UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

LAÍS GOMES DE ARAUJO

**ANÁLISE FÍSICA E BIOLÓGICA DAS MARCAS DE MORDIDA EM
ALIMENTOS E ATOS DE SUCÇÃO DE BEBIDAS PARA FINS DE
IDENTIFICAÇÃO HUMANA**

Ribeirão Preto

2014

LAÍS GOMES DE ARAUJO

**ANÁLISE FÍSICA E BIOLÓGICA DAS MARCAS DE MORDIDA EM
ALIMENTOS E ATOS DE SUCÇÃO DE BEBIDAS PARA FINS DE
IDENTIFICAÇÃO HUMANA**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Reabilitação Oral.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

**Orientador: Prof. Dr. Ricardo Henrique
Alves da Silva**

VERSÃO CORRIGIDA

A versão original se encontra disponível na Faculdade
de Odontologia de Ribeirão Preto – USP

RIBEIRÃO PRETO

2014

**AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE
TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.**

Ficha catalográfica

Elaborada pela Biblioteca Central do Campus USP - Ribeirão Preto

Araujo, Laís Gomes de
Análise física e biológica das marcas de mordida em alimentos e
atos de sucção de bebidas para fins de identificação humana.
Ribeirão Preto, 2014.
156p. :il; 30 cm.

VERSÃO CORRIGIDA

Orientador: Silva, Ricardo Henrique Alves da
Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto/USP. Área de
concentração: Reabilitação Oral.

Palavras-chave: Odontologia Legal; Identificação Humana; Marcas
de mordida; DNA; Saliva.

FOLHA DE APROVAÇÃO

LAÍS GOMES DE ARAUJO

ANÁLISE FÍSICA E BIOLÓGICA DAS MARCAS DE MORDIDA EM ALIMENTOS E ATOS DE SUCÇÃO DE BEBIDAS PARA FINS DE IDENTIFICAÇÃO HUMANA

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Ribeirão Preto, da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do título de Mestre.

Área de Concentração: Reabilitação Oral

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora:

1) Prof. (a). Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof. (a). Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof. (a). Dr. (a): _____

Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicat6ria

Dedico este trabalho...

À minha avó materna, Marina de Castro Gomes (in memoriam), a responsável pela realização de muitos dos meus sonhos. Sou eternamente grata por ter tido você em minha vida!!! Saudades eternas!!!

À minha avó paterna, Mary Araújo, pelos 100 anos repletos de muita sabedoria e alegria de viver. Parabéns e muitas felicidades sempre!!!

Aos meus pais Francisco e Rose , e aos meus irmãos Thomas e Lara , pelos laços de amizade, de apoio, de incentivo, de dedicação, de inspiração, e, principalmente, pelo amor indestrutível que une a família.

A todos aqueles que direta ou indiretamente, acreditaram e me incentivaram a tornar possível a realização desse projeto.

Agradecimento

A Deus que ilumina e me dá forças para nunca desistir.

À FORP/USP por me acolher e contribuir para minha formação profissional.

Ao Programa de Reabilitação Oral da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP, em especial a coordenadora, Professora Fernanda de Carvalho Panzeri Pires de Souza, pela seriedade com que conduz a Pós-Graduação.

Ao Prof. Ricardo Henrique Alves da Silva pelos conhecimentos transmitidos que muito enriqueceram minha formação na área de Odontologia Legal. Obrigada pela orientação, confiança e oportunidade em mim depositadas.

À Prof^a Maria José Alves da Rocha, pela disponibilidade e atenção durante o tempo em que me orientou.

À Prof^a Raquel Fernanda Gerlach por ter autorizado o acesso ao laboratório para realização deste trabalho.

Aos professores da banca examinadora, Prof. Dr. Héliom Leão Lino Júnior (Professor Adjunto do Departamento de Medicina Oral e Odontologia Infantil do Curso de Odontologia da Universidade Estadual de Londrina) e o Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior (Professor Adjunto do Departamento de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de

Piracicaba/UNICAMP) pela disponibilidade e atenção para leitura desta dissertação.

À FAPESP, pelo auxílio financeiro e a bolsa de Treinamento Técnico, que permitiram respectivamente, a execução do projeto através da compra de materiais e equipamentos, e minha dedicação exclusiva e a consequente realização deste trabalho.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro que muito colaborou para a realização do meu mestrado e permitiu minha dedicação exclusiva.

Ao Departamento de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal pelo apoio.

À Aline Azevedo, pela amizade, paciência e colaboração durante esta pesquisa. Por todos os momentos alegres e felizes que passamos no laboratório.

À Edilene Andrade, pela disponibilidade, seriedade e responsabilidade com que conduziu sua participação.

Ao Rodrigo Galo, por se preocupar comigo durante toda a etapa do mestrado, pela estatística e disponibilidade em ajudar. Obrigada por tudo!

Ao Sr. Hermano Machado, pelas fotografias realizadas com muito profissionalismo e dedicação. Obrigada pelas agradáveis conversas que tivemos durante esse período.

Ao Sr. Dorival Gaspar, pelo companheirismo e amizade, por todos os conselhos transmitidos, pelas conversas sempre regadas a um cafezinho e, principalmente, por dividir momentos tristes e alegres durante esses anos.

À Sra. Antônia Ferreira, pelo bom humor de toda manhã, pela amizade e pelo cafezinho de que eu tanto gosto.

A todos os demais professores e funcionários da FORP-USP pelos agradáveis anos de convivência, em especial a Fernanda Freitas, Júlio Matta e Lucimeire Resende.

À Prof^a Karina Lopes Devito, fonte de inspiração e incentivo para seguir a área acadêmica. Você é o exemplo que busco para mim!

A toda minha família que reza e torce muito pelo meu sucesso.

À minha amiga Fernanda Cavalieri, pela amizade que começou na infância e permanece viva por toda vida. Obrigada, por tudo que fez por mim em Ribeirão Preto. Sem você eu não teria conseguido.

Às minhas amigas Kelly Galisteu e Keila Franceschini, pela amizade construída durante esses anos de convivência.

Ao amigo Eduardo Hiromi, por sempre transmitir pensamentos positivos e rezar muito pela minha felicidade!!!

Às minhas amigas Andrea Terada e Marta Flores, pela paciência, por tolerar as minhas imperfeições e ficar do meu lado em todos os momentos difíceis. Vocês foram muito importantes durante essa jornada.

Aos meus amigos de mestrado Sérgio Vicente e Roberto Biancalana, pela amizade que cresce cada dia mais entre nós.

À equipe de Odontologia Legal, Adrielly Ortiz, André Bergamo, Crísthiane Queiroz, Geovane Lavez, Gustavo Peres, Lourenço Roselino, Thaís Dezem pelo companheirismo e pelos trabalhos desenvolvidos.

Aos amigos da especialização pelos momentos alegres e felizes que passamos juntos e pela amizade sempre crescente, em especial Claudine Capistrano, Máisa Diniz, Maria Angélica dos Santos, Luiz Renato Paranhos e Thalita Antunes.

Aos amigos da Prática Profissionalizante de Odontologia Legal Fernando Biagini e Raphael Fernandes pela amizade e companheirismo durante o curso.

Às grandes amizades conquistadas durante esta pesquisa, Alejandro Prado, Felipe Figueiredo, Júnia Ramos, Myrella Castro e Raquel Paggioro obrigada pela atenção e, principalmente, pela grande ajuda que todos vocês me deram. Sem vocês eu não teria conseguido. Foram momentos de muita alegria e felicidade!!!

Às amigas Cinthia Soares e Júlia Pessoa, pela constante ajuda nos momentos em que mais precisei. Obrigada, por tudo!!!

Aos meus amigos e amigas de toda a vida, Rafaela Marques, Maria Cecília Soares, Sandra Machado, Lígia Martins, Luana Porto, Priscila Ferreira, Michell Firmiano, que mesmo longe, estão sempre comigo.

Às amigas, Ana Beatriz Souza e Camila Gleicer, pela amizade que cresce a cada dia. Obrigada, por deixarem meus dias mais alegres e divertidos.

Ao Nelson Silva, obrigada pela atenção e a constante ajuda!!!

"A expectativa de que haja alguma fórmula para vida é a fonte de tantas das nossas decepções. Que tal de peito aberto? Aberto para o mundo... Encarar o mundo como ele é: no seu ineditismo, na sua virgindade, na sua irrepetibilidade e saber que - sem fórmula nenhuma - estamos diante de um mundo extraordinariamente competente pra nos entristecer, mas também capaz de nos proporcionar grandes alegrias, grandes surpresas, momentos que você nunca mais gostaria que acabassem. São esses momentos que a gente persegue e que farão da vida sempre alguma coisa digníssima de ser buscada e fantástica de ser vivida".

Clóvis de Barros Filho

Resumo

ARAUJO, L.G. **Análise física e biológica das marcas de mordida em alimentos e atos de sucção de bebidas para fins de identificação humana**. 2014. 156 f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

RESUMO

No estudo das marcas de mordidas, os materiais biológicos relacionados à Odontologia, como o dente e saliva, são analisados por meio de evidências físicas (análise métrica e/ou emparelhamento físico) e evidências biológicas (análise de DNA). A partir de ambos os métodos pode-se estabelecer a identidade de um indivíduo, podendo assim, nas investigações forenses, apontar, ou mesmo identificar, um suspeito em uma cena de crime. O presente trabalho aplicou quatro métodos de análise física nas marcas de mordida produzidas em queijos e chocolates, bem como obter a recuperação de DNA, extraídos da saliva destes alimentos mordidos e de garrafas de água consumidas. Para tal, 20 participantes (10 do sexo masculino e 10 do sexo feminino) morderam cinco pedaços de queijo, cinco pedaços de chocolate e beberam em cinco garrafas de água, totalizando 15 amostras para cada um. As amostras produzidas foram armazenadas e analisadas em diferentes intervalos de temperatura (ambiente e geladeira) e tempo (imediato, três dias e sete dias). Na análise física, os métodos aplicados foram: análise métrica utilizando um paquímetro digital (Digital Caliper, Cixi Xinzheng Trade Co., Ltd., Zhejiang, China); análise métrica utilizando o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland); sobreposição manual; e a sobreposição digital por meio do software Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc., Mountain View, California, USA). Na análise biológica foram realizadas as seguintes etapas do exame de DNA: coleta da saliva pela técnica de duplo swab, extração do DNA utilizando Kit QIAamp (Qiagen, Hilden, Germany), quantificação do DNA recuperado através do equipamento espectrofotômetro Nanodrop (Thermo ScientificTM, Wilmington, DE, USA), amplificação dos marcadores utilizando o Kit de identificação humana AmpFLSTR Identifier PCR Amplification (Applied Biosystems[®], Carlsbad, CA, EUA) e a eletroforese em gel de agarose. De acordo com os resultados encontrados, não houve diferença significativa entre os dois métodos de análise métrica. Na análise de

emparelhamento físico, o método manual obteve o maior número de identificados, com 58% para ambos os sexos, enquanto o método Adobe Photoshop apenas 32% das amostras foram identificadas para o sexo feminino e 44% no sexo masculino. O valor do índice de concordância intraobservador foi classificado como substancial para os métodos manuais em ambos os sexos e para o método Adobe Photoshop para o sexo masculino; e como moderado para o método Adobe Photoshop para o sexo feminino. Nas evidências biológicas, as amostras de DNA coletadas a partir da saliva depositada em queijos e chocolates mordidos e garrafas de água bebidas tiveram valores de concentração variando entre $28,52 \pm 14,00$ a $8,99 \pm 2,20$ ng/μl, e estas foram suficientes para amplificação. Com isso, conclui-se que amostras de águas, queijos e chocolates nas condições estudadas, que simularam alimentos mordidos e bebidas consumidas encontrados em cenas de crime ou armazenadas em geladeiras a espera da análise pericial, podem ser utilizadas nas investigações de identificação em marcas de mordida tanto para métodos de evidências físicas quanto para métodos de evidências biológicas.

Palavras-chave: Odontologia Legal; Identificação Humana; Marcas de mordida; DNA; Saliva.

Abstract

ARAUJO, L.G. **Analysis of human bite marks from biological and physical evidence in food and beverages suction acts.** 2014. 156 f. Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral). Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

ABSTRACT

In the study of bite marks, the biological materials related to dentistry, such as teeth and saliva, are analyzed by means of physical evidence (metric analysis and / or physical pairing) and biological evidence (DNA analysis). From both methods can establish the identity of an individual, thus allowing, in forensic investigations, point, or even identify a suspect in a crime scene. This study aimed to apply four methods of physical analysis in bite marks produced in cheeses and chocolates, as well as obtain recovery the DNA extracted from the saliva of bitten food and bottled water consumed. The sample was comprised of 20 volunteers, 10 males and 10 females. Each volunteer was instructed to bite five pieces of cheese, five pieces of chocolate and drink five bottles of water, producing 15 samples of each from the 20 participants. The produced samples were stored and analyzed in different temperature ranges - temperature (25°C) and refrigerator (4-8°C), and time (immediately, three days, seven days). The methods used were: metric analysis by using a digital caliper, digital metric analysis using ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland); manual overlay of the plaster model of the dental arches versus plaster model of chewed food, and overlapping images using Adobe Photoshop software (Adobe Systems, Inc., Mountain View, California, USA). In biological testing, saliva collecting was done using the double swab technique, DNA extraction according to the extraction protocol of the QIAamp kit (Qiagen®, Hilden, Germany), quantification of recovered DNA using equipment Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific™, Wilmington, DE, USA); amplification of the markers was performed by human identification kit Identifiler PCR Amplification AmpFLSTR (Applied Biosystems®, Carlsbad, CA, EUA) and agarose gel electrophoresis. According to the results, there was no significant difference between the two methods of metric analysis. In the physical pairing analysis, the manual method had the highest number of identified subjects with 58% for both sexes while

with the Adobe Photoshop method only 32% of the samples were identified for females and 44 % males. The index value for intraobserver agreement was rated substantial for manual methods in both sexes and for Adobe Photoshop method for males; and as moderate for Adobe Photoshop method for females. In biological evidence, samples of DNA from saliva deposited in cheese and bitten chocolate, beverage and water bottles had concentration values ranging from $28,52 \pm 14,00$ a $8,99 \pm 2,20$ ng/ μ l, and these were sufficient for amplification. Thus, it was concluded that samples of water, cheeses and chocolates under the conditions studied, simulating bitten foods and beverages found at crime scenes or stored in refrigerators waiting for the forensic analysis can be used for investigations in identifying bite marks using both physical methods evidence as to biological method evidence.

Keywords: Forensic Odontology; Human Identification; Bite marks; DNA; Saliva.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mordida em alimentos e ato de sucção.....	79
Figura 2. Material para moldagem e confecção do modelo de gesso.....	80
Figura 3. Swab umedecido para água estéril.....	81
Figura 4. Swab passado na superfície da marca de mordida e na garrafa de água bebida.....	82
Figura 5. Swab secos, cortados e colocados em eppendorf 1,5ml.....	82
Figura 6. QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen®, Hilden, Germany).....	83
Figura 7. Espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific™), Laboratório de Estomatologia, Saúde Coletiva e Odontologia Legal – FORP/USP.....	84
Figura 8. AmpFLSTR Identifier PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).....	85
Figura 9. Aplicação das amostras para eletroforese em gel de agarose a 2%.	88
Figura 10. Materiais para confecção das moldeiras para moldagem dos alimentos.....	89
Figura 11. Método utilizando o paquímetro digital.....	90
Figura 12. Método utilizando o Software ImageJ.....	91
Figura 13. Método manual.....	92
Figura 14. Método utilizando o software Adobe Photoshop.....	92
Figura 15. Dados referentes à análise manual para amostras do sexo feminino.....	114
Figura 16. Dados referentes à análise manual para amostras do sexo masculino.....	114
Figura 17. Dados referentes à análise utilizando software Adobe Photoshop para amostras do sexo feminino.....	115
Figura 18. Dados referentes à análise utilizando software Adobe Photoshop para amostras do sexo masculino.....	115
Figura 19. Gel de agarose 2% de 15 amostras de água, queijo e chocolate amplificadas nos diferentes tempos (imediato, 3 dias e 7 dias) e temperatura (ambiente e geladeira), além da saliva in natura, marcador e controle positivo e negativo da reação.....	118

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Média e desvio padrão das análises métricas da distância intercanina dos dentes superiores em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	98
Tabela 2. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 13 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	99
Tabela 3. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 12 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	100
Tabela 4. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 11 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	101
Tabela 5. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 21 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	102
Tabela 6. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 22 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	103
Tabela 7. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 23 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	104
Tabela 8. Média e desvio padrão das análises métricas da distância intercanina dos dentes inferiores em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura....	105

Tabela 9. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 33 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	106
Tabela 10. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 32 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	107
Tabela 11. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 32 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	108
Tabela 12. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 41 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	109
Tabela 13. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 42 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	110
Tabela 14. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 41 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.....	111
Tabela 15. Dentes que apresentam diferenças entre as metodologias aplicadas para amostras do sexo feminino.....	112
Tabela 16. Dentes que apresentam diferenças entre as metodologias aplicadas para amostras do sexo masculino.....	113
Tabela 17. Valores de concordância intraobservador (Kappa).....	116
Tabela 18. Média e desvio padrão dos valores médios quantitativos das concentrações de DNA e contaminação 260/280 das amostras de água do sexo feminino e masculino.....	116

Tabela 19. Média e desvio padrão dos valores médios quantitativos das concentrações de DNA e contaminação 260/280 das amostras de queijo do sexo feminino e masculino..... 117

Tabela 20. Média e desvio padrão dos valores médios quantitativos das concentrações de DNA e contaminação 260/280 das amostras de chocolate do sexo feminino e masculino..... 117

Lista de Quadros

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Grupos amostrais de acordo com o tempo e a temperatura.....	80
Quadro 2. Cálculo do volume dos componentes necessários para preparo das reações de amplificação.....	86
Quadro 3. Cálculo do volume dos componentes para cada amostra.....	87
Quadro 4. Etapas do ciclo de amplificação.....	87
Quadro 5. Orientações de armazenamento das amostras amplificadas.....	87

Lista de Abreviaturas e Siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FBI	Federal Bureau of Investigation
FORP	Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto
INTERPOL	Organização Internacional de Polícia Criminal
mA	Miliampére
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
ng	Nanograma
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
RNA	Ácido ribonucleico
SNPs	Repetições consecutivas curtas
STRs	Repetições consecutivas curtas
TAE	Tampão tris-acetato-edta
TE	Tampão tris-edta
Tris	Trisaminometano
USP	Universidade de São Paulo
V	Volts

VNTR	Número variável de repetições consecutivas
µg	Micrograma
µL	Microlitro
I	Imedito
A	Água
C	Chocolate
Q	Queijo
DI	Distância intercanina

Lista de Símbolos

LISTA DE SÍMBOLOS

°C Graus Celsius

% Porcentagem

Sumário

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	55
1.1 Odontologia Legal.....	57
1.2 Identificação humana.....	58
1.3 Marcas de mordida.....	59
1.4 Evidências das marcas de mordida.....	61
1.4.1. Evidências físicas.....	61
1.4.2. Evidências biológicas.....	64
2 OBJETIVO.....	73
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	77
3.1 Aspectos éticos.....	79
3.2 Coleta das amostras.....	79
3.2.1 Mordida dos alimentos e sucção de bebidas.....	79
3.2.2 Moldagem e confecção dos modelos de gesso.....	79
3.3. Grupos amostrais.....	80
3.4. Evidências biológicas.....	81
3.4.1. Coleta da saliva nos alimentos e bebidas.....	81
3.4.2 Extração de DNA.....	82
3.4.3. Quantificação do DNA.....	83
3.4.4. Amplificação do DNA.....	85
3.4.4.1. Preparo das soluções para PCR.....	86
3.4.4.2. Preparo das amostras de DNA.....	86
3.4.5. Eletroforese em gel de agarose.....	88
3.5. Evidências físicas.....	88
3.5.1. Aplicação dos métodos.....	90
3.5.1.1. Análise métrica.....	90
3.5.1.1.1. Método utilizando paquímetro digital.....	90
3.5.1.1.2. Método utilizando o software ImageJ.....	91
3.5.1.2 Emparelhamento físico.....	91
3.5.1.2.1 Método Manual.....	92
3.5.1.2.2 Método Adobe Photoshop.....	92
3.5.1.3. Análise das técnicas de emparelhamento físico.....	93

3.6. Análise estatística.....	93
4. RESULTADO.....	95
4.1 Análises físicas.....	97
4.2 Análises biológicas.....	116
5. DISCUSSÃO.....	120
5.1 Análises físicas.....	122
5.2 Análises biológicas.....	131
6. CONCLUSÃO.....	140
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144
Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em pesquisa.....	156

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Odontologia Legal

A Odontologia Legal é a especialidade que busca esclarecer eventos relacionados à Justiça, correlacionando estudos tanto da área do Direito quanto da Odontologia (SILVA, 2010). Pesquisam-se alterações psíquicas, físicas, químicas e biológicas nos seres humanos, vivos ou mortos, bem como esqueleto, partes ou vestígios humanos e ainda lesões parciais ou totais, reversíveis ou irreversíveis (VANRELL, 2008, SILVA, 2010; COUTO, 2010).

