



DNA: VIABILIDADE TÉCNICA NO PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO EM ALIMENTOS COM MARCAS DE MORDEDURAS

Ana Carolina Pismel Lobo¹, Lynkon Aguero Camargo², Marcelo Augusto Amaral³

RESUMO: A saliva depositada sobre superfícies tem sido considerada importante fonte de DNA para identificação humana, principalmente pela PCR (Cadeia em Reação Polimerase), técnica em que pequenas quantidades de DNA são amplificadas exponencialmente. Sabendo-se que preservação do material genético varia entre as diversas superfícies em que é depositado, este estudo teve como objetivo avaliar a preservação do DNA sobre alimentos mordidos, no caso maçãs do tipo Gala. As maçãs são facilmente encontradas nas cenas de crimes e as do tipo Gala são as mais produzidas e comercializadas no Brasil. Para tanto, dez sujeitos de pesquisa do sexo masculino, não fumantes e com idade entre 18 e 23 anos foram submetidos inicialmente à técnica do *swab* bucal único (Grupo A) e, posteriormente, morderam cada um duas maçãs, cuja coleta ocorreu por meio da técnica do duplo *swab*, dividida em dois períodos: coleta imediata (Grupo B) e cinco dias após a mordida (Grupo C). Em 100% das amostras foi possível realizar a amplificação por PCR e análise por STRs (*Short Tandem Repeats*), chegando-se a compatibilidade de 100% entre as amostras dos Grupos A, B e C. Infere-se, portanto, a presença DNA salivar em quantidade e qualidade suficiente para identificação genética humana, mesmo que em condições de armazenamento não ideais.

PALAVRAS-CHAVE: Antropologia Forense; DNA; Saliva.

1 INTRODUÇÃO

Todo o crime que produz vestígios exige que se realize uma perícia, geralmente solicitada à Polícia Técnico-Científica pelo delegado responsável do caso. A Polícia Técnico-Científica se subdivide em Instituto Médico-Legal e Instituto de Criminalística, em que a primeira se encarrega de realizar exame direta e exclusivamente no corpo da vítima (viva ou morta) e a segunda realiza exame em objetos obtidos nos locais dos crimes

Investigar o local do crime é imprescindível, pois é a partir dos achados que teremos certeza se houve ou não uma infração penal (há possibilidade de ser apenas um acidente), poderemos qualificar a infração (o quanto o réu planejou, idealizou e realizou o crime), poderemos identificar elementos que identifiquem o autor e, ainda, perpetuar e

¹ Cirurgiã Dentista graduada pelo Centro Universitário de Maringá – Cesumar, Maringá-PR. Ex-Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). carolpismellobo@hotmail.com

² Acadêmico do Curso de Odontologia do Centro Universitário de Maringá – Cesumar. Bolsista do Programa de Bolsas de Iniciação Científica do Cesumar (PROBIC). lynkoncamarago@hotmail.com

³ Orientador, Docente Mestre do Centro Universitário de Maringá – Cesumar. amaral@cesumar.br



legalizar os indícios para que permaneçam gravados nos autos dos processos que correm durante meses ou anos.

É por meio de uma perícia criteriosa que se obtém o vestígios biológicos, os quais continuam potencial fonte genética para identificação. Em casos de crimes sexuais as marcas de mordida são comumente encontradas no corpo da vítima ou em objetos inanimados (MELANI, 1997), fornecendo dados que contribui para a identificação humana a qual pode ser feita de duas formas: pelo método odonto-legal e pelo DNA. O primeiro consiste na comparação da arcada impressa no ato da mordida, enquanto que o segundo procura DNA salivar que fora depositado no mesmo ato (SILVA *et al.*, 2006).

O método odonto-legal é eficaz para a identificação humana, porém é dotado de certas limitações: sofre distorção desde o momento da mordida até o ato da perícia, principalmente quando a marca é deixada na pele. O DNA salivar surge de forma a complementar ou até mesmo substituir o primeiro, já que constitui um teste de excelência (SILVA *et al.*, 2006).

No entanto, o uso da saliva nos processos de identificação só foi plausível após o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular aplicadas à Odontologia Legal. Em aplicações forenses a técnica da PCR é a mais utilizada, pois aumenta drasticamente as possibilidades de análise do DNA, permitindo-se determinar o perfil molecular do indivíduo (FARAH, 1997). Foi a partir de então que a saliva tornou-se grande foco na procura de vestígios, já que oferecem material genético suficiente e em qualidades excelentes para o exame na grande maioria dos casos.

