

# AVALIAÇÃO CRONOLÓGICA DE MANCHAS DE SANGUE SOBRE TECIDOS TÊXTEIS VIA ESPECTROFOTOMETRIA DE COR E LAVAGEM ENZIMÁTICA

**ANTONIO AUGUSTO CANELAS NETO**

POLÍCIA FEDERAL - BRASÍLIA/DF

**ANTÔNIO AUGUSTO ULSON DE SOUZA**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA



## RESUMO

Manchas de sangue são um dos vestígios mais importantes para a investigação forense. Permitem rápido reconhecimento visual de um crime, reconstruções e grande facilidade na extração de perfis genéticos. Com base nas pesquisas, vêm-se buscando novas aplicações deste vestígio para a Criminalística. Uma das mais promissoras é o tempo desde o depósito (TDD) da mancha de sangue. Métodos diversos têm sido sugeridos em vários institutos de pesquisa do mundo, mas os resultados têm apresentado pouco emprego prático para o Perito Criminal. Uma nova forma de abordar o problema é sugerida no presente estudo pela avaliação espectrofotométrica de tecidos com sangue como, por exemplo, as vestes da vítima. Esta nova abordagem permite a utilização da amostra também em um processo de lavagem enzimática, parametrizando o TDD pela resistência à remoção desta mancha. Espectrofotômetros de última geração são capazes de criar banco de dados e transformar espectros em equações matemáticas, interpolando-as. A correlação do TDD através da medição da alteração da cor da mancha de sangue pelo uso de espectrofotometria ao longo de uma cinética de lavagem enzimática é inovadora, aumentando as hipóteses de medição sobre as amostras, ao contrário de pesquisas tradicionais em espectrofotometria que se utilizam apenas de uma leitura.

**PALAVRAS-CHAVE:** Tempo desde o depósito. Local de crime. Perícia Criminal. Criminalística. Espectrofotometria.

## **1. INTRODUÇÃO**

Os vestígios de sangue encontram-se, frequentemente, associados aos crimes violentos. Existem inúmeras formas de utilizar este fluido como vestígio, mas há uma variável, que se destaca em termos de relevância sobre a resolução de um caso, e que a cada dia tem se tornado uma real possibilidade para as ciências forenses: o tempo desde o depósito (TDD).

O TDD se refere ao tempo decorrido de uma mancha de sangue do momento que se forma até o momento de sua coleta para análise. Na maioria dos casos, tal estimativa é indicativo do próprio tempo do crime. Uma estimativa desta natureza possui aplicabilidade na verificação de provas, na confrontação de depoimentos ou mesmo no direcionamento de hipóteses investigativas.

A estimativa do TDD de uma mancha de sangue é considerada por alguns pesquisadores um elemento promissor na investigação (ZADORA; MENŽYK, 2018), (BREMNER *et al.*, 2012). Por décadas, na verdade, métodos de obtenção desta cronologia têm sido apresentados pela comunidade científica. Bergmann *et al.* (2017) relatam a existência de estudos nesta temática desde o ano de 1901.

Em termos práticos, porém, resultados destas pesquisas ainda indicam a necessidade de maior estudo das variações do sangue frente ao ambiente que o rodeia, e da melhor compreensão de seu mecanismo de desnaturação quando fora do corpo humano (BREMNER *et al.*, 2012), (ZADORA; MENŽYK, 2018)

Neste contexto, faz-se necessária uma visão pragmática quanto à realidade da implementação de um método para estimativa do TDD, que seja factível de ser utilizado nos mais diversos rincões deste país. Isto leva a se considerar que métodos, demasiadamente custosos e de natureza muito elaborada, ocasionariam, na prática, pouca probabilidade de implementação.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 O FLUIDO SANGUE

#### 2.1.1 PROPRIEDADES FÍSICAS DO SANGUE

O sangue é um fluido composto de uma complexa mistura de células, enzimas e proteínas. Sua função principal é transportar oxigênio através do corpo, regular a temperatura e o sistema imunológico. Um ser humano possui entre 6-8% de seu peso em volume de sangue (SHARMA; KUMAR, 2018). A parte sólida do sangue é composta essencialmente por hemácias (células vermelhas), leucócitos (células brancas) e plaquetas. Hemácias ocupam cerca de 99,9% destes sólidos e 45% do volume total do sangue. A parte líquida, denominada plasma, ocupa os outros 55%. O plasma é constituído, essencialmente, de 90% de água e 10% de proteínas e sais inorgânicos (ZADORA; MENŻYK, 2018).

O sangue possui viscosidade quatro vezes maior que a água à mesma temperatura. Em condições normais, sua viscosidade é alterada pela tensão de cisalhamento, temperatura e percentual de hemácias (KOLBASOV *et al.*, 2016). Ao tentar evitar uma hemorragia, ou mesmo quando fora do corpo humano, o sangue sofre uma reação bioquímica complexa denominada coagulação. Fatores de coagulação contidos no plasma interagem com as plaquetas da parte sólida do sangue originando uma massa gelatinosa, o coágulo. O plasma, sem seus fatores de coagulação (proteínas e sais), passa, então, a receber a denominação de soro.

#### 2.1.2 INTERAÇÃO DO SANGUE COM O OXIGÊNIO

A hemoglobina é uma proteína contida no interior das hemácias que transporta o oxigênio e o gás carbônico dentro do corpo humano. Também é o cromóforo responsável pela cor vermelha do sangue. É constituída de quatro subunidades de polipeptídeos: duas  $\alpha$  e duas  $\beta$ , onde em cada uma destas subunidades existe um composto orgânico chamado de heme, uma protoporfirina com um átomo de ferro no centro (ZADORA; MENŻYK, 2018).

