

INTRODUÇÃO AOS DESAFIOS NA ANÁLISE DO TEMPO DE DEPOSIÇÃO DE MANCHAS DE SANGUE EM DIFERENTES SUBSTRATOS

RICHARD NOGUEIRA MORAES¹; CARLA DE ANDRADE HARTWIG²; WILIAM BOSCHETTI³

¹Universidade Federal de Pelotas – richard.n.moraes@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – carlahartwig@yahoo.com.br

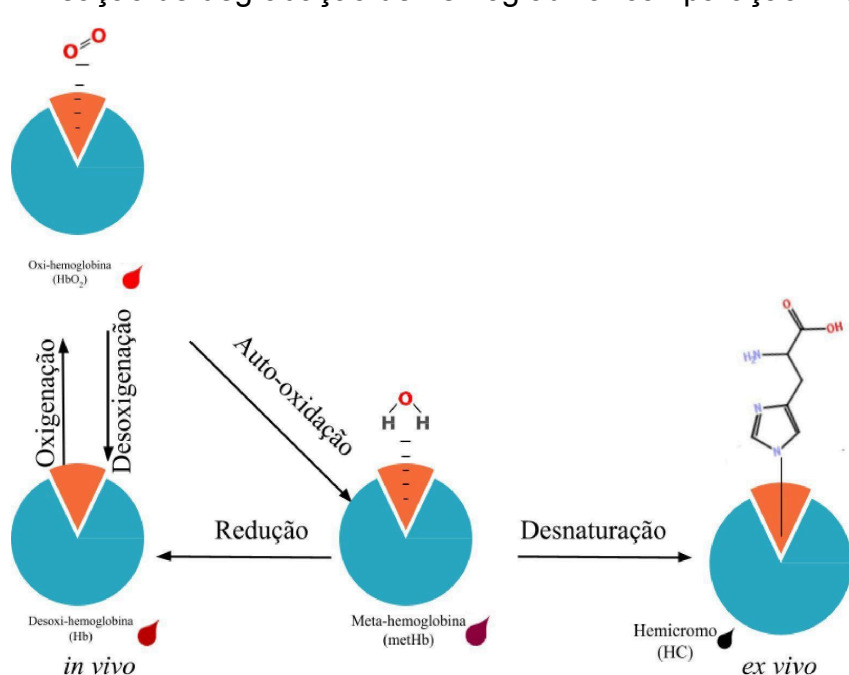
³Universidade Federal de Pelotas – wiliamcaxias@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O sangue é um dos vestígios mais encontrados em locais de crime, sendo uma amostra crítica para a ciência forense, uma vez que é uma das poucas amostras comumente encontradas em locais de crime que é amplamente empregada em análises, de modo a contribuir com uma investigação criminal (Bremmer *et al.*, 2011 e Bergmann; Labudde, 2024).

Atualmente, vem ganhando destaque a área de estudo de estimativa do tempo de deposição (TSD – *time since deposition*) de manchas de sangue, isto é, estimar há quanto tempo uma mancha de sangue foi depositada sobre um material. Algumas metodologias, tipicamente empregadas neste contexto, consistem na interpretação das mudanças na composição química da mancha em função do tempo (Bergmann; Labudde, 2024). Consequentemente, as alterações químicas das manchas de sangue, com ênfase nos derivados da hemoglobina, que são formados conforme a reação apresentada na Fig. 1, ganham importância e podem ser monitoradas através de técnicas espectrométricas. Vale destacar que a Fig. 1 traz um esquema da reação de degradação da hemoglobina com a formação de oxi-hemoglobina (HbO₂), meta-hemoglobina (metHb) e hemicromo (HC).

Figura 1. Reação de degradação de hemoglobina: comparação *in vivo* e *ex vivo*.



Fonte: Adaptado de BERGMANN *et al* (2017).

Desse modo, uma das técnicas analíticas mais tradicionais no monitoramento das transformações da hemoglobina em uma situação *ex vivo* é a espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta visível (UV-Vis) (Bergmann; Labudde, 2024). Essas espécies – HbO₂, metHb e HC, apresentam bandas de absorção características na região do visível (450-700 nm), conforme o Quadro 1.

Quadro 1. Bandas de absorção características para as espécies derivadas da hemoglobina.