Até 1985, quando a PCR ganhou destaque, a análise genética com finalidade médico-legal era limitada. Amostras com quantidade inferior a 1µg eram consideradas inadequadas para a obtenção de resultados confiáveis (SILVA, 1997).

Entretanto, o DNA pode sofrer degradação dependendo das suas condições de preservação. Umidade, calor excessivo, pH, enzimas e outros são variáveis para a sua preservação ideal, sob as diversas superfícies em que pode ser encontrado (BURGER *et al.*, 1999). Sendo este o objeto de vários estudos atuais, inclusive o presente.

Um estudo realizado por Ng *et al.* (2004) refere-se ao efeito das diferentes condições de armazenamento sobre a amplificação e análise do DNA. Concluíram que a saliva é capaz de fornecer material genético, mesmo quando armazenada sob condições inferiores às consideradas ótimas.



Sweet e Hildebrand (1999) destacaram que deve sempre considerar que nas marcas de mordida possa haver remanescentes salivares, até mesmo em situações envolvendo alimentos ricos em bactérias. E citaram o caso em que um suspeito foi condenado através da coleta DNA realizada em um pedaço de queijo que havia mordido.

Muito embora alguns autores afirmem o DNA salivar é facilmente preservado, Burger *et al.* (1999) discorre que a preservação do material genético para a amplificação por PCR também envolve o controle de temperatura, umidade, o valor do pH e da presença de ácido húmico e fúlvico e de microorganismos. A temperatura baixa, ambientes secos, com o mínimo de crescimento de microorganismos e pH neutro ou alcalino favorece a preservação do material genético. Os ácidos húmico e fúlvico (presentes na matéria orgânica em decomposição) podem comprometer a amplificação pela PCR pelo fato de inibir os efeitos da enzima polimerase utilizada na reação, além de que os microorganismos são capazes de metabolizar por completo o DNA, se em grande quantidade.

É esse o contexto no qual a problemática é inserida: é ou não viável a utilização de DNA salivar remanescente em alimentos mordidos, principalmente aqueles mais sujeitos à putrefação e os mais encontrados nas perícias. Cameron e Sims (1973) relatam que os alimentos mais encontrados nas cenas dos crimes são as frutas e os queijos. E dentre as frutas, as maçãs tem maior destaque, porém o tipo não é especificado. São as maçãs, portanto, que servirão como superfície para avaliar a estabilidade do DNA por ser o alimento encontrado com mais frequência e por sofrer facilmente com a variação de temperatura, umidade e crescimento de microorganismos.

O objetivo deste trabalho foi avaliar se a técnica de extração de DNA salivar em alimentos com marcas de mordedura é viável em processos de identificação humana, delimitando o período em que o material foi coletado: imediatamente e cinco dias após a mordida.



2 METODOLOGIA

Dez acadêmicos do gênero masculino, entre 18 e 23 anos e não fumantes foram requisitados para fornecer três amostras genéticas diferentes: Grupo A, esfregaço em mucosa jugal, Grupo B, amostra salivar coletada imediatamente após a mordida em uma maçã e Grupo C, amostra salivar coletada 5 dias após a mordida em outra maçã.

Por se tratar de uma pequena amostra, tornou-se necessário o refinamento da mesma de modo a excluir possíveis interferências nos resultados e, como consequência, evitar que este estudo seja duvidoso. De maneira que o sexo masculino foi o escolhido já que não faz uso de produtos cosméticos na região dos lábios (batons, brilhos labiais) e os fumantes excluídos, pois podem conter substâncias que interferem na técnica de extração do DNA. Já com relação à idade, a justificativa se baseia na mudança da flora bucal, a quantidade de células descamadas e saliva produzida que varia entre faixas etárias.

Para a coleta de todas as amostras, o pesquisador fez uso dos equipamentos de proteção individual de forma a evitar a contaminação das mesmas, segundo o protocolo descrito na Resolução SSP nº 194/99 e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Cesumar segundo Parecer 023/2011.

