervalo mínimo de 8 horas desde a última suplementação. As mães eram orientadas a não escovar os dentes dos seus filhos, nem na noite anterior à coleta, nem na manhã da coleta, a fim de se obter quantidade suficiente de biofilme para a amostragem.

Coleta de biofilme

O biofilme foi coletado de pelo menos quatro regiões diferentes da cavidade oral. Coletou-se uma amostra pré-tratamento (*baseline*) e outra 60 dias após o início da suplementação. A coleta de biofilme foi realizada por meio de curetas dentinárias estéreis, armazenando-o em *ependorfs* previamente esterilizados. Mantidas sob refrigeração, as amostras eram encaminhadas para o Laboratório de Microbiologia da Universidade Federal do Maranhão.

Coleta de saliva

A saliva estimulada foi coletada em dois tempos distintos: 0 (*baseline* – antes da suplementação com sulfato ferroso) e 60 dias após o início da suplementação. Esse procedimento foi realizado com as crianças em jejum, utilizando parafilme e tubos Falcon

^{**} Medicamento distribuído pelo Governo Federal

estéreis para armazenamento do material. Após a coleta, as amostras foram levadas sob refrigeração para o Laboratório de Microbiologia Oral da Universidade Federal do Maranhão.

Análise Microbiológica

No laboratório de microbiologia, as amostras de biofilme eram imediatamente pesadas em balança analítica para a utilização do peso como fator de correção das diferentes quantidades amostras de biofilme coletadas.

As amostras de biofilme e saliva foram submetidas à diluição decimal em série até 10^{-5} com solução salina estéril (0,9% NaCl). Alíquotas de 25 μ L de cada diluição foram semeadas, em duplicata, em placas Petri contendo meio de cultura *Ágar Mitis Salivarius* (MSA) (Difco-BD, Sparks, Maryland, EUA), suplementado com sacarose a 20%, 0,2 unidades/mL de bacitracina e telurito de potássio a 1% (MSB)²⁵ para contagem de SM. As placas foram incubadas em jarras para microaerofilia (Probac, São Paulo, SP, Brasil) durante 48h a 37°C. Após a incubação, o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mg de biofilme e UFC/ml de saliva) foi determinado por um único examinador cego por meio da técnica de contagem padrão de colônias de SM viáveis em microscópio estereoscópico. Três colônias foram selecionadas para avaliação da morfologia celular (fenotipagem) e por coloração de Gram.

Análise imunológica

Níveis de Imunoglobulina A anti-*Streptococcus mutans* salivares foram determinados por *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA), como previamente descrito²⁶. Para tal, usaram-se placas de microtitulação com 96 poços (NUNC, Roskilde, Denmark). A cada poço, foram adicionados 200 μ L de Ig A de cabra anti-Ig A humana (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) diluído na concentração de 1/1000 em solução tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6). As placas foram incubadas por 18 horas a 4°C. A seguir, os poços passaram por lavagem tripla em solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH = 7,2) com adição de 0,05% de Tween 20 (Promega, Madison, USA; PBS-T) e incubados em PBS contendo 1% de soro de albumina bovina por 1 hora a 37°C. Depois, a cada poço foi adicionado, em duplicata, 200 μ L de amostra salivar diluída na proporção de 1:10 em PBS, para que as placas fossem incubadas por 2 horas à temperatura ambiente (\pm 25°C).

As placas foram lavadas e, logo em seguida, adicionou-se 200 µL de anticorpo anti-Ig A humana conjugado a fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA), diluído a 1/500 em PBS-T a cada um dos poços. As placas foram incubadas novamente por 2 horas em temperatura ambiente e, depois, lavadas três vezes com PBS-T. A cada poço foi adicionado 200 µL de uma solução de p-nitrofenilfosfato (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA; pNPP) e as placas foram incubadas por mais 30 minutos à temperatura ambiente, observando sempre a mudança de cor característica desta reação. O bloqueio desta foi realizado com a adição de 50 µL de NaOH 1N (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, USA) a cada um dos poços. A densidade óptica foi mensurada em leitor ELISA com filtro de 405 nm de comprimento de onda.

Análise estatística

Para as análises, utilizou-se o software BIOESTAT 5.0, sendo o nível de significância fixado em 5%. Os dados de microbiologia do biofilme e da saliva foram transformados em Log 10.

O efeito do tratamento com sulfato ferroso foi observado a partir da comparação das médias da contagem de *S. mutans* (biofilme e saliva) e no Ig A anti-*mutans* salivar, antes e após 60 dias da suplementação usando-se teste t para amostras pareadas.

RESULTADOS

Não houve redução significativa sobre a contagem de UFC nas amostras de biofilme, variando de 2,734±0,59 UFC/mg (T=0) para 2,7±1,00 UFC/mg (Tabela 1).

Os resultados da contagem de UFC na saliva dos voluntários, antes e após a suplementação de ferro, estão apresentados na Tabela 1. Houve redução na contagem de SM em 50% da amostra, sendo uma redução na ordem de 100 vezes em 28,5% das crianças e de 10 vezes em 21,5% delas. Após a aplicação do teste t para amostras pareadas (Tabela 1), esse resultado apresentou-se no limite da significância ($p = 0,053$).

Os resultados da avaliação de Ig A anti-*mutans* nas 14 crianças nos tempos $t = 0$ e $t = 60$ dias estão apresentados na Tabela 1. Houve uma a redução de SM, observada através da

redução de Ig A anti-*mutans* na saliva em 57% da amostra. Essa redução foi estatisticamente significativa ($p = 0,0165$) quando aplicado o teste t para amostras pareadas.

Tabela 1: Resultados obtidos a partir da contagem das UFC em biofilme (UFC/mg), saliva (UFC/ml) e Ig A anti-*mutans* nos tempos T=0 e T=60, em crianças com CPI e anemia por deficiência de ferro (média±dp; n=14).

	T = 0	T = 60
Biofilme (UFC/mg)*	2,734±0,59 ^a	2,702±1,00 ^a
Saliva (UFC/ml)*	4,631±0,531 ^b	4,194±0,907 ^b
Ig A anti-<i>mutans</i>	1,621±1,38 ^c	0,715±0,89 ^c

Teste t para amostras pareadas; $\alpha=0,05$

Letras de tamanhos diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas.

