

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Projeto de Pesquisa de Dissertação de Mestrado
Área de Concentração: Química Analítica / Química Forense

ESTUDO DE MANCHAS DE SANGUE:
UMA ABORDAGEM FORENSE EMPREGANDO ESPECTROSCOPIA RAMAN E
FERRAMENTAS QUIMIOMÉTRICAS

Aluno: Carlos Alberto Rios
Orientador: Mariana Ramos de Almeida
Laboratório de execução: 167

Belo Horizonte
2016

1. INTRODUÇÃO

O estudo das evidências e vestígios que compõem a cena de um crime, isto é, o espaço onde ocorreu o delito, é uma das etapas essenciais de uma investigação criminal¹. A análise química de um local de crime é atribuída a química forense, área da química que utiliza técnicas e metodologias analíticas para resolução de questões legais e judiciais.

Dentre os vestígios biológicos, os mais comuns em cenas de crime são sangue, cabelo, pelos, saliva, urina e sêmen. A identificação da mancha de sangue e a determinação de sua idade têm grande valor no processo investigativo, pois de posse desses dados, pode-se determinar o momento que um crime foi cometido, se as manchas estão relacionadas com o crime ou não, se originam de um único evento ou de eventos múltiplos.

A identificação das manchas de sangue no local do delito é feita utilizando reagentes como a fenoltaleína e a tetrametilbenzidina que mudam de cor em contato com a peroxidase ou hemoglobina do sangue.^{2,3} Para a identificação das manchas invisíveis é utilizado o reagente luminol. No entanto, o uso dessas metodologias analíticas pode levar a perda da amostra inviabilizando análises futuras, e não traz nenhuma informação sobre o tempo em que o vestígio está no local.

Para Dorea (1989)⁴, é crucial que o perito garanta que todas as amostras coletadas não percam sua importância como prova material. Segundo Peschel *et al.* (2011)⁵ citado por Maciel *et al.* (2014)⁶, a utilização de métodos científicos para interpretar evidências chegando a conclusões dedutivas é a melhor forma de se obter conhecimento explícito acerca de um crime. Desse modo, é interessante o uso de técnicas analíticas que minimizem a perda de amostra e que sejam confiáveis e não-destrutíveis.

No caso de manchas de sangue, várias metodologias têm sido propostas para a determinação da idade da mancha, como cromatografia líquida de alta eficiência⁷ (HPLC), microscopia de força atômica⁸, análise de RNA⁹, medidas de reflectância na região do visível e infravermelho próximo^{10,11}. No entanto, nenhuma dessas técnicas fazem parte da rotina forense atualmente. E os motivos são a falta de validação dos métodos analíticos propostos e/ou laboriosas etapas de preparo de amostra durante a análise.^{12,13}

Dentre as técnicas analíticas empregadas na área de química forense, a espectroscopia Raman pode ser destacada, pois atende as exigências de ser minimamente destrutível e envolve pouca ou nenhuma etapa de preparo de amostra. Em vista disso, será proposta nesse trabalho como técnica analítica para o estudo de manchas de sangue juntamente com o uso de ferramentas quimiométricas para o tratamento dos dados.

1.1 SANGUE

O sangue é um fluido corporal que circula no aparelho cardiovascular e é encontrado em todo o organismo, exceto unhas e epiderme. Sua cor no organismo pode variar de vermelho vivo (sangue arterial) ao escuro (sangue venoso). Possui pH em torno de 7,5 e ao ser observado no microscópio, mostra ser uma mistura de componentes sólidos (glóbulos brancos, vermelhos e plaquetas) e um componente líquido (plasma).^{5,6}

As alterações físicas e químicas do sangue em contato com o meio externo já são conhecidas no meio científico. Com relação ao aspecto físico, ocorre uma alteração na cor da mancha, indo de um vermelho intenso para um tom amarronzado com o passar do tempo.

Do ponto de vista químico, essa mudança é decorrente da oxidação da hemoglobina (oxyHb) em contato com o meio externo, pois no sangue a hemoglobina pode existir na forma oxigenada (oxyHb) possuindo o ferro em seu estado de oxidação +2 ou desoxigenada (metHb) tendo o ferro no estado de oxidação +3. Na forma metHb, a hemoglobina é incapaz de se ligar a molécula de oxigênio, por isso dentro do organismo há uma enzima cuja função é reduzir a forma desoxigenada para a oxigenada, a *citocromo-B5 redutase*.^{2,3}

Como a enzima não existe no meio exterior a tendência é que a forma oxidada ou desoxigenada (metHb) aumente e a forma reduzida ou oxigenada (oxiHb) diminua, levando a perda da capacidade de transporte de oxigênio, desnaturação, agregação e formação de hemicromos (Hc). Os hemicromos são definidos como sendo as formas desnaturadas da hemoglobina, possuindo uma geometria estrutural diferente.

