

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

THAYSE CAMPOS MILESKI

**APLICAÇÃO DE CORANTES BENZAZÓLICOS FLUORESCENTES POR ESIPT PARA A
REVELAÇÃO DE MANCHAS DE SANGUE EM CENAS DE CRIME E A SÍNTESE DO
LUMINOL**

Dissertação de Mestrado

Porto Alegre, abril de 2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

THAYSE CAMPOS MILESKI

**APLICAÇÃO DE CORANTES BENZAZÓLICOS FLUORESCENTES POR ESIPT PARA A
REVELAÇÃO DE MANCHAS DE SANGUE EM CENAS DE CRIME E A SÍNTESE DO
LUMINOL**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Valter Stefani

Porto Alegre, abril de 2016

Dedico esta Dissertação aos meus pais e irmã que me apoiaram nessa escolha e que estiveram ao meu lado até o último momento dessa trajetória.

Agradecimentos

Quero agradecer o apoio que meus pais sempre me deram. Eles sempre estiveram do meu lado me apoiando e vibrando com todas as minhas conquistas desde que escolhi ser química. Lembro-me do dia da minha formatura e do dia da aprovação do mestrado e nada me fez tão feliz quanto ver o brilho nos olhos deles e o orgulho que sentiam.

Agradeço a minha irmã que me ajudou nas horas que necessitei e principalmente por ter sido a minha parceira de festa para aqueles momentos em que é necessário descontrair para não enlouquecer no meio dos estudos.

A Paula Castro que é a minha amiga/irmã que a faculdade trouxe para a minha vida e que sempre estava do meu lado nos momentos mais importantes da minha vida, tanto pessoal quanto profissional.

Quero agradecer em especial ao meu orientador, o professor Dr. Valter Stefani que aceitou me orientar tanto no TCC quanto no mestrado e que acredita em mim quando eu acho que ninguém mais acredita. Obrigada pelo carinho e pelos puxões de orelha que às vezes eu preciso.

Também quero agradecer o apoio dos meus colegas do LMNO-QF pela amizade durante esses dois anos. Aos ICs Heron e Thiago por me ajudarem nas reações, ao Hélio Barros pelos corantes HBs utilizados neste trabalho que foram criação dele, a Sandra por colaborar com amostras de sangue coletadas na veterinária da UFRGS e a Crisle, que além das conversas, contribuiu neste trabalho realizando as análises de Cianacrilato e pela possibilidade de aplicar este estudo em um caso real, cuja necessidade de um reagente com as características descritas neste trabalho foi totalmente justificada.

Minha eterna gratidão aos peritos do Setor Técnico Científico da Superintendência da Polícia Federal do Rio Grande do Sul que sempre me ajudaram desde a época do estágio até o final desse mestrado. Obrigada por nunca terem fechado as portas pra mim e por permitirem que eu utilizasse os equipamentos do setor para realizar algumas análises. Obrigada pela amizade e carinho que recebo de vocês, em especial à Carina que sempre me socorreu, ao Miguel e ao Ávila que se mostraram receptivos a me ajudar quando os procurei.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	15
1.1.	MOTIVAÇÃO.....	15
1.2.	OBJETIVO GERAL	16
1.3.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1.	O SANGUE E SUAS PROPRIEDADES.....	17
2.2.	LOCAL DO CRIME	18
2.3.	ANÁLISE DO PADRÃO DAS MANCHAS DE SANGUE	20
2.4.	TIPOS DE MANCHAS DE SANGUE	21
2.5.	TESTES PRELIMINARES DE SANGUE.....	23
2.5.1.	Testes colorimétricos.....	24
2.5.2.	Testes luminescentes.....	27
2.6.	TESTES DEFINITIVOS DE SANGUE	36
2.6.1.	Teste de Teichmann.....	36
2.6.2.	Teste Takayama	37
2.7.	REAGENTES UTILIZADOS PARA REALÇAR IMPRESSÕES COM SANGUE	37
2.7.1.	Amido Black.....	38
2.7.2.	Vermelho da Hungria	40
2.7.3.	<i>Leuco</i> Violeta Cristal.....	41
2.7.4.	Coomassie Blue.....	41
2.7.5.	Dupla Coloração de Crowle	42
2.7.6.	Suspensão de Dióxido de Titânio.....	43
2.7.7.	Amarelo Ácido 7	43
2.8.	IMPRESSÕES DIGITAIS.....	44
2.9.	CORANTES BENZAZÓLICOS	47
2.9.1.	Corantes HBs	48
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	51
3.1.	ESTUDO DA APLICAÇÃO DOS CORANTES BENZAZÓLICOS EM MANCHAS DE SANGUE	51
3.1.1.	Escolha da solução fixadora	51
3.1.2.	Análise da interferência do tempo de contato das amostras com a solução fixadora e com solução corante	52
3.1.3.	Formas de aplicar as soluções sobre as manchas de sangue	52
3.1.4.	Utilização de diferentes corantes benzazólicos para superfícies diversas.....	52

3.1.5.	Análise da diluição das manchas de sangue por contato.....	53
3.1.6.	Ligação dos corantes com o sangue	53
3.1.7.	Estudo de falso-positivo e interferentes.....	53
3.1.8.	Estudo da combinação de diferentes técnicas para análise de digitais e/ou sangue latente.....	54
3.1.9.	Estudo da sensibilidade.....	55
3.2.	SÍNTESE DO LUMINOL.....	56
3.3.	SÍNTESE DO ISOLUMINOL	59
3.4.	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO LUMINOL E DO ISOLUMINOL SINTETIZADOS	61
3.5.	PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE USO DO LUMINOL	62
3.6.	APLICAÇÃO DO CORANTE HB-7 EM UM CASO REAL	62
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1.	ESTUDO DA APLICAÇÃO DOS CORANTES BENZAZÓLICOS EM MANCHAS DE SANGUE	64
4.1.1.	Avaliação da efetividade da escolha da solução fixadora	64
4.1.2.	Análise da interferência do tempo de contato das amostras com a solução fixadora e a corante.....	65
4.1.3.	Avaliação das formas de aplicação das soluções sobre as manchas de sangue.....	66
4.1.4.	Utilização de diferentes corantes benzazólicos para superfícies diversas.....	67
4.1.5.	Análise da diluição das manchas de sangue por contato.....	72
4.1.6.	Ligação dos corantes com o sangue	75
4.1.7.	Estudo de falso-positivo e interferentes.....	76
4.1.8.	Estudo da combinação de diferentes técnicas para análises de digitais e/ou sangue latente.....	78
4.1.9.	Estudo da sensibilidade.....	82
4.2.	SÍNTESE DO LUMINOL.....	83
4.3.	SÍNTESE DO ISOLUMINOL	85
4.4.	CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO LUMINOL E ISOLUMINOL SINTETIZADOS	86
4.5.	PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE USO DO LUMINOL	95
4.6.	APLICAÇÃO DO CORANTE HB-7 EM UM CASO REAL	95
5.	CONCLUSÃO.....	98
6.	REFERÊNCIAS	100

Lista de Figuras

Figura 1: Representação do grupo heme e da hemoglobina. A) átomo de ferro com as 4 ligações com os nitrogênios no plano. B) ligações perpendiculares do ferro com o grupo His da proteína e a ligação com o oxigênio. C) Hemoglobina. ⁽⁶⁾	17
Figura 2: Rompimento das estrutura quaternárias, terciárias e secundárias da proteína devido aos desnaturantes. (A) Proteína sem desnaturante, (B) proteína com desnaturante fraco, (C e D) proteína com desnaturante moderado e (E) Proteína com desnaturante forte. ⁽⁸⁾	18
Figura 3: Diferença do volume das gotas de sangue em materiais de diferentes tamanhos e formas.	21
Figura 4: Relação do ângulo de incidência com o formato da mancha de sangue na superfície.	22
Figura 5: Formato da mancha de sangue após atingir a superfície em diferentes ângulos (elipses A e B) e cálculo do ângulo de incidência da gota de sangue na superfície.	22
Figura 6: Método de formação dos respingos de satélite.	23
Figura 7: Reação de oxidação da Benzidina.	24
Figura 8: Reação de oxidação da o-Tolidina.	25
Figura 9: Reação de oxidação da Tetrametilbenzidina.	25
Figura 10: Kit de 50 fitas de Hemastix® ⁽¹³⁾	26
Figura 11: Reação de oxidação da Fenolftaleína em meio básico.	27
Figura 12: Reação de oxidação do Leuco Verde Malachita	27
Figura 13: Diagrama de Jablonski simplificado.	29
Figura 14: Estrutura química do Luminol.	29
Figura 15: Mecanismo de oxiredução do Luminol e do Ferro na presença do peróxido de hidrogênio.	30
Figura 16: Mecanismo de oxidação do Luminol.	30
Figura 17: Aplicação do Luminol para identificação de sangue latente em uma banheira ⁽²⁹⁾	31
Figura 18: Aplicação do BlueStar® para revelação de sangue latente em uma pia ⁽²⁷⁾	31
Figura 19: Etapas da rota sintética do Luminol.	35
Figura 20: Estrutura química da Fluoresceína e a sua aplicação na revelação de sangue dentro de um veículo ⁽⁴⁹⁾	35
Figura 21: Cristais formados no resultado positivo do teste de Teichmann ⁽⁵⁰⁾	36
Figura 22: Cristais formados no teste de Takayama para sangue ⁽⁵¹⁾	37
Figura 23: Estrutura química do Amido Black e sua aplicação na revelação de uma impressão digital com sangue.	39
Figura 24: Exemplo da dificuldade de visualização da impressão digital quando revelada com Amido Black em superfícies escuras.	39
Figura 25: Interação do Amido Black com os grupos catiônicos da proteína (representados por R). R= histadina, lisina ou arginina ⁽⁵⁾	40
Figura 26: Estrutura química do vermelho da Hungria e sua aplicação na revelação de uma pegada com sangue. Na superior a revelação com fluorescência e na inferior na luz visível ⁽⁵⁵⁾	40
Figura 27: Estrutura química do Leuco Violeta Cristal e sua aplicação na revelação de uma pegada com sangue ⁽⁵⁷⁾	41
Figura 28: Estrutura química do Azul Brilhante de Coomassie e sua aplicação na revelação de uma pegada com sangue ⁽⁵⁹⁾	42
Figura 29: Estrutura dos dois corantes usados na Dupla Coloração de Crowle e a sua aplicação na revelação de marcas com sangue em um azulejo branco ⁽¹⁾	42
Figura 30: Utilização da suspensão de Dióxido de Titânio para revelar digitais com sangue em um disquete de computador ⁽⁶¹⁾	43
Figura 31: Estrutura química do Amarelo Ácido 7 e sua aplicação na revelação de uma digital com sangue usando filtro (inferior) e sem filtro (superior) ⁽⁶²⁾	44

Figura 32: Classificação das impressões digitais pelo sistema de Vucetich ⁽⁶⁴⁾	45
Figura 33: Identificação das minúcias de uma impressão digital ⁽⁶³⁾	45
Figura 34: Estrutura genérica de um corante benzazólico.	47
Figura 35: Esquema da transferência protônica entre as estruturas ceto-enol por ESIPT ⁽⁶⁵⁾	48
Figura 36: Estrutura geral dos corantes HB-7, HB-9 e HB-11 ⁽⁶⁵⁾	49
Figura 37: Corantes HBs no estado sólido. A- sob luz visível e B- sob luz UV ⁽⁶⁵⁾	49
Figura 38: Corantes HBs em solução aquosa. A- sob luz visível e B- sob luz UV ⁽⁶⁵⁾	50
Figura 39: Revelação de digital latente em superfície adesiva de fita isolante elétrica preta (Tectape®) ⁽⁶⁵⁾	50
Figura 40: Reação de nitração do anidrido ftálico na síntese do Luminol.	56
Figura 41: Reação com a hidrazina para formar o produto 3-nitroftalhidrazina.	57
Figura 42: Reação de redução do grupo nitro para a síntese do Luminol.	58
Figura 43: Nitração da ftalimida para a síntese do Isoluminol.	59
Figura 44: Reação de redução do grupo nitro para a síntese do Isoluminol.	60
Figura 45: reação da 4-aminoftalimida com a hidrazina para a síntese do Isoluminol.	60
Figura 46: Resultado das diferentes soluções fixadoras coradas com HB-7 e reveladas sob luz UV 254nm. Da esquerda para a direita: A) solução aquosa 2% de ácido 5-sulfosalicílico, B) solução metanólica 2% de ácido 5-sulfosalicílico, C) solução etanólica 2% de ácido 5-sulfosalicílico, D) solução 2% de ácido 5-sulfosalicílico em etanol:água (40:60), solução E) etanol:água (40:60), F) metanol P.A., G) etanol P.A..	64
Figura 47: Revelação de uma pegada do solado de um calçado impregnado com sangue usando HB-7 com borrifador.	67
Figura 48: Revelação de manchas de sangue feitas com dedos revelado com HB-7 por submersão	67
Figura 49: Imagem do cabo de uma faca manchado com sangue revelado com HB-7 por lavagens utilizando uma pipeta pasteur.	67
Figura 50: Revelação de manchas de sangue em poliestireno com HB-7.	68
Figura 51: Revelação de manchas de sangue em alumínio pintado (lata de refrigerante) com HB-7.....	68
Figura 52: Revelação de manchas de sangue em cerâmica (piso) com HB-7.	68
Figura 53: Revelação de manchas de sangue em polipropileno com HB-7.	69
Figura 54: Revelação de manchas de sangue em Aço INOX com HB-7.	69
Figura 55: Revelação de manchas de sangue em garrafa PET com HB-7.	69
Figura 56: Revelação de manchas de sangue em vidro de cor preta com HB-7.	69
Figura 57: Aplicação dos corantes HB-7, HB-9 e HB-11, respectivamente, em madeira crua.	70
Figura 58: Aplicação dos corantes HB-7, HB-9 e HB-11, respectivamente, em vidro.....	70
Figura 59: Aplicação dos corantes HB-7, HB-11 e HB-9, respectivamente, em madeira MDF.....	71
Figura 60: Aplicação dos corantes HB-7, HB-9 e HB-11, respectivamente, em polietileno.	71
Figura 61: Aplicação dos corantes HB-7, HB-9 e HB-11, respectivamente, em alumínio.	71
Figura 62: Deposição sequencial de manchas de sangue em madeira crua. Revelada com HB-7.	72
Figura 63: Zoom das digitas sequenciais 7ª e 8ª da Figura 62.	73
Figura 64: Manchas de sangue depositadas vinte e duas vezes seguidas, em vidro, antes de revelar com o HB-7.	73
Figura 65: Manchas de sangue depositadas vinte e duas vezes seguidas, em vidro, após revelação com o HB-7.	73
Figura 66: Manchas de sangue depositadas vinte e duas vezes seguidas, em vidro, antes de revelar.	74
Figura 67: Manchas de sangue depositadas vinte e duas vezes seguidas, em vidro, depois de revelar com o Amido Black.....	74
Figura 68: Imagem de marcas sequenciais de sangue em madeira.	74
Figura 69: Imagem das marcas sequenciais de sangue em madeira. Revelação das marcações da fileira inferior com Amido Black.	75
Figura 70: Revelação das manchas de sangue da fileira superior com HB-7.....	75
Figura 71: Comparação das últimas marcações das duas fileiras, uma revelada com HB-7 (esquerda) e outra com Amido Black (direita).	75

Figura 72: Imagem das proteínas fixadas na lâmina de vidro (esquerda) e tingidas com HB-7 (direita).	76
Figura 73: Manchas dos falsos positivos sendo revelada com a solução de HB-7 sob luz negra. Da esquerda para a direita: hipoclorito de sódio, detergente, ketchup, coca cola, beterraba, café, massa de tomate e molho de pimenta.....	77
Figura 74: Manchas dos falsos positivos após serem reveladas com a solução de HB-7 sob luz branca. Da esquerda para a direita: hipoclorito de sódio, detergente, Coca Cola, ketchup, beterraba, café, molho de pimenta e massa de tomate.....	77
Figura 75: A) Falso positivo para molho de pimenta. B) Falso positivo para massa de tomate.....	77
Figura 76: 1) mancha de sangue, 2) revelação com HB-7, 3) revelação com Amido Black.....	78
Figura 77: Digitais reveladas com Amido Black e HB-7 visualizadas em luz branca. Na digital da esquerda (A) foi aplicado primeiro o HB-7 e depois o Amido Black. Na B foi aplicado o Amido Black e depois o HB-7.....	78
Figura 78: Digitais reveladas com Amido Black e HB-7 visualizadas na luz negra. Na digital da esquerda (A) foi aplicado primeiro o HB-7 e depois o Amido Black. Na B foi aplicado o Amido Black e depois o HB-7.....	79
Figura 79: Sequencia de revelação da lata C. Luminol (a), HB-7 (b) e Cianoacrilato (c).	80
Figura 80: Revelação sequencial da lata E. Cianoacrilato (a), HB-7 (b) e Luminol (c).	80
Figura 81: Revelação em sequência da lata D. Cianoacrilato (a), HB-7 (b) e Luminol (c).	81
Figura 82: Resultado da análise da aderência do Cianoacrilato sobre digitais puras (direita) e com sangue (esquerda).	81
Figura 83: Ampliação do resultado da análise da aderência do Cianoacrilato sobre digitais puras (direita) e com sangue (esquerda).	82
Figura 84: Manchas de sangue diluído em diferentes concentrações aplicadas sobre lâminas de vidro. Da esquerda para a direita: 100% sangue, 50%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001%.	82
Figura 85: Manchas de sangue de diferentes concentrações reveladas com HB-7.	82
Figura 86: Resultado do teste de sensibilidade para o Amido Black em diferentes concentrações de sangue....	83
Figura 87: Resultado do teste de sensibilidade para o Luminol em diferentes concentrações de sangue.	83
Figura 88: Reação de nitração do anidrido ftálico.	83
Figura 89: Esquema da reação do ácido 3-nitroftálico com o sulfato de hidrazina.	84
Figura 90: Reação de redução do grupo nitro.	85
Figura 91: Imagem da CCD em luz visível. LP = Luminol padrão; L2b = Luminol da Rota sintética 2 (alta temperatura) ; L2bp = Luminol da Rota sintética 2 (alta temperatura) purificado em etanol; L2a = Luminol da rota sintética 2 (baixa temperatura) ; L2ap = Luminol da rota sintética 2 (baixa temperatura) purificado em etanol; IL1 = Isoluminol da rota sintética 1; IL2 = Isoluminol da Rota sintética 2; Amino = 4-aminoftalimida e nitro= 4-nitroftalimida.	86
Figura 92: CCD revelada em 365nm (superior) e 254nm (inferior). LP = Luminol padrão; L2b = Luminol da Rota sintética 2 (alta temperatura) ; L2bp = Luminol da Rota sintética 2 (alta temperatura) purificado em etanol; L2a = Luminol da rota sintética 2 (baixa temperatura) ; L2ap = Luminol da rota sintética 2 (baixa temperatura) purificado em etanol; IL1 = Isoluminol da rota sintética 1; IL2 = Isoluminol da Rota sintética 2; Amino = 4-aminoftalimida e nitro= 4-nitroftalimida.	87
Figura 93: Espectro de infravermelho do Luminol padrão.	88
Figura 94: Espectro de infravermelho do Luminol bruto sintetizado via Rota 2 com temperatura elevada.	88
Figura 95: Espectro de infravermelho do Luminol Purificado sintetizado via Rota 2 com temperatura elevada.	89
Figura 96: Espectro de infravermelho do Luminol purificado sintetizado via Rota 2 com baixa temperatura.	89
Figura 97: Espectro de infravermelho do Luminol bruto sintetizado via rota 3.	90
Figura 98: Espectro de infravermelho do produto Isoluminol via rota 2.	91
Figura 99: Espectro de infravermelho do produto Isoluminol via rota 1.	91
Figura 100: RMN- ¹³ C do Luminol padrão ampliado.	92
Figura 101: RMN- ¹ H do Luminol padrão.	93
Figura 102: RMN- ¹ H do Luminol sintetizado via rota 2 com altas temperaturas. Análise em DMSO deuterado e 400MHz.	93

Figura 103: RMN- ¹ H ampliado do Luminol sintetizado via rota 2 com altas temperaturas. Análise em DMSO deuterado e 400MHz.	94
Figura 104: RMN- ¹³ C do Luminol sintetizado via rota 2 com altas temperaturas. Análise em DMSO deuterado e 75MHz.	94
Figura 105: RMN- ¹³ C ampliado Luminol sintetizado via rota 2 com altas temperaturas. Análise em DMSO deuterado e 400MHz.	95
Figura 106: Imagem do cabo da faca, sem nenhum tratamento químico, identificando o local de possíveis digitais.	96
Figura 107: Foto da esquerda aplicando o corante. Foto da direita: visualização da faca após aplicar o corante HB-7, sob luz negra.	96
Figura 108: Marcação das digitais tingidas pelo HB-7.	97
Figura 109: Foto da faca revelada com Amido Black.	97

Lista de tabelas

Tabela I: Formulações para o preparo das soluções de uso do Luminol segundo Grodsky e Weber ^(1, 16)	34
Tabela II: Composição dos compostos expelidos pelas glândulas sudoríparas, sebáceas e apócrinas. Principal composição das impressões digitais latentes ⁽⁶⁷⁾	46
Tabela III: Ordem de aplicação das técnicas de revelação em cada lata.	55
Tabela IV: Resultado obtido variando os tipos de soluções fixadoras e o tempo de contato delas com o sangue. Todas reveladas com HB-7 por 3 minutos de contato.	66
Tabela V: Resultado obtido variando o tempo de aplicação do corante utilizando diferentes soluções fixadoras. A fixação foi realizada por 1 min.....	66

Lista de abreviaturas:

DNA – Ácido desoxirribonucleico.....	20
BPA – Análise do padrão de manchas de sangue.....	20
TMB – Tetrametilbenzidina.....	25
EPI – Equipamento de proteção individual.....	28
S₀ – Estado de energia singleto fundamental.....	28
S₁ – Primeiro Estado singleto de energia excitado.....	28
S₂ – Segundo Estado singleto de energia excitado.....	28
T₁ – Primeiro Estado tripleto de energia excitado.....	28
PCR – Reação em cadeia polimerase.....	39
FBI – Federal Bureau of Investigation.....	41
ESIPT – Mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado.....	47
PPA – Ácido polifosfórico.....	48
PPE – Éster polifosfórico.....	48
UV – Ultravioleta.....	49
H – Hidrogênio.....	47
OH – Hidroxila.....	47
NH₂ – Grupo amino.....	47
Me – Metila.....	47
Et – Etila.....	47
Ph – Fenil.....	47
S – Enxofre.....	47
O – Oxigênio.....	47
N – Nitrogênio.....	47
5-ASS – Ácido 5-sulfosalicílico.....	51
BCAA – Aminoácidos de cadeia ramificada.....	53
H-HQ – Complexo hidroquinona-hidrazina.....	61
FTIR-ATR – Espectrofotômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier e refletância total atenuada.....	61
CCD - Cromatografia em Camada Delgada.....	62
RMN-¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio.....	62
RMN-¹³C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono.....	62
TMS – Tetrametilsilano.....	62
LNMO-QF – Laboratório de Novos Materiais Orgânicos e Química Forense.....	63
Rf – Tempo de retenção	86

Resumo

Os corantes benzazólicos fluorescentes por ESIPT são conhecidos pela sua grande estabilidade e variabilidade no comprimento de onda da sua emissão de fluorescência. Novos derivados, nomeados HBs, foram estudados como corantes para sangue por possuírem grupos sulfônicos na sua estrutura molecular, o que é característico dos corantes proteicos utilizados para a análise de sangue.

Estudos sobre essa aplicação foram desenvolvidos nesse trabalho, visando estabelecer vantagens e desvantagens em comparação aos reagentes mais utilizados. Os resultados foram satisfatórios para essa utilização, sendo tão sensível quanto o Amido Black e permitindo a combinação de técnicas com diferentes reveladores, sendo eles: Amido Black, Cianocrilato e Luminol.

Este trabalho também estudou a síntese do Luminol reproduzindo metodologias descritas na literatura, além da síntese do isômero Isoluminol. A obtenção de um produto com alto grau de pureza é difícil. Como são necessárias várias etapas, o rendimento do produto não é alto.

Palavras chaves: Manchas de sangue, fluorescência, Luminol, corantes benzazólicos, AmidoBlack.

Abstract

The benzazole fluorescent dyes by ESIPT are known for their high stability and fluorescence emission wavelength variability. New derivatives, appointed HBs, were studied as blood enhancement dyes once they have sulfonic groups in its molecular structure, which is characteristic of protein dyes used for blood analysis.

Studies about this application were developed in this work, in order to establish its advantages and disadvantages compared to commonly used reagents. The results were satisfactory for the referred use, being as sensitive as Amido Black and allowing for techniques combination with different developers: Amido Black, Cyanoacrylate and Luminol.

This work also studied the Luminol synthesis by reproducing methodologies described in the literature, as well as the isomer Isoluminol synthesis. The obtaining of a product with high purity is difficult. As several steps are required, the product yield is not high.

Key words: Bloodstain, fluorescence, Luminol, benzazole dyes, Amido Black.

1. INTRODUÇÃO

1.1. MOTIVAÇÃO

O sangue é uma evidência física normalmente encontrada em cenas de crime, principalmente os de maior poder ofensivo, envolvendo morte e violência, sendo amplamente investigado pelos órgãos de segurança pública. Além de conter o DNA existem outras informações ocultas nessa evidência. É possível analisar o padrão das manchas de sangue, o local da agressão e as características do agressor como altura, força, posição dos envolvidos, entre outros fatores. O suspeito também pode produzir evidências contaminadas pelo sangue, como impressões do tipo digitais, palmares e plantares, além do solado de calçados. Mesmo quando propositalmente ocultado, o sangue pode ser visualizado permitindo a determinação da alteração da cena de crime que pode qualificar a conduta do criminoso. Seguindo esta sequência, podemos dividir a análise de sangue em 3 grupos principais: teste preliminar, definitivo e análise de impressões.

Existem vários produtos químicos para a detecção das manchas de sangue na cena de crime. Na identificação preliminar são utilizados reagentes que sofrem um processo de oxidação química na presença de sangue a partir da modificação da sua estrutura, gerando uma cor visível. Esta reação ocorre por ser catalisada pelo grupo heme das hemácias devido a sua propriedade oxidante semelhante às enzimas peroxidases. Dentro deste grupo também estão os reagentes utilizados para identificar sangue latente. Entre estes, dispõe-se do Luminol que é uma substância quimioluminescente que reage por oxirredução na presença do ferro da hemoglobina e também da Fluoresceína que é uma substância fluorescente, porém não tão sensível quanto o Luminol.

Além disso, os especialistas em impressões utilizam reagentes que possuem afinidade com as substâncias presentes no sangue, conferindo cor mais intensa às manchas, que muitas vezes podem estar pouco visíveis e com reduzida nitidez para realizar a identificação dos detalhes necessários. Esses corantes apresentam colorações variadas. Alguns possuem fluorescência quando expostos à luz ultravioleta e outros apenas cor visível quando expostos à luz branca. Cada produto possui uma característica específica, sendo melhor aplicado em

determinados tipos de superfície. Entre tantos, o que mais se destaca e que é amplamente utilizado nesses casos é o Amido Black. O solvente utilizado na preparação da solução de uso determina a superfície na qual ele pode ser aplicado (porosa ou não porosa). Este apresenta coloração azul escura, desta forma não é recomendado o seu uso em superfícies escuras pela falta de contraste. O único limitante deste corante é sua aplicação em superfícies escuras, pois não há contraste. Este motivo é fundamental para o desenvolvimento de outros corantes.

1.2. OBJETIVO GERAL

Analisar a capacidade de detecção de manchas de sangue usando corantes.

1.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Aplicar corantes do tipo benzazólicos, fluorescentes por ESIPT, para tingir manchas de sangue presentes em cenas de crime;
- B) Testar a aplicação de novos corantes fluorescentes em manchas de sangue;
- C) Estudar a seletividade e eficácia para sangue;
- D) Comparar os resultados, a eficiência e limitações com o Amido Black;
- E) Verificar possíveis combinações entre diferentes técnicas sem perder a evidência criminal;
- F) Comparar a eficiência da síntese dos reagentes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. O SANGUE E SUAS PROPRIEDADES

O sangue consiste em células e fragmentos de células suspensos em um líquido chamado de plasma. Este pode ser separado em 3 fases quando centrifugado: células vermelhas, células brancas e plasma ^(1, 2, 3).

As células vermelhas (hemácias ou eritrócitos) formam 55% do volume total e possuem em sua constituição hemoglobinas e antígenos ABO. Sua função principal é o transporte de oxigênio e gás carbônico através das hemoglobinas presentes no citoplasma. As células brancas, ou leucócitos, e as plaquetas, possuem volume tão pequeno que é considerado nulo. A sua principal função é proteger o organismo contra patógenos e são responsáveis pela cicatrização de ferimentos. O plasma constitui 45% do volume total do sangue e é composto por 90% de água e 10% de solutos como, sais, glicose, proteínas, lipídios, entre outros ^(2, 4). O sangue possui pH em torno de 7,4 e corresponde em torno de 8 a 9% da massa corporal ⁽⁵⁾. A média é de 60 a 66ml de sangue por quilograma do peso do indivíduo ⁽¹⁾.

As hemoglobinas são metaloproteínas que possuem 4 sub-unidades proteicas, de dois tipos (α e β), sendo duas de cada tipo e todas possuem 1 grupo Heme na sua estrutura. A porção heme é o centro que contém o átomo de ferro coordenado a 4 nitrogênios das porfirinas, a proteína e ao oxigênio, sendo dessa forma hexacoordenado, como pode ser visto na figura 1 ⁽³⁾. A presença desse metal normalmente no estado de oxidação $2+$ gera a cor vermelha ao sangue. A mudança no estado de oxidação do ferro pode ser gerada no contato com o ar, oxidando para $3+$ ^(1, 4).

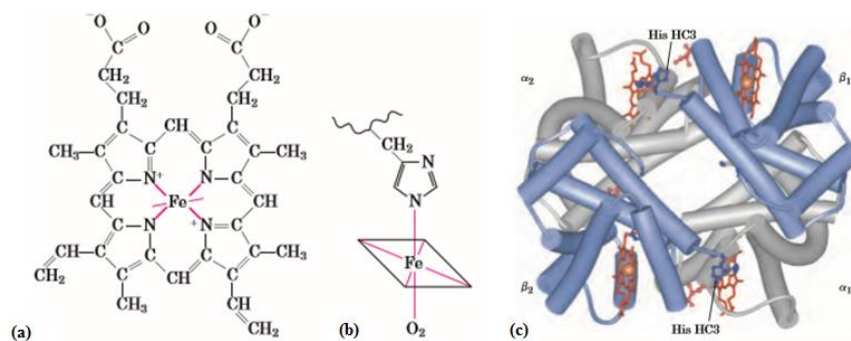


Figura 1: Representação do grupo heme e da hemoglobina. A) átomo de ferro com as 4 ligações com os nitrogênios no plano. B) ligações perpendiculares do ferro com o grupo His da proteína e a ligação com o oxigênio. C) Hemoglobina. ⁽⁶⁾

As proteínas presentes no sangue são facilmente desnaturadas, ou seja, ocorre uma modificação na estrutura da proteína fazendo com que ela fique insolúvel e precipite. Dessa forma, as manchas de sangue podem ser fixadas à superfície aplicando um desnaturante: calor, modificações de pH e solventes orgânicos podem ser aplicados com essa finalidade. Essa etapa deve ser feita antes de realizar a análise das marcas com os corantes, pois assim não ocorre a deformação das mesmas ^(4, 7). A Figura 2 mostra o efeito da desnaturação na estrutura da proteína. Uma proteína no seu estado original possui a estrutura compactada (A) devido às quatro estruturas (primárias, secundárias, terciárias e quaternárias) e as interações químicas responsáveis para formar cada uma delas. A força relativa ao desnaturante (forte, moderado e fraco) é relacionado ao número de estruturas que ele é capaz de clivar. Ao utilizar os moderados ocorre o rompimento das estruturas terciárias e quaternárias (C e D), já os fracos rompem apenas as quaternárias (B). Nestes dois casos a estrutura não está na forma compacta e globular, como algumas estruturas foram rompidas, a proteína começa a abrir de forma linear mantendo as interações que permaneceram (representado em bolas pretas na Figura 2). Quando for utilizado um solvente forte, isto é, capaz de romper as estruturas quaternárias, terciárias e secundárias, a estrutura da proteína (normalmente na forma globular) abre formando uma cadeia linear e plana (E) ⁽⁸⁾.

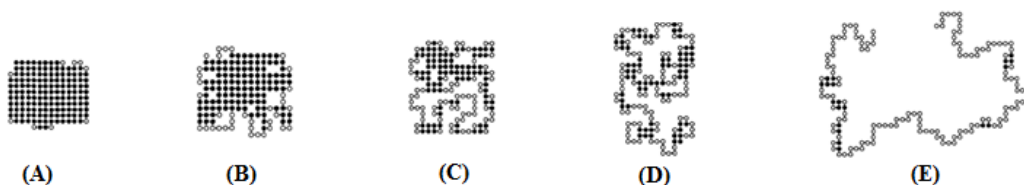


Figura 2: Rompimento das estrutura quaternárias, terciárias e secundárias da proteína devido aos desnaturantes. (A) Proteína sem desnaturante, (B) proteína com desnaturante fraco, (C e D) proteína com desnaturante moderado e (E) Proteína com desnaturante forte. ⁽⁸⁾

2.2. LOCAL DO CRIME

Local (ou cena) do crime é definido como qualquer instalação, local, veículo, pessoa, ou mesmo um item que tenha sido envolvido em um crime ou incidente. Contudo, independente de qual será o órgão responsável pela análise criminal, um grupo de cientistas é requerido para analisar as evidências ⁽⁹⁾. Essa investigação utiliza como base a Lei de

Locard: “Todo contado deixa uma marca”. A ciência forense se baseia nessa Lei para revelar e analisar vestígios do criminoso. Existem alguns profissionais que são responsáveis por realizar a perícia criminal como o perito, papiloscopista e o médico legista ⁽¹⁰⁾.

