

Estimativa de tempo de deposição de manchas de sangue em local de crime por espectrofotometria UV-Vis

K.C. Casagrande ^a, J.C. Gandin ^b, T.Y.C. Massuda ^c

^a Bacharela em Biomedicina, Brasil

^b Perito Criminal da Seção de Crimes Contra a Pessoa da Polícia Científica do Paraná, Brasil

^c Perito Criminal da Polícia Científica do Paraná e Professor do Centro Universitário UniBrasil, Brasil

Endereço de e-mail para correspondência: ckamelyn@yahoo.com. Tel.: (41) 99665-8855

Recebido em 31/07/2018; Revisado em 03/10/2018; Aceito em 20/10/2018

Resumo

A investigação do local de crime é um dos processos mais importantes para solucioná-lo e as manchas de sangue são um dos vestígios mais comumente encontrados, pois fornecem muitas informações sobre o ocorrido. A capacidade de determinar o tempo desde a sua deposição (TSD, time since deposition) pode ser útil nos casos em que nenhum corpo é encontrado, dando informações sobre o tempo de morte ou do delito. Este estudo desenvolveu um método espectrofotométrico UV-Vis para estimar TSD de manchas de sangue empregando recursos disponíveis na Polícia Científica do Paraná. Alíquotas de 5 µL de sangue fresco foram depositados em microtubos transparentes e deixadas em repouso por tempo determinado de cada leitura. Foram coletados os fragmentos de sangue dessecados em diferentes datas, solubilizados em 1,5 mL de solução de tampão Tris-HCl pH 8,0, sonificados por 45 s e centrifugados a 13.000 rpm a -10 °C por 5 min. O sobrenadante foi transferido para cubetas descartáveis e submetidas a leitura em espectrofotômetro UV-Vis, em modo scan, na faixa de 300 a 700 nm com intervalos de 0,1 nm. Observou-se alteração no comportamento espectrofotométrico do sangue em função do TSD, especialmente em relação à área e ao deslocamento hipsocrômico da banda de Soret. O desenvolvimento desse método de estimativa de TSD de manchas de sangue por espectrometria UV-Vis é justificado pelo baixo custo operacional, simplicidade de aplicação e reduzido consumo de amostra.

Palavras-Chave: Sangue; Espectrofotometria UV-Vis; TSD; Deslocamento hipsocrômico; Banda de Soret.

Abstract

The crime scene investigation is one of the most important processes to solve it and the blood patterns are one of the most commonly found biological evidence and such evidence provide a lot of information about what happened. The capacity of to determine the time since their deposition (TSD) can be useful on cases where no one body is found, giving information about the death or offense time. That study developed an UV-Vis spectrometry method to estimate TSD of blood patterns using available resources at Scientific Police of Parana. Aliquots of 5 µL of flesh blood were deposited at plastic microtubes and left at rest by the time of each reading. The fragments of dried blood were collected on different dates, solubilized in 1.5 mL of Tris-HCl buffer solution pH 8.0, sonicated at 45 s and centrifugated at 13,000 rpm at -10 °C for 5 min. The supernatant was transferred to disposable cuvettes and read on UV-Vis spectrophotometer, at scan mode, between 300 at 700 nm with breaks of 0.1 nm. Changes in the spectrophotometric behavior of the blood were observed as a function of the TSD, especially in relation to the area and to the hypsochromic displacement of the Soret band. The development of this method of estimation of TSD of blood patterns by UV-Vis spectrometry is justified by the low operational cost, simplicity of application and reduced sample consumption.

Keywords: Blood; UV-Vis Spectrophotometry; TSD; Hypsochromic displacement; Soret band.

1. INTRODUÇÃO

Em eventos violentos (homicídio, latrocínio, suicídio), a investigação do local onde o crime ocorreu é um dos processos mais importantes para solucioná-lo, pois, geralmente se encontram muitos vestígios físicos (impressões digitais, pegadas, fibras de tecidos, armas, projéteis) e/ou biológicos (cabelo, sêmen, sangue, saliva, pelos) [1]. As manchas de sangue são um dos vestígios mais comumente encontrados [1] e sua análise é de grande importância para entender os acontecimentos [2] e até para realização de uma reprodução simulada do delito [3].