A primeira amostra (Grupo A) refere-se ao controle e foi obtida através de esfregaço com escova cervical (Vagispec) único na mucosa jugal. Para a coleta, o sujeito de pesquisa não deve ter ingerido, por um período de 1 hora, alimentos quaisquer e deve ter escovado os dentes. As embalagens dos swabs devem ser cortadas nas extremidades contrárias as das escovas por uma tesoura previamente descontaminadas com algodão embebido em álcool 70%.

Com uma escova cervical, realiza-se o esfregaço com movimentos rotatórios por aproximadamente 15 vezes na mucosa jugal direita (Figura 1), coloca-se a escova no tubo de microcentrífuga e corta-se a haste com uma tesoura previamente descontaminada com álcool 70%. Realiza-se o mesmo procedimento com outra escova cervical, agora na mucosa jugal esquerda, depositando-a no mesmo tubo de microcentrífuga. Cada tubo corresponde a um sujeito de pesquisa, identificado com seu respectivo número na ordem de 1 a 10. No Grupo B, a amostra foi coletada imediatamente após a mordida na maçã (Figura 2) e no Grupo C foi realizada 5 dias após a mordida (Figura 3). Sendo que as maçãs relativas ao Grupo C foram armazenadas em



caixas sem tampa e com divisórias, de modo a impedir a contaminação entre as frutas e simular as condições em que fora deixada no local do crime.

Apesar da diferença de dias entre mordida e coleta, o protocolo é o mesmo para ambas: técnica do duplo *swab*. Com um *swab* estéril umedecido em soro fisiológico estéril (Figura 4), realiza-se gentilmente um esfregaço em todo o perímetro da marca de mordedura em maçã. Em seguida, um segundo *swab*, agora seco, é igualmente aplicado em forma de esfregaço. Ambos têm suas hastes cortadas com tesoura desinfetada em álcool 70% e são armazenados em um único tubo de microcentrífuga (Figura 5) correspondente ao respectivo sujeito de pesquisa, previamente identificado.



Figura 1: Coleta com escova cervical em mucosa jugal direita

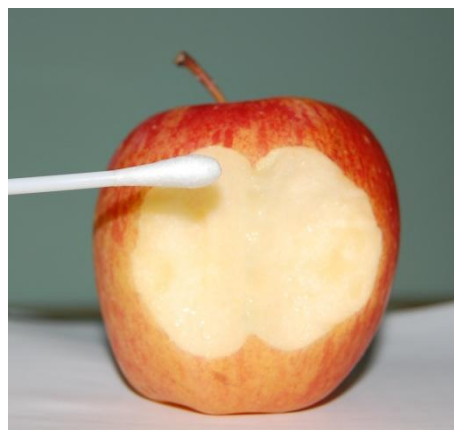


Figura 2: Coleta imediatamente dias após a mordida.

Os tubos foram armazenados em uma caixa de isopor contendo gelo para o transporte até o Instituto Médico Legal de Curitiba, onde as amostras foram processadas, procedendo-se o PCR, eletroforese e análise por STRs.

Para a extração do DNA foi realizado o Protocolo de Spin (*DNA purification from Buccal Swabs*) com certas modificações. No primeiro passo foi utilizado o tubo de 1,5ml com volume de PSB igual a 400µL; no segundo passo foi feito uso de 400µL da solução AL; no quarto 400µL de etanol 100%; o nono não foi necessário; e no décimo utilizou-se o volume de 100µL de *buffer*AE para a eluição do DNA.



Figura 3: Coleta 5 dias após a mordida.



Figura 4: Swab úmido.



Figura 5: Swab seco e úmido num único tubo de microcentrífuga.

Uma vez extraído o DNA das amostras, através do Protocolo de Spin (QIAamp®DNA Mini andBlood Mini Handbook), inicia-se a PCR preparando o Kit AmpF λ STR®NGM™PCR Amplification. Calcula-se o volume de cada componente para preparar a reação: 10 μ L de AmpF λ STR®NGM™ Master Mix e 5 μ L de AmpF λ STR®NGM™ Primer Set – o volume necessário por reação. É importante calcular o volume com certo excesso, visto que ocorre perda de reagentes durante a transferência dos mesmos.

Os reagentes (AmpF λ STR®NGM™ Master Mix e AmpF λ STR®NGM™ Primer Set) são descongelados, homogeneizados em movimentos circulares (vortex) por 3 segundos e centrifugados brevemente antes de abri-los. Em seguida, com uma pipeta os volumes de reagentes necessários são colocados em tubos de microcentrífuga apropriados. São novamente homogeneizados por 3 segundos e centrifugados rapidamente. E então se coloca 15 μ L dos reagentes misturados em cada tubo MicroAmp®.

