

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

**TEMPO DE VIABILIDADE DA SALIVA HUMANA EM  
MEIO EXTERNO PARA FINS DE EXTRAÇÃO E  
QUANTIFICAÇÃO DO DNA**

**Isabella Pontes de Medeiros**

**SAPIENTIA AEDIFICAT**

**ISABELLA PONTES DE MEDEIROS**

**TEMPO DE VIABILIDADE DA SALIVA EM MEIO EXTERNO PARA  
FINS DE EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE DNA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Bianca Marques Santiago

João Pessoa

2025

### **Informações Complementares:**

Viability time of human saliva in external environment for DNA extraction and quantification purposes.

Palavras-chave em outro idioma: Saliva. Forensic Anthropology. DNA. Forensic Dentistry. Forensic Genetics.

Área de concentração: Saúde Bucal Coletiva. Linha de Pesquisa: Odontologia Legal.

Banca examinadora: Bianca Marques Santiago (Orientador, Universidade Federal da Paraíba); Rhonan Ferreira da Silva (Universidade Federal de Goiás); Yuri Wanderley Cavalcante (Universidade Federal da Paraíba); Isla Camilla Carvalho Laureano (Universidade Federal da Paraíba).

Data de qualificação: 31/10/2024

Data de defesa: 28/01/2025

### **Informações acadêmicas e profissionais do(a) aluno(a)**

- ORCID: 0000-0002-7229-4357

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0463196314365319>

### **Catálogo na publicação Seção de Catalogação e Classificação**

M488t Medeiros, Isabella Pontes de.

Tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para fins de extração e quantificação de DNA / Isabella Pontes de Medeiros. - João Pessoa, 2025.  
56 f. : il.

Orientação: Bianca Marques Santiago.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Saliva. 2. DNA. 3. Antropologia forense. 4. Odontologia Legal. 5. Genética forense. I. Santiago, Bianca Marques. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616-  
008.843.1(043)



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



ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
2025

Aos vinte e oito dias do mês de janeiro do ano de 2025, às 08:30 horas, com uso de recursos à distância, reuniram-se os membros da banca examinadora composta pelos professores doutores: BIANCA MARQUES SANTIAGO (Orientadora e Presidente), YURI WANDERLEY CAVALCANTI (membro interno ao Programa de Pós-graduação em Odontologia – UFPB) e RHONAN FERREIRA DA SILVA (membro externo ao PPGO/UFPB, vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Goiás) a fim de arguirem a mestranda ISABELLA PONTES DE MEDEIROS, com relação ao seu trabalho final de curso de mestrado (dissertação), sob o título “Tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para fins de extração e quantificação de DNA”. Aberta a sessão pela presidente da mesma, coube a candidata, na forma regimental, expor o tema de sua dissertação, dentro do tempo regulamentar. Em seguida, foi questionada pelos membros da banca examinadora, sendo as explicações necessárias fornecidas e as modificações solicitadas registradas. Logo após, os membros da banca examinadora reuniram-se em sessão secreta, tendo chegado ao seguinte julgamento, que, de público, foi anunciado: 1º Examinador (membro externo): Conceito “Aprovado”; 2º Examinador (membro interno): Conceito “Aprovado, 3º Examinador (Orientadora e presidente): Conceito “Aprovado”. O que resultou em conceito final igual: “APROVADO”, o que permite o(a) candidato(a) fazer jus ao título de Mestre em Odontologia. Os documentos utilizados para avaliação da candidata durante o processo aqui descrito apresentam-se como prova documental do mesmo e, como tal, serão anexadas a esta ata para arquivamento. Nada mais havendo a tratar, foi lavrada a presente ata, que será assinada pela presidente, pelos demais membros da banca e pela candidata.

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** RHONAN FERREIRA DA SILVA  
Data: 29/01/2025 07:55:08-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** YURI WANDERLEY CAVALCANTI  
Data: 28/01/2025 13:34:46-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

1º Examinador – Membro Externo

2º Examinador – Membro interno

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** BIANCA MARQUES SANTIAGO  
Data: 28/01/2025 10:32:10-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ISABELLA PONTES DE MEDEIROS  
Data: 29/01/2025 12:50:06-0300  
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

3º Examinador –Presidente

Candidato (a)



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



45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63  
64  
65  
66  
67  
68  
69  
70  
71  
72  
73  
74  
75  
76  
77  
78  
79  
80  
81  
82  
83  
84  
85  
86  
87  
88  
89  
90  
91  
92  
93  
94

ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
(DOCUMENTO ANEXO – 1)

A Comissão Examinadora do Trabalho Final (dissertação) de Curso de Mestrado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, em sessão pública, após apreciação da apresentação oral e arguição do trabalho:

CANDIDATO: ISABELLA PONTES DE MEDEIROS  
ORIENTADOR: Prof. Dr. BIANCA MARQUES SANTIAGO

BANCA EXAMINADORA:  
1º Examinador: Prof. Dr. RHONAN FERREIRA DA SILVA (Membro Externo)  
2º Examinador: Prof. Dr. YURI WANDERLEY CAVALCANTI (Membro interno)  
3º Examinador: Prof. Dr. BIANCA MARQUES SANTIAGO (orientador e presidente)

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: “Tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para fins de extração e quantificação de DNA.”.

Houve sugestão de alteração do título do trabalho final? ( ) Sim ( X ) Não
Se sim, qual o novo título sugerido?
_____
_____
_____

no dia 28 de janeiro de 2025, e observando o que determina a Resolução do Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia atribuem o conceito final:

( X ) Aprovado ( ) Insuficiente ( ) Reprovado  
ao candidato o que lhe permitirá fazer jus ao título de Mestre em Odontologia, após a tramitação pertinente.

1º Examinador – Membro Externo

2º Examinador – Membro interno

3º Examinador – Presidente



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



95  
96  
97  
98  
99  
100  
101  
102  
103  
104  
105  
106  
107  
108  
109  
110  
111  
112  
113  
114  
115  
116  
117  
118  
119  
120  
121  
122  
123  
124  
125  
126  
127  
128  
129  
130  
131

ATA DA DEFESA PÚBLICA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO  
(DOCUMENTO ANEXO – 2)

João Pessoa, 28 de janeiro de 2025.

CANDIDATO: ISABELLA PONTES DE MEDEIROS

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: “Tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para fins de extração e quantificação de DNA.”

1º EXAMINADOR: Prof. Dr. RHONAN FERREIRA DA SILVA  
Parecer: ( X )Aprovado ( ) Insuficiente ( ) Reprovado

1º Examinador

2º EXAMINADOR: Prof. Dr. YURI WANDERLEY CAVALCANTI  
Parecer: ( X )Aprovado ( ) Insuficiente ( ) Reprovado

2º Examinador

3º EXAMINADOR: Prof. Dr. BIANCA MARQUES SANTIAGO  
Parecer: ( X )Aprovado ( ) Insuficiente ( ) Reprovado

3º Examinador

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha amada amiga Rayanne Rodrigues (in memoriam), a melhor pessoa que conheci.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus por minha vida e a todas as conquistas e obstáculos vividos até aqui. A Virgem Maria por sua poderosa intercessão. A toda a minha família e amigos que me ajudaram e incentivaram nos momentos difíceis e compreenderam a minha ausência enquanto eu me dedicava a realização deste trabalho. A minha orientadora pela confiança, amizade e pelos valiosos ensinamentos. Aos professores do Departamento por tudo que me ensinaram e pela amizade. Aos funcionários do Departamento que contribuíram com este trabalho, direta ou indiretamente. Aos colegas, pela colaboração e convivência.

Agradeço também ao PPGO-UFPB, à Universidade Federal da Paraíba ao apoio financeiro para a minha pesquisa pela “Chamada Interna Produtividade em Pesquisa PROPESQ/PRPG - Custeio, Programa de Apoio à Pesquisa da UFPB” e ao apoio da Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado da Paraíba (FAPESQ).

## RESUMO

A análise do material genético desempenha um papel crucial nas investigações forenses, especialmente na identificação humana. A saliva tem se destacado como uma alternativa viável e promissora. Nesse sentido, esta dissertação foi organizada em capítulos que se referem a artigos elaborados durante o curso de mestrado. O primeiro capítulo apresenta, por meio de um artigo de revisão de escopo publicado na Revista Brasileira de Odontologia Legal (RBOL), o estado da arte da temática. Com o objetivo de mapear o tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para fins de extração e quantificação de DNA, a revisão foi desenvolvida seguindo o protocolo do *Joanna Briggs Institute* e, previamente registrada na plataforma do *Open Science Framework* (doi: 10.17605/OSF.IO/PN9ET), com buscas realizadas nas seguintes bases: Pubmed, Web of Science, Scopus, LILACS, Cochrane e Google Scholar, sem restrições sobre período de publicação ou idioma. Após a *screening* inicial dos 283 estudos identificados, seguida de leitura na íntegra para confirmação dos critérios de elegibilidade, foram inclusos 6 estudos na revisão. Bitucas de cigarro, próteses dentárias, pastilhas de compressão dentária, cavidade oral e cartões de FTA foram os substratos descritos como fonte de saliva coletada. A viabilidade do DNA foi verificada em tempos que variaram de 1 dia a 11 anos. Verificou-se que o protocolo de coleta e armazenamento das amostras é um fator que pode influenciar a quantidade e qualidade do material examinado, todavia, observou-se DNA viável em análise realizada uma década após a coleta da saliva e esse foi o tempo máximo de acompanhamento relatado nos estudos. No segundo capítulo, é apresentado um artigo de pesquisa laboratorial, que investigou o tempo de viabilidade do DNA extraído da saliva humana quando exposta a ambiente externo, com o objetivo de avaliar seu potencial para identificação humana. O estudo contou com a participação de 10 voluntários adultos e saudáveis. Os participantes mascararam um sialagogo durante 3 minutos e, em seguida, expeliram suas salivas em tubos Falcon estéreis. As amostras foram expostas ao ambiente e analisadas em cinco períodos distintos: 0, 7, 15, 30 e 60 dias. Posteriormente, respeitando o tempo de análise de cada grupo, as amostras de saliva foram imersas em 800 µL de TRIzol™ Reagent, uma solução empregada para a extração de DNA. Em seguida, foram centrifugadas, e criopreservadas a -20°C. Na fase seguinte, após a extração de fases, as substâncias amostrais em fase aquosa,

que contém moléculas de DNA, foram recuperadas e transferidas para novos microtubos, sendo agregado com álcool para precipitar as moléculas de DNA após nova centrifugação. Aos tubos contendo amostras sem solução visível, foram adicionados 50 µL de água ultrapura, e depois 8 µL de cada amostra foram retirados e acrescentados com 10 µL de mastermix e 2 µL de primer B-actin gene. A seguir, a quantidade do material genético foi avaliada utilizando um termociclador para verificar a emissão de fluorescência, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real. Após a coleta do resultado relativo, os dados foram analisados estatisticamente no *software* Jamovi (versão 2.3.21), adotando nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram uma perda de aproximadamente 20% na quantidade de DNA, perda essa que se manteve consistente em todas as análises a partir do 7º dia. As variações nos valores de DNA quantificável nos diferentes grupos (tempo) não demonstraram diferença estatisticamente significativa (ANOVA para medidas repetidas;  $p = 0,475$ ). Os resultados indicam que a saliva exposta por 60 dias ao meio externo ainda é viável para fins de identificação humana. Pode-se concluir que os dois artigos se complementam, visto que o primeiro artigo demonstra o que se sabe sobre o tema e as lacunas do conhecimento na temática, a falta de um protocolo específico de coleta e armazenamento da saliva, bem como a definição do tempo limite máximo em que a saliva deixa de ser viável. E o segundo artigo explora essa última lacuna ao desenvolver uma pesquisa experimental que demonstra que a saliva é um substrato viável para identificação humana mesmo após a sua exposição ao meio durante 60 dias. Este estudo consolida a saliva como um material genético confiável para análises forenses, reforçando sua estabilidade e viabilidade mesmo após longos períodos de exposição ambiental, o que amplia seu potencial de aplicação na identificação humana e na resolução de investigações criminais.

**Palavras-chave:** Saliva; DNA; Antropologia Forense; Odontologia Legal; Genética Forense.

## ABSTRACT

The analysis of genetic material plays a crucial role in forensic investigations, especially in human identification. Saliva has emerged as a viable and promising alternative. In this sense, this dissertation is organized into chapters that refer to articles developed during the master's course. The first chapter presents, through a scope review article published in the Brazilian Journal of Forensic Odontology (RBOL), the state of the art on the topic. Aiming to map the viability time of human saliva in an external environment for DNA extraction and quantification, the review was developed following the Joanna Briggs Institute protocol and was previously registered on the Open Science Framework platform (doi: 10.17605/OSF.IO/PN9ET), with searches conducted in the following databases: PubMed, Web of Science, Scopus, LILACS, Cochrane, and Google Scholar, without restrictions regarding publication period or language. After the initial screening of the 283 identified studies, followed by a full-text reading to confirm eligibility criteria, 6 studies were included in the review. Cigarette butts, dental prostheses, dental compression pads, oral cavity, and FTA cards were described as substrates from which collected saliva samples were obtained. The DNA viability was verified in time frames ranging from 1 day to 11 years. It was found that the sample collection and storage protocol is a factor that can influence the quantity and quality of the examined material; however, viable DNA was observed in analyses conducted a decade after saliva collection, and this was the maximum follow-up time reported in the studies. In the second chapter, a laboratory research article is presented, which investigated the viability time of DNA extracted from human saliva when exposed to the external environment, with the aim of evaluating its potential for human identification. The study involved 10 healthy adult volunteers. Participants chewed a sialogogue for 3 minutes and then expelled their saliva into sterile Falcon tubes. The samples were exposed to the environment and analyzed at five distinct time points: 0, 7, 15, 30, and 60 days. Afterward, respecting the analysis time for each group, the saliva samples were immersed in 800  $\mu$ L of TRIzol™ Reagent, a solution used for DNA extraction. The samples were then centrifuged and cryopreserved at -20°C. In the next phase, after extracting the aqueous-phase substances, which contain DNA molecules, these were recovered and transferred to new microtubes, to which alcohol was added to precipitate the DNA molecules after another centrifugation. For

tubes containing samples without visible solution, 50  $\mu\text{L}$  of ultrapure water was added, and then 8  $\mu\text{L}$  of each sample was taken and mixed with 10  $\mu\text{L}$  of mastermix and 2  $\mu\text{L}$  of primer for the B-actin gene. Next, the genetic material quantity was assessed using a thermocycler to check for fluorescence emission, real-time PCR (Polymerase Chain Reaction). After collecting the relative results, the data were statistically analyzed using the Jamovi software (version 2.3.21), with a significance level of 5%. The results showed a loss of approximately 20% in the DNA quantity, which remained consistent across all analyses from the 7th day onward. The variations in the DNA values across the different time groups did not show statistically significant differences (ANOVA for repeated measures;  $p = 0.475$ ). The results indicate that saliva exposed to the external environment for 60 days is still viable for human identification purposes. It can be concluded that the two articles complement each other, as the first article demonstrates what is known about the topic and the gaps in knowledge, such as the lack of a specific saliva collection and storage protocol and the definition of the maximum time limit at which saliva becomes non-viable. The second article addresses this last gap by conducting experimental research that shows saliva is a viable substrate for human identification even after being exposed to the environment for 60 days. This study consolidates saliva as a reliable genetic material for forensic analysis, reinforcing its stability and viability even after long periods of environmental exposure, which expands its potential for application in human identification and in resolving criminal investigations.

