

Revista Brasileira de Odontologia Legal – RBOL

ISSN 2359-3466

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



Odontologia legal e DNA

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

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

Rayle Diniz ANDRADE¹, Isabella Pontes de MEDEIROS², Tainá Nascimento FALCÃO², Johnys Berton Medeiros da NÓBREGA², Bianca Marques SANTIAGO^{2,3}.

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

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

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

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

Informações sobre o manuscrito:

Recebido: 21 de abril de 2023

Aceito: 11 de julho de 2023

Autor(a) para contato:

Profa. Dra. Bianca Marques Santiago.

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

Email: bianca.santiago@academico.ufpb.br.

RESUMO

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

PALAVRAS-CHAVE

Odontologia legal; Saliva; DNA; Genética forense.

INTRODUÇÃO

A Odontologia Legal tem como objetivo a aplicação dos conhecimentos da ciência odontológica a serviço da justiça¹, uma de suas áreas de atuação diz respeito à identificação humana, por consequência, auxilia também na resolução de crimes.

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

Este último representa um avanço de grande importância para a genética moderna e em muito contribui na investigação criminal, pois apresenta potencial discriminatório e pode ser realizado em amostras antigas expostas às agressões ambientais. O DNA de um indivíduo é idêntico em qualquer célula do seu corpo, quer tenha sido extraído da raiz do cabelo, sêmen, sangue ou saliva, sendo, portanto, possível obter um perfil molecular único para cada pessoa a partir de uma amostra biológica².

O sangue e a saliva contêm alguns constituintes semelhantes, entre eles, o DNA, assim, como nem sempre é possível a obtenção de amostras sanguíneas, o fluido salivar é uma fonte alternativa segura para extração de material genético². O uso de saliva é favorecido devido à sua praticidade, por conferir um processo não invasivo e de fácil coleta³.

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

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

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

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

METODOLOGIA

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

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

Pergunta de investigação

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

Estratégia de busca

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

Crítérios de elegibilidade para seleção dos estudos

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

Seleção das fontes de evidência

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

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

foram registrados e relatados nesta revisão.

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

Extração de dados

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

Análise e apresentação dos dados

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

RESULTADOS

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

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

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

Caracterização dos artigos científicos

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

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

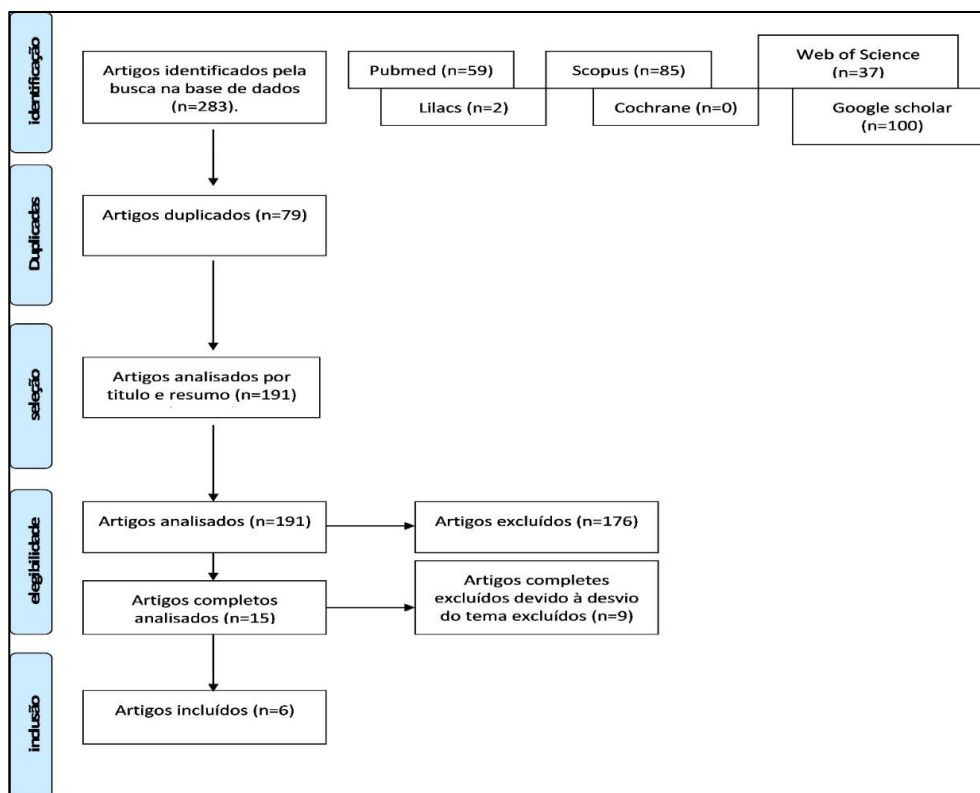


Figura 1. Diagrama PRISMA – Fluxograma das etapas desenvolvidas para a seleção de estudos primários incluídos na revisão.

DISCUSSÃO

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

Com relação à coleta de DNA em próteses dentárias de resina, foi visto que a região que apresentava maior quantitativo genético eram nas áreas de superfícies basais⁹. Além disso, a coleta de DNA isolado da prótese dentária, mesmo após 1

mês, adiciona grande utilidade deste método na ciência forense¹⁰.

O uso de cartões *Flinders Technology Associate* (FTA), quando a amostra de saliva é adequadamente transferida para estes e, em seguida, armazenados corretamente seguindo as instruções do fabricante, favorece a recuperação de quantidades suficientes de DNA para identificação humana, mesmo depois de mais de uma década de armazenamento à temperatura ambiente¹¹. O protocolo, segundo Ovchinnikov et al. (2016)¹² aponta que a utilização de PCR multiplex e simplex para amplificação e sequenciamento do DNA da saliva pode ser utilizado em cartões FTA com coleta de mais de 10 anos, mesmo que estes estejam sem proteção especial.

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

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

Observou-se também que mesmo após um ano de diferença entre coleta e análise da amostra, a saliva coletada de marcas de mordidas em pastilha de compressão dentária ainda guarda material genético. Além de não serem encontrados inibidores que pudessem interferir no perfil do DNA¹³.

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

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

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

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

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

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

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

acondicionamento, evitando a contaminação por contato, por mistura ou por material biológico do coletor¹⁶. Os estudos aqui incluídos apresentaram controle para minimizar o risco de contaminação¹⁷.

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

CONCLUSÃO

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

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

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

AGRADECIMENTO

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

ABSTRACT

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

KEYWORDS

Forensic dentistry; Saliva. DNA. Forensic genetics.

REFERÊNCIAS

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

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