



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE (UERN)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E SOCIEDADE (PPGSS)



LETÍCIA MARQUES FONTES

MÉTODO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE DNA DENTAL  
POR MEIO DE PULVERIZAÇÃO ATRAVÉS DE MOINHO DE BOLA

MOSSORÓ – RN

2018

LETÍCIA MARQUES FONTES

MÉTODO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE DNA DENTAL  
POR MEIO DE PULVERIZAÇÃO ATRAVÉS DE MOINHO DE BOLA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Sociedade (PPGSS) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Sociedade.

Orientadora: Profa. Dra. Isabela Pinheiro  
Cavalcanti Lima

MOSSORÓ – RN

2018

© Todos os direitos estão reservados a Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do(a) autor(a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu(a) respectivo(a) autor(a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

**Catálogo da Publicação na Fonte.**  
**Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.**

F683m Fontes, Letícia Marques  
MÉTODO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE DNA  
DENTAL POR MEIO DE PULVERIZAÇÃO ATRAVÉS DE  
MOINHO DE BOLA. / Letícia Marques Fontes. -  
Mossoró/RN, 2018.  
35p.

Orientador(a): Profa. Dra. Isabela Pinheiro Cavalcante  
Lima.

Dissertação (Mestrado em Programa de Pós-  
Graduação em Saúde e Sociedade). Universidade do  
Estado do Rio Grande do Norte.

1. Características Físicas. 2. Dna forense. 3.  
Pulverização de dentes. I. Lima, Isabela Pinheiro  
Cavalcante. II. Universidade do Estado do Rio Grande do  
Norte. III. Título.

LETÍCIA MARQUES FONTES

MÉTODO ALTERNATIVO PARA OBTENÇÃO DE DNA DENTAL  
POR MEIO DE PULVERIZAÇÃO ATRAVÉS DE MOINHO DE BOLA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Sociedade (PPGSS) da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN) como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Saúde e Sociedade.

Data da Defesa: 07/02/2018

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

Profa. Dra. Isabela Pinheiro Cavalcanti Lima  
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte

---

Profa. Dra. Claudia Tavares Machado Cunha  
Universidade Potiguar

---

Prof. Dr. Gustavo Barbalho Guedes Emiliano  
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha irmã, que estiveram presentes em todas as etapas da minha vida, incentivando-me sempre a crescer.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Adalgisa Marques da Costa e Antonio Leite Fontes, que me forneceram todo apoio emocional para que eu seguisse firme com o meu sonho;

A minha irmã, Luanna Giselly Marques Fontes, que esteve do meu lado em todos os momentos, dando forças e dizendo que tudo iria correr bem;

A minha orientadora, Isabela Pinheiro Cavalcant Lima, que com toda paciência e saber pode me proporcionar uma rica experiência durante esses anos juntas;

Ao meu “co-orientador”, Gustavo, que esteve disposto a encarar esse desafio, me incentivando a crescer sempre;

Aos meus amigos, que mesmo distantes ou não, estavam torcendo pela minha vitória;

Ao meu namorado, Diogo Diogenes Medeiros Diniz, que esteve presente durante todas as etapas da minha vida, torcendo fielmente pelo meu sucesso;

Ao técnico Roberto, que com toda simpatia ajudou nas etapas laboratoriais dessa pesquisa.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”. (Madre Teresa de Calcuta)

## RESUMO

A extração de DNA de tecidos mineralizados é um processo laborioso, oneroso e de longo tempo de processamento. Considera-se que novos métodos de pulverização, destes tecidos duros, poderiam ser implantados para substituir, o uso do *standar-gold* para a sua pulverização para fins de identificação genética. Objetivou-se nesta pesquisa analisar e comparar a granulometria média das partículas de elementos dentários pulverizados pelos métodos Freezer mill® e Moinho Excêntrico de Bolas. Refere-se a um estudo individuado, laboratorial e de acurácia. A amostra consistiu de 06 (seis) dentes molares, sem tratamento endodôntico e sem tecido cariado, de indivíduos adultos, selecionados aleatoriamente quanto ao sexo e ancestralidade. Cada dente foi seccionado longitudinalmente em dois hemi-dentes. Após a secção, os elementos dentários foram limpos e pulverizados seguindo os 02 (dois) diferentes métodos. As amostras destinadas ao Moinho Excêntrico de Bolas foram colocadas uma a uma junto com as bolas de cerâmicas dentro dos jarros e foi esperado um tempo de 2 horas. As amostras referentes ao Freezer mill® foram imersas em nitrogênio líquido por 3 minutos antes de cada ciclo. Após os dois processos, os pós oriundos foram submetidas a caracterização através de Peneiras de 150 e 200 Mesh. Foi selecionado o teste não-paramétrico de Mann-Withney para a análise estatística. O Moinho Criogênico resultou em 36,8% da amostra passando pela peneira de 150 mesh e 35,9% pela peneira de 200 mesh, enquanto que o Moinho de Bolas teve 26,5% da amostra passando pela peneira de 150 e 8,5% passando pela peneira de 200 mesh. Concluiu-se que o Moinho de Excêntrico de Bolas ... estudo deu um passo importante na direção do desenvolvimento de um método alternativo de pulverização de dentes, necessitando de novas pesquisas para aprimoramento da técnica.

**Palavras-chaves:** DNA forense; Pulverização de dentes; Características Físicas.



## **ABSTRACT**

The extraction of DNA from mineralized tissues is a laborious, costly and time-consuming process. It is considered that new spraying methods, of these hard tissues, could be implanted to replace the use of standard gold for spraying for purposes of genetic identification. The objective of this research was to analyze and compare the physical characteristics (mean GRANULOMETRY of the particles and homogeneity) of the particles of dental elements pulverized by Freezer mill® and Eccentric Ball Mill methods. Refers to an individual, laboratory and accuracy study. The sample consisted of 06 (six) molar teeth, without endodontic treatment and without caries, of adult individuals, randomly selected as to sex and ancestry. Each tooth was sectioned longitudinally in two hemi-teeth. After sectioning, the dental elements were cleaned and pulverized following the 02 (two) different methods. The samples destined for the Eccentric Ball Mill were placed one by one along with the ceramic balls inside the jars and a time of 2 hours was expected. Freezer mill® samples were immersed in liquid nitrogen for 3 minutes before each cycle. After the two processes, the originating powders were submitted to characterization through 150 and 200 mesh screens. The non-parametric Mann-Whitney test was selected for statistical analysis. The Cryogenic Mill resulted in 36.8% of the sample passing through the 150 mesh sieve and 35.9% through the 200 mesh sieve, whereas the Ball Mill had 26.5% of the sample passing through the sieve of 150 and 8.5 % passing through the 200 mesh screen.