*Valores transformados em Log 10

** Densidade Óptica

DISCUSSÃO

No biofilme oral não foi encontrada redução na quantidade de SM após o período de suplementação, apesar da concentração de ferro elementar usada na suplementação das crianças com anemia ter sido na dose de 25 mg/mL. Essa dose, correspondente a 25000 ppm, é 350 vezes maior que a dose usada no estudo *in situ* de Pecharki *et al.*²³ e 250 vezes superior à maior concentração usada por Ribeiro *et al.*²¹. Em ambos os experimentos, foi demonstrado um efeito sobre SM presente em amostras de biofilme dental. O primeiro demonstrou um efeito estatisticamente significativo anti-*mutans* a uma concentração de 70 ppm, enquanto o segundo apresentou um efeito anti-*mutans* dose-dependente em concentrações variando entre 1, 10 e 100 ppm de Fe num modelo de biofilme *in vitro*.

As diferenças encontradas entre os estudos supracitados e o presente experimento clínico, relativas às amostras de biofilme, podem ser atribuídas a condições experimentais distintas. No modelo de Pecharki *et al.*²³, a solução de sulfato ferroso era gotejada 8 vezes ao dia, durante 15 dias, diretamente sobre o biofilme formado *in situ*. No estudo de Ribeiro *et al.*²¹, blocos com biofilme de SM eram mergulhados em uma solução de Fe⁺⁺, durante 1 minuto, 2 vezes ao dia. O biofilme dental é um material biológico que está sempre sobre renovação na cavidade oral, sujeito diretamente ao efeito de lavagem desempenhado pelo

fluxo salivar, estando sob agregação e desagregação constante²⁷. No presente estudo, o ferro disponível na cavidade oral pode não ter sido observado no biofilme microbiano porque ele era diferente daquele coletado antes do início do tratamento.

A saliva estimulada corresponde a uma amostra representativa da microbiota oral, já que a mastigação remove os microrganismos do biofilme dental²⁸, justificando a escolha dessa técnica para a coleta do material biológico.

A baixa sensibilidade da técnica de contagem direta das colônias de *Streptococcus mutans* também pode ser um fator limitante dos resultados. Isso porque a quantificação das UFC pode não ser exata, uma vez que em MSB é possível que cresçam colônias de outros microrganismos²⁸. Sugere-se que a confirmação desse resultado seja feita utilizando a técnica de *Reação em Cadeia da Polimerase* (PCR).

Outra explicação para os resultados da contagem de *S. mutans* pode ser devido a diferenças no fluxo salivar, capacidade-tampão, composição da saliva ou à presença de alto nível de lactato-metabolização e base de geração de espécies bacterianas na placa dental²⁹. O crescimento de microrganismos orais é influenciado por uma variedade de fatores, tais como temperatura, pH, disponibilidade de água e nutrientes, anatomia das estruturas orais, potencial de oxi-redução, fluxo salivar e substâncias antimicrobianas³⁰. Nesse sentido, em se tratando de um estudo clínico, diversos fatores pertinentes ao hospedeiro podem ter influenciado positiva ou negativamente na ação do sulfato ferroso sobre as colônias de SM na população avaliada, resultando em uma redução aquém daquela vista em estudos *in vitro*, *in situ* e em animais manipulados e controlados laboratorialmente.

Os dados do presente estudo apontam para um efeito antimicrobiano do ferro a partir das análises salivares microbiológicas e imunológicas. Após a suplementação de ferro, houve uma redução de pelo menos uma casa decimal na contagem de SM em 50% das crianças (Tabela 2). Ainda que não se tenha mostrado diferença estatística, o valor de *p* ficou no limite da significância ($p = 0,053$). É possível que o tamanho da amostra tenha sido fator limitante para observação desse efeito sobre a contagem de UFC. Todavia, os resultados da análise imunológica da saliva mostraram uma redução significativa dos anticorpos Ig A anti-*mutans* 60 dias após o início da suplementação. Os achados sugerem uma redução à exposição ao antígeno do SM, dando suporte aos dados observados na análise microbiológica de redução da quantidade de UFC na saliva.

A saliva é fonte de diversos fatores de defesa, específicos e não-específicos, sendo a IgA o principal fator de defesa específico da saliva³¹. A Ig A presente na saliva humana é capaz de inibir a aderência de *Streptococcus* à mucosa oral³⁰, como também a ligação dessas

bactérias aos dentes³². Estudos anteriores observaram que baixos níveis de anticorpos Ig A estavam associados à alta atividade ou susceptibilidade à cárie^{33,34}. Há ainda estudos na literatura que observaram um aumento do nível de Ig A anti-*mutans* após o tratamento da doença cárie^{35,36}.

Recentemente, pesquisadores compararam a quantidade de Ig A anti-*mutans* em amostras salivares de crianças cárie-ativas (CPOD \geq 3) e crianças livres de cárie (CPOD=0), sendo observados maiores índices de Ig A anti-*mutans* a saliva das crianças cárie-ativas. Esse resultado foi atribuído a um mecanismo de defesa relacionado ao maior número de SM na saliva das crianças cárie-ativas³⁷. A redução dos níveis de Ig A anti-*mutans* observada no presente estudo concorda com o resultado anteriormente encontrado, sugerindo que a redução de imunoglobulina A anti-*mutans* seja ocasionada pela redução de SM – possivelmente devido à suplementação do sulfato ferroso nessas crianças.

A concentração de ferro salivar varia de 0,1 a 1,0 μ M dependendo do padrão dietético do indivíduo³⁸. Dados de um estudo piloto (n = 3) mostraram que a concentração salivar após a suplementação de sulfato ferroso (25 mg/mL) apresentou-se em 300, 100 e 10 ppm Fe, nos tempos de 5 minutos, 30 minutos e 24 horas, respectivamente. Esses dados demonstram que o ferro possui uma alta substantividade, permanecendo em altas concentrações horas depois de aplicado na cavidade oral. O efeito anti-*mutans* aqui observado pode ser atribuído a essa alta permanência do ferro na saliva.

CONCLUSÃO

Os achados sugerem um efeito anti-*mutans* da suplementação de ferro na saliva das crianças com anemia por deficiência de ferro e CPI. Todavia, mais estudos precisam ser conduzidos para avaliação da durabilidade desses efeitos antimicrobianos e se esses achados se refletirão na atividade anti-cariogênica em longo prazo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos às instituições de fomento CNPq (MCT/CNPq 15/2007) e FAPEMA.