**Keywords:** Saliva; DNA; Forensic Anthropology; Forensic Odontology; Forensic Genetics.

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

CCS - Centro de Ciências da Saúde

CEP- Comitê de Ética em Pesquisa

CT – Cycle threshold

DNA - Ácido desoxirribonucleico

FTA - Flinders Technology Associates

INTERPOL – Organização Internacional de Polícia Criminal

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

RLFP - Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição

RNA - Ácido ribonucleico

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFPB - Universidade Federal da Paraíba

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	17
3. OBJETIVOS.....	20
4. Artigo 1.....	21
5. Artigo 2.....	31
6. CONSIDERAÇÃO GERAIS.....	48
7. CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
APÊNDICE.....	54
ANEXO.....	56

## 1. INTRODUÇÃO

A Odontologia Legal, ou Odontologia Forense, vêm ganhando destaque nas últimas duas décadas e engloba a análise, revisão, avaliação e apresentação de evidências odontológicas, visando fornecer informações científicas e objetivas em procedimentos judiciais e investigações criminais (ATA-ALI; ATA-ALI, 2014; VERÍSSIMO *et al.*, 2021). Uma das suas áreas diz respeito à identificação humana, podendo ser o principal método utilizado em desastres com múltiplas vítimas (CHOI *et al.*, 2018), cuja análise de dados é considerada eficaz, segura e prática por ser baseada em elevados critérios científicos (SILVA *et al.*, 2015). Além disso, é amplamente utilizada em indivíduos vivos, contribuindo, por exemplo, para a solução de crimes (RAMOS *et al.*, 2021).

A identidade é definida como o conjunto de características físicas, funcionais, psíquicas e civis que tornam uma pessoa única. Do ponto de vista pericial, a identificação refere-se ao processo ou técnica utilizada para estabelecer ou determinar uma identidade (SILVA; FRANCO; MACHADO, 2022). Para que um método de identificação seja considerado ideal, é necessário que preencha os requisitos da unicidade (cada indivíduo deve ter uma identidade única), imutabilidade (as características utilizadas para identificação não devem mudar ao longo do tempo de forma significativa), praticabilidade (deve ser de fácil aplicação), classificabilidade (deve permitir a categorização clara das identidades) e perenidade (deve garantir a estabilidade ao longo do tempo) (RAMOS *et al.*, 2021).

Os odontologistas necessitam de conhecimentos que abrangem diversas áreas e utilizam diferentes métodos para identificação humana, explorando características únicas da anatomia da face, dentes e boca (DUANGTON *et al.*, 2018). Os principais métodos incluem a papiloscopia, que se refere à análise das impressões digitais, a análise de arcos dentais e do DNA (ANDRADE *et al.*, 2023). Para este último, o sangue é geralmente a fonte que contém maior quantidade de material genético. No entanto, nem sempre está disponível em todas as situações forenses (MURUGANANDHAN; SIVAKUMAR, 2011), sendo necessário recorrer a outras fontes de DNA como sêmen, sangue ou saliva (LIMA; MEDEIROS, 2015).

A saliva é frequentemente considerada uma alternativa viável para a coleta de DNA em estudos (epi)genômicos, e mesmo fora da cavidade oral pode fornecer

informações genéticas precisas (LANGIE *et al.*, 2016; HANSSEN *et al.*, 2018). Comparada ao sangue, ela oferece várias vantagens significativas em termos de coleta e uso: facilidade de coleta, método pouco invasivo e prático, conforto e menor preocupação em relação a coagulação (LANGIE *et al.*, 2016; NETO *et al.*, 2020). Sabe-se que ambientes controlados favorecem a recuperação do DNA, no entanto, a viabilidade de extração deste material em amostras salivares fora do ambiente oral pode apresentar degradações do material genético com o passar do tempo (ANDRADE *et al.*, 2023).

Diante disso, o objetivo geral do presente estudo é verificar o tempo de viabilidade que o DNA salivar quando esta se encontra em ambiente externo à cavidade bucal e se o DNA extraído da mesma apresentará potencial de identificação humana. Os objetivos específicos são: identificar o tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para a extração e purificação do DNA e avaliar a degradação do DNA extraído e sua capacidade de preservação em 4 diferentes intervalos de tempo (7, 15, 30 e 60 dias) para a possibilidade de identificação humana. A presente dissertação foi dividida em dois capítulos, sendo o primeiro referente ao artigo de revisão de escopo em que traz o estado da arte, e o segundo sobre o artigo que apresenta a pesquisa laboratorial realizada, que ajuda a compor o conjunto de evidências científicas sobre a temática.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A Odontologia Legal é uma das áreas das Ciências Forenses responsável pela investigação de fenômenos psíquicos, físicos, químicos e biológicos que podem atingir os seres humanos (vivo, morto, ossada e fragmentos). Dentre suas competências, destaca-se a identificação humana, realizando, por exemplo, estimativas de sexo, idade, estatura, análise de mordida e de DNA (DEBORTOLI *et al.*, 2019; RAMOS *et al.*, 2021).

A atuação do cirurgião-dentista no âmbito forense é respaldada pela legislação federal competente, a Lei nº 5.081 (Brasil, 1966), que regulamenta o exercício da Odontologia no Brasil. Além disso, o Conselho Federal de Odontologia (CFO), por meio da Resolução nº 63, define claramente o campo de atuação do especialista em Odontologia Legal, garantindo total autonomia nas questões que envolvem Identificação Humana, Tanatologia Forense, Infortunística, Traumatologia, Balística Forense, e Imagiologia (RAMOS *et al.*, 2021; VANRELL, 2019). Essas regulamentações garantem que os profissionais estejam capacitados e autorizados para desempenhar um papel fundamental em procedimentos judiciais e investigações que envolvam aspectos odontológicos forenses.

A identidade é o conjunto de características morfofisiológicas e psíquicas exclusivas de uma pessoa, sendo definida por processo objetivo, baseado em fundamentos científicos. A identificação humana é de fundamental importância para sociedade, seja pelas considerações humanitárias ou por sua aplicação em processos cíveis e criminais (LIMA; CUNHA; FUJITA, 2022.; DEBORTOLI *et al.*, 2019).

Vários métodos foram desenvolvidos para se estabelecer a identidade individual, mas a Interpol classifica o exame do DNA, junto com a análise papiloscópica e odontológica, como os métodos primários na identificação humana. Caso um indivíduo seja identificado positivamente por um desses métodos, a identificação humana está estabelecida sem a necessidade de realização de outra metodologia pericial para confirmar os resultados obtidos (MALIK; PILLAI; MALIK, 2022; SILVA; FRANCO; MACHADO, 2022).

O uso de saliva como fonte de DNA para investigações forenses é interessante dada a sua facilidade de coleta, sendo um processo não invasivo e, a depender da situação, de fácil recolhimento (SILVA *et al.*, 2020). A saliva também tem a vantagem

de que o *background* do material analisado (células, DNA, RNA e proteínas) e substâncias inibidoras é muito menor e menos complexo do que no sangue (RAMOS *et al.*, 2021).

De modo consensual, a saliva é descrita como uma fonte muito rica de DNA humano, pois o número médio de células epiteliais por 1 mL de saliva é cerca de  $4,3 \times 10,5 \mu\text{l}$  (microlitros). Além disso, a renovação destas células é bastante extensa na boca, pois a camada superficial é substituída, em média, a cada 2,7 horas, sugerindo que é provável que haja DNA genômico intacto nas amostras de saliva (RAMOS *et al.*, 2021).

Kuchler *et al.* (2012) avaliaram o rendimento e a qualidade do DNA genômico obtido da saliva fresca e saliva armazenada por 4 e 8 dias à temperatura ambiente, utilizando o enxague bucal para coleta da amostra. Seus resultados indicaram que não houve diferença significativa entre os diferentes períodos de armazenamento. Desse modo, mostrando que a qualidade da saliva para fins genéticos permanece adequada mesmo quando exposta a fatores externos.

Técnicas como o Polimorfismo no Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP), a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), a Eletroforese, e a *Southern Blotting* são utilizadas para uma ampla verificação em amostras de DNA na identificação de práticas criminosas (OLIVEIRA; FILHO, 2018). A PCR é uma das técnicas mais utilizadas, pois permite a amplificação de regiões restritas do genoma humano tornando possível a obtenção de informações mesmo em quantidades extremamente pequenas de DNA, sendo classificada como ferramenta simples e sensível (POWER, *et al.* 2010). É utilizada também em outras áreas como no diagnóstico de infectologia clínica através da análise dos ácidos nucléicos e dos patógenos (SILVA, *et al.* 2020).

A PCR é feita em um tubo onde é colocado pequena quantidade de DNA genômico, quatro nucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP e dGTP), a enzima Taq DNA polimerase, responsável pela síntese de DNA a partir de um molde, primers, que são sequências curtas de nucleotídeos que delimitam a região alvo, e uma solução tampão, que mantém o pH estável, prevenindo variações mesmo com a adição de substâncias ácidas ou básicas. Após isso, todo o material é colocado em um termociclador onde ocorrerá 3 etapas com diferentes graus de temperatura (desnaturação, pareamento dos primers e síntese), conferindo milhões de cópias do

DNA em questão. Por fim, dependente da temperatura, através da eletroforese capilar, método que faz uso da corrente elétrica e de corante marcador de DNA, será possível visualizar por luz ultravioleta os fragmentos do DNA (VALARINI *et al.*, 2011).

Os cuidados na coleta da saliva com relação a partículas ou outras substâncias interferentes são imprescindíveis, uma vez que a presença de outros microrganismos e substâncias podem acelerar a degradação do DNA, como também, gerar a contaminação da amostra a ser analisada. Dessa forma, o uso de luvas e materiais de coleta limpos são imprescindíveis no momento da coleta (BHATTARAI; KIM; CHAE, 2018). A literatura sobre métodos de coleta de saliva para fins genéticos até o momento traz como opção o enxague oral com solução salina, esfregaço bucal por *swabs*, escova citológica e coleta total de saliva por kits prontos. Entretanto, Ambers *et al.* (2018) verificaram que o uso de *swabs* úmidos, especificamente da marca microFLOQR, é o método de extração ideal em casos de cenas de crime onde há pouca quantidade de material salivar para ser coletado.

A preservação do material genético para a amplificação por PCR envolve o controle de temperatura, umidade, o valor do pH e da presença de ácidos e de microorganismos. A temperatura baixa, ambientes secos, com o mínimo de crescimento de microorganismos e pH neutro ou alcalino favorecem a preservação do material genético (LOBO; AMARAL; SUEDEI, 2012).

Diante do exposto, torna-se evidente a importância de realizar estudos detalhados e específicos sobre o DNA presente na saliva quando esta se encontra fora do ambiente bucal. Assim, o presente trabalho se propôs a identificar o tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para a extração do DNA e avaliar a preservação desse DNA para a possibilidade de identificação humana.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Investigar o tempo de viabilidade da saliva humana para fins de identificação encontrados na literatura e analisar a viabilidade do DNA contido na saliva em um período de 60 dias.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Mapear a literatura acerca do tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para a extração do DNA para a possibilidade de seu uso com fins de identificação;
- Avaliar a degradação do DNA extraído e sua capacidade de preservação em 4 diferentes intervalos de tempo (7, 15, 30 e 60 dias) para a possibilidade de identificação humana.

#### **4. ARTIGO 1**

O manuscrito a seguir foi submetido ao periódico “Revista Brasileira de Odontologia Legal - RBOL”, aceito em 11/07/2023 e publicado em 13/10/2023 (<https://doi.org/10.21117/rbol-v10n22023-487>).

## Revista Brasileira de Odontologia Legal – RBOL

ISSN 2359-3466

<http://www.portallabol.com.br/rbol>



### Odontologia legal e DNA

## TEMPO DE VIABILIDADE DA SALIVA HUMANA EM MEIO EXTERNO PARA FINS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA: UMA REVISÃO DE ESCOPO\*.

### *Viability time of human saliva in the external environment for DNA extraction and purification: a scoping review.*

Rayle Diniz ANDRADE<sup>1</sup>, Isabella Pontes de MEDEIROS<sup>2</sup>, Tainá Nascimento FALCÃO<sup>2</sup>, Johnys Berton Medeiros da NÓBREGA<sup>2</sup>, Bianca Marques SANTIAGO<sup>2,3</sup>.

1. Graduada em Odontologia pela Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Paraíba, Brasil.

2. Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba (UFPB), Paraíba, Brasil.

3. Núcleo de Medicina e Odontologia Legal (NUMOL), Instituto de Polícia Científica da Paraíba (IPC/PB), João Pessoa, Paraíba, Brasil.