Dentro de um corpo humano saudável, moléculas de hemoglobina estão presentes em duas formas: sem oxigênio, denominadas desoxihemoglobina (Hb), e saturadas com oxigênio, denominadas oxi-hemoglobina (HbO<sub>2</sub>). Na circulação sanguínea, parte do sangue (1%) sofre autooxidação em meta-hemoglobina (Met-Hb) quando então é reduzido novamente em desoxihemoglobina, através de uma enzima, citocromo b5, contida no sangue. Quando fora do corpo humano, porém, o HbO<sub>2</sub> se satura com o oxigênio contido no ar ambiente. Pela ausência da enzima citocromo b5, a meta-hemoglobina não consegue se reduzir novamente em desoxihemoglobina, ocasionando sua desnaturação para o Hemicromo (HC). A Figura 1 apresenta uma simplificação da cinética de reação da hemoglobina dentro e fora do corpo humano (BREMNER; NADORT; *et al.*, 2011).

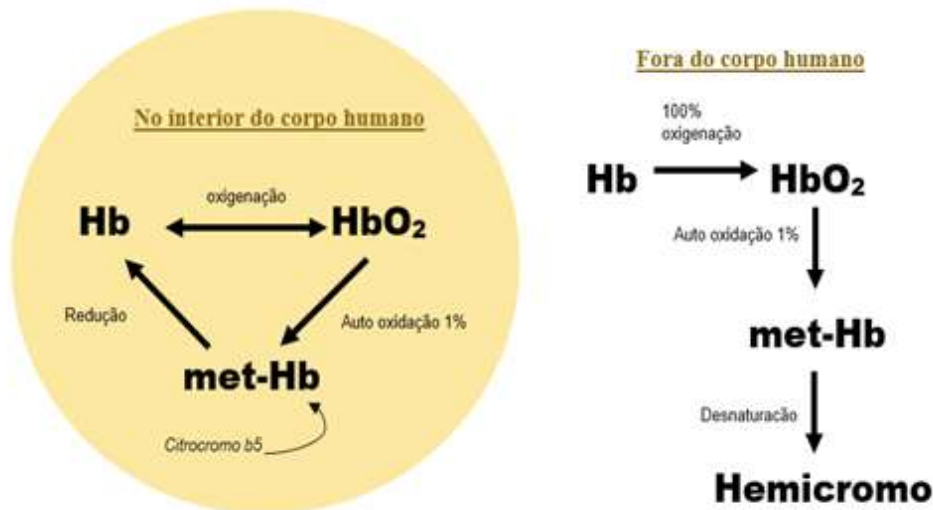


Figura 1 Simplificação da cinética de reação da hemoglobina dentro e fora do corpo humano (adaptado de BREMMER *et al.*, 2011).

Uma vez que a forma de interação com a luz se altera, a depender da forma como cada um destes grupos heme interage com o oxigênio, é possível verificar uma mudança de coloração da mancha de sangue no decorrer do tempo, passando de vermelho escuro para vermelho marrom, marrom-violeta e, finalmente, cinza (SCHWARZACHER, 1930). Esta mudança também ocasiona alterações em outras propriedades físicas do sangue tais como seu comportamento magnético e viscoelástico (BREMNER *et al.*, 2012), (ZADORA; MENŽYK, 2018), (CAVALCANTI; SILVA, 2019).

Bremmer & De Bruin *et al.* (2011) relatam que a reação de oxidação da oxi-hemoglobina ocorre em duas fases antes de se desnaturar para hemicromo (figura 2).

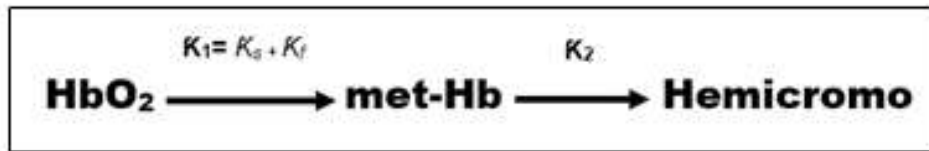


Figura 2 Reação de oxidação da oxi-hemoglobina em duas fases (BREMNER; DE BRUIN; *et al.*, 2011).

Segundo estes autores, os componentes  $K_f$  e  $K_s$  da constante  $K_1$  são relacionados à velocidade de oxidação da cadeia  $\alpha$  da hemoglobina, mais rápida ( $K_f$ ), e da cadeia  $\beta$ , mais lenta ( $K_s$ ). Relatam que as constantes de velocidade  $K_1$  e  $K_2$  sofrem acréscimo com o aumento da temperatura, mas possuem efeitos distintos frente à umidade relativa. Na conversão de  $\text{HbO}_2$  para  $\text{Met-Hb}$ , a umidade em nada afeta a cinética. Todavia, os autores relatam que a quantidade de  $\text{Met-Hb}$  aumenta com a elevação da umidade relativa e ocasiona um decréscimo de hemicromo, um indicativo de que a constante  $K_2$  diminui com o aumento da umidade relativa. Após alguns exames, Bremmer & De Bruin *et al.* (2011) concluem que, ao se elevar ao limite a umidade relativa (100%), não haverá formação de hemicromo. Este efeito também já havia sido relatado por Tsuruga *et al.* (1998).