A Odontologia Legal no Brasil foi constituída pelo Decreto 19.852, no ano de 1931 (SILVA, 2010) e, desde então, tem se desenvolvido, desde simples pesquisas a sofisticados testes laboratoriais (VANRELL, 2008, SILVA, 2010; COUTO, 2010).

O cirurgião-dentista que atua no âmbito forense tem sua ampla autonomia no exercício legal respaldado pela Lei 5.081, de 24 de Agosto de 1966, que regulamenta o exercício da Odontologia no Brasil, em seu artigo 6º, no inciso IV, no que condiz em proceder à perícia odontolegal em foro civil, criminal, trabalhista e sede administrativa (VANRELL, 2008, SILVA, 2010; COUTO, 2010).

Além disso, a Resolução 63/2005, atualizada em Julho/2012, do Conselho Federal de Odontologia, em seu artigo 63, Parágrafo Único, define como áreas de atuação do profissional especialista em Odontologia Legal, a análise, perícia e avaliação de fatos ligados à Odontologia, podendo, se a circunstância o exigir, estender-se a outras ciências, em prol da verdade e no estrito interesse da justiça e da administração (BRASIL, 2005).

Dessa forma, o cirurgião-dentista é constantemente convocado a prestar serviços periciais correlacionando à área odontológica nos diversos campos do direito, sendo assim, o responsável por produzir as provas materializadas (laudos), de caráter técnico especializado (SILVA, 2010).

Identificação humana

A identidade de uma pessoa na sociedade assegura o seus direitos e exigem o seus deveres no contexto das relações interpessoais. Mesmo após a morte, o processo de identificação é indispensável, pois além de garantir aos familiares o direito à herança, também proporciona ao corpo, um destino digno no que diz respeito às crenças religiosas, como pro exemplo, o enterro (ZIĘTKIEWICZ et al., 2012).

A identidade é definida como a soma das características físicas (raça, sexo, idade, arco dental, datiloscopia, entre outros) de uma determinada pessoa, tornando-a única (VANRELL, 2008; COUTO, 2011). No campo da Odontologia Legal a identificação humana é um dos principais temas de estudo, uma vez que os materiais biológicos disponíveis, como os dentes e a saliva, contribuem diretamente na identificação de um indivíduo, tanto por análise de métodos odontológicos, quanto por meio de exames genéticos (ZIĘTKIEWICZ et al., 2012).

O exame odontológico, juntamente com a datiloscopia e o exame de DNA, são os únicos métodos primários de identificação que atendem positivamente os requisitos técnicos e científicos aplicáveis. Estes são assim considerados por possuírem as seguintes características: unicidade ou individualidade, ou seja, são únicos para cada indivíduo; imutabilidade, não se altera com o passar do tempo; perenidade, resiste à ação do tempo; praticabilidade, ou seja, viabilidade de aplicação na rotina pericial, como por exemplo, custo, facilidade de obtenção e de registro das amostras; classificabilidade, possibilidade de classificação que facilita o arquivamento e a localização das amostras arquivadas quando necessário; e por fim, a reprodutibilidade, possibilidade a reprodução contínua e fiel dos resultados obtidos em todos os testes realizados (INTERPOL, 2009).

No processo de identificação humana, geralmente, se utilizam informações médicas e prontuários odontológicos. Os dados *ante mortem* são comparados aos registros *post mortem*, conduzindo a conclusões de acordo com o número de pontos coincidentes, assim como a ausência de discordâncias (VANRELL, 2008; COUTO, 2011; ZIĘTKIEWICZ et al., 2012).

Uma sub-área de pesquisa na ciência odontológica envolvendo a identificação humana, é o estudo das marcas de mordida deixadas pelos dentes em pele, alimentos ou objetos na cena do crime. Estas informações geradas podem ser

tomadas a partir de análises odontológicas (evidência física) e de exames de DNA (evidências biológicas) (HINCHLIFFE, 2011; BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

O estudo das marcas de mordida é uma importante ferramenta em investigações criminais, devido à quantidade de provas produzidas pelos arcos dentais. Em muitos casos o estudo possibilita a identificação médico-jurídica, resultando na inclusão ou exclusão de suspeitos, ou apontando elementos de culpabilidade, auxiliando no combate ao crime e à impunidade (MARQUES, GALVÃO e SILVA, 2007; HINCHLIFFE, 2011, BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

Marcas de Mordida

As mordidas são as marcas e/ou lesões produzidas pelos dentes humanos, aplicados e transferidos para um substrato (pele, objeto ou alimento) (MACDONALD, 1974; MARQUES, GALVÃO e SILVA, 2007; PETTRY, 2008; GOREA e JASUJA, 2010; EVANS et al., 2013; GROVER et al., 2013).

Seus registros são frequentemente associados a questões criminais, podendo muitas vezes, ser a única prova que liga o mordedor à cena do crime. Usualmente, é o agressor quem morde a vítima, entretanto, existem relatos em que a vítima, na tentativa de legítima defesa, acaba mordendo-o (HERAS et al., 2005; FLORA, TUCERYAN e BLITZER, 2009; GOREA e JASUJA, 2010; HINCHLIFFE, 2011).

As análises das impressões nas diferentes superfícies geram diversas imagens. Quando ocasionadas na pele humana, a marca produzida corresponde à dupla impressão dos dentes superiores e inferiores, em forma de “U” ou semicircular, os quais, unidos, irão reproduzir um formato oval ou circular (LESSIG, WENZEL e WEBER, 2006; JAKOBSEN e REPPIEN, 2008). Outros protótipos podem ser observados, como: registro de um arco, de um ou poucos dentes, de forma unilateral; mordidas indistintas, resultantes da fusão dos arcos causadas pela pressão excessiva dos dentes sem ocorrer às impressões individuais destes; mordidas duplas, em que uma mordida encontra-se dentro da outra; mordidas com

padrões alterados, quando há roupa interposta servindo de barreira física; e por fim, múltiplas mordidas, gerando imagens difusas (VANRELL, 2008; COUTO, 2011).

Com relação às lesões produzidas na pele decorrentes à mordida, estas são as mais variadas, sendo as mais comuns: abrasões, contusões, lacerações, equimoses, escoriações, petéquias, avulsões, eritemas e perfurações (VANRELL, 2008; COUTO, 2011). Os dentes atuam como instrumentos contundentes ou corto-contundentes, sendo a última classificação a mais utilizada pelos peritos (MARQUES, GALVÃO e SILVA, 2007; VANRELL, 2008; COUTO, 2011).

Em objetos e, principalmente, em alimentos, as impressões serão dependentes da consistência da superfície mordida. Normalmente, a dinâmica consiste nos dentes superiores prenderem o substrato, enquanto os dentes inferiores cortam. Com isso, diferentemente das impressões deixadas na pele, as marcas nos alimentos e nos objetos apresentam forma de meio arco (SWEET e HILDEBRAND, 1999; MARQUES, GALVÃO e SILVA, 2007; NAETHER et al., 2012).

Partindo do pressuposto de que não existem padrões dentais iguais entre duas pessoas, nem mesmo para gêmeos univitelinos, as marcas de mordida são individualizadas. Assim, torna-se fundamental, conhecer tanto as características da dentição normal, quanto às particularidades incomuns (LESSIG, WENZEL e WEBER, 2006; JAKOBSEN e REPPIEN, 2008).

A unicidade está relacionada no formato do arco, podendo este ser oval, elíptico ou circular, nos arranjos dentais, por exemplo, à combinação da rotação, giroversão e alinhamento dos dentes. E nas diversas peculiaridades dos dentes, como espaços que indicam ausências dentárias, anomalias, desgastes, diastemas, angulações, fraturas, restaurações entre outras (MACDONALD, 1974; MARQUES, GALVÃO e SILVA, 2007; PETTRY, 2008; GOREA e JASUJA, 2010; EVANS et al., 2013; GROVER et al., 2013).

Outra característica que pode ser levada em consideração são os padrões dentais produzidos nas marcas, ou seja, os dentes permanentes são agrupados em incisivos, caninos, pré-molares e molares, sendo cada um desses, gerador de um tipo de registro. Dentes incisivos deixam impressões retangulares nas superfícies; caninos determinam marcas ovais ou triangulares; e pré-molares e molares produzem formas triangulares, circulares ou trapezoides. As marcas dos dentes anteriores são as mais evidentes e suscetíveis à análise (MACDONALD, 1974; MARQUES, GALVÃO e SILVA, 2007; LESSIG, WENZEL e WEBER, 2006;

JAKOBSEN e REPPIEN, 2008; PETTRY, 2008; GOREA e JASUJA, 2010; EVANS et al., 2013; GROVER et al., 2013).

Evidências das marcas de mordida

O estudo das marcas de mordida constitui a análise de duas evidências: Física e Biológica (LESSIG, WENZEL e WEBER, 2006; JAKOBSEN e REPPIEN, 2008; PETTRY, 2008; GOREA e JASUJA, 2010; EVANS et al., 2013; GROVER et al., 2013).

Evidências Físicas

Quando são estudadas as evidências físicas em marcas de mordida, dois princípios básicos são levados em consideração. O primeiro diz respeito à individualidade da dentição para cada indivíduo, podendo, assim, diferenciar cada registro. O segundo está relacionado às características analisadas, servindo como parâmetro de comparação (NAETHER et al., 2012). Os diferentes métodos descritos na literatura utilizam como base a comparação dos atributos individuais da dentição (TUCERYAN et al., 2010).

As evidências físicas podem ser analisadas através de duas formas: análise métrica, que corresponde às mensurações e emparelhamento físico, realizado através da sobreposição das imagens a partir das características observadas na mordida (MAC DONALD, 1974; SWEET et al., 1997; SWEET e SHUTLER, 1999; SWEET e PRETTY, 2001; PETTRY, 2008; HINCHLIFFE, 2011, BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

Na análise métrica, cada detalhe ou traço do dente do suspeito, como comprimento, largura e profundidade, deve ser registrado. Além disso, outras medidas, como a distância intercanina, espaços entre as marcas dos dentes, as indicações de mau posicionamento ou de ausência de dentes, e outras particularidades específicas também devem ser anotadas e calculadas (BERNITZ et al., 2008; STOLS e BERNITZ, 2010; BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

A sobreposição de imagens é feita a partir das diversas técnicas manuais e digitais existentes. São analisados os pontos coincidentes e divergentes. As formas manuais mais comuns de análises utilizam folhas de acetato transparente, posicionadas sobre os modelos de gesso, em que é feita a cópia das superfícies incisais, e posteriormente se sobrepõem às marcas da mordida. Já as técnicas digitais, as manipulações entre as impressões e o modelo de gesso do suspeito são realizadas por programas de computador, a partir de tomadas fotográficas digitalizadas ou de fotografias scaneadas (HERAS et al., 2005; AL-TALABANI et al., 2006; VAN DER VELDEN, SPIESSENS e WILLEMS, 2006; BLACKWELL et al., 2007; FLORA, TUCERYAN e BLITZER, 2009; MILLER et al., 2009; GOREA e JASUJA, 2010; TUCERYAN et al., 2010; SANTORO et al., 2011; NAETHER et al., 2012; EVANS et al. 2013).

Com isso, o uso do registro fotográfico nas perícias das marcas de mordida é de grande importância e faz parte das metodologias descritas (GOLDEN, 2011; MAIOR et al., 2007). Além de revelar com mais detalhes as provas periciadas, as fotografias preservam as evidências físicas das impressões dentais deixadas tanto no alimento quanto na pele humana, que posteriormente, em um curto período de tempo, tendem a se deteriorar (GOLDEN, 2011).

Geralmente, na realização dos registros fotográficos é utilizado o protocolo da ABFO (2002) em que são preconizados os seguintes passos: tirar fotografias seriadas com visão mais ampla para orientação, facilitando o reconhecimento do local da mordida, e outra em close; utilizar uma resolução que permita qualidade; posicionar a máquina fotográfica em um ângulo de 90° com o plano da impressão na tentativa de gerar o mínimo de distorção possível. Fica como opção a utilização ou não de uma escala, que, quando utilizada, deve estar no mesmo plano e adjacente à impressão. Entretanto, recomendam-se utilizar a escala nº 2 da ABFO (GOLDEN, 2011; MAIOR et al., 2007).

A escala nº 2 da ABFO contém duas escalas métricas em formato de “L” com três círculos nas extremidades que possibilitam a correção das distorções, quando o plano da lente não está paralelo à escala (MARQUES, GALVÃO E SILVA, 2007).

Na tentativa de auxiliar as análises das marcas de mordida, preconizam-se a reprodução e armazenagem das superfícies das impressões dentais, utilizando os variados materiais de moldagem existentes na Odontologia, preparados de

acordo com as instruções do fabricante (PETTRY, 2008; HINCHLIFFE, 2011, BEENA et al., 2012). Dentre as propriedades existentes dos materiais de moldagem, as principais características que estes devem apresentar, são: elasticidade, capacidade de reprodução de detalhes e facilidade de manipulação (MAC DONALD, 1974; SWEET e PRETTY, 2001; PETTRY, 2008).

Geralmente, o material de escolha nos casos forenses é o alginato, devido ao seu baixo custo, além de ser de fácil manipulação, e apresentar resultados próximos ao real. Outros materiais como a silicona de condensação, silicona de adição e o poliéter também são descritos como materiais de moldagem nos registros das marcas em casos periciais (MARQUES, GALVÃO E SILVA, 2007).

No caso da moldagem na pele de cadáveres que possibilita informações úteis nas investigações, a área do tecido deve ser removida para facilitar a moldagem (MAC DONALD, 1974; SWEET et al., 1997; SWEET e SHUTLER, 1999; PETTRY, 2008; HINCHLIFFE, 2011). Em alimentos como frutas, queijos e chocolates, antes de qualquer manipulação da peça (moldagem e reprodução do modelo de gesso), são feitas a coleta da saliva para a realização do exame de DNA (HINCHLIFFE, 2011, BEENA et al., 2012; NAETHER et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

A fim de se aplicar as metodologias para análise física, também são realizadas as moldagens dos arcos dentais superior e inferior do suspeito, para que, posteriormente, seja feita a reprodução do modelo de gesso, servindo como instrumento de análise (MAC DONALD, 1974; SWEET et al., 1997; SWEET e SHUTLER, 1999; SWEET e PRETTY 2001; PETTRY, 2008; HINCHLIFFE, 2011; BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

As marcas de mordida podem sofrer distorções resultando na modificação de sua aparência, fazendo com que esta não configure um reflexo exato das características da boca do mordedor, dificultando ou mesmo impedindo uma comparação apropriada da impressão da mordida e da dentição que a causou (SHEASBY e MACDONALD, 2001).

Estas distorções podem ser classificadas em primárias e secundárias (HERAS et al., 2005). Nas distorções primárias, as alterações produzidas ocorrem no momento da mordida, podendo está relacionado, por exemplo, com o substrato mordido, a força aplicada e a duração do ato (SHEASBY e MACDONALD, 2001). Já nas distorções secundárias, as deformações acontecem durante o exame pericial,

em muitos casos na manipulação da prova, e/ou nos registros fotográficos, quando o plano da lente da máquina não está posicionado a 90°C do plano da marca de mordida (PETTRY, 2008; HINCHLIFFE, 2011, BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

Na perícia de marcas de mordidas, a identificação entre o suspeito e a marca analisada pode resultar nas seguintes conclusões: 1) Identificação positiva, o suspeito é identificado por diversos métodos e critérios com o mesmo grau de certeza; 2) Provável identificação, quando é mais provável que o suspeito tenha ocasionado a lesão do que ao contrário; 3) Possível identificação, quando não exclui o suspeito de ter cometido a lesão, ou seja, os dentes do suspeito podem ter efetuado a marca, porém outros indivíduos também podem tê-la efetuado; 4) Dados insuficientes para avaliação, quando o resultado é inconclusivo, existem evidências insuficientes que levem a uma conclusão precisa da ligação entre a dentição do suspeito e a marca produzida; 5) Identificação negativa, quando a conclusão é exclusão, existe discrepâncias entre a marca e a dentadura do suspeito que excluem a possibilidade de o suspeito ser o agressor (MAC DONALD, 1974; SWEET, et al., 1997; SWEET e SHUTLER, 1999; SWEET e PRETTY, 2001; PETTRY, 2008; HINCHLIFFE, 2011, BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

Como visto, a análise física apresenta limitações, já que a marca começa a sofrer alterações logo após o momento da mordida, dificultando a comparação entre a marca produzida e a dentição do suposto suspeito (SHEASBY e MACDONALD, 2001; BUSH et al., 2009; RADFORD et al., 2009). Com isso, quando os métodos de identificação dental estão prejudicados, para obter uma maior confiabilidade nos resultados, sempre que for possível, é indicada também a análise da evidência biológica (MAC DONALD, 1974; SWEET et al., 1997; SWEET e SHUTLER, 1999; SWEET e PRETTY 2001; PETTRY, 2008; HINCHLIFFE, 2011, BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

Evidências Biológicas

Os principais vestígios biológicos encontrados em uma cena do crime, em que se consegue extrair o material para determinar o perfil genético do indivíduo são: manchas de sangue, sêmen, cabelo, ossos, dentes, unhas, saliva, urina e

fluidos biológicos. Eles podem estabelecer o elo entre uma determinada pessoa e o local do crime (MAC DONALD, 1974; SWEET et al., 1997; SWEET e SHUTLER, 1999; SWEET e PRETTY, 2001; PETTRY, 2008; HINCHLIFFE, 2011, BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

Em marcas de mordida, a saliva é a principal fonte para análise da molécula de ácido desoxirribonucleico, conhecido como DNA. Estruturalmente, é uma molécula em forma de dupla hélice, formada por duas longas cadeias de nucleotídeos, fortemente associadas e enroladas em espiral. As pontes de hidrogênio realizam as ligações entre as fitas opostas, pareando adenina com timina e citosina com guanina, constituindo assim os pares de bases nitrogenadas (WALSH et al., 1992; ALLEN, SALDEEN e GYLLENSTEN, 1995; SWEET et al., 1997; SWEET e SHUTLER, 1999; PARYS-PROSZEK, 2001; ANZAI et al., 2005; BARBARO et al., 2006; ELLIS et al., 2007; CARVALHO et al., 2010).

O processo de replicação do DNA gera cópias idênticas às moléculas de DNA presentes na célula-mãe. A enzima DNA polimerase tem a função de construir a cadeia complementar, buscando as bases nitrogenadas correspondentes, a partir da cadeia original (BUTLER, 2009; JOHNSON e WALTER, 2011; MANJUNATH et al. 2011; ZIĘTKIEWICZ et al., 2012).

O genoma humano, em quase sua totalidade, apresenta uma mesma sequência de pares de base. Na identificação humana, apenas 0,1% destas sequências são estudadas para traçar o perfil genético do indivíduo, com exceção dos gêmeos univitelinos que apresentam todas essas sequências de DNA similares entre si (BUTLER, 2009; JOHNSON e WALTER, 2011).

O DNA pode ser encontrado em duas regiões do organismo e, dependendo da sua localização, recebem nomes distintos. São eles: o DNA genômico ou nuclear, encontrado no núcleo das células; e, o DNA mitocondrial (mtDNA), localizado no citoplasma, no interior das mitocôndrias (BUTLER, 2009; JOHNSON e WALTER, 2011).