\* Trabalho de Iniciação Científica desenvolvido durante a vigência 2020/2021 do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) da Universidade Federal da Paraíba (Edital 01/2020/PROPEQ Seleção de Projetos de Iniciação Científica 2020/2021).

#### Informações sobre o manuscrito:

Recebido: 21 de abril de 2023

Aceito: 11 de julho de 2023

#### Autor(a) para contato:

Profa. Dra. Bianca Marques Santiago.

Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO), Departamento de Clínica e Odontologia Social, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba – Campus I, Lot. Cidade Universitária, João Pessoa - PB. CEP: 58051-900.

Email: [bianca.santiago@academico.ufpb.br](mailto:bianca.santiago@academico.ufpb.br).

#### RESUMO

**Introdução:** A análise do DNA salivar é uma dos métodos de identificação humana relacionados à Odontologia Legal. A coleta do material genético salivar consiste num processo simples e pouco invasivo, por possuir grande potencial discriminatório tem sido amplamente aplicado em investigações criminais. **Objetivo:** Por meio de uma revisão de escopo, objetivou-se mapear o tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para fins de extração e purificação de DNA. **Material e Métodos:** A revisão foi conduzida seguindo o protocolo JBI e registrada (doi: 10.17605/OSF.IO/PN9ET). A estratégia de busca foi adaptada para as bases: Pubmed, Web of Science, Scopus, LILACS, Cochrane e Google Scholar, sem restrições sobre período de publicação ou idioma. Foram excluídos estudos que exploraram apenas as metodologias e materiais relacionados a extração de DNA, também aqueles que estudaram DNA de outros componentes que não a saliva. **Resultados:** Identificou-se 283 estudos. Após triagem inicial, 15 referências foram lidas na íntegra, sendo 6 incluídas na revisão, em função da confirmação da elegibilidade. Bitucas de cigarro, próteses dentárias, pastilhas de compressão dentária, cavidade oral e cartões de FTA foram os substratos descritos como fonte de saliva coletada. A viabilidade do DNA foi verificada em tempos que variaram de 1 dia à 11 anos. **Conclusão:** O protocolo de coleta e armazenamento das amostras é um fator que pode influenciar a quantidade e qualidade do material examinado, todavia, observou-se DNA viável em análise realizada uma década após a coleta da saliva e esse foi o tempo máximo de acompanhamento relatado nos estudos.

#### PALAVRAS-CHAVE

Odontologia legal; Saliva; DNA; Genética forense.

## INTRODUÇÃO

A Odontologia Legal tem como objetivo a aplicação dos conhecimentos da ciência odontológica a serviço da justiça<sup>1</sup>, uma de suas áreas de atuação diz respeito à identificação humana, por consequência, auxilia também na resolução de crimes.

A identificação humana determina a identidade de uma pessoa por meio das características que a diferenciam das demais, para tanto, lança-se mão de métodos capazes de caracterizar e individualizar o sujeito. Dentre os métodos primários de identificação humana estão a papiloscopia, a identificação pela arcada dentária e a análise do DNA.

Este último representa um avanço de grande importância para a genética moderna e em muito contribui na investigação criminal, pois apresenta potencial discriminatório e pode ser realizado em amostras antigas expostas às agressões ambientais. O DNA de um indivíduo é idêntico em qualquer célula do seu corpo, quer tenha sido extraído da raiz do cabelo, sêmen, sangue ou saliva, sendo, portanto, possível obter um perfil molecular único para cada pessoa a partir de uma amostra biológica<sup>2</sup>.

O sangue e a saliva contêm alguns constituintes semelhantes, entre eles, o DNA, assim, como nem sempre é possível a obtenção de amostras sanguíneas, o fluido salivar é uma fonte alternativa segura para extração de material genético<sup>2</sup>. O uso de saliva é favorecido devido à sua praticidade, por conferir um processo não invasivo e de fácil coleta<sup>3</sup>.

Uma vez extraído, o material genético deve ser amplificado para análise,

entre os métodos estão: a amplificação isotérmica, multiplex, por transcrição reversa, *rolling circle*, reação em cadeia de polimerase (PCR), entre outros. Atualmente, a PCR está entre as técnicas mais utilizadas, a partir dela regiões restritas do genoma humano são copiadas, tornando possível a obtenção de informações mesmo quando a fonte de material biológico são quantidades extremamente pequenas de DNA.

A preservação do material genético para a amplificação por PCR envolve o controle de temperatura, umidade, pH e da presença de ácidos e de micro-organismos. Temperatura baixa, ambientes secos, com o mínimo de crescimento de micro-organismos e pH neutro ou alcalino favorecem a preservação do material genético.

Portanto, sabe-se que ambientes controlados favorecem a recuperação do DNA. Entretanto, ainda há questionamentos sobre a viabilidade de extração deste material em amostras salivares expostas, fora do ambiente oral, como em marcas de mordida, restos alimentares, vestígios em objetos ou outros substratos. Assim, por meio de uma revisão de escopo, objetiva-se mapear o tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para a extração do DNA para a possibilidade de seu uso com fins de identificação.

## METODOLOGIA

A revisão de escopo foi conduzida de acordo com a metodologia proposta pelo Joanna Briggs Institute (JBI) para revisões de escopo<sup>4,5</sup> e seu relato seguiu as

recomendações propostas pelo Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses extension for Scoping Reviews- (PRISMA- ScR)<sup>6</sup>. O protocolo da pesquisa foi registrado no Open Science Framework (<https://doi.org/10.17605/OSF.IO/PN9ET>).

### ***Pergunta de investigação***

Desenvolveu-se a revisão com base na seguinte pergunta norteadora: “Qual o tempo de viabilidade da saliva humana para extração do DNA com fins de identificação humana?”. Tal pergunta foi construída a partir do acrônimo PCC (População/Problema, Conceito, Contexto) e seu mapeamento permitiu a elaboração da estratégia de busca.

### ***Estratégia de busca***

A estratégia de busca, incluindo todas as palavras-chave e termos de índices identificados, foi inicialmente montada e testada no Pubmed e posteriormente adaptada para cada uma das bases também incluídas nesta revisão: Web of Science, Scopus, LILACS e Biblioteca Cochrane. Não houve restrição quanto ao idioma e período de publicação, sendo avaliados registros publicados até fevereiro de 2023. A busca na literatura cinzenta foi contemplada com pesquisa no Google Scholar e, adicionalmente, as listas de referências de artigos selecionados foram rastreadas para busca adicional de artigos (busca manual).

### ***Critérios de elegibilidade para seleção dos estudos***

Esta revisão incluiu estudos considerando todos os tipos de participantes. Foram considerados os estudos que estavam relacionados com a avaliação do DNA presente na saliva, em relação ao tempo dela conservada em meio externo. Também foram incluídos trabalhos que exploravam o tempo de viabilidade do DNA da saliva em relação à identificação humana. Excluíram-se estudos que explorassem apenas as metodologias e materiais relacionados à extração do DNA. Além disso, descartaram-se os artigos que usavam DNA de outros componentes que não o salivar. Esta revisão considerou todos os desenhos de estudo, independentemente de seu delineamento e rigor metodológico.

### ***Seleção das fontes de evidência***

Mediante a pesquisa, todos os registros identificados nas diferentes bases foram agrupados e incluídos no gerenciador de referência ENDNote Web para remoção das duplicatas. A triagem inicial pela análise dos títulos e resumos foi realizada por dois revisores independentes. Artigos potencialmente relevantes foram recuperados na íntegra e seus metadados importados para o software gerenciador de referências Rayyan (Rayyan QCRI/www.rayyan.ai)<sup>7</sup>, específico para estudos de revisão de literatura, como as sistemáticas ou de escopo.

Os artigos selecionados foram avaliados em relação aos critérios de inclusão por dois revisores independentes. Os motivos para a exclusão daqueles que não atenderam aos critérios de inclusão

foram registrados e relatados nesta revisão.

Quaisquer divergências que surgiram entre os revisores em cada etapa do processo de seleção foram resolvidas por meio de discussão, em reuniões de consenso, com a presença de um terceiro revisor. Os resultados da pesquisa são relatados por completo nesta revisão de escopo e apresentados em um fluxograma proposto pelo PRISMA-ScR.

### **Extração de dados**

Os dados foram extraídos por dois revisores independentes, usando um formulário de extração de dados de autoria própria que incluiu detalhes específicos alinhados aos objetivos desta revisão, tais como: autoria, ano e local de estudo, título, local de coleta da saliva, tempo entre coleta de DNA e análise, método de extração e amplificação do DNA, condição de acondicionamento da amostra e resultados obtidos.

### **Análise e apresentação dos dados**

Os resultados estão apresentados graficamente e em forma de tabela, acompanhados de uma síntese narrativa dos estudos mapeados. As tabelas de apresentação dos dados foram desenvolvidas com base nos dados extraídos, agrupados de acordo com os resultados obtidos por cada artigo.

## **RESULTADOS**

A busca inicial identificou 283 registros, sendo: 59 da Pubmed, 85 da Scopus, 37 da Web of Science, 2 da Lilacs e 100 do Google Scholar. Após a remoção

das duplicatas (n=79) pelo gerenciador de referências, restaram 220 trabalhos, desses foram selecionados 191 artigos, pois foram excluídas mais 29 duplicatas pelo software de manejo de referências para revisões de literatura (Rayyan).

No Rayyan, as 191 referências foram analisadas, por meio dos seus títulos e resumos, por 2 colaboradores que estavam com a configuração "blind on" ativada. Após essa fase, um terceiro colaborador, com o "blind on" desativado, fez a análise dos conflitos existentes. Desse modo, 15 referências foram selecionadas para leitura na íntegra, dessas, 9 não atenderam aos critérios de elegibilidade e foram excluídas. Assim, 6 estudos foram inseridos nesta revisão (figura 1).

### **Caracterização dos artigos científicos**

Os estudos identificados nesta revisão foram publicados entre os anos de 1991 e 2019, tendo sido todos desenvolvidos internacionalmente nos seguintes países: Estados Unidos, Japão, Índia e Alemanha. A coleta de material genético salivar foi realizada em indivíduos infantis, adultos e idosos, conforme demonstra o quadro 1.

O PCR foi a técnica de amplificação de DNA utilizada em todos os estudos, entretanto, os protocolos de execução variaram de acordo com os kits comerciais de escolha, entre eles: tecnologia MagAttract e protocolos que utilizavam dodecil sulfato de sódio (SDS) e proteinase K, além da solução Chelex com método piggyback.

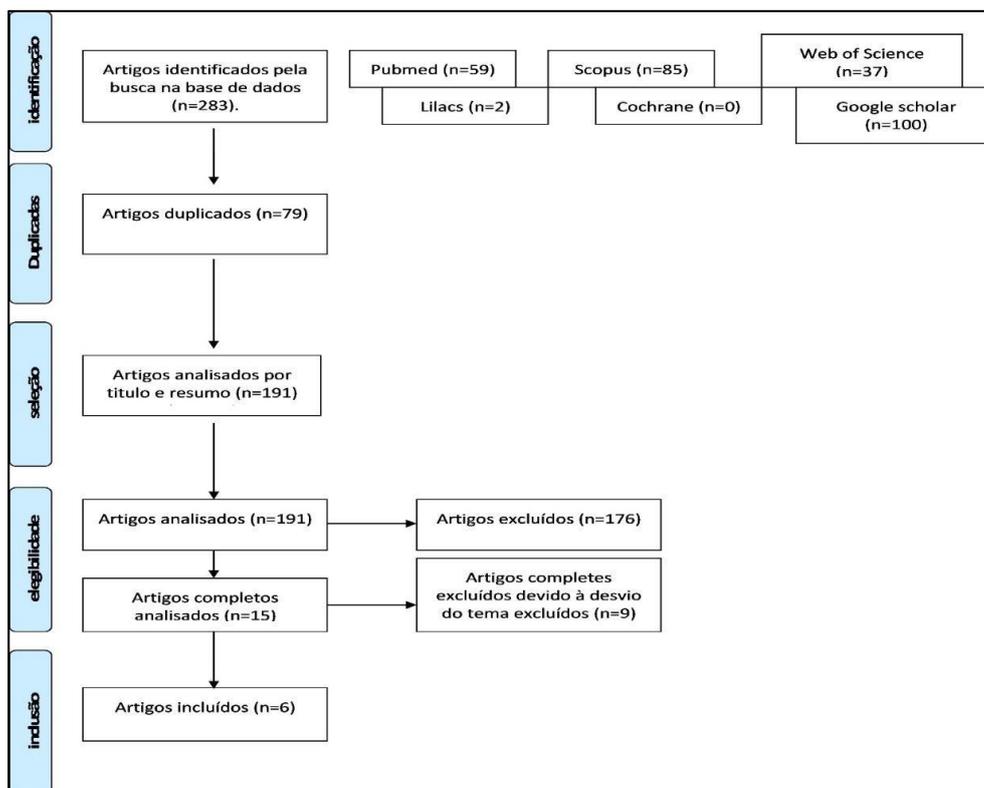


Figura 1. Diagrama PRISMA – Fluxograma das etapas desenvolvidas para a seleção de estudos primários incluídos na revisão.

## DISCUSSÃO

Em investigações forenses, a saliva pode ser encontrada em diversas superfícies e substratos, segundo Hochmeister et al. (1991)<sup>8</sup>, que avaliaram o DNA por meio de bitucas de cigarro, a amplificação do DNA pode apresentar dificuldades devido a diminuição da concentração de material salivar com o passar do tempo em meio externo. Portanto, a utilização de albumina de soro bovino (BSA), que diminui a desnaturação no armazenamento.

Com relação à coleta de DNA em próteses dentárias de resina, foi visto que a região que apresentava maior quantitativo genético eram nas áreas de superfícies basais<sup>9</sup>. Além disso, a coleta de DNA isolado da prótese dentária, mesmo após 1

mês, adiciona grande utilidade deste método na ciência forense<sup>10</sup>.