## 2.2 TÉCNICAS DE ESTIMATIVA DO TEMPO DESDE O DEPÓSITO (TDD)

Ao contrário do que muitos possam pensar, métodos de estimativas do tempo de depósito não visam apresentar uma resposta numérica e absoluta para a justiça ou para a investigação, mas sim direcionar a respeito de hipóteses cronológicas distintas e possíveis. A técnica de desnaturação do sangue, como parâmetro de medição de tempo, possui aplicabilidade forense mais abrangente do que as avaliações do tempo de morte da medicina legal porque, dentre outras coisas, o sangue é encontrado em outros crimes com emprego de violência e não somente em homicídios. Bremmer *et al.* (2012) e Morta (2012) utilizam em suas revisões a divisão dos métodos de TDD em grupos classificados de acordo com a composição do sangue.

### **2.2.1- TÉCNICAS BASEADAS NO USO DOS LEUCÓCITOS**

O número de células brancas e plaquetas é bem inferior no sangue que o número de células vermelhas. Sua principal função é contribuir para o sistema imunológico e, no caso das plaquetas, para a coagulação. Células brancas contêm DNA e RNA. Embora o DNA se mantenha praticamente estável na mancha de sangue, o RNA se degrada com o passar do tempo. Isto tem sido explorado na determinação do TDD por pesquisadores da área. ANDERSON *et al.* (2005) foram um dos primeiros a propor este estudo, através das espécies  $\beta$ -actina mRNA e 18S rRNA, que sofrem degradações diferentes. A  $\beta$ -actina sofre ação do meio ambiente, enquanto o marcador 18S rRNA se encontra protegido dentro da estrutura ribossômica sendo menos factível à degradação. O uso de marcadores genéticos para estimativa do TDD estão longe de serem esgotados. Courts & Madea (2010), Zhao *et al.* (2017), Alshehhi *et al.* (2017) e Fu *et al.* (2019) também utilizaram esta abordagem em suas pesquisas.

### **2.2.2 TÉCNICAS BASEADAS NO USO DO PLASMA**

O plasma consiste em 90% de água somado a algumas proteínas, como albumina, globulina, hormônios e fatores de coagulação. Estas proteínas se degradam com o transcorrer do tempo quando fora do corpo humano, sendo, por isso, mensuradas na estimativa de TDD. Ackermann *et al.* (2010) estudaram marcadores bioquímicos como a melatonina e cortisol, que possuem decaimentos distintos na mancha de sangue no transcorrer do tempo. Mc Shine *et al.* (2017) apresentam um método para estimativa do TDD através do tempo de fluorescência do aminoácido triptofano contido no plasma. Segundo estes autores, mudanças na maioria das proteínas ocorrem após o depósito da mancha de sangue, o que reduz sua fluorescência com o tempo. Seok *et al.* (2018) também propõem o uso de HPLC com espectrometria de massa durante o período de 21 dias, relatando que cinco metabólitos como o L-tryptofan e a ergotioneína são identificados com sucesso na cronologia de desnaturação. Já Agudelo *et al.* (2016) propõem estimativas de TDD baseadas no teor de fosfatase alcalina contida no soro do sangue.

### 2.2.3- TÉCNICAS BASEADAS NO USO DAS HEMÁCIAS

Hemácias fazem parte do maior número de sólidos no sangue seco, sendo, talvez por conta disso, o componente do sangue mais estudado nas técnicas de estimativa do TDD.

A hemoglobina contida nas hemácias, quando ausente de ligação com oxigênio (Hb), possui ferro na forma bivalente ( $Fe^{2+}$ ). Quando ligada ao oxigênio, na forma  $HbO_2$ , apresenta ferro na forma bi e trivalente ( $Fe^{2+}$ ;  $Fe^{3+}$ ). Estes átomos de ferro possuem ressonância eletrônica paramagnética. Quando  $HbO_2$  se auto oxida em Met-Hb, o sangue se desnatura para a forma HC, que possui fraca ligação com oxigênio, mantendo o ferro na forma trivalente. Este processo de desnaturação é acompanhado por mudança em absorção da luz, e mudança de configuração do spin da molécula de ferro (BREMNER; NADORT; *et al.*, 2011).

#### 2.2.3.1 TÉCNICAS DE HPLC (*HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY*)

O método de separação por cromatografia líquida, HPLC, possibilita separar e quantificar os componentes do sangue, incluindo os derivados da hemoglobina. Através da quantificação da degradação dos produtos heme das manchas de sangue e a interrelação desta degradação com o tempo de retenção de inúmeras proteínas, através de uma leitura óptica de vários comprimentos de onda, possibilita a avaliação do TDD (INQUE *et al.*, 1992), (ANDRASKO, 1997).

#### 2.2.3.2 ELETRODOS DE OXIGÊNIO

Segundo Matsuoka *et al.*(1995), a quantidade de  $HbO_2$  em manchas de sangue pode ser estimada usando eletrodos de oxigênio. O princípio de baseia em dissolver a mancha de sangue em uma solução salina, imprimindo nesta solução uma corrente elétrica. Através de um analisador de oxigênio é possível, segundo os autores, medir o teor de oxigênio contido na amostra e estabelecer os teores de  $HbO_2$ , met-Hb e Hb.

