



Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial

www.elsevier.pt/spemd



Revisão

A importância médico-legal e criminalística da saliva: sistematização da sua aplicação nas ciências forenses



Cristiana Palmela Pereira^{a,b,c,d}

^a Faculty of Dentistry, University of Lisbon, Lisboa, Portugal

^b Portuguese National Institute of Legal Medicine and Forensic Science, Lisboa, Portugal

^c Center of Statistics and Applications, University of Lisbon (CEAUL), Lisboa, Portugal

^d CENCIFOR, Center of Forensic Studies, Instituto Nacional de Medicina Legal, I.P., Coimbra, Portugal

INFORMAÇÃO SOBRE O ARTIGO

Historial do artigo:

Recebido a 10 de dezembro de 2013

Aceite a 6 de janeiro de 2014

On-line a 18 de fevereiro de 2014

Palavras-chave:

Saliva

Criminalística

Medicina legal

Ciências forenses

Identificação

Drogas de abuso

R E S U M O

Nos últimos anos a saliva tornou-se num vestígio biológico muito importante para os investigadores das várias áreas das ciências forenses. Este fluido corporal ganhou popularidade na investigação médico-legal e na criminalística devido à sua fácil recolha, ao seu fácil e seguro manuseio e à sua estreita relação com o plasma. A análise da saliva para testes serológicos e para conteúdos celulares provou que esta é de grande utilidade na deteção de drogas de abuso e de álcool, na identificação hormonal, em casos de envenenamento e de marcas de mordeduras. Atualmente é imperativo que os laboratórios forenses automatizem os procedimentos específicos de rotina para a saliva como os que possuem para o sangue e para a urina, para que a saliva possa ser considerada um vestígio de equivalente importância na investigação criminal. Esta atualização sistemática destina-se a enfatizar os muitos usos da saliva na prática das ciências forenses.

© 2013 Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos os direitos reservados.

The medico-legal and criminalistics importance of saliva: Update of its application in forensic sciences

A B S T R A C T

In recent years saliva has attracted much interest amongst researchers especially in the field of Forensic sciences. This body fluid is gaining popularity due to its ease of collection, safety in handling, and its close relationship with plasma. Analysis of saliva for serological testing and cellular content has proved to be of wide use in crime detection, drug and alcohol abuse, hormone identification, cases of poisoning and bites. In the present moment there is a need for Forensic laboratories to automate the settings specific for saliva as routinely done for blood or urine in order to consider saliva as the primary investigating tool in absence of other

Keywords:

Saliva

Criminalistics

Legal medicine

Forensic sciences

Identification

Substance abuse detection

Correio eletrónico: cristiana.pereira@fmd.ul.pt

1646-2890/\$ – see front matter © 2013 Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos os direitos reservados.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rpem.2014.01.002>

body fluids. This update is aimed at highlighting the many uses of saliva in the practice of Forensic Sciences.

© 2013 Sociedade Portuguesa de Estomatologia e Medicina Dentária. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

Introdução

A criminalística, ciência que tem por objetivo o reconhecimento de objetos extrínsecos relativos ao crime e à identidade do criminoso, é tradicionalmente descrita como a ciência da individualização. A individualização significa a possibilidade de se definir uma única fonte como origem de um vestígio de uma cena de crime, dentro de um leque de várias fontes possíveis. A ciência forense distingue a individualização da identificação, uma vez que esta última apenas permite estreitar a fonte potencial de origem a um grupo ou classe de objetos¹.

Na última década tem aumentado o interesse forense pela saliva e o seu uso como vestígio forense de diagnóstico em alternativa ao sangue e à urina². A saliva total é a mistura da saliva segregada pelas glândulas salivares, do fluido gengival crevicular e das células epiteliais orais exfoliadas e dos micro-organismos. As vantagens adicionais de ser um método de recolha não invasivo e fácil, que pode ser recolhido por investigadores criminais com muito pouco treino, e de ser um método que evita a intrusão por parte dos profissionais da investigação criminal na supervisão obrigatória da recolha de vestígios, em funções privadas, como por exemplo, na recolha da urina, fazem da saliva o fluido mais importante na análise forense³. Em muitos casos de investigação forense de cenas de crime, onde a cavidade oral esteve envolvida, a saliva é detetada em conjunto com as marcas de mordedura e as impressões labiais. A análise serológica e celular da saliva assim recolhida é de extrema importância na identificação do possível suspeito⁴. Nos últimos anos a saliva ganhou máxima relevância na deteção de drogas de abuso e de álcool nos condutores⁵. Por outro lado, a saliva é também um vestígio de análise nos casos de envenenamentos com metais pesados, uma vez que informa sobre o desequilíbrio iónico e a excreção de determinados venenos por esta via.