O uso de cartões *Flinders Technology Associate (FTA)*, quando a amostra de saliva é adequadamente transferida para estes e, em seguida, armazenados corretamente seguindo as instruções do fabricante, favorece a recuperação de quantidades suficientes de DNA para identificação humana, mesmo depois de mais de uma década de armazenamento à temperatura ambiente<sup>11</sup>. O protocolo, segundo Ovchinnikov et al. (2016)<sup>12</sup> aponta que a utilização de PCR multiplex e simplex para amplificação e sequenciamento do DNA da saliva pode ser utilizado em cartões FTA com coleta de mais de 10 anos, mesmo que estes estejam sem proteção especial.

**Quadro 1. Distribuição e caracterização dos estudos selecionados para inclusão na revisão de escopo, a qual responde a seguinte pergunta norteadora:**

Autoria (Ano)	Local do estudo	Local de coleta da saliva	Tempo entre coleta de DNA e análise	Extração do DNA	Amplificação do DNA	Condições de acondicionamento da amostra	Resultados
Hochmeister et al. (1991)	Estados Unidos	Bitucas de cigarro	1 mês, 3 meses e 7 meses	A cobertura externa do cigarro foi colocada em um tubo de 1,5ml com 1ml de solução Chelex + agitação no vortex por 30s + incubação por 30 min a 56°C + agitação + fervura por 8min + agitação + solução Chelex foi transferida para outro tubo pelo método piggyback, por meio de centrifugação + o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para o microconcentrador Centricon™ 100 + centrifugação + uso de 2ml de solução tampão + armazenamento a 4 °C.	PCR usando a AmpliType™ HLA-DQ Alpha Forensic DNA Amplification e Typing Kit	Bolsas de papel em temperatura e umidade ambiente	A análise baseada em PCR do DNA extraído da saliva em pontas de cigarro oferece o potencial de caracterizar geneticamente o material onde antes não era possível com a tipagem de marcadores sorológicos convencionais.
Inoike, M. et al (2000)	Japão	Peças de resina, próteses e coroas dentárias	1 dia, 1 semana, 2 semanas, 1 mês, 2 meses, 200 dias e 727 dias	As peças de resinas manchadas com saliva foram incubadas em solução tampão contendo 1% de dodecil sulfato de sódio (SDS) e digerido com 0,1mg/ml de proteinase K a 55°C durante a noite. Após a incubação a solução digerida pela proteinase K foi transferida para outro tubo e o DNA foi extraído com fenol/clorofórmio precipitado com etanol e resuspenso em solução tampão.	PCR	Expostas em uma sala em temperatura ambiente.	Próteses de resina usadas por pacientes podem ser fontes úteis de DNA para identificação pessoal. Tais próteses deixadas em temperatura ambiente por aproximadamente 200 dias podem ser utilizadas para extração de material genético.
Chauhan, I. et al. (2016)	Índia	Próteses dentárias	1 semana; 1 mês	Próteses foram colocadas em solução tampão e o DNA foi isolado usando o kit Qiagen DNeasy® Blood & Tissue.	PCR AmpFLSTR®	Em temperatura ambiente no meio externo.	A saliva é uma excelente fonte de DNA para estudos forenses mesmo após 1 mês da cavidade oral e em temperatura ambiente.
Corradini B., et al. (2019)	Alemanha	Cartões de FTA	11 anos	ReadyAmp Genomic DNA Purification System (Promega) nos cartões de FTA	PCR com PowerQuant System (Promega)	Armazenado em temperatura ambiente dentro de bolsas multibarreiras com dessecante e protegido pela luz ultravioleta.	Os cartões FTA são adequados para a recuperação robusta e confiável de DNA em amostras de saliva até 11 anos após coleta.
Ovchinnikov, I.V. et al. (2016)	Estados Unidos	Cavidade Oral	10 anos	-	PCRs Multiplex e simplex	-	Descreveu-se um método baseado em PCR de duas rodadas, combinando PCRs multiplex e simplex. Tal método aplicado a cartões FTA® após 10 anos de transporte e preservação, sem proteção.
Kim, M. et al. (2012)	Estados Unidos	Pastilha de compressão dentária	1 ano	Tecnologia MagAttract na estação de trabalho BioRobot M48 (Qiagen, Valencia, Calif, USA).	PCR	Temperatura ambiente e em sacolas seladas.	As pastilhas de impressão dentária podem ser úteis para coleta de DNA e identificação de crianças. Após 12 meses, a pastilha ainda era usada para captura de material e correspondência de identificação.

Observou-se também que mesmo após um ano de diferença entre coleta e análise da amostra, a saliva coletada de marcas de mordidas em pastilha de compressão dentária ainda guarda material genético. Além de não serem encontrados inibidores que pudessem interferir no perfil do DNA<sup>13</sup>.

A saliva pode estar disponível em uma variedade de fontes, como marcas de mordida, copos, lenços de papel, próteses e alimentos. A principal fonte de DNA da saliva são as células epiteliais descamadas da mucosa oral e a literatura apresenta distintos métodos de coleta, incluindo o uso de cotonetes, bochechos, citobrush e saliva em frascos.

A respeito do tempo de viabilidade, foi visto que mesmo após 11 anos da coleta da saliva a mesma ainda se apresentava como fonte de obtenção do DNA, fato apontado pelo trabalho de Corradini et al. (2019)<sup>11</sup>, estudo que apresentou o maior tempo entre a obtenção do DNA e a análise. Entretanto, não foi possível determinar qual o tempo limite em que a saliva deixava de ser um fator auxiliador na busca genética pela ausência de estudos com maior tempo de duração da pesquisa.

No quesito dos protocolos e técnicas de obtenção do DNA o uso de kits comerciais são os mais recomendados, uma vez que vêm com as proporções e reagentes químicos ideais para as reações necessárias na obtenção do material genético, garantindo melhor quantidade e qualidade dos genes a serem extraídos. Tal fato é comprovado pelos resultados do estudo de Garbieri et al. (2017)<sup>14</sup> o qual

avaliou 5 protocolos diferentes e concluiu que os protocolos comerciais mantinham maior pureza do DNA, diferentemente dos não comerciais que perdiam tal eficiência.

Segundo a revisão sistemática de Sujatha et al. (2019)<sup>15</sup>, foi visto que a saliva foi uma fonte suficiente de obtenção de DNA, principalmente para métodos de amplificação por PCR e genotipagem, independentemente das condições ambientais e do tempo de espera, indicando assim que a saliva é uma fonte confiável e prática. A presente revisão confirma essa ideia, uma vez que aqui também se investigou a forma de acondicionamento da amostra e verificou-se que independente da escolha do meio, se em sacolas seladas, bolsas de papel, bolsas multibarreiras com dessecante e protegido por raios UV ou exposta ao meio externo em temperatura ambiente, o DNA esteve viável para extração em diferentes tempos.

Outro ponto de destaque diz respeito à forma de armazenamento do material coletado para manter a viabilidade de se obter DNA. No estudo de Garbieri e colaboradores (2017)<sup>14</sup>, foi visto que com o uso do kit Oragene™, a partir de saliva fresca, observou-se 70% de integridade do DNA na eletroforese em gel de agarose, após PCR convencional, e com saliva congelada por 6 e 12 meses observou-se 100% de integridade. Com isso, evidencia-se que o congelamento da amostra é uma técnica que mantém a qualidade da mesma.

Ressalta-se também a necessidade em manter a integridade das amostras no processo de coleta e

acondicionamento, evitando a contaminação por contato, por mistura ou por material biológico do coletor<sup>16</sup>. Os estudos aqui incluídos apresentaram controle para minimizar o risco de contaminação<sup>17</sup>.

Por fim, a variedade de protocolos de coleta e armazenamento de material biológico, comentados nesta revisão, demonstra que não há uma diretriz padrão para análise de DNA a partir da saliva. Reforça-se que o fluido salivar é sim fonte viável para extração de material genético, mas que a forma de armazenamento da amostra coletada se sobressai ao quesito tempo.

## CONCLUSÃO

Com relação ao tempo de viabilidade da saliva para fins de identificação humana, o maior tempo relatado nos estudos foi de 11 anos em cartões de FTA. Não foi possível definir qual o limite máximo em que a saliva

deixava de ser um fator auxiliador na busca genética por não haver estudos que identificaram com quanto tempo o material deixa de ser viável.

Os estudos extraíram DNA de saliva obtida em diversos substratos, demonstrando ampla possibilidade de coleta. Em relação à preservação do material genético, mesmo com o passar do tempo, verificou-se que parte do DNA extraído ainda possuía viabilidade quanto à expressão genética em todos os estudos incluídos, possibilitando a identificação humana.

## AGRADECIMENTO

A presente equipe de pesquisa agradece à UFPB pelo estímulo e concessão de bolsas de iniciação científica especialmente no âmbito da Odontologia Legal (Edital 01/2020/PROPESQ Seleção de Projetos de Iniciação Científica 2020/2021).

## ABSTRACT

Introduction: Salivary DNA analysis is one of the human identification methods related to forensic dentistry. Collection of salivary genetic material consists of a simple and poorly invasive process because it has great discriminatory potential has been widely applied in criminal investigations. Objective: Through a scope review, the feasibility time of human saliva was mapped in the external environment for DNA extraction and purification purposes. Material and Methods: The review was conducted following the JBI protocol and registered (doi: 10.17605/OSF.IO/PN9ET). The search strategy was adapted for the databases: Pubmed, Web of Science, Scopus, LILACS, Cochrane and Google Scholar, with no restrictions on period of publication or language. Studies that explored only methodologies and materials related to DNA extraction were excluded, as well as those that studied DNA from components other than saliva. Results: 283 studies were identified. After initial screening, 15 references were read in full, 6 of which were included in the review. Cigarette butts, dentures, dental compression tablets, oral cavity and FTA cards were the substrates described as a source of collected saliva. DNA viability was verified in times ranging from 1 day to 11 years. Conclusion: The sample collection and storage protocol is a factor that can influence the quantity and quality of the material examined, however, viable DNA was observed in an analysis performed a decade after saliva collection and this was the maximum reported follow-up time in the studies.

## KEYWORDS

Forensic dentistry; Saliva. DNA. Forensic genetics.

## REFERÊNCIAS

1. Vanrell JP. Odontologia legal e Antropologia Forense. 3 ed. Rio de

- Janeiro. Ed. Guanabara Koogan; 2019.
- Lima HLO, Medeiros UV. Aplicabilidade do DNA em Odontologia Forense. *Odontol. Clín.-Cient. (Online)*. 2015; 14(4):801-8. Disponível em: <http://revodonto.bvsalud.org/pdf/occ/v14n4/a05v14n4.pdf>.
  - Silva Neto JMAE, Farias DNS, Souza JBR, Batista ARC, Santos JKB, Trujillo AM et al. A saliva como sendo um meio de diagnósticos: uma rev de literatura. *Rev Acervo Saúde*. 2020; 41: e2506. <https://doi.org/10.25248/reas.e2506.2020>.
  - Munn Z, Aromataris E, Tufanaru C, Stern C, Porritt K, Farrow J et al. The development of software to support multiple systematic review types: the JBI System for the Unified Management, Assessment and Review of Information (JBI SUMARI). *Int J Evid Bas Healthc*. 2019;17(1); 36-43. <https://doi.org/10.1097/XEB.0000000000000152>.
  - Petters MDJ et al. Chapter 11: Scoping Reviews (2020 version). In: Aromataris E, Munn Z (Editors). *JBI Manual for Evidence Synthesis*, JBI, 2020. <https://doi.org/10.46658/JBIMES-20-12>.
  - Tricco AC et al. PRISMA Extension for Scoping Reviews (PRISMA ScR): checklist and explanation. *Ann Intern Med*. 2018; 169 (7); 467-473. doi: 10.7326/M18-0850.
  - Ouzzani M, Hammady H, Fedorowicz Z, Elmagarmid A. Rayyan - a web and mobile app for systematic reviews. *Systematic Rev*. 2016; 210. Disponível em: <https://systematicreviewsjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13643-016-0384-4>.
  - Hochmeister MN et al. PCR-based typing of DNA extracted from cigarette butts. *Int J of Leg.Med*. 1991; 104 (4); 229-33. <https://doi.org/10.1007/BF01369812>
  - Inoque M et al. Personal identification by DNA analysis of samples from dental prostheses made of acrylic resin. *The Bulletin of Tokyo Dent Col*.2000; 41 (4); 175-85. <https://doi.org/10.2209/tdcpublication.41.175>.
  - Chauhan I et al. Evaluation of salivary DNA obtained from dental prosthesis and its applicability in forensic investigations. *J Fores Leg Med*. 2016; 42; 100-5. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2016.05.015>.
  - Corradini B et al. The importance of forensic storage support: DNA quality from 11-year-old saliva on FTA cards. *Int J of Leg Med*. 2019; 133 (6); 1743-50. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02146-6>.
  - Ovchinnikov IV et al. Whole Human Mitochondrial DNA Sequencing. *Met Mol Bio*. 2016; 1420; 157-71. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3597-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3597-0_13).
  - Kim M, Siegler K, Tamariz J, Caragine T, Fernandez J, Daronch M et al. Identification and Long Term Stability of DNA Captured on a Dental Impression Wafer. *Ped Dent*.2012; 34 (5); 373-7. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23211911/>.
  - Garbieri TF et al. Human DNA extraction from whole saliva that was fresh or stored for 3, 6 or 12 months using five different protocols. *J Appl Oral Sci*. Bauru. 2017; 25 (2); 147-58. <https://doi.org/10.1590/1678-77572016-0046> .
  - Sujatha et al. Determination of reliability and practicality of saliva as a genetic source in forensic investigation by analysing DNA yield and success rates: A systematic review. *J of Oral and Maxillofacial Surgery, Med, and Pathology*. 2019; 31 (3); 218-27. <https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2018.12.004>.
  - Francez PAC, Pombo AML, Silva RS. Risco de contaminação por DNA de alto peso molecular e por amplicons em Laboratório de Genética Forense no Brasil. *Rev Bras Crimin*. 2020; 9 (2); 85-94. <https://doi.org/10.15260/rbc.v9i2.245>.
  - Bhattarai KR, Kim HR, Chae HJ. Cumprimento do protocolo de coleta de saliva em voluntários saudáveis: estratégias para gerenciar riscos e erros. *Int J Med. Sci*. 2018; 15(8): 823-31. <https://doi.org/10.7150/ijms.25146>.