Num segundo momento, as amostras de DNA são preparadas: Controle Negativo (CN), Amostras Testadas (AT) e Controle Positivo (CP). Na primeira (CN) adiciona-se 10 μ L de solução tampão (10mM Tris, 0,1mM de EDTA, pH 8,0) e na terceira (CP) adiciona-se 10 μ L de 007 DNA controle (0,1 ng/ μ L) produzindo 1ng total de DNA no controle positivo da reação. E as Amostras Testadas (A1 a A10, B1 a B10, e C1 a C10) são o resultado da diluição do DNA teste extraído em solução tampão resultando em 10 μ L de volume final, o qual é adicionado aos 15 μ L da solução dos reagentes (AmpF λ STR®NGM™ Master Mix e AmpF λ STR®NGM™ Primer Set) finalizando em 25 μ L de solução. Os tubos são fechados e centrifugados a 3000rpm por 20 segundos para remover as bolhas.



As amostras são amplificadas no GeneAmp® PCR System 9700 com o silver 96-well block, programando as condições de ciclos térmicos de acordo com a Tabela 1 e seguindo as recomendações do fabricante. Terminado o processo, o DNA amplificado é armazenado a temperaturas entre 2 e 8°C e protegido da luz.

Tabela 1: Programação dos ciclos térmicos de acordo com o guia de uso do fabricante.

Incubação Inicial	Ciclos (29 ciclos)		Extensão Final	Armazenamento Final
	Desnaturação	Cozimento		
Armazenamento	Ciclo		Armazenamento	
95°C - 11 minutos	94°C - 20 segundos	59°C - 3 minutos	60°C - 10 minutos	4°C - ∞

Depois de amplificadas, as amostras são submetidas à eletroforese capilar no aparelho 3130 Analyzer com as configurações referidas na Tabela 2, mas com o polímero HID Fragment Analysis36_POP7_1. Nesta etapa realiza-se a detecção dos produtos de PCR, ou seja, a separação de fragmentos de DNA nos 16 STRs padrões para a identificação genética humana (D10, vWA, D16S539, D2S1338, D2S1179, D21S11, D18S51, D22, D19S433, TH01, FGA, D2S441, D3S1358, D1S1656, D12S391 e Amelogenina).

Tabela 2: Configurações do aparelho 3130 Analyser, segundo o guia do usuário.

Sistema Memória do Software	Sistema de Operação	Módulos e Condições de Funcionamento	Referências
3.0 (3130/3130x Analyser)	Windows XP	<ul style="list-style-type: none">HID Fragment Analysis36_POP4_1 Injection Conditions<ul style="list-style-type: none">- 3130 = 3kV/ 5 seg- 3130 x/ = 3kV/ 10 segDye Set G5	Applied Biosystems 3130/3130 x/ Genetic Analyzers Using Data Collection Software V3.0, Protocols for processing AmpF STR PCR Amplification Kit PCR Products user Bulletin (PN 4363787)



3 RESULTADOS

Para a caracterização da viabilidade as amostras foram submetidas aos processos de quantificação, amplificação por PCR e análise de STR e, como consequência, a obtenção de três resultados.

O primeiro resultado se refere à quantificação do DNA referente a cada amostra pesquisada. Todas as amostras (100% delas) apresentam quantidade suficiente de DNA para processos de identificação, ou seja, com volume igual ou superior a 0,1ng/μL. Mesmo as amostras que foram repetidas (A2 e B7).

O segundo retrata a viabilidade de realizar PCR e analisar os STRs através da eletroforese capilar. Das amostras de A1 a A10 e B1 a B10 foram amplificados os 16 locus, e das amostras do Grupo C só não amplificaram o locus FGA da amostra C7 e o D21S11 da amostra C8. Resultando em um dado estatístico de 99,58% de amplificação do total de amostras dos Grupos A, B e C.

E o terceiro confirma a compatibilidade de 100% das amostras dos Grupos B e C com o Grupo A (referência). Destes 100%, oito sujeitos (93,33%) obtiveram compatibilidade de 100% entre os Grupos A, B e C. Os sujeitos 7 e 8 (6,66%) não foram compatíveis em apenas um locus com a amostra A na amostra C, ambos resultando em 93,75% de compatibilidade.