### **2.2.3.3 RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA NUCLEAR (RPN)**

A desnaturização da hemoglobina que ocorre no sangue seco é também governada pela mudança do estado spin do íon ferro. Manchas de sangue possuem quatro sinais típicos que detectam variações ao utilizar esta técnica, tais como Hb, HbO<sub>2</sub>, met-Hb e HC permitindo a avaliação cronológica do depósito da mancha de sangue (MIKI; KAI; IKEYA, 1987), (SAKURAI *et al.*, 1989), (FUJITA *et al.*, 2005).

### **2.2.3.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)**

A microscopia de força atômica se baseia em um escaneamento de alta resolução sobre uma amostra suportada em uma base fixa de modo que através de uma oscilação de uma sonda móvel, que escaneia a superfície da amostra, é possível mapear propriedades morfológicas e nanomecânicas da mancha de sangue. As variações destas propriedades, tais como a viscoelasticidade, se alteram com o tempo a contar do momento que o sangue está fora do corpo humano e isto pode ser mensurado como um medidor de TDD (WU *et al.*, 2009), (SMIJS; GALLI; VAN ASTEN, 2016), (CAVALCANTI; SILVA, 2019).

### **2.2.3.5 ESPECTROMETRIA**

Por ser um método pouco invasivo, de baixo custo e capaz de interagir com a cinética de oxidação da hemoglobina, a espectrometria tem sido a ferramenta mais frequentemente utilizada em pesquisas desta área.

Doty *et al.* (2017) e Takamura *et al.* (2019) propõem o uso da espectrometria Raman somado aos métodos estatísticos na determinação do TDD, onde a desnaturação de hemicromos é identificada com relativa facilidade frente a sua cinética. Takamura *et al.* (2019) analisaram os espectros Raman frente às variações de três temperaturas, também determinando a cinética de desnaturação da hemoglobina, e inferindo que, caso a temperatura não seja uma constante, a cronologia das manchas pode ser estimada com base na integração da equação de referência com o tempo.



Outros métodos de espectrometria são apresentados no espectro visível (HANSON; BALLANTYNE, 2010), (SUN *et al.*, 2017), no ultravioleta (HANSON; BALLANTYNE, 2010), (SHINE *et al.*, 2017) e no infravermelho (MAJDA *et al.*, 2018). Todos se baseiam na absorção, transmitância ou refletância da mancha de sangue na forma sólida ou mesmo diluída em relação a um comprimento de onda incidente, sendo o objetivo principal verificar o comportamento da hemoglobina em suas mais diferentes formas de oxidação.

A espectrometria, na verdade, é o mais antigo método registrado na história. Bergmann *et al.* (2017) relatam pesquisas com espectro de cores desde 1901. Foi Schwarzacher (1930), por exemplo, quem primeiro relatou a influência da luz solar sobre o envelhecimento das manchas de sangue analisando sua mudança de cor. Kind *et al.* (1972) apresentaram um trabalho bastante abrangente para a época e baseado em estudos anteriores de Patterson (1960) e de Schwarzacher (1930). Os autores mensuraram as influências da temperatura, umidade, e luz incidente do ambiente experimental sobre as manchas de sangue, além da influência de sua espessura. Criaram um fator  $\alpha$  que se relaciona a picos de absorção das cadeias  $\alpha$  (576nm) e  $\beta$  (541nm) da hemoglobina, uma espécie de adimensional comparativo da oxidação da hemoglobina com o tempo. O uso do fator  $\alpha$  por Kind *et al.* (1972) foi novamente citado em revisões recentes por Bergmann *et al.* (2017), Sharma & Kumar (2018) e Zadora & Menzyk (2018). Hanson *et al.* (2010) também apresentam um marcador de estimativa do TDD denominado banda azul no UV-VIS (412nm), visto que esta banda sofre mudanças de intensidade com o tempo.

Zadora & Menzyk (2018), através de uma revisão mais recente da área, reconheceram o esforço no desenvolvimento de métodos de estimativa de TDD e indicam que avanços de metodologia na espectrometria têm se mostrado mais promissores desde a revisão de Bremmer *et al.* (2012). Sugerem, para os futuros trabalhos, acompanhamento detalhado da cinética de desnaturação da hemoglobina e de como estas variações são influenciadas, tanto pelo suporte da mancha de sangue como pelas intempéries do ambiente.

### **3. DISCUSSÃO**

Com base na maioria dos métodos propostos de TDD até o ano de 2012, Bremmer *et al.* (2012) produziram uma revisão onde também apresentam uma discussão a respeito da eficácia de alguns destes métodos. Concluíram que os desvios padrões apresentados ainda possuíam valores altos para serem aplicados no uso forense. Os autores justificam estes desvios pelo fato de muitas destas técnicas ainda se encontrarem em processo de validação e alertam que poucas variações das intempéries sobre as manchas de sangue foram estudadas.

Em revisões posteriores ao ano de 2012, realizadas por Sharma & Kumar (2018) e Zadora & Menzyk (2018), verifica-se, nas pesquisas da área, um cuidado maior na variação das intempéries sobre as manchas de sangue. Os autores apresentam algumas ressalvas sobre alguns procedimentos como, por exemplo, a coleta de amostras de sangue com suabe de algodão umedecido, visto que a umidade altera o processo de desnaturação da meta-hemoglobina e pode ocasionar erros de estimativa (BREMNER; DE BRUIN; *et al.*, 2011).