Os peritos precisam reunir evidências que auxiliem na compreensão do que e como ocorreu o crime. Existem alguns roteiros que podem auxiliar o investigador a entender o que ocorreu na cena do crime. A análise científica oferece o suporte da investigação confirmando ou excluindo suspeitos através das análises das provas (material coletado no local do crime que possa estar ligado ao crime e que possua informações importantes como material genético e digital. Um exemplo de roteiro a ser seguido está escrito abaixo ^(1, 11):

- Qual evento ocorreu?
- Onde ocorreu?
- Quando e em qual sequência?
- Quem estava no local durante o evento?
- Quem não estava no local durante o evento?
- O que não ocorreu?

Cada busca por vestígios de um crime segue uma sequência para não ocorrer perdas ou contaminação das evidências. As etapas realizadas na busca por manchas de sangue seguem a seguinte ordem ⁽¹⁾:

- 1) Obter registros fotográficos de todo o local e dos materiais encontrados na cena.
Além de desenhos e registros escritos ou audiovisuais do local;
- 2) Examinar minuciosamente todo o local para encontrar evidências de sangue;
- 3) Na obtenção de possíveis manchas de sangue: aplicar teste preliminar para a identificação de sangue;
- 4) Em caso de cena limpa, mas com suspeita de agressão: aplicar produtos para identificação de sangue latente;
- 5) Coletar material suspeito com swab estéril para futura análise de material genético;
- 6) Realizar um teste específico para sangue;
- 7) Determinar a origem biológica: animal ou humano;
- 8) Para manchas de sangue com pouca visibilidade: aplicar corantes para sangue;
- 9) Análise de DNA.

2.3. ANÁLISE DO PADRÃO DAS MANCHAS DE SANGUE

Em uma cena de crime é possível encontrar uma diversidade de evidências físicas sendo elas biológicas (sangue, sêmen, cabelo, por exemplo) ou não. Entre essas provas, uma das mais significantes e que é frequentemente encontrada em locais com morte e/ou violência é o sangue ^(1, 2, 12).

A análise do sangue como tentativa de individualizá-lo iniciou em 1901 com o estudo do sistema ABO. Este estudo foi utilizado por muitos anos, o que gerou alguns casos de erros nas condenações de criminosos. Apenas no final dos anos 70 é que foi possível realizar a identificação do suspeito através da caracterização das isoenzimas das células vermelhas e dos marcadores genéticos (ácido desoxirribonucleico - DNA), que são únicos para cada indivíduo. Dessa forma, manchas de sangue coletadas no local, nas roupas da vítima ou do acusado contribuem para a reconstituição, podendo relacionar uma pessoa a cena do crime ⁽¹⁾.

A identificação e individualização do sangue humano faz parte da análise do padrão das manchas de sangue (bloodstain pattern analysis - BPA). Este estudo avalia o tamanho, a forma e a distribuição das manchas provenientes de eventos com derramamento de sangue. Dessa forma, pode-se determinar os tipos de atividades e mecanismos que os originaram. Também são utilizados modelos matemáticos e programas computacionais para elaboração da BPA ^(1, 11, 12).

Em conjunto, os estudos de BPA, DNA e necropsia constitui a base da reconstrução de cenas de crime e permite-se esclarecer fatos como homicídio, suicídio, acidente ou morte natural. Além disso, o estudo BPA possibilita a identificação de fatos importantes como ^(1, 11):

- Áreas de convergência e origem de manchas de sangue;
- Tipo de material e direção do impacto que produziu a mancha;
- Mecanismo pelo qual as manchas foram produzidas;
- Entender como o sangue foi depositado sobre os itens;
- Possível movimentação e direção da vítima, do agressor ou dos objetos após ou durante o crime;
- Suporte ou contradição das declarações dadas por acusados e testemunhas;
- Critério adicional para estimar o intervalo pós morte;
- Correlação com outros resultados laboratoriais e patológicos para confirmação de alguma suspeita.

2.4. TIPOS DE MANCHAS DE SANGUE

A BPA ajuda na reconstrução do crime dando pistas de qual tipo de objeto foi usado, como e onde foi utilizado. O formato, a largura e o volume de sangue de uma mancha dependem da fonte e da forma com que ela foi originada. Por exemplo, um objeto pontiagudo origina gotas de sangue menores do que as formadas por objetos contundentes⁽¹¹⁾. No exemplo do martelo, Figura 3, os dois lados originam padrões de gotejamentos diferentes. O lado estreito formará gotas pequenas, por ter menor volume de sangue, já o outro formará gotas maiores, com grande quantidade de sangue⁽¹⁾.

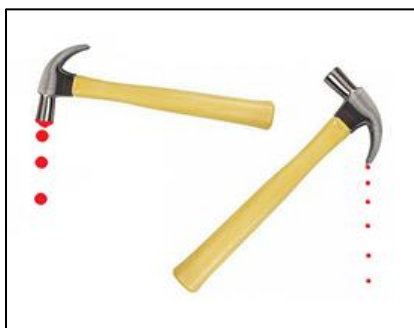


Figura 3: Diferença do volume das gotas de sangue em materiais de diferentes tamanhos e formas.

A altura que a gota percorre até atingir o chão modifica o diâmetro da mancha, quanto maior o percurso, maior será o diâmetro. Esta relação é descrita por uma curva exponencial, entretanto, após uma determinada altura (2 metros) o diâmetro não varia significativamente⁽¹⁾. Contudo, a análise mais significativa é a da direção dos respingos. Esta análise evidencia o ponto de origem, ou seja, a posição da vítima no momento do golpe^(1, 11).

O ângulo de incidência da gota de sangue com a superfície faz com que a mancha tenha uma distorção, formando uma elipse. Quanto menor o ângulo de incidência maior será o comprimento da elipse. Esta relação pode ser observada na Figura 4. Além disso, um dos lados da elipse fica com maior concentração de sangue indicando que é o lado terminal. Por exemplo, se a direção de incidência foi da esquerda para a direita, a mancha terá maior acúmulo de sangue no lado direito⁽¹⁾.

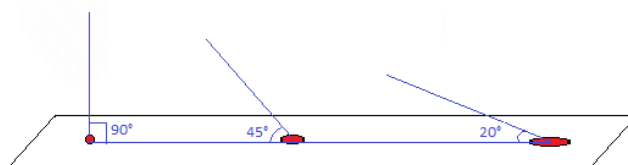


Figura 4: Relação do ângulo de incidência com o formato da mancha de sangue na superfície.

A forma de calcular o ângulo de incidência consiste em medir os dois lados da elipse. O menor lado é equivalente ao diâmetro da gota. Realizando a projeção do percurso da gota forma-se um triângulo retângulo em que o ângulo de incidência pode ser calculado pelo seno do triângulo, em que o cateto adjacente é o maior lado da elipse (representado pela letra X na Figura 5) e o cateto oposto é o diâmetro da gota (representado pela letra d na Figura 5). O ângulo de incidência da gota na superfície é representado pela letra α ⁽¹⁾. Traçando a direção das gotas de sangue com a angulação calculada é possível encontrar o ponto de convergência que indica a posição da vítima no momento do golpe ⁽¹⁾.

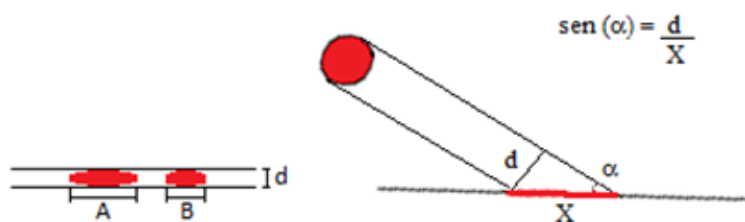


Figura 5: Formato da mancha de sangue após atingir a superfície em diferentes ângulos (elipses A e B) e cálculo do ângulo de incidência da gota de sangue na superfície.

As manchas de sangue podem ser classificadas de 3 formas: passivas, respingos ou alteradas ^(1, 11).

1. Passivas: São aquelas que apenas apresentam características físicas de serem criadas pela força da gravidade e pela fricção, sem a aplicação de uma força externa significativa. São as mais comuns. Podem ser identificadas como gotas sozinhas, múltiplas ou em trilhas, poças de sangue ou piscina (manchas com grande volume de sangue), fluxo de sangue ou transferidas por pancadas fortes ⁽¹⁾.
2. Respingos: São manchas que apresentam direcionalidade, variam em tamanho e estão associadas a uma fonte de sangue que foi sujeita a uma força externa, além da gravidade e fricção. Essas podem ser criadas de 3 formas:

- Mecanismo secundário: são chamadas de respingos de satélite. São respingos criados por gotas incidentes no mesmo local, criando um volume de sangue que quando outra gota atinge ocorre a projeção de respingos lateralmente (Figura 6).
- Mecanismos de impacto: formadas pelo uso de armas de fogo, por espancamento, esfaqueamento e outras ferramentas.
- Mecanismo de projeção: originada de sangue arterial, expirado (projetado pelo nariz e boca, por exemplo) e o lançado. O tipo lançado são respingos provocados por algum objeto em movimento no qual a força centrífuga atua projetando gotículas de sangue pelo trajeto do objeto ⁽¹⁾.

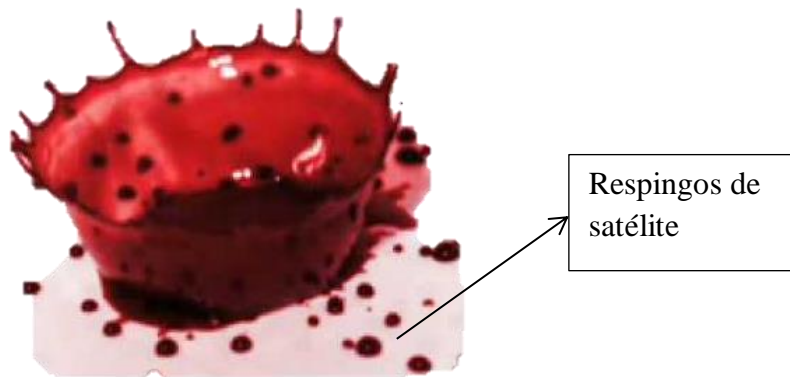


Figura 6: Método de formação dos respingos de satélite.

3. Alteradas: A aparência dessa marca mostra que o sangue sofreu alterações físicas ou fisiológicas. Essas alterações podem ser coagulação, diluição, difusão, marcas formadas por insetos, marcas formadas pela falta de sangue no meio da poça e por sequência de manchas. Um exemplo da forma sequencial é uma camisa que foi suja de sangue em algum golpe durante o crime e possui outra marca por cima por encostar em algum lugar com sangue, formando duas manchas sequências no mesmo lugar ⁽¹⁾.

2.5. TESTES PRELIMINARES DE SANGUE

Os testes preliminares de sangue são utilizados como forma inicial da análise de sangue. Serve para pré classificar as marcas encontradas em cenas de crime como possível material sanguíneo. Os testes consistem em utilizar reações colorimétricas ou luminescentes. Ambos

os tipos dependem das propriedades catalíticas do sangue, através da atividade das peroxidases e do ferro das hemoglobinas ^(1, 2).

2.5.1. Testes colorimétricos

Os testes catalíticos (colorimétricos) consistem na oxidação química, catalisada pelo sangue, da substância cromogênica através de um agente oxidante ^(2, 3). Essa análise é realizada coletando o material suspeito com swab, então são adicionadas gotas da solução que possui o cromógeno sobre a amostra coletada e em seguida o agente oxidante (normalmente uma solução 3% de peróxido de hidrogênio) ^(1, 5). O rápido aparecimento da cor característica do teste realizado indica um resultado potencialmente positivo para a presença de sangue. Em alguns métodos a formulação envolve a misturado corante com o agente oxidante. Isso pode influenciar o resultado gerando falsos positivos, pois uma substância suspeita pode reagir com o cromógeno sem necessitar do agente oxidante, ou seja, ao aplicar o cromógeno a cor já apareceria, sem precisar da adição do oxidante, porém quando os dois estão em uma única solução não é possível identificar essa diferença. Isso pode ocorrer em presença de oxidantes químicos como, por exemplo, dióxido de manganês, cobre ⁽¹⁾.

Se a cor demorar muito tempo para aparecer, o teste pode ser considerado negativo, pois o aparecimento lento da cor pode ser resultado de uma lenta oxidação do corante que pode ocorrer na presença do ar. Esses testes podem ser utilizados em manchas de sangue expostas há muito tempo ao ar sem perdas na qualidade da análise ⁽¹⁾.

2.5.1.1. Benzidina – Teste de Adler

Este teste foi desenvolvido por volta de 1900 ⁽³⁾, esse foi um dos testes mais utilizados, porém, por ser cancerígeno, não é mais empregado. Essa reação normalmente ocorre em uma solução de etanol/ácido acético ⁽²⁾. A Benzidina, Figura 7, na presença do peróxido de hidrogênio e das enzimas peroxidases, é oxidada formando um produto de cor azul/azul escuro que pode eventualmente se tornar marrom ⁽¹⁾.

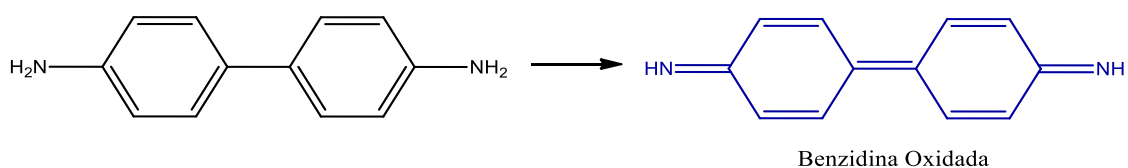


Figura 7: Reação de oxidação da Benzidina.

2.5.1.2. *o*-Tolidina

O uso da *o*-Tolidina (Figura 8) foi proposto como otimização do teste da Benzidina visando diminuir a sua toxicidade. Contudo, foi reportado o seu efeito cancerígeno em ratos após 14 anos do seu desenvolvimento. Sendo assim, pelo mesmo motivo da Benzidina, ela não é mais utilizada. Este teste é realizado em condições ácidas e gera um produto de coloração azul escuro ^(1, 2).

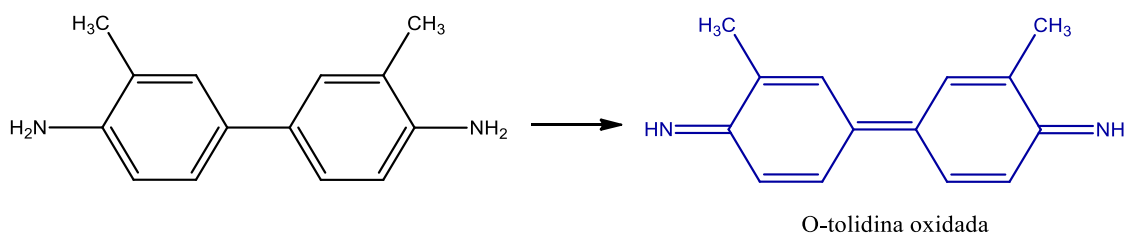


Figura 8: Reação de oxidação da *o*-Tolidina.

Em 1981 a *o*-Tolidina foi utilizada como reagente do teste Hemastix[®] que analisa a presença de sangue na urina. Este teste é apresentado na forma de fita de pH. Os testes toxicológicos continuaram evoluindo e então esse reagente foi substituído pela Tetrametilbenzidina (TMB) ⁽¹⁾.

2.5.1.3. Tetrametilbenzidina

A fim de aprimorar os *o*-Tolidina, foram realizados estudos sobre o efeito cancerígeno das mesmas e foi descoberto que o metabólito 3,3'-dihidroxibenzidina era mais tóxico. Para evitar a *orto* hidroxilação que ocorria em vivo originando esse composto, foi necessário metilar as posições *orto* do reagente (Benzidina), produzindo dessa forma o TMB (Figura 9). Foi observado um efeito cancerígeno menor do que quando comparado ao uso da Benzidina e *o*-Tolidina. Este teste também é realizado em meio ácido, oxidando o TMB gerando uma cor que varia do verde ao azul esverdeado ^(1, 2).

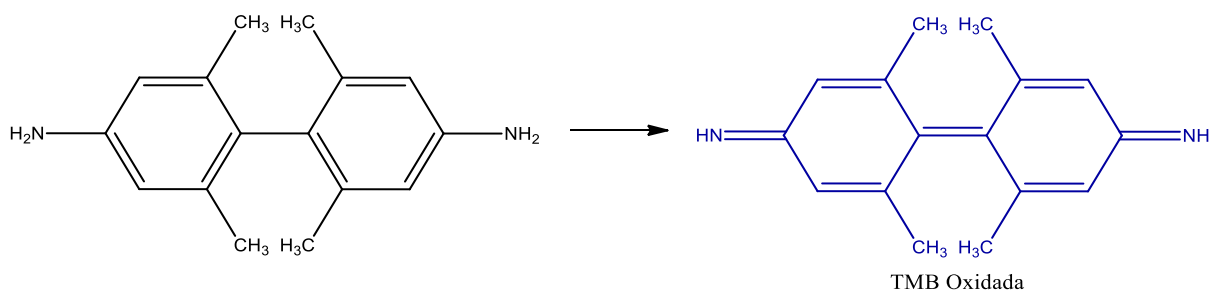


Figura 9: Reação de oxidação da Tetrametilbenzidina.

Assim, o Hemastix® (Figura 10) passou a utilizar o TMB como ingrediente ativo impregnado nas fitas⁽²⁾. Essa análise consiste em umedecer um swab, para coletar a amostra suspeita, e colocar esse em contato com a fita Hemastix®. A mudança da cor amarela (padrão da fita) para a verde escuro indica resultado potencialmente positivo. Swabs pré tratados com cosméticos podem contribuir para falso positivos⁽¹⁾. Alguns frascos de Hemastix® indicam o nível de hemoglobina em determinada amostra relacionando a cor da fita com uma escala de coloração que indica a concentração de hemoglobina, ou seja, concentração de sangue⁽¹³⁾.



Figura 10: Kit de 50 fitas de Hemastix®⁽¹³⁾.

2.5.1.4. Fenolftaleína – Teste Kastle-Meyer

O teste Kastle-Meyer é o mais utilizado. A Fenolftaleína, muito utilizada como indicador ácido/base, possui cor rosada quando em meio básico e incolor em meio ácido. Para a identificação do sangue, Kastle e Meyer desenvolveram essa técnica em 1903⁽³⁾, provocando a redução da fenolftaleína para a forma *leuco* na presença de zinco usando solução de hidróxido de potássio. Essa forma reduzida é incolor em meio básico^(1, 2). Dessa forma, adiciona-se a *leuco* Fenolftaleína em solução alcalina sobre a amostra suspeita, espera-se alguns segundos e se adiciona o peróxido de hidrogênio (agente oxidante da reação). Se houver o aparecimento de uma cor rosa avermelhada significa que a forma reduzida foi oxidada, possivelmente, pela presença de sangue que catalisa essa reação (Figura 11)^(1, 14). É necessário esperar alguns segundos para colocar o agente oxidante, pois assim evita-se oxidação do reagente pela amostra suspeita⁽¹⁴⁾. Alguns falsos positivos conhecidos são as reações envolvendo vegetais, como batata e raiz forte, que possuem oxidantes fortes o suficiente para realizar essa reação sem a adição do agente oxidante⁽¹⁴⁾.

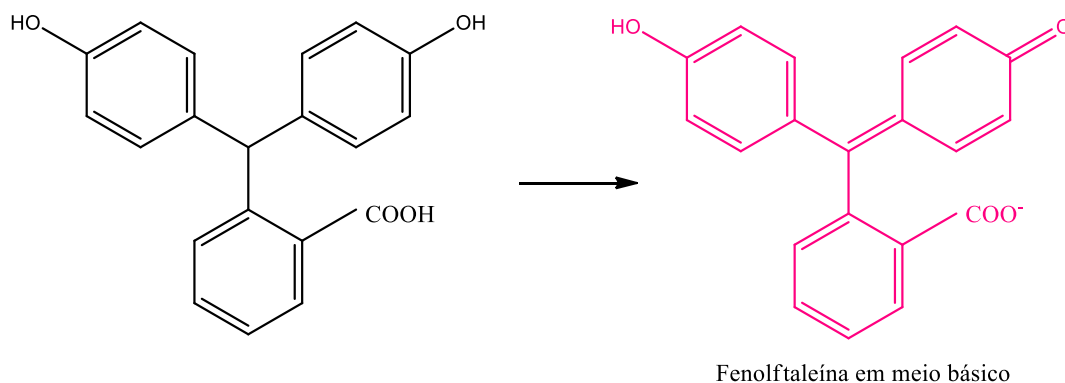


Figura 11: Reação de oxidação da Fenolftaleína em meio básico.

2.5.1.5. *Leuco Verde Malachita*

O teste *Leuco Verde Malachita* foi desenvolvido em 1904 ⁽³⁾, como os outros, é catalisado na presença do sangue que oxida o grupo pré-cromóforo para a obtenção da cor verde (Figura 12) ^(1, 14). Semelhante ao teste da Benzidina, a reação também ocorre em meio ácido e na presença do peróxido de hidrogênio ^(1, 2). O teste é potencialmente positivo se a cor obtida for verde. A sensibilidade desse teste é 1:10.000. Esse teste é menos específico que o da Fenolftaleína, mas possui maior sensibilidade ⁽¹³⁾.

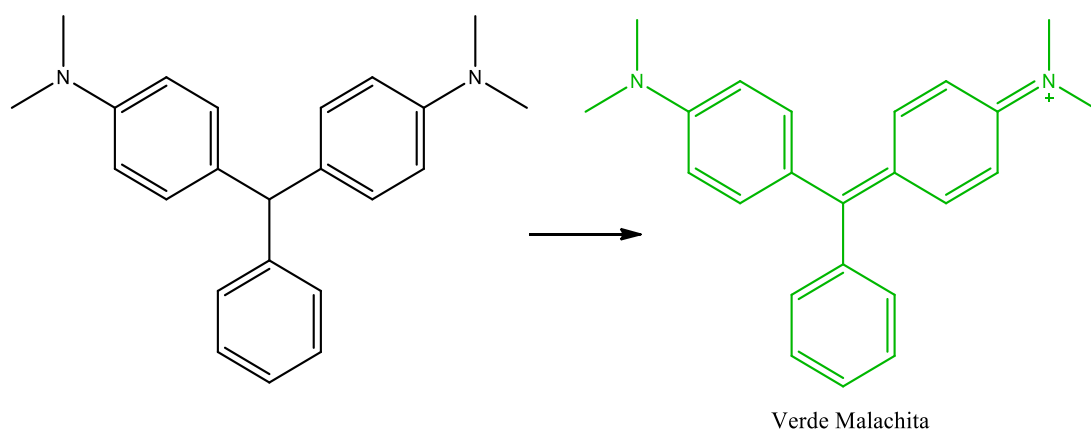


Figura 12: Reação de oxidação do *Leuco Verde Malachita*

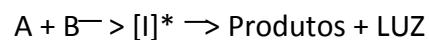
2.5.2. Testes luminescentes

Em alguns casos a cena do crime pode ter sido limpa para ocultar as evidências, porém, normalmente ficam traços de sangue ocultos. Nessa situação, é necessária a utilização de reagentes mais sensíveis. Testes que emitem luminescência tendem a ter uma maior sensibilidade que os colorimétricos. Existem muitos tipos de luminescência, sendo que as mais utilizadas para a análise de sangue são a fluorescência e a quimioluminescência ⁽¹⁵⁾.

Dois testes muito utilizados para identificar sangue latente, devido a sua alta sensibilidade, são o que emprega o Luminol e a Fluoresceína ^(1, 2).

A técnica consiste em borrifar uma solução contendo o reagente sobre a área que se suspeita estar contaminada com sangue. Esta análise deve ser realizada em locais com pouca ou nenhuma luminosidade. O aparecimento da luminescência é registrado com câmeras fotográficas. Estudos mostram que essas substâncias são irritantes e devem ser utilizadas com controle e equipamento de proteção individual (EPI) ⁽¹⁾.

O Luminol sofre um processo quimioluminescente, ou seja, durante a reação química ocorre a formação de um estado de transição altamente energético que libera energia na forma de luz fria ⁽¹⁶⁾. Esta reação pode ser representada da seguinte forma:



Onde A e B são os reagentes e $[I]^*$ é a configuração de um intermediário de reação no estado excitado ⁽⁴⁾. No caso do Luminol, essa luz (quimioluminescência) dura apenas alguns segundos, mas essa propriedade varia com cada formulação ⁽¹⁶⁾. Já a Fluoresceína é um reagente fluorescente que ao ser exposto a um comprimento de onda específico passa para um estado excitado e ao voltar ao estado fundamental libera energia na forma de luz. Essa luminescência só dura enquanto a substância está sob a fonte energética excitatória ⁽¹⁾. Esses tipos de luminescência podem ser explicados pelo diagrama de Jablonski (Figura 13). Quando a molécula absorve energia ela muda do estado singleto de baixa energia (S_0) para o estado singleto de maior energia (S_2 ou S_1), então ocorre a conversão interna de energia do S_2 para o estado singleto excitado S_1 , se necessário. A energia liberada para retornar ao estado S_0 pode ser emitida sob forma de fluorescência ou quimioluminescência (depende da forma que essa excitação ocorreu) ou simplesmente ser dissipada de forma interna, como por vibrações. Se houver a conversão interna do sistema passando do estado singleto S_1 para o estado tripleto T_1 , então a liberação da energia para retornar ao S_0 será na forma de emissão de fosforescência ^(16, 17, 18, 19, 20).

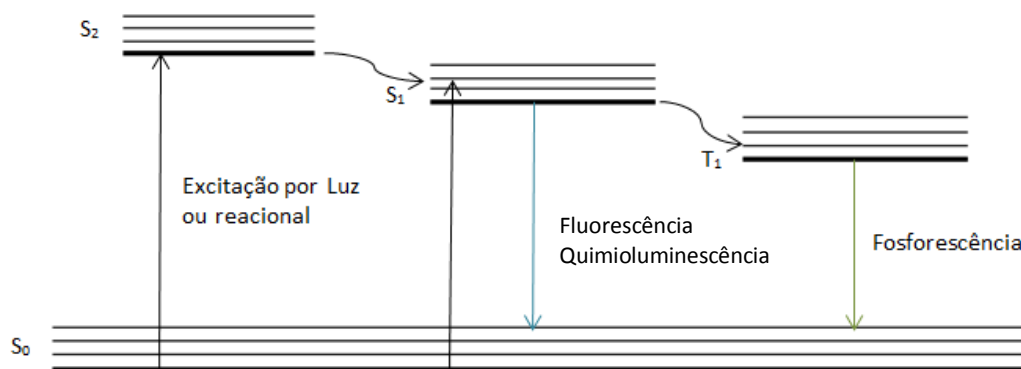


Figura 13: Diagrama de Jablonski simplificado.

2.5.2.1. Luminol

O Luminol (3-aminofthalhidrazina), Figura 14, e a sua propriedade quimioluminescente é conhecida há muitos anos, porém apenas em 1937 foi aplicada na ciência forense para a identificação de sangue ^(12, 21). Essa análise é um teste preliminar com alta sensibilidade, sendo utilizado na identificação de sangue latente, isto é, aquele imperceptível a olho nu. Geralmente são locais que foram limpos com o objetivo de ocultar as evidências ⁽²²⁾.

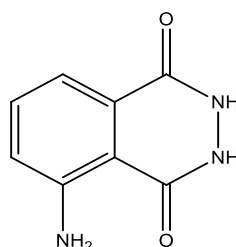


Figura 14: Estrutura química do Luminol.

O Luminol é capaz de emitir quimioluminescência na cor azul claro após ser oxidado em meio ácido ou alcalino, sem necessitar de uma fonte de luz ⁽¹²⁾. Em meio básico a reação ocorre com a presença de agentes oxidantes ⁽²³⁾. O método de oxidação do Luminol é complexo e a teoria que melhor explica é que esse reagente sofre uma reação de oxirredução na presença do ferro da hemoglobina e do peróxido de hidrogênio ⁽¹⁾. Durante a reação um intermediário (3-aminofthalato) absorve energia passando para um estado tripleto excitado, então ocorre a interconversão de sistema para o estado singleto excitado, liberando a energia em forma de luz para retornar ao estado singleto fundamental ^(12, 16,23, 24). O mecanismo de oxidação do Luminol está na Figura 16. Esse mecanismo ocorre porque a hemoglobina catalisa essa reação por causa da presença do ferro no grupo heme. Dentro da corrente sanguínea o ferro está no estado de oxidação 2+ e quando exposto ao ar oxida

para ferro 3+, essa mudança do estado de oxidação modifica a cor do sangue de vermelho para marrom ⁽¹²⁾. O peróxido de hidrogênio consegue oxidar o ferro para o estado de oxidação 4+, que é altamente oxidante. Dessa forma ocorre a reação de oxi-redução: o Luminol oxida emitindo luz enquanto o ferro reduz para 3+ (Figura 15). O ciclo pode ser reproduzido aplicando uma nova solução ao local ⁽¹⁾.

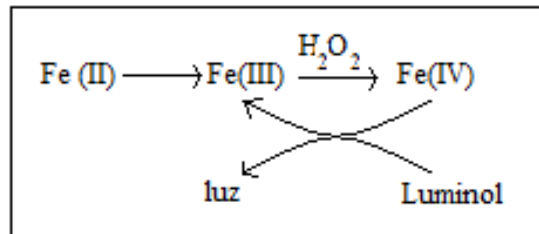


Figura 15: Mecanismo de oxiredução do Luminol e do Ferro na presença do peróxido de hidrogênio.

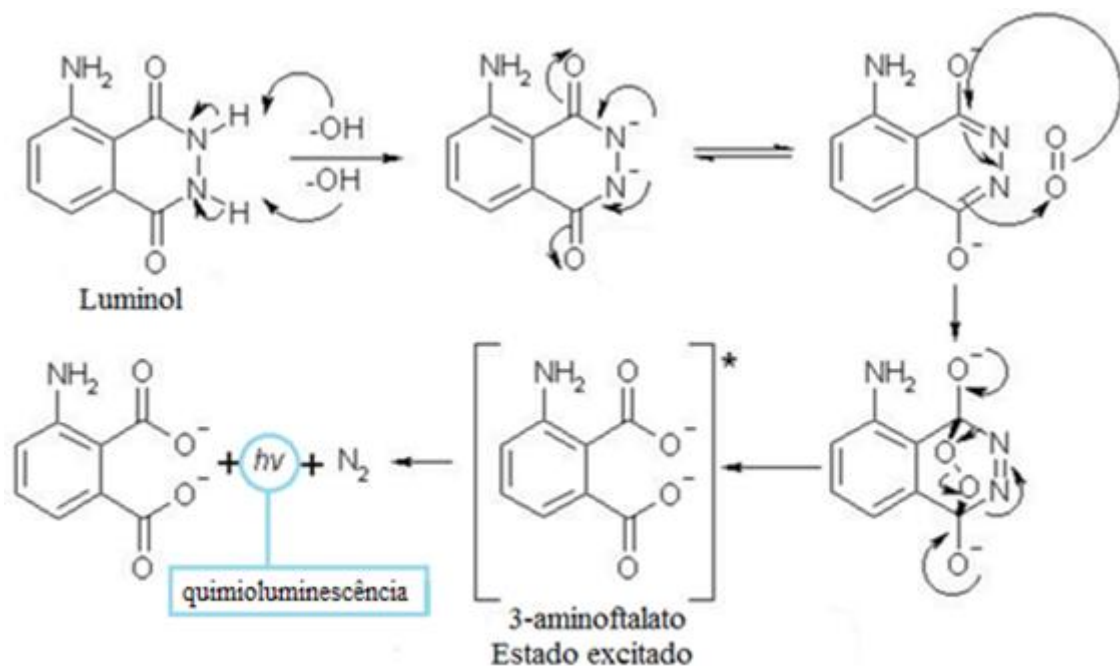


Figura 16: Mecanismo de oxidação do Luminol.

Como o sangue permite a análise de DNA é importante que os reagentes não degradem o mesmo. O Luminol praticamente não interfere na análise para determinação de origem, sistema ABO e DNA ^(1, 14, 12, 25). Já o hipoclorito de sódio, material de limpeza utilizado para ocultar manchas de sangue em cena de crime, agride mais o DNA, mas mesmo assim é

possível fazer a identificação ⁽²⁶⁾. O grande problema que pode ocorrer para a análise de DNA é utilizar muita solução de Luminol diluindo a amostra de sangue, o que dificulta a obtenção da tipagem ⁽⁴⁾.

A alta sensibilidade dessa técnica é em média de 1:100.000 ⁽¹³⁾. Este dado varia bastante com a fonte pesquisada ^(4,17). A intensidade da luminescência varia com a concentração de sangue, quanto mais diluído menor é a luminescência. Como alternativa, existe o reagente comercial BlueStar[®] que é vendido para a identificação de sangue latente. A vantagem em relação ao Luminol é a produção da quimioluminescência que é mais intensa e com maior tempo de duração ⁽²⁷⁾. As Figuras 17 e 18 mostram a quimioluminescência emitida pelo Luminol e pelo Bluestar[®] quando eles foram aplicados sobre manchas de sangue latente apresentando resultado positivo. Contudo, a combinação do Luminol com a Fluoresceína (Luminescence), técnica relativamente nova, mostra ser melhor que o BlueStar[®] para alguns casos, principalmente para sangue muito diluído ^(4, 28).