4 DISCUSSÃO

Na literatura científica inúmeros trabalhos têm sido publicados acerca do DNA e a sua aplicação na Antropologia Forense. Uns regulamentando o seu uso, como os de Schie, Van e Wilson (1997), Wright e Dailey (2001) e Kwok e Higuchi (1989). Outros comprovando sua eficácia: Hsu *et al.* (1999), Remualdo e Oliveira (2005) e Morgan *et al.* (2006).

Nesse mesmo contexto, o DNA salivar como objeto de estudo para identificação humana também teve várias publicações documentando a possibilidade de seu uso, entre elas: Ng *et al.* (2004) e Yamamoto *et al.* (1998).



Entretanto, poucas publicações foram feitas correlacionando o DNA salivar e as superfícies sobre o qual é depositado. Anzai-Kanto *et al.* (2005) é um exemplo e discorre sobre o sucesso da identificação através de material genético coletado de saliva remanescente em marcas de mordida deixadas sobre a pele.

Menor ainda é o número de publicações relacionando a aplicabilidade do DNA salivar extraído sobre alimentos mordidos, sendo esta uma dificuldade para comparação com o presente estudo. O único semelhante foi o estudo publicado por Sweet e Hildebrand (1999), em que fizeram um relato de caso no qual o agressor deixou na cena do crime um queijo mordido. Deste pedaço de queijo foi possível extrair DNA salivar, que serviu como prova para condenar o suspeito.

Os três principais questionamentos do presente estudo se caracterizam em saber se há ou não material genético suficiente para procedimentos de identificação (quantificação), se é possível aplicar PCR em material genético degradado (amplificação) e se há a comprovação de identificação através dos STRs.

Os resultados obtidos permitem afirmar que existe material genético suficiente para identificação, mesmo nas amostras coletadas em maçã (Grupo B e C), corroborando com os achados de Asamura *et al.* (2006) que obtiveram resultados a partir de dois picogramas (milionésima parte de um micrograma). Mesmo que na quantificação não esteja presente apenas material genético humano, e sim humano e de outros organismos, sugerindo-se realizar a PCR em tempo real para refinamento da pesquisa.

Burger *et al.* (1999) discorreram sobre alguns fatores (como os ácidos húmico e fúlvico, e a presença de microrganismos) que podem alterar a reação de PCR. Neste estudo, a reação de PCR não foi insultada em nenhuma das amostras. Entretanto, não se sabe se é pela ausência de algum desses fatores, pois o estudo dos autores foi realizado em cadáveres e não era este o objetivo do trabalho. Apesar de saber-se da presença dos ácidos húmico e fúlvico na matéria orgânica em decomposição.

Embora as amostras C7 e C8 não apresentarem compatibilidade de 100% com as amostras A7 e B7, e, A8 e B8, respectivamente, comprovam-se a viabilidade de utilizar DNA degradado ou não armazenado em condições ideais, pois todas as amostras tiveram um grau de compatibilidade acima de 90%. Corroborando com os achados de Anzai-Kanto *et al.* (2005), que avaliaram a conservação de DNA depositado sobre pele humana. E com os de Sweet e Hildebrand (1999) que relataram a coleta de saliva em um queijo



mordido achado pela polícia na cena do crime, e congelado por 10 dias antes de ser enviado ao laboratório. O suspeito foi identificado através da detecção de 10 locusSTRs por PCR.

A pequena incompatibilidade sofrida nas amostras C7 e C8 pode ser justificada por alguma contaminação no processo de armazenamento das amostras, que só aconteceram o Grupo C.

5 CONCLUSÃO

Através do presente estudo foi possível afirmar que é viável obter material genético a partir de remanescentes salivares depositados sobre alimentos com marcas de mordedura. Todos os processos para a identificação, desde a extração do DNA, passando pela quantificação, PCR e análise em eletroforese capilar dos 16 locusSTRs, foram inalterados e forneceram excelentes resultados. Podendo-se afirmar, também, a viabilidade de obter resultados satisfatórios mesmo em amostras de DNA degradadas ou em condições não ideais de armazenamento, através das técnicas citadas.

Por mais que seja um exame dispendioso, vem a suprir as necessidades de outros métodos, como os médicos e odonto-legais, fornecendo resultados de extrema excelência e confiabilidade. Ademais, em processos de identificação, é o ápice dos exames e o mais aceito em questões jurídicas.