Zadora & Menzyk (2018) indicam um crescimento em métodos espectrométricos nos últimos anos, inferindo ser esta uma tendência natural, visto que a interação matéria e radiação eletromagnética facilita a medição de características químicas e físicas das substâncias. Apresentam uma listagem de todos os dezesseis métodos espectrométricos utilizados em TDD entre 2011-2017, registrando o principal elemento monitorado por cada método, seus resultados e suas metodologias. Alertam para desafios novos, neste tipo de pesquisa, pela melhor percepção das influências do suporte da mancha de sangue sobre o espalhamento dos comprimentos de onda incidentes. Da mesma forma que Bremmer *et al.* (2012), sugerem comparações entre suportes não absorventes e absorventes em pesquisas futuras.

De uma maneira global, pode-se inferir que a estimativa de TDD de uma mancha de sangue é um trabalho complexo quando se leva em conta o número de variáveis envolvidas em sua determinação. Técnicas com elevada reprodutibilidade e consequente controle de parâmetros ambientais, acessibilidade, praticidade e baixo custo são os principais

desafios das pesquisas na área. Certamente, métodos com possibilidade de averiguação “in loco” para o Perito Criminal ocuparão um papel de destaque frente a métodos de análise mais demorados ou complexos.

A espectrofotometria parece ter grande vantagem, pela sua simplicidade, eficiência e custo relativamente baixo, se comparado com tratamentos mais sofisticados. Espectrômetros portáteis também são uma realidade nos dias de hoje e indicam perspectiva real de exames “in loco” para estimativa do TDD. A espectrometria se baseia nas variações de absorção, transmitância, vibração e reflectância das diferentes subunidades da hemoglobina que, por sinal, constitui 97% em massa do sangue seco (BREMNER; NADORT; *et al.*, 2011). Esta proteína, em seus mais diversos estados de oxidação, é sensível à incidência dos mais variáveis tipos de comprimentos de onda, indicando, portanto, grande afinidade com métodos espectrométricos (HANSON; BALLANTYNE, 2010), (SUN *et al.*, 2017), (SHINE *et al.*, 2017), (MAJDA *et al.*, 2018).

#### **4. PROPOSIÇÃO: TDD VIA ESPECTROFOTOMETRIA DE COR E LAVAGEM ENZIMÁTICA**

Durante uma ocorrência criminosa com violência é bastante comum a verificação de sangue em tecidos têxteis, principalmente nas vestes da vítima, embora possa também ser encontrado em locais físicos distintos do fato, como em roupas de suspeitos ou estofados de veículos. A coleta de tecidos com sangue, portanto, é uma maneira estratégica de se buscar provas e estabelecer correlações. Tecidos saturados com sangue também permitem a remoção do substrato (sangue) pelo simples recorte e sem uso de superfícies intermediárias, como suabes.

Por possuir características físicas mensuráveis, tecidos possuem boa parametrização de espessura da mancha e da área em contato com o oxigênio do ar e com a irradiação de luz. A coleta de tecidos saturados com sangue permite o estabelecimento de outra metodologia de estimativa de TDD, que não somente a leitura por espectrometria da amostra encontrada, mas também após um pré-tratamento como a lavagem enzimática, sendo esta uma nova rota objeto desta pesquisa.

Desde os experimentos de dissolução de manchas de sangue em água por Schwarzarcher (1930), sabe-se que o sangue tem menor solubilidade neste solvente à medida que envelhece. Wu *et al.* (2009) também verificaram que a força de adesão das hemácias é dependente do tempo e aumenta significativamente após sete dias. No estudo de eficiência de produtos e máquinas de limpeza, manchas de sangue têm sido empregadas como parâmetro. Equações de cinética de lavagem são estudadas neste setor frente a índices de remoção da sujidade em tecidos (BUENO *et al.*, 2019). A empresa europeia WFK, por exemplo, desenvolve produtos têxteis contendo sujidades padrão, incluindo, em seu portfólio de produtos, tecidos impregnados com manchas de sangue de dois diferentes tempos de depósito (WFK, 2019).

Bueno *et al.* (2019) relatam, através de um trabalho de eficiência em máquinas de lavar roupa, que a sujidade pode ser medida por um índice de remoção denominado SRI (“Stain Removal Index”), obtido por espectrofotometria de cor. As resistências à transferência de massa destas sujidades são equacionadas em regiões intrafios e interfios do tecido.

Já o uso de enzimas na formulação de detergentes mostra seletividade, eficiência, e menor agressão às fibras dos tecidos (VASCONCELOS *et al.*, 2006), (VERMELHO; BRANQUINHA, 2008), (NIYONZIMA; MORE, 2015). Testes utilizando enzimas proteáticas com detergentes na remoção de manchas de sangue foram realizados em pesquisas desenvolvidas por Jellouli *et al.* (2011), que confirmaram excelente seletividade na remoção deste substrato.

Trazendo estes conhecimentos para a área forense, não é difícil vislumbrar que o espectro de cor, encontrado em tecido saturado com sangue e coletado em um local de crime, pode ter o mesmo tratamento científico de leitura, antes e após uma cinética de lavagem enzimática, sem prejuízo de outras medidas de espectrometria. Cria-se, assim, não somente uma leitura do tecido da forma como encontrado no local do crime, mas também nova medição cronologicamente relacionada ao tempo de depósito, como aquela relacionada com a adesividade do sangue após uma lavagem enzimática. A criação prévia de um banco de dados para espectros de manchas de sangue a diferentes temperaturas, nível de irradiação de luz e umidade relativa serviria como base de comparação para as amostras obtidas em campo.