Figura 17: Aplicação do Luminol para identificação de sangue latente em uma banheira ⁽²⁹⁾.



Figura 18: Aplicação do BlueStar[®] para revelação de sangue latente em uma pia ⁽²⁷⁾.

As principais limitações dessa técnica são que as análises devem ser realizadas em locais escuros, a quimioluminescência dura em torno de 30 segundos e o registro fotográfico exige conhecimento e técnicas em fotografia para obter uma imagem de qualidade ^(22, 30). Como o Luminol é uma análise preliminar, pois não reage com o sangue, ao invés disso é

catalisado por este, existe a possibilidade de outras substâncias oxidarem esse reagente gerando a quimioluminescência. Alguns exemplos dessas substâncias são enzimas peroxidases de plantas, hipoclorito de sódio e outros metais ^(12, 21, 23, 24, 31). O falso positivo gerado por alguns vegetais normalmente possui uma quimioluminescência mais fraca do que a obtida com sangue, com algumas exceções. Algumas superfícies também podem oxidar o Luminol, portanto o mais indicado é realizar um teste em branco nos locais do crime ⁽²¹⁾. Uma vantagem é que ele não reage com outros fluidos corporais como saliva, sêmen e urina ^(1, 22).

A aplicação desse reagente pode ser feita em qualquer superfície. As superfícies horizontais e porosas permitem uma melhor análise do padrão das manchas de sangue por manter as marcas definidas, o que não acontece nas superfícies verticais ou não porosas. Uma forma de solucionar esse problema é realizar a fixação do sangue antes da aplicação do Luminol ⁽⁴⁾. Quando o sangue é limpo em um local de crime o tipo de superfície influencia na análise, pois uma superfície porosa ou rugosa dificulta a limpeza, deixando sempre algum vestígio mesmo que não seja visível ^(1, 22). Porém superfícies não porosas são mais fáceis de limpar completamente. O que dificultaria essa limpeza é a presença de frestas, reboco ou rejunte que absorvem o sangue. Como a limpeza costuma ser realizada rapidamente ficam pequenos indícios de sangue, possibilitando a identificação pelo Luminol. Por exemplo, um estudo foi realizado limpando um local com sangue utilizando hipoclorito de sódio e medindo a intensidade da quimioluminescência a cada etapa. O resultado mostrou que com as lavagens a intensidade decaiu, pois diminuiu a concentração de sangue chegando um momento em que estava tão baixa que não influenciava no resultado. Porém a quantidade de hipoclorito no local aumenta e como esse produto também gera a oxidação do Luminol, a intensidade da quimioluminescência tem um pequeno aumento ^(12, 32). Vale ressaltar que a reação do sangue com o Luminol gera uma quimioluminescência homogênea, com duração aproximada de 30 segundos, enquanto que a produzida com o hipoclorito é muito rápida (tipo um flash) e decai em poucos segundos. Esse interferente pode ser resolvido de duas formas: esperando o hipoclorito evaporar por aproximadamente 2 dias ou adicionando glicina em pH 12. Isso faz com que a intensidade da quimioluminescência decaia significativamente, pois a reação da glicina com o hipoclorito é rápida, inibindo dessa forma a reação com o Luminol ^(12, 23).

Apesar de ser uma técnica muito sensível, ela não é adequada para exibir os detalhes, como digitais, apenas marcas maiores onde o que interessa são os formatos e não as minúcias ⁽²²⁾. Estudos com o uso do Luminol mostram a sua alta sensibilidade principalmente para manchas de sangue em superfícies porosa. Como exemplo da grande sensibilidade dessa técnica foi comprovado a possibilidade de identificar manchas de sangue em camisetas após alguns ciclos de lavagens realizados de formas diferentes obtendo resultados positivos para todas as situações ⁽³³⁾. O sangue também pode ser identificado em paredes que foram pintadas, pois, ao colocar a tinta fresca, o sangue se mistura a ela ao invés de formar uma película protetora ⁽¹⁴⁾. Também é possível identificar marcas de sangue em solo mesmo após 6 anos de exposição à intempéries climáticas ⁽³⁴⁾.

Alguns exemplos de interferências realizadas na análise com Luminol é a utilização de antioxidantes na presença de sangue, como extratos de chá, isso faz com que a quimioluminescência do reagente decaia significativamente ⁽³⁵⁾. Também, existe a possibilidade de queimar a cena do crime com o objetivo de destruir quaisquer evidências. Uma análise feita com Luminol e BlueStar[®] mostrou que após queimar por 1 minuto o local, o sangue fica praticamente imperceptível para o Luminol, porém com o BlueStar[®] é possível detectar a quimioluminescência mesmo após 5 minutos de queima ⁽³⁶⁾. Como os veículos são normalmente utilizados para transportar corpos para desova, é comum procurar vestígios de sangue dentro de carros com suspeita de terem sido utilizados para esses casos. As análises mostram que poucos materiais do interior dos veículos geram falsos positivos e além disso, a limpeza não é eficiente, sendo facilmente detectável traços de sangue. Outro fator favorável para a busca de vestígios de sangue nos veículos é que a temperatura interna dos carros, por exemplo, costuma ser mais elevada quando expostos ao sol. Isso favorece a análise gerando uma maior intensidade de quimioluminescência, pois favorece a conversão do estado de oxidação da hemoglobina para Fe³⁺ ⁽³⁷⁾.

A utilização do Luminol consiste em fazer a solução de uso momentos antes de ser utilizada, pois o Luminol degrada, na presença do agente oxidante, com o tempo ⁽¹⁾. Existem várias preparações diferentes para a solução de uso e isso interfere na quimioluminescência. Algumas permitem uma emissão mais intensa e duradoura do que outras. As mais conhecidas são as propostas por Grodsky em 1951 e por Weber em 1966 ^(1, 12). As formas de preparo estão citadas na tabela I ⁽¹⁶⁾. O aumento da concentração ou do tipo de agente

oxidante interfere na intensidade da luminescência mais do que a variação da concentração do reagente ⁽²²⁾. A melhor e mais utilizada forma para aplicar essa solução é com o uso de um borrifador ⁽¹⁴⁾.

Tabela I: Formulações para o preparo das soluções de uso do Luminol segundo Grodsky e Weber ^(1, 16).

Grodsky	Weber
<ul style="list-style-type: none"> • 3,5 g de perborato de sódio • 500 mL de água destilada • Misturar e agitar até completa dissolução • Adicionar 0,5 g de Luminol e 25 g de carbonato de sódio • Agitar até completa dissolução • Colocar a mistura para o borrifador e usar imediatamente. 	<ul style="list-style-type: none"> • Solução A: 8 g de hidróxido de sódio dissolvidos em 500 mL de água destilada. • Solução B: 10 mL de peróxido de hidrogênio 30% com 490 mL de água destilada • Solução C: 0,354 g de Luminol dissolvidos em 62,5 mL da solução A e completar com água destilada até 500 mL • Essas soluções podem ser armazenadas a 4°C e sem luz direta. • Solução de uso: misturar 10 mL de cada solução (A, B e C) e completar com água destilada até 100 mL. • Colocar a mistura para o borrifador e usar imediatamente.

Muitos artigos apresentam variações para a síntese do Luminol. A maioria retrata ser uma síntese fácil e acessível. Apesar das modificações de tempo, temperatura e reagentes, todas seguem as mesmas etapas. Partindo do primeiro precursor, o anidrido ftálico, é necessário nitrar o carbono 3, reagir o ácido ftálico formado com hidrazina e, por fim, reduzir o grupo nitro para amino. O esquema dessa reação está representado na Figura 19 ^(4, 38, 39, 40). A pesquisa por derivados do Luminol é grande, pois o objetivo é criar novos

reagentes que tenham a emissão da quimioluminescência em um comprimento de onda mais elevado ou por mais tempo e mais intenso ^(41, 42).

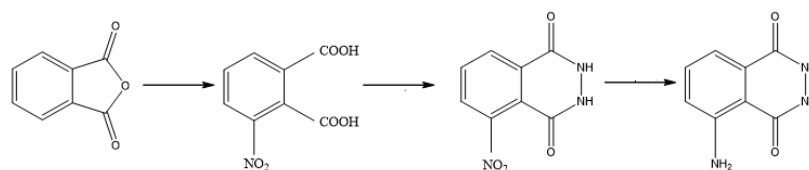


Figura 19: Etapas da rota sintética do Luminol.

2.5.2.2. Fluoresceína

A Fluoresceína é um fluoróforo da família das xantanas ⁽⁴³⁾ (molécula capaz de emitir luz quando exposto a um comprimento de onda específico) muito utilizada para fins biológicos, bioquímicos e medicinais ⁽⁴⁴⁾, assim como seus derivados, que são produzidos e estudados para novas finalidades, possuindo diferentes comprimentos de onda para a emissão de fluorescência ^(18, 43, 45, 46, 47, 48).

A utilização da Fluoresceína para análise de sangue foi descoberta em 1910. A aplicação dessa técnica exige cuidados semelhantes a do Luminol no quesito segurança e na forma de aplicação da solução sobre as superfícies ⁽¹⁴⁾. O preparo desse reagente é semelhante ao da Fenolftaleína: a Fluoresceína é reduzida em meio alcalino com o uso de zinco, então esse produto reduzido é utilizado na análise da presença de sangue. A atividade catalítica do sangue auxilia na oxidação junto com o peróxido de hidrogênio. O produto oxidado é a Fluoresceína que emite fluorescência na cor verde amarelada quando submetida à excitação com um comprimento de onda específico de 494nm ^(1, 12). A Figura 20 mostra a estrutura e o resultado positivo da Fluoresceína para a análise de sangue latente.

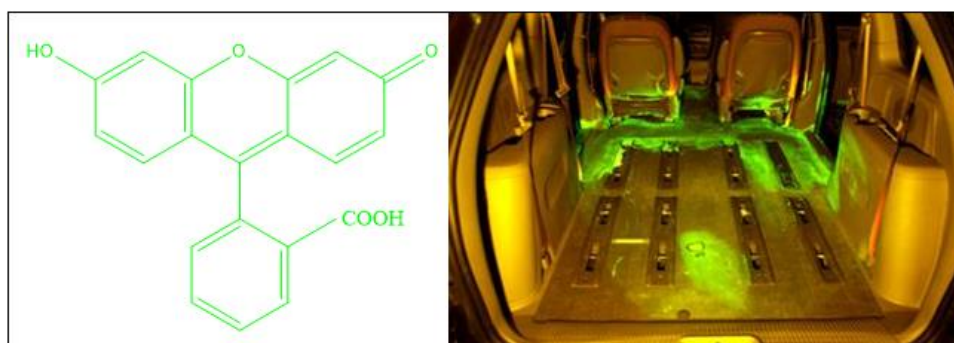


Figura 20: Estrutura química da Fluoresceína e a sua aplicação na revelação de sangue dentro de um veículo ⁽⁴⁹⁾.

Diferente do Luminol, a Fluoresceína necessita de um espessante comercial para aderir sobre a amostra de sangue. Por este motivo é indicado para superfícies verticais, pois não deforma as marcas como o Luminol. Essa substância não gera falso positivo em contato com hipoclorito de sódio ⁽¹⁴⁾. Estudos comprovam que não há degradação do DNA com a utilização desse reagente ⁽¹⁾.

2.6. TESTES DEFINITIVOS DE SANGUE

Existem alguns tipos de testes definitivos para sangue como: cristalográficos, microscópicos, espectroscópicos, imunológicos e cromatográficos. Os testes cristalográficos são os únicos que reagem com a hemoglobina obtendo cristais específicos ⁽³⁾. Diferentes dos testes preliminares que são catalisados pelas propriedades oxidativas, esses reagem diretamente com substâncias presentes no sangue. Não há falso positivo para essas análises ⁽¹⁾. Existem dois testes cristalográficos que foram muito utilizados (Teichmann e Takayama), porém o mais moderno, que além de identificar sangue verifica se é de origem humana, é o teste imunológico. Essa análise precipita as hemoglobinas do sangue humano através da utilização de uma anti-hemoglobina específica ⁽²⁾.

2.6.1. Teste de Teichmann

Este teste foi desenvolvido em 1850 e consiste em aquecer sangue seco com ácido acético glacial na presença de um halogênio (normalmente cloreto) para formar um derivado do grupo Heme em forma de cristais rômnicos e de cor marrom, como mostra a Figura 21 ^(2, 3). Este teste apresenta dificuldade no controle do aquecimento, podendo ser maior ou menor que o necessário para formar os cristais e pode dar um resultado falso negativo ⁽¹⁾.



Figura 21: Cristais formados no resultado positivo do teste de Teichmann ⁽⁵⁰⁾.

2.6.2. Teste Takayama

Essa análise, desenvolvida em 1912, realiza um aquecimento brando do sangue com piridina em condições alcalinas e na presença de açúcar, como glicose^(2, 3). Assim a piridina liga-se ao ferro do grupo Heme formando um cristal de aproximadamente 2mm, como mostra a Figura 22. Este teste é considerado mais exato que o de Teichmann por não a etapa de aquecimento que, se for realizada de forma inapropriada, pode resultar em um falso negativo⁽¹⁾.

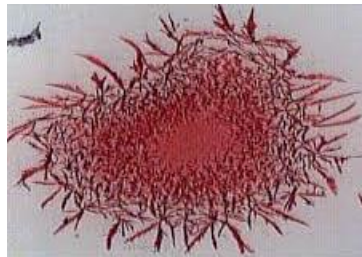


Figura 22: Cristais formados no teste de Takayama para sangue⁽⁵¹⁾.

2.7. REAGENTES UTILIZADOS PARA REALÇAR IMPRESSÕES COM SANGUE

Esses reagentes são corantes que se ligam à marcas de sangue muito fracas gerando uma nova tonalidade⁽¹⁾. Isso permite uma melhor visualização dessas manchas podendo obter detalhes importantes de digitais ou outras impressões como palmar, plantar, sola de calçado, entre outros⁽¹²⁾. Há dois tipos de corantes: os que se ligam às proteínas e os que são catalisados pelo grupo Heme. Os proteicos tendem a ser mais sensíveis, isso porque existem mais proteínas no sangue do que grupos Heme^(3, 5). Essa técnica requer alguns cuidados como: coletar a amostra de sangue antes de aplicar o corante (já que essas análises podem degradar o DNA), utilizar uma solução fixadora para o sangue, saber qual é o melhor corante para ser utilizado em determinada superfície (avaliar cor e porosidade) e aplicar uma solução de lavagem para retirar excesso de corante da superfície^(1, 5).

A solução fixadora é utilizada para evitar que a marca de sangue se dissolva ou que seja diluída ao aplicar a solução com o corante⁽¹⁾. A fixação consiste em desnaturar as proteínas presentes no sangue para que essas precipitem aderindo à superfície⁽⁵⁾. Existem muitas soluções que são aplicadas com essa finalidade, como por exemplo, solventes orgânicos. A desnaturação pode ocorrer por aquecimento ou por agentes naturais e mudanças de pH. O indicado é que se a solução com corante for feita em água, etanol ou ácido acético, o fixador deve ser a solução aquosa 2% de ácido 5-sulfosalicílico. Porém se o corante é solubilizado

em metanol, o fixador deve ser metanol. O problema da utilização desse fixador é a sua toxicidade e inflamabilidade ^(1, 5). O metanol pode danificar algumas superfícies e interferir na análise de DNA, mas apresenta a vantagem de gerar uma cor mais forte do que os preparados em água ⁽⁵⁾. A amostra de sangue muda de cor quando é fixada, variando do vermelho para marrom escuro. A aplicação dessa solução, como das outras, pode ser por submersão do objeto na solução ou borrifação sobre a superfície ⁽¹⁾.

A solução com o corante é preparada utilizando o solvente mais adequado. A maioria utiliza água como solvente e às vezes faz uso de álcoois e ácidos. Os que utilizam metanol tendem a ser melhores para superfícies porosas, pela sua rápida evaporação ⁽¹⁾.

As soluções de lavagem também dependem dos corantes e solventes utilizados. Normalmente a solução de lavagem é preparada com os solventes utilizados na solução do corante. Algumas análises necessitam de mais de uma solução de lavagem ⁽¹⁾. Normalmente apenas a água é suficiente para retirar o excesso das soluções corantes e fixadoras, a não ser quando o metanol foi usado ⁽⁵⁾.

Existem inúmeros corantes para esta técnica como: Amido Black, Vermelho da Hungria, *Leuco* Violeta Cristal, Azul Brilhante de Coomassie, Dupla Coloração de Crowle, Suspensão de Dióxido de Titânio e Amarelo Ácido 7 ⁽¹⁾. A maioria desses reagentes são corantes de proteínas. Essa ligação ocorre entre o grupo sulfônico que possuem e os grupos catiônicos das proteínas que ocorre em condições moderadamente ácidas ^(3, 5).

2.7.1. Amido Black

O Amido Black tinge as proteínas presentes no sangue originando uma cor azul escura (Figura 23). Existem três formas de preparar a solução com o corante: aquosa, metanólica e água/etanol ^(1, 13). Quando se utiliza a água é indicada a aplicação para superfícies não porosas, pois pode acontecer de danificar a mancha de sangue. Já a solução metanólica é indicada para todas as superfícies, pois como o metanol evapora rapidamente, não ocorre deformação das marcas. Porém esse solvente é tóxico e inflamável, para evitar estes problemas, foi sugerida uma mistura de etanol e água como proposta de solvente. O etanol não é tóxico como o metanol e a inflamabilidade diminui pela presença da água, sendo que os benefícios continuam, podendo ser aplicado em superfícies porosas e não porosas ⁽¹⁾.

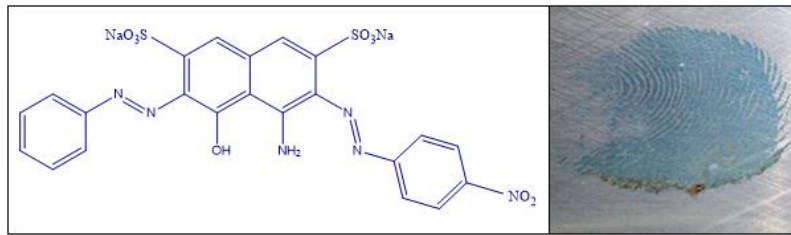


Figura 23: Estrutura química do Amido Black e sua aplicação na revelação de uma impressão digital com sangue.

A única limitação do Amido Black é a sua cor, que não permite destacar manchas de sangue em superfícies escuras ^(1, 5). Dessa forma é possível utilizar outros corantes que consigam, como por exemplo, o Vermelho da Hungria ou o Amarelo Ácido 7 que possuem fluorescência ⁽⁵⁾. A Figura 24 mostra essa limitação do Amido Black.



Figura 24: Exemplo da dificuldade de visualização da impressão digital quando revelada com Amido Black em superfícies escuras.

Estudos mostraram que ao utilizar esse corante em manchas de sangue a tipagem do DNA por PCR (reação em cadeia da polimerase – método de amplificação de DNA) é possível, porém há uma diminuição na quantidade do DNA após tratar a mancha com os reagentes por causa das lavagens. Isso gera dificuldade para a obtenção de amostra suficiente para a análise ⁽⁵⁾. A melhor solução para este caso é tratar uma das impressões e colher o material genético de outra que não foi tratada com produtos químicos. Essa mesma situação ocorre para o uso do *Leuco Violeta Cristal* ⁽⁵²⁾. A intensidade da cor do Amido Black varia de acordo com três fatores principais: quantidade de proteínas fixadas, o tempo de contato entre amostra e reagente e o tipo de solução em que foi preparado ⁽⁵⁾.

A Figura 25 mostra a interação existente entre esse corante e as proteínas. O meio moderadamente básico faz com que o grupo sulfônico desprotona (quando estiver na forma ácida) originando uma carga negativa (SO₃⁻). Já os grupos catiônicos, que podem ser histidinas, lisinas, ou argininas, são protonados (R⁺), dessa forma ocorre a interação iônica

entre esses grupos, sendo essa a explicação mais adequada para todos os reagentes proteicos⁽⁵⁾.

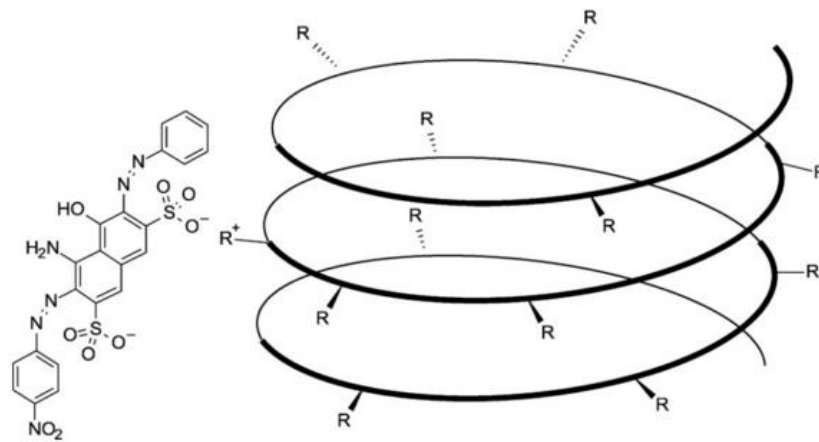


Figura 25: Interação do Amido Black com os grupos catiônicos da proteína (representados por R). R= histadina, lisina ou arginina⁽⁵⁾.

2.7.2. Vermelho da Hungria

Este corante é preparado em solução aquosa e interage com as proteínas presentes no sangue gerando uma cor vermelha (Figura 26), além de ser fluorescente. Emite uma cor amarela quando submetido à fonte de luz alternada (520-560nm) ou laser. Porém essa fluorescência só é visível no molde de gelatina¹, o que configura uma limitação dessa técnica (1, 13, 53, 54). A combinação de cor visível com a fluorescência permite a visibilidade tanto em superfícies claras quanto escuras⁽¹⁾. A solução fixadora indicada é a do ácido 5-sulfosalicílico e a solução de lavagem pode ser tanto a solução de ácido acético quanto água destilada⁽⁵³⁾.

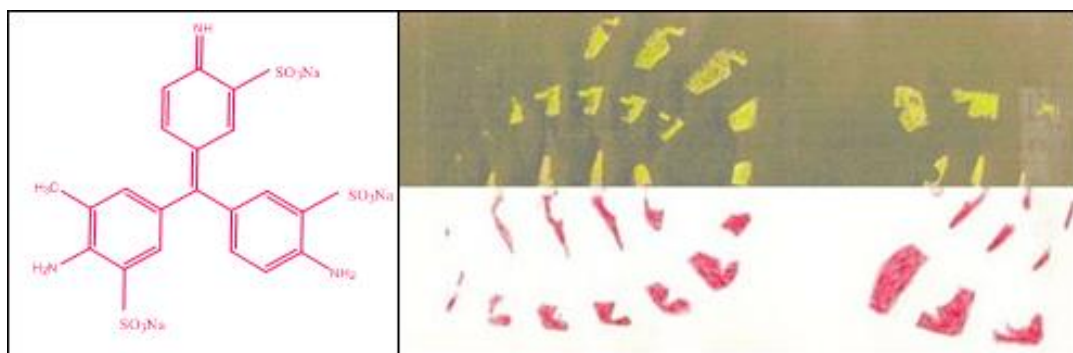


Figura 26: Estrutura química do vermelho da Hungria e sua aplicação na revelação de uma pegada com sangue. Na superior a revelação com fluorescência e na inferior na luz visível⁽⁵⁵⁾.

¹ São moldes semelhantes a papeis adesivos que possuem a capacidade de obter um carimbo da marca que está sendo analisada⁽⁸⁰⁾.

2.7.3. Leuco Violeta Cristal

A primeira vez que foi utilizado o *Leuco Violeta Cristal* para destacar manchas de sangue foi em 1993 no laboratório do FBI (Federal Bureau of Investigation) ⁽⁵⁶⁾. Esse corante é um triarilmetano catiônico que possui grande afinidade com materiais proteicos e celulósicos. O reagente é a forma reduzida do Violeta Cristal e é incolor ⁽⁵⁶⁾. Ao ser aplicado em uma solução aquosa sobre o sangue, na presença de peróxido de hidrogênio, ocorre a oxidação do reagente gerando uma coloração azul púrpura (Figura 27) ⁽⁵⁾. Essa oxidação ocorre na presença de hemoglobinas ⁽¹⁾. Esse corante emite fluorescência em 695nm quando iluminado com comprimentos de ondas entre 400 e 600nm ⁽⁵⁾.

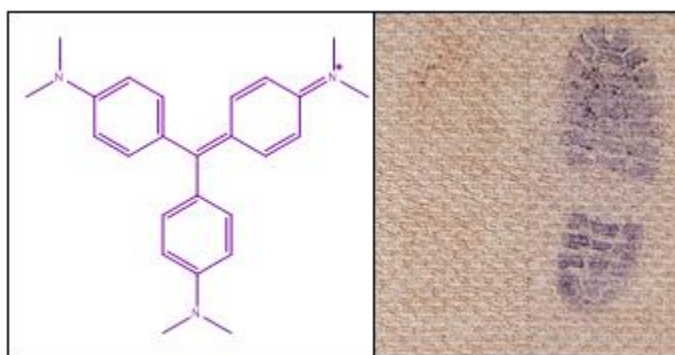


Figura 27: Estrutura química do Leuco Violeta Cristal e sua aplicação na revelação de uma pegada com sangue ⁽⁵⁷⁾.

A vantagem dessa técnica é a sua aplicação em superfícies porosas e não porosas além da possibilidade de combiná-la com outros corantes que se ligam diretamente à proteína, como o Amido Black por exemplo ^(1, 5). Esse corante é recomendado para madeiras tratadas com poliuretano, vidros e azulejo ⁽⁵⁸⁾. A sensibilidade é baixa quando comparada com a de corantes como o Amarelo Ácido 7 e o Vermelho da Hungria, que possuem sensibilidades muito próximas a do Luminol ⁽⁵⁴⁾.

2.7.4. Coomassie Blue

O corante Coomassie Blue, Figura 28, tinge as proteínas do sangue com uma cor azul-violeta ⁽¹³⁾. Ele pode ser preparado utilizando exclusivamente metanol ou combinado com água. A primeira gera um resultado melhor que o uso do Amido Black (em solução metanólica) ao ser aplicado em porcelanas ou plásticos brilhantes. Já a segunda preparação gera melhores resultados em superfícies pintadas ou envernizadas ⁽¹⁾.

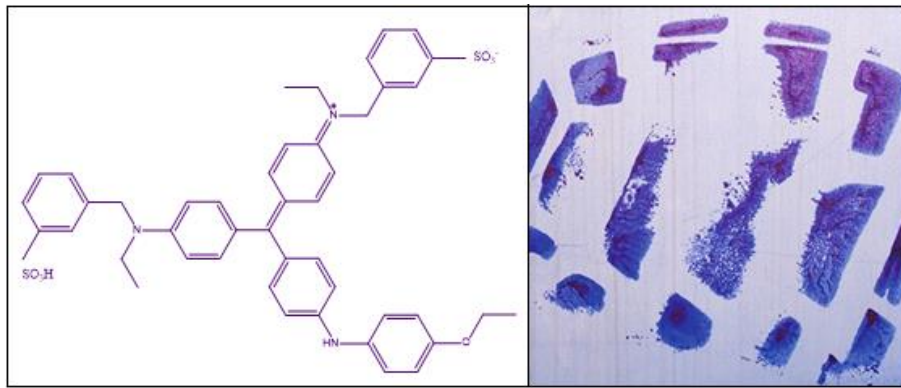


Figura 28: Estrutura química do Azul Brilhante de Coomassie e sua aplicação na revelação de uma pegada com sangue ⁽⁵⁹⁾.

É o melhor reagente para ser utilizado em superfícies porosas com manchas moderadamente visíveis quando comparado com Amarelo Ácido 7, Amido Black aquoso, *Leuco Violeta Cristal* e a combinação dos dois últimos em metanol ⁽⁵⁸⁾. Este corante também apresenta bons resultados em papel branco com manchas de sangue fracas. Apesar de ser indicado como um reagente opcional pelo Guia do FBI (FBI's Processing Guide for Developing Latent Prints) ⁽⁶⁰⁾ para revelar marcas latentes, estudos mostram uma grande eficácia quando utilizado em impressões digitais com pouco sangue em superfícies porosas e não porosas, além de ser uma alternativa para revelar machas latentes em azulejos brancos ⁽⁵⁸⁾.

2.7.5. Dupla Coloração de Crowle

Esta técnica é uma mistura de dois corantes, Crocein Scarlet 7B e o Azul Brilhante de Coomassie (Figura 29) que tingem a proteína do sangue de cor vermelha. É indicado apenas para superfícies não porosas. Não é muito utilizado pois apresenta a mesma cor do Vermelho da Hungria sem a vantagem da fluorescência ⁽¹⁾.

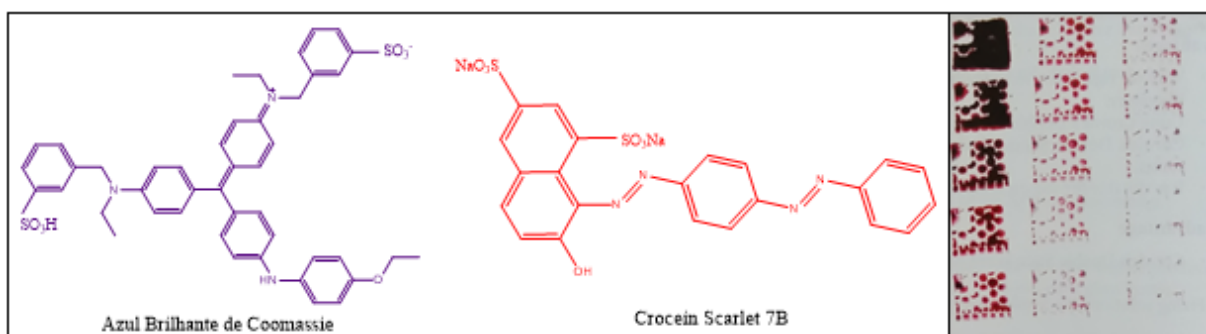


Figura 29: Estrutura dos dois corantes usados na Dupla Coloração de Crowle e a sua aplicação na revelação de marcas com sangue em um azulejo branco ⁽¹⁾.

2.7.6. Suspensão de Dióxido de Titânio

O Dióxido de Titânio pode ser utilizado para destacar as manchas de sangue quando pequenas partículas são colocadas em suspensão aquosa ⁽⁷⁾ ou metanólica ⁽¹⁾. A interação ocorre pela afinidade desse óxido com os aminoácidos e proteínas presentes no sangue ⁽⁵⁾. A deposição das partículas de Dióxido de Titânio ocorre em torno das células vermelhas ⁽⁷⁾. É uma solução indicada para superfícies escuras, por apresentar cor branca, e não porosas, como pode ser visto na Figura 30. Essa técnica pode ser combinada com corantes proteicos, como por exemplo, o Amarelo Ácido 7 ⁽⁷⁾.



Figura 30: Utilização da suspensão de Dióxido de Titânio para revelar digitais com sangue em um disquete de computador ⁽⁶¹⁾.

2.7.7. Amarelo Ácido 7

Este corante é utilizado em marcas latentes de pegadas e digitais pela sua capacidade de ligar-se às proteínas presentes no sangue ⁽¹³⁾. O comprimento de onda de excitação máxima é em 460nm e seu pico de emissão em 535nm. A excitação entre 400 e 500nm combinado com um filtro laranja permite a visibilidade da marca, como pode ser observado na Figura 31 ⁽⁵⁾. É um bom corante para aplicar em superfícies não porosas e escuras ^(7, 54). Um problema que ocorre com substâncias fluorescentes, é a reabsorção de fluorescência, que ocorre em meios muito concentrados, dessa forma a energia que seria emitida acaba sendo absorvida por outra molécula. Isso causa o desaparecimento da fluorescência ⁽⁵⁾.

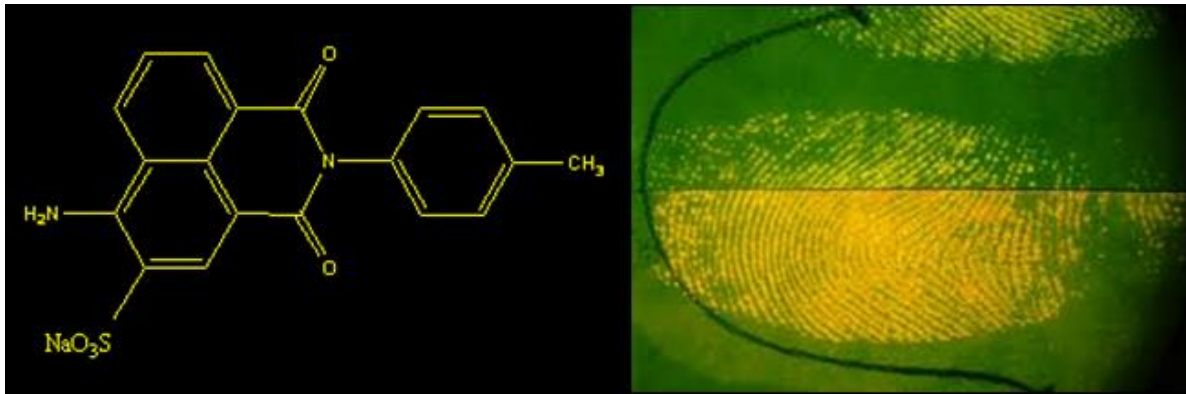


Figura 31: Estrutura química do Amarelo Ácido 7 e sua aplicação na revelação de uma digital com sangue usando filtro (inferior) e sem filtro (superior) ⁽⁶²⁾.