Dessa forma, pode-se inferir, inclusive, que todas as evidências de fluidos humanos devem ser coletadas, não descartadas, pois com a tecnologia atual é possível analisar o conteúdo genético (por menor que seja) resultando em provas de grande importância para a identificação humana.

REFERÊNCIAS

ANZAI-KANTO, E.;HIRATA, M.H.;HIRATA, R.D.C.;NUNES, F.D.;MELANI, R.F.H.;OLIVEIRA, R.N. **DNA extraction from human saliva deposited on skin and its use in forensic identification procedures**. Brazilian Oral Research, v. 19, n. 3, p. 216-222, 2005.



ASAMURA, H.;SAKAI, H.;KOBAYASHI, K.;OTA, M.;FUKUSHIMA, H. **MiniX-STR multiplex system population study in Japan and application to degraded DNA analysis**. International Journal of Legal Medicine, v. 120, p. 174-181, 2006.

BURGER, J.;HUMMEL, S.;HERMANN, B.;HENKE, W. **DNA preservation: a microsatellite-DNA study on ancient skeletal remains**. Eletrophoresis, v. 20, n. 8, p. 1722-1728, 1999.

CAMERON, J.M.;SIMS, B.G. **Forensic Dentistry**. Edinburgh: Churchill Livingstone;1973.

FARAH, S.B. **DNA: segredos & mistérios**. São Paulo: Sarvier; 1997.

HSU, C.M.; HUANG,N.E.;TASI, L.C.;KAO, L.G.;CHAO, C.H.LINACRE, A. **Identification of victims of the 1998 Taoyuan Airbus crash accident using DNA analysis**. International Journal of Legal Medicine, v. 113, p. 43-46, 1999.

KWOK, S.;HIGUCHI, R. **Avoiding false positives with PCR**. Nature, v. 339, p. 237-238, 1989.

MELANI, R.F.H. **Identificação por marcas de mordida**. In: Silva M. Compêndio de Odontologia Legal. São Paulo: Medsi; 1997.

MORGAN, O.W.; SRIBANDITMONGKOL P.; PERERA C.; SULASMI Y.; ALPHEN, D.V.; SONDRP, E.**Mass fatality management following the South Asian tsunami disaster: case studies in Thailand, Indonesia and Sri Lanka**. Plos Medicine, v. 3, n. 6, p. 809-815, 2006.

NG, D.P.K.; KOH, D.; CHOO, S.G.L.; NG, V.; FU, Q. **Effect of storage conditions on the straction of PCR-quality genomic DNA from saliva**. Clinica Chimica Acta, v. 343, p. 191-194, 2004.

REMUALDO, V.R.; OLIVEIRA, R.N. **Potencial de análise forense do DNA de diferentes amostras biológicas**. Revista da Associação Paulista dos Cirurgiões Dentistas, v. 59, n. 6, p. 421-424, 2005.

SCHIE, R.C.A.A.; VAN, WILSON M.E. **Saliva: a convenient source of DNA for analysis of bi-allelic polymorphisms of Fcγ receptor IIA (CD32) and Fcγ receptor IIIB (CD16)**. Journal of Immunological Methods, v. 298, p. 91-101, 1997.

SILVA,M. **Compêndio de Odontologia Legal**. São Paulo: Ed. Medsi; 1997.

SILVA, R.H.A.; MUSSE, J.O.; MELANI, R.F.H.; OLIVEIRA, R.N. **Human bite identification and DNA technology in forensic dentistry**. Brazilian Journal Oral Science, v. 19, n. 5, p. 1193-1197, 2006.



SWEET, D.; HILDEBRAND, D. **Saliva from cheese bite yields DNA profile of burglar: a case report.** International Journal of Legal Medicine, v. 112, p. 201-203, 1999.

WRIGHT, F.D.; DAILEY, J.C. **Human bite marks in forensic dentistry.** Dental Clinics of North America, v. 45, n. 2, p. 365-397, 2001.

YAMAMOTO, T.; UCHIKI, R.; KOJIMA, T.; NOZAWA, H.; HUANG, X.L.; TAMAKI, K.; KATSUMATA, Y. **Maternal identification from skeletal remains from skeletal remains of an infant kept by the alleged mother for 16 years with DNA typing.** Journal of Forensic Science, v. 43, n. 3, p. 701-705, 1998.