Espectrofotômetros de última geração são capazes de ler cores em superfícies sólidas com grande precisão. Após equacionar matematicamente estas medidas, softwares integrados são capazes de organizá-las em um banco de dados com até 5.000 espectros. Este software é capaz de realizar comparações, consultas e combinação destas equações matemáticas na elaboração de novas cores, na busca de cores similares a uma amostra e, inclusive, estimar cores intermediárias entre duas ou mais semelhantes (MANUAL INSTRUÇÃO KONICA MINOLTA, 2011).

## 5. CONCLUSÕES

O estudo de cronologia de depósito de manchas de sangue é considerado uma das estimativas mais almejadas pela comunidade forense, contendo relatos desde o ano de 1901. Tal interesse se justifica porque o domínio de uma técnica desta natureza permite ao examinador melhor estimativa da realidade de um crime, no que se refere ao tempo decorrido, auxiliando a investigação criminal na obtenção de provas e averiguação de depoimentos. O resultado, em métodos de medição do tempo desde o depósito (TDD) do sangue, é similar ao que propõe a medicina legal com o tempo de morte, mas muito mais abrangente, visto que uma mancha de sangue não precisa da presença de um corpo, não ocorre apenas em casos de homicídio e nem, necessariamente, precisa ser encontrada, somente, no local imediato do crime.

As técnicas relacionadas com a espectrometria se apresentam como as mais promissoras na validação desta estimativa, visto que se baseiam, em sua maioria, no comportamento de desnaturação da hemoglobina. A hemoglobina apresenta uma cinética de reação com o oxigênio do ar bem caracterizada e que ocasiona um rearranjo estrutural dependente do tempo, podendo ser quantificada por métodos espectrofotométricos. A espectrometria também é um método pouco invasivo e de possibilidades de análise mais simplificadas, inclusive com equipamentos portáteis de modo que o Perito Criminal possa utilizá-los “*in loco*”.

A avaliação espectrofotométrica de cor, após lavagem enzimática de tecidos saturados com sangue, permite a avaliação das propriedades de adesividade na remoção também relacionadas com o TDD.

Esta metodologia pode ser potencializada através da construção prévia de um banco de dados de colorimétricos padrão e espectros para estimativas do TDD da amostra coletada e da amostra após lavagem enzimática com água e tensoativos. Portanto, ao empregar este método, é possível utilizar duas medidas, com dois procedimentos distintos, sobre uma mesma amostra e para um mesmo TDD. Esta dupla medição promove maior acurácia estatística do tempo decorrido desde o depósito e, por conta disso, pode vir a estabelecer um maior rigor técnico-científico na estimativa da cronologia do crime.

**ANTONIO AUGUSTO CANELAS NETO**

DEPARTAMENTO DE POLÍCIA FEDERAL. PERITO CRIMINAL FEDERAL. MESTRE EM ENGENHARIA QUÍMICA E DOUTORANDO EM ENGENHARIA QUÍMICA. ANALISTA DE MANCHAS DE SANGUE. CERTIFICAÇÕES EM ANÁLISE DE PERFIS DE MANCHAS DE SANGUE PELA MIAMI DADE POLICE (EUA), BLUSTPÜREN INSTITUT (ALEMANHA), LOCI FORENSICS (HOLANDA) E CEDAR CREST COLLEGE (EUA). AUTOR LIVRO PERFIS DE MANCHAS DE SANGUE-DO LOCAL DE CRIME À ELABORAÇÃO DO LAUDO, ED. LURA, 1A. ED. 360P, 2017.

**ANTONIO AUGUSTO ULSON DE SOUZA**

PROFESSOR TITULAR, PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA QUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA (UFSC), PÓS-DOCTOR EM ENGENHARIA QUÍMICA PELA UNIVERSITY OF CALIFORNIA AT DAVIS-USA. AUTOR DE 171 ARTIGOS EM PERÍODOS ESPECIALIZADOS E 7 DEPÓSITOS DE PATENTES. COORDENAÇÃO DE MAIS 40 PROJETOS PESQUISA. REVISOR DE 23 PERIÓDICOS INTERNACIONAIS E 5 NACIONAIS. LÍDER DO GRUPO PESQUISA CNPQ TECTEXTIL.

# **CHRONOLOGICAL EVALUATION OF BLOOD STAINS ON TEXTILE FABRICS VIA COLOR SPECTROPHOTOMETRY AND ENZYMATIC WASHING**

## *ABSTRACT*

Bloodstains are one of the most important evidences for forensic investigation. They allow rapid visual recognition of a crime, criminal reconstruction and ease of extraction of genetic profiles. Researchers have been looking for new applications of this trace for Criminalistics. One of the most promising applications is the Time Since Deposition (TSD) of bloodstains. Various methods have been suggested by different research institutes around the world. So far, the results have shown little practical use for the criminal expert. A new approach to the problem is been suggested in the present study by spectrophotometric evaluation of bloodstain on textiles, such as the victim's cloth. This choice allows the use of this sample in a controlled enzymatic washing process, parameterizing the TSD also by the dirt removal resistance. State-of-the-art spectrophotometer software are accomplished of creating databases and transforming spectra into mathematical equations by interpolating them. The measuring of the color spectra throughout of enzymatic washing kinetics is innovative because increases the chances of measuring in the sample, unlike traditional spectrophotometric research using only one reading.