2.8. IMPRESSÕES DIGITAIS

As impressões digitais (ID's), seguindo a Lei de Locard, são originadas do contato das cristas de fricção, encontradas nos dedos, palma das mãos e nos pés, com todas as superfícies. As ID's são compostas por uma mistura de componentes químicos que são secretados pelas glândulas sudoríparas (écrinas e apócrinas) e as glândulas sebáceas ⁽¹⁰⁾.

As cristas formam desenhos únicos em cada indivíduo, tornando as ID's um ótimo meio de identificação. Por este motivo, a busca por impressões latentes em locais de crime tornou-se crucial, além de ser uma prova de crime de grande relevância. Por consequência, a ciência forense evolui a cada dia para produzir e aprimorar novas técnicas para revelar as ID's latentes ⁽⁶³⁾.

Os desenhos, formados pelas cristas de fricção, das impressões digitais são classificados em três grupos principais, sendo eles, arco, verticilo e presilha. No Brasil segue-se a classificação de Vucetich que divide a presilha entre interna e externa, como mostra a Figura 32. Essa classificação considera o número de deltas encontrados em cada impressão e a direção de entrada e saída das linhas ⁽¹⁰⁾.

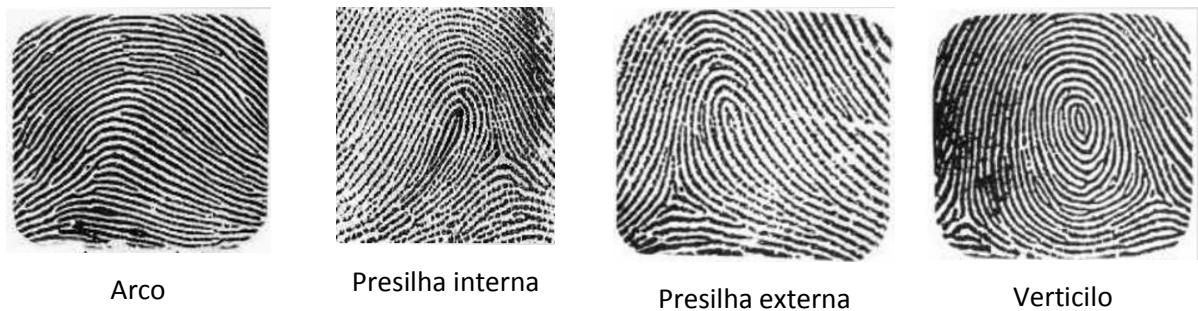


Figura 32: Classificação das impressões digitais pelo sistema de Vucetich ⁽⁶⁴⁾.

Contudo, quatro classificações não são suficientes para uma identificação. Para isso é necessária a comparação das minúcias dos desenhos. Essa técnica consiste em analisar pontos específicos das linhas identificando bifurcações, ponta de linha, ilhotas e encerro, como está exemplificado na Figura 33. O confronto consiste em identificar esses pontos da impressão questionada e comparar a um padrão (obtido do indivíduo suspeito). Os pontos devem ser os mesmos e devem estar na mesma distância e posição para uma análise confirmatória ⁽⁶³⁾.

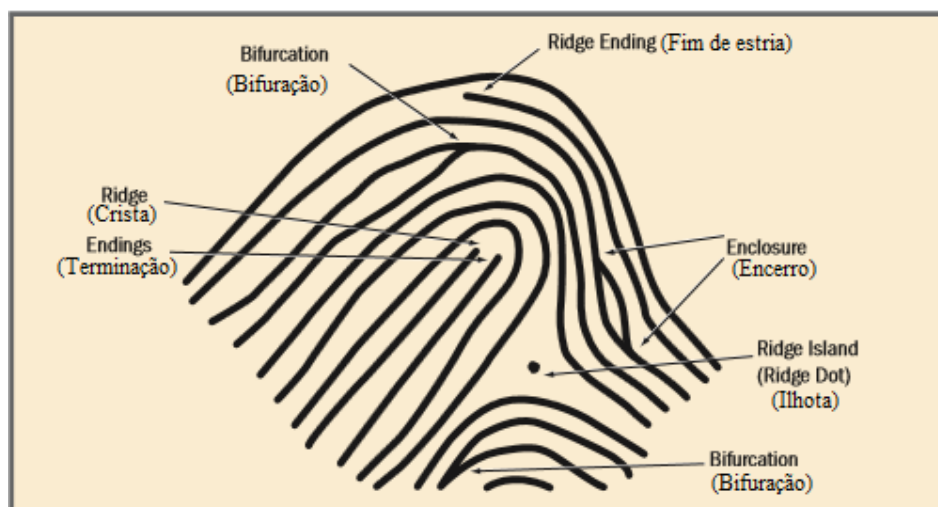


Figura 33: Identificação das minúcias de uma impressão digital ⁽⁶³⁾.

A ciência forense responsável por estudar a análise das ID's é chamada de Papiloscopia. Essa ciência se baseia em três princípios fundamentais: ^(63, 65)

1 – Imutabilidade Relativa: Por muitos anos acreditava-se que os desenhos não se alteravam com o tempo. Mesmo em casos extremos como corte, queimadura ou doenças de pele, o desenho se regenerava no mesmo formato, dependo do nível da lesão ⁽⁶³⁾. Porém, estudos recentes mostraram mudanças nas minúcias das digitais com o passar dos anos ⁽⁶⁶⁾.

2 – Variabilidade: Os desenhos são únicos para cada pessoa, além disso, eles não se repetem entre os dedos do mesmo indivíduo. Dessa forma, nem gêmeos univitelinos possuem digitais iguais ⁽⁶³⁾.

3 - Perenidade: As cristas papilares se desenvolvem ainda no feto a partir do 6º mês de gestação e permanecem iguais até o final da vida. As ID's apenas aumentam o tamanho, acompanhando o crescimento, mas mantendo a proporcionalidade entre minúcias ⁽⁶³⁾.

As ID's latentes são aquelas deixadas pelo contato da pele com uma superfície e são compostas por substâncias excretadas pelas glândulas da epiderme. Contudo, quando são depositadas sobre uma superfície alteram rapidamente a sua composição. Entre centenas de compostos, elas são formadas por 99% de água e o restante contém principalmente compostos orgânicos, na sua maioria gorduras, aminoácidos e proteínas. A Tabela II mostra a composição do suor excretado por cada glândula. As principais técnicas para a revelação da digital utilizam esses componentes para conseguir a visualização da impressão latente. Essas técnicas permitem a visualização das minúcias para um possível confronto ⁽⁶⁵⁾.

Tabela II: Composição dos compostos expelidos pelas glândulas sudoríparas, sebáceas e apócrinas. Principal composição das impressões digitais latentes ⁽⁶⁷⁾.

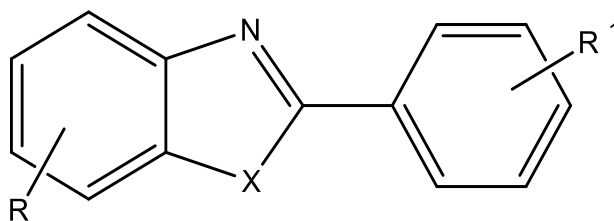
Glândulas	Compostos Inorgânicos	Compostos Orgânicos
Sudoríparas	Cloretos Íons metálicos Amônia Sulfatos Fosfatos Água	Aminoácidos Ureia Ácido láctico Açúcares Creatinina Colina Ácido úrico
Sebáceas	----	Ácidos graxos Glicerídeos Hidrocarbonetos Álcoois
Apócrinas	Ferro	Proteínas Carboidratos Colesterol

Além das técnicas químicas, as impressões digitais ficam visíveis ao utilizar algum tipo de tinta sobre o dedo e pressionando o mesmo à alguma superfície, por exemplo, um papel. Em casos de crime o sangue pode funcionar como essas “tintas”, isto é, as cristas de fricção

ficam visíveis e desenhadas com a ajuda do sangue. Isso permite a sua análise pelo profissional (papiloscopista) responsável. Existem muitas formas de melhorar essas marcações para conseguir a melhor identificação das minúcias, como a utilização dos corantes proteicos quando essas macas são impregnadas de sangue ⁽¹⁾.

2.9. CORANTES BENZAZÓLICOS

Os corantes benzazólicos são compostos formados por um anel azólico condensado a um anel benzênico (Figura 34). O anel azólico é caracterizado por ser um anel de cinco membros contendo dois heteroátomos nas posições 1,3, sendo que um deles é obrigatoriamente o nitrogênio. O outro heteroátomo pode ser um oxigênio, enxofre ou nitrogênio ⁽⁶⁵⁾.



X = O, S, N

R ou R' = H, OH, NH₂, Me, Et, Ph, entre outros.

Figura 34: Estrutura genérica de um corante benzazólico.

Essa estrutura permite a síntese de derivados com diversos substituintes nos anéis benzólicos, representados por R e R' na Figura 34.

Dentro dessa família de corantes é possível gerar compostos com o mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT). Esse mecanismo ocorre quando há um grupo hidroxila na posição *orto* do anel benzênico (R' = OH). Essa estrutura permite a transferência do próton da hidroxila para o heteroátomo azólico gerando uma tautomeria entre as configurações ceto-enol. Essas mudanças estruturais possibilitam o aumento de energia tendo a transferência protônica realizada no estado excitado. Essa energia é dissipada na forma de fluorescência (Figura 35) ⁽⁶⁵⁾.

Tanto na estrutura ceto (K) como a enol (E) é possível ter as configurações *cis* e *trans* (considerando o oxigênio da hidroxila e o nitrogênio azólico). A configuração *trans*-enol (E') e *trans*-ceto (K') são mais energéticos e em consequência a forma *trans* não propicia o ESIPT. A estrutura mais estável (E) ao absorver energia vai para o estado excitado (E*) onde ocorre

rapidamente a transferência protônica gerando a forma ceto excitada (K^*). Essa energia é liberada pelo efeito da fluorescência. Assim, ocorre o equilíbrio tautômero entre a forma ceto (K) e enol até que ocorra nova absorção de energia para repetir o ciclo ⁽⁶⁵⁾.

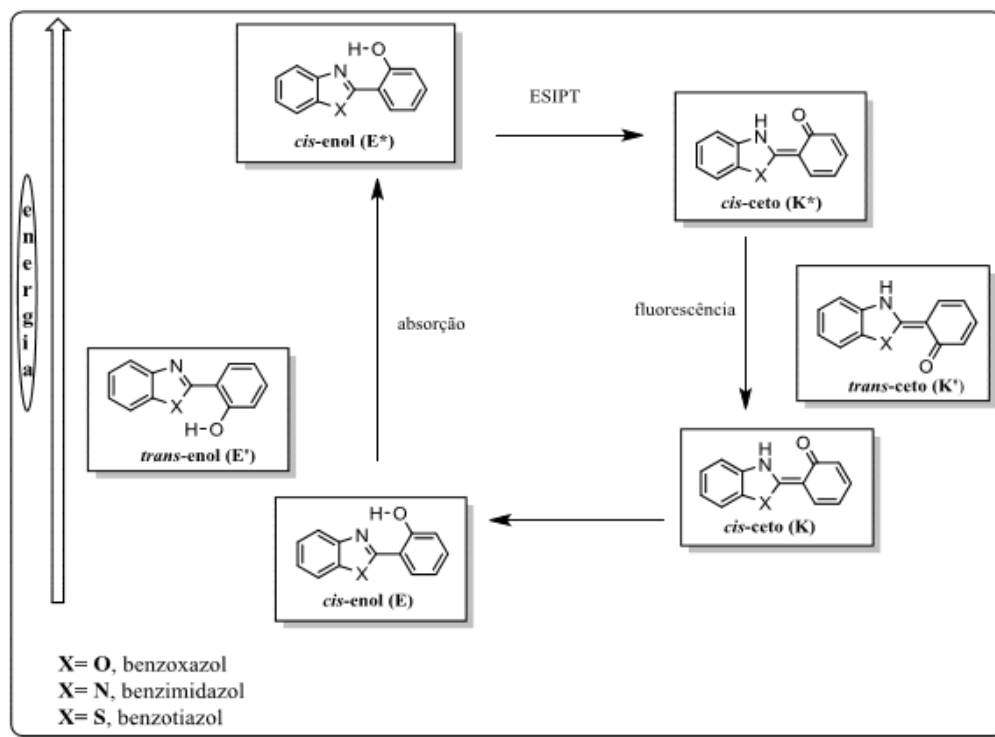


Figura 35: Esquema da transferência protônica entre as estruturas ceto-enol por ESIPT ⁽⁶⁵⁾.

A grande vantagem da ESIPT é o grande deslocamento de Stokes, que pode chegar a 200nm. Essa medida é a diferença entre o máximo de absorção e o máximo de emissão da molécula. Além disso, esses compostos possuem elevada sensibilidade, estabilidade térmica e fotofísica ⁽⁶⁵⁾.

Existem muitas metodologias de síntese para esses corantes. Entre as térmicas, pode-se citar as ciclizações por: ácido polifosfórico (PPA), éster polifosfórico (PPE), pentóxido de fósforo, cloreto de tionila. Também existem as ciclizações oxidativas de bases de Schiff e por óxido de alumínio ativado. Entre essas a síntese com PPA tem se destacado pelo seu baixo custo e fácil aquisição comercial ⁽⁶⁵⁾.

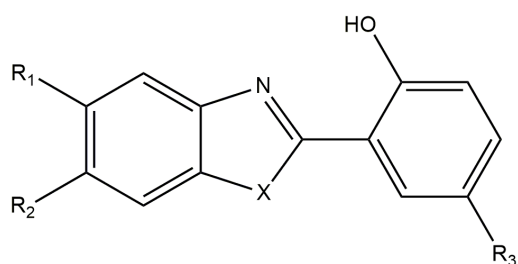
2.9.1. Corantes HBs

Os HBs são corantes benzazólicos com ESIPT que estão protegidos pela patente intitulada “Método de obtenção de derivados benzazólicos fluorescentes e sua aplicação em

ciência forense como reveladores de impressões digitais latentes”, Brasil, registro número BR 10 2014 030942-0, depositado em 10 de dezembro de 2014 ⁽⁶⁵⁾.

A síntese desses compostos foi realizada seguindo o método de Hein que utiliza o PPA. A reação é uma condensação entre derivados de anilinas *orto*-substituídas com ácido salicílico substituído. As condições de síntese variam para a formação de cada composto. A temperatura variou de 130-300°C e o tempo de reação entre 1,5h e 6h para a síntese dos HBs ⁽⁶⁵⁾.

Foram sintetizados diversos corantes benzazólicos dos quais cinco, nominados: HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13, mostraram ser os mais adequados. A estrutura genérica de alguns desses corantes está representada na Figura 36. Os corantes tanto na forma sólida como em solução estão representados nas Figuras 37 e 38 mostrando a aparência na luz visível e na luz ultravioleta (UV) (365nm) ⁽⁶⁵⁾.



HB-7, X=S, R₁=H, R₂=H, R₃=SO₃H

HB-9, X=O, R₁=H, R₂=CH₃, R₃=SO₃H

HB-11, X=O, R₁=SO₃H, R₂=H, R₃=NH₂

Figura 36: Estrutura geral dos corantes HB-7, HB-9 e HB-11 ⁽⁶⁵⁾.

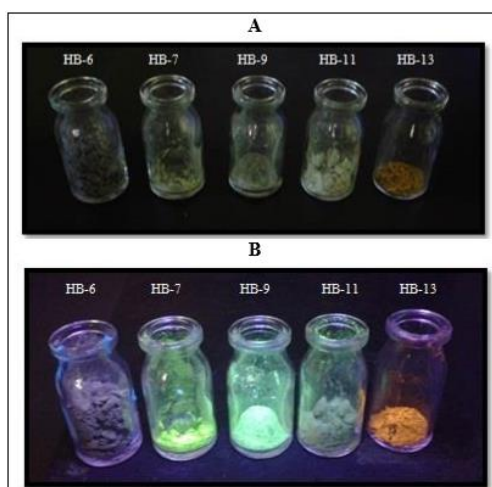


Figura 37: Corantes HBs no estado sólido. A- sob luz visível e B- sob luz UV ⁽⁶⁵⁾.

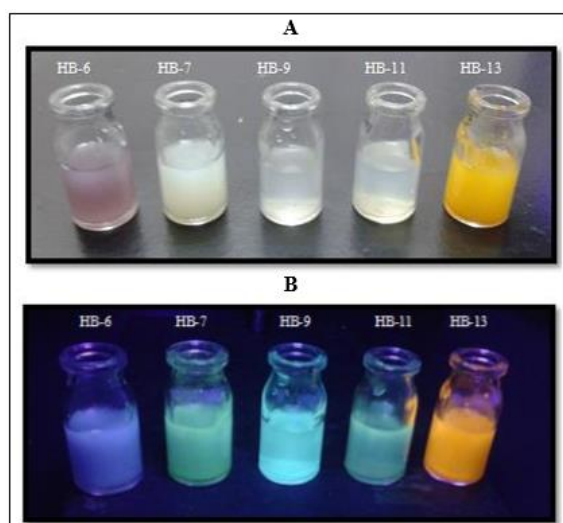


Figura 38: Corantes HBs em solução aquosa. A- sob luz visível e B- sob luz UV ⁽⁶⁵⁾.

Estes corantes foram utilizados para a revelação de digitais latentes em superfícies adesivas tanto nas cores claras quanto nas escuras. Os HBs tingiram as digitais com sucesso sem tingir a superfície (Figura 39). Os resultados mostraram grande sensibilidade e durabilidade dos corantes, permitindo o armazenamento das superfícies adesivas como contra prova. Estudos iniciais apontaram a aplicação desses novos derivados como sondas biológicas com bons resultados ⁽⁶⁵⁾.

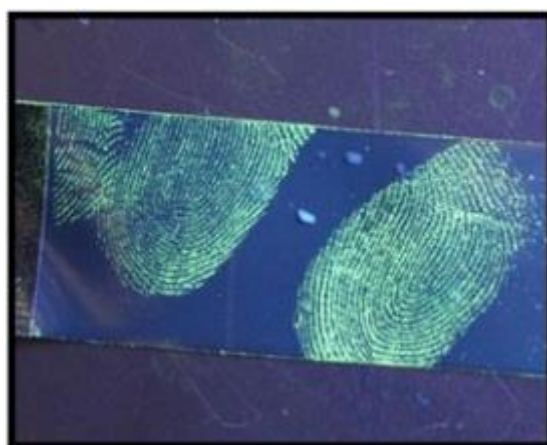


Figura 39: Revelação de digital latente em superfície adesiva de fita isolante elétrica preta (Tectape®) ⁽⁶⁵⁾.

Como esses corantes apresentam grupos sulfônicos em sua estrutura, assim como os corantes proteicos, este trabalho estudou a aplicação do HB-7, HB-9 e HB-11 para a análise de manchas de sangue em local de crime.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho o sangue utilizado foi obtido de embalagens de carnes comercializadas em redes de supermercados e amostras de sangue de equinos doadas pelo Setor de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul que seriam descartadas. Essas amostras foram armazenadas a 4 °C e continham EDTA como anticoagulante. Os corantes benzazólicos utilizados foram o HB-7, HB-9 e HB-11. Todos foram diluídos em água na concentração de 0,1% (m/v). Para visualizar as manchas de sangue com estes corantes foi utilizada luz negra (380-420nm – UV próximo), por ser a faixa de absorção desses corantes.

3.1. ESTUDO DA APLICAÇÃO DOS CORANTES BENZAZÓLICOS EM MANCHAS DE SANGUE

3.1.1. Escolha da solução fixadora

Como existem muitas formas de fixar o sangue, foram utilizadas soluções descritas na literatura ⁽¹⁾ e novas foram propostas. As soluções estudadas foram:

- Solução aquosa 2% de ácido 5-sulfosalicílico (5-ASS);
- Solução metanólica 2% de 5-ASS;
- Solução etanólica 2% de 5-ASS;
- Metanol P.A.;
- Etanol P.A.;
- Solução etanol:água (40:60);
- Solução 2% de 5-ASS em etanol:água (40:60).

Nesta análise sete lâminas de vidro foram marcadas com sangue fixando cada uma delas com uma das soluções testes. A fixação foi realizada por três minutos e o excesso foi retirado com uma lavagem de água corrente. Em seguida a solução com o corante de HB-7 foi aplicada sobre essas lâminas de vidro por três minutos e o excesso foi retirado com uma lavagem de água corrente. O resultado foi analisado sob luz negra.

3.1.2. Análise da interferência do tempo de contato das amostras com a solução fixadora e com solução corante

Superfícies de vidro contendo sangue foram submergidas em três soluções fixadoras, sendo elas: solução de 5-ASS a 2%, solução de 5-ASS a 5% e solução de 5-ASS a 2% em etanol:água (40:60). O tempo de submersão variou entre 1, 5 e 10 minutos para cada solução. Após fixar, foi realizada a lavagem das amostras em água corrente e então essas foram submersas na solução corante por 1 min. O resultado demonstrou a qualidade da revelação das manchas com a variação do tempo de contato com o fixador.

Também foi realizada a variação do tempo de contato das amostras com a solução corante, variando em 1, 5 e 10min. O tempo de fixação foi mantido constante para todas as amostras por um minuto. Esse tempo foi escolhido conforme o melhor resultado obtido na análise anterior.

3.1.3. Formas de aplicar as soluções sobre as manchas de sangue

A forma de aplicação das soluções são usando borrifadores, submergindo a amostra em solução ou por lavagem da superfície com o auxílio de uma pipeta. Diferentes amostras foram analisadas em cada uma das técnicas. Também foi avaliada a necessidade de realizar as lavagens com água entre cada solução. O uso de uma única solução para fixar e tingir a mancha de sangue ao mesmo tempo também foi estudada. Essa solução foi preparada misturando porções 2:1 da solução fixadora (etanol:água: 5-ASS) com solução corante HB-7.

3.1.4. Utilização de diferentes corantes benzazólicos para superfícies diversas

Foram utilizados 3 corantes benzazólicos nomeados HB-7, HB-9 e HB-11. Como o HB-7 era o corante em maior quantidade, a maioria dos testes foram realizados com ele. A aplicação dos 3 corantes foi realizada em diferentes superfícies (porosas, semi porosas e não porosas) para analisar se todos teriam o mesmo desempenho. As superfícies escolhidas foram: polietileno, poliestireno, polipropileno, politereftalato de etileno (PET), Aço INOX, alumínio com e sem tinta², granito, tapete, vidro, madeira crua, madeira MDF, cerâmica, papel, e tecido. Diferentes manchas de sangue foram depositadas sobre essas superfícies pressionando a polpa do dedo indicador primeiro sobre uma amostra de sangue e depois sobre a superfície escolhida. Foi simulando um contato real sem manter o mesmo volume de sangue na amostra e sem depositar sobre o material com a mesma pressão, variáveis que

² O alumínio utilizado foi de latas de refrigerantes que possuem a sua camada externa tingida com as características do produto e por dentro alumínio puro.

afetam a concentração de sangue nas impressões. Todas foram fixadas utilizando a solução etanol:água com 2% de 5-ASS que foi aplicada por submersão ou com borrifadores conforme a necessidade de cada superfície. As lavagens entre cada solução foram feitas com água.

3.1.5. Análise da diluição das manchas de sangue por contato

Foram realizados testes de manchas sequenciais para verificar a capacidade destes corantes em tingir manchas com diferentes concentrações de sangue. Os resultados foram comparados aos obtidos pelo Amido Black, corante mais utilizado para essa finalidade.

As marcas foram produzidas umedecendo o dedo com sangue e pressionando a polpa digital sobre a superfície, lado a lado, consecutivamente até esgotar a amostra de sangue no dedo. Os materiais utilizados para realizar a marcação foram vidro, madeira crua e MDF. A revelação das manchas foram realizadas com a fixação do sangue (utilizando etanol:água com 2% de 5-ASS) e a aplicação da solução com o corante HB-7, realizando as lavagens com água entre cada etapa.

3.1.6. Ligação dos corantes com o sangue

Para confirmar se esses corantes benzazólicos sulfonados teriam a capacidade de interagir com as proteínas ou com aminoácidos, foi realizada a análise fixando proteína isolada do soro do leite (Whey protein) em uma lâmina e na outra, aminoácidos de cadeia ramificadas (BCAA). Esses produtos foram escolhidos por serem facilmente encontrados em redes de produtos para suplementação alimentar. As marcas utilizadas foram BCAA NeoNutri 500mg e IsolateWhey NeoNutri sabor baunilha.

Neste teste foi aplicada a proteína (ou aminoácido) na lâmina de vidro com excesso da solução metanólica 2% de 5-ASS até total evaporação do metanol. Foi realizado a lavagem com água para aplicar a solução corante HB-7 (mantida por três minutos) retirando o excesso com água.

3.1.7. Estudo de falso-positivo e interferentes

Em uma cena de crime é possível encontrar diversas manchas que podem ser confundidas com sangue. O estudo dos falso-positivos e interferentes da metodologia a ser aplicada ajuda a esclarecer sobre a prova encontrada. Este trabalho realizou o estudo de alguns possíveis falsos positivos que podem ser confundidos com sangue por causa da sua

cor. As substâncias escolhidas foram: café, beterraba, ketchup, Coca-Cola, molho de pimenta e massa de tomate. Além de produtos considerados interferentes da reação, que são utilizados para limpeza, sendo eles o hipoclorito de sódio e detergente de louça.

Todas as amostras foram aplicadas sobre lâminas de vidro e expostas ao ar ambiente por uma semana para secar. Então foi aplicada a solução fixadora de metanol com 2% de 5-ASS até evaporar completamente. Foi retirado o excesso da solução com água e aplicada a solução corante por cinco minutos e retirando o excesso de corante com água.

3.1.8. Estudo da combinação de diferentes técnicas para análise de digitais e/ou sangue latente

Às vezes é necessário utilizar mais de uma técnica para revelar marcas latentes. Esse estudo verificou a possibilidade de combinar as principais técnicas de análise utilizando os corantes benzazólicos para saber qual a melhor sequência para aplicar os corantes sem perder informações importantes. As técnicas mais utilizadas por especialistas são: Amido Black, Luminol e Cianocrilato.

A solução fixadora utilizada foi etanol:água (40:60) com 2% de 5-ASS. A solução corante escolhida foi a 0,1% de HB-7. O Amido Black foi preparado na solução 1% em etanol:água:ácido acético (70:25:5). A solução de uso do Luminol foi preparada seguindo a receita de Weber, descrita na Seção 2.5.2.1 utilizando o Luminol sintetizado nesse trabalho. A revelação com Cianocrilato foi realizada, utilizando o reagente Omega-Print Cyanoacrylate Fuming Compound for Latent Print Development (Sirchie), simulando exatamente como a Perícia do RS realiza. Para obter um controle da análise, duas lâminas de vidro foram colocadas na câmara de revelação, uma contendo a mancha de sangue e a outra uma digital latente (não contaminada).

Inicialmente foi analisada apenas a combinação do HB-7 com o Amido Black. O sangue foi fixado em quatro superfícies de alumínio. Essas foram analisadas utilizando o HB-7 seguido do Amido Black e invertendo a ordem da aplicação dos corantes. As amostras foram submetidas à luz negra depois da aplicação de cada corante para verificar a continuidade da fluorescência do HB-7 com o uso do Amido Black. O tempo de contato do HB-7 variou de três à trinta minutos e o do Amido Black foi mantido por dois minutos.

Na segunda etapa dessa análise, utilizando o Cianocrilato, o Luminol e o HB-7, foi realizado marcas em latas de refrigerantes com dedos impregnados de sangue. As latas foram identificadas de A à H e reveladas com sequencias diferentes como mostra a Tabela III. O Amido Black não foi utilizado pois não teria destaque da marca em consequência da cor do corante e da superfície serem escuras.

Tabela III: Ordem de aplicação das técnicas de revelação em cada lata.

Lata	Sequencia das técnicas
A	Luminol – Cianocrilato – HB-7
B	Luminol – HB-7 – Cianocrilato
C	Fixação - Luminol – HB-7 – Cianocrilato
D	Cianocrilato – HB-7 - Luminol
E	Fixação - Cianocrilato – HB-7 - Luminol
F	Cianocrilato – Luminol – HB-7
G	HB-7 – Luminol - Cianocrilato
H	HB-7 – Cianocrilato - Luminol

Para verificar a aderência do Cianocrilato sobre o sangue, foram limpas cinco lâminas com etanol. Em uma lâmina foram feitas três marcações do dedo polegar direito sem sangue e as outras quatro, com três marcações cada, do dedo polegar impregnado com sangue. Essas foram colocadas na câmara e submetidas aos vapores de Cianocrilato, que após aquecimento, evapora e entra em contato com as superfícies. Por haver uma variação de tempo da técnica, levando em consideração principalmente a umidade e temperatura no interior da câmara, controla-se através de uma amostra padrão e observação do Especialista.

3.1.9. Estudo da sensibilidade

É importante definir o nível de sensibilidade de cada técnica, para afirmar a confiabilidade da técnica até determinada diluição. Sendo assim, foi realizada a análise de oito soluções de diferentes concentrações de sangue diluído em água destilada. Essa análise utilizou o HB-7, o Amido Black e o Luminol, necessariamente aplicados nessa ordem. As concentrações das soluções de sangue analisadas foram de 100% (sangue puro), 50%, 10%,

1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001% v/v. O método consistiu em colocar gotas de cada solução sobre lâminas de vidro, deixando em repouso por dois dias até o sangue secar completamente. O sangue foi fixado por trinta minutos e revelado com o corante HB-7, mantido em contato por quinze minutos. Após foi aplicado o Amido Black por quinze minutos e por último foi aplicado o Luminol 97% da Sigma-Aldrich preparado pela fórmula de Weber ⁽¹⁾. A solução utilizada para fixar foi a 2% de ácido 5-sulfosalicílico em etanol e água (40:60) e foram feitas lavagens com água entre cada aplicação de solução para retirar o excesso das mesmas.

3.2. SÍNTESE DO LUMINOL

Este trabalho realizou a síntese do Luminol partindo do Anidrido Ftálico em 3 etapas, sendo elas: Nitração, reação com a hidrazina e redução do grupo nitro.

- 1ª Etapa - Nitração ⁽⁶⁸⁾.

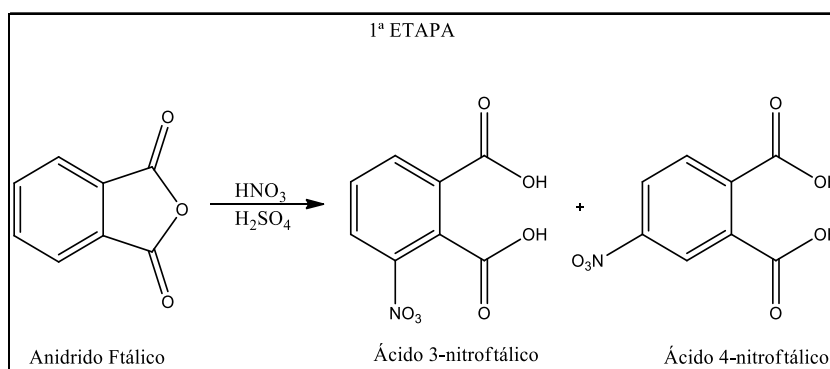


Figura 40: Reação de nitração do anidrido ftálico na síntese do Luminol.

Foi adicionado 5g (33,78 mmol) de anidrido ftálico em 8 mL (191 mmol) de ácido nítrico (HNO₃) com agitação na temperatura ambiente. A adição dos 33 mL (619 mmol) de ácido sulfúrico foi feita lentamente a essa mistura, em banho de gelo porque essa reação é extremamente exotérmica. O banho de gelo foi retirado e a reação foi mantida em agitação e banho de água fervente por 3h. A boca do balão foi fechada para não evaporar os gases formados nessa etapa. Terminando o tempo, o balão foi destampado e vertido em gelo e água para ocorrer a precipitação do produto. O precipitado foi filtrado e recristalizado em 10 ml de água. O precipitado obtido foi cristais brancos, ou levemente amarelados. Rendimento em torno de 30%.

- 2ª Etapa – Reação com a Hidrazina.

Nesta etapa foram realizadas diferentes rotas sintéticas encontradas na literatura ^(69, 70, 71, 72), adaptadas em diferentes concentrações dos reagentes, com o objetivo de analisar através de qual delas é obtido o melhor produto, em termos de rendimento e pureza.

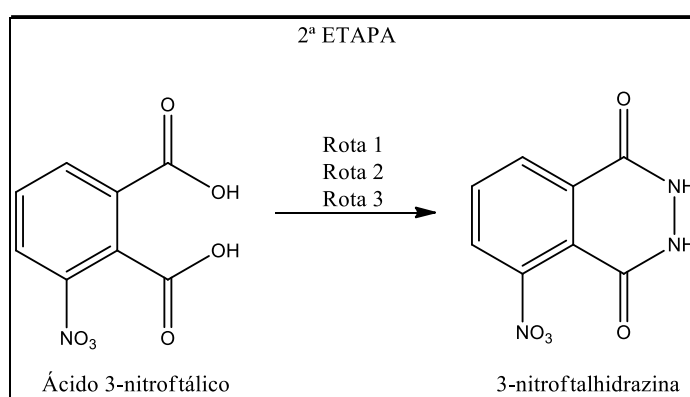


Figura 41: Reação com a hidrazina para formar o produto 3-nitroftalhidrazina.

Rota 1 - 1,3g (6 mmol) do ácido 3-nitroftálico foram adicionados em um balão contendo 2 mL de hidrazina 10% (4 mmol) e 4 mL de dietilenoglicol (42 mmol). A mistura reacional foi aquecida até 210°C por quarenta minutos sob agitação magnética. Deixou-se a reação esfriar até 100°C e então foram adicionados 20 mL de água fervendo. Após esfriar o precipitado foi filtrado. Rendimento de 78%.