**Keywords:** Forensic DNA; Spraying of teeth; Physical characteristics.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Limpeza da amostra com Curetas Periodontais afiadas. ....	19
<b>Figura 2:</b> Limpeza das superfícies dentárias com Lixa. ....	19
<b>Figura 3:</b> Elemento dentário sendo seccionado com alta rotação. ....	20
<b>Figura 4:</b> Pesagem de um Hemi-dente. ....	20
<b>Figura 5:</b> Tamanho aproximado após a quebra do hemi-dente. ....	21
<b>Figura 6:</b> Bolas de Cerâmica utilizadas para moagem. ....	22
<b>Figura 7:</b> Moinho Excêntrico de Bolas.....	22
<b>Figura 8:</b> Agitador com as Peneiras acopladas.....	23

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Pesagem da amostra em gramas antes e após a secção. ....	25
<b>Tabela 2:</b> Quantidade da amostra pulverizada pelo Freezer Mill® antes e após passarem nas peneiras. ....	25
<b>Tabela 3:</b> Peso das amostras pulverizadas no Moinho Excêntrico de Bolas antes e após passarem nas peneiras. ....	26
<b>Tabela 4:</b> Valores das medianas obtidas para as variáveis relacionadas à pesagem das amostras de acordo com o tipo de pulverização. ....	27

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	11
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
<b>OBJETIVOS</b> .....	17
OBJETIVO GERAL: .....	17
OBJETIVO ESPECÍFICO: .....	17
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	18
NATUREZA DO ESTUDO .....	18
CENÁRIO DA PESQUISA .....	18
CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DE EXCLUSÃO .....	18
TAMANHO DA AMOSTRA .....	18
PROCESSAMENTO DA AMOSTRA .....	19
PULVERIZAÇÃO COM MOINHO EXCÊNTRICO DE BOLAS .....	21
PULVERIZAÇÃO COM FREEZER MILL® .....	23
CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	24
<b>RESULTADOS</b> .....	25
<b>DISCUSSÃO</b> .....	28
<b>CONCLUSÃO</b> .....	3130
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	321



## INTRODUÇÃO

A Odontologia Legal é uma especialidade que exige um conhecimento amplo. O profissional deve aplicar os conhecimentos adquiridos em todas as disciplinas, desde as mais básicas como Anatomia, até as mais complexas como Dentística, Prótese e Ortodontia, aos interesses do Direito. O Odontologista ou Dentista Forense tem como papel a identificação de mortos através das arcadas dentárias e ajuda a solucionar crimes, seu campo de atuação é bem vasto. Deve estar familiarizado com os laboratórios que processam DNA. Sua presença nos Institutos Médicos Legais (IML) é de suma importância visto que um médico não poderá realizar o exame pericial da cavidade oral corretamente. Ele saberá analisar um odontograma ou até mesmo identificar as informações importantes de uma arcada dentária esqueletizada ou carbonizada. Portanto, um IML sem um Odontologista pode ser considerado incompleto. (SILVEIRA, 2006).

Entendemos a Identificação Humana como sendo a busca por uma identidade, que pode ser feita tanto em indivíduos vivos como em mortos independente da condição atual do corpo (carbonizado, mutilado ou em decomposição). Consiste na busca de coincidências entre os dados previamente obtidos e registrados com os achados no presente. Para que uma técnica de Identificação seja considerada aplicável, ela deve apresentar cinco características básicas: Individualidade (característica é única por indivíduo); Imutabilidade (não se altera com a ação do tempo); Perenidade (persistente à ação do tempo); Aplicabilidade (a técnica para obtenção deve ser de custo viável e fácil reprodução); Classificabilidade (possibilidade de classificação) (TORNAVOI; SILVA, 2010).

Amostras de DNA podem ser obtidas de qualquer tecido humano constituído de células. O DNA extraído de sangue, saliva, ossos, sêmen, marcas de mordida, escovas de dente, *swab* bucal, cigarros e elementos dentários podem ser utilizados como fonte de material para determinação do perfil genético do indivíduo (BUTTLER, 2010).

A seleção do tipo de fonte de DNA dependerá das condições de conservação dos tecidos, sendo os elementos dentários o material de escolha quando na ausência de outros tecidos em condições melhores de preservação. Os dentes por serem as estruturas do corpo mais rígidas, mineralizados e resistentes à putrefação preservam melhor o DNA da degradação (MALAVER; YUNIS, 2003).

A estrutura mineralizada confere maior capacidade de resistir à ação adversa do meio, do tempo decorrido, da *causa mortis* em casos de carbonização, imersão e decomposição, além de resistir aos traumas de alta energia (JOBIM *et al.*, 2008).

Em estudos com regiões específicas de tecidos dentários, resultados quantitativos demonstraram o sucesso de extração de DNA nos tecidos da dentina e da polpa de elementos dentários, sendo a região com maior quantidade de DNA foi o terço médio da raiz (SWEET, 1998).

Para que se obtenham amostras de DNA a partir de elementos dentários é necessário que os mesmos passem pelo processo de pulverização. Esse método tem como resultado partículas com tamanhos e formas diversas, com diferentes homogeneidades que irão influenciar diretamente na potencialidade de aplicação dos métodos de extração. A forma como os tecidos dentais são pulverizados influencia diretamente na capacidade da amostra de servir para a área de identificação humana (PAPINI, 2003).