**KEYWORDS:** Time since deposit. Crime scene. Forensic Science. Criminalistic. Spectrophotometry.

# **EVALUACIÓN CRONOLÓGICA DE MANCHAS DE SANGRE EN TEJIDOS TEXTILES MEDIANTE ESPECTROFOTOMETRÍA DE COLORES Y LAVADO ENZIMÁTICO**

## *RESUMEN*

Las manchas de sangre son uno de los rastros más importantes para la investigación forense. Permiten un rápido reconocimiento visual de un delito, reconstrucciones y gran facilidad en la extracción de perfiles genéticos. Con base en la investigación, se han buscado nuevas aplicaciones de este rastro para Criminalística. Uno de los más prometedores es el tiempo transcurrido desde el depósito (TDD) de la mancha de sangre. Se han sugerido diferentes métodos en varios institutos de investigación de todo el mundo, pero los resultados han

mostrado poca utilidad práctica para el experto criminal. En el presente estudio se sugiere una nueva forma de abordar el problema mediante la evaluación espectrofotométrica de tejidos con sangre, como la ropa de la víctima. Este nuevo enfoque permite el uso de la muestra también en un proceso de lavado enzimático, parametrizando el TDD por la resistencia a la eliminación de esta mancha. Los espectrofotómetros de última generación son capaces de crear bases de datos y transformar espectros en ecuaciones matemáticas, interpolarlas. La correlación de TDD a través de la medición del cambio en el color de la mancha de sangre mediante el uso de espectrofotometría a lo largo de una cinética de lavado enzimático es innovadora, aumentando las hipótesis de medición en las muestras, a diferencia de la investigación espectrofotométrica tradicional que se utiliza solo de una lectura.

**PALABRAS-CLAVE:** Tiempo desde depósito. Escena del crimen. Pericia criminal. Criminalística. Espectrofotometría.

## REFERÊNCIAS

- ACKERMANN, K.; BALLANTYNE, K. N.; KAYSER, M.  
Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: A prospective and versatile tool for crime scene reconstruction. *International Journal of Legal Medicine*, v. 124, n. 5, p. 387–395, 2010.
- AGUDELO, J. *et al.* Ages at a Crime Scene: Simultaneous Estimation of the Time since Deposition and Age of Its Originator. *Analytical Chemistry*, v. 88, n. 12, p. 6479–6484, 21 jun. 2016. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.analchem.6b01169>>.
- ALSHEHHI, S.; MCCALLUM, N. A.; HADDRILL, P. R.  
Quantification of RNA degradation of blood-specific markers to indicate the age of bloodstains. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, v. 6, n. August, p. e453–e455, 2017.
- ANDERSON, S. *et al.* A method for determining the age of a bloodstain. *Forensic Science International*, v. 148, n. 1, p. 37–45, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.11.008>>.
- ANDRASKO, J. The estimation of age of bloodstains by HPLC analysis. *Journal of Forensic Sciences*, v. 42, n. 4, p. 601–607, jul. 1997.



- BERGMANN, T.; HEINKE, F.; LABUDDE, D. Towards substrate-independent age estimation of blood stains based on dimensionality reduction and k-nearest neighbor classification of absorbance spectroscopic data. *Forensic Science International*, v. 278, p. 1–8, set. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073817302050>>.
- BREMMER, R. H.; NADORT, A.; *et al.* Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy. *Forensic Science International*, v. 206, n. 1–3, p. 166–171, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.034>>.
- BREMMER, R. H.; DE BRUIN, D. M.; *et al.* Biphasic oxidation of Oxy-Hemoglobin in bloodstains. *PLoS ONE*, v. 6, n. 7, p. 1–6, 2011.
- BREMMER, R. H. *et al.* Forensic quest for age determination of bloodstains. *Forensic Science International*, v. 216, n. 1–3, p. 1–11, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.07.027>>.
- BUENO, L. *et al.* Modelling the kinetics of stain removal from knitted cotton fabrics in a commercial Front Loader Washing Machine (FLWM). *Chemical Engineering Science*, v. 200, p. 176–185, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ces.2019.02.008>>.
- CAVALCANTI, D. R.; SILVA, L. P. Application of atomic force microscopy in the analysis of time since deposition (TSD) of red blood cells in bloodstains: A forensic analysis. *Forensic Science International*, v. 301, p. 254–262, 2019.
- COURTS, C.; MADEA, B. Micro-RNA - A potential for forensic science? *Forensic Science International*, v. 203, n. 1–3, p. 106–111, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.002>>.
- DOTY, K. C.; MURO, C. K.; LEDNEV, I. K. Predicting the time of the crime: Bloodstain aging estimation for up to two years. *Forensic Chemistry*, v. 5, p. 1–7, set. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468170917300218>>.