Rota 2 - 11g (52 mmol) do ácido 3-nitroftálico foram solubilizados em 40 mL de água com 6g (107 mmol) de hidróxido de potássio (KOH) e colocados sob agitação magnética. Foi adicionado 7,5g (57 mmol) de sulfato de hidrazina e 25 mL de dietilenoglicol (264 mmol). O recipiente foi mantido aberto durante o aquecimento. A temperatura foi mantida a 160°C por 4 horas com agitação magnética. Após esfriar foi adicionado 50 mL de água fria. O precipitado foi filtrado. Rendimento de 88%.

Essa reação também foi realizada deixando a temperatura da reação atingir 210 °C. Rendimento de 94%.

Rota 3 - Em um balão foi adicionado 3g (14 mmol) do ácido 3-nitroftálico, 10 mL (171 mmol) de etanol e 1,5 mL (30 mmol) de hidrazina 99%. Esse sistema foi posto em refluxo por 5 horas. O precipitado foi filtrado. Rendimento 95%.

- 3ª Etapa – Redução do grupo Nitro.

A terceira fase da síntese do Luminol consiste em reduzir o grupo nitro para amino. Neste caso a reação foi feita com o redutor ditonito de sódio por sua ação como redutor de grupo nitro. Essa reação foi inspirada no artigo de Valentin Rădipoiu et al. ⁽⁷³⁾. As quantidades de cada reagente variaram conforme cada rota sintética realizada na segunda etapa.

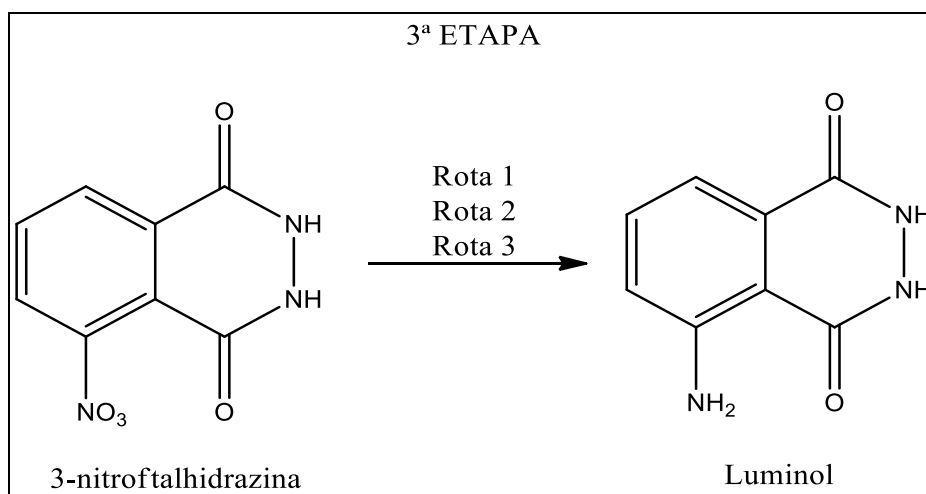


Figura 42: Reação de redução do grupo nitro para a síntese do Luminol.

Rota 1: Em um erlenmeyer com 6,5mL de hidróxido de amônio 10% (16 mmol), foram adicionados 1g (5 mmol) da 3-nitroftalhidrazina, 4g (23 mmol) de ditonito de sódio e 10mL de água. A reação foi submetida a agitação e aquecimento de 65°C por trinta minutos. Após esfriar foi adicionado ácido acético glacial até pH 3-4. A mistura reacional foi armazenada a 4°C por 12 horas e posteriormente filtrada. Foi obtido um precipitado de cor amarelo queimado com rendimento de 44%.

Rota 2: 11g (53 mmol) da 3-nitroftalhidrazina foram dissolvidos em 80 mL de hidróxido de amônio 4,5% (90 mmol) e foi adicionado 42g (241 mmol) de ditonito de sódio. A reação foi mantida em agitação magnética a temperatura ambiente por 4 horas. Então foi

adicionado ácido acético glacial até pH 3-4. O precipitado obtido possuía cor amarelo vivo. Rendimento >99%, por ser difícil secar completamente e purificar.

Para a reação que utilizou o produto da reação com a hidrazina sintetizado à 210 °C (temperatura elevada), a redução foi realizada utilizando 4g (19 mmol) de 3-nitroftalhidrazina, 6,5 mL de hidróxido de amônia 4,5% (7 mmol) , 17g (98 mmol) de ditonito de sódio em 50 mL de água, sendo realizado nas mesmas condições: 4 horas de agitação à temperatura ambiente e acidificado com ácido acético até pH 3-4. Foi obtido um precipitado amarelo claro. O rendimento foi >99% nos dois casos pela dificuldade em obter um produto puro e completamente seco.

Rota 3: Em um erlenmeyer foi adicionado 3,5g (17 mmol) da 3-nitroftalhidrazina dissolvidos em 20 mL de hidróxido de amônio 4,5% (23 mmol). Foi adicionado 14g (80 mmol) de ditonito de sódio. A reação foi mantida em agitação a temperatura ambiente por 4 horas. Foi adicionado ácido acético glacial até pH 3-4. O precipitado filtrado apresentou cor amarelo vivo com rendimento de 50%.

3.3. SÍNTESE DO ISOLUMINOL

Para sintetizar o Isoluminol (4-nitroftalhidrazina) optou-se por partir da 4-aminoftalimida e posteriormente realizar a reação com a hidrazina. Esse processo foi inspirado no trabalho do Yoshida et al. ⁽⁷⁴⁾. A reação com a hidrazina foi testada de diferentes formas (4 rotas sintéticas), conforme descrito na literatura já citada para o caso do Luminol. A primeira e a segunda etapa foram realizadas seguindo o estudo do Radipoiu et al. ⁽⁷³⁾.

- 1ª Etapa: Nitração da ftalimida.

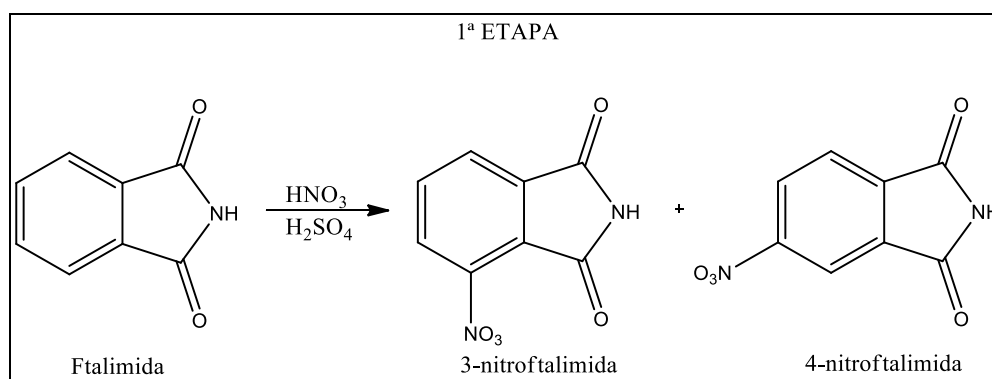


Figura 43: Nitração da ftalimida para a síntese do Isoluminol.

Foi colocado 30g (204 mmol) de ftalimida em um erlenmeyer onde foi adicionado 43 mL (0,65 mol) de HNO_3 e 200 mL (3,9 mol) de H_2SO_4 , lentamente, seguindo esta ordem. Como essa reação é muito exotérmica, essa mistura foi realizada em banho de gelo. A reação foi mantida em agitação magnética em temperatura ambiente por 5 horas. A mistura reacional foi vertida sobre gelo em um copo de Becker, então o precipitado branco foi filtrado e recristalizado em etanol. Rendimento de 78%.

- 2ª Etapa: Redução do grupo nitro.

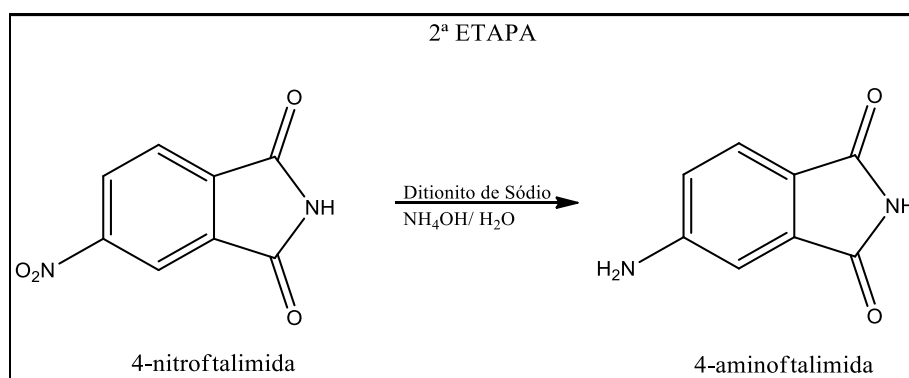


Figura 44: Reação de redução do grupo nitro para a síntese do Isoluminol.

Foi adicionado 6g (31 mmol) da 4-nitroftalimida em um erlenmeyer contendo 120 mL de água, 5 mL de NH_4OH (35 mmol) e 25g (143 mmol) de ditionito de sódio. A reação foi mantida em agitação por 4 horas na temperatura ambiente. O precipitado amarelo forte foi filtrado. Rendimento >99% por dificuldades na purificação e na secagem do produto.

- 3ª Etapa: Reação com a Hidrazina.

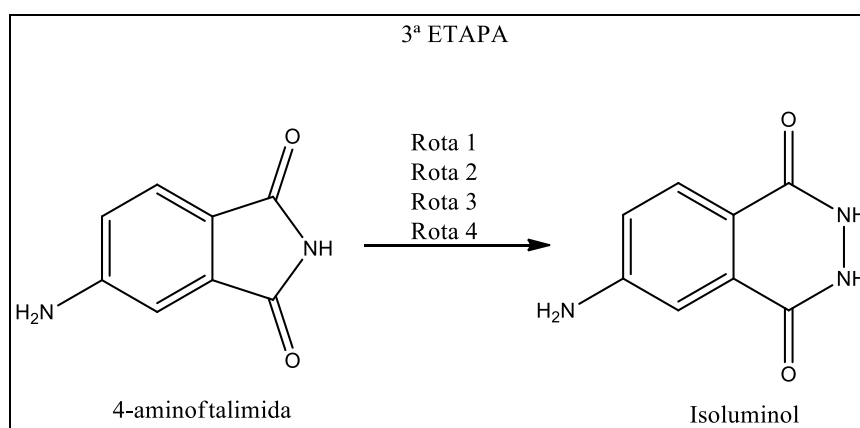


Figura 45: reação da 4-aminoftalimida com a hidrazina para a síntese do Isoluminol.

Rota 1: Foi colocado em refluxo 3g (18,5 mmol) da 4-aminoftalimida com 2 mL de hidrazina 99% (41 mmol) em 15 mL (257 mmol) de etanol por 5 horas. Foi obtido um precipitado bege que foi suspenso em etanol e filtrado. Rendimento de 61%.

Rota 2: Foi adicionado 3g (18,5 mmol) da 4-aminoftalimida em um erlenmeyer contendo 40 mL de água e 2g (36 mmol) de KOH. Foi adicionado 5 mL de hidrazina 30% (30 mmol) e 15 mL de dietilenoglicol (158 mmol). A reação foi aquecida até 160°C utilizando agitação magnética. A reação foi mantida em repouso por uma noite, então foi adicionado 30 mL de água e o precipitado foi filtrado. Rendimento de 62%.

Rota 3: Esta reação seguiu o trabalho do Chattopadhyay ⁽⁶⁹⁾. O complexo de hidroquinona-hidrazina (H-HQ) foi sintetizado dissolvendo 4,3g (39 mmol) de hidroquinona em 15 mL de hidrazina 20% (61 mmol). A reação foi aquecida mantendo a temperatura entre 80-90°C por 2 horas. Deixou-se esfriar lentamente para formar cristais brancos, após foi filtrado o precipitado.

0,12g (0,74 mmol) da 4-aminoftalimida foi adicionado com 0,5g (3,5 mmol) do complexo H-HQ em um balão mantendo a temperatura de 140-145°C por 10 minutos com agitação magnética. A reação foi mantida em repouso até atingir a temperatura ambiente. Foi adicionado água em excesso para suspender o produto em solução e filtrar. Não foi obtido precipitado para análise.

Rota 4: Essa reação foi realizada adicionando 4g (25 mmol) de 4-aminoftalimida, 6,5 mL de hidróxido de amônia (46 mmol) e 17g (98 mmol) de ditonito de sódio com 50 mL de água. A reação foi mantida por 4 horas em agitação à temperatura ambiente. No final foi acidificada com ácido acético até pH 3-4. Não foi obtido precipitado para filtrar a solução e seguir com a caracterização do produto.

3.4. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO LUMINOL E DO ISOLUMINOL SINTETIZADOS

Os produtos finais foram analisados utilizando o Espectrofotômetro de Infravermelho com transformada de Fourier de refletância total atenuada (FTIR-ATR) da Thermo Eléctron

Corporation, modelo Nicolet 380. A leitura foi feita através de 20 scan, sendo a janela de leitura 4000cm^{-1} .

Foi realizada uma Cromatografia em Camada Delgada (CCD) das amostras sintetizadas e do padrão do Luminol. As amostras foram dissolvidas em etanol e o eluente utilizado foi acetato de etila P.A.

A Ressonância Magnética Nuclear de ^1H (RMN- ^1H) e de ^{13}C (RMN- ^{13}C) foram realizados no aparelho Bruker Avance – 400 operando a frequência de 400 MHz, para hidrogênio e de 75 MHz para carbono. Foi utilizado DMSO deuterado como solvente para essas análises e TMS como referência.

3.5. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE USO DO LUMINOL

Existem muitos tipos de soluções de uso para o Luminol. Este trabalho optou por utilizar a mais referenciada delas. Essa solução de uso foi descrita por Weber em 1966 ⁽¹⁾ e consiste na preparação de 3 soluções estoques, sendo elas:

- a) 8g de hidróxido de sódio em 500 mL de água destilada (solução 0,4M);
- b) 10 mL de peróxido de hidrogênio 30% em 490 mL de água destilada (solução 0,176M);
- c) 0,354g de Luminol em 62,5 mL 0,4M de hidróxido de sódio. Completar com água destilada até 500 mL de solução.

Essas soluções são armazenadas em geladeira. Para aplicar o Luminol na cena de crime é preparada a solução de uso que consiste em misturar 10 mL da solução A, 10 mL da solução B, 10 mL da solução C e completar o volume com água destilada até 100 mL e utilizar imediatamente.

3.6. APLICAÇÃO DO CORANTE HB-7 EM UM CASO REAL

Durante o ano de 2015, dentre os materiais encaminhados para a Perícia Papiloscópica, uma faca utilizada em um crime possuía características que a definiam como de difícil revelação de impressões papilares. Esta faca estava coberta de manchas de sangue e o cabo era de cor preta. O reagente utilizado, nestes casos, é o Amido Black, porém como esse corante apresenta cor azul escuro, a visualização de impressões não apresenta nitidez ou é nula (em superfícies escuras), impossibilitando as próximas etapas da Papiloscopia.

Em colaboração com o laboratório LNMO-QF foi utilizado o corante benzazólico HB-7 para a revelação do sangue no cabo da faca. Também foi feito o uso do corante Amido Black. Inicialmente o sangue foi fixado aplicando a solução de ácido 5-sulfosalicílico a 2% em etanol e água (40:60) com o auxílio de uma pipeta. O excesso foi retirado com água corrente. Foi aplicada a solução corante HB-7 sobre a faca da mesma forma que a fixadora. Após aplicar a luz negra e registrar o resultado, aplicou-se o Amido Black com borrifador.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ESTUDO DA APLICAÇÃO DOS CORANTES BENZAZÓLICOS EM MANCHAS DE SANGUE

4.1.1. Avaliação da efetividade da escolha da solução fixadora

Foram testadas as sete soluções fixadoras propostas neste trabalho, mantendo o mesmo tempo de fixação do sangue. O corante utilizado foi o HB-7 que também permaneceu em contato pelo mesmo tempo. O resultado pode ser observado na Figura 46. É possível verificar que todas as soluções fixaram o sangue, porém algumas se destacam por conseguir que o corante HB-7 obtenha uma cor mais vibrante.

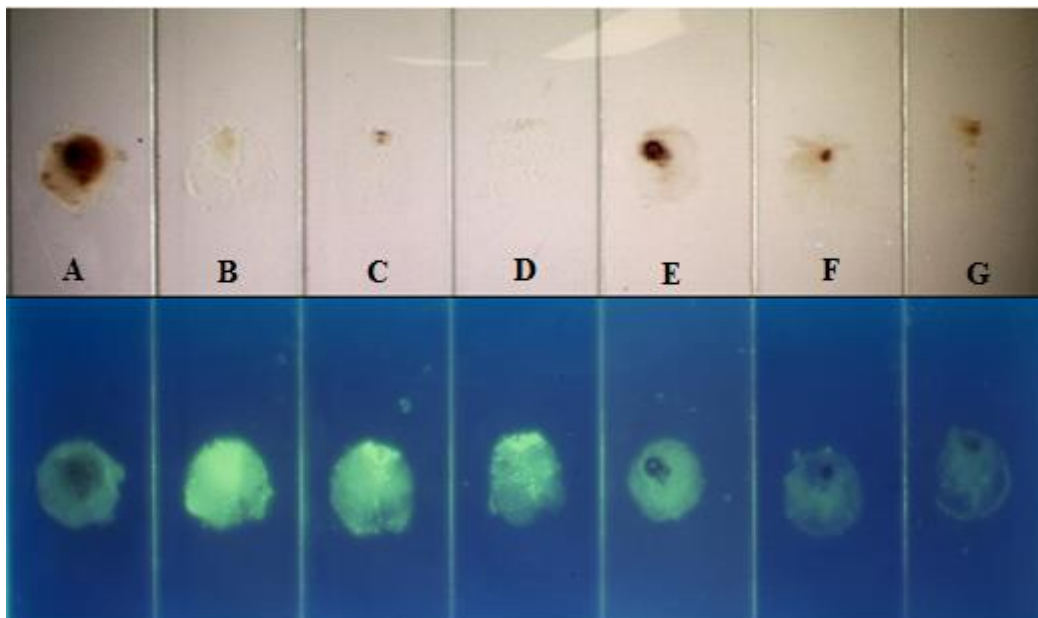


Figura 46: Resultado das diferentes soluções fixadoras coradas com HB-7 e reveladas sob luz UV 254nm. Da esquerda para a direita: A) solução aquosa 2% de ácido 5-sulfosalicílico, B) solução metanólica 2% de ácido 5-sulfosalicílico, C) solução etanólica 2% de ácido 5-sulfosalicílico, D) solução 2% de ácido 5-sulfosalicílico em etanol:água (40:60), solução E) etanol:água (40:60), F) metanol P.A., G) etanol P.A..

As melhores soluções fixadoras foram: solução metanólica 2% de ácido 5-sulfosalicílico, solução etanólica 2% de ácido 5-sulfosalicílico, solução 2% de ácido 5-sulfosalicílico em etanol:água (40:60), as lâminas B, C e D, respectivamente. Essa análise mostrou que apesar de todas as soluções fixarem o sangue, as que continham álcool geravam uma fluorescência mais intensa e que ficou ainda maior na presença do ácido 5-sulfosalicílico.

Como as proteínas possuem estruturas primárias, secundárias, terciárias e quaternárias, essas podem ser rompidas com diferentes variáveis causando a sua desnaturação e precipitação. A estrutura primária, ligação peptídica entre os aminoácidos, permanece intacta, porém as outras podem ser rompidas com variações de pH, temperatura, utilização de solventes orgânicos miscíveis em água, entre outros. Cada uma dessas propriedades age de forma diferente sobre a proteína causando o rompimento das estruturas em diferentes níveis. Isso gera o aumento da superfície de contato que facilita a aderência do corante com a proteína pela interação iônica entre as duas substâncias. No caso dos HBs é necessário utilizar solventes orgânicos (álcoois) e variar o pH (ácido 5-sulfosalicílico) para romper o maior número de estruturas secundárias, terciárias e quaternárias para facilitar a interação do HB-7 com a proteína. Para evitar a toxicidade do metanol, é preferível trabalhar com o etanol e diluí-lo em água para diminuir a inflamabilidade. Desta forma, a melhor solução fixadora e a mais utilizada no decorrer das análises foi a solução etanol/água (40:60) de 5-ASS a 2%. A solução metanólica de 5-ASS a 2% foi utilizada quando foi necessário um solvente que evaporasse rapidamente.

4.1.2. Análise da interferência do tempo de contato das amostras com a solução fixadora e a corante

Nesta análise foi utilizada a solução aquosa do ácido 5-sulfosalicílico em duas concentrações diferentes (2% e 5%) para verificar se essa variação melhoraria a desnaturação da proteína gerando uma fluorescência mais intensa. O resultado, Tabela IV, mostrou que o aumento da concentração do ácido e o aumento do tempo de contato não foram o suficiente para gerar o aumento da luminescência, ou seja, mais interações do corante com a proteína. Isso reforça que essa solução fixadora não gera a desnaturação necessária para um resultado satisfatório. Já a variação do tempo para a solução água:metanol e ácido 5-sulfosalicílico 2% não evidenciou influência significativa na fluorescência final, sendo satisfatória a partir de 1 minuto de contato. Isso indica que a desnaturação ocorreu rapidamente para essas amostras de sangue.

Já a análise do tempo necessário para que o corante consiga se fixar ao sangue, Tabela V, mostrou que é necessário mais de 1 min de contato para que ocorra a interação iônica com uma fluorescência satisfatória, utilizando a solução etanol:água:2% ácido 5-sulfosalicílico já que a aquosa não é um bom fixador para esses corantes. Isso ocorre

porque com pouco tempo de contato ocorre poucas interações, gerando uma luminescência fraca, já com 5 minutos ou mais, o brilho fica intenso e sem variação. Esse teste mostrou que não é necessária uma exposição prolongada com o corante, pois ocorre a saturação dos sítios catiônicos disponíveis para a interação entre corante e proteína.

Além do controle do tempo, a análise visual pode ser utilizada, pois o sangue muda a cor de vermelho para marrom avermelhado quando fixado. Já a aplicação do corante pode ser realizada sob uma luz negra para controle da luminescência. Caso o resultado com o corante não tenha gerado a fluorescência desejada, pode ser reaplicado o corante.

Os resultados obtidos podem ser visualizados de forma resumida nas Tabelas IV e V., onde ruim significa baixa ou nenhuma fluorescência e bom indica fluorescência alta.

Tabela IV: Resultado obtido variando os tipos de soluções fixadoras e o tempo de contato delas com o sangue. Todas reveladas com HB-7 por 3 minutos de contato.

	Tempo de aplicação da solução fixadora		
	1minuto	5 minutos	10 minutos
Solução aquosa 2% de ácido 5-sulfosalicílico	ruim	ruim	ruim
Solução aquosa 5% de ácido 5-sulfosalicílico	ruim	ruim	ruim
Solução etanol/água 2% de ácido 5-sulfosalicílico	bom	bom	bom

Tabela V: Resultado obtido variando o tempo de aplicação do corante utilizando diferentes soluções fixadoras. A fixação foi realizada por 1 min.

	Tempo de aplicação da solução corante		
	1minuto	5 minutos	10 minutos
Solução aquosa 2% de ácido 5-sulfosalicílico	ruim	ruim	ruim
Solução aquosa 5% de ácido 5-sulfosalicílico	ruim	ruim	ruim
Solução etanol/água 2% de ácido 5-sulfosalicílico	ruim	bom	bom

4.1.3. Avaliação das formas de aplicação das soluções sobre as manchas de sangue

A forma de aplicar a solução corante depende muito do tipo da superfície. Para áreas muito grandes é indicado o uso de borrifadores. A qualidade do borrifador influencia para identificar as minúcias quando necessário. O melhor borrifador é o que possui um “jato” em

forma de nuvem, com gotículas bem pequenas. Objetos pequenos podem ser submersos na solução. Esse método garante melhor detalhamento das manchas. Uma alternativa a esse método é utilizar lavagens com o auxílio de uma pipeta. Já a solução fixadora não apresenta grandes complicações, podendo ser aplicada de qualquer maneira com obtenção de bons resultados. Exemplos dos diferentes tipos de aplicação podem ser visualizados nas Figuras 47, 48 e 49 onde foi utilizado borrifador, submersão e lavagem, respectivamente.

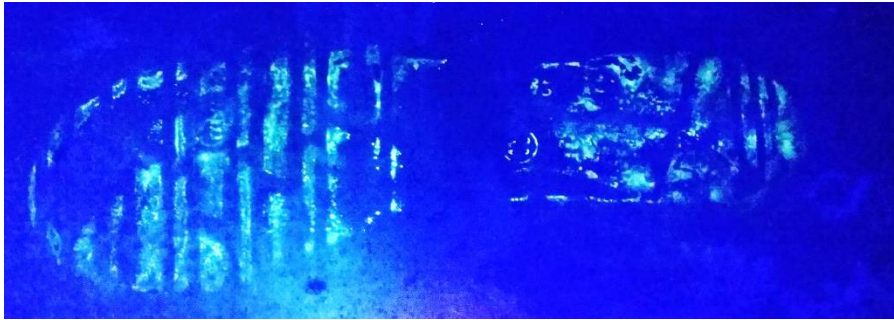


Figura 47: Revelação de uma pegada do solado de um calçado impregnado com sangue usando HB-7 com borrifador.



Figura 48: Revelação de manchas de sangue feitas com dedos revelado com HB-7 por submersão



Figura 49: Imagem do cabo de uma faca manchado com sangue revelado com HB-7 por lavagens utilizando uma pipeta pasteur.

4.1.4. Utilização de diferentes corantes benzazólicos para superfícies diversas

Nesta etapa foram aplicadas manchas de sangue em diferentes superfícies, sendo elas porosas, semi porosas e não porosas. O HB-7 foi testado em todas as superfícies e os corantes HB-9 e HB-11 foram testados em 5 superfícies (madeira crua, madeira MDF, vidro,

polietileno e alumínio). As figuras a seguir mostram o sangue revelado nas diferentes superfícies estudadas.

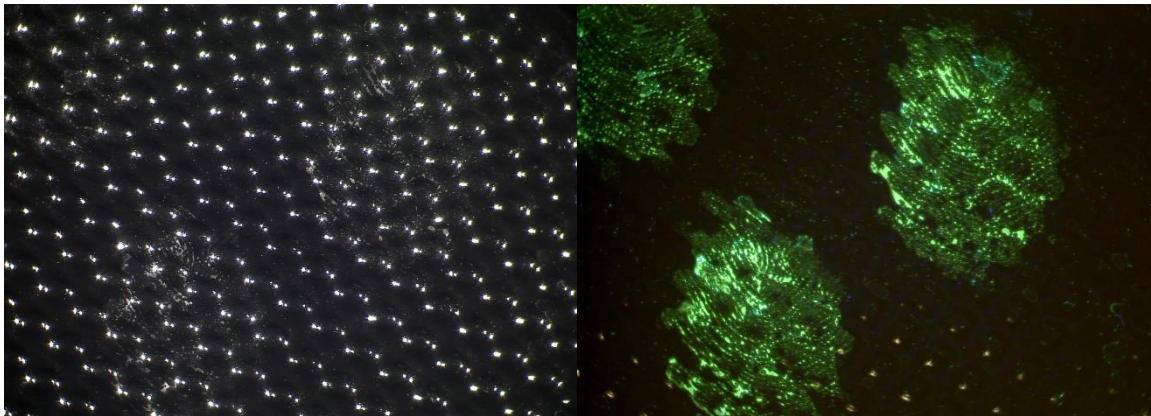


Figura 50: Revelação de manchas de sangue em poliestireno com HB-7.

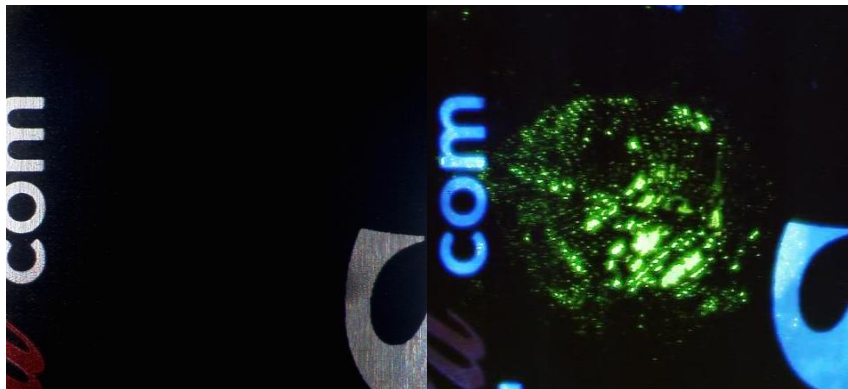


Figura 51: Revelação de manchas de sangue em alumínio pintado (lata de refrigerante) com HB-7.

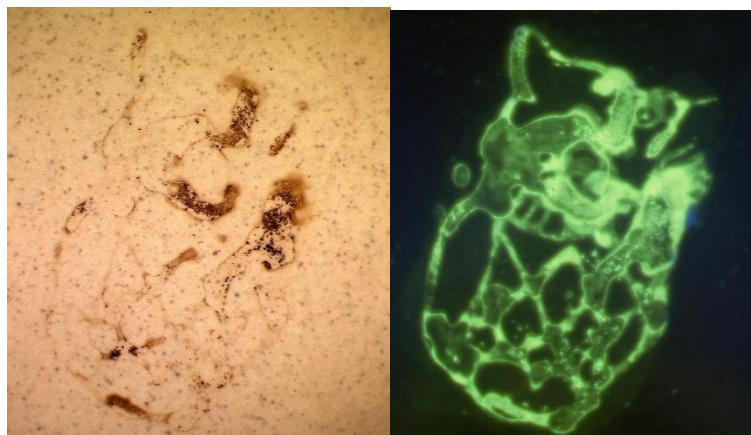


Figura 52: Revelação de manchas de sangue em cerâmica (piso) com HB-7.

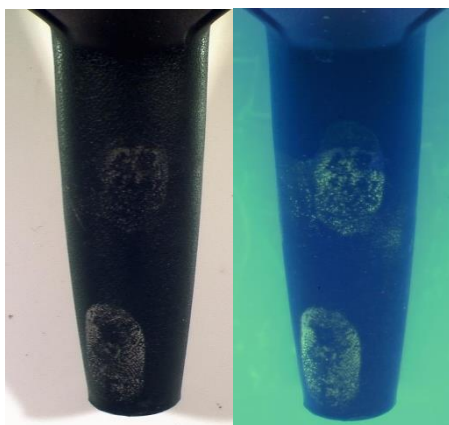


Figura 53: Revelação de manchas de sangue em polipropileno com HB-7.

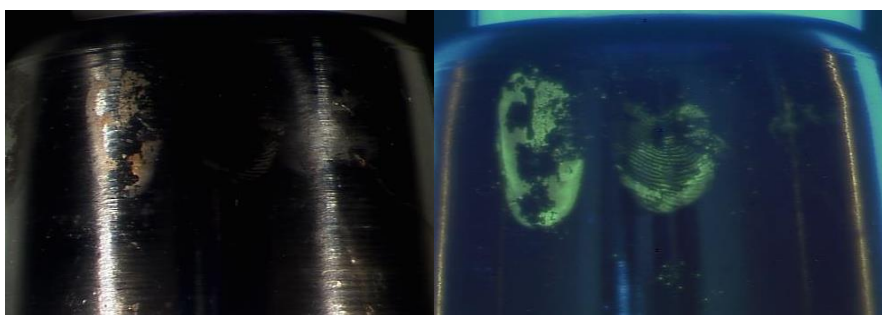


Figura 54: Revelação de manchas de sangue em Aço INOX com HB-7.

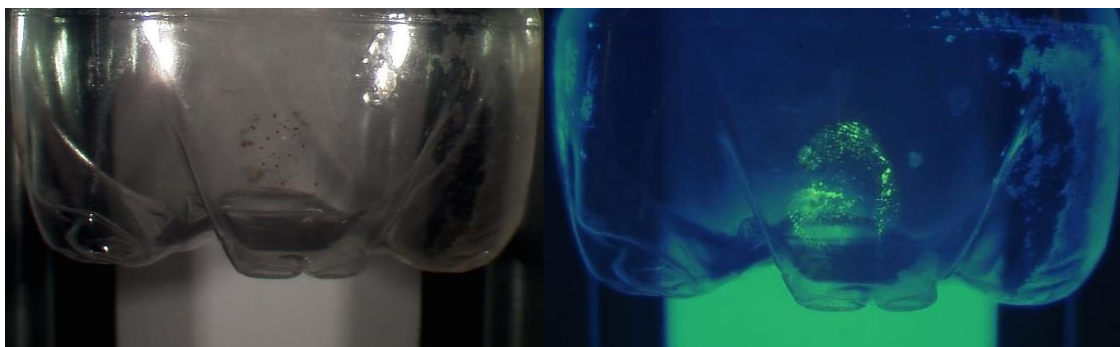


Figura 55: Revelação de manchas de sangue em garrafa PET com HB-7.

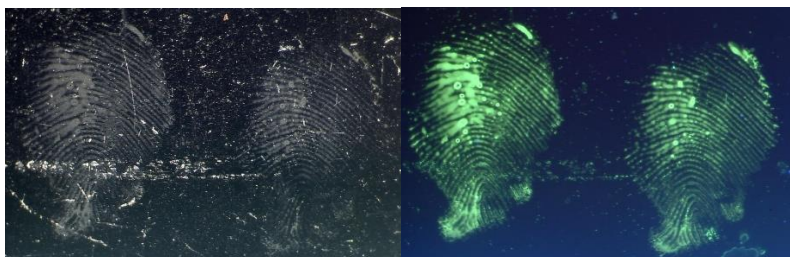


Figura 56: Revelação de manchas de sangue em vidro de cor preta com HB-7.