Apesar de ambos serem utilizados no âmbito forense, o DNA mais utilizado nas rotinas periciais na identificação humana é o DNA nuclear, principalmente por ser metade de origem materna e metade de origem paterna (KOCH e ANDRADE, 2008; BUTLER, 2009; JOHNSON e WALTER, 2011). O DNA mitocondrial é herança exclusivamente da mãe, não podendo, desta forma, estabelecer a relação de informações genéticas com o pai, permitindo apenas traçar

a linhagem materna de uma pessoa (SNTOVSKY et al., 1999; BUTLER, 2009; JOHNSON e WALTER, 2011).

Investigações genéticas envolvem as regiões hipervariáveis de nucleotídeos do DNA com o alto grau de polimorfismo (SNPs, de *single nucleotide polymorphisms*), como os microssatélites ou STRs (*Short Tandem Repeats*), empregando o método de reações em cadeia pela polimerase (PCR) (TAUTZ e RENZS, 1984; WEBER, 1989; TUCERYAN et al., 2010).

Os STRs são formados por curtas sequências de nucleotídeos, variando entre um a seis bases de comprimento, que se repetem in *tandem* (uma após a outra, consecutivamente). A análise dos STR é feita pela contagem do número de vezes que a pequena sequência “loci”, se repete em uma determinada localização cromossômica (TAUTZ e RENZS, 1984; WEBER, 1989; JOBLING, 2004; BUTLER, 2004, 2006, 2007; TUCERYAN et al., 2010).

Atualmente, são os marcadores mais aceitos por apresentarem as seguintes características: maior polimorfismo (maior quantidade de alelos); menor tamanho de pares de base (variando entre 100 a 200); maior heterozigose (superior a 90%) e baixas taxas de mutação (JOBIM, 2003; BUTLER, 2005, 2009; TUCERYAN et al., 2010).

No mercado estão disponíveis kits que pesquisam os STRs, contendo múltiplos marcadores com oligonucleotídeos flanqueadores (*primers*) marcados com fluorocromos. Estes possibilitam a amplificação simultânea, permitindo obter informações dos *loci* numa única reação, diminuindo o tempo de estudo, assim como a quantidade de DNA e de reagente (JOBIM, 2003). Quanto maior o número de locis analisados, menor a probabilidade de duas pessoas apresentarem o mesmo perfil de STRs (VALLONE, HILL e BUTLER, 2008; FREDSLUND et al., 2009; MULLER et al., 2010; VILTROP et al., 2010; WANG et al., 2011; FOSTER e LAURIN, 2012; KIRKHAM et al., 2012; NATHALIE, HADI e GOODWIN, 2012; TUCKER, KIRKHAM e HOPWOOD, 2012; VERHEIJ, HARTEVELD e SIJEN, 2012; WANG et al., 2012).

O Federal Bureau of Investigation (FBI) utiliza os kits comerciais contendo regiões específicas de múltiplos STR, principalmente, quando envolvem estudos populacionais realizados em bancos de dados genéticos, como no caso do CODIS (Combined DNA Index System), que utiliza um software contendo base de dados locais, estaduais e nacional de perfis de DNA de criminosos condenados, nas

evidências da cena do crime sem solução e nos casos de pessoas desaparecidas (BUTLER, 2006).

As vantagens apresentadas nesses kits estão relacionadas ao alto poder de discriminação, podendo ser aplicadas em amostras com quantidades mínimas de DNA ou com alto grau de degradação. Além disso, a detecção de STR multiplex por ser automatizada, otimiza a demanda dos testes de DNA nos laboratórios forenses (VALLONE, HILL e BUTLER, 2008; FREDSLUND et al., 2009; MULLER et al., 2010; VILTROP et al., 2010; WANG et al., 2011; FOSTER e LAURIN, 2012; KIRKHAM et al., 2012; NATHALIE, HADI e GOODWIN, 2012; TUCKER, KIRKHAM e HOPWOOD, 2012; VERHEIJ, HARTEVELD e SIJEN, 2012; WANG et al., 2012).

Em restos de alimentos mordidos e em recipientes nos quais líquidos foram consumidos, a saliva é comumente depositada (SWEET e HILDEBRAND, 1997; NAETHER et al., 2012) e é por meio das células presentes na saliva que são realizadas as análises de DNA para identificação humana (ANZAI et al., 2005; NG et al., 2004; CARVALHO et al., 2010; MURUGANANDHAN e SIVAKUMAR, 2011; NEMODA et al., 2011; DURDIAKOVÁ et al., 2012; NUNES et al., 2012).

A análise do material genético forense abrange diferentes etapas que corresponde desde a coleta das amostras, extração, quantificação, amplificação e até a detecção do DNA (JOBLING, 2004; BUTLER, 2006; MANJUNATH et al., 2011; ZIĘTKIEWICZ et al., 2012). O êxito final nos resultados das análises está diretamente relacionado aos cuidados na execução de todas as fases supracitadas, e principalmente nas condições mínimas de segurança da amostra a ser analisada.

Para preservar a integridade da prova e minimizar danos irrecuperáveis no material coletado, que muitas vezes resulta no comprometimento da idoneidade do processo, torna-se necessário a realização do minucioso controle de segurança, conhecido como Cadeia de Custódia (CC) (VANRELL, 2008; COUTO, 2011). A CC é usada para manter e documentar a história cronológica da evidência, para rastrear a posse e o manuseio da amostra abrangendo todas as etapas e pessoas relacionadas à análise. Com isso, faz parte da normatização, registrar todas as informações relacionadas às partes internas e externas de campo, de laboratório e de pessoas que manusearam a amostra, conforme um programa previamente estabelecido e acordado, com conscientização e treinamento sobre as respectivas etapas e responsabilidades (GIANNELLI, 1996).

Existem diferentes métodos para a coleta da saliva. As principais técnicas são o filtro de papel, a técnica do swab simples e a técnica do duplo swab (SWEET et al. 1997).

Atualmente, são realizadas as técnicas que utilizam o swab. Este é um tipo de cotonete de haste longa, revestida com algodão ou outro material absorvente. Para a coleta e a transferência do maior número de células salivares, o swab deve ser previamente umedecido com água destilada estéril, e passado levemente sobre a superfície da mordida em movimento de rotação, com moderada pressão, buscando o maior contato para a maior recuperação do remanescente da saliva (SWEET et al., 1997; SWEET e HILDEBRAND, 1999; SWEET e SHUTLER, 1999; ANZAI et al., 2005; CARVALHO et al., 2010).

Entre os métodos de coleta supracitados a mais utilizada nos dias atuais é a técnica do duplo swab, em que são utilizados dois swabs estéreis, sendo o primeiro umedecido para que ocorra a rehidratação e deslocamento das células, com a seguida coleta das células com o segundo swab seco, buscando-se obter o máximo de evidências possíveis (SWEET et al., 1997; NG et al., 2004; ANZAI et al., 2005; CARVALHO et al., 2010). Posteriormente, tanto o swab umedecido quanto o swab seco devem ser secos ao ar livre (SWEET et al., 1997).

A etapa da coleta exige precauções, pois o material disponível para análise geralmente encontra-se fragmentado ou em quantidades escassas. Pensando nisso, é importante o seu correto manuseio, coleta e armazenamento (ANZAI et al., 2005; NG et al., 2004; CARVALHO et al., 2010; MURUGANANDHAN e SIVAKUMAR 2011; NEMODA et al., 2011; DURDIAKOVÁ et al., 2012; NUNES et al. 2012). A técnica mais utilizada para conservação da integridade das amostras é o congelamento (ANZAI et al., 2005; NG et al. 2004; CARVALHO et al., 2010). Entretanto, já existem no mercado, produtos testados e aprovados cientificamente que estabilizam o DNA, permitindo assim, que amostras recolhidas em qualquer lugar sejam encaminhadas para análises de forma segura (EHLI et al. 2008; PHILLIPS, MCCALLUM e WELCH 2012; TERADA, 2013).

A extração do DNA se baseia em isolar o material genético das outras partes da célula. Existem diferentes metodologias descritas na literatura, entre elas, as mais conhecidas são a extração orgânica com fenol clorofórmico e a C Chelex®100 (BOWERS, 2006; JOBLING, 2004; BUTLER, 2006, BUTLER, 2009; JOHNSON e WALTER, 2011). Além disso, foram criados kits específicos de

extração para essa finalidade (EHLI et al., 2008; COTTON et al., 2000; PHILLIPS, MCCALLUM e WELCH, 2012)

Assim como na extração, na quantificação existem inúmeros métodos capazes de analisar a quantidade e qualidade das amostras obtidas (BOWERS, 2006; JOBLING, 2004; BUTLER, 2006). Essa etapa é muito importante, pois, torna possível a adequação da concentração do DNA para posterior amplificação (MORLING, 2009).

A amplificação do DNA é um processo enzimático a partir da reação da cadeia de polimerase (PCR). Para esta etapa, utiliza-se um termociclador capaz de realizar ciclos de variação do tempo e da temperatura (BOWERS, 2006; JOBLING, 2004; BUTLER, 2006, 2009; JOHNSON e WALTER, 2011)

Os componentes presentes na PCR são: pequenas quantidades de DNA alvo, tampão salino contendo a polimerase, primers (iniciadores), quatro desoxinucleótidos constituintes do DNA (dNTPs) e o cofactor Mg^{2+} (BUTLER, 2009; MORLING, 2009; JOHNSON e WALTER, 2011).

As etapas dos ciclos de amplificação consistem na desnaturação (com a ação do calor, ocorre a separação da dupla hélice do DNA), anelamento (ligação dos primers ao DNA alvo da cadeia simples) e a extensão dos primers (síntese da cadeia complementar de cada cadeia molde, catalisada pelo DNA polimerase) (CURRY et al., 2005; BUTLER, 2009; JOHNSON e WALTER, 2011).

Este ciclo é repetido diversas vezes, resultando no aumento da concentração de DNA pré-existente, gerando um crescimento exponencial. Contudo, no procedimento da PCR é preciso conhecer a sequência de DNA que se deseja amplificar para que possam ser sintetizados os primers específicos (BUTLER, 2006, 2009).

Outro ponto importante nesta etapa está relacionando ao alto grau de sensibilidade da técnica, podendo, muitas vezes, resultar na contaminação da amostra estudada por DNA estranho. Além disso, quando a concentração do DNA é muito abaixo, os produtos da PCR encontram-se abaixo do limiar de detecção, podendo resultar assim em um falso homozigoto quando um dos alelos não é detectado (JOBLING; 2004; BOWERS, 2006; BUTLER, 2006).

A eletroforese é uma técnica aplicada na biologia molecular que possibilita analisar os produtos da PCR através da separação das moléculas em função da massa, da carga, da forma e da compactação. Tal procedimento é

considerado rápido, sensível e preciso. A migração acontece pela ação de uma corrente elétrica em suportes como géis de agarose ou poliacrilamida (BOWERS, 2006; JOBLING; 2004; BUTLER, 2006).

O princípio da técnica se baseia na carga negativa da fita de DNA (grupos de fosfato) migrando o para o polo positivo. Sendo assim, íons livres, moléculas inteiras ou fragmentos de DNA são separados, aplicando-se uma determinada voltagem, e ao final do processo, o DNA de baixa massa molecular estará próximo ao polo positivo (BOWERS, 2006; JOBLING; 2004; BUTLER, 2006).

Uma tecnologia utilizada para análise dos produtos gerados em PCR é o sequenciamento automático de DNA, que permite a armazenagem dos resultados em ficheiros com o uso de um *software* apropriado. Um dos métodos mais usados é o “método didesoxi”, conhecido como “terminadores de cadeia” ou de “Sanger”, que consiste em identificar o último nucleotídeo agrupado na extremidade da cadeia (HINCHLIFFE, 2011, BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

As sequências de nucleotídeos de uma amostra suspeita são comparadas com a amostra de referência, na tentativa de avaliar o perfil genético do indivíduo, podendo ou não resultar em uma identificação positiva (HINCHLIFFE, 2011, BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013). Na análise comparativa dos produtos obtidos, os alelos vinculados aos loci são estudados. Quando são classificados “em inclusão”, os cálculos estatísticos são feitos baseados na frequência em que um dado alelo loci específico aparece numa determinada população, podendo ainda gerar resultados como a exclusão (não coincidentes) e inconclusivo (não há conclusão) (SWEET e HILDEBRAN, 1999; BARBARO et al. 2006; PRETTY, 2008; HINCHLIFFE, 2011, BEENA et al., 2012; SINGH et al., 2012; GROVER et al., 2013).

A grande maioria das pesquisas publicadas sobre marcas de mordida em alimentos e atos de sucção foram realizadas em países de clima temperado. Com base na literatura, as perícias em marcas de mordida (evidências físicas e biológicas) têm contribuído de forma significativa para a condenação de pessoas envolvidas em crimes.

Assim, é de fundamental importância conhecer as condições desta análise em países de clima tropical, como o Brasil. Tais conhecimentos fornecem embasamento às autoridades competentes e aos serviços periciais, a respeito do

tempo máximo em que a saliva encontrada em um local do crime ou armazenada em geladeira, poderá ser útil na análise forense, bem como, a validação e eficiência dos métodos.

Objetivo

2 OBJETIVO

O presente trabalho teve como objetivo:

- a) Aplicar dois métodos de análise métrica (Paquímetro digital e Software ImageJ) e dois métodos de emparelhamento físico (sobreposição manual e sobreposição digital utilizando software Adobe Photoshop) em marcas de mordida produzidas em queijos e chocolates, em diferentes condições de tempo e temperatura;
- b) Obter a recuperação de DNA extraído da saliva de queijos e chocolates mordidos e de garrafas de água consumidas, em diferentes condições de tempo e temperatura.

Material e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos Éticos

Inicialmente, o projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CEP – FORP/ USP), sendo aprovado sob o registro CAAE nº 05944812.2.0000.5419, Parecer nº 164.620 (Anexo A).

3.2 Coleta das amostras

As amostras foram provenientes de 20 sujeitos da pesquisa, sendo dez do sexo masculino e dez do sexo feminino, com idade acima de 18 anos, sendo apresentado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, o qual foi aceito, preenchido e assinado pelos participantes.

3.2.1 Mordida dos alimentos e sucção de bebidas

Cada indivíduo foi orientado a morder cinco pedaços de queijo, cinco pedaços de chocolate e beber em cinco garrafas de água, totalizando 15 amostras de cada um dos 20 sujeitos da pesquisa. As mordidas dos alimentos foram produzidas pelos dentes anteriores, de canino a canino (Figura 1).

Figura 1. Mordida em alimentos e ato de sucção

3.2.2 Moldagem e confecção dos modelos de gesso

Também foram feitas as moldagens dos arcos dentais superiores e inferiores dos participantes com o material alginato (Jeltrate®, Dustless, Petrópolis,

Brasil), e a posterior confecção dos modelos de gesso com gesso Tipo IV (Dent Mix 4, Asfer, São Caetano do Sul, Brasil) (Figura 2).

Figura 2. Material para moldagem e confecção do modelo de gesso.

3.3 Grupos amostrais

Uma vez que os alimentos foram mordidos e as águas consumidas, as amostras produzidas foram armazenadas e analisadas de acordo com a temperatura (ambiente: 24 a 37°C; e geladeira: 2 a 4°C) e tempo (logo após o consumo, três dias, sete dias), conforme exposto nos Quadros 1.

Quadro 1. Grupos amostrais de acordo com o tempo e a temperatura.

Temperatura Ambiente			Temperatura Geladeira (2 a 4°C)	
Tempo	Logo após	Queijo	1 amostra	
		Chocolate	1 amostra	
		Água	1 amostra	
	3 dias	Queijo	1 amostra	1 amostra
		Chocolate	1 amostra	1 amostra
		Água	1 amostra	1 amostra
	7 dias	Queijo	1 amostra	1 amostra
		Chocolate	1 amostra	1 amostra
		Água	1 amostra	1 amostra

3.4 Evidências Biológicas

3.4.1 Coleta da Saliva

De acordo com cada período amostral, foram feitas as coletas da saliva utilizando o método do duplo swab. O primeiro swab foi umedecido com água estéril, por meio de uma seringa, para não embeber demais (Figura 3). O swab foi passado sobre a superfície da mordida e da garrafa, tornando úmida a saliva seca, e posteriormente foi utilizado o swab seco. O movimento realizado foi de rotação e com moderada pressão (Figura 4). Antes de iniciar o processo de extração, os swabs foram deixados, por 30 minutos, para secar, cortados e colocados em um eppendorf 1,5mL dando início a etapa de extração do DNA (Figura 5).

Figura 3. Swab umedecido por água estéril.

Figura 4. Swab na superfície da marca de mordida e na garrafa de água consumida.

Figura 5. Swabs secos, cortados e colocados em um eppendorf 1,5 ml.

3.4.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído utilizando o QIAamp® DNA Investigator Kit (Qiagen®, Hilden, Germany) (Figura 6), de acordo com as instruções do fabricante, utilizando os protocolos de extrações de DNA para o swab (Qiagen, 2010).

Figura 6. QIAamp® DNA Investigator Kit (Qiagen®, Hilden, Germany)

3.4.3 Quantificação do DNA

As amostras de DNA recuperado foram quantificadas utilizando o equipamento espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific™) com o objetivo de detectar a quantidade de DNA nas concentrações amostrais (ng/μl) (Figura 7.).

Figura 7. Espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific™), Laboratório de Odontologia Legal – FORP/USP.

3.4.4 Amplificação do DNA

A amplificação do DNA genômico extraído das amostras foi realizada por meio do método PCR no equipamento termociclador Mastercycler® Nexus (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

Foi utilizado o kit de identificação humana AmpFLSTR® Identifiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems®, Carlsbad, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

O Kit possui um sistema que permite a amplificação simultânea de 15 loci de STRs autossômicos (CSF1P0, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA), além do loco da Amelogenina (para determinação do sexo), utilizando-se *primers* marcados com fluorescência (Figura 8.).

Figura 8. AmpFLSTR® Identifiler PCR Amplification Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, EUA).

3.4.4.1 Preparo das soluções para PCR

Inicialmente foram calculados os volumes das soluções AmpFISTR® NGM™ Master Mix e AmpFISTR® NGM™ Primer Set para a reação de amplificação, fornecidos pelo kit AmpFLSTR® Identifier PCR Amplification (Applied Biosystems®, Carlsbad, CA, EUA). Para cada amostra, a proporção está demonstrada no Quadro 2.

Quadro 2. Cálculo do volume dos componentes necessários para preparo das reações de amplificação

Reagentes do Kit	Volume por reação (µL)
AmpFISTR® NGM™ Master Mix	10.0 µL
AmpFISTR® NGM™ Primer Set	5.0 µL

Cada 15µL da mistura (AmpFISTR® NGM™ Master Mix e AmpFISTR® NGM™ Primer Set) foram adicionadas nas placas de reações (MicroAmp® Optical 96 Well Reaction Plate, Applied Biosystems®, Carlsbad, CA, EUA) contendo 96 poços, na qual, posteriormente, foram inseridas as amostras. Também foram colocadas as amostras de controle negativo e controle positivo.

3.4.4.2 Preparo das amostras de DNA

Como descrito no Manual do Kit AmpFLSTR® Identifier PCR Amplification (Applied Biosystems®, Carlsbad, CA, EUA) antes da realização do preparo das amostras, foi necessário preparar um Tampão de baixo TE (Tris-HCl [10mM], pH 8,0; EDTA [0,2mM], pH 8,0; água destilada [990mL]).

A partir da concentração de DNA de cada produto da extração, foi feito o cálculo do volume de DNA em uma proporção de 1ng de DNA total diluído com o tampão de baixo teor de TE, para um volume final de 10µl. Posteriormente para cada amostra diluída foi adicionada na mistura (AmpFISTR® NGM™ Master Mix e AmpFISTR® NGM™ Primer Set), totalizando um volume final de reação de 25µl.

Para o controle positivo e negativo da reação foi adicionado junto a mistura (AmpFISTR® NGM™ Master Mix e AmpFISTR® NGM™ Primer Set) 10µl de

007 DNA controle e 10 µL do tampão de baixo teor de TE, respectivamente (Quadro 3.).

Quadro 3. Cálculo do volume dos componentes para cada amostra

Amostras	Reagentes	Mistura	Volume Final
DNA	1 ng da [] de DNA diluído em TE para volume final de 10 µL	Mix 10 µL	25 µL
Controle positivo	10 µL de 007 DNA controle	Primer 5 µL	
Controle negativo	10 µL de TE		

O tempo e a temperatura de cada etapa do ciclo de amplificação foi programado de acordo com o estabelecido no Manual do Kit AmpFLSTR® Identifier PCR Amplification (Applied Biosystems®, Carlsbad, CA, EUA), conforme demonstrado no Quadro 4.