Dessa forma, técnicas de espectroscopia vibracional podem ser empregadas para a caracterização de manchas de sangue, uma vez que podem fornecer informação sobre as mudanças que ocorrem na hemoglobina.³ Atualmente não existe um modelo ou método bem aceito para determinar a idade de manchas de sangue, embora muitos trabalhos estão sendo publicados levando em consideração a diferença dos hemicromos da hemoglobina e buscando relacionar essa característica com o tempo da mancha.³

Os estudos de Botonjic-Sehic *et al* (2009)² mostraram uma relação entre a oxyHb e a metHb ao longo do tempo, pois ao analisar os espectros obtidos na região do infravermelho próximo (NIR), pôde-se concluir que a quantidade de oxyHb em uma mancha de sangue diminuiu com o passar do tempo, e a metHb aumentou. Uma possível explicação para esses resultados é que em contato com o meio externo o ferro oxidado prefere se ligar a uma molécula de água do que do oxigênio.²

Outro trabalho relacionado ao tema e envolvendo espectroscopia vibracional é o de Lednev *et al* (2016)³. Após a análise dos espectros Raman de manchas de sangue, os

pesquisadores consideraram as bandas em 377 e 420 cm^{-1} como os marcadores da metHb e oxyHb, respectivamente. Durante o estudo, os espectros com um tempo de exposição menor do que uma hora já apresentavam a banda da forma desoxigenada (metHb) mais intensa do que da forma oxigenada (oxyHb), corroborando com a afirmação de que processo de oxidação é rápido. No estudo, o autor também afirmou que as mudanças nos espectros decorrentes desse processo continuariam por um tempo superior ao das análises, que foi de uma semana.³ No entanto, o trabalho não engloba variações de outros parâmetros, como um tempo de exposição maior, luminosidade, temperatura, umidade e diferentes tipos de superfície.

De acordo com Li *et al* (2011)¹⁴ um método interessante para a determinação da idade de uma mancha de sangue é a análise da hemoglobina utilizando microespectrofotometria na região do visível e do infravermelho próximo (NIR). Os autores usaram manchas de sangue equino e mostraram que a mudança nos espectros obtidos em relação ao tempo da mancha é de fácil visualização, embora os mesmos tivessem que ser pré-processados com diferentes métodos, a fim de reduzir os efeitos das variações da linha de base. Os autores construíram um modelo de classificação empregando análise discriminante linear para determinar a idade da mancha de sangue e obtiveram resultados satisfatórios, com mais de 90% das amostras sendo classificadas corretamente.

Outro estudo relevante é o de Mistek *et al* (2016)¹⁵ que estudou a diferenciação de raças humanas usando amostras de sangue utilizando a técnica de espectroscopia Raman. Em seu trabalho ele levou em conta as raças caucasianas e afro-americanos de vinte indivíduos variando em gênero e idade. Obteve bons resultados, construindo um modelo de classificação com 83% de probabilidade de se fazer uma correta classificação para as raças. E uma especificidade e sensibilidade de 80%.

1.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN

A espectroscopia Raman aplicada a química forense tem se mostrado uma técnica promissora devido a fatores como sua sensibilidade na identificação de compostos químicos (inorgânicos e orgânicos), destruição de quantidades insignificantes do analito com o mínimo de preparo de amostra. A disponibilidade de equipamentos portáteis amplia o leque de aplicações dessa técnica, permitindo a realização de medidas diretamente sobre o material ou até mesmo em materiais acondicionados em sacos plásticos ou vidros.^{12,16}

A técnica utiliza como fonte de excitação um laser de radiação monocromática na região do visível ou do infravermelho próximo. Os fótons do laser são incididos sobre a amostra, e após interação com a amostra são espalhados em todas as direções. O espalhamento da radiação pode ocorrer com a mesma energia da radiação incidida (espalhamento elástico ou Rayleigh) ou com uma energia diferente da incidida (espalhamento inelástico).