REFERÊNCIAS

1. Borgna-Pignatti C, Marsella M. Iron deficiency in infancy and childhood. *Pediatr Ann* 2008; 37: 329–37.
2. Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005: WHO global database on anaemia. Geneva, World Health Organization, 2008.
3. Manios Y, Moschonis G, Kolotourou M, Keskin Y, Sur H, Kocaoglu B, Hayran O. Iron deficiency prevalence and dietary patterns by school district in Istanbul. *J Hum Nutr Diet*. 2007 Dec; 20(6): 549-57.
4. WHO. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. 2001. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_NHD_01.3.pdf
5. Stecksén-Blicks C, Sunnegårdh K, Borssén E. Caries experience and background factors in 4-years-old children: time trends 1967-2002. *Caries Res* 2004 Mar-Apr; 38(2): 149-55.
6. Tomar SL, Reeves AF. Changes in the oral health of US children and adolescents and dental public health infrastructure since the release of the Healthy People 2010 Objectives. *Acad Pediatr*. 2009 Nov-Dec; 9(6): 388-95.
7. Whelton H. The anatomy and physiology of salivary glands. In: Edgar WM, O'Mullane DM, editors. *Saliva and oral health*, 2nd Ed. London: British Dental Association; 1996. p. 2.
8. American Academy of Pediatric Dentistry. Guidelines. *American Academy of Pediatric Dentistry. Pediatr. Dent*. 2002; 24(7 Suppl): 43-122.
9. Hallett KB, O'Rourke PK. Pattern and severity of early childhood caries. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2006 Feb; 34(1): 25-35.
10. Clarke M, Locker D, Berall G, Pencharz P, Kenny DJ, Judd P. Malnourishment in a population of young children with severe early childhood caries. *Pediatr Dent*. 2006 May-Jun; 28 (3): 254-9.
11. Shaoul R, Gaitini L, Kharouba J, Darawshi G, Maor I, Somri M. The association of childhood iron deficiency anaemia with severe dental caries. *Acta Paediatr*. 2012 Feb; 101(2): 76-9.
12. Joyce T, Gibney MJ. The impact of added sugar consumption on overall dietary quality in Irish children and teenagers. *J Hum Nutr Diet*. 2008 Oct; 21(5): 438-50.
13. Gibson S, Boyd A. Associations between added sugars and micronutrient intakes and status: further analysis of data from National Diet and Nutrition Survey of Young People aged 4 to 18 years. *Br J Nutr*. 2009 Jan. 101(1): 100-7.
14. Anderson CA, Curzon ME, Van Loveren C, Tatsi C, Duggal MS. Sucrose and dental caries: a review of the evidence. *Obes Rev*. 2009 Mar; 10(1): 41-54.
15. Nunes AM, Alves CM, Borba de Araújo F, Ortiz TM, Ribeiro MR, Silva AA, Ribeiro CC. Association between prolonged breast-feeding and early childhood caries: a hierarchical approach. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2012 Dec; 40(6): 542-9.
16. Tympa-Psirropoulou E, Vagenas C, Psirropoulos D, Dafni O, Matala A, Skopouli F. Nutritional risk factors for iron-deficiency anaemia in children 12-24 months old in the area of Thessalia in Greece. *Int J Food Sci Nutr*. 2005 Feb; 56(1): 1-12.
17. Lacy AM. The effect of iron compounds on dental caries: a review. *Clin Prev Dent*. 1979 May-Jun; 1(3): 6-7.
18. Torell P. Iron and dental caries. *Swed Dent J*. 1988; 12(3): 113-24.
19. Devulapalle KS, Mooser G. Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries. *J Dent Res*. 2001 Feb; 80(2): 466-9.

20. Berlutti F, Ajello M, Bosso P, Morea C, Petrucca A, Antonini G, Valenti P. Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Biometals*. 2004 Jun; 17(3): 271-8.
21. Ribeiro CC, Ccahuana-Vásquez RA, Carmo CD, Alves CM, Leitão TL, Vidotti LR, Cury JA. The effect of iron on *Streptococcus mutans* biofilm and on enamel demineralization. *Braz Oral Res*. 2012 Jul-Aug; 26(4): 300-5.
22. Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH. Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in deslivated rats. *Arch Oral Biol*. 1996 Nov; 41(11): 1003-10.
23. Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen WH. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilme and enamel demineralization in situ. *Caries Res*. 2005 Mar-Apr; 39(2): 123-9.
24. Nyvad B, Mchiulskiene V, Baelum V. Construct and predictive validity of clinical caries diagnostic criteria assessing lesion activity. *J Dent Res*. 2003 Feb; 82(2): 117-22.
25. Gold OG, Jordan HV, Van Houte J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol*. 1973 Nov; 18(11): 1357-67.
26. Guerra RN, Silva VM, Aragão-França LS, Oliveira PR, Feitosa R, Nascimento FR, *et al.*. Babassu aqueous extract (BAE) as an adjuvant for T helper (Th)1-dependent immune responses in mice of a Th2 immune response-prone strain. *BMC Immunol*. 2011 Jan 29;12:13.
27. Lenander-Lumiraki M, Loimaranta V. Saliva and dental caries. *Adv Dent Res*. 2000 Dec; 14: 40-7.
28. Ericson D, Bratthall D. Simplified method to estimate salivary buffer capacity. *Scand J Dent Res*. 1989 Oct; 97(5): 405-7.
29. Marsh, P., and M. Martin. 1992. *Oral microbiology*, 3rd ed. Chapman & Hall, Ltd., London, United Kingdom.
30. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998 Mar;62(1):71-109.
31. Vudhichamnonng, K., D. M. Walker, and H. C. Ryley. 1982. The effect of secretory immunoglobulin A on the in vitro adherence of the yeast *Candida albicans* to human oral epithelial cells. *Arch. Oral Biol*. 27:617–621.
32. Kilian, M., J. Reinholdt, B. Nyvad, E. V. G. Frandsen, and L. Mikkelsen. 1989. IgA1 proteases of oral streptococci: ecological aspects. *Immunol. Invest*. 18:161–170.
33. Tenovuo, J., H. Jentsch, T. Soukka, and L. Karhuvaara. 1992. Antimicrobial factors of saliva in relation to dental caries and salivary levels of mutans streptococci. *J. Biol. Buccale* 20:85–90.
34. Bolton, R. W., and G. L. Hlava. 1982. Evaluation of salivary IgA antibodies to cariogenic microorganisms in children. Correlation with dental caries activity. *J. Dent. Res*. 61:1225–1228.
35. Challacombe, S. J. 1980. Serum and salivary antibodies to *Streptococcus mutans* in relation to the development and treatment of human dental caries. *Arch. Oral Biol*. 25:495–502.
36. Everhart, D. L., P. O. Bamgboye, and M. S. Schwartz. 1982. Salivary anti-*Streptococcus mutans* changes over a six-month period in children ages two–five years. *J. Dent. Res*. 61:386–390.
37. Ranadheer E, Nayak UA, Reddy NV, Rao VA. The relationship between salivary IgA levels and dental caries in children. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2011 Apr-Jun;29(2):106-12.