As Figuras 57, 58, 59, 60 e 61 mostram os três corantes sendo aplicados nas outras superfícies. Em geral o HB-9 e HB-11 funcionam para as mesmas superfícies que o HB-7. As diferenças entre os corantes mostra que o HB-11 possui uma luminosidade mais intensa, porém o fundo de superfícies semi porosas também ficam com mais fluorescência, o que gera uma menor distinção entre a mancha de sangue e o material, como pode ser visto na Figura 57. Já o HB-9 possui fluorescência azulada e obteve resultados satisfatórios quando aplicado por mais tempo que os outros corantes. Isso porque a interação entre o corante e as proteínas deve ser mais fraca, precisando de mais tempo de contato para ocorrer. O único material que não obteve bons resultados com o HB-9 e HB-11 foi o polietileno, Figura 55. Isto pode ser relacionado com a tinta da superfície que foi dissolvida com a aplicação dos corantes, sendo mais agredida pelo HB-11, o que causou um menor tempo de contato dos corantes com ao sangue.

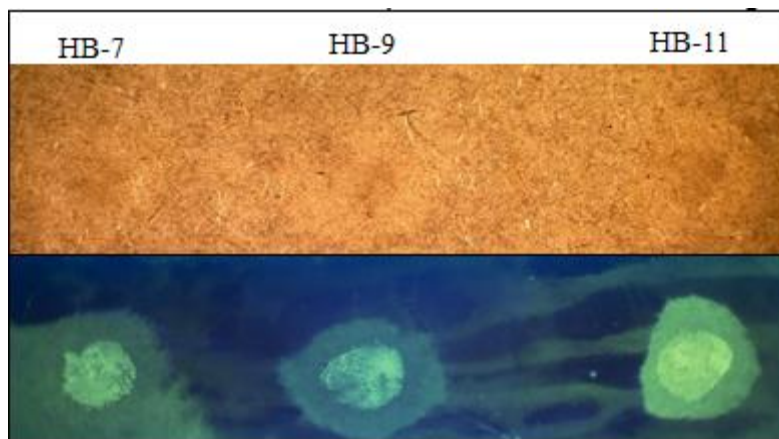


Figura 57: Aplicação dos corantes HB-7, HB-9 e HB-11, respectivamente, em madeira crua.

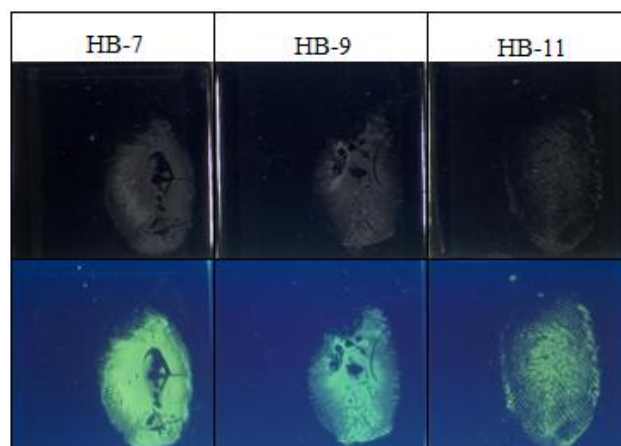


Figura 58: Aplicação dos corantes HB-7, HB-9 e HB-11, respectivamente, em vidro.

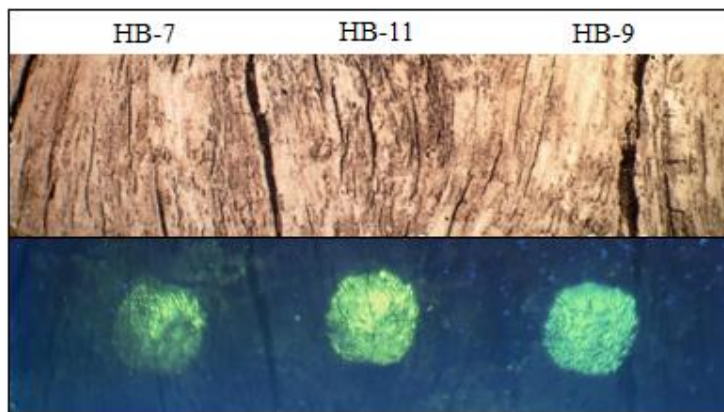


Figura 59: Aplicação dos corantes HB-7, HB-11 e HB-9, respectivamente, em madeira MDF.

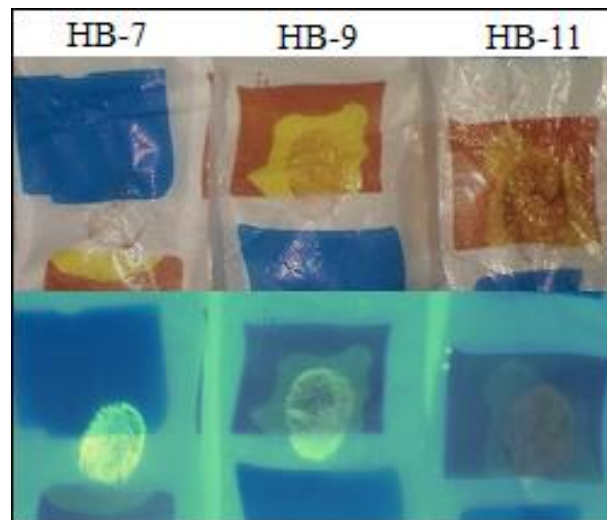


Figura 60: Aplicação dos corantes HB-7, HB-9 e HB-11, respectivamente, em polietileno.

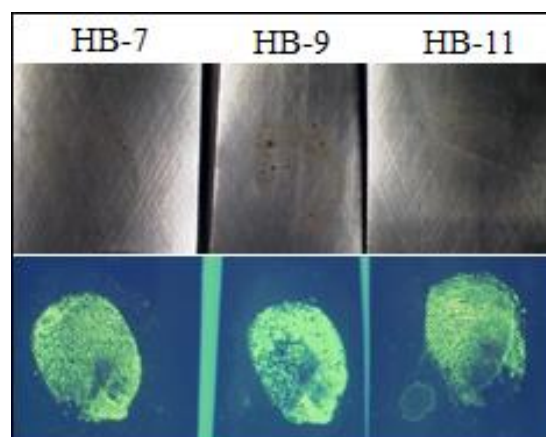


Figura 61: Aplicação dos corantes HB-7, HB-9 e HB-11, respectivamente, em alumínio.

As únicas superfícies que os corantes HBs não tingiram a mancha de sangue foram as mais porosas: tecido, papel e tapete. As soluções foram absorvidas por toda a a superfície e não criaram distinção entre a mancha de sangue (que em geral não apresentou fluorescência) e o fundo da superfície. Além disso, em matérias de cor branca a presença dos branqueadores, que emitem fluorescência azul, interferiu na visualização da fluorescência dos corantes. Mesmo utilizando o filtro laranja, usualmente utilizado nessas superfícies para eliminar interferência dos branqueadores ópticos, não foi possível visualizar a fluorescência dos corantes estudados.

4.1.5. Análise da diluição das manchas de sangue por contato

As primeiras manchas, feitas com o dedo indicador, mostram apenas uma marca de sangue sem nenhuma minúcia de impressão digital para a análise. Conforme as manchas vão sendo depositadas, o volume de sangue diminui. Quanto menor o volume de sangue, melhor fica a impressão digital para a análise dos pontos característicos. A Figura 62 mostra a sequência de dezesseis marcas feitas sobre uma madeira crua. Após utilizar o revelador todas as marcas ficam visíveis, diferente da análise visual na luz branca que mostra apenas seis manchas sem nenhum detalhamento da impressão digital. Apesar de visualizar as dezesseis marcas, nem todas são adequadas para a análise papiloscópica, pois com muito sangue a impressão digital é apenas uma mancha uniforme (sem minúcias) e com nenhuma ou pouca fluorescência devido à reabsorção da emissão da fluorescência que ocorre em altas concentrações. Quando as manchas estão com pouco sangue a impressão digital fica interrompida e com pouca intensidade. O melhor resultado é encontrado em um nível intermediário como mostra a Figura 62 e 63. Nesta última imagem estão ampliadas a 7ª e 8ª deposição.

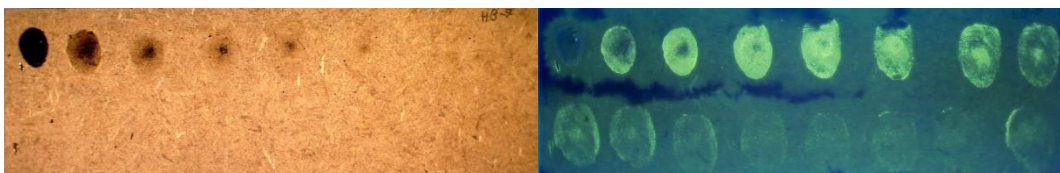


Figura 62: Deposição sequencial de manchas de sangue em madeira crua. Revelada com HB-7.



Figura 63: Zoom das digitas sequenciais 7ª e 8ª da Figura 62.

A qualidade da impressão digital também depende da forma como foi depositada na superfície. Isso é, se pressionar o dedo contra a superfície, mais sangue será depositado, se esfregar, a digital ficará borrada impossibilitando a verificação dos pontos de coincidência.

A análise sequencial também foi realizada com o Amido Black em comparação com o HB-7. As manchas de sangue foram colocadas em vidro e em madeira MDF. As figuras abaixo apresentam os resultados dessa análise.

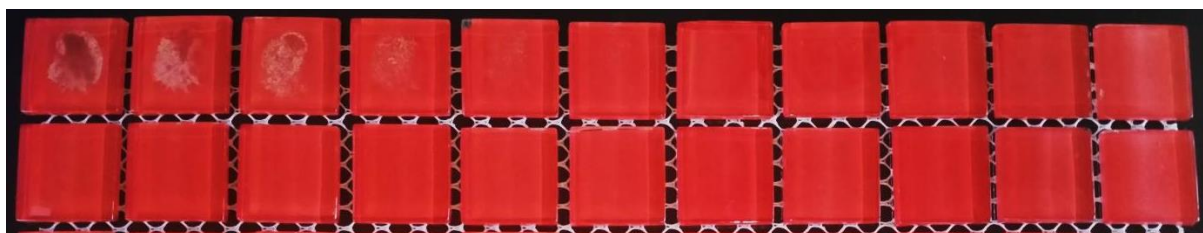


Figura 64: Manchas de sangue depositadas vinte e duas vezes seguidas, em vidro, antes de revelar com o HB-7.

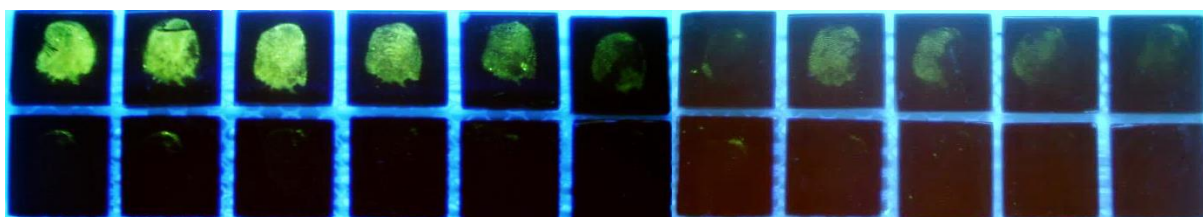


Figura 65: Manchas de sangue depositadas vinte e duas vezes seguidas, em vidro, após revelação com o HB-7.

Com base nas Figuras 65 e 67 pode-se concluir que a revelação é eficiente até a 11ª marcação (final da 1ª linha da Figura 65), pois a partir da 12ª só é possível visualizar traços da digital. Nessa análise não foi aplicada muita pressão para marcar as digitais e nem muito

volume de sangue. Isso pode ser observado pela fluorescência completa que apresenta a 1ª marcação.

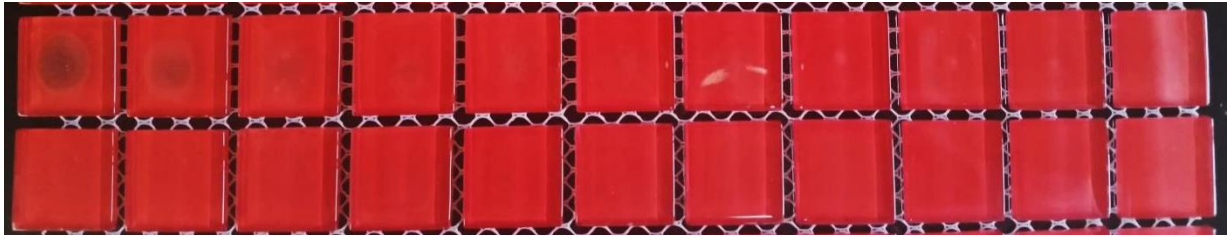


Figura 66: Manchas de sangue depositadas vinte e duas vezes seguidas, em vidro, antes de revelar.

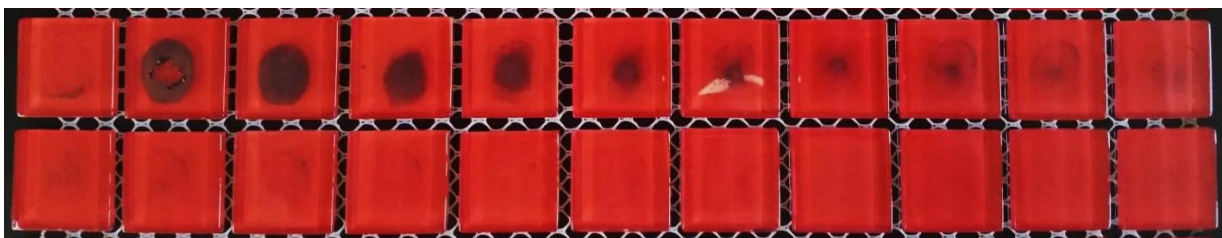


Figura 67: Manchas de sangue depositadas vinte e duas vezes seguidas, em vidro, depois de revelar com o Amido Black.

De forma diferente, outras marcas (Figura 66) foram produzidas com um volume maior de sangue, caracterizado pelas falhas nas primeiras manchas. A concentração estava tão elevada que a marca se desgrudou da superfície como uma película durante as lavagens. São identificadas marcas até a 11ª marcação após revelar com o Amido Black, Figura 67. Esses resultados mostram que os dois corantes possuem sensibilidade muito semelhante. A marcação sequencial feita em madeira está na Figura 68 e os resultados nas Figuras 69, 70 e 71. A Figura 69 mostra a revelação de uma das fileiras (inferior) revelada com o Amido Black. Observar as digitais nessa superfície não é muito fácil pois a cor escura da madeira e do corante geram pouco contraste entre si. Porém é possível visualizar traços da digital, dependendo do ângulo de incidência da luz branca, até a última marcação.



Figura 68: Imagem de marcas sequenciais de sangue em madeira.



Figura 69: Imagem das marcas sequenciais de sangue em madeira. Revelação das marcações da fileira inferior com Amido Black.

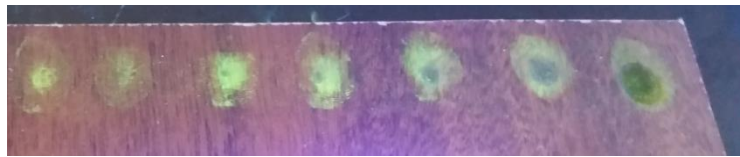


Figura 70: Revelação das manchas de sangue da fileira superior com HB-7.



Figura 71: Comparação das últimas marcações das duas fileiras, uma revelada com HB-7 (esquerda) e outra com Amido Black (direita).

A Figura 70 mostra a revelação das digitais (fileira superior) com o HB-7 tendo grande destaque entre a cor do corante e da superfície, facilitando a análise. A Figura 66 mostra as últimas marcações para os dois corantes. Apesar dos dois corantes funcionarem e mostrarem traços dessas digitais, a técnica com o HB-7 facilita a visualização das marcas, pois como é observado, obter um registro fotográfico de qualidade com diferença de contraste entre superfície e digital é complicado.

4.1.6. Ligação dos corantes com o sangue

Como foi apresentado nesse trabalho, o sangue possui muitas substâncias como proteínas, aminoácidos, sais minerais, entre outros. Existem basicamente dois tipos de reagentes para sangue, aqueles que interagem com as proteínas e os que são oxidados na presença de enzimas. Os corantes proteicos possuem grupo sulfônico como característica

comum na sua estrutura. Esse grupo é o responsável por realizar a interação iônica com os grupos catiônicos das proteínas. Os corantes HB's também apresentam esse grupo químico. Com isso podemos sugerir que eles atuam da mesma forma.

Para verificar com qual substância ocorre a ligação, proteínas e aminoácidos foram fixados em lâminas de vidro. As proteínas aderiram à superfície pela sua característica de desnaturação. Contudo, os aminoácidos não foram fixados, nem sobre superfície adesiva. Ao aplicar o corante HB-7 as proteínas foram tingidas. Isso intensifica a sugestão de interação entre proteína e corante. Como os aminoácidos não foram fixados, não foi possível verificar a interação com essa substância.

A Figura 72 apresenta a lâmina com proteínas fixadas do lado esquerdo e tingida com HB-7 e revelada sob luz negra do lado direito. A fluorescência ficou bem intensa devido a grande quantidade de proteínas fixadas.

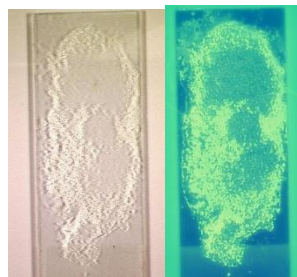


Figura 72: Imagem das proteínas fixadas na lâmina de vidro (esquerda) e tingidas com HB-7 (direita).

4.1.7. Estudo de falso-positivo e interferentes

Em uma cena de crime podem ser encontradas diversas manchas em tons avermelhados que podem ser confundidas com sangue. Por esse motivo é importante verificar os falsos positivos. Nessa análise foram escolhidos produtos fáceis de serem encontrados em residências e que podem provocar marcas semelhantes a sangue. A Figura 73 mostra as lâminas com os falsos positivos e também com dois possíveis adulterantes que são muito utilizados (detergente e hipoclorito de sódio). Esses produtos são utilizados para limpar o local do crime e existe a possibilidade deles reagirem com sangue.

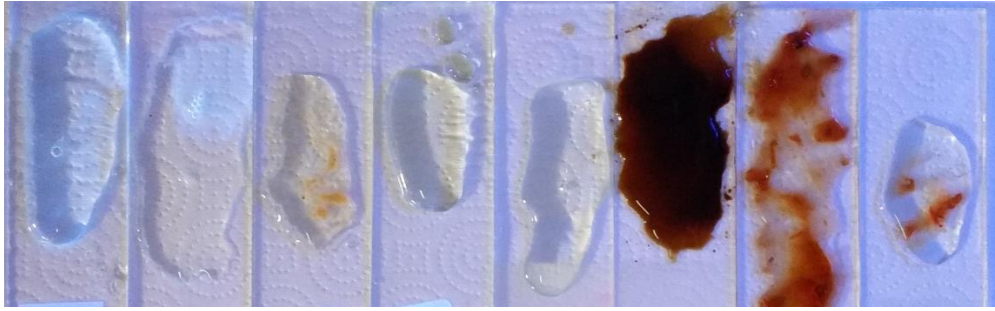


Figura 73: Manchas dos falsos positivos sendo revelada com a solução de HB-7 sob luz negra. Da esquerda para a direita: hipoclorito de sódio, detergente, ketchup, coca cola, beterraba, café, massa de tomate e molho de pimenta.



Figura 74: Manchas dos falsos positivos após serem reveladas com a solução de HB-7 sob luz branca. Da esquerda para a direita: hipoclorito de sódio, detergente, Coca Cola, ketchup, beterraba, café, molho de pimenta e massa de tomate.

Como é possível verificar na Figura 74, após realizar toda a análise a maioria das lâminas ficaram sem vestígios, ou seja, essas substâncias não ficam aderidas à superfície quando fixadas. Ao analisar sob luz negra, apenas a massa de tomate e o molho de pimenta foram tingidos. Não na mesma intensidade que o sangue. Como são substâncias vegetais possuem proteínas em sua constituição é possível gerar falso positivo.

Nenhum dos adulterantes reagiu com o corante e poucas substâncias foram capazes de gerar dúvidas na análise, porém testes específicos para sangue podem ser realizados para definir ou confirmar os resultados. A Figura 75 mostra os dois resultados positivos para essa análise.

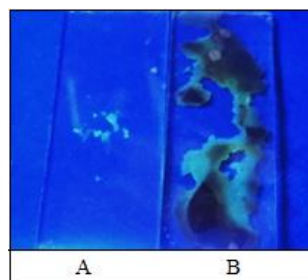


Figura 75: A) Falso positivo para molho de pimenta. B) Falso positivo para massa de tomate.

4.1.8. Estudo da combinação de diferentes técnicas para análises de digitais e/ou sangue latente

A primeira combinação realizada foi a combinação do HB-7 e do Amido Black. O primeiro teste foi realizado aplicando o HB-7 e após visualizar o resultado, foi aplicado o Amido Black. A figura 76 apresenta o esquema da revelação esperado deste teste, aplicando primeiro o HB-7 e depois o Amido Black.

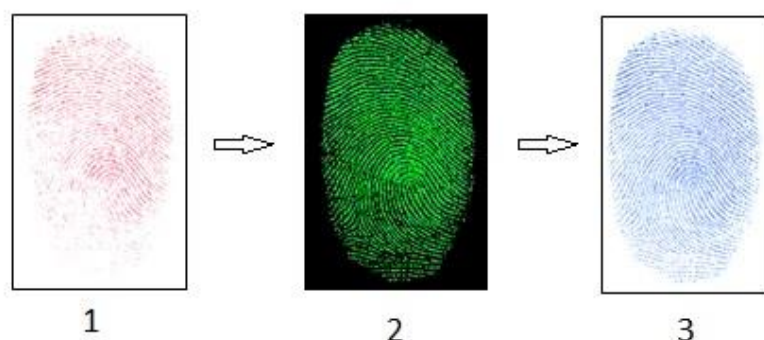


Figura 76: 1) mancha de sangue, 2) revelação com HB-7, 3) revelação com Amido Black.

O resultado mostrou que o segundo reagente inibe a fluorescência do primeiro. Já se a análise for realizada na ordem inversa o HB-7 não consegue se ligar as proteínas. Mesmo mantendo esse reagente em contato com a amostra por 30 minutos o resultado não é eficiente, pois apenas algumas partes são tingidas. As Figuras 77 e 78 apresentam esses resultados. A imagem A mostra que o Amido Black inibiu a fluorescência do HB-7, pois essa não é visualizada no final do processo. Já a imagem B mostra que o HB-7 interagiu fracamente com as proteínas quando aplicado após o Amido Black.

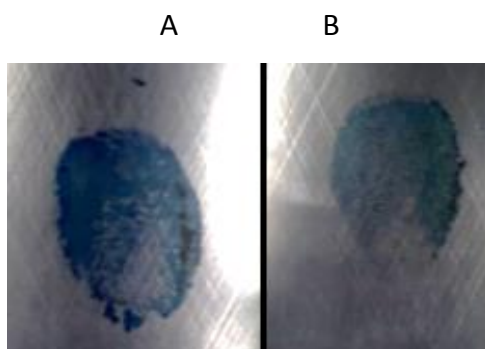


Figura 77: Digitais reveladas com Amido Black e HB-7 visualizadas em luz branca. Na digital da esquerda (A) foi aplicado primeiro o HB-7 e depois o Amido Black. Na B foi aplicado o Amido Black e depois o HB-7.

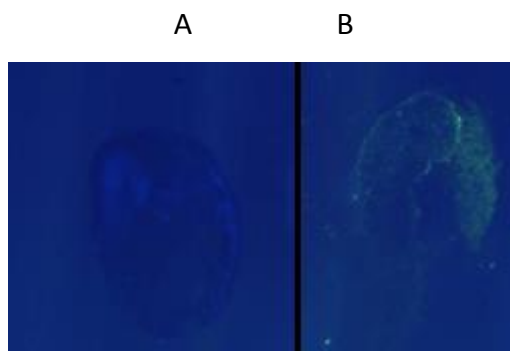


Figura 78: Digitais reveladas com Amido Black e HB-7 visualizadas na luz negra. Na digital da esquerda (A) foi aplicado primeiro o HB-7 e depois o Amido Black. Na B foi aplicado o Amido Black e depois o HB-7.

Se os dois corantes competem pelos mesmos sítios da proteína, o Amido Black provavelmente possui maior força de interação, pois ele tingiu rapidamente sobre o HB-7, mas o contrário não ocorre de forma eficiente. Esse resultado é bom, pois permite a combinação das duas técnicas que podem ser aplicadas e registradas a cada etapa sem perda de qualidade.

Na análise sequencial utilizando Cianocrilato, Luminol e HB-7, o Amido Black não foi utilizado, porém ele poderia ser aplicado após o HB-7 sem prejudicar a análise.

As latas A, B e C foram analisadas utilizando primeiro o Luminol. Na lata C o sangue foi fixado antes de aplicar as técnicas. O resultado obtido não foi bom, visto que o Luminol gera a sua quimioluminescência em todas elas, mas em consequência o sangue é lavado da superfície. Sendo assim, não foi possível visualizar as manchas aplicando as outras técnicas. Na lata C, pelo sangue ter sido fixado, as marcas ficaram mais resistentes e permaneceram traços, parcialmente destruídos, sem conseguir visualizar as minúcias das digitais com o HB-7. A Figura 79 mostra as digitais com o Luminol, já com o HB-7 apareceram apenas pontos fluorescentes. O Cianocrilato não marcou nenhuma das digitais.

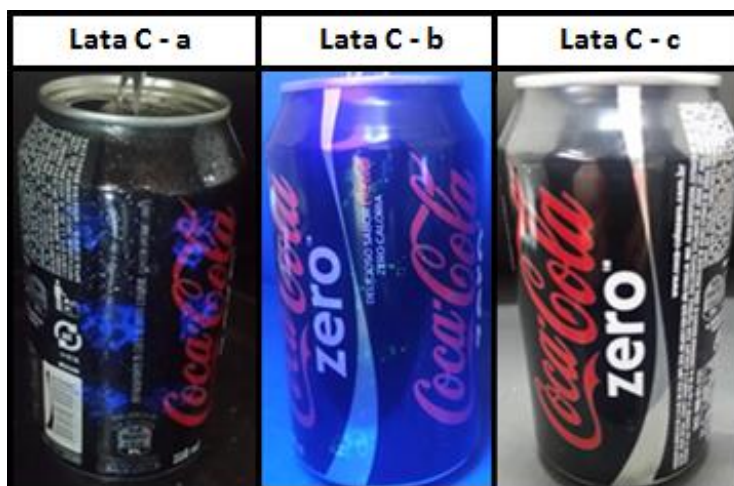


Figura 79: Sequencia de revelação da lata C. Luminol (a), HB-7 (b) e Cianoacrilato (c).

As latas D, E e F foram reveladas utilizando o Cianoacrilato primeiramente. Contudo, nenhuma das marcas de sangue ficou visível (branca) pela deposição de Cianoacrilato. A lata F utilizou Luminol antes do HB-7, o que já foi visto nas outras latas (A, B e C) que não é uma boa sequencia. Novamente o Luminol funcionou, mas o HB-7 não. Entre as latas D e E a diferença foi fixar o sangue na E antes de utilizar o Cianoacrilato. As duas conseguiram mostrar resultados satisfatórios, sendo que a fixada mostrou uma fluorescência melhor com o HB-7 (Figura 80). A figura 81 mostra o resultado da lata D, onde é possível ver a revelação falhada.

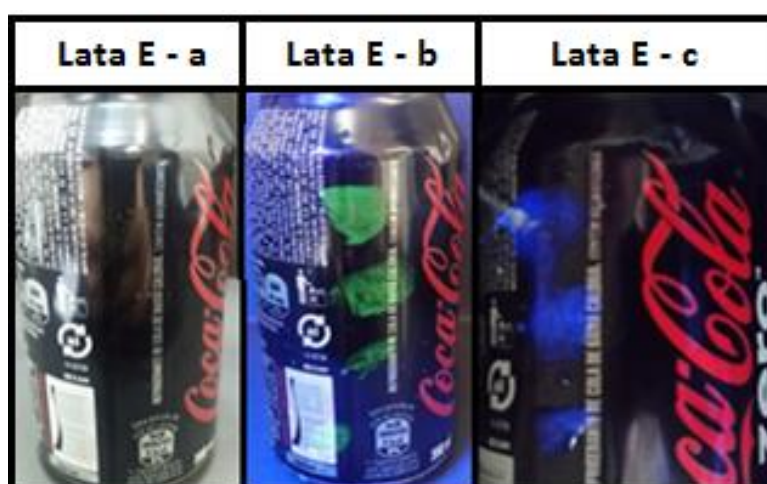


Figura 80: Revelação sequencial da lata E. Cianoacrilato (a), HB-7 (b) e Luminol (c).



Figura 81: Revelação em sequência da lata D. Cianoacrilato (a), HB-7 (b) e Luminol (c).

Nas últimas latas (G e H) foi aplicado primeiro o HB-7 apresentando um bom resultado. O Cianoacrilato não depositou sobre nenhuma marca de sangue independente da ordem de aplicação. O Luminol apresentou quimioluminescência para as duas amostras.

Como o Cianoacrilato não marcou nenhuma lata foi realizado um teste para verificar a aderência dele sobre sangue. Lâminas de vidro foram preparadas colocando o dedo polegar sem sangue em uma delas e com sangue na outra. Ao utilizar o Cianoacrilato, apenas a digital sem sangue obteve o resultado esperado por essa técnica (aparecimento de uma cobertura branca), comprovando que as digitais com sangue não podem ser reveladas com o Cianoacrilato. A utilização dele não interfere nas outras análises, mas as outras técnicas podem interferir na análise do Cianoacrilato para digitais latentes. As lavagens e a utilização dos outros reagentes podem retirar ou danificar as digitais latentes. Por esse motivo o Cianoacrilato deve ser o primeiro reagente a ser utilizado, seguido do HB-7, Amido Black e Luminol, como foi concluído nesse estudo. A Figura 82 mostra claramente o resultado positivo do Cianoacrilato para digitais latentes (esquerda) e o resultado negativo para as marcas com sangue (direita).

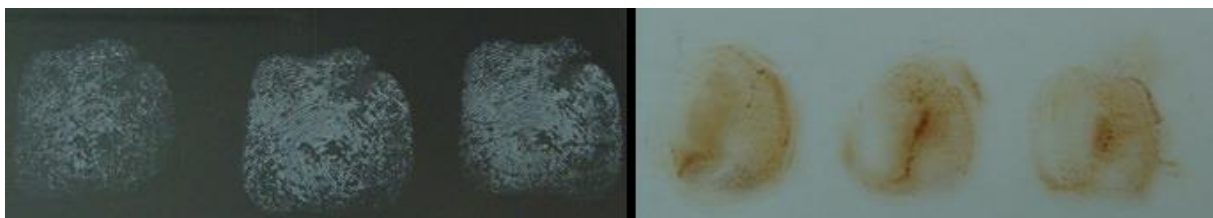


Figura 82: Resultado da análise da aderência do Cianoacrilato sobre digitais puras (direita) e com sangue (esquerda).

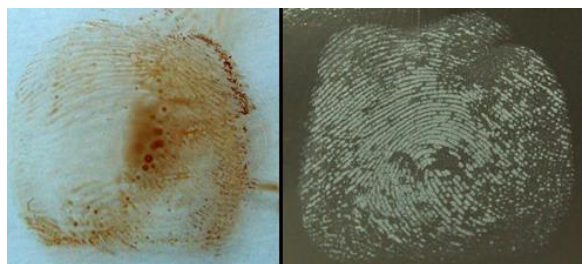


Figura 83: Ampliação do resultado da análise da aderência do Cianocrilato sobre digitais puras (direita) e com sangue (esquerda).

4.1.9. Estudo da sensibilidade

A comparação entre a sensibilidade do HB-7, Amido Black e Luminol foi realizada aplicando esses corantes na melhor sequência já definida nesse trabalho. A Figura 85 apresenta os resultados obtidos com o HB-7. É possível observar a fluorescência até a concentração 0,001% (v/v).



Figura 84: Manchas de sangue diluído em diferentes concentrações aplicadas sobre lâminas de vidro. Da esquerda para a direita: 100% sangue, 50%, 10%, 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% e 0,0001%.

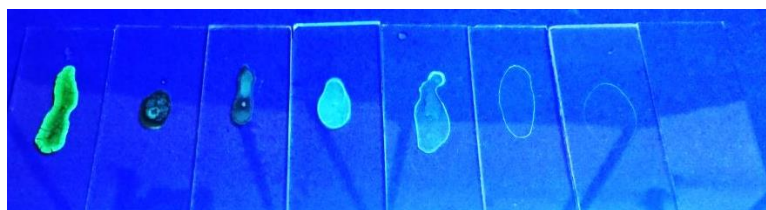


Figura 85: Manchas de sangue de diferentes concentrações reveladas com HB-7.

A aplicação do Amido Black (Figura 86) e do Luminol (figura 87) mostram que a sensibilidade com o Amido Black equivale a do HB-7. Essa sensibilidade fica entre 1:10.000 e 1:100.000. Já o Luminol apresentou uma sensibilidade mais baixa, em torno de 1:1.000. A luminosidade foi diminuindo com o aumento a diluição, o que já era esperado. Porém a sensibilidade pode ter sido mais baixa em função das várias etapas de lavagens que

ocorreram durante a aplicação dos outros dois corantes. Essas lavagens podem levar a uma maior diluição, diminuindo a sensibilidade da técnica.