O espalhamento inelástico é capaz de fornecer informações vibracionais da amostra e pode ser classificado em espalhamento Stokes (energia espalhada menor que a incidida) e espalhamento anti-Stokes (energia espalhada maior que a incidida).^{17,18} Esse fenômeno (espalhamento inelástico) foi chamado de efeito Raman em homenagem ao seu descobridor, o físico indiano Chandrasekhar Venkata. A pesquisa com espalhamento da radiação foi publicada na Nature em 1928 com co-autoria de K. S. Krishnan e em 1930, Raman recebeu o prêmio Nobel de Física.¹⁸

Em muitos estudos utilizando técnicas espectroscópicas é recorrente a aplicação da espectroscopia Raman em conjunto com a espectroscopia na região infravermelho afim de elucidar a composição química de uma amostra. No entanto, a primeira técnica apresenta algumas vantagens, e uma delas é não sofrer interferência da água, permitindo a análise de soluções aquosas.^{12, 16, 17, 19}

Na área de química forense, a espectroscopia Raman tem sido aplicada a diferentes matrizes, tais como drogas lícitas e ilícitas, venenos, explosivos, resíduos de armas de fogo, combustíveis, tintas, fibras e falsificações de obras de arte.¹²

Geralmente o desenvolvimento de metodologias analíticas empregando espectroscopia Raman envolve o emprego de ferramentas quimiométricas. A utilização de quimiometria em dados de espectroscopia Raman permite análises de reconhecimento de padrões e construção de modelos de regressão.

1.3 QUIMIOMETRIA

A quimiometria pode ser definida como sendo uma área da química voltada para o tratamento de dados usando ferramentas matemáticas e estatísticas.¹² Os constantes avanços na área de software e o aumento considerável no poder de aquisição de dados contribuiu para que a quimiometria se desenvolvesse como uma ferramenta importantíssima tornando o processamento e interpretação dos dados cada vez mais rápidos e eficientes.

O uso de métodos quimiométricos para tratar os dados obtidos por espectroscopia Raman na área de forense é recorrente, pois auxilia na elaboração de modelos de classificação, por exemplo, em testes de falso/positivo. Dentre os métodos disponíveis na área, os mais usados para fins forenses são: calibração multivariada, reconhecimento de padrões e planejamento e otimização de experimentos.¹²

Nesse trabalho será empregado os métodos de reconhecimento de padrões e calibração multivariado. Entre os métodos de reconhecimento de padrão não supervisionado, a análise por componentes principais (PCA) é a mais empregada. O objetivo da PCA é transformar grandes matrizes de dados em matrizes menores que podem ser facilmente interpretadas, permitindo identificar semelhanças e diferenças entre as amostras.¹² O método de regressão multivariada por mínimos quadrados parciais (PLS) é o método mais utilizado e difundido entre as técnicas de calibração multivariada. O PLS é baseado em uma relação linear entre as variáveis **X** (respostas instrumentais) e as variáveis de interesse, **Y**. Na regressão por PLS todas as variáveis relevantes são incluídas no modelo, desta forma, a calibração pode ser realizada na presença de interferentes.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo realizar um estudo utilizando a técnica de espectroscopia Raman para analisar manchas de sangue ao longo do tempo em diferentes condições ambientes. Além disso, pretende-se desenvolver modelos quimiométricos que levam em conta a incerteza das previsões e forneça uma medida da confiabilidade dos resultados.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Caracterizar os espectros Raman das manchas de sangue;
- ❖ Construir modelo de regressão multivariada para estimar a idade de uma mancha de sangue;
- ❖ Determinar qual é o tempo máximo que uma mancha de sangue pode ser diferenciada tendo em vista a alteração dos parâmetros: luminosidade e umidade;
- ❖ Validação dos modelos multivariados.

3. RELEVÂNCIA DO PROJETO

Devido a importância do tema para a área forense, vários estudos têm sido publicados na literatura com o objetivo de datação de manchas de sangue. No entanto, não há disponível um método de referência para tal objetivo. Observa-se uma lacuna nos estudos de datação de manchas de sangue quanto os efeitos das condições ambientais de exposição e validação dos métodos propostos.^{3, 20, 14, 15}

Desta forma, este projeto de pesquisa almeja contribuir com informações e estratégias para o desenvolvimento de uma metodologia analítica empregando espectroscopia Raman e ferramentas quimiométricas para determinação da idade de manchas de sangue. O uso em conjunto da espectroscopia Raman e quimiometria permite o estudo de conjuntos de dados com grande variabilidade, sendo possível correlacionar os dados gerados a fatores como idade da mancha, condições ambientais de exposição através do agrupamento das amostras com mesmas características.