Quadro 4. Etapas do ciclo de amplificação.

Incubação Inicial	Ciclo (29)		Extensão Final	Final da Reação
	Desnaturação	Anelamento		
Manter	Ciclo		Manter	Manter
95°C	94°C	59°C	60°C	4°C
11 min	20 seg	3 min	10 min	∞

Após completa corrida, o DNA amplificado foi protegido da luz e armazenado de acordo com as instruções do fabricante do kit (Quadro 5.).

Quadro 5. Orientações de armazenamento das amostras amplificadas.

Armazenamento do DNA amplificado	Temperatura
Menos que 2 semanas	2 a 8°C
Mais que 2 semanas	-15 a -25°C

3.4.5 Eletroforese em gel de Agarose

Para analisar qualitativamente o produto final da amplificação de DNA, foram utilizados géis de agarose (Seakem[®], FNC Inc.) a 2% em tampão TAE (Tris acetato [10,0mM]; EDTA [1,0mM] pH 8,0).

Foram separados para cada amostra 3ul do produto da amplificação e colocados em tubos de microcentrifugação (Axygen, Inc, EUA) de 0,5 mL com 6 ul de água Milli-Q e 1 ul de gel Red (Invitrogen[®], EUA) diluído.

Para visualização do número de pares de base para cada loci do kit multiplex, foi preparado o marcador (DNA ladder 100 bp) de pares de base, na qual se adicionou 0,5 ul do marcador, 8,5 ul de água Milli-Q e 1 ul de gel Red (Invitrogen[®], EUA) diluído.

A eletroforese foi realizada a 80V durante duas horas e, após iluminação com luz ultravioleta, os géis foram fotografados pelo sistema de imagem (Chemi Doc MP, Biorad) (Figura 9.).

Figura 9. Aplicação das amostras para eletroforese em gel de agarose a 2%.

3.5 Evidências Físicas

Inicialmente foram confeccionadas moldeiras que auxiliaram e padronizaram a moldagem dos alimentos. Estas foram produzidas com resina

acrílica (Jet Acrílico pó e líquido, São Paulo, Brasil) em formato retangular com dimensões aproximadas de 5cm de altura X 5cm de largura X 8cm de comprimento (Figura 10).

Figura 10. Materiais para confecção das moldeiras para moldagem dos alimentos.

Os modelos de gesso dos sujeitos da pesquisa e os alimentos mordidos foram fotografados utilizando a máquina fotográfica digital (Canon Power Shot SX1 ISI, CANON, Tóquio, Japão) em alta resolução com as seguintes referências: distância do alimento ao foco: 47,6 cm; ISO 100.

Após as tomadas fotográficas, os alimentos de análise imediata eram moldados, e os de três e sete dias armazenados em um recipiente de plástico com tampa em diferentes temperaturas (ambiente e geladeira), e posteriormente também foram moldados de acordo com o tempo estipulado.

A moldagem de cada alimento foi realizada utilizando o alginato (Jeltrate[®], Dustless, Petrópolis, Brasil) e posteriormente foram confeccionados os modelos de gesso com gesso Tipo IV. Para ambos os materiais seguiu-se as instruções do fabricante.

A partir dos modelos de gesso das dentições dos sujeitos da pesquisa, dos modelos de gesso dos alimentos mordidos e os registros fotográficos, foram

feitas as análises das marcas de mordidas utilizando quatro métodos, sendo dois envolvendo as análises métricas e dois o emparelhamentos físicos.

As análises das marcas de mordida foram realizadas por um único examinador, devidamente calibrado, sendo executada sem o conhecimento da identidade dos sujeitos da pesquisa. As avaliações ocorreram em momentos diferentes, com intervalo de tempo de 2 semanas para cada método aplicado.

3.5.1 Aplicação dos métodos

3.5.1.1 Análise Métrica

Com relação à análise métrica, as medidas obtidas foram às distâncias intercaninas e as distâncias mesiodistal dos dentes superiores (11, 12, 13, 21, 22 e 23) e dentes inferiores (31, 32, 33, 41, 42 e 43) registradas nas mordidas de cada alimento e nas dentições dos sujeitos da pesquisa (SWEET, 1997; ABFO, 2011).

3.5.1.1.1 Método utilizando o paquímetro digital

No presente método, as mensurações foram feitas nos modelos de gesso da dentição dos sujeitos da pesquisa e nos modelos de gessos dos chocolates e queijos mordidos utilizando o paquímetro digital (Digital Caliper, Cixi Xinzheng Trade Co., Ltd., Zhejiang, China) (Figura 11) (SWEET, 1997; MARQUES, 2004; ABFO, 2011).

Figura 11. Método utilizando o paquímetro digital.

3.5.1.1.2 Método utilizando o Software ImageJ

Nesta técnica, foi utilizado o programa de computador ImageJ, software para processamento e análise de imagens que apresenta ferramentas capazes de medir distâncias e ângulos. Neste caso, as mensurações foram tomadas a partir de imagens fotográficas produzidas dos modelos de gesso dos participantes da pesquisa e dos alimentos mordidos (queijos e chocolates) (Figura 12) (MALOTH e GANAPATHY, 2011).

Figura 12. Método utilizando o Software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland).

3.5.1.2 Emparelhamento Físico

Foram feitas as comparações da forma e padrão dos registros das marcas dos queijos e chocolates mordidos com a dentição do suspeito através de dois tipos de sobreposição: manual e digital.

3.5.1.2.1 Método manual

A sobreposição neste caso foi feita a partir do modelo de gesso da dentição dos sujeitos da pesquisa com os modelos de gesso dos alimentos gerados (Figura 13.) (SWEET, 1997; ABFO, 2011).

Figura 13. Método manual

3.5.1.2.2 Método utilizando o software Adobe Photoshop

As sobreposições neste caso foram feitas a partir das imagens digitais dos modelos de gesso das dentições dos participantes e as fotografias dos alimentos mordidos (Figura 14.) (HERAS et al., 2005; AL-TALABANI et al., 2006; VAN DER VELDEN, SPIESSENS e WILLEMS, 2006; FLORA, TUCERYAN e BLITZER, 2009; TUCERYAN et al., 2010, EVANS et al., 2013)

Figura 14. Método utilizando o software Adobe Photoshop (Adobe Systems, Inc., Mountain View, California, USA).

5.5.1.2.3 Análise das técnicas de emparelhamento físico

Para facilitar as análises dos resultados das técnicas de sobreposição, foram estipulados para ambos os métodos descritos acima o número quantitativo de identificados, de possíveis identificações e não identificados.

3.5.1.3 Análise estatística

Os dados foram tabulados em planilhas do programa excel (Windows XP, Microsoft, EUA). Para análise métrica dos dados foram obtidas distribuições absolutas e medidas de estatística descritiva: média e desvio padrão. Para avaliação das distâncias foi utilizado o teste estatístico T Student. Para comparação intraobservador foi determinado o Índice de Kappa. O programa estatístico utilizado foi o SPSS 12.0 (SPSS para Windons, SPSS INC, Chicago, ILL, USA).

Resultado

4 RESULTADOS

4.1 Análises Físicas

Foram produzidos um total de 200 impressões em alimentos, sendo 50 queijos e 50 chocolates mordidos pelos 10 participantes do sexo masculino e 50 queijos e 50 chocolates mordidos pelos 10 participantes do sexo feminino.

Com relação aos registros gerados, os dentes analisados foram de canino a canino, tanto do arco dental superior quanto do arco dental inferior. Entretanto, alguns dentes isoladamente tiveram que ser excluídos da análise por não aparecerem nitidamente nas impressões produzidas.

Antes de aplicar os cálculos estatísticos relacionados às análises métricas, as medidas encontradas, tanto no método utilizando o paquímetro digital quanto no método utilizando o ImageJ, foram transformadas em valores normalizados, ou seja, os dados obtidos nas análises da distância intercanina e de distância mesiodistal de cada dente foi dividido pelo valor padrão/base de cada medida, gerando assim um valor equalizado que possa ser comparado (CECÍLIO et al. 2010). Quanto mais esses valores obtidos na neutralização se aproximaram de 1, mais próximo foram do valor real. Para valores acima de 1, as medidas encontradas corresponderam à mensurações supramensuradas e abaixo de 1, submensuradas.

Ao analisar as medidas encontradas nos métodos métricos, observou-se que não houve diferença significativa nas amostras de ambos os sexos entre as técnicas aplicadas, ou seja, tanto os valores obtidos por meio da técnica utilizando paquímetro digital quanto os valores mensurados pela técnica realizada através do software ImageJ são equivalentes entre si, destacados conforme expresso nas Tabelas 1 a 14.

Tabela 1. Média e desvio padrão das análises métricas da distância intercanina dos dentes superiores em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

Grupo amostral dentes superiores								
			DI Paquímetro			DI Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	1,05±0,05		10	1,04 ± 0,06	
		3 dias	9	1,32 ± 0,74	1,06 ± 0,79	10	1,06 ± 0,08	1,04 ± 0,05
		7dias	9	1,07 ± 0,75	1,08 ± 0,11	10	1,10 ± 0,11	1,04 ± 0,06
	Chocolate	Imediato	9	1,02 ± 0,63		8	1,00 ± 0,42	
		3 dias	8	1,01 ± 0,48	1,00 ± 0,03	8	0,98 ± 0,04	0,98 ± 0,38
		7dias	7	1,00 ± 0,02	0,98 ± 0,03	8	1,00 ± 0,11	0,99 ± 0,06
Masculino	Queijo	Imediato	8	1,02 ± 0,08		10	1,01 ± 0,04	
		3 dias	9	1,07 ± 0,10	1,09 ± 0,12	10	1,05 ± 0,04	1,02 ± 0,05
		7dias	9	1,05 ± 0,06	1,13 ± 0,11	10	1,07 ± 0,05	1,07 ± 0,06
	Chocolate	Imediato	7	0,98 ± 0,12		8	1,00 ± 0,05	
		3 dias	7	0,98 ± 0,04	1,00 ± 0,08	10	1,01 ± 0,06	1,03 ± 0,06
		7dias	8	1,00 ± 0,11	0,98 ± 0,11	9	1,01 ± 0,11	0,98 ± 0,07

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 2. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 13 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

Grupo amostral dentes superiores								
			13 Paquímetro		13 Image J			
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	8	1,06 ± 0,10		10	1,07 ± 0,11	
		3 dias	8	1,05 ± 0,19	1,08 ± 0,16	10	1,16 ± 0,30	1,07 ± 0,15
		7dias	8	0,97 ± 0,41	1,13 ± 0,08	9	1,18 ± 0,17	1,13 ± 0,13
	Chocolate	Imediato	6	1,19 ± 0,59		6	1,24 ± 0,17	
		3 dias	8	1,10 ± 0,08	1,13 ± 0,14	10	1,22 ± 0,18	1,24 ± 0,21
		7dias	7	1,04 ± 0,06	1,18 ± 0,12	9	1,18 ± 0,12	1,19 ± 0,19
Masculino	Queijo	Imediato	7	1,02 ± 0,13		10	0,95 ± 0,06	
		3 dias	8	1,10 ± 0,09	1,12 ± 0,16	10	1,10 ± 0,18	1,11 ± 0,12
		7dias	8	1,08 ± 0,16	1,02 ± 0,06	10	1,15 ± 0,09	1,01 ± 0,11
	Chocolate	Imediato	4	1,26 ± 0,12		8	1,35 ± 0,28	
		3 dias	8	1,07 ± 0,07	1,11 ± 0,10	10	1,49 ± 0,64	1,39 ± 0,31
		7dias	7	0,99 ± 0,11 *	1,12 ± 0,14	9	1,29 ± 0,40 *	1,25 ± 0,29

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 3. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 12 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

Grupo amostral dentes superiores								
			12 Paquímetro			12 Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	0,95 ± 0,11		10	0,99 ± 0,97	
		3 dias	9	0,90 ± 0,13	0,95 ± 0,07	10	0,97 ± 0,20	1,03 ± 0,15
		7dias	8	0,95 ± 0,08	1,08 ± 0,09 *	10	1,05 ± 0,23	0,95 ± 0,11 *
	Chocolate	Imediato	10	1,01 ± 0,18		10	1,14 ± 0,21	
		3 dias	10	0,91 ± 0,18	0,88 ± 0,15 *	10	1,08 ± 0,25	1,05 ± 0,19 *
		7dias	9	0,89 ± 0,06	0,92 ± 0,10	10	1,11 ± 0,38	0,97±0,15
Masculino	Queijo	Imediato	10	0,97 ± 011		10	0,97 ± 0,10	
		3 dias	10	0,97 ± 0,13	0,96 ± 0,10	10	1,05 ± 0,27	1,03 ± 0,11
		7dias	10	0,97 ± 0,15	1,00 ± 0,07	10	0,97 ± 0,13	1,01 ± 0,10
	Chocolate	Imediato	10	0,94 ± 0,08		10	1,09 ± 0,29	
		3 dias	9	0,93 ± 0,11	0,88 ± 0,10	10	1,13 ± 0,19	1,17 ± 0,23
		7dias	9	1,13 ± 0,34	1,01 ± 0,28	10	1,05 ± 0,23	1,03 ± 0,14

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 4. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 11 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

			Grupo amostral dentes superiores					
			11 Paquímetro			11 Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	0,99 ± 0,10		10	1,16 ± 0,28	
		3 dias	8	1,02 ± 0,11	1,04 ± 0,74	10	1,13 ± 0,24	1,10 ± 0,08
		7dias	8	1,06 ± 0,12	1,08±0,92	10	1,14 ± 0,29	1,11± 0,13
	Chocolate	Imediato	10	1,07 ± 0,16		10	1,16 ± 0,21	
		3 dias	9	1,04 ± 0,10	1,04 ± 0,14	10	1,16 ± 0,16	1,14 ± 0,13
		7dias	9	1,04 ± 0,13	1,07 ± 0,10	9	1,09 ± 0,12	1,10 ± 0,29
Masculino	Queijo	Imediato	10	1,07 ± 0,07		10	1,05 ± 0,72	
		3 dias	9	1,10 ± 0,23	1,10±0,27	10	1,07 ± 0,14	1,05 ± 0,04
		7dias	9	0,98 ± 0,12	1,07 ± 0,10	10	1,03 ± 0,09	1,08 ± 0,06
	Chocolate	Imediato	10	1,03 ± 0,10		10	1,07 ± 0,16	
		3 dias	10	1,04 ± 0,12	1,08 ± 0,12	10	1,13 ± 0,09	1,13 ± 0,09
		7dias	9	1,01 ± 0,12	1,06 ± 0,08	10	1,03 ± 0,13	1,07 ± 0,12

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 5. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 21 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

			Grupo amostral dentes superiores					
			21 Paquímetro			21 Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	0,98 ± 0,73 *		10	1,05 ± 0,04 *	
		3 dias	9	1,01 ± 0,74	1,04 ± 0,10	10	1,09 ± 0,16	1,10 ± 0,12
		7dias	8	1,06 ± 0,10	1,09 ± 0,10	10	1,10 ± 0,29	1,07 ± 0,08
	Chocolate	Imediato	10	1,05 ± 0,12		10	1,11 ± 0,15	
		3 dias	9	1,01 ± 0,06	1,02 ± 0,12	9	1,06 ± 0,08	1,11 ± 0,13
		7dias	9	1,00 ± 0,12	1,05 ± 0,08		1,05 ± 0,11	1,10 ± 0,10
	Queijo	Imediato	10	1,06 ± 0,89		10	1,03 ± 0,08	
		3 dias	9	1,09 ± 0,16	1,10 ± 0,22	10	1,07 ± 0,15	1,07 ± 0,05
		7dias	10	1,01 ± 0,13	1,09 ± 0,12	10	1,08 ± 0,11	1,08 ± 0,69
Masculino	Chocolate	Imediato	10	1,05 ± 0,11		10	1,10 ± 0,16	
		3 dias	9	1,11 ± 0,11	1,07 ± 0,13	10	1,11 ± 0,10	1,18 ± 0,11
		7dias	10	1,01 ± 0,13	1,10 ± 0,10	10	1,09 ± 0,13	1,16 ± 0,11

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 6. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 22 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

Grupo amostral dentes superiores								
			22 Paquímetro			22 Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	0,99 ± 0,11		10	0,99 ± 0,10	
		3 dias	9	0,99 ± 0,21	1,01 ± 0,98	10	1,02 ± 0,11	1,00 ± 0,15
		7dias	8	1,00 ± 0,10	1,03 ± 0,13	10	1,10 ± 0,18	0,97 ± 0,13
	Chocolate	Imediato	10	0,97 ± 0,15		10	1,08 ± 0,15	
		3 dias	9	1,05 ± 0,18	0,98 ± 0,17	10	1,06 ± 0,23	1,04 ± 0,21
		7dias	8	0,88 ± 0,30	1,00 ± 0,12	10	1,11 ± 0,19	0,95 ± 0,15
Masculino	Queijo	Imediato	10	0,98 ± 0,15		10	0,95 ± 0,12	
		3 dias	10	1,00 ± 0,15	0,95±0,18	10	0,96 ± 0,18	0,98 ± 0,12
		7dias	10	1,02 ± 0,14	1,08 ± 0,21	10	1,03 ± 0,11	0,98 ± 0,12
	Chocolate	Imediato	9	1,02 ± 0,14		10	1,03 ± 0,05	
		3 dias	9	1,02 ± 0,13	0,93 ± 0,16	10	1,00 ± 0,15	1,03 ± 0,23
		7dias	9	1,03 ± 0,23	1,01 ± 0,14	10	1,03 ± 0,17	1,00 ± 0,16

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 7. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 23 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

Grupo amostral dentes superiores								
			23 Paquímetro			23 Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	1,03 ± 0,14		10	1,09 ± 0,20	
		3 dias	9	0,97 ± 0,22	0,99 ± 0,12	10	1,05 ± 0,14	0,99±0,06
		7dias	8	1,09 ± 0,20	0,98 ± 0,20	9	1,07 ± 0,14	1,05 ± 0,15
	Chocolate	Imediato	6	0,94 ± 0,14 *		9	1,41 ± 0,50 *	
		3 dias	8	1,07 ± 0,08	1,00 ± 0,15	8	1,19 ± 0,14	1,04 ± 0,21
		7dias	5	1,06 ± 0,10	0,97 ± 0,18	9	1,18 ± 0,25	1,14 ± 0,26
Masculino	Queijo	Imediato	8	1,04 ± 0,15		10	1,01 ± 0,16	
		3 dias	9	1,16 ± 0,22	1,04 ± 0,13	10	1,16 ± 0,18	1,09 ± 0,19
		7dias	9	1,09 ± 0,09	1,20 ± 0,19	10	1,18 ± 0,19	1,15 ± 0,21
	Chocolate	Imediato	6	1,16 ± 0,19		8	1,21 ± 0,38	
		3 dias	7	0,98 ± 0,04 *	1,01 ± 0,06 *	9	1,30 ± 0,30 *	1,40 ± 0,28 *
		7dias	8	1,02 ± 0,07 *	0,98 ± 0,11 *	9	1,31 ± 0,24 *	1,23 ± 0,20 *

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 8. Média e desvio padrão das análises métricas da distância intercanina dos dentes inferiores em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

Grupo amostral dentes inferiores								
			DI Paquímetro			DI Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	0,96 ± 0,99		10	0,95±0,05	
		3 dias	10	0,96 ± 0,94	0,99 ± 0,03	10	1,02±0,07	0,94±0,06
		7dias	9	0,96 ± 0,53	0,89 ± 0,29	10	0,99±0,05	0,95±0,08
	Chocolate	Imediato	9	0,95 ± 0,40		10	0,92±0,05	
		3 dias	9	0,92 ± 0,45	0,94 ± 0,41	9	0,93±0,08	0,92±0,06
		7dias	9	0,92 ± 0,59	0,93 ± 0,55	10	0,95±0,06	0,90±0,51
Masculino	Queijo	Imediato	10	0,98 ± 0,13		10	1,01±0,06	
		3 dias	10	0,97 ± 0,10	0,97 ± 0,08	10	1,00±0,08	1,01±0,06
		7dias	9	1,08 ± 0,13	1,09 ± 0,08	10	1,05±0,09	1,03±0,06
	Chocolate	Imediato	10	0,97 ± 0,10		10	0,98 ± 0,44	
		3 dias	9	0,93 ± 0,07	0,97 ± 0,06	10	0,94 ± 0,10	0,97 ± 0,07
		7dias	9	1,02 ± 0,17	0,96 ± 0,06	9	0,99 ± 0,07	1,00 ± 0,19