38. Spatafora G, Moore M, Landgren S, Stonehouse E, Michalek S. Expression of *Streptococcus mutans* fimA is iron-responsive and regulated by a DtxR homologue. *Microbiology*. 2001; 147(6): 1599-610.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, a associação entre infecções orais e doenças sistêmicas tem sido alvo de muitos estudos científicos. Apesar de ainda não estar bem estabelecida na literatura, evidências apontam para uma associação entre CPI e deficiência de ferro (SHAOUL *et al.*, 2012). Além de uma interação sistêmica, a literatura apresenta estudos que reconhecem um efeito anti-*mutans* de compostos a base de ferro (ROSALEN, PEARSON & BOWEN, 1996; MIGUEL, BOWEN & PEARSON, 1997; DEVULAPALLE & MOOSER, 2001; BERLUTTI *et al.*, 2004; PECHARKI *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2012), sendo que o metal também é relacionado à redução da desmineralização do esmalte (TORELL, 1988; PECHARKI *et al.*, 2005; RIBEIRO *et al.*, 2012).

É importante ressaltar que esses estudos foram realizados em animais, *in vitro* ou *in situ*, determinando condições ideais de controle do experimento. Contudo, essas condições não são observadas em estudos clínicos, onde há, por exemplo, a atividade de limpeza exercida pelo fluxo salivar (ERICSON & BRATTHALL, 1989).

Nossos resultados demonstraram efeito do ferro sobre a redução na contagem de unidades formadoras de colônias de *S. mutans*, confirmado pela análise imunológica do anticorpo específico para esse microrganismo. Nesse sentido, pode-se esperar que, em condições ideais, esses efeitos fossem estendidos ao biofilme dental.

REFERÊNCIAS

- American Academy of Pediatric Dentistry. Guidelines. American Academy of Pediatric Dentistry. **Pediatric Dentistry**. 2002; 24(7 Suppl): 43-122.
- Anderson CA, Curzon ME, Van Loveren C, Tatsi C, Duggal MS. Sucrose and dental caries: a review of the evidence. **Obesity Reviews**. 2009 Mar; 10(1): 41-54.
- Berlutti F, Ajello M, Bosso P, Morea C, Petrucca A, Antonini G, Valenti P. Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **Biometals**. 2004 Jun; 17(3): 271-8.
- Birkeland JM, Haugejorden O, von der Fehr FR. Some factors associated with the caries decline among Norwegian children and adolescents: age-specific and cohort analyses. **Caries Research**. 2000 Mar-Apr; 34(2): 109-16.
- Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Coordenação Geral de Saúde Bucal – Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 92 p.**
- Clarke M, Locker D, Berall G, Pencharz P, Kenny DJ, Judd P. Malnourishment in a population of young children with severe early childhood caries. **Pediatric Dentistry**. 2006 May-Jun; 28 (3): 254-9.
- Cole CR, Grant FK, Swaby-Ellis ED, Smith JL, Jacques A, Northrop-Clewes CA, Caldwell KL, Pfeiffer CM, Ziegler TR. Zinc and iron deficiency and their interrelations on low-income African American and Hispanic children in Atlanta. **American Journal of Clinical Nutrition**. 2010 Apr; 91(4): 1027-34.
- Devulapalle KS, Mooser G. Glucosyltransferase inactivation reduces dental caries. **Journal of Dental Research**. 2001 Feb; 80(2): 466-9.
- Dini EL, Holt RD, Bedi R. Caries and its association with infant feeding and oral health-related behaviours in 3-4-year-old Brazilian children. **Community of Dental Oral Epidemiology**. 2000 Aug; 28(4): 241-8.
- Ericson D, Bratthall D. Simplified method to estimate salivary buffer capacity. **Scandinavian Journal of Dental Research**. 1989 Oct; 97(5): 405-7.
- Eshghi A, Kowasari-Isfahan R, Rezaiefar M, Razavi M, Zeighami S. Effect of iron containing supplements on rats' dental caries progression. **Journal of Dentistry (Tehran)**. 2012 Winter; 9(1):14-9.
- Gibson S, Boyd A. Associations between added sugars and micronutrient intakes and status: further analysis of data from National Diet and Nutrition Survey of Young People aged 4 to 18 years. **British Journal of Nutrition**. 2009 Jan. 101(1): 100-7.
- Hallett KB, O'Rourke PK. Pattern and severity of early childhood caries. **Community Dental Oral Epidemiology**. 2006 Feb; 34(1): 25-35.
- Joyce T, Gibney MJ. The impact of added sugar consumption on overall dietary quality in Irish children and teenagers. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**. 2008 Oct; 21(5): 438-50.
- Lacy AM. The effect of iron compounds on dental caries: a review. **Clinical Preventive Dentistry**. 1979 May-Jun; 1(3): 6-7.
- Livny A, Assali R, Sgan Cohen HD. Early Childhood Caries among a Bedouin community residing in the eastern outskirts of Jerusalem. **BMC Public Health**. 2007 Jul 24; 7: 167

Manios Y, Moschonis G, Kolotourou M, Keskin Y, Sur H, Kocaoglu B, Hayran O. Iron deficiency prevalence and dietary patterns by school district in Istanbul. **Journal of Human Nutrition and Dietetics**. 2007 Dec; 20(6): 549-57.

Miguel JC, Bowen WH, Pearson SK. Effects of frequency of exposure to iron-sucrose on the incidence of dental caries in desalivated rats. **Caries Research**. 1997;31(3):238-43.

Nunes AM, Alves CM, Borba de Araújo F, Ortiz TM, Ribeiro MR, Silva AA, Ribeiro CC. Association between prolonged breast-feeding and early childhood caries: a hierarchical approach. **Community Dentistry of Oral Epidemiology**. 2012 Dec; 40(6): 542-9.

Pecharki GD, Cury JA, Paes Leme AF, Tabchoury CP, Del Bel Cury AA, Rosalen PL, Bowen WH. Effect of sucrose containing iron (II) on dental biofilme and enamel demineralization in situ. **Caries Research**. 2005 Mar-Apr; 39(2): 123-9.