## 5. ARTIGO 2

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “Legal Medicine” e encontra-se em análise.

### **VIABILITY TIME OF HUMAN SALIVA IN EXTERNAL ENVIRONMENT FOR DNA EXTRACTION AND PURIFICATION PURPOSES**

Isabella Pontes de Medeiros<sup>1</sup>, Yuri Wanderley Cavalcanti<sup>2</sup>, Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida<sup>3</sup>, Tainá Nascimento Falcão<sup>4</sup>, Bianca Marques Santiago<sup>1,2,5</sup>

<sup>1</sup> Federal University of Paraíba, Postgraduate in Dentistry Program, João Pessoa, Paraíba, Brazil. ORCID: 0000-0002-7229-4357

<sup>2</sup> Federal University of Paraíba, Department of Clinical and Social Dentistry, João Pessoa, Paraíba, Brazil. ORCID: 0000-0002-3570-9904

<sup>3</sup> Federal University of Paraíba, Postgraduate in Dentistry Program, João Pessoa, Paraíba, Brazil. ORCID: 0000-0001-5997-6612

<sup>4</sup> Federal University of Paraíba, Postgraduate in Dentistry Program, João Pessoa, Paraíba, Brazil. ORCID: 0000-0002-3326-063X

<sup>5</sup> Institute of Scientific Police of the State of Paraíba, João Pessoa, Paraíba Brazil. ORCID: 0000-0001-9559-913X

#### **Corresponding author address:**

Bianca Marques Santiago

Universidade Federal da Paraíba – Campus I – Cidade Universitária, João Pessoa – PB, 58051-900.

**Corresponding author email address:** [bianca.santiago@academico.ufpb.br](mailto:bianca.santiago@academico.ufpb.br)

#### **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

All authors contributed to the study conception and design. Material preparation, data collection and analysis were performed by Isabella Pontes de Medeiros, Yuri Wanderley Cavalcanti, Leopoldina de Fátima Dantas de Almeida, Tainá Nascimento Falcão and Bianca Marques Santiago. The first draft of the manuscript was written by Isabella Pontes de Medeiros and Bianca Marques Santiago and all authors commented on previous versions of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## FUNDING

This work was conducted with financial support from the Paraíba State Research Support Foundation (FAPESQ). The authors have no competing interests to declare that are relevant to the content of this article.

## RESUMO

A análise do material genético desempenha um papel crucial nas investigações forenses, especialmente na identificação humana. Embora o sangue seja tradicionalmente a principal fonte de DNA para esses procedimentos, a saliva tem se destacado como uma alternativa viável e promissora. Nesse sentido, este estudo investigou o tempo de viabilidade do DNA extraído da saliva humana quando exposta a ambiente externo, com o objetivo de avaliar seu potencial para identificação humana. Trata-se de um estudo laboratorial, transversal, de caráter quantitativo, com a participação de 10 voluntários adultos e saudáveis. Os participantes mascararam um sialagogo durante 3 minutos e, em seguida, expeliram suas salivas em tubos Falcon estéreis. As amostras foram expostas ao ambiente e analisadas em cinco períodos distintos: 0, 7, 15, 30 e 60 dias. Posteriormente, respeitando o tempo de análise de cada grupo, as amostras de saliva foram imersas em 800 µL de TRIzol™ Reagent, uma solução empregada para a extração de DNA. Em seguida, foram centrifugadas, e criopreservadas a -20°C. Na fase seguinte, as substâncias amostrais em fase aquosa, que contém moléculas de DNA, foram acondicionadas em novos microtubos e adicionadas com álcool para precipitação do DNA. Após esta fase, o sobrenadante foi removido e adicionado a 50µL de água ultrapura. Aliquotas de 8 µL foram acondicionadas em novos microtubos e inseridos em 10 µL de mastermix e 2 µL de primer B-actin gene. A seguir, a quantidade do material genético foi avaliada utilizando um termociclador para verificar a emissão de fluorescência, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real. As condições de ciclagem térmica utilizadas para este primer foram as seguintes: 94° C por 2 minutos, 40 ciclos de 94° C por 45 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minutos, seguidos por um período final a 72°C por 10 minutos. Após a coleta do resultado relativo, os dados foram analisados estatisticamente no *software* Jamovi (versão 2.3.21), adotando nível de significância

de 5%. Os resultados demonstraram uma perda de aproximadamente 20% na quantidade de DNA, perda essa que se manteve consistente em todas as análises a partir do 7º dia. As variações nos valores de DNA quantificável nos diferentes grupos (tempo) não demonstraram diferença estatisticamente significativa (ANOVA para medidas repetidas;  $p = 0,475$ ). Os resultados indicam que a saliva exposta por 60 dias ao meio externo ainda é viável para fins de identificação humana, oferecendo, assim, subsídios para as áreas da Antropologia forense.

**Palavras-chave:** Saliva. DNA. Antropologia Forense. Odontologia Legal. Genética Forense.

## 1. INTRODUÇÃO

A Odontologia Legal, ou Odontologia Forense, tem se destacado nas últimas duas décadas por sua capacidade de analisar, revisar, avaliar e apresentar evidências odontológicas, fornecendo informações científicas e objetivas para procedimentos judiciais [1,2]. Dentre suas competências, a identificação humana é notável por sua precisão e eficácia baseada em rigorosos critérios científicos. Essa abordagem é fundamental para a solução de crimes, estimativas de sexo e análise de DNA [3,4].

A identidade é definida como um conjunto de características que permitem a distinção de uma pessoa das demais, individualizando-a fisicamente e juridicamente. A identificação refere-se ao processo técnico-científico pelo qual se determina a identidade de um indivíduo [5]. Para que um método de identificação seja considerado ideal, é necessário que preencha os requisitos da unicidade (cada indivíduo deve ter uma identidade única), imutabilidade (as características utilizadas para identificação não devem mudar ao longo do tempo de forma significativa), praticabilidade (deve ser de fácil aplicação), classificabilidade (deve permitir a categorização clara das identidades) e perenidade (deve garantir a estabilidade ao longo do tempo) [4].

Os odontologistas atuam de forma respaldada pela legislação federal brasileira e pelo Conselho Federal de Odontologia [4]. Possuem conhecimentos abrangentes que englobam diversas disciplinas e aplicam métodos variados para a identificação humana, analisando características específicas da anatomia da face, dentes e boca [6]. Os principais métodos incluem a análise da arcada dentária e a análise do DNA [7, 8], ambos considerados pela Organização Internacional de Polícia Criminal (Interpol) como os testes de excelência na identificação humana [9].

Para a análise do DNA, o sangue é a fonte mais comum e que contém maior quantidade de material genético. No entanto, sua disponibilidade nem sempre é garantida em todas as situações forenses [9, 10, 11]. Em tais casos, outras fontes de DNA, como cabelo, sêmen ou saliva, podem ser utilizadas [12, 13].

A saliva é frequentemente considerada uma alternativa viável para a coleta de DNA em estudos (epi)genômicos e em contextos forenses, e mesmo fora da cavidade oral pode fornecer informações genéticas precisas [11, 14, 15]. Comparada ao sangue, ela oferece várias vantagens significativas em termos de coleta e uso: facilidade de coleta, método não invasivo e prático, conforto, menos preocupação com a coagulação e redução do risco de transmissão de doenças [11, 16]. Sabe-se que ambientes controlados favorecem a recuperação do DNA, no entanto, suspeita-se que a viabilidade de extração deste material em amostras salivares fora do ambiente oral pode apresentar diferenciações com o passar do tempo [7].

Diante disso, o objetivo do presente estudo foi identificar o tempo de viabilidade que o DNA apresenta na saliva humana quando esta se encontra em ambiente externo à cavidade bucal e se este DNA extraído da mesma apresentaria potencial de identificação humana.

## **2. MÉTODOS**

### **2.1 DESENHO DO ESTUDO**

Trata-se de um estudo laboratorial, do tipo transversal, de caráter quantitativo.

### **2.2 PARTICIPANTES**

A amostra foi recrutada por conveniência de forma não probabilística. Foram adotados como critérios de inclusão adultos saudáveis, de ambos os sexos (6 mulheres e 4 homens), com idade entre 20 e 35 anos, mediante a aceitação em participar do estudo. Os critérios de exclusão abrangeram participantes que tivessem utilizado produtos cosméticos na região dos lábios, se alimentado por pelo menos 30 minutos antes da coleta, fossem fumantes ou que fizeram uso de álcool e outras drogas nos últimos 15 dias. Essas restrições foram estabelecidas devido ao potencial de interferência dessas substâncias na técnica de extração do DNA.

## 2.3 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba (CCS/UFPB), sob o número de parecer 4.102.884. Todos os participantes participaram de forma voluntária e forneceram consentimento por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

## 2.4 ANÁLISE MOLECULAR

### *Coleta de amostras salivares*

Os voluntários foram instruídos a ficarem sentados e mascar um sialagogo, 10mm de silicone, por 3 minutos para estimular a produção de saliva. Após mascar, eles expeliram o sialagogo e a saliva separadamente em tubos Falcon estéreis livres de DNases.

Este procedimento foi repetido para gerar amostras correspondentes a diferentes intervalos de análise: imediatamente após a coleta (controle), e após 7, 15, 30 e 60 dias. Utilizando uma pipeta, cada amostra de saliva foi subdividida em cinco tubos menores, contendo 800 µL cada. Cada tubo foi identificado com a inicial do voluntário e o intervalo de exposição correspondente, de modo a evitar qualquer possibilidade de troca ou confusão entre as amostras. Em seguida, os tubos foram expostos em uma bancada localizada em uma sala fechada, sob iluminação artificial, com temperatura ambiente variando entre 25 e 31 graus Celsius. A sala apresentava circulação diária de pessoas, de modo a simular condições que podem ocorrer em cenas de crimes.

Após os períodos de análise, todas as amostras foram criopreservadas a -20°C na presença do reagente utilizado na extração e preservação do DNA (TRIzol™ Reagent). Salienta-se que para a coleta de todas as amostras salivares, o pesquisador utilizou equipamentos de proteção individual, incluindo luvas, máscaras, toucas, óculos de proteção e jaleco, a fim de evitar qualquer contaminação.

### *Extração, isolamento e purificação do DNA*

Ao finalizar cada período de exposição, a extração, isolamento e purificação das moléculas de DNA foi iniciada utilizando o método do Fenol:Clorofórmio:Álcool Isoamílico (TRIzol™). O TRIzol™ Reagent, é uma solução monofásica contendo

tiocianato de guanidina e fenol. Esta solução é amplamente utilizada para o isolamento de DNA, RNA e proteínas de diversas amostras biológicas, incluindo humanas, animais, plantas, leveduras, bactérias e vírus [17].

As respectivas amostras compostas por 800 µL de saliva foram imersas em 800 µL de TRIzol™ Reagent e, em seguida, centrifugadas e criopreservadas a -20°C. Após essa fase inicial, as substâncias amostrais em fase aquosa, que contém moléculas de DNA, foram recuperadas e transferidas para outro microtubo, sendo misturada com 1 µL álcool para precipitar as moléculas de DNA. Após uma nova centrifugação de 1200 rpm por 2 minutos, removeu-se o sobrenadante e inseriu 50 µL água ultrapura para ressuspender o material genético. [18,19].

Todo o procedimento de coleta de amostras e extração, isolamento, purificação de DNA foram realizados no Laboratório de Microbiologia Bucal do Núcleo de Medicina Tropical (NUMETROP) do Centro de Ciências da Saúde da UFPB.

#### *Análise do DNA*

A análise das moléculas de DNA foi realizada utilizando o termociclador PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em tempo real. Este equipamento é capaz de identificar a quantidade de uma sequência específica de gene presente em uma amostra [20, 21].

Em resumo, 8 µL de cada amostra foram retirados e misturados com 10 µL de mastermix e 2 µL de primer B-actin gene (Foward – AACCGCGAGAAGATGACCCAGATCATGTTT; Reverse - AGCAGCCGTGGCCATCTCTTGCTCGAAGTC). O primer tem a função de iniciar a duplicação das moléculas de DNA, enquanto o mastermix contém os reagentes necessários para a reação de PCR, incluindo corantes que marcam as fitas de DNA duplicadas pelo primer [22]. As condições de ciclagem térmica utilizadas para este primer foram as seguintes: 94° C por 2 minutos, 40 ciclos de 94° C por 45 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1,5 minutos, seguidos por um período final a 72°C por 10 minutos.

No equipamento PCR em tempo real, sinais de fluorescência mais intensos e detectados em menor tempo indicaram maiores quantidades iniciais de molécula de DNA na amostra. Assim, obteve-se o Cycle threshold (CT ou Limiar de Ciclo) para cada amostra, que representa quantos ciclos foram necessários para atingir o limiar

de fluorescência detectado pelo equipamento. Para o contexto forense, essas informações são valiosas porque indicam a presença e a quantidade de sequências genéticas específicas na amostra original.

A análise das moléculas de DNA foi conduzida no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal da Paraíba (LaBiMOL/CCM/UFPB), e as amostras foram descartadas de acordo com o protocolo estabelecido para descarte no referido laboratório.

Para análise do CT foi utilizado o método da expressão relativa. Os resultados obtidos foram compilados em uma planilha eletrônica, elaborada no software Excel (2016) e alimentada com o valor de CT a cada análise de acordo com a amostra e o tempo em questão. Calculou-se a variação dos valores de CT (Delta CT) de cada amostra em relação à média de seu grupo (0, 7, 14, 30 e 60 dias) e, posteriormente, a exponencial desta variação ( $2^{\Delta \text{CT}}$ ), uma vez que a cada ciclo da PCR ocorre duplicação da quantidade de moléculas de DNA. Com a intenção de facilitar a interpretação dos resultados, calculou-se a expressão relativa a partir do  $2^{\Delta \text{CT}}$ , que significa o percentual de DNA quantificado em relação a quantificação inicial obtida no tempo 0 dias.