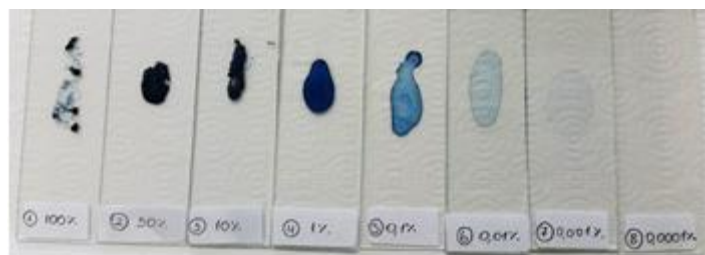


Figura 86: Resultado do teste de sensibilidade para o Amido Black em diferentes concentrações de sangue.

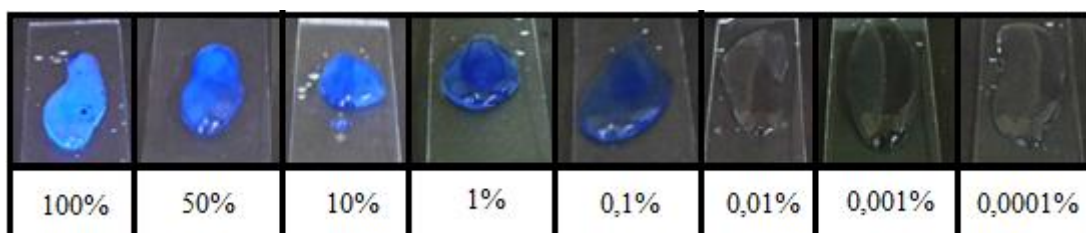


Figura 87: Resultado do teste de sensibilidade para o Luminol em diferentes concentrações de sangue.

4.2. SÍNTESE DO LUMINOL

A primeira etapa da síntese do Luminol foi a nitração do anidrido ftálico. Essa reação é realizada com a mistura de ácido sulfúrico e ácido nítrico que formam o eletrófilo dióxido de nitrogênio. O anel aromático reage com o eletrófilo resultando na mistura dos isômeros, como mostra a Figura 88. O produto ácido 3-nitroftálico (produto A) é o minoritário e menos solúvel em água do que o isômero (Produto B). A separação dos isômeros é realizada com a adição da água no meio reacional devido a diferença de solubilidade dos produtos, porém essa separação não é satisfatória, mantendo uma mistura reacional que resulta em um produto impuro ⁽⁷⁵⁾. Uma alternativa para obter o produto ácido 3-nitroftálico é nitrando o naftaleno ⁽³⁹⁾.

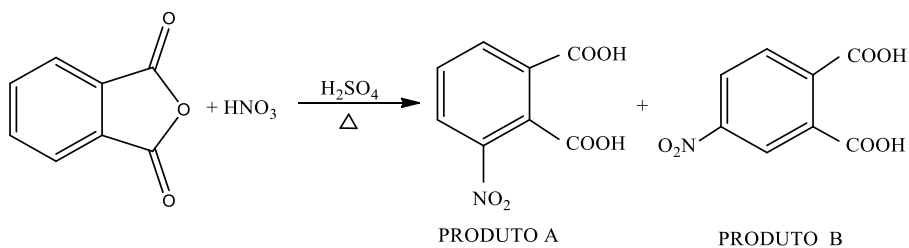


Figura 88: Reação de nitração do anidrido ftálico.

A segunda etapa da síntese é a formação do 3-nitroftalhidrazina a partir da reação do ácido 3-nitroftálico com a hidrazina. Para essa etapa foram testadas 4 rotas sintéticas em que foi utilizado hidrazina 10%, 99% e sulfato de hidrazina. Nas rotas 1 e 2 o sistema é aberto para que a água evapore e a reação ocorre em dietilenoglicol (alto ponto de ebulição) em função da alta temperatura necessária para essa reação. Porém se for colocado em excesso não é possível filtrar o produto, mesmo com a adição, que tem como finalidade solubilizar o dietilenoglicol e o excesso de hidrazina. A reação com o sulfato de hidrazina (Rota 2) é a preferencial por utilizar o reagente em uma versão menos tóxica que a hidrazina pura. O hidróxido de potássio forma o sal 3-nitroftalato de Potássio que reage com o sulfato de hidrazina formando Sulfato de Potássio, que é solubilizado em água, e o 3-nitroftalhidrazina, como mostra a Figura 89. O aumento da temperatura para 210 °C favorece essa reação.

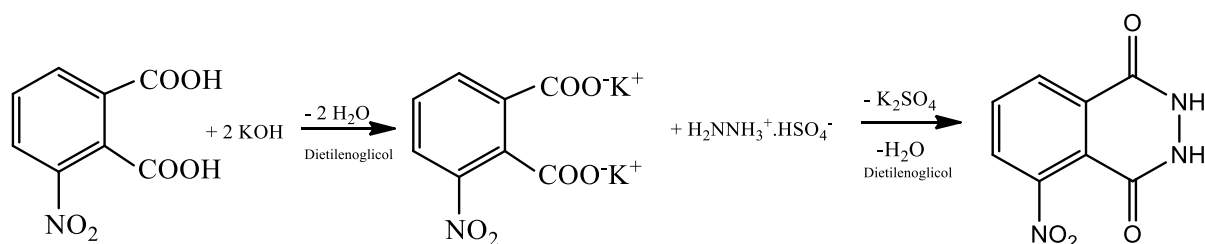


Figura 89: Esquema da reação do ácido 3-nitroftálico com o sulfato de hidrazina.

A Rota 3 tem como inconveniente a utilização de um reagente extremamente tóxico como a hidrazina 99%, além do baixo rendimento quando comparado com a reação que utiliza o sulfato de hidrazina e a baixa temperatura, em função do solvente (etanol), que não favorece o ataque da hidrazina às carbonilas do ácido 3-nitroftálico.

A última etapa consiste em reduzir o grupo nitro para amino. Para isso foi utilizado o ditionito de sódio como agente redutor em água e meio básico. O hidróxido provoca a desprotonação de um dos nitrogênios do anel gerando um composto solúvel no meio reacional. No final da reação, foi adicionado o ácido acético para acidificar o meio provocando a protonação do nitrogênio que causa a precipitação do produto final, Luminol, que é insolúvel em água, como pode ser visto na Figura 90. Se for adicionada pouca quantidade de solvente, os produtos já tendem a precipitar durante a reação. Todas as

recristalizações foram feitas em etanol e as reações foram acompanhadas com CCD em acetato de etila.

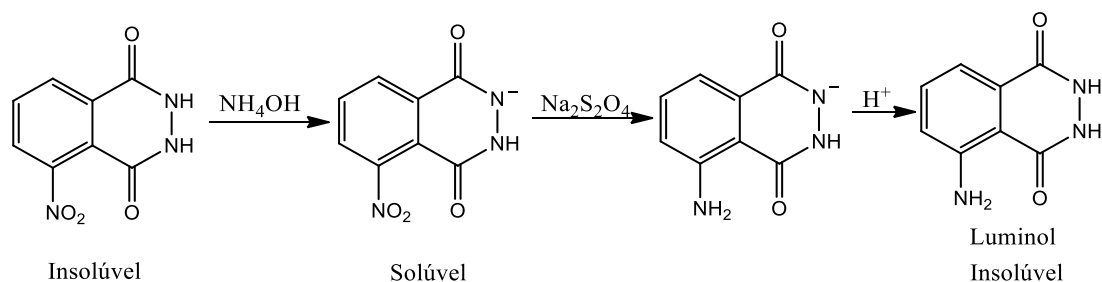


Figura 90: Reação de redução do grupo nitro.

4.3. SÍNTESE DO ISOLUMINOL

A síntese desse produto foi realizada com o objetivo de sintetizar derivados a partir do Isoluminol^(74, 78, 79). Devido a dificuldades na síntese, optou-se por dar continuidade aos derivados em um trabalho futuro.

Diferente do Luminol, essa síntese parte da ftalimida. Essa modificação nos reagentes permite a fácil obtenção do produto 4-nitroftalimida, sem constar a presença do isômero 3-nitroftalimida⁽⁷⁶⁾. Neste caso, ao realizar a precipitação com gelo, o composto precipitado é o majoritário (4-nitroftalimida).

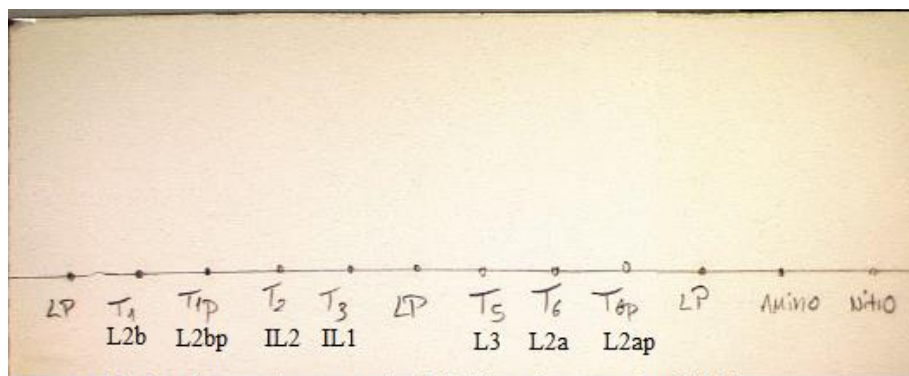
A segunda etapa dessa síntese é a redução do grupo nitro para amino. A redução foi feita seguindo o método que utiliza o ditionito de sódio, apesar de ter outras opções de redução⁽⁷⁷⁾. É realizada em meio básico para garantir a solubilidade do reagente e a insolubilidade do produto. Nesta etapa há a formação de um precipitado amarelo forte e o rendimento depende da quantidade de água adicionada no meio reacional. Em excesso, a água diminui o rendimento por solubilizar o produto.

Na última etapa, igualmente ao Luminol, existem várias descrições para a reação com a hidrazina. A Rota 1 tem como inconveniente a baixa temperatura, em função do solvente utilizado, e da toxicidade do reagente. A Rota 2 apresenta dificuldade na quantidade de dietilenoglicol a ser utilizada, já que o excesso impossibilita a separação do produto. Já a rota 3 (com o sulfato de hidrazina) não funcionou, pois o sulfato ficou insolúvel em uma segunda fase sem reagir com a 4-aminoftalimida. A síntese em fase sólida, Rota 3, com o complexo H-

HQ também não ocorreu da forma esperada. Ao adicionar a água tudo foi solubilizado, o produto não ficou precipitado como era esperado.

4.4. CARACTERIZAÇÃO ESPECTROSCÓPICA DO LUMINOL E ISOLUMINOL SINTETIZADOS

A análise de CCD (Figura 91) foi realizada utilizando o Luminol comercial da Sigma-Adrich como padrão. Os produtos sintetizados pela Rota 2 e 3 mostram que foi sintetizado o Luminol como esperado, pois apresentaram duas manchas, quando visualizada a placa no comprimento de onda de 365nm (Figura 92): uma azul e a outra fraca e levemente amarela esverdeada (com maior tempo de retenção). Essa última deve ser devido a impurezas, pois se assemelha com a análise obtida da 4-aminoftalimida. O produto da Rota 3 praticamente não se assemelha ao Luminol padrão, não obtendo as mesmas manchas nos mesmos tempos de retenção (Rf).



LP = Luminol padrão; Amino = 4-aminoftalimida; Nitro = 4-nitroftalimida.

Figura 91: Imagem da CCD em luz visível. LP = Luminol padrão; L2b = Luminol da Rota sintética 2 (alta temperatura) ; L2bp = Luminol da Rota sintética 2 (alta temperatura) purificado em etanol; L2a = Luminol da rota sintética 2 (baixa temperatura) ; L2ap = Luminol da rota sintética 2 (baixa temperatura) purificado em etanol; IL1 = Isoluminol da rota sintética 1; IL2 = Isoluminol da Rota sintética 2; Amino = 4-aminoftalimida e nitro= 4-nitroftalimida.

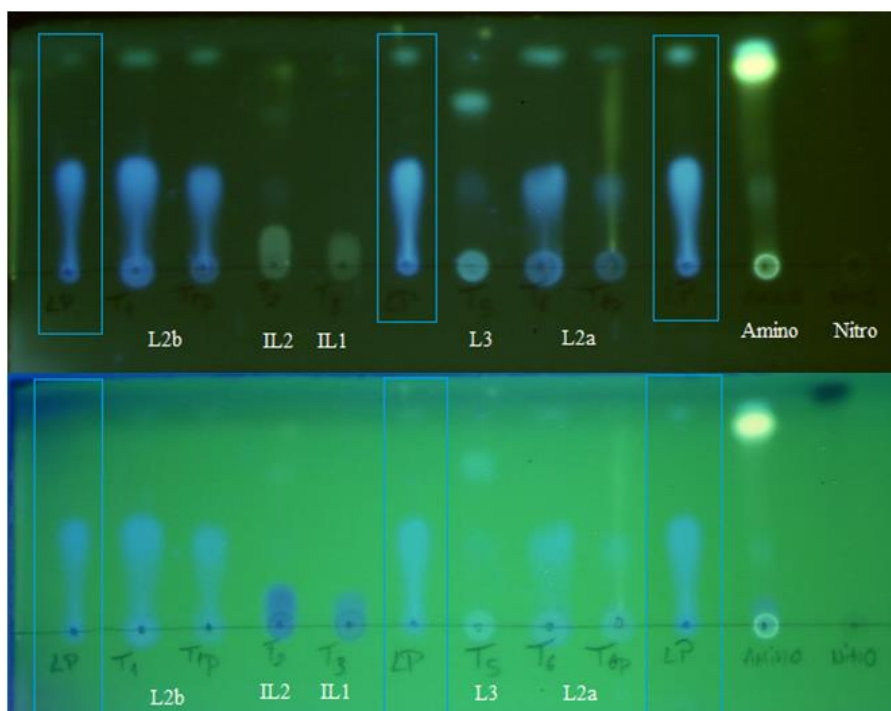


Figura 92: CCD revelada em 365nm (superior) e 254nm (inferior). LP = Luminol padrão; L2b = Luminol da Rota sintética 2 (alta temperatura) ; L2bp = Luminol da Rota sintética 2 (alta temperatura) purificado em etanol; L2a = Luminol da rota sintética 2 (baixa temperatura) ; L2ap = Luminol da rota sintética 2 (baixa temperatura) purificado em etanol; IL1 = Isoluminol da rota sintética 1; IL2 = Isoluminol da Rota sintética 2; Amino = 4-aminoftalimida e nitro= 4-nitroftalimida.

Através da CCD também é possível verificar que o Isoluminol produzido tanto pela rota 1 quanto pela rota 2, se assemelham entre si. A síntese do Isoluminol, combinado com a análise de Infravermelho, mostrou que a ftalimida foi nitrada e reduzida, como pode ser observado na CCD em que o produto Nitro (4-nitroftalimida) é todo convertido no Amino (4-aminoftalimida, pela mudança do Rf. A mancha com maior Rf do Amino (de cor azulada) é a mesma que aparece como contaminante das amostras do Luminol padrão. O Luminol sintetizado também apresenta esse contaminante, devido a dificuldade de separação dos isômeros na síntese do ácido nitroftálico.

Pela análise de infravermelho (IV) o produto sintetizado pela rota 2 em temperaturas elevadas (Figura 94 e 95) é o que melhor se assemelha ao espectro do Luminol padrão (Figura 93), principalmente depois de purificar por recristalização em etanol. O Luminol produzido pela rota 2 com baixa temperatura possui uma pureza menor do que o produzido pela mesma rota mas com temperatura elevada (Figura 96). Já os produtos que foram produzidos pelas rotas 1 e 3 (Figura 97) não possuem um espectro de qualidade por possuir uma pureza muito baixa, mesmo recristalizando em etanol. Isso indica que o aquecimento

brando não favorece a reação com a hidrazina, resultando uma reação incompleta e com muitas impurezas.

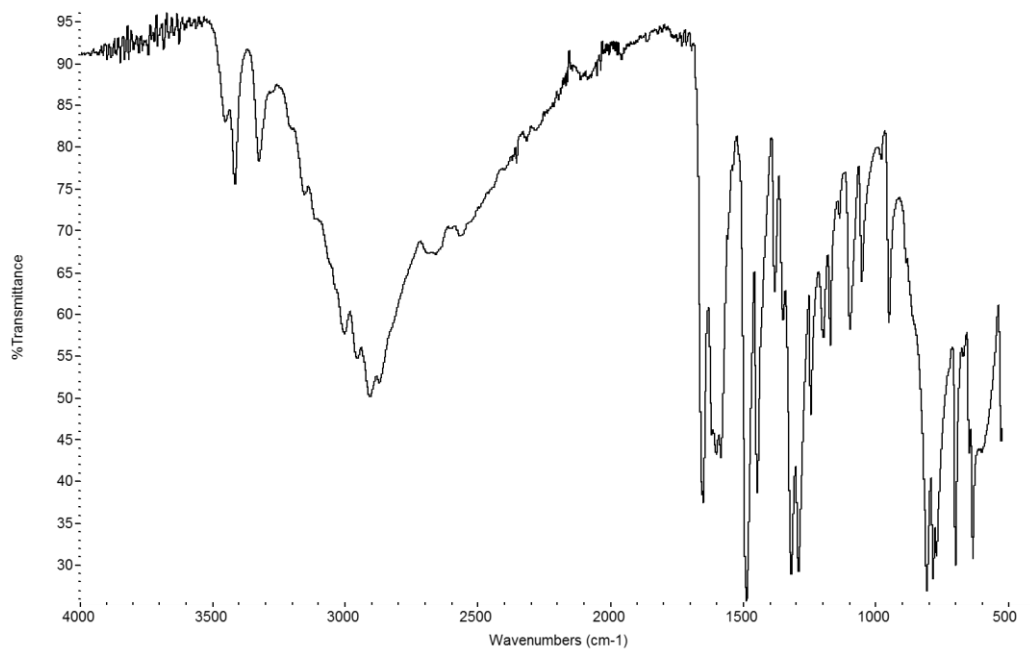


Figura 93: Espectro de infravermelho do Luminol padrão.

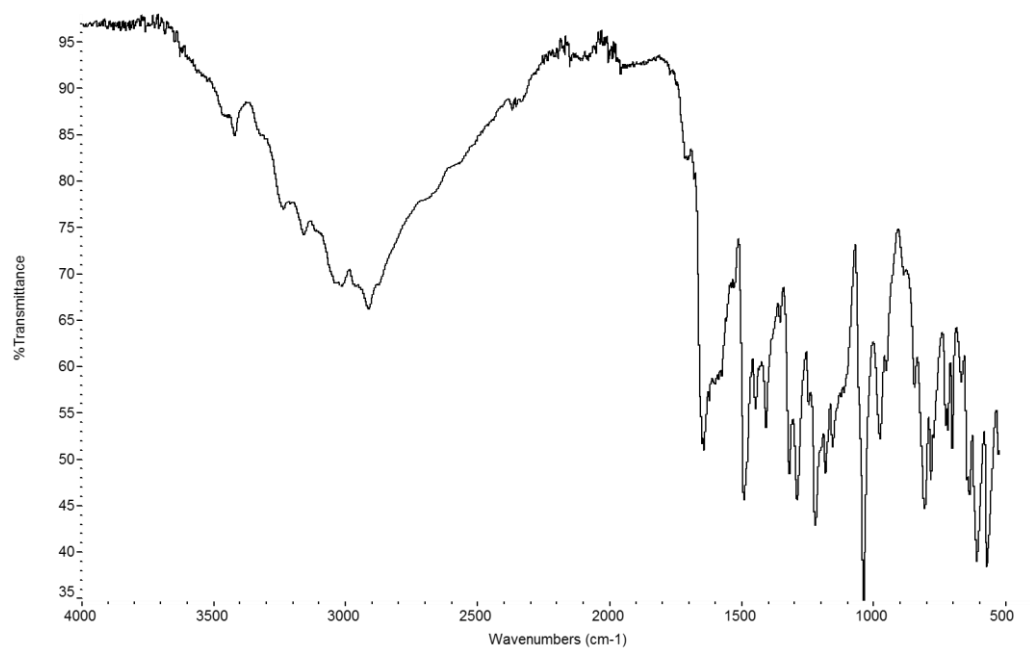


Figura 94: Espectro de infravermelho do Luminol bruto sintetizado via Rota 2 com temperatura elevada.

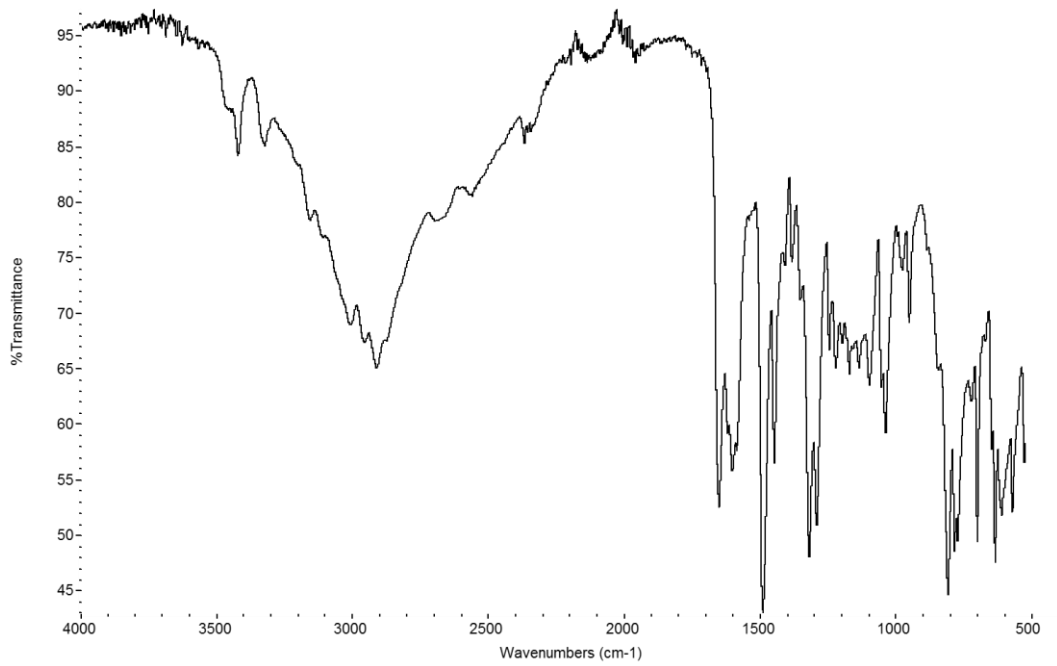


Figura 95: Espectro de infravermelho do Luminol Purificado sintetizado via Rota 2 com temperatura elevada.

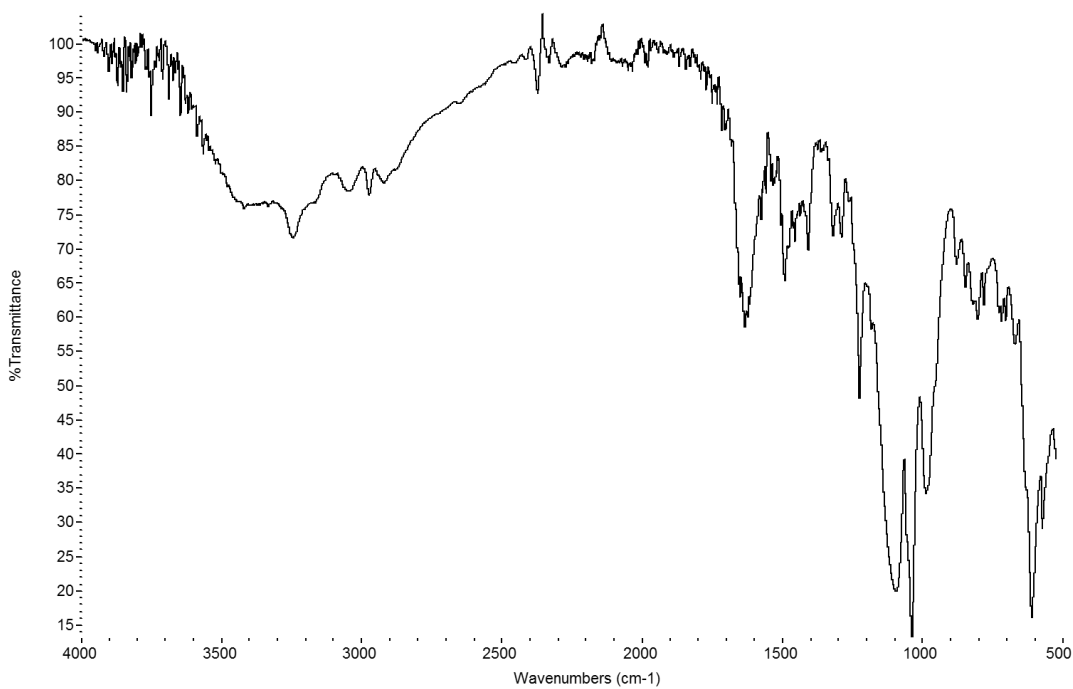


Figura 96: Espectro de infravermelho do Luminol purificado sintetizado via Rota 2 com baixa temperatura.

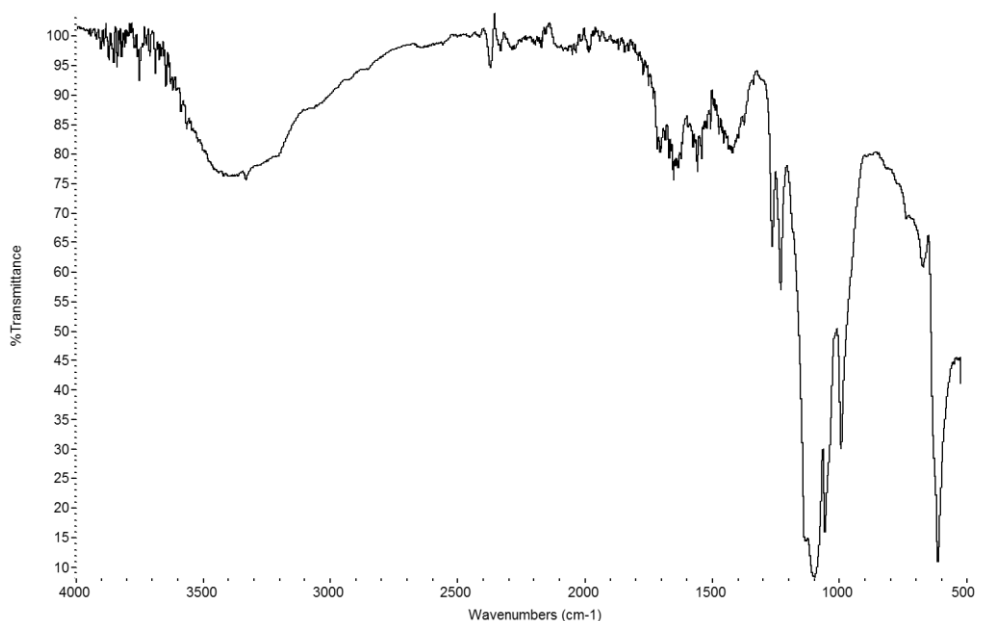


Figura 97: Espectro de infravermelho do Luminol bruto sintetizado via rota 3.

As bandas principais do espectro do infravermelho são as geradas pelos grupos NH, NH₂, C=O, NO₂. Porém os estiramentos tanto da carbonila de amida aromática quanto o estiramento do grupo nitro aromático ficam na mesma região do espectro sendo elas 1500cm⁻¹ e 1300cm⁻¹ (80). Já as bandas características do estiramento axial das amins primárias (2 bandas) e secundárias (1 banda) são mostradas na região entre 3300 – 3500cm⁻¹. Os espectros do Luminol padrão, Luminol (via rota 2 em altas temperaturas) purificado mostram as bandas dos estiramentos das amins. Além das bandas do estiramento assimétrico (1500cm⁻¹) e simétrico da carbonila (1300cm⁻¹). Já os espectros Luminol via rota 2 de baixa temperatura e rota 3 não mostram bandas claras dos grupos amins na região de 3400cm⁻¹, pois há a presença de uma banda larga em toda essa região. Apesar desses espectros serem semelhantes entre si, as bandas da carbonila aparecem muito pequenas. Esses dois produtos não tiveram a sua reação completa. Por essa análise a melhor síntese para produzir o Luminol é a reação com sulfato de hidrazina a altas temperaturas (rota 2) e mantendo um maior tempo reacional. Uma etapa crucial também é conseguir separar os isômeros do ácido nitroftálico.

Os espectros do Isoluminol sintetizados via rota 1 (Figura 99) e via rota 2 (Figura 98) se aproximam muito um do outro. Os espectros mostram que o produto via rota 2 parece mais puro que o via rota 1 por apresentar picos mais definidos, como os característicos do

estiramento axial do grupo amino em $3250 - 3400 \text{ cm}^{-1}$. O espectro do Isoluminol via rota 2 também não apresenta o pico do grupo nitro que o sintetizado pela rota 1 possui em 1550 cm^{-1} . Pela análise desses espectros a reação em refluxo não foi suficiente para reagir a 4-aminofталimida com a hidrazina.

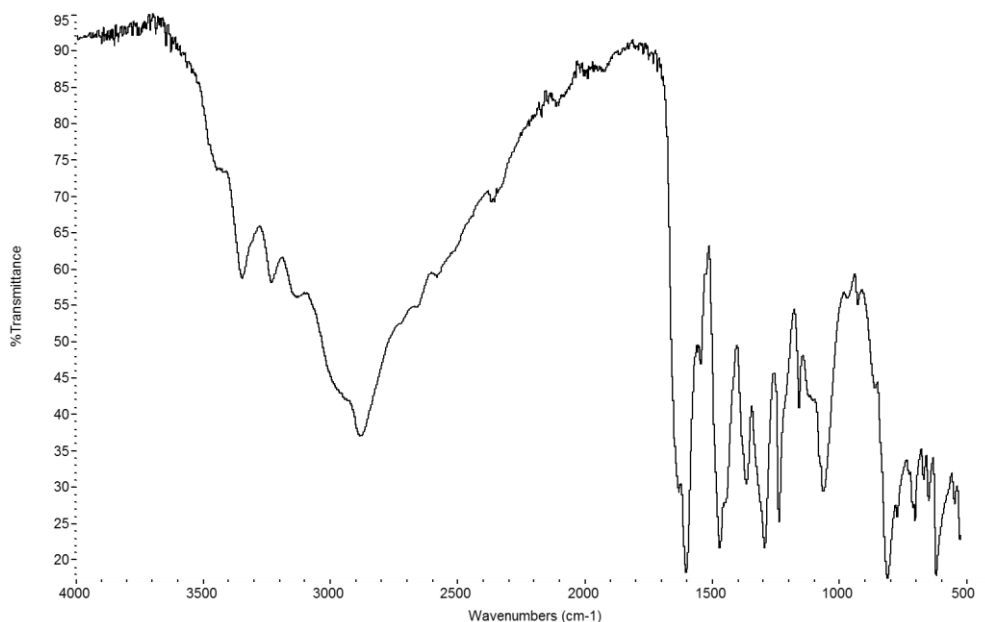


Figura 98: Espectro de infravermelho do produto Isoluminol via rota 2.

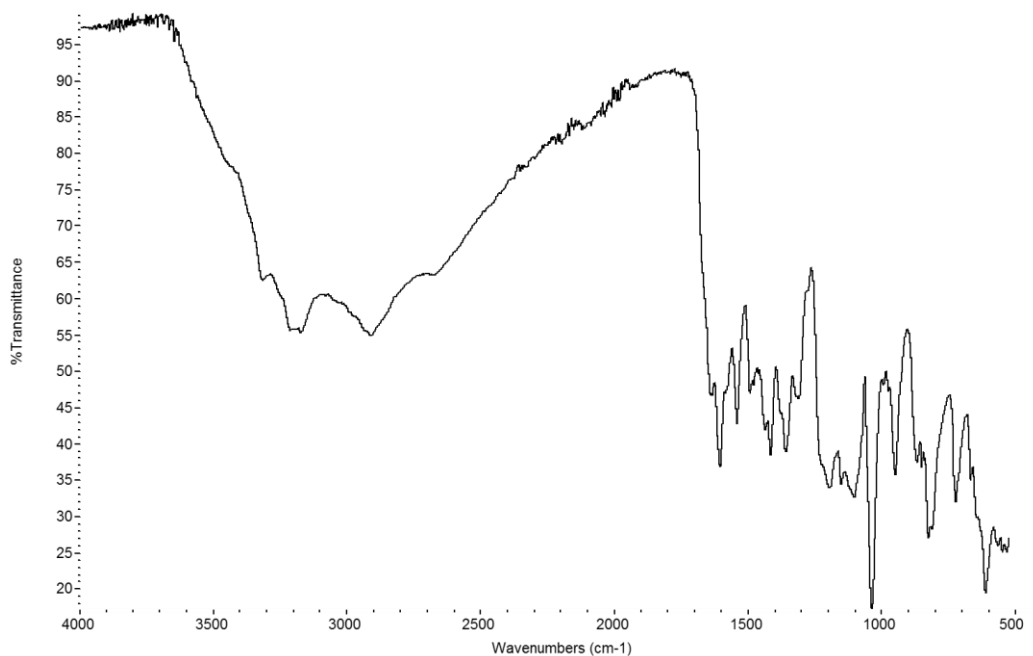


Figura 99: Espectro de infravermelho do produto Isoluminol via rota 1.

Foi realizada a análise de ressonância magnética nuclear de carbono (RMN – ^{13}C) e hidrogênio (RMN – ^1H) do Luminol padrão e do produto obtido pela rota 2 com elevada temperatura que demonstrou estar mais puro. Contudo, o RMN mostrou que há uma mistura de produtos, possivelmente dos isômeros 3- e 4-aminofalhidrazina, pois há mais carbonos e hidrogênios que o esperado para a estrutura do produto. O RMN- ^{13}C mostrou o dobro de carbonos esperados, mas a proximidade indica estrutura muito semelhante, como já era previsto. A mudança na posição do substituinte é suficiente para modificar o deslocamento dos picos de cada carbono. Uma análise delicada do RMN- ^1H do Luminol sintetizado mostrou o sistema de substituição aromática com substituinte no carbono de posição 3, ou seja, foi produzido Luminol, mas não foi possível purificar.