Ribeiro CC, Ccahuana-Vásquez RA, Carmo CD, Alves CM, Leitão TL, Vidotti LR, Cury JA. The effect of iron on *Streptococcus mutans* biofilm and on enamel demineralization. **Brazilian Oral Research**. 2012 Jul-Aug; 26(4): 300-5.

Rosalen PL, Pearson SK, Bowen WH. Effects of copper, iron and fluoride co-crystallized with sugar on caries development and acid formation in deslivated rats. **Archives of Oral Biology**. 1996 Nov; 41(11): 1003-10.

Shaoul R, Gaitini L, Kharouba J, Darawshi G, Maor I, Somri M. The association of childhood iron deficiency anaemia with severe dental caries. **Acta Paediatric**. 2012 Feb; 101(2): 76-9.

Stecksén-Blicks C, Sunnegårdh K, Borssén E. Caries experience and background factors in 4-years-old children: time trends 1967-2002. **Caries Research** 2004 Mar-Apr; 38(2): 149-55.

Tomar SL, Reeves AF. Changes in the oral health of US children and adolescents and dental public health infrastructure since the release of the Healthy People 2010 Objectives. **Academy of Pediatrics**. 2009 Nov-Dec; 9(6): 388-95.

Torell P. Iron and dental caries. **Swedish Dental Journal**. 1988; 12(3): 113-24.

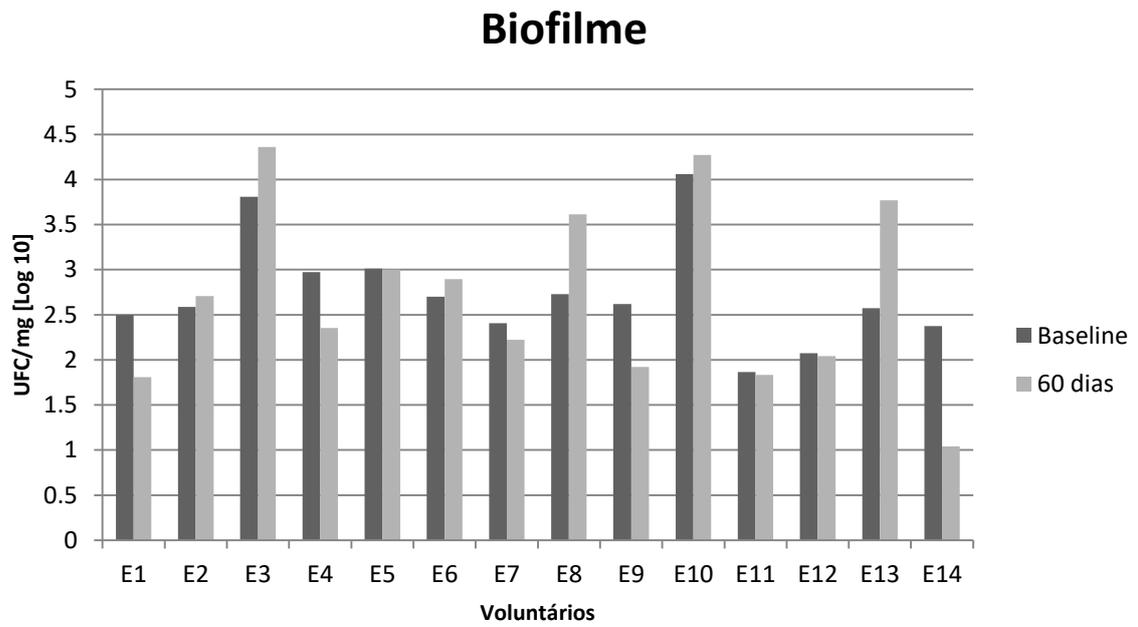
Tympa-Psirropoulou E, Vagenas C, Psirropoulos D, Dafni O, Matala A, Skopouli F. Nutritional risk factors for iron-deficiency anaemia in children 12-24 months old in the area of Thessalia in Greece. **International Journal of Food Science and Nutrition**. 2005 Feb; 56(1): 1-12.

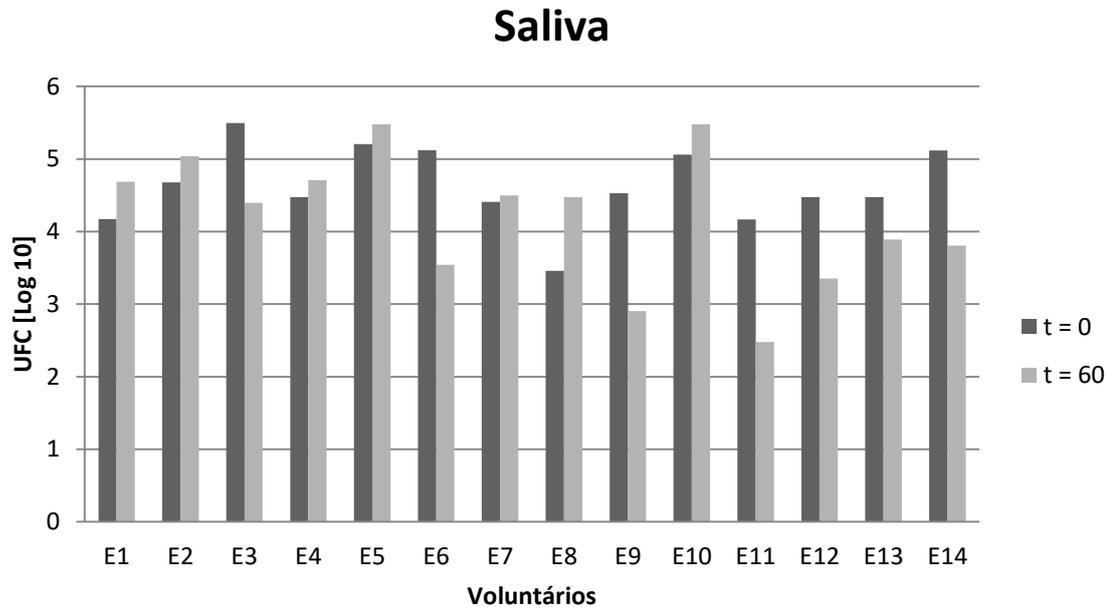
Wang R, Kaplan A, Guo L, Shi W, Zhou X, Lux R, He X. The influence of iron availability on human salivary microbial community composition. **Microbial Ecology**. 2012 Jul; 64(1): 152-61.

Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005: WHO global database on anaemia. Geneva, **World Health Organization**, 2008. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241596657_eng.pdf?ua=1.