Diversos trabalhos têm mostrado aplicações da espectroscopia Raman aliada a ferramentas quimiométricas na área forense, no entanto a falta de validação dos métodos dificulta a implementação de tal metodologia em análises de rotina. Este trabalho pretende contribuir com o desenvolvimento de modelos multivariados validados.

4. METODOLOGIA

4.1 AMOSTRAS

Serão obtidas amostras de sangue de 10 doadores voluntários após aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras dos voluntários serão coletadas no Laboratório Central do Departamento de Patologia Clínica da Faculdade de Medicina da UFMG no período de março a julho de 2017. Os critérios de participação serão homens e mulheres com idade entre 20 e 50 anos. Os dados relativos à identificação, à idade, ao sexo e à raça serão obtidos do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aplicado antes da coleta aos doadores voluntários.

4.2 PREPARO DAS MANCHAS DE SANGUE

As manchas de sangue serão preparadas adicionando uma pequena gota (30 μL) em lâminas de vidro revestidas com papel alumínio e analisadas por espectroscopia Raman no decorrer do tempo. No primeiro dia, as amostras serão analisadas num intervalo de tempo de 1, 3, 5, 8 e 10 horas de exposição a dois tipos de condições ambientais. Depois disso, os ensaios serão realizados uma vez ao dia até que se complete o período de 30 dias. Após esse período, as manchas serão analisadas uma vez por semana até que se complete o período de 180 dias. Mudanças no cronograma das amostras podem ocorrer de acordo com os resultados que serão obtidos, podendo o intervalo de tempo entre as análises aumentar ou diminuir.

As condições ambientes, como umidade e luminosidade serão estudadas. As manchas de sangue ficarão expostas em ambiente com umidade e luminosidade controlada.

4.3 OBTENÇÃO DOS ESPECTROS RAMAN

Os espectros Raman serão coletados em um espectrômetro dispersivo Raman Senterra (Bruker), equipado com 3 linhas de laser e detector CCD. O equipamento possui um microscópio ótico acoplado com objetivas de 20x, 50x e 100x. A linha do laser empregada para aquisição dos espectros será a de 785 nm. O intervalo espectral a ser estudado será de 1800 a 200 cm^{-1} com resolução espectral de 4 cm^{-1} . A otimização de parâmetros como potência do laser, tempo de exposição e número de acumulações será feita previamente com o objetivo de obter espectros com adequada relação sinal-ruído. A preparação das amostras para obtenção dos espectros Raman será mínima ou nenhuma.

4.4 TRATAMENTO DE DADOS

Os espectros Raman obtidos serão tratados em ambiente Matlab, versão 7.13 (The MathWorks Natick, EUA), utilizando o pacote PLS Toolbox, versão 6.5 (Eigenvector Technologies, Manson, EUA). Os dados serão pré-processados utilizando vários tipos de pré-processamento, por exemplo, dados centrados na média, normalização, uso de derivadas com utilização de filtros de Savitzky-Golay. O pré-processamento escolhido será o que fornecer melhores resultados para o fim que se destina.

Serão empregados métodos de treinamento não supervisionado, como a PCA para uma análise exploratória dos dados. Modelos de regressão multivariados serão desenvolvidos para estimar o tempo da mancha de sangue baseado nos espectros Raman. Para tal proposta será utilizada a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS).