Os elementos dentários são os órgãos mais duráveis do corpo humano, sendo capazes de resistir a temperaturas altíssimas. Sendo assim, em alguns casos, apenas eles serão encontrados para que sejam feitos os exames necessários. Mesmo com a presença de apenas pequenos fragmentos de dentes, pode-se realizar exames microscópicos que mostram características ímpares sobre aquele indivíduo.

Apesar de ser uma amostra indicada em casos forenses de identificação, a extração de DNA de tecidos mineralizados exige métodos laboriosos, onerosos e de longo tempo de processamento. O método considerado *standard-gold* leva em consideração a pulverização completa do dente em equipamento de moinho criogênico por ação eletromagnética (Freezer mill®), no qual a amostra de dente ou osso fica imersa em nitrogênio líquido (- 180°C) durante ciclos de três a cinco minutos, de acordo com o protocolo Sweet e Hildebrand (1998). A pulverização criogênica apesar de apresentar resultados práticos na perícia de identificação humana pelo perfil genético, algumas desvantagens podem ser apontadas, como o alto custo de aquisição do equipamento importado, despesas constantes face a necessidade periódica de renovação dos estoques de nitrogênio líquido em botijões, e também, o tempo de licitação e condições especiais na logística de transporte e armazenamento do material.

Na literatura atual, há escassez de estudos comparativos que abordem as propriedades físicas das partículas pulverizadas através de diferentes métodos. Tendo em vista que já existe um protocolo validado e reconhecido internacionalmente, onde ocorre a pulverização dos elementos dentários a partir do Freezer mill® (PAPINI, 2003).

No que diz respeito às propriedades físicas, trabalhos com materiais inertes mostram que o diâmetro dos grãos é um pré-requisito fundamental para o processamento envolvendo amostras pulverizadas, visto que influencia diretamente nas características dos materiais. O tamanho da partícula também determina a distância entre elas em uma dispersão (SILVEIRA,

2006). Levando esses conceitos para a técnica de extração de DNA, subentende-se que, em tese, quanto menor a área superficial e o diâmetro da partícula, maior o potencial de aplicação para obtenção de DNA, uma vez que o grão entra em maior contato com a solução de extração.

Diante da ausência de estudos na literatura de métodos alternativos ao Freezer mill® com resultados experimentais com eficiência de amplificação de marcadores STRs iguais ou superiores, a presente pesquisa objetiva analisar e comparar as propriedades físicas das partículas obtidas da pulverização com moinhos de bolas.

Sendo a quantidade e a qualidade do material genético extraído condições que dependem do método de processamento e pulverização dos tecidos dentários, considera-se que novos métodos de pulverização poderiam ser implantados nos serviços de identificação no país, nos serviços privados e públicos do país para substituir, como método pericial substituto ao uso do Freezer mill®.

Logo, frente à elevada quantidade de cadáveres não identificados de crimes comuns ou de situações de desastre de massa a introdução de métodos alternativos de processamento e pulverização do dente poderiam aumentar a eficiência da extração de DNA e, por sua vez, tornar o processo de identificação com amostras de dente e osso mais célere e menos oneroso para sua implantação universal nos serviços de identificação humana dos Institutos de Medicina e Odontologia Legal no Brasil, transpondo, assim, um dos principais obstáculos para o sucesso da genotipagem forense e ampliação de casos resolvidos a partir de amostras dentárias no Rio Grande do Norte e demais Estados do país.

Assim, dada às elevadas taxas de homicídio, inquéritos policiais inconclusos e perícias de identificação humana sem solução, pesquisas nessa área tem grande impacto na resolução de crimes e combate à impunidade, principalmente, devido à parceria de pesquisas científicas desenvolvidas em instituições de ensino superior com institutos de medicina e odontologia legal, Seja pela incorporação de novos métodos pela perícia, seja pela solução dos casos, questões fundamentais na perícia forense. Sendo assim, o estudo se faz necessário devido a sua possibilidade de contribuir para a instação de uma técnica alternativa a qual irá diminuir parte dessa problematização e conseqüentemente aumentar a resolução de casos não concluídos.



## REVISÃO DE LITERATURA

Foi em 1869 que aconteceu a descoberta do ácido desoxirribonucéico. Até então não se conhecia a estrutura do DNA e nem como se dispunha a sua configuração. Atualmente, sabemos que as duas cadeias polinucleotídicas são complementares. O DNA possui informações da célula em si e principalmente da sua relação com as demais. A identificação a partir do DNA é um dos métodos mais confiáveis de identificação humana (FARIA, 2011).

A extração de DNA pode ser feita a partir de vários tecidos do corpo. O sangue é considerado o melhor material, porém diversos outros meios podem ser utilizados como, por exemplo: células da mucosa oral, fios de cabelo, ossos carbonizados e dentes (VIEIRA; TAVARES; BOUCHARDET, 2010).

Devido a alta resistência a degradação, em casos onde os corpos não encontram-se em bom estado, os elementos dentários são utilizados para identificação. Também existe a possibilidade de não ser possível realizar a identificação por meio da arcada dentária, sendo assim a análise do DNA é uma excelente opção, pois mesmo em casos que o dente esteja fragmentado, ainda assim é possível fazer a coleta (MANJUNATH *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado em Bogotá, foi feita uma avaliação de diferentes tecidos dentais como fontes de DNA. A amostra foi de 20 elementos retirados de corpos sem identificação enterrados no Cemitério Central em 1995 e exumados em 2000. Foram avaliados a polpa, dentina e cemento. Utilizando alta rotação a polpa foi exposta, removida e processada. A dentina e o cemento foram obtidos também por meio da alta rotação e colocados separadamente em tubos de ensaio. Foi concluído após as análises que os cementoblastos e odontoblastos localizados dentro do cemento e dentina por estarem rodeados pela matriz mineral da estrutura dental tornam-se protegidos da degradação ambiental, o que os torna fontes adequadas para a análise de DNA (MALAVER; YUNIS, 2003).