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 9. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 33 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

Grupo amostral dentes inferiores								
			33 Paquímetro			33 Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	0,92 ± 0,57		10	0,99 ± 0,18	
		3 dias	8	0,97 ± 0,13	0,94 ± 0,12	9	1,00 ± 0,08	1,00 ± 0,26
		7dias	10	0,96 ± 0,14	1,02 ± 0,09	10	1,04 ± 0,19	1,11 ± 0,12
	Chocolate	Imediato	9	0,99 ± 0,08 *		10	1,17 ± 0,23 *	
		3 dias	8	0,99 ± 0,10 *	0,92 ± 0,10	9	1,18 ± 0,23 *	1,06 ± 0,33
		7dias	8	0,97 ± 0,16	1,00 ± 0,10	10	1,16 ± 0,24	1,11 ± 0,21
Masculino	Queijo	Imediato	10	1,02 ± 0,13		10	1,00 ± 0,12	
		3 dias	10	1,01 ± 0,13	1,02 ± 0,15	10	1,00 ± 0,14	1,04 ± 0,09
		7dias	9	0,99 ± 0,11 *	1,04 ± 0,10	10	1,20 ± 0,17 *	0,99 ± 0,79
	Chocolate	Imediato	10	1,00 ± 0,04		10	1,05 ± 0,25	
		3 dias	9	0,96 ± 0,11	0,93 ± 0,11	10	1,12 ± 0,19	1,06 ± 0,20
		7dias	9	1,01 ± 0,12	1,04 ± 0,22	9	1,11 ± 0,16	1,03 ± 0,18

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 10. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 32 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

			Grupo amostral dentes inferiores					
			32 Paquímetro			32 Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	0,94 ± 0,94		10	1,01 ± 0,15	
		3 dias	10	1,04 ± 0,14	0,98 ± 0,92	10	1,09 ± 0,16	1,08 ± 0,26
		7dias	8	0,96 ± 0,68	0,97 ± 0,84 *	9	1,10 ± 0,20	1,10 ± 0,13 *
	Chocolate	Imediato	10	0,94 ± 0,14		10	1,02 ± 0,09	
		3 dias	10	0,88 ± 0,16 *	0,98 ± 0,15	9	1,19 ± 0,24 *	1,07 ± 0,11
		7dias	10	0,92 ± 0,13 *	0,94 ± 0,13	9	1,07 ± 0,15 *	0,99 ± 0,10
Masculino	Queijo	Imediato	10	0,99 ± 0,12		10	0,96 ± 0,06	
		3 dias	10	1,01 ± 0,15	1,02 ± 0,14	10	0,99 ± 0,07	1,04 ± 0,06
		7dias	9	1,04 ± 0,08	1,01 ± 0,06	10	0,99 ± 0,07	1,02 ± 0,03
	Chocolate	Imediato	10	0,98 ± 0,05		10	1,06 ± 0,13	
		3 dias	10	0,98 ± 0,12	1,04 ± 0,15	10	1,08 ± 0,12	1,06 ± 0,12
		7dias	10	0,99 ± 0,14	1,04 ± 0,15	10	1,08 ± 0,12	1,07 ± 0,14

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 11. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 31 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

			Grupo amostral dentes inferiores					
			31 Paquímetro			31 Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	0,95 ± 0,10		10	0,98 ± 0,10	
		3 dias	10	0,99 ± 0,12 *	1,03 ± 0,12	10	1,15 ± 0,07 *	1,07 ± 0,19
		7dias	8	0,95 ± 0,05 *	1,01 ± 0,06	10	1,11 ± 0,16 *	1,06 ± 0,14
	Chocolate	Imediato	10	0,97 ± 0,11		10	1,00 ± 0,06	
		3 dias	10	0,93 ± 0,06 *	0,99 ± 0,09	10	1,10 ± 0,20 *	1,06 ± 0,23
		7dias	9	1,00 ± 0,07	1,01 ± 0,12	10	1,03 ± 0,09	1,00 ± 0,10
Masculino	Queijo	Imediato	10	1,00 ± 0,18		10	1,05 ± 0,11	
		3 dias	10	1,04 ± 0,09	1,02 ± 0,14	10	1,08 ± 0,10	1,11 ± 0,09
		7dias	9	1,10 ± 0,23	1,06 ± 0,08	10	1,07 ± 0,10	1,13 ± 0,11
	Chocolate	Imediato	10	0,96 ± 0,14		10	1,02 ± 0,19	
		3 dias	10	0,99 ± 0,13 *	1,08 ± 0,09	10	1,13 ± 0,13 *	1,09 ± 0,11
		7dias	10	1,01 ± 0,13	1,03 ± 0,10	9	1,09 ± 0,13	1,03 ± 0,15

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 12. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 41 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

			Grupo amostral dentes inferiores					
			41 Paquímetro			41 Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	0,97 ± 0,10		10	1,00 ± 0,17	
		3 dias	10	0,96 ± 0,12 *	1,02 ± 0,09	10	1,15 ± 0,18 *	1,12 ± 0,24
		7dias	8	0,96 ± 0,91	0,95 ± 0,08	10	1,12 ± 0,21	1,07 ± 0,14
	Chocolate	Imediato	10	0,93 ± 0,11 *		10	1,05 ± 0,12 *	
		3 dias	10	0,93 ± 0,07 *	0,96 ± 0,10 *	10	1,10 ± 0,11 *	1,07 ± 0,04 *
		7dias	9	0,93 ± 0,08 *	0,99 ± 0,11	10	1,12 ± 0,20 *	1,02 ± 0,07
Masculino	Queijo	Imediato	10	1,07 ± 0,13		10	1,05 ± 0,07	
		3 dias	9	1,04 ± 0,11	0,94 ± 0,15 *	10	1,11 ± 0,17	1,11 ± 0,09 *
		7dias	9	1,03 ± 0,14	1,08 ± 0,15	10	1,20 ± 0,31	1,13 ± 0,14
	Chocolate	Imediato	10	1,01 ± 0,12		10	1,02 ± 0,13	
		3 dias	10	1,00 ± 0,12	1,05 ± 0,07 *	10	1,14 ± 0,18	1,16 ± 0,13 *
		7dias	10	1,01 ± 0,12	1,05 ± 0,12	9	1,07 ± 0,11	1,13 ± 0,19

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Tabela 13. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 42 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

			Grupo amostral dentes inferiores					
			42 Paquímetro			42 Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	0,99 ± 0,17		10	1,00 ± 0,95	
		3 dias	10	1,00 ± 0,19	0,98 ± 0,09	10	1,14 ± 0,13	1,18 ± 0,33
		7dias	8	0,96 ± 0,10	1,01 ± 0,12	10	1,13 ± 0,16	1,03 ± 0,15
	Chocolate	Imediato	10	1,03 ± 0,12		10	1,08 ± 0,09	
		3 dias	10	1,07 ± 0,23	1,02 ± 0,11	10	1,02 ± 0,06	1,01 ± 0,10
		7dias	9	0,99 ± 0,10	0,98 ± 0,08	10	1,06 ± 0,12	1,04 ± 0,09
Masculino	Queijo	Imediato	9	1,04 ± 0,18		9	1,06 ± 0,13	
		3 dias	9	1,02 ± 0,09	1,03 ± 0,15	9	1,08 ± 0,19	1,07 ± 0,09
		7dias	8	1,11 ± 0,16	1,02 ± 0,09	8	1,10 ± 0,17	1,11 ± 0,11
	Chocolate	Imediato	10	1,01 ± 0,14		10	1,01 ± 0,13	
		3 dias	10	1,00 ± 0,15	1,01 ± 0,11	10	1,06 ± 0,10	1,01 ± 0,08
		7dias	10	1,01 ± 0,18	1,06 ± 0,32	10	0,98 ± 0,13	2,07 ± 0,32

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados

Tabela 14. Média e desvio padrão das análises métricas dos dentes 43 em amostras de queijo e chocolate tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino de acordo com tempo e temperatura.

			Grupo amostral dentes inferiores					
			43 Paquímetro			43 Image J		
			n	Ambiente	Geladeira	n	Ambiente	Geladeira
Feminino	Queijo	Imediato	10	0,99 ± 0,12		10	0,99±0,16	
		3 dias	10	0,85 ± 0,31	1,00 ± 0,08	10	0,98±0,12	0,98±0,18
		7dias	8	0,93 ± 0,06	0,97 ± 0,08	10	1,00±0,14	0,95±0,17
	Chocolate	Imediato	7	0,89 ± 0,08 *		10	1,05±0,15 *	
		3 dias	9	0,94 ± 0,13	0,93 ± 0,10	10	1,04±0,17	1,16±0,36
		7dias	8	0,90 ± 0,05	0,96 ± 0,10	10	1,01±0,16	1,00±0,22
Masculino	Queijo	Imediato	10	0,97 ± 0,06		10	1,07±0,24	
		3 dias	10	1,04 ± 0,18	0,93 ± 0,12	9	1,04±0,23	0,96±0,09
		7dias	9	1,03 ± 0,12	1,04 ± 0,23	10	1,06±0,36	1,15±0,31
	Chocolate	Imediato	10	1,05 ± 0,14		10	1,06 ± 0,18	
		3 dias	10	1,00 ± 0,11	1,09 ± 0,08	9	1,09 ± 0,25	1,07 ± 0,15
		7dias	10	1,02 ± 0,12	1,03 ± 0,17	8	1,13 ± 0,17	1,05 ± 0,23

* Valores significativamente diferentes entre os métodos analisados.

Apenas em determinados dentes foram observados valores que subestimavam ou supraestimavam o valor real (igual a 1). No geral, o método do paquímetro digital mostrou-se subestimado, quando comparado ao método utilizando o ImageJ. Com exceção do dente 23, chocolate, ambiente, 7 dias, masculino; do dente 23, chocolate, geladeira, 3 dias masculino; e do dente 41, chocolate, ambiente, 3 dias, masculino, para ambas as técnicas as medidas encontradas foram supraestimadas; mesmo assim, o método do paquímetro digital obteve um valor mais próximo do real, quando comparado ao ImageJ (Tabela 15 e 16).

Tabela 15. Dentes que apresentaram diferenças entre as metodologias aplicadas para amostras do sexo feminino.

		Queijo Feminino Dentes superiores		Chocolate Feminino Dentes superiores		Queijo Feminino Dentes inferiores		Chocolate Feminino Dentes inferiores	
		A	G	A	G	A	G	A	G
Amostras	Imedito	21 (P↓/I↑)		23 (P↓/I↑)				33 (P↓/I↑)	
								41 (P↓/I↑)	
								43 (P↓/I↑)	
	3 dias			12 (P↓/I↑)		31 (P↓/I↑)		31 (P↓/I↑)	
						41 (P↓/I↑)		32 (P↓/I↑)	41 (P↓/I↑)
								33 (P↓/I↑)	
								41 (P↓/I↑)	
	7 dias	12 (P↓/I↑)		13 (P↓/I↑)		31 (P↓/I↑)	32 (P↓/I↑)	32 (P↓/I↑)	
								41 (P↓/I↑)	

Tabela 16. Dentes que apresentaram diferenças entre as metodologias aplicadas para amostras do sexo masculino.

		Queijo Masculino		Chocolate Masculino		Queijo Masculino		Chocolate Masculino	
		Dentes superiores		Dentes superiores		Dentes inferiores		Dentes inferiores	
		A	G	A	G	A	G	A	G
Imedito									
Amostras	3 dias			12 (P↓/I↑)	12 (P↓/I↑)	41 (P↓/I↑)	31 (P↓/I↑)	41 (P↑/I↑)*	
				23 (P↓/I↑)	23 (P↑/I↑)*				
	7 dias			23 (P↑/I↑)*	23 (P↓/I↑)	33 (P↓/I↑)			

* Valores supraestimados para ambos os métodos aplicados.

Com relação às distorções provocadas pela variação de tempo e temperatura, de acordo com as análises estatísticas, não houve diferença significativa entre as amostras de queijo e de chocolate até sete dias tanto na temperatura em geladeira quanto em ambiente. Apenas na avaliação após sete dias, na amostra de chocolate para o sexo feminino os valores encontrados no dente 13 mostraram-se diferentes entre si, na qual a amostra deixada em temperatura ambiente foi o mais próxima do valor real quando comparado à temperatura de geladeira.

Quanto aos métodos de emparelhamento físico, os resultados demonstram que para ambos os sexos, a análise manual obteve um maior número de identificações e/ou possíveis identificados quando comparado ao método utilizando o Adobe Photoshop, conforme representado nas Figuras 15 a 18.

Figura 15. Dados referentes à análise manual para amostras do sexo feminino.

Figura 16. Dados referentes à análise manual para amostras do sexo masculino.

Figura 17. Dados referentes à análise utilizando software Adobe Photoshop para amostras do sexo feminino

Figura 18. Dados referentes à análise utilizando software Adobe Photoshop para amostras do sexo masculino.

O índice de concordância intraexaminador foi calculado para cada método de emparelhamento físico por meio do coeficiente Kappa, sendo encontrados os valores apresentados na Tabela 15.

Tabela 17. Valores de concordância intraobservador (Kappa).

	Análise Métrica	Concordância	Média	Índice	Descrição*
Feminino	Manual	Intraexaminador	66,70%	0,61 a 0,80	Substancial
	Adobe Photoshop		46,60%	0,41 a 0,60	Moderada
Masculino	Manual	Intraexaminador	73,40%	0,61 a 0,80	Substancial
	Adobe Photoshop		75,86%		

* O coeficiente de Kappa foi classificado segundo Landis e Koch (1977)

4.2 Análises Biológicas

Para análise da etapa de extração de DNA foi realizada a quantificação das amostras por meio do espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific™), tanto para as águas consumidas quanto para os alimentos mordidos. As concentrações médias não apresentaram grandes variações entre os tempos (imediatos, três e sete dias) em ambos os sexos. Os níveis de contaminação (concentração 260/280) também foram avaliados e tiveram resultados semelhantes entre si, conforme demonstrado nas Tabelas 16 a 18.

Tabela 18. Média e desvio padrão dos valores médios quantitativos das concentrações de DNA e contaminação 260/280 das amostras de água do sexo feminino e masculino.

		Água			
		DNA (ng/μl)		[] 260/280	
Feminino	Imediato	10,2 ± 5,17		3,42 ± 1,27	
		Ambiente	[] 260/280	Geladeira	[] 260/280
	3 dias	14,86 ± 8,24	2,95 ± 0,92	12,21 ± 4,75	3,32 ± 0,60
	7 dias	17,12 ± 11,81	2,79 ± 1,06	12,31 ± 6,08	3,24 ± 0,86
		DNA (ng/μl)		[] 260/280	
	Imediato	8,99 ± 2,20		3,19 ± 0,80	
Masculino		Ambiente	[] 260/280	Geladeira	[] 260/280
	3 dias	9,75 ± 3,64	4,38 ± 1,82	9,78 ± 2,92	3,88 ± 1,56
	7 dias	9,87 ± 4,01	3,55 ± 1,15	10,84 ± 3,98	3,66 ± 1,29
		DNA (ng/μl)		[] 260/280	

Tabela 19. Média e desvio padrão dos valores médios quantitativos das concentrações de DNA e contaminação 260/280 das amostras de queijo do sexo feminino e masculino.

Queijo					
		DNA (ng/μl)		[] 260/280	
Feminino	Imediato	18,79 ± 12,09		3,1 ± 0,57	
		Ambiente	[] 260/280	Geladeira	[] 260/280
	3 dias	24,48 ± 19,25	3,19 ± 1,00	14,53 ± 7,23	3,06 ± 0,74
	7 dias	27,81 ± 17,31	2,87 ± 0,85	13,94 ± 4,14	3,23 ± 0,53
		DNA (ng/μl)		[] 260/280	
Masculino	Imediato	15,93 ± 11,82		2,91 ± 0,56	
		Ambiente	[] 260/280	Geladeira	[] 260/280
	3 dias	22,11 ± 14,64	3,05 ± 1,04	19,89 ± 20,31	3,86 ± 2,61
	7 dias	28,52 ± 14,00	3,04 ± 1,40	11,12 ± 4,73	4,16 ± 2,25
		DNA (ng/μl)		[] 260/280	

Tabela 20. Média e desvio padrão dos valores médios quantitativos das concentrações de DNA e contaminação 260/280 das amostras de chocolate do sexo feminino e masculino.

Chocolate					
		DNA (ng/μl)		[] 260/280	
Feminino	Imediato	15,23 ± 7,46		2,65 ± 0,40	
		Ambiente	[] 260/280	Geladeira	[] 260/280
	3 dias	17,91 ± 9,09	2,68 ± 0,84	15,56 ± 7,97	2,83 ± 0,87
	7 dias	17,28 ± 11,46	2,42 ± 0,66	15,56 ± 7,97	2,71 ± 0,54
		DNA (ng/μl)		[] 260/280	
Masculino	Imediato	15,95 ± 10,22		3,05 ± 0,80	
		Ambiente	[] 260/280	Geladeira	[] 260/280
	3 dias	11,85 ± 4,50	3,06 ± 1,45	20,14 ± 13,06	2,61 ± 0,64
	7 dias	13,28 ± 4,42	3,00 ± 0,97	13,52 ± 4,29	3,09 ± 0,91
		DNA (ng/μl)		[] 260/280	

Do total das 320 amostras de DNA extraídas da pesquisa, 160 foram amplificadas e obtiveram resultados satisfatórios nas imagens geradas a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose a 2%, sendo constatada a presença de bandas que confirmam a amplificação dos fragmentos de DNA nos 15 loci de STRs autossômicos (CSF1P0, D2S1338, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D19S433, D21S11, FGA, TH01, TPOX, vWA), além do loco da Amelogenina, com diferentes quantidades de bases de pares, como ilustrado nas Figuras 19.

Figuras 19. Gel de agarose 2% de 16 amostras de água, queijo e chocolate amplificadas nos diferentes tempos (imediato, 3 dias e 7 dias) e temperatura (ambiente e geladeira), além da saliva in natura, marcador e controle positivo e negativo da reação.

Discussão

5 DISCUSSÃO

5.1 Análise física

As marcas de mordida produzidas em locais animados (animais ou pessoas) e inanimados (objeto e alimentos), são produtos finais da ação física do sistema bucal, constituído pelos dentes e seus anexos (MARQUES, GALVÃO e SILVA, 2007; VANRELL, 2008, COUTO, 2011). Sua análise continua sendo um tema complexo e constantemente discutido na Odontologia Legal (SWEET et al., 1997; SWEET e HILDEBRAND, 1999; SHEASBY e MACDONALD, 2001; AL-TALABANI et al., 2006; BLACKWELL et al., 2007; ELLIS et al., 2007; BERNITZ et al., 2008; FLORA, TUCERYAN e BLITZER, 2009, BUSH et al., 2009, TUCERYAN e BLITZER, 2009; STOLS e BERNITZ, 2010; SANTORO et al., 2011; NAETHER et al., 2012; EVANS et al., 2013).

Comumente encontradas em cena de crime, as marcas de mordida, em muitos casos, podem ser as únicas provas periciais nas investigações forenses (MACDONALD, 1974; LESSIG, WENZEL e WEBER, 2006; PRETTY, 2008; GOREA e JASUJA, 2010; RAJSHEKAR, KRUGER e TENNANT, 2012). Entretanto, muitas condenações baseadas em análise descritiva foram contestadas nos Tribunais de Justiça, por considerarem os testes empíricos, subjetivos e passíveis de erros (GOREA e JASUJA, 2010; TUCERYAN et al., 2010, RAJSHEKAR, KRUGER e TENNANT, 2012).

Atualmente, para garantir a confiabilidade dos resultados, são aceitas pela comunidade científica perícias fundamentadas em dados quantitativos em conjunto com metodologias qualitativas, em vez de simples descrições. Futuras pesquisas devem adotar esta tendência (BLACKWELL et al., 2007).