## 2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores de  $2^{\Delta \text{CT}}$  foram analisados descritivamente, utilizando o *software* Jamovi (versão 2.3.21). Adicionalmente, a estatística inferencial foi utilizada, adotando-se nível de significância de 5%. O teste T para amostras emparelhadas foi aplicado para avaliar a diferença dos valores de  $2^{\Delta \text{CT}}$  entre os grupos (0, 7, 14, 30 e 60 dias) e de cada grupo em relação ao tempo inicial. Por fim, utilizou-se a Anova de Medidas Repetidas para comparação de todos os grupos.

## 3. RESULTADOS

A pesquisa foi composta pela amostra salivar de 10 voluntários analisadas nos intervalos de tempo de 0, 7, 14, 30 e 60 dias. A tabela 1 representa de forma descritiva os valores brutos de CT (Cycle Threshold) de cada amostra analisada.

**Tabela 1** – Valor bruto de CT (Cycle threshold) de cada amostra analisada

<b>Sexo</b>	<b>0 dias</b>	<b>7 dias</b>	<b>15 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>
F	38.59	34.24	--	--	33.99
M	32.74	31.48	--	32.22	33.53
F	34.35	32.96	30.28	33.79	35.32
F	36.47	33.47	34.27	35.96	33.58
M					
	31.31	32.48	32.23	32.22	33.56
M	31.67	23.82	31.61	37.80	30.94
F	33.83	33.65	34.6	31.42	32.53
F	29.77	32.83	34.4	--	33.45
F	34.28	32.82	35.15	31.67	35.76
M	--	34.86	31.01	35.28	34.86

F= Feminino; M=Masculino

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

A tabela 2 representa de forma descritiva a média e o desvio padrão (DP) da amostra em seus respectivos grupos.

**Tabela 2** - Média e Desvio-Padrão (DP) da diferença exponencial de Cycle threshold ( $2^{\Delta}$ -Delta CT) para cada um dos tempos avaliados.

	<b>0 dias</b>	<b>7 dias</b>	<b>14 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>
<b>Média</b>	1,54	1,20	1,22	1,20	1,21
<b>DP</b>	0,77	0,73	0,86	0,81	0,75

\*CT = Cycle Threshold = Limiar do Ciclo, referente a quantos ciclos foram necessários para atingir o mesmo limiar de fluorescência.

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

Os valores expostos abaixo (Tabela 3) representam os resultados obtidos quando da aplicação do Teste T para amostras emparelhadas na tentativa de avaliar diferença das médias entre os diferentes intervalos de tempo. Nenhuma diferença estatisticamente foi observada entre as variáveis, o que enfatiza o fato de que mesmo com o passar do tempo ainda é possível constatar a presença de DNA viável com potencial de identificação.

**Tabela 3** – Resultado (p-valor) da diferença das médias de 2<sup>Δ</sup>-Delta CT nos diferentes intervalos de tempo (Teste t para amostras emparelhadas).

	<b>0 dias</b>	<b>7 dias</b>	<b>14 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>
<b>0 dias</b>	-	0,936	0,645	0,051	0,924
<b>7 dias</b>	0,936	-	0,546	-	-
<b>14 dias</b>	0,645	0,546	-9	0,860	-
<b>30 dias</b>	0,051	-	0,860	-	0,365
<b>60 dias</b>	0,924	-	-	0,365	-

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

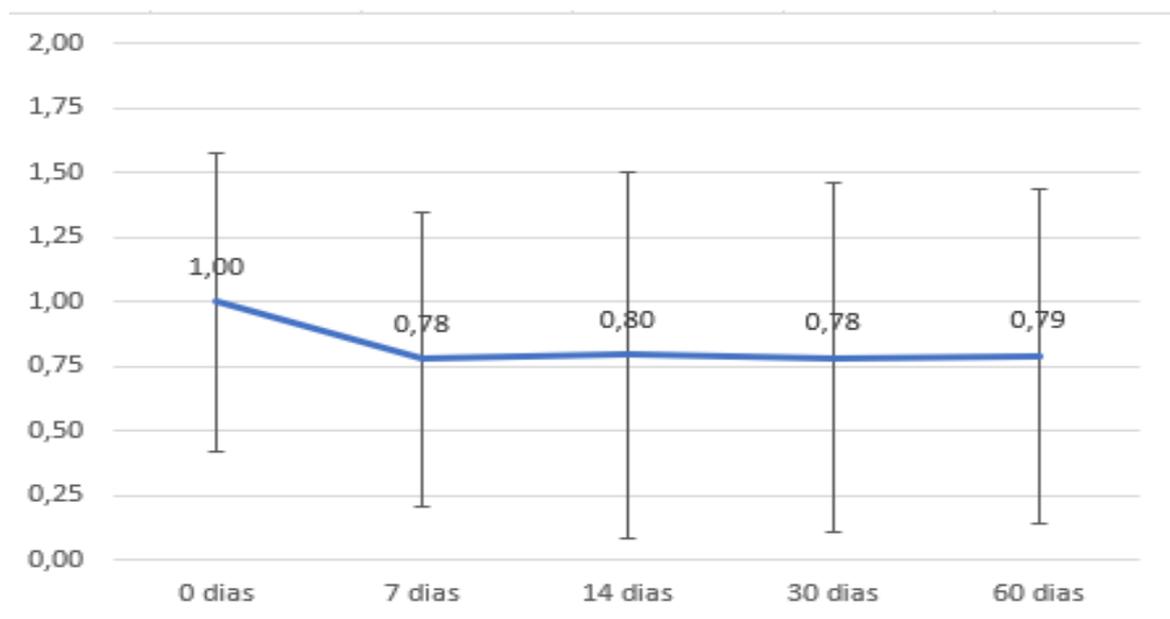
A Tabela 4 apresenta os valores de expressão relativa, evidenciando uma redução de aproximadamente 20% na quantidade de DNA identificável, uma diminuição que se manteve consistente em todas as análises a partir do 7º dia, fato este que é ilustrado na figura 1. Apesar das pequenas variações observadas nos grupos analisados, o teste de ANOVA para medidas repetidas não detectou diferenças estatisticamente significantes entre eles ( $p = 0,475$ ).

**Tabela 4** – Valores de Média e Desvio-padrão (DP) da expressão relativa nos diferentes grupos, indicando o percentual de perda da quantificação de DNA viável ao longo do tempo.

	<b>0 dias</b>	<b>7 dias</b>	<b>14 dias</b>	<b>30 dias</b>	<b>60 dias</b>
<b>Média</b>	1,00	0,78	0,80	0,78	0,79
<b>DP</b>	0,58	0,57	0,71	0,68	0,65

Fonte: Dados da pesquisa (2024).

**Figura 1** – Representação do percentual de DNA quantificado nos grupos distintos



Fonte: Dados da pesquisa (2024).

#### 4. DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi identificar o tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para a extração do DNA e avaliar a quantidade de DNA preservada para fins de identificação humana. Os resultados indicaram que o DNA salivar nas condições desse trabalho não sofreu alterações significativas ao longo dos diferentes períodos de exposição (0, 7, 14, 30, 60 dias), demonstrando boa estabilidade e capacidade de identificação.

Foi utilizado para este fim, a reação da polimerase em cadeia, pelo método de quantificação de ciclos a partir da emissão de fluorescência, o PCR em tempo real, visto que é o método mais sensível e amplamente utilizado em pesquisas dessa natureza. Além disso, permite a amplificação de regiões restritas do genoma humano, tornando possível a obtenção de informações mesmo em quantidades extremamente pequenas de DNA, e é classificada como uma estratégia simples e sensível em comparação com outros métodos, como o RFLP, Eletroforese e Southern Blotting [23, 24].

A saliva é descrita como uma fonte confiável de DNA humano e sua utilização em investigações forenses é interessante devido a sua facilidade de coleta de forma não invasiva [25]. Além disso, apresenta a vantagem de ter um *background* do material analisado (células, DNA, RNA e proteínas) e substâncias inibidoras muito menores e

menos complexas do que o sangue [4]. Há relatos que a força de tipagem de DNA de 1  $\mu$ L de saliva é igual a 10  $\mu$ L de sangue, sendo considerado um alto nível de confiança para discriminação de DNA [26].

Khare *et al.* [27] compararam a quantidade e qualidade das moléculas de DNA extraído de amostras de saliva com aquelas extraídas do sangue de 20 voluntários, utilizando o método da PCR, e tinham como objetivo avaliar a viabilidade da saliva como fonte alternativa para extração de DNA em contextos de identificação forense.

Os resultados demonstraram que, apesar da variação observada no rendimento do DNA com uma perda média de 25%, a saliva provou ser uma fonte viável para extração de DNA, adequada como material inicial para amplificação genética por PCR.

Embora o presente estudo não tenha adotado a mesma abordagem, ele utilizou um número reduzido de voluntários e empregou o mesmo método de extração de DNA a partir da saliva. Os resultados foram consistentes com os de Khare *et al.* [27], já que foi possível identificar DNA de forma bem-sucedida, com uma porcentagem similar à observada neste estudo, a partir das amostras de saliva."

Kuchler *et al.* [28] avaliaram o rendimento e a qualidade do DNA genômico obtido da saliva fresca e saliva armazenada por 4 e 8 dias à temperatura ambiente, utilizando o enxague bucal para coleta da amostra. Seus resultados indicaram que não houve diferença significativa e que as amostras representaram o mesmo genótipo após os diferentes períodos de armazenamento. Fato este também evidenciado no presente estudo, embora não tenha utilizado o mesmo protocolo de coleta.

No presente estudo, as amostras de saliva se apresentaram viáveis para fins de quantificação, sendo possível quantificá-las até 60 dias após a exposição ao meio. Esse achado está alinhado com a literatura que também relata resultados positivos quanto ao tempo de viabilidade do DNA em longo prazo. Zapico; Roca [29], realizaram um estudo para validar a detecção de amostras de 50  $\mu$ l de saliva depositadas em tecidos de denim, algodão e poliéster por meio de testes rápidos de análise do DNA em diferentes períodos de tempos (1, 3, 7, 14, 21, 30, 60, 90, 150 e 180 dias) utilizando o PCR Convencional (análise de bandas em gel). Concluíram que, embora a intensidade das bandas varie entre os tipos de tecido e ao longo do tempo, as manchas de saliva até 6 meses após a deposição permanecem espécimes válidos com DNA completamente recuperável e identificável. Desse modo, pode-se

considerar que a qualidade da saliva para fins genéticos permanece boa mesmo quando exposta a fatores externos.

Kim *et al.* [30] objetivaram determinar a quantidade e qualidade do DNA extraído de uma pastilha de impressão de mordida dentária imediatamente após a impressão e após 12 meses de armazenamento em casa. Os autores hipotetizaram que a pastilha poderia reter DNA suficiente com marcadores genéticos adequados para possibilitar uma correspondência de identificação, e seus resultados confirmaram essa hipótese mesmo após o período de 12 meses.

Corroborando com isso, Corradini *et al.* [31] avaliaram a recuperabilidade e integridade do DNA da saliva armazenada por 11 anos em cartões FTA (Flinders Technology Associates), que preservam o material genético em uma base de armazenamento a seco e tornam os patógenos inativos após o contato [32]. A estabilidade do DNA a longo prazo pode ter várias razões, dentre elas o envolvimento do controle de temperatura, a presença de ácidos e de microrganismos [15, 33].

Alinhado a isso, Sirker; Schneider; Gomes [34] em seu estudo visaram monitorar e comparar a degradação de ácidos nucleicos em amostras de sangue, saliva e sêmen humanos em três diferentes concentrações, expostas a condições secas e úmidas durante um período de 17 meses. Os resultados indicaram que a degradação dos ácidos nucleicos varia conforme as condições ambientais. Em particular, a umidade contribuiu significativamente para a degradação, sendo mais pronunciada em manchas de sangue e sêmen em comparação com a saliva. No presente estudo, foram aplicadas metodologias distintas: ao invés de usar saliva seca e o equipamento PCR de ponto final duplex, utilizou-se a saliva líquida e a reação de PCR em tempo real, e não houve alteração no ambiente, pois as amostras permaneceram expostas no mesmo local. Entretanto, mesmo com essas diferenças, a saliva mostrou em ambos os estudos a sua eficiência como um substrato para a identificação humana e grande poder de reprodutibilidade.

Tais achados destacam a importância do DNA encontrado na saliva e seu uso em vários contextos forenses. Entretanto, é importante salientar que existem diferentes métodos e protocolos para coleta, extração e armazenamento de DNA, evidenciando a falta de uma diretriz padrão para a análise do DNA a partir da saliva [7]. Isso não diminui o potencial do fluido salivar como fonte de material genético, bem como para identificação humana. Sugere-se que futuros estudos considerem o uso de

uma amostragem maior, períodos superiores a 60 dias e o emprego de situações mais realistas de cenas de crimes para verificar a possibilidade de uma análise mais robusta e representativa da viabilidade do uso forense. Além disso, recomenda-se a investigação dos motivos e possíveis intervenções para mitigar a redução das moléculas de DNA ao longo do tempo, bem como a aplicação de técnicas de sequenciamento genético para avaliar a integridade e a qualidade do DNA extraído, permitindo uma caracterização mais detalhada e precisa do material genético disponível.

## 5. CONCLUSÃO

O presente estudo enfatiza a promissora utilidade da saliva como fonte de DNA para identificação humana em contextos forenses, além de destacar a preservação do material genético ao longo de períodos variados de exposição ao ambiente. Embora tenha sido observada uma diminuição de cerca de 20% nas moléculas de DNA viáveis, esse valor não apresentou diferença estatisticamente significativa. Esses resultados estão alinhados com pesquisas anteriores e ressaltam a estabilidade relativa da quantificação de DNA em diversas condições experimentais, oferecendo uma base sólida para investigações futuras e aplicações práticas na área da Odontologia Legal.