O sangue pode fornecer muita informação sobre o ocorrido e a capacidade de determinar o tempo desde a sua deposição (TSD, *time since deposition*) pode ser útil nos casos em que nenhum corpo é encontrado [3], dando informações sobre o tempo de morte ou do delito [4]. Além disso, a determinação do tempo de deposição de uma mancha de sangue pode também fornecer informações valiosas na presença de um cadáver, a fim de melhorar a precisão do tempo de morte [5].

A análise de uma mancha de sangue inclui vários passos. Em primeiro lugar, deve ser determinado se a mancha encontrada na cena do crime é realmente sangue ou outro fluido. Um segundo passo é a classificação da amostra de sangue: se é de origem humana ou animal. Para isso, um teste de sorologia, que se baseia na interação de anticorpos e antígenos nas células de sangue pode ser utilizado [5].

Os métodos espectroscópicos destinados à determinação de TSD são baseados no princípio de alteração de cor, do vermelho ao castanho, em decorrência do envelhecimento do sangue. Este efeito é observado tanto em manchas de sangue seco, como em amostras de sangue hemolisadas. O substrato responsável pela cor do sangue é a hemoglobina, seu principal cromóforo. A alteração na cor do sangue sugere uma mudança na hemoglobina (conversão da oxiemoglobina para metaemoglobina e hemicromo) [5].

A análise óptica da cor do sangue, portanto, pode ser um método valioso para se definir o TSD [3]. Hemoglobina, met-Hb e ferryl-Hb possuem diferentes características espectroscópicas. A curva espectral de absorvância de cada uma dessas espécies possui diferentes picos das bandas alfa, beta e banda de *Soret* (onde se localiza o grupo heme) na região visível do espectro (380-700 nm) [6].

A capacidade de determinar o TSD de manchas biológicas propicia aos investigadores uma nova evidência com valor probatório, estabelecendo uma aproximação do tempo da ocorrência criminal. Apesar de alguns métodos (HPLC – *high performance*, PCR-RT – reação em cadeia da polimerase em tempo real) para determinação de tempo de deposição de manchas de

sangue terem sido propostos, nenhum deles foi amplamente aceito devido à baixa sensibilidade analítica e grande consumo de amostra [7].

O presente estudo teve o objetivo de desenvolver e validar um método novo a ser empregado na rotina de peritos criminais, auxiliando em locais com ou sem a presença do cadáver. A estimativa de tempo de deposição de manchas de sangue por espectrofotometria *UV-Vis* necessita de pequena quantidade de amostra, com alta especificidade, baixa interferência química, baixo custo operacional, alta sensibilidade e reprodutibilidade e baixa toxicidade ao ambiente laboratorial.

2. MATERIAL E MÉTODO

2.1. Amostra

Foi coletada uma amostra de 1 mL de sangue venoso sem anticoagulante de um membro da equipe do IML de Curitiba, sendo ele, do gênero feminino, na faixa etária dos 20 anos, hígido e não fumante.

2.2. Preparo da amostra

Alíquotas de 5 μ L desta amostra foram depositadas em microtubos transparentes e analisadas em datas distintas (recém-coletada, uma semana, um mês, dois meses, três meses, quatro meses, cinco meses, seis meses, sete meses e oito meses), visto que, permaneceram por determinado tempo em temperatura ambiente no Laboratório de Toxicologia Forense do IML para permitir condições mais próximas das encontradas em um local de crime.

2.3. Análise da amostra

Os fragmentos dessecados de sangue foram solubilizados em 1,5 mL de solução de tampão *Tris-HCl* pH 8.0 e deixados *overnight* em repouso, sonicados na frequência de 1 MHz por 45 s (em equipamento especialmente produzido para tal propósito) e centrifugados a 13.000 rpm em -10°C por 5 min. O sobrenadante foi transferido para cubetas descartáveis de polimetilmetacrilato e submetido a leitura em espectrofotômetro Genesys 10 S, do tipo *UV-Vis*, em modo *scan*, (Thermo Scientific), na faixa de 300 a 700 nm com intervalos de 0,1 nm, no Laboratório de Toxicologia Forense da Polícia Científica do Paraná.