Muitas técnicas e procedimentos têm sido desenvolvidos para serem utilizados juntamente aos protocolos aceitos na literatura para perícia de marcas de mordida. Estas propostas, geralmente, variam em abordagens manuais, semiautomáticas e totalmente automáticas (AL-TALABANI et al., 2006; SILVA et al., 2006; BLACKWELL et al., 2007; ELLIS et al., 2007; BERNITZ et al., 2008; FLORA, TUCERYAN e BLITZER, 2009, BUSH et al., 2009, TUCERYAN e BLITZER, 2009;

STOLS e BERNITZ, 2010; SANTORO et al., 2011; NAETHER et al., 2012; EVANS et al., 2013).

As técnicas convencionais de análise das evidências físicas baseiam-se em métodos de comparação, incluindo as análises métricas de tamanho, forma e posição dos dentes e o emparelhamento físico, podendo ser realizada a sobreposição manual direta, feita nos modelos de gesso dos suspeitos e das marcas de mordida; ou a sobreposição de imagens fotográficas, realizada diretamente nos modelos de gesso, ou em imagens digitalizadas dos modelos de gesso utilizando softwares de computador (MARQUES, GALVÃO e SILVA, 2007; VANRELL, 2008, COUTO, 2011).

Assim como no trabalho de Naether et al. (2012), foram estudadas as marcas de mordida produzidas em alimentos, queijo e chocolate, em diferentes tempos (imediato, três dias e sete dias) e temperatura (ambiente e geladeira). Os dentes avaliados nos registros foram os incisivos centrais, incisivos laterais e caninos dos arcos dentais superior e inferior.

Em uma cena de crime, as fotografias das evidências encontradas são comumente incluídas, sendo esta uma fase representada pela obtenção, documentação e conservação da prova (VAN DER VELDEN, SPIESSENS e WILLEMS, 2006).

Em perícias de marcas de mordida, a fim de se evitar uma possível distorção fotográfica e resultar em provas inválidas, os seguintes cuidados devem ser tomados: paralelismo entre filme e local a ser fotografado; angulação de 90°, estando a câmera perpendicular ao centro da marca de mordida; começar sempre por tomadas “panorâmicas” e, em seguida, centrar-se nos detalhes através de fotografias em “close”; quando possível, fazer fotografias com luz natural, com flash, em cores, em preto-e-branco e com filme infravermelho; incluir sempre uma escala ou régua milimétrica (MAIOR et al., 2007; GOLDEN, 2011). As fotografias realizadas na presente pesquisa seguiram todas as normas de qualidade, resultando em imagens próximas do real.

Com relação às análises métricas realizadas na presente pesquisa, diferentemente do estudo de Naether et al. (2012) em que todos os registros nos alimentos produzidos foram passíveis de serem analisados, algumas amostras geradas tiveram que ser excluídas, devido à falta de registro de alguns dentes e pela putrefação de alguns substratos que impossibilitaram a análise.

Embora alguns registros de dentes tenham sido perdidos, no geral, as impressões deixadas nos alimentos apresentaram uma boa qualidade na impressão das características das dentições dos sujeitos da pesquisa como forma, posição, tamanho e padrão dos dentes. Assim como nas marcas geradas nas amostras do estudo de Naether et al. (2012), não só a face incisal dos dentes era visível, mas, também, quase toda superfície dos dentes incisivos.

Apesar do queijo apresentar em suas propriedades a perda de água e gordura, podendo com isso alterar o seu substrato, foi no chocolate que o maior número de amostras analisadas metricamente obteve seus valores variados entre os dois métodos estudados. Sugere-se que alguns pontos devem ser levados em consideração, como a consistência do material mordido, a função dos dentes envolvidos na mordida e a força da mordida.

A literatura relata que os chocolates podem preservar com eficiência as marcas dentárias, embora possam ser influenciadas pelo aumento da temperatura no local encontrado ou armazenado. Porém é considerado um material friável, podendo se fragmentar na ação da mordida (MARQUES, GALVÃO e SILVA, 2007). Outra situação que pode ocorrer e dificultar um bom registro dentário nos chocolates está relacionada à sua consistência relativamente dura e, ao aplicar a força na mordida, pode ocasionar deslizamentos no movimento, o que dificilmente acontece nos queijos que, por serem mais macios e plásticos, facilitam a apreensão do alimento.

Os incisivos laterais e caninos foram os dentes com o maior número de valores diferentes entre os métodos. Com relação ao dente canino, este resultado pode ser justificado por sua função no sistema bucomaxilofacial. Sabendo que estes rasgam o alimento durante a mordida, dificilmente são registrados fielmente. Além disso, o formato varia entre ovais e triangulares, e, em muitos casos, principalmente, em alimentos endurecidos como o chocolate, aparecem como um ponto de contato na superfície da mordida sendo menos evidentes e suscetíveis à mensuração, diferentemente do que ocorre nos dentes incisivos, que têm a função de cortar o alimento, e apresentam uma maior área de contato e, consequentemente, geram uma melhor impressão (MARQUES, GALVÃO e SILVA, 2007).

Durante o movimento da mordida, a mandíbula é móvel e, usualmente, proporciona a maior força quando comparada à maxila que é uma estrutura inerte (AL-TALABANI et al., 2006; EVANS et al., 2013). Sendo assim, a mandíbula se move contra a maxila no decorrer do ato e produz a força da mordida. Os dentes

superiores seguram enquanto que os dentes inferiores são os principais responsáveis pelo corte, e com isso, fornecem melhores registros quando comparados à arcada superior. Essa teoria é confirmada nos trabalhos de Bernitz et al. (2008) e de Santoro et al., (2011), que mostraram que as impressões geradas na arcada superior foram mais eficientes nas identificações quando comparado aos arcos inferiores. Na presente pesquisa, todas as amostras que tiveram divergências nas análises métricas para ambos os métodos foram dentes localizados na arcada superior, podendo indicar que os registros sofreram alterações, reduzindo assim, a eficiência da mensuração.

O tipo de material mensurado nas análises físicas foi diferente entre os métodos aplicados, podendo assim explicar os picos de medidas encontradas que subestimaram e supraestimaram os valores reais. No caso do paquímetro digital as medidas foram diretamente tomadas a partir de modelos de gesso dos alimentos mordidos. A moldagem dos alimentos foi feita utilizando o alginato, devido ao baixo custo e à fácil manipulação. Apesar de ser um material que apresenta propriedades de elasticidade e flexibilidade sendo assim indicados para reproduzir as marcas, estes sofrem alterações dimensionais provocadas pelos fenômenos de sinérese e embebição, ou seja, sofrem respectivamente contração e expansão, podendo assim interferir nos resultados da pesquisa.

Já, no imageJ, as medidas foram extraídas a partir das fotografias realizadas nos alimentos. Assim como no estudo de Bernitz et al. (2008), as fotografias puderam ser ampliadas, de modo que as características das dentições puderam ser claramente visualizadas e os pontos das distâncias marcados. No entanto, por serem mensurações indiretas, os resultados podem ser estimados para mais ou para menos. Para facilitar a análise das marcas digitalizadas, as imagens devem ser as mais nítidas possíveis, pois imagens deficientes podem fornecer uma falsa representação da morfologia do dente.

Como visto as discrepâncias entre os valores numéricos encontrados nas análises métricas não alteram os resultados, já que não são analisadas individualmente. Mesmo um examinador especialista em marcas de mordida, não consegue reproduzir com precisão o mesmo registro repetidamente, entretanto é possível obter medidas significativamente semelhantes entre si. Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Bush et al.(2009) em que nenhum dos 23 registros produzidos apresentou medidas iguais.

Independentemente da técnica aplicada em marcas de mordida, o grau de deformação, o encolhimento, e a distorção presentes nos registros continuam a ser um desafio na perícia forense (STOLS E BERNITZ, 2010). Isto por que, estas podem modificar sua aparência e, com isso, dificultar ou até mesmo impedir o processo de identificação (MAIOR et al., 2007; BUSH et al., 2009).

As distorções ocorrem em diferentes estágios, podendo ser no momento da mordida (distorção primária), ou ainda subsequente a ela, quando são examinadas ou notadas (distorção secundária). Podem ser divididas em três categorias: distorções provocadas pelo fator tempo, distorções relacionadas à sua localização e ainda as distorções produzidas pelos registros fotográficos (HERAS et al., 2005; MAIOR et al., 2007; BUSH et al., 2009)

Com isso, as distorções refletem diretamente na redução dos detalhes dos registros produzidos (MILLER et al., 2009, BUSH et al., 2009). Quando se analisa especificamente o alimento, deve se levar em consideração principalmente as distorções produzidas pela putrefação causada pelo tempo e temperatura (NAETHER et al., 2012).

Ao analisar a variação de tempo e temperatura estabelecidos na presente pesquisa, não se observa diferença significativa entre as amostras de queijo e de chocolate em um período máximo de sete dias, tanto para amostras deixadas em temperatura de geladeira quanto em ambiente, ou seja, as amostras dos alimentos supracitados, nas condições testadas, podem ser analisadas utilizando os métodos de análise métrica sem que ocorram interferências nos resultados. Apenas no dente 13, sete dias, na amostra de chocolate para o sexo feminino os valores encontrados foram diferentes entre si.

Semelhantes resultados foram observados no estudo Naether et al. (2012) que avaliou a influência da putrefação nos alimentos mordidos em diferentes estágios de tempo, em temperatura ambiente entre 25 e 35 ° C. O fator tempo variou de acordo com as características estruturais das amostras. Nos chocolates mordidos, não houve alterações visíveis, enquanto que no queijo foi observada distorção de cerca de 4% após 5 dias, de 8% após 2 semanas, de 10% após 4 semanas e, após 7 semanas, de 11%. Estes resultados são justificados pela perda de umidade e óleos de seu substrato.

Entretanto, mesmo sabendo que os alimentos possam vir a sofrer modificações em sua estrutura com o passar do tempo, quando este fator for

considerado mínimo (muitas vezes sendo microscópica), não irá afetar as análises das marcas de mordida, e consequentemente será possível estabelecer a identificação do suspeito (MILLER et al., 2009, BUSH et al., 2009). Os limites numéricos de deformação, retração e distorção que possam vir a afetar significativamente os resultados das análises físicas ainda não foram determinados na literatura (STOLS e BERNITZ, 2010).

No trabalho de Bernitz et al. (2008) os autores demonstraram que um pequeno grau de deformação, retração e distorção não afeta o padrão de análise nas marca de mordida, mesmo porque pequenas alterações estarão sempre presentes devido ao ato da mordida.

Stols e Bernitz, (2010) analisaram matematicamente o grau de deformação gerado nas marcas de mordida e observou que estatisticamente estas não afetam a capacidade de mostrar a concordância positiva no processo de comparação entre dentição do suspeito e o registro da marca.

Deformações encontradas na rotina de análise de marca de mordida geralmente podem ser consideradas insignificantes quando a dentição do suspeito apresentar características significativas para uma identificação (MAIOR et al., 2007; BUSH et al., 2009; EVANS et al., 2013). Por exemplo, ao analisar uma marca de mordida que apresenta um diastema entre os dois dentes centrais, este pode sofrer variações de largura entre a dentição do suspeito e o registro analisado, entretanto o espaço entre os dentes centrais estará presente em ambos os casos e terá uma relação similar para os dentes adjacentes. Esse mesmo exemplo pode ser aplicado para outras características incomuns, como um dente girovertido, uma perda dentária, dentes com posição alterada no arco, ou qualquer outra característica dentária reconhecível (STOLS e BERNITZ, 2010).

Por fim, é importante destacar que em uma cena de crime, quando encontrados alimentos mordidos, como o queijo e o chocolate, em até sete dias, em temperatura ambiente de países tropicais como o Brasil, que variam entre 25 a 35°C, ou, quando armazenados em geladeira temperaturas entre 2 a 4°C, estes podem ser utilizados com confiança como provas periciais para análises físicas, sem que os resultados comprometam a identificação de um suspeito. Semelhantes resultados foram encontrados por Naether et al. (2012) que afirmaram que os alimentos são um bom meio de prova para análise de marcas de mordida deixadas nas cenas de crime

para possível identificação de um suspeito, mesmo quando o alimento foi deixado por semanas ou meses, em condições de temperatura ambiente.

Outra técnica de análise de marcas de mordida bastante estudada na Odontologia Forense é o emparelhamento físico, em que são feitas comparações da forma e padrão dos registros com a dentição do suspeito através da sobreposição, podendo ser realizadas manualmente ou digitalizadas (HERAS et al., 2005; AL-TALABANI et al., 2006; VAN DER VELDEN, SPIESSENS e WILLEMS, 2006; FLORA, TUCERYAN e BLITZER, 2009; TUCERYAN et al., 2010, EVANS et al., 2013). Na presente pesquisa, foi realizado o método manual de sobreposição envolvendo o modelo de gesso da dentição dos sujeitos da pesquisa com os modelos de gesso dos alimentos e o método digital de sobreposição de imagens utilizando o software Adobe Photoshop.

Para facilitar as análises dos resultados das técnicas de sobreposição, foram estipulados para os dois métodos o número quantitativo de identificados, não identificados e possível identificação.

Quando analisado pelo método manual, para ambos os sexos 58% das amostras foram corretamente identificadas com precisão. Para o sexo feminino, 26% das amostras obtiveram mais de uma resposta, entretanto, entre estas foram incluído o possível suspeito, e em 16% dos casos houve o erro na identificação. Já para o sexo masculino, 20% foram possivelmente identificados enquanto que 22% não foram identificados.

Já para o método digital houve uma redução significativa no número de acertos tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino, sendo os valores encontrados respectivamente de 32% e 45% dos casos. Com relação a uma possível identificação, para o sexo feminino ocorreu em 19% e para o sexo masculino 44%. Amostras que não foram identificadas corretamente para o sexo feminino foram em 49% e para o sexo masculino 21%. Com isso, os resultados encontrados mostraram que o método manual foi mais preciso quando comparado ao método utilizando o Adobe Photoshop na presente pesquisa.

Embora, muitos autores afirmem que o método digital utilizando software Adobe Photoshop é aplicável e confiável (HERAS et al., 2005; AL-TALABANI et al., 2006; VAN DER VELDEN, SPIESSENS e WILLEMS, 2006; FLORA, TUCERYAN E BLITZER, 2009; TUCERYAN et al., 2010, EVANS et al., 2013), os resultados na presente pesquisa não foram satisfatórios.

O programa Adobe Photoshop possui diversas ferramentas que melhoram cor, contraste, brilho, distorções, o fundo das impressões entre outros aplicativos, beneficiando assim a técnica de sobreposição de imagens (EVANS et al., 2013). Todos esses artifícios supracitados foram aplicados neste estudo. Cuidados com o contraste foram tomados para não gerar alterações nas bordas incisais e resultar em falsas informações. O contraste foi apenas utilizado para aumentar as imagens que já eram visíveis nas fotos originais, embora estivessem fracas ou difusas.

Apesar de a dentição humana ser classificada como única para cada indivíduo, estudos relatam que diferentes marcas de mordida mesmo contendo singularidades, podem apresentar grandes semelhanças, sendo impossível de serem identificadas (BLACKWELL et al., 2007; VAN DER VELDEN, SPIESSENS e WILLEMS, 2006; EVANS et al., 2013).

No trabalho de Blackwell et al. (2007), as amostras analisadas apresentaram um baixo número de características individuais por estudarem dentições de jovens de boa condição econômica, consequentemente apresentaram um alto grau de semelhança entre si. O mesmo ocorreu nesta pesquisa, em que a maioria da amostra foi composta por universitários entre 20 a 30 anos de idade.

Segundo Miller et al. (2009), quando é comparado um número alto de dentições similares entre si torna-se mais difícil à exclusão dos suspeitos, consequentemente podem levar a inclusão de pessoas inocentes, resultando assim em um falso positivo. Na presente pesquisa, o número de dentições similares entre si foi alto principalmente para o sexo feminino, podendo observar que, no método Photoshop o número de identificados e possíveis identificações foram bem abaixo, dos valores encontrados para o sexo masculino, quando comparados entre si. As amostras que apresentavam características individualizadas foram identificadas corretamente sem muita dificuldade para ambos os métodos.

Considerando que a técnica digital utilizada na pesquisa é bidimensional, ou seja, apenas a largura e o comprimento dos dentes são visualizadas e sabendo que a profundidade é um dado que deve ser levado em consideração em marcas de mordida, alguns autores justificam a dificuldade de se analisar através deste método (VAN DER VELDEN, SPIESSENS e WILLEMS, 2006; MAIOR et al., 2007; TUCERYAN et al., 2010). Embora a fotografia tenha a vantagem de relativa permanência, elas representam imagens de duas dimensões, sendo que as marcas de mordida são constituídas de três dimensões.

Um fator importante de se observar em análises físicas é a subjetividade a que os métodos qualitativos estão submetidos, ou seja, os resultados dependem da avaliação do pesquisador. Com isso, a identificação positiva depende da leitura visual do profissional. Sua experiência com perícias em marcas de mordida tem total influência sobre os resultados. Na literatura, existem diversos métodos cientificamente comprovados e adaptados, com diferentes resultados entre eles, e é o perito que decide qual o melhor método a ser aplicado, pois cada caso é único (AL-TALABANI et al., 2006; BLACKWELL et al., 2007; ELLIS et al., 2007; BERNITZ et al., 2008; FLORA, TUCERYAN e BLITZER, 2009, BUSH et al., 2009, TUCERYAN e BLITZER, 2009; STOLS e BERNITZ 2010; SANTORO et al., 2011; NAETHER et al., 2012; EVANS et al., 2013).

No estudo de Flora, Tuceryan e Blitzer, (2009) foi analisada estatisticamente a relação interobservador entre dois odontologistas com experiência em perícias de marcas de mordida, na qual se obteve valores de 67% entre as análises aplicadas. Deste resultado, 47% dos registros foram identificados corretamente, 87% tiveram acertos pelo menos uma vez e 13% não tiveram as identidades identificadas. Não houve relação entre o número de acertos e erros com relação às metodologias aplicadas.

Para minimizar possíveis erros periciais, torna-se importante a realização da calibração das técnicas e principalmente a fiel aplicação dos métodos a serem realizados. Assim como nos diversos estudos de marcas de mordida, a presente pesquisa analisou a concordância intra-examinador nos métodos de emparelhamento físico. Na análise manual para o sexo masculino foi de 73,4% e para o sexo feminino de 66,7%, ambas classificadas em substancial, ou seja, o índice se enquadra na faixa de 0,61 a 0,80. Já, na análise do Photoshop, os resultados encontrados para o sexo masculino foram de 75,86%, também considerados substanciais, diferentemente dos encontrados para o sexo feminino que foram de 46,6%, em que o índice fica em torno de 0,41 a 0,60, indicando ser moderado.

Por fim, apesar de os métodos aplicados não terem sido avaliados em conjunto, muitos autores afirmam que a precisão e a confiabilidade da identificação aumentam quando as análises morfométricas são avaliadas em conjunto (SWEET et al., 1997; SWEET e HILDEBRAND, 1999; SHEASBY e MACDONALD 2001; AL-TALABANI et al., 2006; BLACKWELL et al., 2007; ELLIS et al., 2007; BERNITZ et

al., 2008; FLORA, TUCERYAN e BLITZER, 2009, BUSH et al., 2009, TUCERYAN e BLITZER, 2009; STOLS e BERNITZ 2010; SANTORO et al., 2011; NAETHER et al., 2012; EVANS et al., 2013).

5.2 Análise biológica

Conhecer o perfil genético do indivíduo tornou-se de grande importância no campo da identificação humana. Muitas vezes, as investigações forenses envolvendo a área da Biologia Molecular estão entrelaçadas diretamente com a Odontologia, como quando a análise de DNA é feita nos vestígios biológicos como dentes e/ou saliva (JOBLING 2004; SILVA et al. 2007; MANJUNATH et al., 2011; KIRKHAM et al., 2012).

Inúmeros trabalhos científicos publicados e as experiências vivenciadas nos Institutos de Pesquisa Forense confirmam a grande utilidade desses materiais biológicos na genética forense (WALSH et al., 1992; ALLEN, SALDEEN e GYLLENSTEN, 1995; SWEET et al., 1997; SWEET e SHUTLER, 1999; PARYS-PROSZEK, 2001; ANZAI et al., 2005; BARBARO et al., 2006; ELLIS et al., 2007; CARVALHO et al., 2010).