WHO. Iron deficiency anaemia: assessment, prevention and control. 2001. Available from http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/WHO_NHD_01.3.pdf

APÊNDICE A – RESULTADOS DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM BIOFILME



APÊNDICE B – RESULTADOS DA ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM SALIVA

APÊNDICE C– TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Projeto: Efeito da suplementação de ferro na saliva e no biofilme oral em crianças com cárie precoce da infância

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este documento tem o objetivo de obter seu consentimento, para participação de seu (sua) filho(a) no projeto “**Efeito da suplementação de ferro no biofilme oral em crianças com cárie precoce da infância.**”, desenvolvido no Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Maranhão sob responsabilidade da Profª. Drª Cecília Cláudia Costa Ribeiro e da mestrandia Mariana Almeida Mello Proença.

Após o diagnóstico de cárie e a realização de exames de sangue para avaliar se seu filho tem deficiência de ferro, serão feitos novos exames na boca da criança para coleta de biofilme oral e de saliva. São procedimentos simples, rápidos, sem dor e sem qualquer prejuízo ou dano para seu filho. Caso haja necessidade, a criança poderá ainda ser encaminhada para Clínica de Odontopediatria da Universidade Federal do Maranhão para tratamento odontológico.

Os resultados serão usados para elaboração de trabalho científico, apresentação em congressos e publicação em revistas e periódicos odontológicos, além de divulgação nos meios de comunicação em massa, sendo que a identidade da criança (nome ou fotografia) **será mantida em sigilo.**

A criança poderá abandonar a pesquisa, sem perda dos benefícios/direitos que esteja recebendo na UFMA. Não haverá qualquer compensação financeira para participar deste estudo; as despesas referentes aos exames, ao tratamento com sulfato ferroso e transporte serão de responsabilidade dos pesquisadores envolvidos. A criança terá como benefício o tratamento para as doenças cárie e deficiência de ferro, além de orientações sobre higiene bucal.

Após ter todas as dúvidas esclarecidas pelo pesquisador responsável você deve assinar no campo abaixo e, a seguir receberá uma cópia deste documento.

Filho (a): _____ Telefone: _____

Endereço: _____ Data: __/__/__

Assinatura do Responsável

Mariana Almeida Mello Proença
Rua Marques de Tamandare, 22 – Alto do Calhau
Fone: 87074440

Pesquisador Responsável:
Cecília Cláudia Costa Ribeiro
Av dos Portugueses, s/n – Campus Universitário do Bacanga
Fone: 33018577

Comitê de Ética em Pesquisa- Sala07, Bloco C, CEB Velho, Campus Universitário do

Bacanga da UFMA, Telefone: 3301-8708

COORDENADOR: Profª Drª Elba Gomide Mochel

ANEXO A – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO

Mission, scope, and submission policy

Brazilian Oral Research - BOR (online version ISSN 1807-3107) is the official publication of the *Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica* - SBPqO (the Brazilian division of the International Association for Dental Research - IADR). The journal has an Impact Factor™ of 0.937 (Institute for Scientific Information - ISI), is peer-reviewed (double-blind system), and its mission is to disseminate and promote an information interchange concerning the several fields in dentistry research and/or related areas with gold open access.

BOR invites the submission of original and review manuscripts and papers in the following typology: Original Research (complete manuscript or Short Communication), Critical Review of Literature, Systematic Review (and Meta-Analysis) and Letters to the Editor. All submissions must be exclusive to.

Manuscripts and all corresponding documentation should be exclusively submitted through ScholarOne Manuscripts™ via the online submission link (<http://mc04.manuscriptcentral.com/bor-scielo>).

The evaluation process of manuscript's scientific content will only be initiated after meeting of all the requirements described in the present Instructions for Authors. Any manuscript that does not meet these requirements will be returned to the corresponding author for adaptations.

Important: Once having been accepted on their scientific merit, all manuscripts will be submitted for grammar and style revision as per the English language. Contact BOR by bor@sbpqo.org.br to get information about the recommended translation companies. The authors should forward the revised text with the enclosed revision certificate provided by the chosen editing company. **Linguistic revisions performed by companies that do not provide the mentioned certificate will not be accepted.** As an exception, this rule does not apply when one of the authors is a native English speaker.

Presentation of the manuscript

The manuscript text should be written in English and provided in a digital file compatible with "Microsoft Word" (in DOC, DOCX, or RTF format).

All figures (including those in layouts/combinations) must be provided in individual and separate files, according to recommendations described under the specific topic.

Photographs, micrographs, and radiographs should be provided in TIFF format, according to the recommendations described under the specific

topic.

Charts, drawings, layouts, and other vector illustrations must be provided in a PDF format individually in separate files, according to the recommendations described under the specific topic.

Video files may be submitted as per the specifications, including the author's anonymity (for purposes of evaluation) and respect for the patient's rights.

Important: ScholarOne™ allows upload of a set of files up to 10 MB. In case the video file exceeds this size, it is possible to leave information about the link to access the video. The use of patients' initials, names, and/or registry numbers is prohibited in the reproduction of clinical documentation. The identification of patients is prohibited. An informed consent statement, signed by the patient, concerning the use of his/her image should be provided by the author(s) when requested by **BOR**. The Copyright legislation in force must be respected and the source cited when the manuscript reproduces any previously published material (including texts, charts, tables, figures, or any other materials).

Title page (compulsory data)

- This must indicate the specialty* or research field focused on in the manuscript.

*Anatomy; Basic Implantodontology and Biomaterials; Behavioral Sciences; Biochemistry; Cariology; Community Dental Health; Craniofacial Biology; Dental Materials; Dentistry; Endodontic Therapy; Forensic Dentistry; Geriatric Dentistry; Imaginology; Immunology; Implantodontology – Prosthetics; Implantodontology – Surgical; Infection Control; Microbiology; Mouth and Jaw Surgery; Occlusion; Oral Pathology; Orthodontics; Orthopedics; Pediatric Dentistry; Periodontics; Pharmacology; Physiology; Prosthesis; Pulp Biology; Social/Community Dentistry; Stomatology; Temporomandibular Joint Dysfunction.

- Informative and concise title, limited to a maximum of 110 characters, including spaces.
- Names of all authors written out in full, including respective telephone numbers and email addresses for correspondence. We recommend that authors collate the names present in the Cover Letter with the profile created in ScholarOne™, to avoid discrepancies.
- The participation of each author must be justified on a separate page, which should meet the authorship and co-authorship criteria adopted by the International Committee of Medical Journal Editors, available at <http://www.icmje.org/recommendations/browse/roles-and-responsibilities/defining-the-role-of-authors-and-contributors.html>
- Data of institutional/professional affiliation of all authors, including university (or other institution), college/program, department, city,
-
- state, and country, presented according to internal citation norms established by each author's institution. Verify that such affiliations are correctly entered in ScholarOne™.