Verifica-se que existem várias funções para a saliva na área das ciências forenses e o objetivo deste artigo é fornecer uma sistematização atual e completa das suas principais utilizações forenses e criminalística.

O papel da saliva na identificação médico-legal humana

A saliva é normalmente depositada com as marcas de mordedura em muitos casos de homicídios, assaltos, abusos sexuais e outros casos criminais⁶. Quando a marca de mordedura não permite uma análise física médico-legal para uma possível identificação positiva, é a saliva, depositada no ato de morder, o principal alvo forense na análise biológica do vestígio marca de mordedura. A dificuldade da recolha da saliva depositada na pele, nas roupas, no papel e noutros objetos inanimados prende-se principalmente com o facto de ser

completamente invisível, assim como pelos substratos onde se encontra depositada não poderem ser submetidos diretamente aos procedimentos de extração⁷.

Métodos de deteção de manchas secas de saliva

Existem fundamentalmente 3 principais métodos forenses:

1. Métodos químicos: muitos produtos químicos e enzimáticos já foram alvo de experimentação para detetar uma mancha seca de saliva. A deteção de saliva em envelopes e selos tem sido realizada com o teste químico de trifetil tetrazólio, o qual reage reduzindo os açúcares e formando um precipitado insolúvel vermelho. A maioria das enzimas usadas nesta reação são as fosfatases alcalinas e as amilases. Também têm sido usados para a deteção da saliva os sais de nitrato e o tiocianato⁸. Todos estes métodos químicos têm limitações e a respetiva sensibilidade é variável dependendo do tempo da mancha seca de saliva e da quantidade de saliva depositada.
2. Luz ultravioleta e laser, tubo em arco de quartzo e laser de argónio^{9,10}.
3. Espetroscopia de fluorescência: o aminoácido aromático, triptofano, da enzima alfa amilase é caracterizado por um espectro de emissão único, o que possibilita uma boa sensibilidade na deteção de manchas secas de saliva na pele⁸.

Recolha de saliva do substrato pele

Vestígios de resíduos de saliva podem ser recolhidos para o teste de identificação. Os métodos clássicos para a recolha da saliva na pele são a utilização de uma zaragatoa húmida ou de um papel de filtro húmido colocado de forma suave, sem exercer nenhuma pressão, na zona anatómica da pele com a mancha seca de saliva⁶. O método que usa uma zaragatoa húmida seguida de uma zaragatoa seca, conhecida como a técnica do *double swab*, foi estudado pela primeira vez por Sweet et al. em 1997¹¹, fornece melhores resultados ao nível da recuperação da saliva da superfície da pele. O ácido *desoxirribonucleico* (ADN) da saliva e da pele com depósitos de saliva é extraído através do método do fenol-clorofórmio.

Perfil de ADN («fingerprinting»)

O perfil de ADN, exceto para os gémeos monozigóticos, é único para a individualização. Fatores como o calor, a humidade, a luz solar, os contaminantes de superfície, entre outros, podem aumentar a degradação do ADN. Os polimorfismos da molécula de ADN são herdados e não mudam ao longo da vida de um indivíduo. As amostras de ADN são amplificadas pela técnica de PCR para a tipagem de regiões *short tandem repeat* (STR)¹². A separação dos pequenos fragmentos STR polimórficos faz com que seja possível a sua utilização em amostras biológicas com um alto grau de degradação. A análise conjunta

de regiões STR proporciona resultados altamente satisfatórios. Para além do ADN genómico, as células derivadas da saliva contêm ADN mitocondrial que poderá ajudar na identificação médico-legal^{13,14}. A maior vantagem do ADN mitocondrial é a existência de um elevado número de cópias em cada célula, proporcionado pelo elevado número de mitocôndrias presentes na maioria das células¹³. O ADN cromossómico provém do pai e da mãe, enquanto o ADN mitocondrial está estritamente relacionado com a mãe. Assim, por exemplo, quando estamos perante um caso forense com a necessidade de realizar uma identificação de uma ossada, se os familiares mais próximos não existirem, poderemos utilizar os familiares da linhagem materna mais distantes como uma fonte de referência para suportar a identificação. Quando o ADN nuclear falha ou não é possível analisar o ADN genómico por este estar muito degradado, existe a possibilidade de utilizar o ADN mitocondrial¹².