Amostras de saliva depositadas em alimentos em cenas de crime são potenciais evidências para solucionar casos criminais envolvendo marcas de mordida, incluindo ou excluindo um suspeito (ANZAI et al., 2005). Até mesmo quando a quantidade de saliva nas amostras é pequena ou sofre processos de degradação, este material poderá servir como fonte de dados genéticos nas identificações (PARYS-PROSZEK, 2001; SILVA et al. 2012).

No estudo de Anzai et al., (2005), os resultados encontrados mostram que os procedimentos de coleta, extração e amplificação de DNA utilizando a saliva foram positivos nos casos criminais envolvendo marcas de mordida em alimentos, uma vez que tem grande poder discriminatório. Outras pesquisas utilizando as salivas presentes nas marcas de mordida também obtiveram resultados promissores, encontrando produtos de DNA específicos de tamanho padrão, mesmo quando se trabalhou sob condições alteradas de armazenamento (WALSH et al., 1992; ALLEN, SALDEEN e GYLLENSTEN, 1995; SWEET et al., 1997; SWEET e

SHUTLER, 1999; PARYS-PROSZEK, 2001; ANZAI et al., 2005; BARBARO et al., 2006; ELLIS et al., 2007; CARVALHO et al., 2010).

As células salivares podem aderir aos dispositivos de coleta das amostras, tais como algodão, espuma, hidrocéluloses entre outros. Quando a coleta é realizada por um material absorvente, a chance de um alto teor de ácidos nucléicos permanecerem no dispositivo é grande (NEMODA et al. 2011). Existem no mercado kits comerciais que aumentam o poder da descamação da mucosa oral, resultando assim no maior número de células salivares coletadas (NUNES et al. 2012).

No trabalho de Sweet et al., (1997), foi aplicada para coleta de saliva a técnica do swab simples, em que houve recuperação de DNA relativamente satisfatória (35,3-4,8%) indicando que este método pode ser aplicado em alguns casos. Quando realizado o método do duplo swab, a quantidade de saliva aumentou para uma média de 44,6-46,4% de DNA total. Com isso, os autores afirmam que a técnica do duplo swab utilizada na recuperação das células salivares permite a coleta de uma maior quantidade de DNA quando comparada com o método de swab simples.

Na presente pesquisa, o material genético estudado foi a saliva depositada em garrafas de água consumidas e em chocolates e queijos mordidos. A técnica de escolha para coleta da saliva foi a do duplo swab, uma vez que este método foi significativamente mais eficaz na recuperação de DNA na saliva, quando comparado a dois outros métodos de coleta como filtro de papel e técnica do *swab* único em estudos da literatura (SWEET et al., 1997). Em outro estudo, o método do duplo *swab*, também, se mostrou mais sensível e eficiente do que outros métodos, permitindo a determinação do perfil genético em quatro de cinco amostras testadas, compostas por 250µL de saliva depositada na pele (ANZAI et al., 2005).

A técnica do duplo swab é recomendada, principalmente, nos casos em que as quantidades de saliva são mínimas, em que há degradação parcial do DNA, ou na superfície dos registros na pele, em alimentos e objetos em que a saliva depositada pode ser contaminada, seja esta pela mistura do DNA do autor e da vítima ou pelos microrganismos presentes no meio (SWEET et al., 1997; SWEET e SHUTLER, 1999; ANZAI et al., 2005).

O método do swab utilizada na coleta de amostras de saliva para análise de DNA apresenta vantagens em relação à coleta de outros vestígios, como por

exemplo, o sangue. Tal fato se justifica por ser um método rápido, não invasivo, indolor e suficiente para promover a análise de DNA, além de ser mais propenso ao consentimento do doador, que muitas vezes sente desconforto devido à seringa na coleta de sangue (NG et al., 2004; NG et al., 2007; NEMODA et al., 2011). Entretanto, algumas desvantagens podem estar relacionadas no uso da saliva como material biológico. Dependendo do método de escolha na coleta, pode ocorrer a produção de diferentes volumes de saliva, consequentemente levando à variação da quantidade de DNA disponível para extração (NEMODA et al., 2011).

Existe uma divergência na literatura sobre a estratégia a ser tomada com relação à coleta de evidências biológicas em marcas de mordida, alguns autores defendem que as investigações físicas muitas vezes são realizadas posteriormente a esta etapa para que não ocorra a contaminação da amostra por terceiros (WALSH et al., 1992; ANZAI et al., 2005; CARVALHO et al., 2010; MURUGANANDHAN, SIVAKUMAR, 2011). Por outro lado, outros autores defendem que a coleta de DNA possivelmente destrói características das impressões, e a análise não seria mais possível (NAETHER et al., 2012). Na presente pesquisa a coleta de DNA antecedeu os registros fotográficos para que os riscos de possíveis contaminações fossem reduzidos.

O manuseio inadequado dos alimentos em uma cena de crime por pessoas não qualificadas para esse tipo de atividade pode dificultar na recuperação do DNA, ou, até mesmo ocasionar à destruição de possíveis provas (NAETHER et al., 2012). Além disso, podem alterar as evidências físicas registradas na superfície dos alimentos, em especial em queijos (MARQUES, GALVÃO e SILVA, 2007).

Muito se discute sobre o armazenamento das amostras e suas possíveis alterações. Sabe-se que o fluxo de trabalhos nos laboratórios forenses pode muitas vezes impossibilitar a extração imediata das amostras, sendo assim necessário armazená-las antes de suas análises (NG et al., 2004; NG et al., 2007). Segundo descrito no protocolo da Interpol, um constante congelamento e descongelamento das amostras pode ocasionar na degradação do DNA (INTERPOL; 2009).

A saliva contém uma variedade de compostos com alto poder de degradação de proteínas e ácidos nucleicos (NG et al., 2004; MURUGANANDHAN e SIVAKUMAR 2011). Se as amostras de saliva são armazenadas ou transportadas em temperatura ambiente a ação desses compostos ou de seus produtos podem causar prejuízos na extração de DNA (NEMODA et al., 2011)

Estudos evidenciam que os principais fatores ambientais que podem influenciar na quantidade e qualidade de DNA armazenado são o tempo e a temperatura. Segundo os autores, a saliva pode ser utilizada mesmo quando armazenada nas mais diversas temperaturas variando entre -70°C a 4 °C. (ANZAI et al., 2005; NG et al., 2004; CARVALHO et al., 2010; MURUGANANDHAN e SIVAKUMAR 2011; NEMODA et al., 2011; DURDIAKOVÁ et al., 2012; NUNES et al. 2012)

Na pesquisa de Ng et al., (2004), quando as extrações das amostras foram feitas imediatamente após a coleta do material, as recuperações de DNA foram de alto nível de qualidade. Resultado semelhante ao observado em amostras que foram armazenadas em 4°C e -70°C em sete dias, indicando que essas condições apresentam mínima deteriorização do DNA, não afetando a qualidade dos produtos da PCR. Quando as amostras foram deixadas a 4°C por sete dias e, posteriormente congeladas a -70°C durante um mês, e para as amostras congeladas diretamente a -70°C no período de 1 mês, observou-se que os resultados dos produtos de PCR encontrados foram menos favoráveis, diminuindo o poder de amplificação. No entanto, mesmo nas condições descritas acima, a utilização do DNA extraído é viável, podendo assim ser amplificada.

Já no trabalho de Carvalho et al. (2010), ao estudar a durabilidade da saliva armazenada durante os períodos de sete a 180 dias, encontraram resultados estatísticos significativamente semelhantes com relação a quantidade de DNA extraídos nas amostras, sendo de 97,5% para sete dias e de 100% para 180 dias, confirmando assim, a possibilidade de armazenamento do material por longos períodos de tempo até o processo de extração, e, mesmo ocorrendo a degradação, não ocorrerá a diminuição da qualidade do material a ser analisado.

Diferentemente dos resultados observados por Nemoda et al., (2011), em que confirmam que alterações na extração de DNA podem ser observadas quando as amostras são armazenadas em temperatura ambiente por cinco dias ou quando são feitos congelamentos e descongelamentos contínuos de até seis vezes.

Na presente pesquisa, a extração do DNA respeitou a metodologia definida, ou seja, em diferentes intervalos de tempo: imediatamente após a mordida, três dias e sete dias depois; e em diferentes temperaturas: temperatura ambiente do clima do município de Ribeirão Preto/São Paulo e temperatura geladeira, variando entre 2 a 4°C, no intuito de simular intervalos e condições que geralmente ocorrem

entre a ação pericial na cena do crime e o exame propriamente dito, ou casos em que as provas são encontradas somente após um período prolongado. Posteriormente, as amostras foram congeladas, e só foram descongeladas no momento da etapa de amplificação.

Para suprir as dificuldades encontradas no armazenamento das amostras e garantir o sucesso dos resultados obtidos nas análises foram criados produtos que estabilizam o DNA extraído até a realização das etapas laboratoriais. Terada (2012) ao analisar a eficácia do produto Allprotect Tissue Reagent® (Qiagen, Hilden, Germany) em tecidos dentais humanos armazenados em diferentes condições de tempo (um, sete, 30 e 180 dias) e temperatura (ambiente e refrigerado), observou que a utilização do produto mostrou diferença significativa em amostras armazenadas em temperatura ambiente durante 30 e 180 dias, enquanto que nas demais condições testadas, os resultados não evidenciaram justificativa para o uso do produto.

Na tentativa de padronização das etapas de extração de DNA, diminuir o tempo laboratorial, minimizar possíveis contaminações, além de promover a extração com uma alta qualidade diversa de tipos de amostras (FRIDEZ e COQUOZ, 1996), foram desenvolvidos kits comerciais de extração, sendo seu uso recomendado em protocolos internacionais de investigação criminal (INTERPOL, 2009). Seguindo essas recomendações, na presente pesquisa, a extração do DNA foi realizada utilizando o QIAamp® DNA Investigator Kit (Qiagen®, Hilden, Germany). O kit de escolha é específico para amostras escassas oriundas de casos forenses (EHLI et al., 2008; VALLONE, HILL e BUTLER, 2008; FREDSLUND et al., 2009; MULLER et al., 2010; VILTROP et al., 2010; WANG et al., 2011; FOSTER e LAURIN, 2012; KIRKHAM et al. 2012; NATHALIE, HADI e GOODWIN, 2012; PHILLIPS, MCCALLUM e WELCH, 2012; TUCKER, KIRKHAM e HOPWOOD 2012; VERHEIJ, HARTEVELD e SIJEN 2012; WANG et al., 2012)

A variação da quantidade de DNA está relacionada aos procedimentos de coleta e extração (ANZAI et al., 2005; NG et al., 2004; SILVA et al. 2006; CARVALHO et al., 2010; MURUGANANDHAN e SIVAKUMAR 2011; NEMODA et al, 2011; DURDIAKOVÁ et al., 2012; NUNES et al. 2012). As etapas da extração conseguem remover grande parte dos ácidos nucléicos retidos no material de coleta (NEMODA et al., 2011). Na pesquisa de Ehli et al. (2008), em que se analisou a recuperação de DNA em mordidas de bolachas, um ponto importante que resultou

na variabilidade das concentrações extraídas de DNA, foi o sujeito da pesquisa ter se alimentado antes de produzir as marcas nos alimentos passíveis de serem periciados.

No intuito de diminuir a variação na quantidade de DNA coletado e extraído na presente pesquisa, os procedimentos de coleta seguiram a mesma ordem para todas as amostras geradas, realizando inicialmente a coleta em garrafas de água consumidas, seguida da mordida no queijo e da mordida no chocolate. Foi feito um intervalo de 5 minutos entre cada amostra produzida.

Assim como nos trabalhos de Nemoda et al., (2011) e Nunes et al., (2012) as concentrações de DNA das amostras foram mensuradas por meio do equipamento espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific™) que detecta a quantidade de DNA nas concentrações amostrais (ng/μl). Entretanto, não diferencia os DNA humano e bacteriano presentes na saliva. Portanto, os valores de concentração das amostras de DNA provavelmente não refletem à verdadeira concentração de DNA humano (NEMODA et al. 2011). A mesma limitação no uso do Nanodrop é descrita no trabalho de Nunes et al. (2012), na qual não é possível mensurar separadamente a fonte de DNA humano e de DNA bacteriano.

No estudo de Nemoda et al. (2011) as concentrações de 5 a 10ng foram suficientes para determinar os genótipos através dos polimorfismos representados pelos microssatélites SNP e VNTR. Neste estudo afirmam também que esta quantidade poderia ser utilizada para determinar de 20 a 50 polimorfismos. Na presente pesquisa, além da média das concentrações de DNA da saliva in natura, as concentrações das águas bebidas e das mordidas dos queijos e dos chocolates também apresentaram variações nas suas quantidades mensuradas. Entretanto, os resultados obtidos foram próximos, quando comparados aos mesmos grupos de amostras para ambos os sexos.

Os valores máximo e mínimo das médias das concentrações de DNA foram entre $28,52 \pm 14,00$ a $8,99 \pm 2,20$ ng/μl. De acordo com Nemoda et al. (2011), amostras de 10 a 20ng obtiveram êxito na genotipagem de 94 a 98%. Com isso, pode-se indicar que as concentrações encontradas no presente estudo podem ser consideradas suficientes para traçar o perfil genético do indivíduo.

De acordo com FBI, o ideal para análise é a recuperação de pelo menos 0,001ug de DNA, entretanto amostras com valores de 0,0002mg podem ser estudadas (ELLIS et al., 2007). No estudo de Ellis et al. (2007), as concentrações

encontradas foram equivalentes a 0,0279mg sendo assim consideradas ideais para análise.

A PCR é uma técnica quantitativa simples, que permite uma rápida amplificação e análise do DNA (SWEET et al., 1997). Muitas vezes, utilizada para amplificar quantidades mínimas de DNA tão quanto a 1,0ng de DNA (BUTLER, 2006; JOBLING, 2004). A PCR realizada nessa pesquisa foi a simultânea de 15 loci de STRs autossômico, conhecido como um kit multiplex. A utilização desse kit possibilitou que múltiplos loci fossem amplificados numa única reação, diminuindo o tempo de estudo, assim como da quantidade de DNA e de reagentes.

A reação totalizou 29 ciclos de amplificação. Cada ciclo de amplificação constituiu em etapas seguindo a ordem de desnaturação, de pareamento e de síntese. Cada ciclo variou, de 20 segundos a 3 minutos em um termociclador automatizado, somando um tempo de 2h e 25min para todo o processo.

Com o objetivo de evitar e controlar a contaminação das amostras analisadas, os preparos das amostras para amplificação foram feitos em uma sala separada, contendo uma capela. Antes do início do processo, o local foi desinfetado pela lampada germicida produzindo luz ultravioleta, com efeito esterilizante, evitando assim a contaminação por outras fontes de DNA, bactérias e outros produtos, deixados na superfície que pudessem danificar as amostras. Além disso, as soluções utilizadas foram autoclavadas, os reagentes foram aliquotados e os controles positivos e negativos foram feitos.

A contaminação da saliva pode resultar no comprometimento da análise e consequentemente impossibilita a identificação de um suposto suspeito. Mesmo em condições normais, o fluido salivar contém em sua microbiota, vírus, bactérias e fungos, podendo ocasionar alteração na qualidade e quantidade de DNA (PARYS-PROSZEK, 2001; NG et al., 2004; ANZAI et al., 2005; CARVALHO et al., 2010; NEMODA et al., 2011; NUNES et al., 2012). Além disso, a saliva é a mistura de diversos produtos produzidos pelas glândulas salivares parótida, sublingual e submandibular. Cada glândula produz diferentes volumes de saliva e diferentes componentes, podendo assim, alterar para mais ou para menos o teor de ácidos nucléicos (NEMODA et al., 2011).

A relação A260/A280 está relacionada à contaminação da amostra que pode resultar na amplificação negativa das amostras. Na presente pesquisa, as amostras quantificadas apresentaram valores considerados altos, variando as

médias máxima e mínima entre $4,38 \pm 1,82$ a $2,42 \pm 0,66$ ng/μl. Quando há contaminação das amostras de saliva, pode ocorrer a inibição das enzimas de PCR resultando no erro do processo. Ou ainda, quando o DNA contaminante estiver presente em níveis comparáveis aos do DNA alvo, a amplificação poderá gerar fragmentos de DNA que irão confundir a interpretação dos resultados da tipagem, podendo levar a uma conclusão errônea (PARYS-PROSZEK, 2001; NG et al., 2004; ANZAI et al., 2005; CARVALHO et al., 2010; NEMODA et al., 2011; NUNES et al., 2012). Com isso, algumas providências devem ser tomadas para se evitar a contaminação das amostras, bem como, a utilização de um controle negativo, a separação física das áreas do laboratório destinadas à extração de DNA, o preparo da reação de PCR e a obtenção do produto amplificado (CARVALHO et al., 2010).

Para observar se houve a contaminação das amostras amplificadas, foram feitos os controles positivos e negativos das reações. No controle positivo, foi como descrito no protocolo da reação do kit utilizado foi adicionado 10μl de 007 DNA controle. E para os controles negativos aplicou-se 10μl de TE (10 mM Tris, 0,1 mM EDTA, pH 8,0). De acordo com a eletroforese feita nos géis de agarose, o controle positivo aproximou-se dos resultados obtidos na amplificação das amostras. Já no controle negativo, a amplificação não ocorreu, indicando assim a ausência de contaminação. Como é mostrado nas imagens das eletroforeses feitas em géis de agarose, as amostras foram amplificadas e as bandas foram de aparência similar nas diferentes amostras, tais como na saliva in natura, nos queijos e chocolates mordidos e nas águas bebidas.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que:

- As medidas feitas em marcas de mordidas utilizando paquímetro digital e software ImageJ são semelhantes entre si em queijos e chocolates em até 7 dias, tanto para temperaturas ambiente de clima tropical (25°C a 35°C) quanto para temperaturas de geladeira (2 a 4°C).
- Os métodos de emparelhamento físico, a técnica manual mostrou-se mais precisa e confiável quando comparada a técnica utilizando o software Adobe Photoshop.
- Nas evidências biológicas as amostras de DNA a partir da saliva depositada em queijos e chocolates mordidos e garrafas de água consumidas podem ser recuperadas e amplificadas mesmo com a variação do tempo e temperatura.
- Desta forma, verifica-se que amostras de águas, queijos e chocolates nas condições estudadas, que simularam alimentos mordidos e bebidas consumidas encontrados em cenas de crime ou armazenadas em geladeiras a espera da análise pericial, podem ser utilizadas nas investigações de identificação em marcas de mordida tanto para métodos de evidências físicas quanto para métodos de evidências biológicas.

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, M.; SALDEEN, T.; GYLLENSTEN U. PCR-based DNA typing of saliva on stamps and envelopes. **Biotechniques**. v.17 n.3, p. 546-552, 1994.

AL-TALABANI, N. et al. Digital analysis of experimental human bite marks: application of two new methods. **Journal Forensic Sciences**. v.51, n.6, p.1372-1375, 2006.

AMERICAN BOARD OF FORENSIC ODONTOLOGY. ABFO Guidelines and standards. In: Bowers CM, Bell GL. **Manual of forensic odontology**. 3rd ed. Colorado: American Society of Forensic Odontology; 1997.

AMERICAN BOARD OF FORENSIC ODONTOLOGY. Diplomates Reference Manual 2013 [periódico online] 2013. Disponível em URL: <http://www.abfo.org/wp-content/uploads/2012/08/ABFO-Reference-Manual-1-22-2013-revision.pdf>. Acesso em: 03/09/2014.

ANZAI, E. K. et al. DNA extraction from human saliva deposited on skin and its use in forensic identification procedures. **Brazilian Oral Research**. v.19, n. 3, p. 216-22, 2005.

BARBARO, A. et al. Anonymous letters? DNA and fingerprints technologies combined to solve a case. **Forensic Science International**. 146S:S133–S134, 2004.

BEENA, V. T. et al. Bite marks from the crime scene- an overview. **Oral & Maxillofacial Pathology Journal**. v.31, n.1, p. 192-197, 2012.

BERNITZ, H. et al. An integrated technique for the analysis of skin bite marks. **Journal Forensic Sciences**. v.53, n.1, p.194-198, 2008.