A amostra foi processada em diferentes momentos, totalizando dez leituras em espectrofotômetro *UV-Vis*, visto que, todos os dados foram executados em duplicata. A partir destes, foi realizado a construção de gráficos dos espectros de absorção com comprimento de ondas específicos (nm) da banda de *Soret*, oxiemoglobina, cianometemoglobina, metaemoglobina e banda α e β . Os gráficos foram analisados por comparação dos picos

espectrais gerados no programa *VISIONlite*, versão 4.0, do espectrofotômetro do IML Curitiba/PR.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O método proposto, viável para a determinação de TSD na rotina pericial, se baseia na relação direta entre a redução de área do pico referente à banda de *Soret* e daqueles picos correspondentes às cadeias α e β da hemoglobina com o envelhecimento das amostras de sangue humano. Outra variável importante observada no espectro *UV-Vis* das amostras processadas foi o deslocamento hipsocrômico (deslocamento de um comprimento de onda maior para um comprimento de onda menor) do pico correspondente a banda de *Soret*, cujo comportamento segue a mesma relação direta dos parâmetros citados acima.

O comportamento espectrofotométrico em *UV-Vis* da amostra recém-coletada e com uma semana, sobrepostos, encontra-se representado na Fig. 1, onde se observam os comportamentos citados anteriormente. Nota-se a intensa redução das bandas α e β em relação ao sangue fresco, sendo que para as amostras mais antigas, essas bandas se apresentaram de forma residual Fig. 2 e Fig. 3.

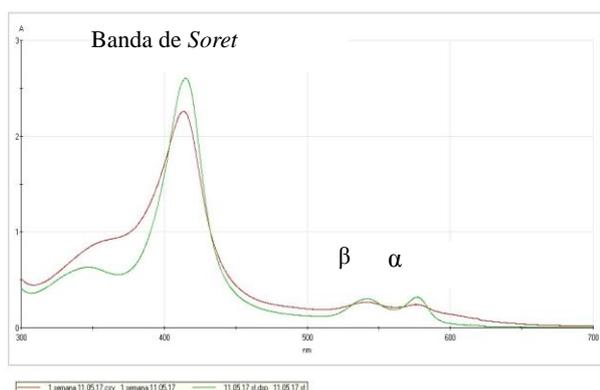


Fig. 1. Pico superior, representando a alíquota de sangue fresco e o pico inferior, o sangue datado com uma semana.

A sobreposição dos espectros obtidos a partir das alíquotas das amostras datadas com um mês, dois meses e três meses foram analisadas espectrofotometricamente e representadas através da Fig. 2, onde se observa mais claramente a redução da banda de *Soret*, bem como o deslocamento hipsocrômico desta banda, visto que as alterações relativas às bandas α e β são observados com menor intensidade entre as manchas com maior TSD.

O comportamento espectrofotométrico em *UV-Vis* do sangue em função do envelhecimento está relacionado com mudanças de estado oxidação do Fe (II) para o Fe (III) [7]. Essa alteração é a mesma que possibilita a observação a olho desarmado da mudança de coloração entre uma mancha de sangue recente e outra mais envelhecida.

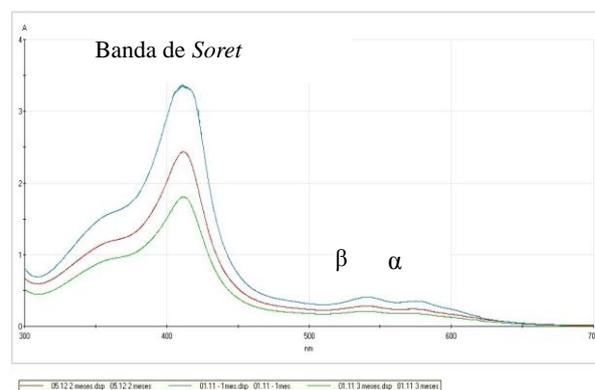


Fig. 2. Pico superior representando o fragmento de sangue dessecado datado em um mês, o pico do meio, representa o sangue com dois meses e o pico inferior, o sangue datado com três meses.

Com a análise espectrofotométrica *UV-Vis* de mais alíquotas de amostras com maiores TSDs, tornou-se mais evidente o deslocamento hipsocrômico da banda de *Soret*, conforme indicado pela Fig. 3.

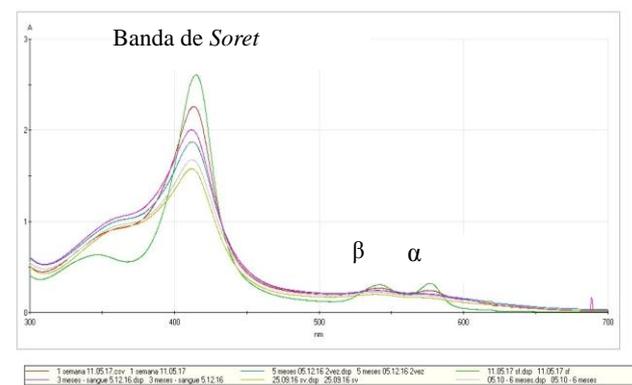


Fig. 3. Decrescentemente, em relação à amplitude do pico da banda de *Soret*: sangue fresco, uma semana, três meses, cinco meses, seis meses e oito meses, respectivamente.