## REFERÊNCIAS

- [1] J. Ata-Ali, F. Ata-Ali. Forensic dentistry in human identification: A review of the literature. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 6 (2) (2014), e162-167. <https://doi.org/10.4317/jced.51387>.
- [2] M.H.G. Veríssimo, M.A. Rodrigues, W.F.S. Nóbrega, D.V. Barbosa, O.D.M.M. Neto, B.A.S. Dias, G.C.B. Silva. O conhecimento da anatomia versus a Odontologia Legal: Uma revisão integrativa sobre o processo de identificação humana, *Pesquisa, Sociedade e Desenvolvimento*, 10 (7) (2021), e9310716421 - e9310716421. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16421>
- [3] E. Debortoli, J. Tapparelo, M. Durlo, M. Junior, V. Donini, F. Tasca, M. Takemoto. Odontologia Legal: Reconhecimento e Identificação humana, *Rev Tecnológica*, 9 (1) (2019), 13-22.
- [4] M. L. Gioster-Ramos, E. C. A. Silva, C. R. Nascimento, C. M. S. Fernandes, M. C. Serra. Técnicas de identificação humana em Odontologia Legal. *Research, Society and Development*, 10(3) (2021), e20310313200 - e20310313200. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13200>

- [5] R. P. Moreira, A. Z. V. M. Freitas. Dicionário de odontologia legal. In: Dicionário de odontologia legal. (1999), p. 165.
- [6] P. Duangto, A. Janhom, S. Prasitwattanaseree, A. Iamaroon. New equations for age estimation using four permanent mandibular teeth in Thai children and adolescents. *International Journal of Legal Medicine*, 132 (2018), 1743-1747. <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1805-9>
- [7] R. D. Andrade, I. P. de Medeiros, T. N. Falcão, J. B. M. Nóbrega, B. M. Santiago. Tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para fins de extração e purificação do DNA: uma revisão de escopo. *Revista Brasileira de Odontologia Legal*, 10 (2) (2023), e20310313200. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13200>
- [8] R. A. Kaleelullah, P. Hamid. Forensic odontology, a boon and a humanitarian tool: A literature review. *Cureus*, 12(3) (2020), e7400. <https://doi.org/10.7759/cureus.7400>
- [9] S. D. Malik, J. P. Pillai, U. Malik. Forensic genetics: Scope and application from forensic odontology perspective. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 26(4) (2022), 558-563. [https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp\\_341\\_21](https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_341_21)
- [10] J. Muruganandhan, G. Sivakumar. Practical aspects of DNA-based forensic studies in dentistry. *Journal of forensic dental sciences*, 3(1) (2011), 38-45. <https://doi.org/10.4103/0975-1475.85295>
- [11] S. A. Langie, M. Moisse, K. Declerck, G. Koppen, L. Godderis, W. Vanden Berghe, P. De Boever. Salivary DNA methylation profiling: aspects to consider for biomarker identification. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 121 (2017), 93-101. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12721>
- [12] H. L. D. O. Lima, U. V. D. Medeiros. Aplicabilidade do DNA em odontologia forense. *Odontologia Clínico-Científica (Online)*, 14(4) (2015), 801-808.
- [13] T. Sijen, S. Harbison, S. On the identification of body fluids and tissues: a crucial link in the investigation and solution of crime. *Genes*, 12(11) (2021), 1728. <https://doi.org/10.3390/genes12111728>
- [14] E. N. Hanssen, K. H. Liland, P. Gill, L. Snipen. Optimizing body fluid recognition from microbial taxonomic profiles. *Forensic Science International: Genetics*, 37 (2018), 13-20. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.07.012>
- [15] Ishikawa, N., Nakamura, Y., Miura, Y., Kuroda, H., Kitamura, K., & Hashimoto, M. Influence of the amount of saliva deposition and time elapsed after deposition on bite mark analysis. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 2023, 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12024-023-00742-y>
- [16] J. M. De Aquino, S. Neto, D. N. S. Farias, J. B. R. De Souza, A. R. C. Batista, J. K. B. Dos Santos, J. F. T. Neto. A saliva como sendo um meio de diagnósticos: uma revisão de literatura. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, (41) (2020), e2506-e2506. <https://doi.org/10.25248/reas.e2506.2020>

- [17] D. C. Rio, M. Ares, G. J. Hannon, T. W. Nilsen. Purification of RNA using TRIzol (TRI reagent). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6) (2010), <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5439>
- [18] J. Emett, R. David, J. McDaniel, S. McDaniel, K. Kingsley. Comparison of DNA Extracted from Pediatric Saliva, Gingival Crevicular Fluid and Site-Specific Biofilm Samples. *Methods and Protocols*, 3(3) (2020), 48. <https://doi.org/10.3390/mps3030048>
- [19] A. M. Eychner, K. M. Schott, K. M. Elkins, Assessing DNA recovery from chewing gum. *Medicine, Science and the Law*, 57(1) (2017), 7-11. <https://doi.org/10.1177/0025802416676413>
- [20] C. McDonald, D. Taylor, A. Linacre. PCR in Forensic Science: A Critical Review. *Genes*, 15(4) (2024), 438. <https://doi.org/10.3390/genes15040438>
- [21] A. Singh, V. Sahajpal,, M. Thakur, L. K. Sharma, K. Chandra, D. Bhandari, A. Sharma. Applicability of human-specific STR systems, GlobalFiler™ PCR Amplification Kit, Investigator 24plex QS Kit, and PowerPlex® Fusion 6C in chimpanzee (*Pan troglodytes*). *BMC research notes*, 14(1) (2021), 212. <https://doi.org/10.1186/s13104-021-05632-6>
- [22] S. P. M. Carvalho, A. Sales-Peres, L. A. Ribeiro-Bicudo, R. H. A. D Silva. Quality evaluation of DNA obtained from stored human saliva and its applicability to identification in Forensic Dentistry. *Revista Odonto Ciência*, 25 (2010), 48-53. <https://doi.org/10.1590/S1980-65232010000100010>
- [23] D. A. Power, S. J. Cordiner, J. A. Kieser, G. R. Tompkins, J. Horswell. PCR-based detection of salivary bacteria as a marker of expired blood. *Science & Justice*, 50(2) (2010), 59-63. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2009.04.006> Obtenha direitos e conteúdo
- [24] G. Sujatha, J. Muruganandhan, V. V. Priya, M. R. Srinivasan. Determination of reliability and practicality of saliva as a genetic source in forensic investigation by analyzing DNA yield and success rates: A systematic review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology*, 31(3) (2019), 218-227. <https://doi.org/10.1016/j.ajoms.2018.12.004>
- [25] J. M. De Aquino, S. Neto, D. N. S. Farias, J. B. R. De Souza, A. R. C. Batista, J. K. B. Dos Santos, J. F. T. Neto. A saliva como sendo um meio de diagnósticos: uma revisão de literatura. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, (41) (2020), e2506-e2506. <https://doi.org/10.25248/reas.e2506.2020>
- [26] D. Sweet, G. G. Shutler. Analysis of salivary DNA evidence from a bite mark on a body submerged in water. *Journal of forensic sciences*, 44(5) (1999), 1069-1072. <https://doi.org/10.1520/JFS12045J>
- [27] P. Khare, V. Raj, S. Chandra, S. Agarwal. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. *Journal of forensic dental sciences*, 6(2) (2014), 81-85. <https://doi.org/10.4103/0975-1475.132529>
- [28] E. C. Küchler, P. N. Tannure, P. Falagan-Lotsch, T. S. Lopes, J. M. Granjeiro, L. M. F. Amorim. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA

suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. *Journal of Applied Oral Science*, 20 (2012), 467-471. <https://doi.org/10.1590/S1678-77572012000400013>

[29] S. Zapico, G. Roca. A spit in time: Identification of saliva stains and assessment of total DNA recovery up to 180 days after deposition. *Forensic Science, Medicine and Pathology*, 20(2) (2023), 552-559. <https://doi.org/10.1007/s12024-023-00691-6>

[30] M. Kim, K. Siegler, J. Tamariz, T. Caragine, J. Fernandez, M. Daronch, A. Moursi; Identification and long term stability of DNA captured on a dental impression wafer. *Pediatric dentistry*, 34(5) (2012), 373-377.

[31] B. Corradini, M. Alù, M., E. Magnanini, M. E. Galinier, E. Silingardi, E. The importance of forensic storage support: DNA quality from 11-year-old saliva on FTA cards. *International journal of legal medicine*, 133 (2019), 1743-1750. <https://doi.org/10.1007/s00414-019-02146-6>

[32] R. H. Kraus, P. Van Hooft, J. Waldenström, N. Latorre-Margalef, R. C. Ydenberg, H. H. Prins. Avian influenza surveillance with FTA cards: field methods, biosafety, and transportation issues solved. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* (54) (2011), e2832. <https://doi.org/10.3791/2832>

[33] A. P. Scorsato, J. E. Telles. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 47 (2011), 541-548. <https://doi.org/10.1590/S1676-24442011000500008>

[34] Sirker, P. M. Schneider, I. Gomes. A 17-month time course study of human RNA and DNA degradation in body fluids under dry and humid environmental conditions. *International journal of legal medicine*, 130 (2016), 1431-1438. <https://doi.org/10.1007/s00414-016-1373-9>

## 6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A análise de DNA salivar tem ganhado importância crescente no campo da odontologia forense, sendo uma alternativa prática e não invasiva em investigações criminais (HANSSEN *et al.*, 2018; ISHIKAWA *et al.*, 2023; LANGIE *et al.*, 2016). Os dois artigos oferecem análises específicas ao explorar as contribuições do DNA extraído da saliva, tanto em termos de durabilidade quanto de métodos de extração.

O Artigo 1, trata-se de uma revisão de escopo que mapeou as evidências científicas existentes acerca do tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para fins de extração e purificação de DNA, com foco na aplicação forense. Este foi publicado na Revista Brasileira de Odontologia Legal (RBOL), uma revista conceituada, o que reforça a importância do estudo e sua contribuição para a área forense. A metodologia utilizada abrangeu diversas bases de dados, inclusive a literatura cinzenta, e incluiu 6 estudos que verificaram a viabilidade do DNA salivar em diferentes substratos, como bitucas de cigarro, próteses dentárias, pastilhas de compressão dentária, cavidade oral e cartões de FTA. Os resultados mostraram que o DNA pode permanecer viável por até 11 anos, com qualidade e quantidade variando dependendo do protocolo de coleta e armazenamento.

Esses dados corroboram com a revisão sistemática de Sujatha *et al.* (2019), em que foi demonstrado que a saliva é uma fonte confiável de DNA para métodos de amplificação por PCR e genotipagem, independentemente das condições ambientais, e que o DNA permaneceu viável para extração no período de tempo entre três dias a dez aos.

Na revisão de escopo foi possível verificar que a variedade de protocolos de coleta e armazenamento de material biológico, demonstra que não há uma diretriz padrão para análise de DNA a partir da saliva, e que não foi possível definir qual o limite máximo em que a saliva deixa de ser um fator auxiliador na busca genética por não haver estudos que identificaram com quanto tempo o material deixa de ser viável.

De forma complementar a essas lacunas encontradas no primeiro artigo, o segundo artigo abordou um estudo experimental com análise da viabilidade do DNA salivar em ambiente externo, utilizando amostras de saliva de voluntários. As amostras foram analisadas em cinco períodos diferentes, de imediato até 60 dias após a coleta. A perda de DNA foi de aproximadamente 20% após o 7º dia, mas essa redução não mostrou significância estatística ao longo do tempo. O estudo utilizou

uma técnica específica com TRIzol™ e quantificou o DNA pelo equipamento PCR em tempo real com utilização do primer B-actin gene, adotando uma metodologia distinta dos estudos abordados na revisão de escopo.

Esses resultados estão alinhados com o estudo de Khare et al. (2014), em que objetivaram também avaliar a viabilidade da saliva como fonte alternativa para extração de DNA em contextos de identificação forense. Em relação a metodologia abordada, os autores compararam quantidade e qualidade de DNA extraído de amostras salivares com aquelas extraídas do sangue de 20 voluntários utilizando o método da PCR. Seus resultados demonstraram que, apesar da variação observada no rendimento do DNA (variando entre 28,5 µg/ml e 61,5 µg/ml), a saliva provou ser uma fonte viável para extração de DNA, adequada como material inicial para amplificação genética por PCR.

Os dois artigos oferecem contribuições significativas para a odontologia forense. O estudo 1, pela característica de uma revisão de escopo, foi possível compreender o estado da arte e verificar que diversas técnicas de extração e análise de DNA, incluindo a técnica do Chelex, além diferentes equipamentos de PCR podem ser utilizados. O artigo 2 complementa essas informações com um estudo experimental que se concentra em uma técnica específica de extração e quantificação, TRIzol™ e equipamento PCR em tempo real, respectivamente.

Como limitações, é possível indicar o número reduzido de estudos sobre a temática e a variedade de protocolos de coleta e armazenamento de material biológico, apresentados no artigo de revisão de escopo, o que demonstra a falta de uma diretriz padrão para análise de DNA a partir da saliva. Isso não diminui o potencial do fluido salivar como fonte de material genético, bem como para identificação humana. Os resultados do artigo 2 indicaram que a saliva, mesmo exposta a fatores ambientais por até 60 dias, permanece viável para identificação humana.

Sugere-se que futuros estudos experimentais considerem o uso de uma amostragem maior para verificar a possibilidade de uma análise mais robusta e representativa da viabilidade do uso forense. Além disso, é recomendado a realização de pesquisas que validem técnicas de extração e quantificação de DNA salivar mais eficientes, com maior praticidade e custo reduzido. E por fim, recomenda-se a investigação dos efeitos da exposição por um período superior a 60 dias, como

também considerar possíveis intervenções para mitigar possíveis reduções das moléculas de DNA ao longo do tempo.

## **7. CONCLUSÃO**

Os dois estudos se complementam ao explorar diferentes aspectos da viabilidade do DNA salivar, oferecendo uma visão ampla sobre o potencial da saliva como uma ferramenta para identificação humana na prática da Odontologia Forense, em particular, e das Ciências Forenses, como um todo. Enquanto o primeiro artigo aborda um escopo mais amplo e destaca a importância de protocolos adequados de coleta e armazenamento, o segundo traz uma análise técnica específica sobre a estabilidade do DNA em espaços de tempo. Juntos, esses achados ampliam as possibilidades de uso da saliva em investigações criminais, seja para casos recentes ou históricos, e fortalecem sua posição como uma alternativa viável ao sangue e outros fluidos corporais nas Ciências Forenses.