BLACKWELL, S. A. 3-D imaging and quantitative comparison of human dentitions and simulated bite marks. **International Journal Legal Medicine**. v.121, n.1, p. 9-17, 2007.

BOWERS, C. M. Problem-based analysis of bite mark misidentifications: the role of DNA. **Forensic Sciences International**. 159S, S104–S109, 2006.

BRASIL. Conselho Federal de Odontologia. Resolução CFO 63/2005: Consolidação das Normas para Procedimentos nos Conselhos de Odontologia. 2005. Disponível em URL: <http://cfo.org.br/wp-content/uploads/2009/10/consolidacao.pdf>. Acesso em: 03/09/2014.

BUSH, M. A. et al. Biomechanical Factors in Human Dermal Bite marks in a Cadaver Model. **Journal of Forensic Sciences**. v. 54, n.1, p.167-176, 2009.

BUTLER, J. M. Short tandem repeat analysis for human identity testing. **Current Protocols in Human Genetics**. v.14, n. 14.8, 2004.

BUTLER, J. M. **Forensic DNA Typing: biology, technology and genetics of S^{*} markers**. San Diego: Academic Press; 2005.

BUTLER, J. M. Genetics and genomics of core STR loci used in human identity testing. **Journal Forensic Sciences**. v.51, n.2, p.253-265, 2006.

BUTLER, J. M. Short tandem repeat typing technologies used in human identity testing. **Biotechniques**. v.43, n.4, 2007.

BUTLER, J. M. **Fundamentals of forensic DNA typing**. California: Academic Press; 2009.

CARVALHO, S. P. M. Quality evaluation of DNA obtained from stored human saliva and its applicability to identification in Forensic Dentistry. **Revista Odonto Ciência**. v. 25, n.1, p.48-53, 2010.

CASTELLA, V. et al. Forensic evaluation of the QIAshredder/QIAamp DNA extraction procedure. **Forensic Science International**. v.156, n.1, p.70-73, 2006.

CECILIO, F. A. et al. Aging and surface EMG activity patterns of masticatory muscles. **Journal of Oral Rehabilitation**. v.37, n.4, p.248-255, 2010.

CHONG, M. C. et al. Test of the rapid PCR method using AmpFISTR Identifier kit. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**. v. 3, n.1, p. 475-476, 2011.

COTTON, E. A. et al. Validation of the AMPFISTR SGM plus system for use in forensic casework. **Forensic Science International**. v.112, n.2-3, p. 151-161, 2000.

COUTO, R.C. **Perícias em Medicina e Odontologia Legal**. Med book. Rio de Janeiro; 2011.

CURY, P. R.; FURUSE, C.; ARAÚJO, N. S. Técnica e aplicação da reação da polimerase em cadeia na área odontológica. **Revista Odontológica de Araçatuba**. v.26, n.2, p.34-39, 2005.

DURDIAKOVÁ, J. Comparison of different collection procedures and two methods for DNA isolation from saliva. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**. v.50, n.4, p.643-647, 2012.

EHLI, E. A. Using a commercially available DNA extraction kit to obtain high quality human genomic DNA suitable for PCR and genotyping from 11-year-old saliva saturated cotton spit wads. **BioMedCentral Research Notes**. v.1, n.133, 2008.

ELLIS, M. A. An evaluation of DNA yield, DNA quality and bite registration from a dental impression wafer. **Journal of the American Dental Association**. v.138, n.9, p. 1234-1240, 2007.

EVANS, S. et al. Contrast enhancement of bite mark images using the grayscale mixer in ACR in Photoshop®. **Journal Forensic Sciences**. v. 58, n. 3, p.804-810, 2013.

FLORA, G.; TUCERYAN, M.; BLITZER, R. Forensic Bite Mark Identification Using Image Processing Methods. **Annual Symposium on Applied Computing - ACM**. p. 903-908, 2009.

FOSTER, A.; LAURIN, N. Development of a fast PCR protocol enabling rapid generation of AmpF!STR® Identifiler® profiles for genotyping of human DNA. **Investigative Genetis**. v.3, n.6, p.3-11, 2012.

FREDSLUND, S. F.; MOGENSEN, H. S.; MORLING, N. Validation of the AmpFISTR SEfiler Plus™ PCR Amplification kit for forensic STR analysis. **Forensic Science International: Genetics Supplement Series**. v. 2, v.1, p. 27-28, 2009.

GIANNELLI, P. C. Chain of Custody. School of Law: Case Western Reserve University [periódico online] 1996. Disponível em URL: http://scholarlycommons.law.case.edu/faculty_publications/345. Acesso em: 03/09/2014.

GOLDEN, G. S. Standards and practices for bite mark photography. **Journal Forensic Odontostomatology**. v. 29, n. 2, p. 29-37, 2011.

GOREA, R. K.; JASUJA, O. P. Identification from bitemarks on Nakh. **Journal Indo-Pacific Academy of Forensic Odontology**. v.1, p.30-33, 2010.

GROVER, M. et al. How deep is the bite? – a review on bite marks in forensic odontology. **Journal of Punjab Academy Forensic Medicine and Toxicology**. v.13, n.1, p.49-52, 2013.

HERAS, S. M. et al. Computer-Based Production of Comparison Overlays from 3D-Scanned Dental Casts for Bite Mark Analysis. **Journal Forensic Science**. v. 50, n. 1, p. 1-7, 2005.

HINCHLIFFE. Forensic odontology, part 4. Human bite marks. **British Dental Journal**. v. 201, n.8, p. 363-368, 2011.

INTERNATIONAL CRIMINAL POLICE ORGANIZATION (INTERPOL). Interpol handbook on DNA data exchange and practice: recommendations from the Interpol DNA monitoring expert group. **Lyon: Organization International de la Police Communautaire – Interpol**; 2009.

JAKOBSEN, J.; REPPIEN, K. Assessment of bite marks on human skin – occlusal variations in the dentition of criminal offenders deserve special attention: Examples from two murder cases and an assault case. **Journal of Forensic Sciences**. v.2, p.37-72, 2008.

JOBLING, M. A.; GILL, P. Encoded evidence: DNA in forensic analysis. **Nature Genetics**. v.5, n.10, p.739-751, 2004.

JOHNSON, A. B. H.; WALTER, L. R. R. **Fundamentos da biologia molecular**. Porto Alegre: Artmed; 2011.

KIRKHAM, A. et al. High-throughput analysis using AmpFISTR® Identifier® with the Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyser. **Forensic Science International Genetics**. v.7, n.1, p.92-97, 2013.

KOCH, A.; ANDRADE, F. M. A utilização de técnicas de biologia molecular na genética forense: uma revisão. **Revista Brasileira Anual Clínica**. v.40, n.1, p.17-23, 2008.

LANDIS, J. R.; KOCH, G. G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. v.33, p.159-174, 2010.

LESSIG, R.; WENZEL, V.; WEBER, M. Bite mark analysis in forensic routine case work. **Experimental and Clinical Sciences International online Journal for advances in Science**. v.5, n.9, p.93-102, 2006.

MACDONALD, D. G. Bite mark recognition and interpretation. **Journal of the Forensic Science Society**. v.14, n.3, p.229-233, 1974.

MAHASANTIPPIYA, P. M. et al. Bite Mark Identification Using Neural Networks: A Preliminary Study. **Proceedings of the International MultiConference of Engineers and Computer Scientist**. v.1, 2011.

MALOTH, S.; GANAPATHY, K. S. Comparison between five commonly used methods of human bite mark overlay production from the dental study casts. **Indian Journal of Dental Research**. v.22, n.3, p.499-505, 2011.

MAIOR, J. R. S. et al. A aplicação da fotografia em marcas de mordida. **International Journal of Dentistry**. v.6, n.1, p. 21-24, 2007.

MANJUNATH, B. C.; CHANDRASHEKAR, B. R.; VATCHALA RANI, R. M. DNA Profiling and forensic dentistry e A review of the recent concepts and trends. **Journal of Forensic and Legal Medicine**. v.18, p.191-197, 2011.

MARQUES, J. A. M.; GALVÃO, L. C. C.; SILVA M. **Marcas de mordida**. 2007.

MILLER, R. G. et al. Uniqueness of the dentition as impressed in human skin: a cadaver model. **Journal Forensic Science**. v.54, n.4, p.909-914, 2009.

MORLING, N. PCR in forensic genetics. **Biochemical Society Transactions**.v.37, n.7, p.438-440, 2009.

MULLER, K. et al. Casework testing of the multiplex kits AmpF[®]STR1 SEfiler Plus[™] PCR amplification kit (AB), PowerPlex1 S5 System (Promega) and AmpFISTR[®] MiniFiler[™] PCR amplification kit (AB). **Forensic Science International: Genetics**. v. 4, n.1, p.200-205, 2010.

NAETHER, S. et al. The examination and identification of bite marks in foods using 3D scanning and 3D comparison methods. **International Journal Legal Medicine**. v.126, n.1, p. 89-95, 2012.

NATHALIE, Z.; HADI, S.; GOODWIN, W. Development of PCR internal controls for DNA profiling with the AmpF[®]STR[®] SGM Plus[®] amplification kit. **Electrophoresis**. v.33, n.2, p.2833-2839, 2012.

NEMODA, Z. et al. Assessing genetic polymorphisms using DNA extracted from cells present in saliva samples. **BioMedCentral Medical Research Methodology**. v.11, n. 170, 2011.

NG, D. P. et al. Effect of storage conditions on the extraction of PCR-quality geno DNA from saliva. **Clinica Chimica Acta**. v.343, n.1, p. 191-194, 2004.

NG, L. K. et al. Optimization of recovery of human DNA from envelope flaps using DNA IQ[™] System for STR genotyping. **Forensic Science International Genetic**. v.1, n.1, p. 283-286, 2007.

NUNES, A. P. et al. Quality of DNA extracted from saliva samples collected with the Oragene[™] DNA self-collection kit. **BioMedicalCentral Medical Research Methodology**. v.12, n. 65, 2012.

PARYS-PROSZEK, A. Some examples of genetic profiling of saliva traces based on polymorphic DNA analysis. **Institute of Forensic Research**. v.48, n.1, p. 109-117, 2001.

PHILLIPS, K.; MCCALLUM, N.; WELCH, L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex 100[®] and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). **Forensic Science International: Genetics**. v.6, n. 2, p. 282-285, 2012.

PRETTY, I. A. Forensic Dentistry: 2. **Bitemarks and Bite Injuries**. Dent Update. v.35, p. 48-61, 2008.

QIAGEN SAMPLE & ASSAY TECHNOLOGIES. QIAamp[®] DNA Investigator Handbook. 2010. Disponível em:
<http://www.qiagen.com/Search.aspx?q=qiaamp%25C2%25AE%2520dna%2520micro%2520handbook&c=%7BF74CDA83-B2E2-47CD-B9DA-E186DC170BFF%7D#&p=>. Acesso em: 02/02/2014.

RADFORD, G. et al. Biomechanical approach to human bitemark reconstruction. **Journal Forensic Odontostomatology**.v.27, n.1, p.33-36, 2009.

RAJSHEKAR, M.; KRUGER, E.; TENNANT, M. Bite marks: Understanding the role of general practitioners in forensic identification. **Journal International Oral Health**. v.4, n.2, p.1-7, 2012.

SANTORO, V. et al. Experimental study of bite mark injuries by digital analysis. **Journal Forensic Science**. v.56, n.1, p. 224-226, 2011.

SHEASBY, D. R.; MACDONALD, D. G. A forensic classification of distortion in human bite marks. **Forensic Science International**. v.122, n.1, p. 75-78, 2001.

SILVA, R. H. A. et al. Human bite mark and DNA technology in Forensic Dentistry. **Brazilian Journal of Oral Sciences**. v.5, n.1, p. 1193-1197, 2006.

SILVA, R. H. A. et al. Use of DNA technology in forensic dentistry. **Journal Applied Oral Science**. v. 15, n.3, p. 156-161, 2007.

SILVA, R. H. A. **Orientação profissional para o cirurgião-dentista: Ética e Legislação**. São Paulo: Santos; 2010.

SILVA, R. H. A. et al. Human identification analysis using PCR from the root portion of dental elements under different conditions of temperature and exposure time. *Revista Sul Brasileira de Odontologia*. v.9, n.1, p. 67-73, 2012.

SINGH, K. et al. Teeth and their Secrets – Forensic Dentistry. **Journal Forensic Research**. v.3, n.141, 2012.

STOLS, G, BERNITZ, H. Reconstruction of deformed bite marks using affine transformations. **Journal Forensic Science**. v.55, n.3, p.784-787, 2010.

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

SWEET, D. **Human bitemarks: Examination, recovery and analysis**. In: Bowers CM; Bell GL. *Manual of forensic odontology*. 3rd ed. American Society Forensic Odontology. p.148169, 1997.

SWEET, D. et al. An improved method to recover saliva from human skin: the double swab technique. **Journal Forensic Science**. v.42, n.2, p. 320-322, 1997.

SWEET, D.; PRETTY, I. A. A look at forensic dentistry – Part 2: teeth as weapons of violence - identification of bitemarks perpetrators. **British Dental Journal**. v.190, n.8, p.415-418, 2001.

SWEET, D.; SHUTLER, G. G. Analysis of salivary DNA evidence from a bite mark on a body submerged in water. **Journal Forensic Science**. v.44, n.5, p. 1069-1072, 1999.

TAUTZ, D.; RENZS, M. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. **Nucleic Acids Research**. v.12, n.10, p.4127-4138, 1984.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**. v.17, n. 16, p.6463-6471, 1989.

TERADA, A. S. S. D. **Utilização do produto Allprotect Tissue Reagent® na estabilização do DNA extraído de tecidos dentais humanos em diferentes condições de armazenamento**. [Dissertação]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo; 2013. 129p.

TUCERYAN, M. et al. A framework for estimating probability of a match in forensic bite mark identification. **Journal Forensic Science**. v.1, p.83-90, 2011.

TUCKER, V. C.; KIRKHAM, A. J.; HOPWOOD, A. J. Forensic validation of the PowerPlex® ESI 16 STR Multiplex and comparison of performance with AmpFISTR® SGM Plus®. **International Journal Legal Medicine**. v.126, n.3, p.345-356, 2012.

VALLONE, P. M.; HILL, C. R.; BUTLER, J. M. Demonstration of rapid multiplex PCR amplification involving 16 genetic loci **Forensic Science International: Genetics** 3. p.42-45, 2008.

VAN DER VELDEN, A.; SPIESSENS, M.; WILLEMS, G. Bite mark analysis and comparison using image perception technology. **Journal of Forensic Odontostomatology**. v.24, n.1, p.14-17, 2006.

VANRELL. **Odontologia Legal e Antropologia Forense**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

VERHEIJ, S.; HARTEVELD, J.; SIJEN, T. A protocol for direct and multiplex PCR amplification on forensically relevant samples. **Forensic Science International: Genetics**. v.6, n.2, p.167-175, 2012.

VILTROP, T. et al. Comparison of DNA extraction methods for multiplex polymerase chain reaction. **Analytical Biochemistry**. v.398, p.260-262, 2010.

WALSH, D. J. et al. Isolation of deoxyribonucleic acid (DNA) from saliva and forensic science samples containing saliva. **Journal Forensic Science**. v.37, p.387-395, 1992.

WANG, D. Y. et al. Developmental Validation of the AmpF‘STR_Identifiler_ Plus PCR Amplification Kit: Na Established Multiplex Assay with Improved Performance. **Journal Forensic Science**. v.57, n.2, p. 453-465, 2012.

WANG, D. Y. et al. Development and Validation of the AmpF‘STR_Identifiler_ Direct PCR Amplification Kit: A Multiplex Assay for the Direct Amplification of Single-Source Samples. **Journal Forensic Sciences**. v.56, n.4, p.835-845, 2011.

WEBER, J. L.; MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal Human Genetics**. v.44, n.3, p.388-396, 1989.

ZIĘTKIEWICZ, E. et al. Current genetic methodologies in the identification of disaster victims and in forensic analysis. **Journal Applied Genetics**. v.53, n.1, p. 41-60, 2012.

Anexo

Anexo A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

<p>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO/ FORP/ USP</p>
<p>PARCELO SUBSTANCIAL DO CEP</p>	
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p>	
<p>Título da Pesquisa: ANÁLISE DE PERFIS GENÉTICOS HUMANOS A PARTIR DE MARCAS DE MORDIDAS EM ALIMENTOS E ATOS DE SUÇÃO DE BEBIDAS, COM FINALIDADE DE IDENTIFICAÇÃO HUMANA.</p>	
<p>Pesquisador: Laís Gomes de Araujo</p>	
<p>Área Temática:</p>	
<p>Resumo: 2</p>	
<p>CNPQ: 303602/2.0005-5419</p>	
<p>Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/ FORP/ USP</p>	
<p>DADOS DO PARECER</p>	
<p>Número do Parecer: 154/00</p>	
<p>Data da Realização: 20/11/2012</p>	
<p>Apresentação do Projeto:</p>	
<p>A determinação da identidade é indispensável às relações humanas, tanto no nível social como jurídico. A Odontologia Legal contribui substancialmente para a identificação humana, inclusive por meio do estudo das marcas de mordidas, uma vez que a dentição de um indivíduo sendo única, pode-se atribuir uma marca de mordida a um indivíduo que possui uma dentição correspondente. A análise de marcas de mordidas humanas é realizada a partir de evidências físicas e biológicas. A física consiste na medição e na determinação do padrão, tamanho e forma dos dentes de um suspeito, comparando-os com as mesmas características observadas em uma mordida. Contudo, as marcas podem sofrer distorções, dificultando ou mesmo impedindo uma comparação adequada da marca de mordida e da dentição que a deixou, tornando-se necessário o estudo de evidências biológicas, principalmente a saliva, que constitui uma fonte de DNA extremamente útil em casos forenses. A partir de células orais de saliva depositada</p>	
<p>Endereço: Avenida do Café nº7 Bairro: Santa Fátima UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO CEP: 14.040-004 Telefone: (16)3602-0301 Fax: (16)3602-4102 E-mail: cos@forp.usp.br</p>	

<p>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO/ FORP/ USP</p>
<p>sobre a pele, objetos ou alimentos, pode-se extrair o DNA e estabelecer o perfil genético da amostra, promovendo a identificação de um suspeito.</p>	
<p>Objetivos da Pesquisa:</p>	
<p>Obter perfis genéticos humanos de marcadores microsatélites a partir do DNA extraído da saliva recuperada de alimentos e bebidas, após mordida ou sucção, respectivamente, visando uma futura aplicação em casos de investigação criminal.</p>	
<p>Avaliação dos Riscos e Benefícios:</p>	
<p>Serão analisadas amostras de saliva coletadas de 20 indivíduos, sendo 10 do sexo masculino e 10 do sexo feminino, com idade acima de 18 anos. Serão coletados de cada sujeito da pesquisa duas amostras de saliva in natura, mordida sem pedações de queijo, sem chocolate e bebida em seis garrafas de água, totalizando vinte amostras de cada um dos 20 participantes.</p>	
<p>De acordo com o relato parecer não haver risco para o voluntário, o benefício será social, de ter em seus genes pesquisadores mais habilitados na área forense.</p>	
<p>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</p>	
<p>Parecer não oferecer riscos aos voluntários e contribuir com a sociedade.</p>	
<p>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</p>	
<p>Pendências atendidas.</p>	
<p>Recomendações:</p>	
<p>Não há.</p>	
<p>Conclusões ou Pendências e Lista de Indicações:</p>	
<p>Aprovado.</p>	
<p>Situação do Parecer:</p>	
<p>Aprovado.</p>	
<p>Necessária Apreciação de CONEP:</p>	
<p>Não.</p>	
<p>Endereço: Avenida do Café nº7 Bairro: Santa Fátima UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO CEP: 14.040-004 Telefone: (16)3602-0301 Fax: (16)3602-4102 E-mail: cos@forp.usp.br</p>	

<p>FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO/ FORP/ USP</p>
<p>Considerações Finais e voto do CEP:</p>	
<p>RIBEIRÃO PRETO, 20 de Dezembro de 2012</p>	
<p>Assinado por: JOSÉ TARCISO LIMA PEREIRA (Exonerado)</p>	
<p>Endereço: Avenida do Café nº7 Bairro: Santa Fátima UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO CEP: 14.040-004 Telefone: (16)3602-0301 Fax: (16)3602-4102 E-mail: cos@forp.usp.br</p>	