Segundo o estudo de Higgins *et al.* (2015) um dos desafios para a análise de DNA de cadáveres é o grau de conservação do corpo. Nesse estudo foi feita a extração do DNA de 150 elementos dentários humanos (molares) em intervalos *pós-mortem* curtos. Mostrou que a dentina e a polpa tiveram a sua integridade estrutural afetadas, sendo a polpa o tecido que mais se afetou com a ação do tempo, estando totalmente degradada. O trabalho concluiu que o cemento de elementos dentários enterrados pode ser usado como fonte confiável para extração do DNA, devido a sua pouca mudança estrutural com o passar do tempo.

Para a extração de DNA é necessário que a amostra seja transformada em pó. Nesse estudo de Pajnič *et al.* (2016) foram analisados 25 restos de esqueletos atuais e 25 restos de esqueletos antigos. Os resultados mostraram que apenas 0,05g de pó de osso ou de dente já são suficientes para sucesso na recuperação de DNA.

Devido à alta resistência dos tecidos dentários ao ambiente externo, quando os métodos convencionais de identificação não são aplicáveis, o DNA pode ser extraído dos dentes desses indivíduos e através de uma comparação com familiares ou fontes colhidas antemortem, a identificação é feita. Quando os tecidos do corpo se decompõem, as estruturas do esmalte, a dentina e a polpa ainda persistem. É necessário extrair o DNA dos tecidos mineralizados e o método mais empregado é por meio do moinho criogênico (SWEET, 1998).

O estudo de SWEET (1998) retrata um caso de um esqueleto adulto que recebeu um tratamento restaurador extenso, porém sua identificação não foi possível ser feita por meio desses dados devido a falta de arquivos que mostrassem evidências sobre o tratamento executado para que fosse feita uma comparação. O método escolhido para a identificação por foi meio de DNA. Foi realizado a extração de DNA do esqueleto e também dos elementos dentários. A técnica de pulverização foi pela moagem criogênica. Os resultados foram comparados com exames citológicos obtidos de registros médicos. Concluiu-se então que o DNA de ambas as amostras eram da mesma fonte.

Os dentes são indiscutivelmente uma boa fonte de DNA, porém pode ser fragmentado em várias regiões diferentes e é importante determinar se existe uma quantidade de DNA significativa em todas as regiões do dente. Por isso, este estudo buscou quantificar o DNA existente em cada região do elemento dentário. Os resultados mostram que existe uma quantidade significativa de DNA em todas as regiões de um dente, por isso é justificável sim a extração de DNA de fragmentos dentários, mesmo que pequenos. Sendo o corpo radicular a região com melhor rendimento (GAYTMENN; SWEET, 2003).

Qualquer processo de moagem objetiva diminuir um material sólido em menores partículas possíveis. A moagem através do Moinho Excêntrico de Bolas é um processo bastante utilizado e pode ocorrer em ambiente seco ou úmido, de forma intermitente ou contínua. Em um estudo realizado com Areia, Calcita, dolomita e Feldspato, a moagem obteve amostras com granulometrias que variavam de 4 a 12 mm e afirmou que materiais mais duros são mais difíceis de moer. (RIBEIRO; ABRANTES, 2001).

O estudo que utilizou fígado bovino pulverizado pelos dois tipos de Moinho (Criogênico e de Bolas) realizou uma análise da micro homogeneidade e concluiu que o Moinho de Bolas gerou partículas mais homogêneas, porém o Moinho Criogênico obteve

partículas com menor diâmetro. (NOMURA; OLIVEIRA, 2006)

Outro estudo sobre Incorporação de lama e granito em massas argilosas, utilizou o moinho de bolas para trituração de argila e granito e a amostra obtida foi passada em peneira de 60 mesh para homogeneização das partículas, e resultou em 90% delas apresentando diâmetros inferiores a 32,8  $\mu\text{m}$ . (SILVA, et. Al, 2005)

Em um estudo sobre cinzas de iodo com adição de concreto foi utilizado o Moinho de Bolas de duas maneiras. A Primeira delas utilizou uma amostra de 20kg, moída por 30 minutos e o resultado foi passado por uma moneira de #200. A outra foi uma amostra de 5kg moída por 24h com uma rotação de 33 RPM. Verificou-se que o diâmetro médio das cinzas incineradas e moídas por 24h em moinho de bolas é de 10,42  $\mu\text{m}$ , enquanto que o processo de 30 minutos resultou em partículas de diâmetro 19,31 $\mu\text{m}$ . (GEYER, 2001)

Um outro estudo sobre amido para produção de biscoitos artesanais, utilizou o moinho de bolas como auxiliar. A moagem do trigo foi realizada por meio de boinho de barras e moinho de bolas por 60 minutos. Esse estudo deixou claro que a dureza do grão de trigo é um fator muito influenciador para o tempo de moagem. (GUTKOSKI. et al. 2007)

O moinho de bolas atende satisfatoriamente demandas laboratoriais. É um dispositivo que está em uso há muito tempo, possui poucas margens de contaminação, ótima qualidade de moagem e a sua produção é um processo de baixo custo e de manutenção fácil. É um equipamento capaz de diminuir a granulometria de inúmeros materiais sólidos. Nesse estudo foram inseridos 200g de Prata em pó e após 24h de moagem o pó apresentou granulometria inferior à 15  $\mu\text{m}$ , atingindo parâmetros adequados para aplicações tecnológicas. (PAULA. et al. 2014)

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL:**

- Realizar a pulverização de elementos dentários humanos por meio de dois métodos diferentes.

### **OBJETIVO ESPECÍFICO:**

- Analisar e comparar as partículas de elementos dentários pulverizados pelos métodos Freezer mill® e Moinho de Bolas quanto ao diâmetro das partículas.

## MATERIAL E MÉTODOS

### NATUREZA DO ESTUDO

Trata-se de um estudo individuado, laboratorial e de acurácia.

### CENÁRIO DA PESQUISA

A pesquisa foi realizada parte dela no Laboratório de Mecânica do Curso de Pós-graduação em Ciência e Engenharia de Materiais (PPGCEM) da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN aonde foram feitos os ensaios com o moinho de bolas e Laboratório de DNA Forense da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), São Paulo - SP, aonde foram feitos os ensaios com o Freezer mill®.

### CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DE EXCLUSÃO

- Inclusão: Elementos dentários (molares) hígidos de indivíduos humanos adultos, maiores de 18 anos de idade, obtidos através de cirurgia oral por indicação de tratamento odontológico (terceiros molares, tratamento ortodôntico e/ou dentes com mobilidade grau III);
- Exclusão: Elementos dentários (molares) com reabsorção radicular; seccionados por broca cirúrgica; cariados ou restaurados.

### TAMANHO DA AMOSTRA

Total de 6 elementos dentários (molares), sendo 6 hemi-dentes submetidos ao método de Freezer mill® e 6 hemi-dentes submetidos ao método de moinho de bolas, resultando assim, em 12 corpos de prova (CP). Os dentes foram coletados em postos de saúde aleatórios sem identificação do doador. O tamanho da amostra considerada deve-se aos custos elevados da pesquisa experimental na área de engenharia de materiais e de DNA forense, e, também, no fato de que estudos comparativos de propriedades físicas dos biomateriais não utilizam amostras grandes, visto que podem ser controladas variáveis sexo, idade e tipo de dente. Ademais, foram analisados e comparados os resultados do mesmo par de hemi-dentes utilizados em cada um dos dois métodos.

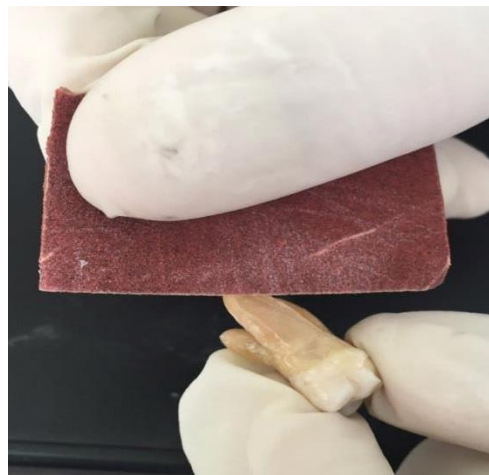
## PROCESSAMENTO DA AMOSTRA

As faces dentárias e região de furca foram limpas com curetas periodontais e lixadas (lixa Red:Wood® de granulação P60, P80 e P220) a fim de remover fisicamente os contaminantes. As amostras foram separadas em coletores transparentes estéreis Petnor Pack®. Posteriormente foram lavadas em água destilada e deixadas para secar dentro do próprio recipiente a temperatura ambiente. Após isso, os dentes foram imersos em seus próprios recipientes em álcool etílico 70 INPM Itajá® deixados para secar a temperatura ambiente no mesmo recipiente de acordo com o protocolo modificado de Malever e Yunis (2003).



**Figura 1:** Limpeza da amostra com Curetas Periodontais afiadas.

**Fonte:** Acervo da própria autora



**Figura 2:** Limpeza das superfícies dentárias com Lixa.

**Fonte:** Acervo da própria autora

Cada elemento foi seccionado em dois hemi-lados utilizando broca diamantada (Microdont®, 3195) em alta rotação refrigerada, sendo os com sufixo *.a* referente a pulverização com Freezer mill® Spex 6750 e os com *.b* referente a pulverização com Moinho de Bolas. Os elementos dentários foram pesados quando inteiros e após a seccção utilizando balança de precisão Pocket Scale®.



**Figura 3:** Elemento dentário sendo seccionado com alta rotação.  
**Fonte:** Acervo da própria autor



**Figura 4:** Pesagem de um Hemi-dente.  
**Fonte:** Acervo da própria autora

## PULVERIZAÇÃO COM MOINHO EXCÊNTRICO DE BOLAS

As amostras foram quebradas em pequenos pedaços para que o processo de moagem fosse facilitado. A quebra do hemi-dente foi feita em recipiente de cerâmica.



**Figura 5:** Tamanho aproximado após a quebra do hemi-dente.

**Fonte:** Acervo da própria autora

Foram inseridas, no jarro de cerâmica, cada amostra individualmente, 6 bolas pequenas, 1 bolas média e uma quantidade de 10ml de álcool 70%. O jarro foi fechado com sua respectiva tampa e posicionado no Moinho de Bolas (BP Engenharia modelo CB2®, Campinas, Brasil). A pulverização acontece em temperatura inferior a 60° Celsius, com velocidade de 30rpm, por duas horas. Os pós do dente foram pesados em balança de precisão Pocket Scale® e armazenados no mesmo recipiente. O Moinho Excêntrico de Bolas é destinado principalmente a moagem de pós. Esse processo acontece por fricção, por isso devem-se utilizar bolas de cerâmica de tamanhos variados.





**Figura 6:** Bolas de Cerâmica utilizadas para moagem.  
**Fonte:** Acervo da própria autora



**Figura 7:** Moinho Excêntrico de Bolas.  
**Fonte:** Acervo da própria autora

## PULVERIZAÇÃO COM FREEZER MILL®

Essa técnica permite a pulverização do elemento dentário imerso em nitrogênio líquido, por 3 minutos cada ciclo utilizando o moinho criogênico Freezer mill® Spex 6750 (SPEX CertPrep® Freezer Mill, Stanmore, London, UK) segundo o método de Sweet e Hildebrand (1998).

### CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para a caracterização das amostras foi analisada a granulometria média das partículas através do uso de Peneiras de Análise Granulométrica da marca Bronzinox®. Foram usadas duas peneiras com Malha Mesh de 150 e 200 consecutivamente. encaixadas e tampadas, foram posicionadas no agitador de peneiras por 4 minutos para que o pó passasse pelas malhas sem pressão.



**Figura 8:** Agitador com as Peneiras acopladas.  
**Fonte:** Acervo da própria autora

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir do programa IBM SPSS Statistics (versão 21.0; IBM Corp., Armonk, NY) e considerando um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) os dados foram analisados. Inicialmente, as amostras foram representadas de forma descritiva para os dados relacionados às pesagens antes e após a pulverização das mesmas. Para verificação da distribuição normal dos dados foram utilizados os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. A partir desta etapa, foi selecionado o teste não-paramétrico de Mann-Whitney para comparação das variáveis obtidas pela pesagem nas amostras dos dois tipos de pulverização analisados.

## CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Anteriormente à realização da pesquisa, o projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, de acordo com a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde e APROVADO com Número do Parecer 2.040.424.

## RESULTADOS

Os elementos dentários foram pesados quando hígidos e após a secção. Durante a secção ocorre uma perda de estrutura devido ao uso da alta rotação, por isso a soma dos pesos não coincide com o peso inicial. Após os seus respectivos processos de moagem, as amostras foram também pesadas antes da análise granulométrica.

Na tabela 1, podem ser observados os valores obtidos na pesagem dos dentes antes e após a secção em hemi-dentes, com os valores absolutos e percentuais de acordo com o peso inicial.

**Tabela 1** - Pesagem da amostra em gramas antes e após a secção.

Dente	Hígido (g)	Hemi-dente a (%)	Hemi-dente b (%)
1	1.2	0.4 (33,3)	0.5 (41,6)
2	2.2	0.8 (36,3)	1.2 (54,5)
3	1.5	0.5 (33,3)	0.8 (53,3)
4	2.1	0.9 (42,8)	1.2 (57,1)
5	2.2	1.1 (50,0)	1.0 (45,4)
6	1.7	1.0 (58,8)	0.6 (35,2)

**Fonte:** Tabela feita pela própria autora

A perda média após a moagem foi de 9,5% do peso. O elemento que obteve maior percentual de perda durante o processo de secção foi o Dente 1, com uma perda de 25,1%, muito provavelmente por ser o primeiro elemento a ser submetido a secção. Os demais elementos apresentaram perdas menores.

A seguir, a tabela 2 mostra a pesagem das amostras pulverizada pelo Freezer Mill® em números absolutos e percentuais que passaram ou não pelas peneiras de 150 e 200 Mesh.

**Tabela 2:** Quantidade da amostra pulverizada pelo Freezer Mill® antes e após passarem nas peneiras.

Hemi-dente	Peso Inicial (g)	Peneira 150 Mesh (g)/%	Peneira 200 Mesh (g)/%	Não passou (g)/%
1.a	0.4	0.1 (25,0)	0.1 (25,0)	0.1 (25,0)
2.a	0.8	0.4 (50,0)	0.1 (12,5)	0.1 (12,5)

<b>3.a</b>	0.5	0.2 (40,0)	0.2 (40,0)	0.1 (20,0)
<b>4.a</b>	0.6	0.4 (66,6)	0.1 (16,6)	0.1 (16,6)
<b>5.a</b>	0.8	0.2 (25,0)	0.4 (50,0)	0.2 (25,0)
<b>6.a</b>	0.7	0.1 (14,2)	0.5 (71,4)	0.1 (14,2)

**Fonte:** Tabela feita pela própria autora

De acordo com a Tabela 2 a média da porcentagem do peso das amostras que passou pela peneira de 150 mesh é de 36,8% e a da peneira de 200 Mesh é de 35,9% do peso inicial da amostra. Enquanto que a média do que não passou em nenhuma das peneiras é de 18,8%.

Na tabela 3, pode ser observada a quantidade da amostra pulverizada pelo Moinho de Bolas (em gramas) que passou ou não pelas peneiras de 150 e 200 Mesh, mediante dados de pesagem absolutos e percentuais.

**Tabela 3:** Peso das amostras pulverizadas no Moinho Excêntrico de Bolas antes e após passarem nas peneiras.

<b>Hemi-dente</b>	<b>Peso Inicial</b>	<b>Peneira 150 Mesh</b>	<b>Peneira 200 Mesh</b>	<b>Não passou</b>
	<b>(g)</b>	<b>(g)/%</b>	<b>(g)/%</b>	<b>(g)/%</b>
<b>1.b</b>	2.4	1.3 (54,1)	0.5 (20,8)	0.6 (25,0)
<b>2.b</b>	2.6	0.5 (19,2)	0.1 (3,8)	1.7 (65,3)
<b>3.b</b>	1.9	0.3 (15,7)	0.1 (5,2)	1.0 (52,6)
<b>4.b</b>	2.0	0.4 (20,0)	0.2 (10,0)	1.2 (60,0)
<b>5.b</b>	2.0	0.5 (25,0)	0.1 (5,0)	1.1 (55,0)
<b>6.b</b>	1.6	0.4 (25,0)	0.1 (6,2)	0.9 (56,2)

**Fonte:** Tabela feita pela própria autora

De acordo com a Tabela 3 a média da porcentagem do peso das amostras que passou pela peneira de 150 mesh é de 26,5% e a da peneira de 200 Mesh é de 8,5% do peso inicial da amostra. Enquanto que a média do que não passou em nenhuma das peneiras é de 52,3%.

A tabela 4 apresenta os resultados que foram obtidos com o teste de Mann-Whitney, considerando valor de  $p < 0,005$ . Os dados representam a comparação das medianas das variáveis de pesagem (peso inicial, peneira de 150 Mesh, peneira de 200 Mesh e partículas que não passaram nas respectivas peneiras) com o tipo de pulverização empregada. De acordo

com o teste realizado, foi encontrada diferença estatisticamente significativa no peso inicial e nas partículas que não passaram para o Freezer Mill, que apresentou valores de mediana menores nos respectivos pesos.

**Tabela 4:** Valores das medianas obtidas para as variáveis relacionadas à pesagem das amostras de acordo com o tipo de pulverização.

	Moinho de Bolas (Mediana / Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> )	Freezer Mill® (Mediana / Q <sub>25</sub> - Q <sub>75</sub> )	valor de <i>p</i>
Peso inicial (g)	2,00 (1,82-2,45)	0,65 (0,47-0,80)	<b>0,002</b>
Peneira de 150 Mesh(g)	0,45 (0,37-0,70)	0,20 (0,10-0,80)	0,026
Peneira de 200 Mesh(g)	0,15 (0,10-0,27)	0,10 (0,10-0,42)	0,699
Não passou (g)	1,05 (0,82-1,32)	0,10 (0,10-0,12)	<b>0,002</b>

**Fonte:** Tabela feita pela própria autora

## DISCUSSÃO

O decorrer do estudo apresentou alguns contratemplos que dificultaram a realização de todas as análises antes previstas para a amostra. Trata-se de um estudo que necessitou de mão de obra especializada, local e materiais extremamente específicos para realização das etapas laboratoriais, além de que parte da pesquisa foi realizada fora do estado, e por conta disso houveram atrasos que acarretaram na impossibilidade de algumas etapas antes desejadas.