## REFERÊNCIAS

Ambers A, Wiley R, Novroski N, Budowle B. Direct PCR amplification of DNA from human bloodstains, saliva, and touch samples collected with microFLOQ® swabs. *Forensic Sci Int* [Internet]. Jan 2018;32:80-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2017.10.010>

Andrade RD, Medeiros IP, Falcão TN, Nóbrega JB, Santiago BM. Tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para fins de extração e purificação do DNA: uma revisão de escopo. *Rev Bras Odontol Leg* [Internet]. 2023; 55-63. Disponível em: <https://doi.org/10.21117/rbol-v10n22023-487>

Ata-Ali J, Ata-Ali F. Forensic dentistry in human identification: A review of the literature. *J Clin Exp Dent* [Internet]. 2014: e162-7. Disponível em: <https://doi.org/10.4317/jced.51387>

Bhattarai KR, Kim HR, Chae HJ. Compliance with Saliva Collection Protocol in Healthy Volunteers: Strategies for Managing Risk and Errors. *Int J Med Sci* [Internet]. 2018;15(8):823-31. Disponível em: <https://doi.org/10.7150/ijms.25146>

Choi IG, Duailibi-Neto EF, Beaini TL, da Silva RL, Chilvarquer I. The Frontal Sinus Cavity Exhibits Sexual Dimorphism in 3D Cone-beam CT Images and can be Used for Sex Determination. *J Forensic Sci* [Internet]. 2017; 63(3):692-8. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13601>

De Oliveira, T. S., De Moraes Filho, A. V. Técnicas de Biologia Molecular Utilizadas para Desvendar Crimes. *Saúde & Ciência Em Ação* [Internet]. 2018; 4(1), 89-102.

E. Debortoli, J. Tapparelo, M. Durlo, M. Junior, V. Donini, F. Tasca, M. Takemoto. Odontologia Legal: Reconhecimento e Identificação humana, *Rev Tecnológica*, 9 (1) (2019), 13-22.

Duangto P, Janhom A, Prasitwattanaseree S, Iamaroon A. New equations for age estimation using four permanent mandibular teeth in Thai children and adolescents. *Int J Leg Med* [Internet]. 3 mar 2018 [citado 10 out 2024];132(6):1743-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00414-018-1805-9>

Gioster-Ramos ML, Silva EC, Nascimento CR, Fernandes CM, Serra MD. Técnicas de identificação humana em Odontologia Legal. Res Soc Dev [Internet]. 12 mar 2021;10(3):e20310313200. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i3.13200>

Hanssen EN, Liland KH, Gill P, Snipen L. Optimizing body fluid recognition from microbial taxonomic profiles. Forensic Sci Int [Internet]. Nov 2018 ;37:13-20. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.07.012>

Khare, Parul et al. Quantitative and qualitative assessment of DNA extracted from saliva for its use in forensic identification. Journal of Forensic Dental Sciences, 2014; 6 (2), 81. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0975-1475.132529>.

Küchler EC, Tannure PN, Falagan-Lotsch P, Lopes TS, Granjeiro JM, Amorim LM. Buccal cells DNA extraction to obtain high quality human genomic DNA suitable for polymorphism genotyping by PCR-RFLP and Real-Time PCR. J Appl Oral Sci [Internet]. Ago 2012; 20(4):467-71. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1678-77572012000400013>

Langie SA, Moisse M, Declerck K, Koppen G, Godderis L, Vanden Berghe W, Drury S, De Boever P. Salivary DNA Methylation Profiling: Aspects to Consider for Biomarker Identification. Basic Amp Clin Pharmacol Amp Toxicol [Internet]. 10 fev 2017;121:93-101. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/bcpt.12721>

Lima MA, Cunha FA, Fujita T. RECONHECIMENTO HUMANO POR MEIO DA ODONTOLOGIA LEGAL – UMA REVISÃO. Rev Ibero Am Humanidades Cienc Educ [Internet]. 30 nov;8(11):69-87. Disponível em: <https://doi.org/10.51891/rease.v8i11.7577>

H. L. D. O. Lima, U. V. D. Medeiros. Aplicabilidade do DNA em odontologia forense. Odontologia Clínico-Científica (Online), 14(4) (2015), 801-808.

Malik S, Pillai J, Malik U. Forensic genetics: Scope and application from forensic odontology perspective. J Oral Maxillofac Pathol [Internet]. 2022;26(4):558. Disponível em: [https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp\\_341\\_21](https://doi.org/10.4103/jomfp.jomfp_341_21)

Moreira, RS; Freitas, AZVM. "Dicionário de odontologia legal." Dicionário de odontologia legal. 1999. 165-165.

Muruganandhan J, Sivakumar G. Practical aspects of DNA-based forensic studies in dentistry. J Forensic Dent Sci [Internet]. 2011; 3(1):38. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0975-1475.85295>

Power DA, Cordiner SJ, Kieser JA, Tompkins GR, Horswell J. PCR-based detection of salivary bacteria as a marker of expired blood. Sci Amp Justice [Internet]. Jun 2010;50(2):59-63. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2009.04.006>

Silva VR, Terada AS, Silva RH. A importância do conhecimento especializado do cirurgião dentista nas equipes de perícia oficial do Brasil. RBOL Rev Bras Odontol Leg [Internet]. 2015; 2(1). Disponível em: <https://doi.org/10.21117/rbol.v2i1.22>

Silva Neto JM, Farias DN, Souza JB, Batista AR, Santos JK, Trujillo AM, Tenório Neto JF. A saliva como sendo um meio de diagnósticos: uma revisão de literatura. Rev Eletronica Acervo Saude [Internet]. 28 fev 2020;(41):e2506. Disponível em: <https://doi.org/10.25248/reas.e2506.2020>

SILVA RF, FRANCO A, MACHADO CEP. Antropologia Forense no contexto de identidade e identificação humana. In: MACHADO et al. **Tratado de Antropologia Forense- Fundamentos e Metodologias aplicadas à Prática Pericial**. São Paulo: Editora Millennium, 2022.

J. P. Vanrelli. Odontologia legal e Antropologia Forense. 3ª. Ed. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 2019.

Silva Neto JM, Farias DN, Souza JB, Batista AR, Santos JK, Trujillo AM, Tenório Neto JF. A saliva como sendo um meio de diagnósticos: uma revisão de literatura. Rev Eletronica Acervo Saude [Internet]. 28 fev 2020;(41):e2506. Disponível em: <https://doi.org/10.25248/reas.e2506.2020>

Sujatha, G., et al. Determination of reliability and practicality of saliva as a genetic source in forensic investigation by analyzing DNA yield and success rates: A systematic review. Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology 2019; 31.3, 218-227.

Valarini, N., Maciel, S. M., Poli-Frederico, R. C. Biologia molecular na odontologia: métodos comumente utilizados na cariologia. *Odontologia Clínico-Científica (Online)*, 2011; 10(1), 19-23.

Veríssimo MH, Rodrigues MA, Nóbrega WF, Barbosa DV, Neto OD, Dias BA, Oliveira JP, Santos LR, Silva JE, Almeida JL, Ferreira MD, Melo PG, Leal TM, Silva MA, Silva GC. O conhecimento da anatomia versus a Odontologia Legal: Uma revisão integrativa sobre o processo de identificação humana. *Res Soc Dev* [Internet].

22 jun 2021;10(7):e9310716421. Disponível em: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i7.16421>

## **APÊNDICE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA-UFPB  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE-CCS  
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA E ODONTOLOGIA SOCIAL-DCOS

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Prezado (a) Senhor (a),

Esta pesquisa é sobre TEMPO DE VIABILIDADE DA SALIVA HUMANA EM MEIO EXTERNO PARA FINS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA a partir da amostra de saliva por meio da mascagem de sialogogos para cada período em questão, por cada participante, que serão recolhidos para posterior análise genética nos períodos de imediato, 7,15,30 e 60 dias. Nosso objetivo é identificar o tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para a extração do DNA e avaliar a preservação do DNA para a possibilidade de identificação humana.

A pesquisa partirá da análise das coletas feitas nas amostras dos participantes nos períodos de imediato, 7, 15, 30 e 60 dias utilizando o espectrofotômetro e por meio de análise em gel de agarose 1,2% com SYBR® safe submetido a eletroforese, que verificará a qualidade do material genético possibilitando analisar se este DNA com o decorrer do tempo continua expressando fatores genéticos. As amostras não terão a identificação individual de cada participante e os dados individuais não serão divulgados em nenhuma hipótese, mas os resultados da pesquisa contribuirão para a identificação da quantidade de tempo que a saliva humana quando fora do ambiente oral pode fornecer informações genéticas para identificação humana, oferecendo, assim, subsídios para a área da Odontologia Forense. Por isso, é importante sua colaboração mediante a assinatura desse documento e execução do procedimento acima explicado.

Esclarecemos que os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Dessa forma, sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Com relação aos riscos ou desconforto, estes podem ocorrer pela possibilidade de constrangimento do

participante no ato de mascar e expelir os sialogogos e saliva para obtenção das amostras. Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição. Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Caso necessite de maiores informações, você pode entrar em contato, a qualquer tempo, com a pesquisadora responsável (Bianca Marques Santiago, Rua Silvino Chaves 1061/1401, Manaíra, CEP: 58.038-420; Fones:(83) 3216-7251,98827-9587; email:bianca.santiago@yahoo.com.br) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde (Campus I, Cidade Universitária, Bloco Arnaldo Tavares, sala 812,1º andar; Fone: (83) 3216-7791; e-mail:eticaccsufpb@hotmail.com).

Eu, \_\_\_\_\_, fui informado sobre o que o pesquisador deseja fazer e porque precisa da minha colaboração e entendi a explicação. Com isso, concordo em participar do estudo, sabendo que não vou ganhar nada e que posso desistir de participar quando quiser. Estou recebendo uma cópia deste documento, assinado, e irei guardá-lo.

João Pessoa, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2023.

\_\_\_\_\_  
Participante

\_\_\_\_\_  
Pesquisador responsável

## ANEXO

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA PARAÍBA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** TEMPO DE VIABILIDADE DA SALIVA HUMANA EM MEIO EXTERNO PARA FINS DE EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA

**Pesquisador:** Bianca Marques Santiago

**Área Temática:** Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

**Versão:** 2

**CAAE:** 30984120.4.0000.5188

**Instituição Proponente:** Centro de Ciência da Saúde

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.102.884

##### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de uma pesquisa experimental em vitro, que contará com a participação voluntária de 10 alunos do curso de odontologia da UFPB cuja pesquisadora pretende identificar o tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para a extração do DNA e avaliar a preservação do DNA para a possibilidade de identificação humana.

##### **Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Identificar o tempo de viabilidade da saliva humana em meio externo para a extração do DNA e avaliar a preservação desse DNA para a possibilidade de identificação humana.

##### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Os riscos previsíveis consistem na possibilidade de constrangimento e/ou desconforto do participante no ato de mascar e expelir os sialogogos e saliva para obtenção das amostras. Para tanto, os voluntários serão esclarecidos sobre os riscos, benefícios e importância da pesquisa, bem como sobre todos os procedimentos de coleta da saliva, a fim de que possam discernir sobre tais riscos e decidir de forma voluntária sua participação. A possibilidade de contaminação da equipe de pesquisadores seria também um risco que será minimizado com a utilização de

**Endereço:** UNIVERSITARIO S/N

**Bairro:** CASTELO BRANCO

**CEP:** 58.051-900

**UF:** PB

**Município:** JOAO PESSOA

**Telefone:** (83)3216-7791

**Fax:** (83)3216-7791

**E-mail:** comitedeetica@ccs.ufpb.br

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA PARAÍBA



Continuação do Parecer: 4.102.884

equipamentos de proteção individual (avental, gorro, máscara, óculos de proteção, protetor facial, luvas).

**Benefícios:**

Esta pesquisa irá contribuir para a identificação da quantidade de tempo que a saliva humana quando fora do ambiente oral pode fornecer informações genéticas para identificação humana oferecendo, assim, subsídios para a área da Odontologia Forense.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante e metodologia bem fundamentada.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória atendem aos requisitos formais do CEP, uma vez que a pesquisadora atendeu as recomendações do CEP.

**Recomendações:**

Não há recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sou de parecer favorável a execução desse projeto de pesquisa, salvo melhor juízo.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou a execução do referido projeto de pesquisa. Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à submissão do Relatório Final na Plataforma Brasil, via Notificação, para fins de apreciação e aprovação por este egrégio Comitê.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1544469.pdf	02/06/2020 18:31:51		Aceito
Outros	cadastro_Bianca_NUMETROP.pdf	02/06/2020 18:31:25	Bianca Marques Santiago	Aceito
Folha de Rosto	Folharosto_TempoViabilidadeSalivaHumana_PIBIC20202021.pdf	23/04/2020 10:12:02	Bianca Marques Santiago	Aceito
Outros	CERTIDAO_DCOS_TempoViabilidadeS	22/04/2020	Bianca Marques	Aceito

Endereço: UNIVERSITÁRIO S/N  
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900  
UF: PB Município: JOAO PESSOA  
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br

UFPB - CENTRO DE CIÊNCIAS  
DA SAÚDE DA UNIVERSIDADE  
FEDERAL DA PARAÍBA



Continuação do Parecer: 4.102.884

Outros	alivaHumana.pdf	20:13:15	Santiago	Aceito
Outros	anuencia_Coordenacao_PIBIC_RAYLE_20202021.pdf	22/04/2020 20:12:49	Bianca Marques Santiago	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_Rayle_2020_Bianca.pdf	22/04/2020 20:12:20	Bianca Marques Santiago	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Rayle_BIANCA_versaoFINAL.pdf	22/04/2020 20:11:57	Bianca Marques Santiago	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JOAO PESSOA, 22 de Junho de 2020

---

Assinado por:  
Eliane Marques Duarte de Sousa  
(Coordenador(a))

Endereço: UNIVERSITARIO S/N  
Bairro: CASTELO BRANCO CEP: 58.051-900  
UF: PB Município: JOAO PESSOA  
Telefone: (83)3216-7791 Fax: (83)3216-7791 E-mail: comitedeetica@ccs.ufpb.br