- FU, J.; ALLEN, R. W. A method to estimate the age of bloodstains using quantitative PCR. *Forensic Science International: Genetics*, v. 39, n. May 2018, p. 103–108, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2018.12.004>>.
- FUJITA, Y. *et al.* Estimation of the age of human bloodstains by electron paramagnetic resonance spectroscopy: Long-term controlled experiment on the effects of environmental factors. *Forensic Science International*, v. 152, n. 1, p. 39–43, 2005.
- HANSON, E. K.; BALLANTYNE, J. A blue spectral shift of the hemoglobin soret band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains. *PLoS ONE*, v. 5, n. 9, p. 1–11, 2010.
- INQUE, H. *et al.* A new marker for estimation of bloodstain age by high-performance liquid-chromatography. *Forensic Science International*, v. 57, n. 1, p. 17–27, nov. 1992.
- JELLOULI, K. *et al.* Alkaline-protease from *Bacillus licheniformis* MP1: Purification, characterization and potential application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 6, p. 1248–1256, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.02.012>>.
- KIND, S. S.; PATTERSON, D.; OWEN, G. W. Estimation of the age of dried blood stains by a spectrophotometric method. *Forensic Science*, v. 1, n. 1, p. 27–54, 1972.
- KOLBASOV, A. *et al.* Blood rheology in shear and uniaxial elongation. *Rheologica Acta*, v. 55, n. 11–12, p. 901–908, 22 dez. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00397-016-0964-1>>.
- MAJDA, A. *et al.* Hyperspectral imaging and multivariate analysis in the dried blood spots investigations. *Applied Physics A*, v. 124, n. 4, p. 312, 15 abr. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00339-018-1739-6>>.
- MANUAL INSTRUÇÃO KONICA MINOLTA, M. CM-3600A Manual Instrução. p. 40, 2011.

- MATSUOKA, T.; TAGUCHI, T.; OKUDA, J. Estimation of bloodstain age by rapid determinations of oxyhemoglobin by use of oxygen-electrode and total hemoglobin. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 18, n. 8, p. 1031–1035, 1995.
- MIKI, T.; KAI, A.; IKEYA, M. Electron spin resonance of bloodstains and its application to the estimation of time after bleeding. *Forensic Science International*, v. 35, n. 2–3, p. 149–158, 1987.
- MORTA, W. A study on nucleic acid degradation in drying and dried bloodstains as a means to determine the time since deposition. PhD Thesis, p. 1–194, 2012.
- NIYONZIMA, F. N.; MORE, S. Detergent-compatible proteases: Microbial production, properties, and stain removal analysis. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, v. 45, n. 3, p. 233–258, 2015.
- PATTERSON, D. Use of reflectance measurements in assessing the colour changes of ageing bloodstains. *Nature*, v. 187, n. 4738, p. 688–689, 1960.
- SAKURAI, H. *et al.* Dating of human blood by electron spin resonance spectroscopy. *Naturwissenschaften*, v. 76, n. 1, p. 24–25, 1989.
- SCHWARZACHER, P. D. Determination of the Age of Bloodstains. *The American Journal of Police Science*, v. 1, n. 4, p. 374–380, 1930. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/1147182>>.
- SEOK, A. E. *et al.* Estimation of Age of Bloodstains by Mass-Spectrometry: A Metabolomic Approach. *Analytical Chemistry*, v. 90, n. 21, p. 12431–12441, 2018.
- SHARMA, V.; KUMAR, R. Trends of chemometrics in bloodstain investigations. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 107, p. 181–195, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.08.006>>.
- SHINE, S. M. *et al.* The applicability of fluorescence lifetime to determine the time since the deposition of biological stains. *Analytical Methods*, v. 9, n. 13, p. 2007–2013, 2017.

- Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6AY03099H>>.
- SMIJS, T.; GALLI, F.; VAN ASTEN, A. Forensic potential of atomic force microscopy. *Forensic Chemistry*, v. 2, p. 93–104, nov. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2468170916300443>>.
- SUN, H. *et al.* Accurate Age Estimation of Bloodstains Based on Visible Reflectance Spectroscopy and Chemometrics Methods. *IEEE Photonics Journal*, v. 9, n. 1, p. 1–14, fev. 2017. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/7814193/>>.
- TAKAMURA, A. *et al.* Comprehensive modeling of bloodstain aging by multivariate Raman spectral resolution with kinetics. *Communications Chemistry*, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s42004-019-0217-1>>.
- TSURUGA, M. *et al.* The Molecular Mechanism of Autoxidation for Human Oxyhemoglobin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 273, n. 15, p. 8607–8615, 1998.
- VASCONCELOS, A. *et al.* Detergent formulations for wool domestic washings containing immobilized enzymes. *Biotechnology Letters*, v. 28, n. 10, p. 725–731, 2006.
- VERMELHO, A.; MELO, A.; BRANQUINHA, M.; SANTOS, A.; SANTOS, D.; MASINI, C.; D'AVILA-LEVY, C.; CURI, S.; BON, E. Enzimas proteolíticas: Aplicações biotecnológicas, 2008. Disponível em: [https://www.researchgate.net/publication/233727171\\_Enzimas\\_proteoliticas\\_Aplicacoes\\_biotecnologicas](https://www.researchgate.net/publication/233727171_Enzimas_proteoliticas_Aplicacoes_biotecnologicas).
- WFK, C. WFK Testmaterials Catalogue & Prices. p. 18, 2019. Disponível em: <[www.testmaterials.com](http://www.testmaterials.com)>.
- WU, Y. *et al.* Time-dependent surface adhesive force and morphology of RBC measured by AFM. *Micron*, v. 40, n. 3, p. 359–364, 2009.
- ZADORA, G.; MENŻYK, A. In the pursuit of the holy grail of forensic science – Spectroscopic studies on the estimation of time since deposition of bloodstains. *TrAC - Trends*

*in Analytical Chemistry*, v. 105, p. 137–165, ago. 2018.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165993618300657>>.

ZHAO, H. *et al.* Identification of aged bloodstains through mRNA profiling: Experiments results on selected markers of 30- and 50-year-old samples. *Forensic Science International*, v. 272, p. e1–e6, mar. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073817300117>>.