Comprimento de onda, λ (nm)	Analito
626	metHb
578	HbO ₂ (cadeia α)
542	HbO ₂ (cadeia β)
537	HC
499	metHb
389	HC

Contudo, as manchas de sangue possuem uma composição química e comportamento físico complexo, por se tratar de um fluido não-newtoniano (Smith; Brutin, 2018). Além disso, em cenas de crime as manchas de sangue são expostas aos mais diversos fatores externos (Bremmer *et al.*, 2012). Entre os fatores externos mais discutidos na literatura científica estão: temperatura, umidade, incidência da luz solar e substrato (material sobre o qual a mancha de sangue é formada). Entretanto, diversos autores apontam a escassez de informações sobre como esses fatores influenciam na degradação de uma mancha de sangue (Bremmer *et al.*, 2012). Nesse sentido, Bremmer *et al.* (2012) indica a importância de conhecer como diferentes características dos substratos, a exemplo a hidrofiliidade e se são ou não adsorventes, influenciam nas manchas de sangue.

Logo, neste trabalho busca-se investigar alterações causadas por diferentes substratos na reação de degradação da hemoglobina.

2. METODOLOGIA

As amostras foram preparadas com 100 μ L de sangue ovino desfibrinado, de descarte, doadas pelo Laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl). Nesse sentido, foram elaborados grupos experimentais com três diferentes substratos: um tecido de algodão hidrofílico (absorvente), um tecido de algodão hidrofóbico (não absorvente) e um piso de porcelanato esmaltado retificado (não absorvente). As amostras de sangue foram depositadas sobre os três diferentes substratos e monitoradas ao longo de uma semana de acordo os seguintes períodos de tempo: 1 hora (h), 3 h, 5 h, 1 dia (d), 2 d, 5 d, 6 d e 7d.

Para avaliar as diferentes espécies derivadas da hemoglobina, geradas nas manchas de sangue dos 3 grupos experimentais, adaptou-se uma metodologia

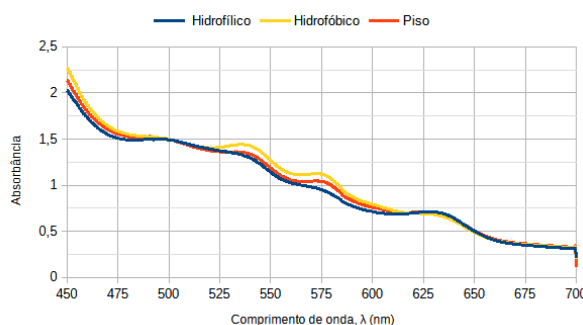
para espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-Vis (UV-M51, Bel Equipamentos Analíticos Ltda., Piracicaba, São Paulo, Brasil) proposta por Bergmann, *et al.* (2017).

As amostras de sangue em tecido de algodão foram extraídas submergindo os tecidos por 60 minutos em 5 mL de água destilada ao passo que as amostras em piso foram primeiro coletadas com *swabs* umedecidos em água destilada, adaptado de um POP (procedimento operacional padrão) da Coordenadoria Geral de Perícias e então extraídas submergindo o *swab* por 60 minutos em 3 mL de água destilada. Em seguida, as amostras foram homogeneizadas por agitador vórtex (VX-38-BI, Satra).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

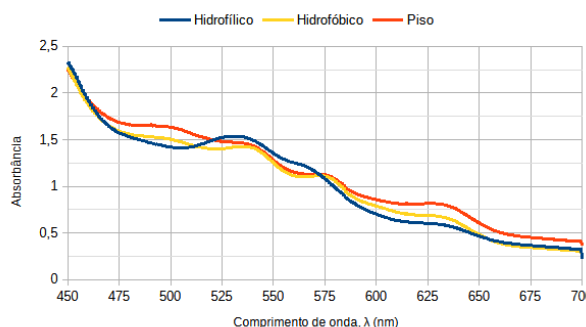
Durante o período em que se monitorou o envelhecimento (tempo de deposição) e a mudança na composição das manchas, o perfil espectral se manteve constante durante os primeiros 5 dias. Contudo, os resultados obtidos para os três grupos experimentais começaram a diferir entre si a partir do sexto dia de envelhecimento (Fig. 2). Observou-se que a mancha produzida em tecido hidrofílico passou a apresentar um perfil de baixa resolução na região dos 500 a 550 nm, característico da formação de hemicromo (HC) – espécie que caracteristicamente tem bandas sobrepostas por outras bandas (Bergmann; Labudde, 2024).