A base molecular do deslocamento hipsocrômico não é esclarecida, mas alguns mecanismos podem ser levados em consideração. À medida que o TSD da mancha aumenta, podem ocorrer alterações conformacionais da proteína (perda da estrutura secundária, interrupção de ligações de hidrogênio, etc.). O grupamento heme previamente protegido pode ficar mais exposto como resultado das mudanças estruturais. A presença do oxigênio do ambiente faz com que os elétrons do Fe (II) mudem de um spin baixo para um spin alto, fazendo com que o Fe (II) fique mais suscetível à oxidação. Com o tempo, Fe (II) será então oxidado a Fe (III). Como resultado desta oxidação, a conformação de elétrons para a molécula de Fe será, portanto, alterada e pode interagir com as ligações π da estrutura do anel de porfirina da hemoglobina. Esta interação pode originar um aumento na energia das transições de π para π^* resultando assim em

pico de absorvância com comprimento de onda mais curto, ou seja, uma mudança hipsocrômica [7].

Para fins de estimativa de TSD de manchas de sangue em locais de sangue, a quantificação do deslocamento hipsocrômico se revelou mais interessante do que as reduções de amplitude dos picos evidenciados no espectro, pois tal parâmetro é absoluto, ou seja, independe da quantidade de amostra analisada de acordo com a metodologia proposta. O estudo desse parâmetro também permitiu a plotagem de um gráfico cuja curva de tendência pode ser reduzida através de uma função logarítmica ($f(x) = -0,7705\ln(x) + 414,505$) com um $R^2 = 0,98$, conforme se encontra indicado na Fig. 4, onde x representa o TSD em semanas. Através de interpolação ou reduções matemáticas, é possível inferir o TSD de uma mancha de sangue a partir do pico de absorção (em nm) da banda de Soret mensurado através do método proposto e testado no presente trabalho de pesquisa.

Como trabalho futuro, caberá o estudo das variações de parâmetros ambientais, como temperatura e umidade, verificando o quanto afetarão o grau de redução dos picos citados anteriormente e, especialmente, o deslocamento hipsocrômico da banda de Soret. Segundo Ballantyne [8], é difícil esclarecer os efeitos da temperatura e da umidade na extensão do deslocamento hipsocrômico.

No que diz respeito à temperatura, seu efeito bem caracterizado sobre as taxas de reação química (como a oxidação de Fe (II) em Fe (III)) pode explicar uma mudança maior com seu aumento. Com relação à umidade, poder-se-ia esperar que a maior adsorção de água nas estruturas da hemoglobina aceleraria a cinética química, incrementando a mudança hipsocrômica [7]. No entanto, o inverso é encontrado em que a maior umidade resulta em um menor deslocamento hipsocrômico [8]. Em um de seus estudos, Ballantyne encontrou um deslocamento hipsocrômico de 7,7 nm [7], enquanto neste estudo foi encontrado um deslocamento da banda de Soret de 2,9 nm, representado na Tab. 1, para um período de tempo equivalente. Isso se deve por questões climáticas, como citado acima, visto que o outro estudo foi realizado em regiões quentes e secas dos Estados Unidos, enquanto o presente estudo foi realizado em Curitiba, uma cidade com temperaturas consideravelmente mais baixas e com índices de umidade relativa bastante elevada. Isso impacta diretamente na cinética química, pois quanto maior for à temperatura e menor a umidade, maior será a velocidade de reação.

Portanto, tornam-se necessários mais estudos sobre a interferência direta da temperatura e umidade relativa do ar para determinação do TSD de mancha de sangue em local de crime e para isso devem ser levadas em conta as temperaturas médias e os níveis de umidade da região geográfica onde o vestígio foi encontrado para efetuar as devidas correções da curva de deslocamento

hipsocrômico representada pela Fig. 4. Isso é possível utilizando os dados fornecidos pelas redes de estações meteorológicas espalhadas pelo Brasil [9], cujas localizações se encontram representadas na Fig.5 e de modelos matemáticos e computacionais adequados.