O moinho escolhido foi o Excêntrico de Bolas, pois ele é o indicado para moagem de amostras que necessitem ter uma granulometria mais fina (SAMPAIO; FRANÇA; BRAGA, 2007).

Sobre as propriedades físicas, os estudos revelam que o tamanho da partícula determina a distância entre elas na dispersão (PAPINI, 2003). Com isso, aplicando esse conceito no processo de extração de DNA, entendemos que quanto menor o diâmetro da partícula, maior o potencial de aplicação para obtenção de DNA, pois o grão vai estar em maior contato com a solução de extração.

A análise da granulometria foi realizada por meio da utilização de peneiras com diâmetros diferentes. A peneira de 200 Mesh possui uma abertura menor (0,074mm) do que a peneira de 150 Mesh (0,105mm), por isso, se a amostra passar, mesmo que pouca quantidade pela peneira mais fina significa que o processo de moagem possui o resultado esperado, ou seja, possui o diâmetro desejado (PAJNIČ *et al.*, 2016).

O Moinho de Bolas em sua atividade com matérias-primas convencionais de seu uso, como areia, argila, etc., resulta em amostras com granulometrias que variam de 4 a 12 mm, o que é consideravelmente uma espessura maior do que as obtidas na moagem dos elementos dentários (0,074 e 0,105mm). Com isso, é notório que a granulometria obtida pelo processo de moagem dos elementos dentários com o Moinho de Bolas obteve uma amostra fina como o esperado. (RIBEIRO; ABRANTES, 2001)

O estudo de NOMURA E OLIVEIRA (2006) concluiu que o moinho de bolas gerou partículas com mais homogeneidade, enquanto que o Moinho Criogênico gerou partículas menores. Comparando com o presente estudo, o Moinho Criogênico obteve uma maior porcentagem da amostra passando pela peneira mais fina de 200 Mesh (35,9%) se comparado com o Moinho Excêntrico de Bolas (8,9%).

No estudo de SILVA *et al* (2005) as massas argilosas com granito após a moagem, foram passadas pela peneira de 60 mesh e 90% da amostra apresentou diâmetro inferior a 32,8 µm, enquanto que no presente estudo 26,5% passou pela peneira de 150 mesh e 8,5% passou pela peneira mais fina de 200 mesh.

Segundo GEYER (2001) em seu estudo onde o Moinho de Bolas foi utilizado de duas formas diferentes, o primeiro método onde a moagem durou 24h o diâmetro médio das cinzas foi de 10,42  $\mu\text{m}$  e no segundo processo que durou cerca de 30 minutos as partículas tinham o diâmetro de 19,31  $\mu\text{m}$ . No presente estudo onde 26,5% da amostra que foi moída pelo Moinho Excêntrico de Bolas passou pela peneira de 150 mesh, ou seja, tem em média 0,105mm e mais 8,5% possui aproximadamente 0,074mm.

O estudo de GUTKOSKI (2007) fala sobre a trituração de trigo para obtenção de amido para posterior produção de biscoitos. Ele conclui falando que a dureza do grão de trigo é um fator influenciador para o tempo de moagem. Podemos aplicar isso no presente estudo, pois sabemos que os elementos dentários possuem durezas diferentes e talvez isso deva ser levado em conta na hora de determinar quanto tempo durará a moagem do elemento, pois assim como os grãos de trigo, quando mais duro for o dente, mais tempo será necessário para chegar ao objetivo.

Diante dos resultados obtidos nessa pesquisa, observamos que em ambos os processos de moagem, as amostras obtiveram o diâmetro considerado bom para extração de DNA, inclusive com gramaturas aproximadas na maioria dos casos.

As amostras pulverizadas pelo moinho de bolas possuem naturalmente um aumento no seu peso inicial após a moagem devido ao incremento de partículas de cerâmica durante o processo. Essa informação explica o fato de uma maior quantidade da amostra, com relação ao Freezer Mill®, não ter passado em nenhuma das peneiras. Vale lembrar que essa informação também justifica o fato do peso inicial da amostra não coincidir com o peso após a moagem.

Vale salientar que o processo de moagem utilizando Moinho de Bolas torna o processo de identificação bem menos oneroso do que o realizado pelo Freezer Mill®, visto que a construção de um Moinho de Bolas é um processo de baixo custo e que não necessita de manutenções caras, assim como mostra o estudo de PAULA (2014).

O procedimento executado pelo moinho criogênico é um procedimento muito caro e que dificulta a sua realização atualmente em solo brasileiro, visto que o maior problema considerado, que é a utilização de nitrogênio líquido durante o processo, é uma etapa eliminada e substituída pela moagem através do atrito das bolas de cerâmica. Essa pesquisa visa promover meios alternativos para extração de DNA, que facilitem a sua execução, barateando o processo, tornando-o mais rápido e sem necessidade de insumos, podendo assim ser realizado em Instituições de Ensino e nos Institutos de Medicina e Odontologia Legal no Brasil.

Além disso, outra grande importância desta pesquisa vem das possibilidades para utilização do pó oriundo da pulverização dos dentes. Existem diversas outras possíveis



aplicações e destinos para esse pó, como por exemplo, a utilização para criação de biomateriais com distintas finalidades. A Incrementação de uma amostra orgânica e natural nos diversos tipos de materiais odontológicos é uma possibilidade para a criação de materiais com propriedades o mais semelhantes possível com o natural e isso pode ser uma excelente via para utilização dessa matéria.

## CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, conclui-se que ambos os processos de moagem resultam em pós com granulação semelhante. Portanto, a pulverização por meio do Moinho Excêntrico de Bolas é um método que produz partículas com granulação semelhante ao Moinho Criogênico.

Sugere-se que mais estudos nessa área sejam feitos para aperfeiçoar o processo e analisar mais propriedades físicas do pó obtido durante a moagem.

Além disso, atna-se que o pó oriundo do processo pode ter diversas aplicações na criação de materiais dentários, necessitando também de mais estudos para o surgimentos de possíveis biomateriais.

## REFERÊNCIAS

- BUTTLER, J. M. **Fundamentals of Forensic DNA Typing**. USA: Elsevier Academic Press, 2010.
- DOLINSKY, L. C.; PEREIRA, L. M. C. V. DNA Forense. **Saúde & Ambiente em revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 11-22, jul./dez. 2007.
- FARIA, L. C. B. **Existências de Códigos Corretores de Erros e Protocolos de Comunicação em Sequências de DNA**. 2011. 296 f. Tese (Doutorado em Telecomunicações e Telemática) – Faculdade de Engenharia Elétrica e de Computação, Universidade Estadual de Campinas, Campinas – SP, 2011.
- GAYTMENN, R.; SWEET, D. Quantification of Forensic DNA from Various Regions of Human Teeth. **Journal of Forensic Sciences**. Florida, v. 48, n. 3, p. 622-625, mai. 2003.
- HIGGINS, D. *et al.* Differential Nuclear and Mitochondrial DNA Preservation in Post-Mortem Teeth with Implications for Forensic and Ancient DNA Studies. **Plos One**, Estados Unidos, v. 10, n. 5, p. 1-17, mai. 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126935>>. Acesso em: 01/02/2018.
- JOBIM M. R. *et al.* Novos testes de DNA na investigação de paternidade com suposto pai falecido. **RT/Fasc. Civ.** São Paulo, ano 97, v. 874, p. 55-69, ago. 2008.
- MALAVAR, P. C.; YUNIS, J. J. Different Dental Tissues as Source of DNA for Human Identification in Forensic Cases. **Croatian Medical Journal**. Croácia, v. 44, n. 3, p. 306-309, jun. 2003.
- MANJUNATH, B. C. *et al.* DNA profiling and forensic dentistry – a review of the recent concepts and trends. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, Inglaterra, v. 18, n. 5, p. 191-197, jul. 2011.
- PAJNIČ, I. Z. *et al.* Highly efficient automated extraction of DNA from old and contemporary skeletal remains. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, Inglaterra, v. 37, p. 78-86, jan. 2016.
- RIBEIRO, M. J. P. M; ABRANTES, J. C. C. Moagem em Moinho de Bolas: Estudo de algumas variáveis e otimização energética do processo. **Cerâmica Industrial**. Portugal, 2001.
- SILVA, J. B. *et al.* Incorporação de lama de mármore e granito em massas argilosas. **Cerâmica 51**. Natal-RN, 2005.
- GEYER, A. L. B; Contribuição ao estudo da disposição final e aproveitamento da cinza de lodo de estações de tratamento de esgotos sanitários como adição ao concreto. Portalegre, 2001. 238 pág. Tese de Doutorado.
- GUTKOSKI, L. C. *et al.* Efeito do teor de amido danii→ • cado na produção de biscoitos tipo semi-duros. **Ciências Tecnol. Aliment**. Campinas, 2007.

PAULA, L. F. et al. Diretrizes para construção de um moinho de bolas para moagem de sólidos em laboratórios. **Quim Nova**. Uberlândia, Vol 37, No 4, 736-739,2014)

NOMURA, C. S; OLIVEIRA, P. V. Preparação de amostra de fígado bovino e estudo de micro homogeneidade para a determinação de cd e pb por espectrometria de absorção atômica com atomização eletrotérmica e amostragem direta de sólido. **Quim Nova**. São Paulo, Vol. 29, No. 2, 234-239, 2006.

PAPINI, C. J. **Estudo comparativo de métodos de determinação do tamanho de partícula**. 2003. 129 f. Dissertação (Mestrado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

PRETTY, I. A.; SWEET, D. A look at forensic dentistry – Part 1: The role of the teeth in the determination of human identity. **British Dental Journal**, Inglaterra, v. 190, n. 7, p. 359-366, mai. 2001.

SAMPAIO, J. A.; FRANÇA, S. C. A.; BRAGA, P. F. A. **Tratamento de minérios: práticas laboratoriais**. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 2007.

SCHWARTZ, T. R. *et al*. Characterization of Deoxyribonucleic Acid (DNA) Obtained from Teeth Subjected to Various Environmental Conditions. **Journal of Forensic Sciences**. Florida, v. 36, n. 4, p. 979-990, ago. 1991.

SILVEIRA, E. M. S. Z. S. F. Odontologia legal: a importância do DNA para as perícias e peritos. **Saúde, Ética & Justiça**. São Paulo, v. 11, n. 1/2, p. 12-18, 2006. Disponível em: <[www.revistas.usp.br/sej/article/download/43832/47453](http://www.revistas.usp.br/sej/article/download/43832/47453)>. Acesso em: 01/02/2018.

SWEET, D.; HILDEBRAND, D. Recovery of DNA from Human Teeth by Cryogenic Grinding. **Journal of Forensic Sciences**. Florida, v. 43, n. 6, p. 1199-1202, dez. 1998.

TORNAVOI, D. C.; SILVA, R. H. A. Rugoscopia palatina e a aplicabilidade na identificação humana em odontologia legal: revisão de literatura. **Saúde, Ética & Justiça**. São Paulo, v. 15, n. 1, p. 28-34, 2010. Disponível em: <[www.revistas.usp.br/sej/article/download/45760/49352](http://www.revistas.usp.br/sej/article/download/45760/49352)>. Acesso em: 01/02/2018.

VIEIRA, G. S.; TAVARES, C. A. P.; BOUCHARDET, F. C. H. Análise de DNA em Odontologia Forense. **Arqu Bras Odontol**. Minas, v. 6, n. 2, p. 64-70, mai./ago. 2010.