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] MALLMITH, D. M. Local de crime. Secretaria da Segurança Pública, Instituto Geral de Perícias, Departamento de Criminalística. Porto Alegre - RS, p. 1-66, 2007.
- [2] BOTONJIC-SEHIC, E.; BROWN, C. W.; LAMONTAGNE, M.; TSAPARIKOS, M. Forensic application of near-infrared spectroscopy: aging of bloodstains. *Spectroscopy*, N° 24, p. 42 - 48, 2009.
- [3] LEDNEV, I. K.; DOTY, K. C.; MCLAUGHLIN, G. A Raman “spectroscopic clock” for bloodstain age determination: the first week after deposition. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, N° 408, p. 3993 - 4001, 2016.
- [4] DOREA, L. E. C. As manchas de sangue como indício em local de crime. Livro técnico sobre procedimentos periciais em locais de crime. Editora Franco Produções. Salvador - BA, p. 1-63, 1989.
- [5] PESCHEL, O.; KUNZ, S. N.; ROTHSCHILD, M. A.; MUTZEL, E. Blood stain pattern analysis. *Forensic Science, Medicine, and Pathology*, N° 7, p. 257-270, 2010.
- [6] MACIEL, D. R. Análise do padrão de manchas de sangue em local de crime: revisão de literatura. Monografia apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOB/UNICAMP). Piracicaba - SP, p. 1-164, 2014.
- [7] ANDRASKO, J. The estimation of age of bloodstains by HPLC analysis. *Journal of forensic sciences*, N° 42, p. 601 – 607, 1997.
- [8] STRASSER, S.; ZINK, A.; KADA, G.; HINTERDORFER, P.; PESCHEL, O.; HECKL, W. M. H.; NERLICH, A. G.; THALHAMMER, S. Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy. *Forensic Science International*, N° 170, p. 8-14, 2007.
- [9] ANDERSONA, S.; HOWARDA, B.; HOBBSB, G. R.; BISHOPA, C. P. A method for determining the age of a bloodstain. *Forensic Science International*, N° 148, p. 37-45, 2005.
- [10] BREMMER, R. H.; NADORT, A.; LEEUWEN, T. G. V.; GEMERT, M. J. C.; AALDERS, M. C. G. Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy. *Forensic Science International*, N° 206, p. 166 – 171, 2011.
- [11] EDELMAN, G.; MANTI, V.; RUTH, S. M. V.; LEEUWEN, T. V.; AALDERS, M. Identification and age estimation of blood stains on colored backgrounds by near infrared spectroscopy. *Forensic Science International*, N° 220, p. 239 - 244, 2012.

- [12] ALMEIDA, M. R. Espectroscopia Raman e quimiometria como ferramentas analíticas para química forense e paleontologia. Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Campinas - SP, p. 1-177, 2015.
- [13] FARIA, D. L. A.; SANTOS, L. G. C.; GONÇALVES, N. S. Uma demonstração sobre o espalhamento inelástico de luz: repetindo o experimento de Raman. *Química Nova*, Vol. 20, Nº 319, 1997.
- [14] LI, B.; BEVERIDGE, P.; O'HARE, W. T.; ISLAM, M. The estimation of the age of a blood stain using reflectance spectroscopy with a microspectrophotometer, spectral pre-processing and linear discriminant analysis. *Forensic Science International*, Nº 212, p. 198-204, 2011.
- [15] MISTEK, E.; HALÁMKOVÁ, L.; DOTY, K. C.; MURO, C. K.; LEDNEV I. K. Race Differentiation by Raman Spectroscopy of a Bloodstain for Forensic Purposes. *Analytical Chemistry*, Nº 88, p. 7453-7456, 2016.
- [16] GOMES J. A.; SERCHELI, M.S. Espectroscopia Raman: um novo método analítico para investigação forense em cruzamento de traços. *Revista Brasileira de criminalística*, Vol. 1, Nº 1, p. 22-30, 2011.
- [17] PUGLIERI, T. S.; FARIA, D. L. A. Microscopia Raman aplicada à conservação e autenticação de obras de arte. Resumo expandido publicado no 7º simpósio: Convenção do Patrimônio Imaterial: 10 anos depois (2003-2013). São Paulo – SP, p. 1-11, 2013.
- [18] RODRIGUES, A. G.; GALZERANI, J. C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, Vol. 34, Nº 4, p. 4309 (1- 9), 2012.
- [19] ROMÃO, W.; SCHWAB, N. V.; BUENO, M. I. M. S.; SPARRAPAN, R.; EBERLIN, M. N.; MARTINY, A.; SABINO, B. D.; MALDANER, A. O. Química forense: perspectiva sobre novos métodos analíticos aplicados à documentoscopia, balística e drogas de abuso. *Química Nova*, Vol. 34, Nº 10, p. 1717-1728, 2011.
- [20] LEDNEV, I. K.; MCLAUGHLIN G. A modified Raman multidimensional spectroscopic signature of blood to account for the effect of laser power. *Forensic Science International*, Nº 240, p. 88–94, 2014.