Análise forense de drogas de abuso na saliva

A amostra biológica de rotina mais frequentemente utilizada na determinação de drogas de abuso é a urina. A amostra é aceitável e obtida de forma não invasiva. Contudo, apesar de a urina ser aceite atualmente, existem várias discussões em relação a valores éticos em torno da forma de recolha desta amostra biológica, quanto à invasão da privacidade, principalmente quando a recolha tem de ser observada para prevenir a adulteração ou substituição da amostra, preservando a cadeia de custódia⁵. Assim, foram implementadas novas técnicas analíticas que proporcionam a deteção de um grande número de drogas com uma pequena quantidade de saliva. A maior vantagem da amostra biológica oral em relação à urina é o seu procedimento de recolha ser fácil, rápido e não intrusivo⁵.

Os grupos de drogas que podem ser identificadas na saliva são as anfetaminas, os barbitúricos, as benzodiazepinas, a fenilciclídina, a cocaína e os opioides. A saliva permite também a deteção do consumo muito recente de marijuana através de métodos de radioimunoensaio (RIA). O maior componente psicoativo da marijuana pode ser detetado na saliva até 4 horas depois de ter sido fumada¹⁵.

A maior parte das drogas estão presentes na saliva por um processo simples de difusão passiva, que é caracterizado pela transferência das moléculas da droga através de um gradiente de concentração sem gasto de energia. Geralmente as concentrações das drogas na saliva refletem a fração livre da droga no sangue.

Alguns autores descobriram quantidades mensuráveis de droga na saliva extraídas pelo método de extração líquido-líquido através do metanol e analisadas e identificadas através da técnica de imunoensaios enzimáticos múltiplos (EMIT) e da cromatografia gasosa/espectrofotometria de massa^{5,15}. Esta metodologia específica e sensitiva com aplicação forense é de utilidade complementar aos testes serológicos nos casos de marcas de mordedura para a possível identificação do agressor. Por outro lado, outros investigadores detetaram drogas como o fenobarbital, a anfetamina e a morfina através de técnicas de RIA na saliva^{5,15}.

Na última década, uma empresa alemã, a Securetec, introduziu um novo teste de deteção de drogas com aplicação

forense, o *Drugwipe*. Consiste num instrumento de imuno-diagnóstico não específico de deteção de drogas em várias superfícies¹⁵. A utilização do teste *Drugwipe* para a saliva e para o suor encontra-se ainda numa fase experimental em vários países. Este teste tem o formato e o tamanho de uma caneta com uma tira baseada numa reação imunoquímica que é utilizada para a deteção de partículas de drogas de abuso em vários tipos de matrizes. Existem testes individuais para o grupo dos opiáceos, dos canabinoides, da cocaína e das anfetaminas (metanfetaminas e ecstasy)¹⁶.

A saliva é comumente utilizada como amostra biológica para a medição de hormonas esteroides, como o cortisol, a cortisona e a testosterona, pois é aceite que os níveis salivares destes esteroides refletem a fração circulante livre não ligada.

O papel da saliva no diagnóstico diferencial dos parâmetros de identificação reconstrutiva de espécie e de sexo em casos de marcas de mordedura

Em 1984, foi introduzida por Fletcher et al.⁶ a reação imunoenzimática (ELISA) através de um anticorpo monoclonal baseado na presença da IgA salivar para a identificação de espécies em manchas com cerca de 16 meses. Esta técnica é de primordial importância em casos de marcas de mordedura quando existem dúvidas se estas são humanas ou não humanas, para a continuação da investigação criminal na identificação do vestígio biológico e físico⁶.

A possibilidade de obter células epiteliais bucais exfoliadas na saliva numa marca de mordedura aumenta a possibilidade de determinar o sexo do agressor. A recolha pode ser realizada até algumas semanas após a sua deposição, dependendo dos materiais que contêm as impressões das marcas de mordedura e dos fatores ambientais. Baseado no sucesso da sua utilização com o sangue, são usados os mesmos parâmetros: 1) a presença e a deteção da cromatina sexual (corpos de Barr nas mulheres e os corpos F nos homens) e 2) a determinação do nível da hormona sexual baseado nas quantidades detetáveis e nas percentagens da testosterona e do 17 β -estradiol pelo método de RIA.