Tab. 1. Comparativo entre o λ_{Soret} e a absorvância máxima da Banda de Soret.

TSD	λ_{Soret}	Abs.máx.Soret
Sangue Fresco	414,7 nm	2,6087
1 semana	413,7 nm	2,2602
3 meses	412,6 nm	2,0065
5 meses	412,2 nm	1,8723
6 meses	412,0 nm	1,6770
8 meses	411,8 nm	1,5789
TOTAL	2,9 nm	-

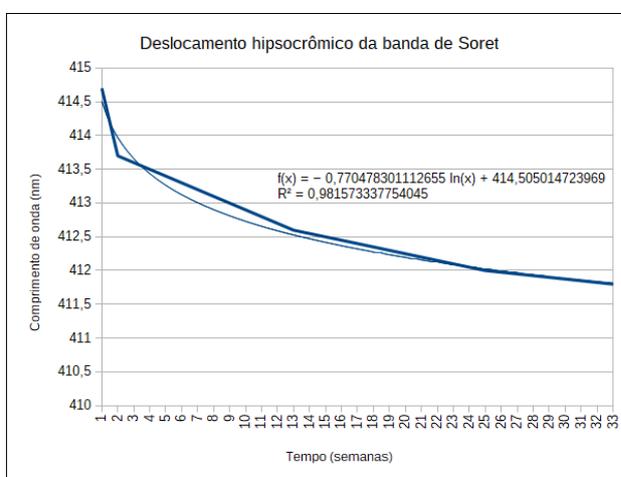


Fig. 4. Gráfico do pico de absorção da banda de Soret (em nm) das amostras em diferentes TSD (tempo em semanas) com linha de tendência evidenciando a fórmula logarítmica e o R^2 .



Fig. 5. Mapa da rede de estações meteorológicas oficiais (INMET) espalhadas pelo Brasil.

4. CONCLUSÕES

A metodologia proposta evidenciou um comportamento espectrofotométrico de amostras de sangue humano, depositados em suportes expostos a

temperatura ambiente, proporcional ao seu envelhecimento, permitindo uma possível determinação de uma curva de tendência em relação ao deslocamento hipsocrômico da banda de Soret. A equação deduzida, de ordem logarítmica, $f(x) = -0,7705\ln(x) + 414,505$ (sendo $f(x)$ em nm e x em semanas), com R^2 elevado (0,98), permite a interpolação de valores medidos para a inferência de TSD. Entretanto, torna-se necessária a realização de experimentos complementares para determinações de ordem estatística, bem como controle de variantes ambientais que afetem o comportamento espectrofotométrico das manchas de sangue em função do tempo de deposição, visando o desenvolvimento de modelos inferenciais mais eficientes e precisos, além de estender o presente estudo para a verificação de comportamentos de amostras excepcionais diversas que podem ser coletadas em locais de crime (sangue de animais domésticos, de pessoas com patologias específicas, tabagistas, etc).

5. REFERÊNCIAS

- [1] D. R. Maciel. Análise do padrão de manchas de sangue em local de crime: revisão de literatura. *Monografia de Especialização*, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2014.
- [2] J. Horswell. *The Practice of the Crime Scene Investigation*. CRC Press, 2004.
- [3] M. de Joode. *Aging Bloodstain Investigation: Biochemical and Spectrophotometric Analysis on Haemoglobin*. Acessado em: 30/07/2018, de < dare.uva.nl/document/347664 >.
- [4] P. C. Bishop. *Determination of Time Since Deposition of Blood Stains*. U.S. Department of Justice, West Virginia, 2006.
- [5] S. Grolleman. *Determination of the age of a blood drop by two spectroscopic methods*. *Dissertação de Mestrado*, University of Amsterdam, 2010.
- [6] P. Tosqui; M.F. Colombo. Uma abordagem prática de reações redox através de espectroscopia de hemoproteínas. *Rev. Brasileira de Ensino de Bioquímica e Biologia Molecular I*, 1-11, 2011.
- [7] J. Ballantyne. *Determination of the Age (Time Since Deposition) of a Biological Stain*. U.S. Department of Justice, 2009.
- [8] J. Ballantyne; E. Hanson; A. Albornoz. Validation of the hemoglobin (Hb) hypsochromic shift assay for determination of the time since deposition (TSD) of dried bloodstains. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series 3*, e307- e308, 2011.
- [9] INMET – Instituto Nacional de Meteorologia. Acessado em: 30/07/2018, de www.inmet.gov.br.