Abstract: This should be presented as a single structured paragraph (but with no subdivisions into sections) containing the objective of the

work, methodology, results, and conclusions. In the System if applicable, use the Special characters tool for special characters.

Keywords: Ranging from 3 (three) to 5 (five) main descriptors should be provided, chosen from the keywords registered at <http://decs.bvs.br/> or <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html> (no synonyms will be accepted).

Main Text

Introduction: This should present the relevance of the study, and its connection with other published works in the same line of research or field, identifying its limitations and possible biases. The objective of the study should be concisely presented at the end of this section.

Methodology: All the features of the material pertinent to the research subject should be provided (*e.g.*, tissue samples or research subjects). The experimental, analytical, and statistical methods should be described in a concise manner, although in detail, sufficient to allow others to recreate the work. Data from manufacturers or suppliers of products, equipment, or software must be explicit when first mentioned in this section, as follows: manufacturer's name, city, and country. The computer programs and statistical methods must also be specified. Unless the objective of the work is to compare products or specific systems, the trade names of techniques, as well as products, or scientific and clinical equipment should only be cited in the "Methodology" and "Acknowledgments" sections, according to each case. Generic names should be used in the remainder of the manuscript, including the title. Manuscripts containing radiographs, microradiographs, or SEM images, the following information must be included: radiation source, filters, and kV levels used. Manuscripts reporting studies on humans should include proof that the research was ethically conducted according to the Helsinki Declaration (*World Medical Association*, <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). The approval protocol number issued by an Institutional Ethics Committee must be cited. Observational studies should follow the STROBE guidelines (<http://stroke-statement.org/>), and the check list must be submitted. Clinical Trials must be reported according to the CONSORT Statement standard protocol (<http://www.consort-statement.org/>); systematic reviews and meta-analysis must follow the PRISMA (<http://www.prisma-statement.org/>), or Cochrane protocol (<http://www.cochrane.org/>).

Clinical Trials

Clinical Trials according to the CONSORT guidelines, available at www.consort-statement.org. The clinical trial registration number and the research registration name will be published along with the article.

Manuscripts reporting studies performed on animals must also include proof that the research was conducted in an ethical manner, and the approval protocol number issued by an Institutional Ethics Committee should be cited. In case the research contains a gene registration, before submission, the new gene sequences must be included in a public database, and the access number should be provided to BOR. The authors may use the following databases:

- GenBank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/submit>
- EMBL: <http://www.ebi.ac.uk/embl/Submission/index.html>
- DDBJ: <http://www.ddbj.nig.ac.jp>

Manuscript submissions including microarray data must include the information recommended by the MIAME guidelines (Minimum Information

About a Microarray Experiment: <http://www.mged.org/index.html>) and/or itemize how the experimental details were submitted to a publicly available database, such as:

- ArrayExpress: <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>
- GEO: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

Results: These should be presented in the same order as the experiment was performed, as described under the "Methodology" section. The most significant results should be described. Text, tables, and figures should not be repetitive. Statistically relevant results should be presented with enclosed corresponding p values.

Tables: These must be numbered and cited consecutively in the main text, in Arabic numerals. Tables must be submitted separately from the text in DOC, DOCX, or RTF format.

Discussion: This must discuss the study results in relation to the work hypothesis and relevant literature. It should describe the similarities and differences of the study in relation to similar studies found in literature, and provide explanations for the possible differences found. It must also identify the study's limitations and make suggestions for future research.

Conclusions: These must be presented in a concise manner and be strictly based on the results obtained in the research. Detailing of results, including numerical values, etc., must not be repeated.

Acknowledgments: Contributions by colleagues (technical assistance, critical comments, etc.) must be given, and any bond between authors and companies must be revealed. This section must describe the research funding source(s), including the corresponding process numbers.

Plagiarism

BOR employs a plagiarism detection system. When you send your manuscript to the journal it may be analyzed-not merely for the repetition of names/affiliations, but rather the sentences or texts used.

References: Only publications from peer-reviewed journals will be accepted as references. Unfinished manuscripts, dissertations, theses, or abstracts presented in congresses will not be accepted as references. References to books should be avoided.

Reference citations must be identified in the text with superscript Arabic numerals. The complete reference list must be presented after the "Acknowledgments" section, and the references must be numbered and presented in Vancouver Style in compliance with the guidelines provided by the International Committee of Medical Journal Editors, as presented in Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7256/>). The journal titles should be abbreviated according to the List of Journals Indexed in Index Medicus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). The authors shall bear full responsibility for the accuracy of their references.

Spelling of scientific terms: When first mentioned in the main text, scientific names (binomials of microbiological, zoological, and botanical nomenclature) must be written out in full, as well as the names of chemical compounds and elements.

Units of measurement: These must be presented according to the International System of Units (<http://www.bipm.org> or <http://www.inmetro.gov.br/consumidor/unidLegaisMed.asp>).

Footnotes on the main text: These must be indicated by asterisks and restricted to the bare minimum.

Figures: Photographs, microradiographs, and radiographs must be at least 10 cm wide, have at least 500 dpi of resolution, and be provided in TIFF format. Charts, drawings, layouts, and other vector illustrations must be provided in a PDF format. All the figures must be submitted individually in separate files (not inserted into the text file). Figures must be numbered and consecutively cited in the main text in Arabic numerals. Figure legends should be inserted together at the end of the text, after the references.

Original Research

Limited to 30,000 characters including spaces (considering the introduction, methodology, results, discussion, conclusion, acknowledgments, tables, references, and figure legends). A maximum of 8 (eight) figures and 40 (forty) references will be accepted. The abstract can contain a maximum of 250 words.

Layout - Text Files

Characteristics and layouts of types of manuscripts

- Title Page
- Main text (30,000 characters including spaces)
- Abstract: a maximum of 250 words
- Keywords: 3 (three)-5 (five) main descriptors
- Introduction
- Methodology
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgments
- Tables
- References: maximum of 40 references
- Figure legends

Layout - Graphic Files

- Figures: a maximum of 8 (eight) figures, as described above.

Short Communication

Limited to 10,000 characters including spaces (considering the introduction, methodology, results, discussion, conclusion, acknowledgments, tables, references, and figure legends). A maximum of 2 (two) figures and 12 (twelve) references will be allowed. The abstract can contain a maximum of 100 words.