Conclusões

A importância médico-legal e criminalística da saliva como vestígio biológico para a investigação criminal tem aumentado nestes últimos anos nos laboratórios forenses. A estes laboratórios é requerida a existência de procedimentos automáticos para a saliva como os que existem de forma rotineira para o sangue e para a urina. A facilidade do método não invasivo de recolha e de segurança no manuseio da saliva fez com que esta amostra biológica tenha ganho muita popularidade na área das ciências forenses para as drogas de abuso. A determinação do sexo e a individualização positiva de um agressor numa cena de crime com a ajuda do exame das células epiteliais esfoliadas na saliva tem sido de grande vantagem na resolução de investigações forenses. No futuro, outros campos de utilização prática da saliva, dentro das ciências forenses, irão emergir de forma mais padronizada e rotineira nos laboratórios forenses.

Conflito de interesses

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Agradecimentos

Fundação Nacional para a Ciência e Tecnologia, Portugal: PEst-OE/MAT/UI0006/2014.

BIBLIOGRAFIA

1. Cole S. Forensics without uniqueness, conclusions without individualization: The new epistemology of forensic identification. *Law, Prob & Risk*. 2009;8:233-55.
2. Bhandari R, Kakkar T, Bhullar RK, Bansal H, Sandhu SV, Jassar S. Saliva an adjunct in forensic odontology. *BFUDJ*. 2011;2:144-7.
3. Ramsey K, Burton E. Crime scene to court. In: Siegel JA, Saukko PJ, editores *Encyclopedia of Forensic Sciences*. 2ª ed. Academic Press; 2013. p. 439-42.
4. Fish JT, Miller LS, Braswell MC, Wallace Jr EW. Bodily fluid evidence. Em: *Crime Scene Investigation*. 3ª ed. Anderson Publishing; 2014. p. 137-59.
5. Vindenes V, Lund HME, Andresen W, Gjerde H, Ikdahl SE, Christophersen AS, et al. Detection of drugs of abuse in simultaneously collected oral fluid, urine and blood from Norwegian drug drivers. *Forensic Sci Int*. 2012;219:165-71.
6. Pereira C, Santos JC, Solheim T. Evidence collection of a tooth mark in a crime scene: Importance of the dental materials in forensic dentistry. *Rev Port Estomatol Cir Maxilofac*. 2009;50:141-4.
7. Silva RHA, Musse JDO, Melani RFH, Oliveira RN. Human bite mark identification and DNA technology in forensic dentistry. *Braz J Oral Sci*. 2006;5:1193-7.
8. Nanda KD, Ranganathan K, Umadevi K, Joshua E. A rapid and noninvasive method to detect dried saliva stains from human skin using fluorescent spectroscopy. *J Oral Maxillofacial Path*. 2011;15:22-5.
9. Auvdel MJ. Comparison of laser and ultraviolet techniques used in the detection of body secretions. *J Forensic Sci*. 1987;32:326-45.
10. Auvdel MJ. Comparison of laser and high intensity quartz arc tubes in detection of body secretions. *J Forensic Sci*. 1988;33:929-45.
11. Sweet D, Lorente M, Lorente JA, Valenzuela A, Villanueva E. An improved method to recover saliva from human skin: The double swab technique. *J Forensic Sci*. 1997;42: 320-2.
12. Anzai-Kanto E, Hirata MH, Hirata RDC, Nunes FD, Melani RFH, Oliveira RN. DNA extraction from human saliva deposited on skin and its use in forensic identification procedures. *Braz Oral Res*. 2005;19:216-22.
13. Pretty IA, Sweet D. A look at forensic dentistry-Part 1: The role of teeth in the determination of human identity. *Br Dental J*. 2001;190:359-66.
14. Stavrianos C, Eliades A, Kokkas A. The role of DNA in forensic odontology (Part 1) DNA analysis methods. *Res J of Med Sciences*. 2010;4:334-9.
15. Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int*. 2005;150: 119-31.
16. Samyn N, van Haeren C. On-site testing of saliva and sweat with Drugwipe and determination of concentrations of drugs of abuse in saliva, plasma and urine of suspected users. *Int J Legal Med*. 2000;113:150-4.