Figura 2. Perfil espectral de manchas de sangue sobre diferentes substratos com tempo de deposição de 6 dias. Os substratos foram: tecido hidrofílico (linha azul), tecido hidrofóbico (linha amarelo) e piso de porcelanato (linha vermelha).



Fonte: o autor.

Figura 3. Perfil espectral de manchas de sangue sobre diferentes substratos com tempo de deposição de 7 dias. Os substratos foram: tecido hidrofílico (linha azul), tecido hidrofóbico (linha amarelo) e piso de porcelanato (linha vermelha).



Fonte: o autor.

As diferenças notadas a partir do sexto dia se exacerbaram a partir do sétimo dia (Fig. 3). Enquanto o perfil espectral da mancha em tecido hidrofóbico se manteve constante, os demais grupos apresentaram alterações em comparação com o dia anterior. O perfil referente ao piso de porcelanato começou a apresentar um sinal semelhante ao visto no 6º dia do grupo sobre tecido hidrofílico, o qual continuou a se desenvolver, indicando uma maior formação de hemicromo (HC) – como pode ser observado pela maior intensidade da banda na região dos 530 nm.

Nesse sentido, a não observância das manchas de sangue em substrato: tecido de algodão hidrofóbico e não absorvente, sugere que as características de diferentes materiais são capazes de inibir a formação de espécies derivadas da hemoglobina, mais especificamente, o hemicromo (HC), uma vez que pode-se observar bandas referentes a oxi-hemoglobina (HbO_2 – região dos 540 e 570 nm) e meta-hemoglobina (methHb – região dos 500 e 630 nm). Esse resultado está em concordância com Bergmann, *et al.* (2017) e Gariglio, *et al.* (2024).

Entretanto, é necessário investigar os grupos experimentais por um maior período de tempo e com alto rigor experimental, além de maiores investigações com relação às características do próprio material para entender qual é a interação entre o substrato e a amostra que provoca essa inibição na reação de degradação dos derivados da hemoglobina, pois como relata Smith; Brutin (2018) as interações entre o sangue e os diferentes materiais ainda não estão esclarecidas.

4. CONCLUSÕES

Ao avaliar o efeito que diferentes substratos podem ter sobre as reações de degradação da hemoglobina, pode-se observar diferenças significativas na formação de produtos da reação de degradação, com ênfase no hemicromo (HC), cuja formação não foi constatada na superfície do grupo tecido hidrofóbico. Entretanto, são necessárias mais investigações quanto ao tempo de exposição da mancha de sangue com os substratos e com protocolos de coleta e análise por espectrofotometria de absorção molecular na região do ultravioleta-visível.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BERGMANN, T.; LABUDDE, D. Forensic Analysis of Bloodstain Color. In: SAMANTA, A. K. **Advances in Colorimetry**. Índia: IntechOpen, 2024. 4: pg. 1-16.
- BERGMANN, T. *et al.* Towards Substrate-independent Age Estimation of Blood Stains based on Dimensionality Reduction and k-Nearest Neighbor Classification of Absorbance Spectroscopic. **Forensic Science International**, Alemanha, v. 278, pg.1-8, 2017.
- BREMMER, R. H. *et al.* Biphasic Oxidation of Oxy-Hemoglobin in Bloodstains. **PLoS ONE**, Itália, v. 6. n.7, pg. 1-6, 2011.
- BREMMER, R. H. *et al.* Forensic quest for age determination of bloodstains. **Forensic Science International**, Itália, v. 216, pg. 1-11, 2012.
- GARIGLIO, S. *et al.* Determination of time since deposition of bloodstains through NIR and UV-Vis Spectroscopy – A critical comparison. **Talanta**, Itália, v. 278, pg.1-12, 2024.
- SMITH, F. R.; BRUTIN, D. Wetting and spreading of human blood: Recent advances and applications. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, França, v. 36, pg.78-83, 2018.