Layout - Text Files

- Title page
- Main text (10,000 characters including spaces)

- Abstract: a maximum of 100 words
- Descriptors: 3 (three)-5 (five) main descriptors
- Introduction
- Methodology
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgments
- Tables
- References: a maximum of 12 references
- Figure legends

Layout- Graphic Files

- Figures: a maximum of 2 (two) figures, as described above.

Critical Review of Literature

The submission of this type of manuscript will be performed only by invitation of the BOR Publishing Commission. All manuscripts will be submitted to peer-review. This type of manuscript must have a descriptive and discursive content, focusing on a comprehensive presentation and discussion of important and innovative scientific issues, with a limit of 30,000 characters including spaces (considering the introduction, methodology, results, discussion, conclusion, acknowledgments, tables, references, and figure legends). It must include a clear presentation of the scientific object, logical argumentation, a methodological and theoretical critical analysis of the studies, and a summarized conclusion. A maximum of 6 (six) figures and 50 (fifty) references is permitted. The abstract must contain a maximum of 250 words.

Layout- Text Files

- Title page
- Main text (30,000 characters including spaces)
- Abstract: a maximum of 250 words
- Keywords: 3 (three)-5 (five) main descriptors
- Introduction
- Methodology
- Results
- Discussion
- Conclusion
- Acknowledgments
- Tables
- References: maximum of 50 references
- Figure legends

Layout - Graphic Files

- Figures: a maximum of 6 (six) figures, as described above.

Systematic Review and Meta-Analysis

While summarizing the results of original studies, quantitative or qualitative, this type of manuscript should answer a specific question, with a limit of 30,000 characters, including spaces, and follow the Cochrane format and style (www.cochrane.org). The manuscript must report, in detail, the process of the search and retrieval of the original works, the selection criteria of the studies included in the review, and provide an abstract of the results obtained in the reviewed studies (with or without a meta-analysis approach). There is no limit to the number of references or figures. Tables and figures, if included, must present the features of the reviewed studies, the compared interventions, and the corresponding results, as well as those studies excluded from the review. Other tables and figures relevant to the review must be presented as previously described. The abstract can contain a maximum of 250 words.

Layout - Text Files

- Title page
- Main text (30,000 characters including spaces)
- Abstract: a maximum of 250 words
- Question formulation
- Location of the studies
- Critical Evaluation and Data Collection
- Data analysis and presentation
- Improvement
- Review update
- References: no limit on the number of references
- Tables

Layout - Graphic Files

- Figures: no limit on the number of figures

Letter to the Editor

Letters must include evidence to support an opinion of the author(s) about the scientific or editorial content of the BOR, and must be limited to 500 words. No figures or tables are permitted.

Copyright transfer agreement and responsibility statements

The manuscript submitted for publication must include the Copyright Transfer Agreement and the Responsibility Statements, available in the online system and mandatory.

CHECKLIST FOR INITIAL SUBMISSION

- Title Page file (in DOC, DOCX, or RTF format).
- Main text file (Main Document, manuscript), in DOC, DOCX, or RTF format.
- Tables, in DOC, DOCX, or RTF format.
- Declaration of interests and funding, submitted in a separate document and in a PDF format. (if applicable)
- Justification for participation of each author, provided in a separate document and in a PDF format.
- Photographs, microradiographs, and radiographs (10 cm minimum width, 500 dpi minimum resolution) in TIFF format.
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/pub/filespec-images/>)
- Charts, drawings, layouts, and other vector illustrations in a PDF format.
- Each figure should be submitted individually in separate files (not inserted in the text file).

Publication fees

Authors are not required to pay for the submission or review of articles.

EXAMPLES OF REFERENCES

Journals

Goracci C, Tavares AU, Fabianelli A, Monticelli F, Raffaelli O, Cardoso PC, et al. The adhesion between fiber posts and root canal walls: comparison between microtensile and push-out bond strength measurements. *Eur J Oral Sci.* 2004 Aug;112(4):353-61.

Bhutta ZA, Darmstadt GL, Hasan BS, Haws RA. Community-based interventions for improving perinatal and neonatal health outcomes in developing countries: a review of the evidence. *Pediatrics.* 2005;115(2 Suppl):519-617. doi:10.1542/peds.2004-1441.

Usunoff KG, Itzev DE, Rolfs A, Schmitt O, Wree A. Nitric oxide synthase-containing neurons in the amygdaloid nuclear complex of the rat. *Anat Embryol (Berl).* 2006 Oct 27. Epub ahead of print. doi: 10.1007/s00429-006-0134-9

Walsh B, Steiner A, Pickering RM, Ward-Basu J. Economic evaluation of nurse led intermediate care versus standard care for post-acute medical patients: cost minimisation analysis of data from a randomised controlled trial. *BMJ.* 2005 Mar 26;330(7493):699. Epub 2005 Mar 9.

Papers with Title and Text in Languages Other Than English

Li YJ, He X, Liu LN, Lan YY, Wang AM, Wang YL. [Studies on chemical constituents in herb of *Polygonum orientale*]. *Zhongguo Ahong Yao Za*

Zhi. 2005 Mar;30(6):444-6. Chinese.

Supplements or Special Editions

Pucca Junior GA, Lucena EH, Cawahisa PT. Financing national policy on oral health in Brazil in the context of the Unified Health System. *Braz Oral Res.* 2010 Aug;24 Spec Iss 1:26-32.

Online Journals

Barata RB, Ribeiro MCSA, De Sordi M. Desigualdades sociais e homicídios na cidade de São Paulo, 1998. *Rev Bras Epidemiol.* 2008;11(1):3-13 [cited 2008 Feb 23]. Available from: <http://www.scielosp.org/pdf/rbepid/v11n1/01.pdf>.

Books

Stedman TL. *Stedman's medical dictionary: a vocabulary of medicine and its allied sciences, with pronunciations and derivations.* 20th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1961. 259 p.

Books Online

Foley KM, Gelband H, editors. *Improving palliative care for cancer* [monograph on the Internet]. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>.

Websites

Cancer-Pain.org [homepage on the Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000 [cited 2002 Jul 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org/>.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística [homepage]. Brasília (DF): Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; 2010 [cited 2010 Nov 27]. Available from: <http://www.ibge.gov.br/home/default.php>.

World Health Organization [homepage]. Geneva: World Health Organization; 2011 [cited 2011 Jan 17]. Available from: <http://www.who.int/en/>