A Figura 100 e 101 mostram o espectro de RMN- ^{13}C e RMN- ^1H , respectivamente, do Luminol padrão. As Figuras 102 à 105 mostram os espectros de RMN do Luminol sintetizado, provando a mistura de produtos mesmo após a purificação com o Etanol.

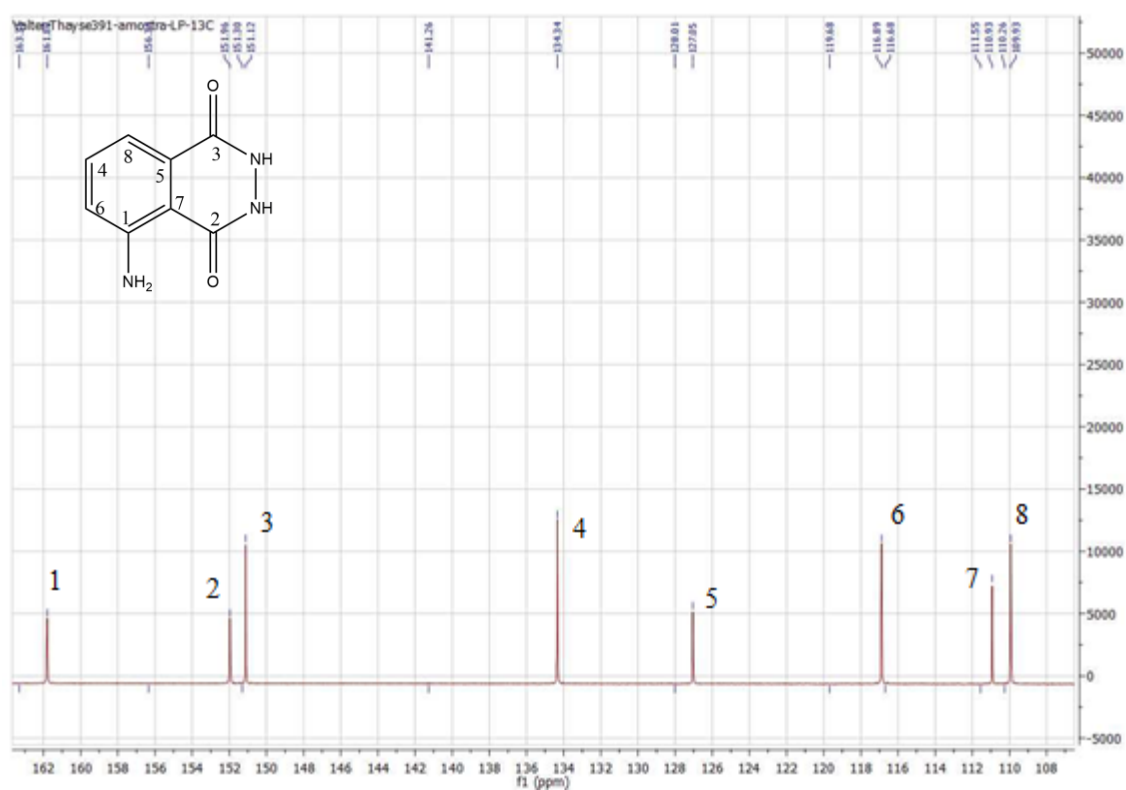


Figura 100: RMN- ^{13}C do Luminol padrão ampliado. Análise em DMSO deuterado e 75MHz.

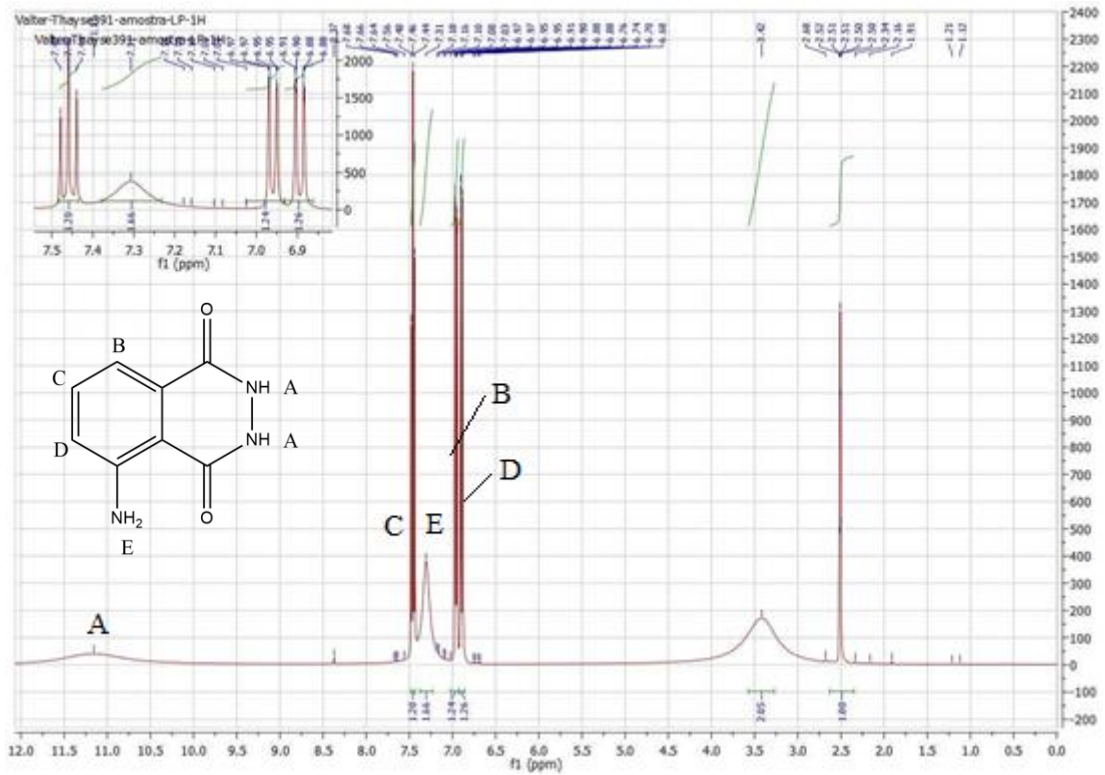


Figura 101: RMN- ^1H do Luminol padrão. Análise em DMSO deuterado e 400MHz.

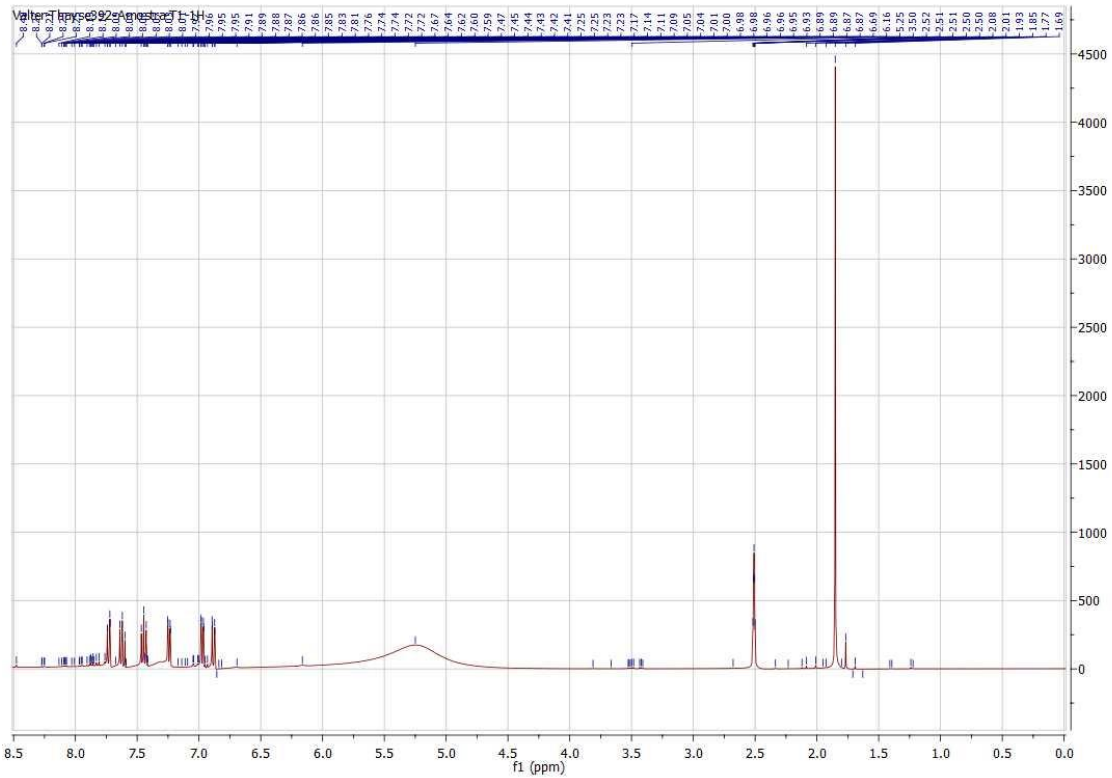


Figura 102: RMN- ^1H do Luminol sintetizado via rota 2 com altas temperaturas. Análise em DMSO deuterado e 400MHz.

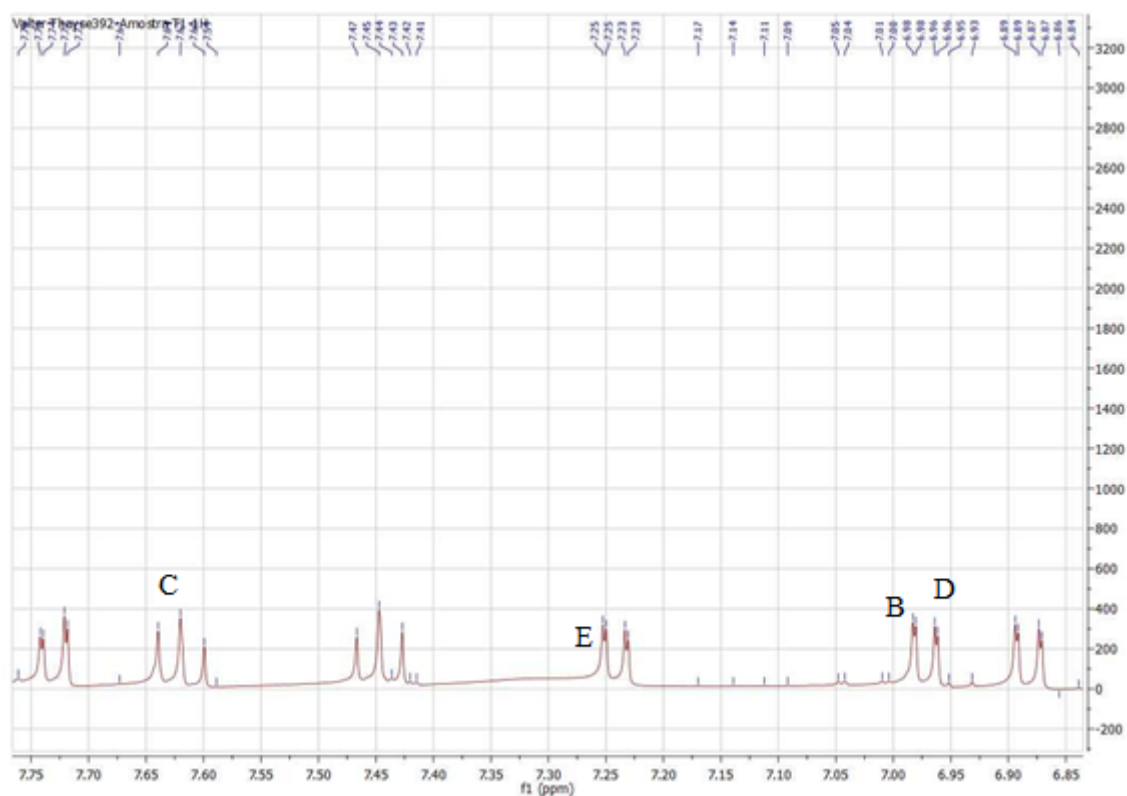


Figura 103: RMN-¹H ampliado do Luminol sintetizado via rota 2 com altas temperaturas. Análise em DMSO deuterado e 400MHz.

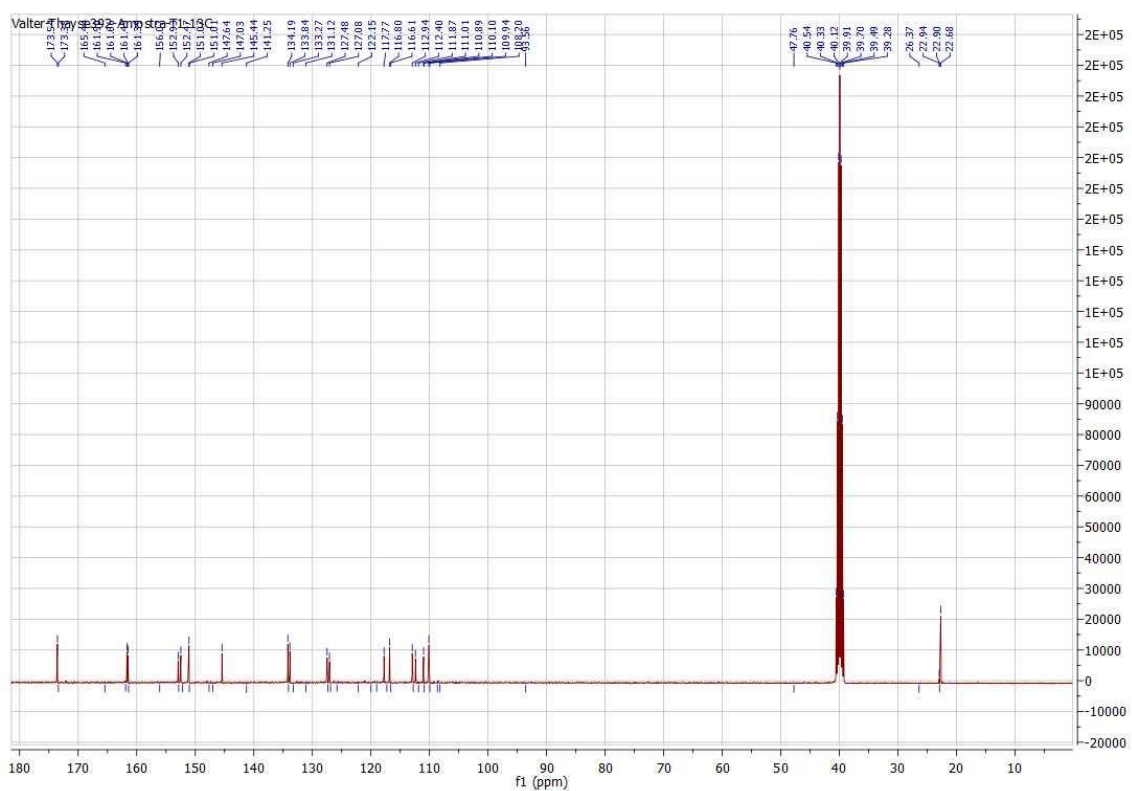


Figura 104: RMN-¹³C do Luminol sintetizado via rota 2 com altas temperaturas. Análise em DMSO deuterado e 75MHz.

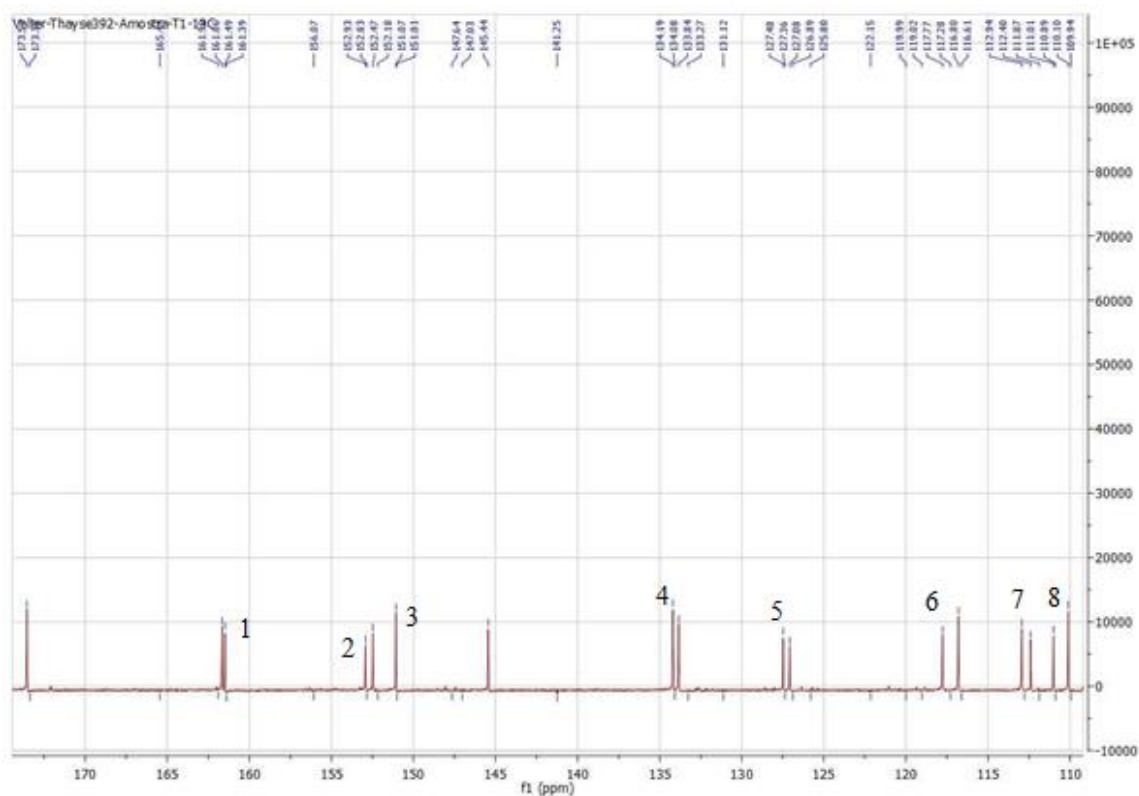


Figura 105: RMN-¹³C ampliado Luminol sintetizado via rota 2 com altas temperaturas. Análise em DMSO deuterado e 75MHz.

4.5. PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE USO DO LUMINOL

Esse procedimento descrito por Weber para a solução de uso do Luminol é a mais utilizada e conhecida. A solução de uso só pode ser utilizada no momento da aplicação, pois se o Luminol ficar em contato com o peróxido de hidrogênio ocorre a sua oxidação e perda da quimioluminescência. Contudo uma solução pronta para o uso foi congelada por uma semana, descongelada e aplicada, o resultado foi igual ao de uma solução preparada na hora. A baixa temperatura desacelerou a reação de oxidação. O peróxido de carbamida é um agente oxidante mais forte que o peróxido de hidrogênio, ele poderia ser utilizado na substituição dos peróxidos na solução de uso do Luminol.

4.6. APLICAÇÃO DO CORANTE HB-7 EM UM CASO REAL

O Amido Black é o corante mais utilizado por ter o potencial de ser aplicado sobre superfícies lisas e porosas dependendo do seu preparo. Porém a única limitação é a sua aplicação sobre superfícies escuras, já que é um corante azul escuro sem nenhum tipo de

luminescência. Para resolver este problema novos corantes são produzidos e estudados de forma a serem tão eficientes quanto, mas que possam ser visualizados em superfícies escuras. Os corantes benzazólicos HBs foram estudados com esse objetivo e devido aos resultados obtidos ao longo do trabalho, foi possível aplicar os reagentes em um material encaminhado à Perícia Papiloscópica do Rio Grande do Sul. A faca apreendida na cena do crime (Figura 106) apresentava sangue no cabo escuro e na lâmina. Primeiramente, o sangue foi fixado e depois foi aplicado o HB-7 (Figura 107). O corante demonstrou um ótimo resultado, podendo ver as marcas de digitais no cabo com grande definição (Figura 108). Após foi aplicado o Amido Black para certificar que tudo tenha sido identificado e para facilitar a análise da lâmina de metal (Figura 109). Neste caso, as impressões reveladas não possuíam elementos suficientes para proceder ao confronto papiloscópico.

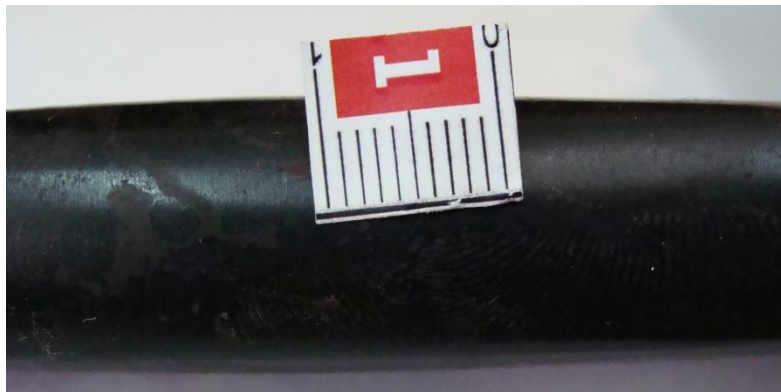


Figura 106: Imagem do cabo da faca, sem nenhum tratamento químico, identificando o local de possíveis digitais.

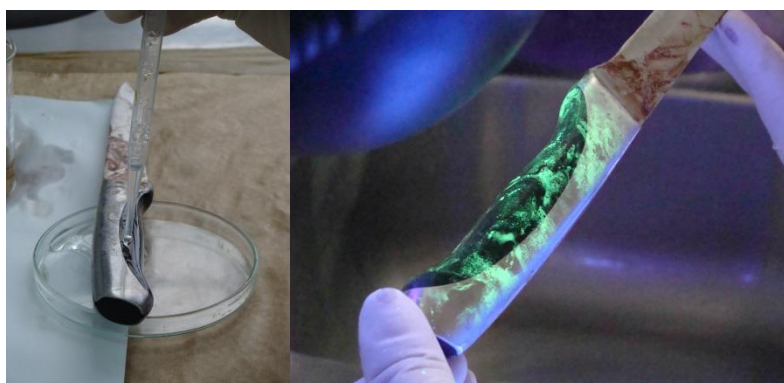


Figura 107: Foto da esquerda aplicando o corante. Foto da direita: visualização da faca após aplicar o corante HB-7, sob luz negra.



Figura 108: Marcação das digitais tingidas pelo HB-7.



Figura 109: Foto da faca revelada com Amido Black.

5. CONCLUSÃO

Os novos corantes benzazólicos (HB-7, HB-9 e HB-11) apresentaram bons resultados na identificação de manchas de sangue latente. Para a análise é necessário utilizar a solução fixadora com ácido 5-sulfossilicico com etanol e água para garantir a melhor intensidade de fluorescência dos corantes pelo aumento da superfície de contato gerada na desnaturação das proteínas. Apesar de terem vantagens em relação ao Amido Black, como a possibilidade de aplicar sobre superfícies escuras, a sua limitação foi a sua utilização para superfícies porosas como papel e tecido. Porém a sua sensibilidade equivale a do Amido Black e essas superaram a aplicação com o Luminol quando aplicadas em sequência.

A possibilidade de combinar esse corante com outras técnicas sem perder as amostras amplia a possibilidades de investigação das provas de um crime. O Luminol não pode ser aplicado antes desses reagentes pois, apesar de não destruir o DNA, ele solubiliza as manchas de sangue. Por outro lado o Cianocrilato não adere sobre superfícies impregnadas com sangue e não prejudica as análises com os corantes, sendo indicado aplicá-lo em primeiro lugar. Fazendo a sequência de revelação dessas técnicas utilizando cianoacrilato, HBS, Amido Black e Luminol, nesta ordem.

Uma grande vantagem de se utilizar esses novos corantes é a sua baixa toxicidade, seu baixo custo de produção e a grande estabilidade que os HBs possuem. Amostras reveladas a mais de 1 ano ainda possuem fluorescência e mantiveram o formato das manchas intacto, o que garante uma contra prova.

A síntese do Luminol possui etapas que necessitam de grande controle reacional, além de ter um processo de purificação insatisfatório. A síntese e purificação do ácido 3-nitroftálico é uma das etapas mais críticas, pois a obtenção desse produto possui baixo rendimento e a separação dos isômeros não é eficaz. A melhor maneira rota sintética para a reação com a hidrazina é a Rota 2, pois utiliza-se sulfato de hidrazina (baixa toxicidade) e deve ser realizado em superfícies altas (210 °C) para o sistema ter energia suficiente para favorecer a síntese. As outras reações realizadas em temperaturas brandas mostraram um rendimento muito baixo e maior mistura de produtos. A produção do Isolumino demonstrou ser mais eficiente com a hidrazina 30% sob agitação e aquecimento elevado, rota 2. Nos dois

casos deve-se controlar a quantidade de dietilenoglicol utilizado, pois em excesso ele impossibilita a obtenção do precipitado. As análises de infravermelho e CCD comprovaram a síntese do Luminol e do Isoluminol, porém o RMN mostrou que não foi possível purificar estes produtos. A análise de cromatografia gasosa não foi utilizada, pois o elevado ponto de ebulição desses produtos não possibilita essa análise.

6. REFERÊNCIAS

1. **James, Stuart H.** *Principles of Bloodstain Pattern Analysis Theory and Practice*. s.l. : Taylor and Francis, 2005.
2. **Virkler K., Lednev I.K.** Analysis of body fluids for forensic purposes: from laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Science International*. 2009, Vol. 188, 1-17.
3. **Brian Yamashita, Mike French.** Latent print development . [A. do livro] National Criminal Justice Reference Service. *The Fingerprint Sourcebook*. s.l. : Createspace Pub, 2014.
4. **Cheyne, Morgan.** Illuminating Latent Blood: Application methods, fixatives, alternatives and new formulas for luminol . *Dissertação de Mestrado*. Auckland : Universidade da Auckland, 2011.
5. **Lydia C.A.M. Bossers, Claude Roux, Michael Bell, Andrew M. McDonagh.** Methods for the enhancement of fingerprints in blood. *Forensic Science International*. 2011, Vol. 210, 1-11.
6. **David L. Nelson, Michael M. Cox.** *Principles of biochemistry*. New York : Freeman and Company, 2005.
7. **Catherine Au, Hayley Jackson-Smith, Ignacio Quinones, B.J. Jones, Barbara Daniel.** Wet powder suspensions as an additional technique for the enhancement of bloodied marks. *Forensic Science International*. 2011, Vol. 204, 13 - 18.
8. **Ken A. Dill, David Shortle.** Denatured States of Proteins. *Annual Review of Biochemistry*. 1991, Vol. 60, 795-825.
9. **Moenssens, Allan Jamieson e Andre.** *Encyclopedia of Forensic Science*. s.l. : Wiley, 2009.
10. **Bertino, Anthony J.** *Forensic science: Fundamentals and investigations*. New York : South-Western, 2009.
11. **Bernstein, Ed.** Science in bloodstain pattern analysis. *International association of bloodstain pattern analysts*. dezembro, 2005.
12. **Nilsson, Anders.** *The forensic luminol test for blood: unwanted interference and effect on subsequent analysis*. Linköping : Linköping University, 2006.
13. Blood Search, Identification and Enhancement. *www.sirchie.com*. [Online] Sirchie. [Citado em: 09 de fevereiro de 2016.]
14. **Carlyle, Felicity.** seeing red - presumptive test for blood. *The GIST*. [Online] Março de 2011. [Citado em: 11 de fevereiro de 2016.] <http://the-gist.org/2011/03/seeing-red---presumptive-tests-for-blood/>.
15. **Drummen, Gregor P. C.** Fluorescent Probes and Fluorescence (Microscopy) Techniques — Illuminating Biological and Biomedical Research . *Molecules*. 17, 2012, 14067-14090.

16. **Filippo Barni, Simon W. Lewis, Andrea Berti.** Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*. 2007, Vol. 72, 896-913.
17. **S, James O Pex M.** The use and limitations of luminol in bloodstain pattern analysis. *International association of bloodstain pattern analysts*. dezembro, 2005.
18. **Kotásková, Michaela.** Synthesis of New Xanthene Derivatives . *Dissertação de Doutorado*. Mainz : universidade johannes gutenberg, 2012.
19. **Valuer, Bernanrd.** *Molecular Fluorescence: principles and applications*. s.l. : Wiley VCH, 2001.
20. **Lakowicz, Joseph R.** *Principles of fluorescence Spectroscopy*. 3ª. s.l. : Spring.
21. **T. I. Quickenden, J.I. Creamer.** A study of common interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence*. 2001, Vol. 16, 295-298.
22. **L. T. Lytle, D. G. Hedgecock.** Chemiluminescence in the Visualization of Forensic Bloodstains. *Journal of Forensic Sciences*. 1978, Vol. 23, 550-555.
23. **Richard King, Gordon M. Miskelly.** The inhibition by amines and amino acids of bleach-induced luminol chemiluminescence during forensic screening for blood. *Talanta* . 67, 2005, Vol. , 345-353.
24. **Terence I. Quickenden, Paul D. Cooper.** Increasing the specificity of the forensic luminol test for blood. *Luminescence*. 2001, Vol. 16, 251-253.
25. **V.R.D. Santos, W.X. Paula, E. Kalapothakis.** Influence of the luminol chemiluminescence reaction on the confirmatory tests for the detection and characterization of bloodstains in forensic analysis. *Forensic science international: Genetics Supplement series*. 2009, Vol. 2, 196-197.
26. **Neha Passi, Rakesh Kumar Garg, MukeshYadav, Ram Sarup Singh, Magdy A Kharoshah.** Effect of luminol and bleaching agent on the serological and DNA analysis from bloodstain. *Egyptian Journal of Forensic Sciences*. 2012, Vol. 2, 54-61.
27. **BlueStar.** BlueStar: Latent Bloodstain reagent. *BlueStar forensic*. [Online] Webdesigner, 2004. [Citado em: 14 de fevereiro de 2016.] <http://www.bluestar-forensic.com/>.
28. **Brigantini, Marie.** *Lumiscene*. Suécia : Laboratório Forense Estatal , 2011.
29. **Cultura Mix.** Como funciona o luminol? *Cultura Mix*. [Online] [Citado em: 14 de fevereiro de 2016.] <http://www.culturamix.com/cultura/ciencia/como-funciona-o-luminol>.
30. **Young, Tina.** A Photographic Comparison of Luminol, Fluorescein, and Bluestar. *Journal of Forensic Identification* . 56, 2006, Vol. 6, 906-912.
31. **Yun Luo, Yi Li, Baoqiang Lv, Zaide Zhou, Dan Xiao, Martin M. F. Choi.** A new luminol derivative as a fluorescent probe for trace analysis of copper(II). *Microchimica Acta* . 164, 2009, 411-417.
32. **Jonathan I. Creamer, Terence I. Quickenden, Leah B. Crichton, Patrick Robertson, Rasha A. Ruhayel.** Attempted cleaning of bloodstains and its effect on the forensic luminol test. *Luminescence*. 2005.

33. **Thomas W Adair, Rebecca L Shaw.** Enhancement of bloodstains on washed clothing using luminol and LCV reagents. *International association of bloodstain pattern analysts*. 2005.
34. **Ron Gabel, Sheri Shimamoto, Ivania Stene, Tom Adair.** Detecting blood in soil after six years with luminol. *Journal of the association for crime scene reconstruction*. 1, 2011, Vol. 17, 1-4.
35. **Bancirova, Martina.** Black and Green tea - Luminol false-negative bloodstains detection. *Science and justice*. 2012, Vol. 52, 102-105.
36. **Peter Bilous, PhD, et al., et al.** *Detecting Burnt Bloodstain Samples with Light-Emitting Blood Enhancement Reagents*. Washington : Eastern Washington University, 2010.
37. **T. I. Quickenden, C. P. Ennis, J. I. Creamer.** The forensic use of luminol chemiluminescence to detect traces of blood inside motor vehicles. *Luminescence*. 19, 2004, 271-277.
38. **Pavia, Lampman, Kriz.** *Introduction to Organic Laboratory Techniques: A contemporary Approach*. s.l. : Saunders, 1976.
39. **Razvan Petre, Gheorghe Hubca.** A performing synthesis strategy of luminol, a standard chemiluminescent substance. *UPB scientific bulletin. Serie B*, 2013, Vol. 75, Issue 1.
40. **Gautam Chattopadhyay, Partha Sinha Ray.** Hydrazine-hydroquinone complex as an efficient solid phase hydrazine donor: high yield synthesis of luminol and luminol. *Journal of chemical research*. junho, 2011, 326-328.
41. **Yoshimori Omote, Takeo Miyake, Seiya Ohmori and Noboru Sugiyama.** The Chemiluminescence of Luminol and Acetyl-luminol. *Bulletin of the chemical society of Japan*. 1967, Vol. 40, 899-903.
42. **Menezes, Filipe Miguel Cardoso.** Synthesis and Chemiluminescence Studies of Luminol and Derivatives. *Dissertação de Mestrado*. Lisboa : Universidade técnica de Lisboa, 2010.
43. **Linda G. Lee, Gillian M. Berry, Chia-Huei Chen.** Vita Blue: A New 633-nm Excitable Fluorescent Dye for Cell Analysis. *Cytometry*. 10, 1989, 151-164.
44. **Couto, Maria da Graça Marques do.** síntese de novos derivados de rodamina para aplicações em biologia e ambiente. *Mestrado em Química*. Porto : Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2013.
45. **Yuichiro Ueno, Guan-Sheng Jiao, Kevin Burgess.** Preparation of 5- and 6-carboxyfluorescein. *Synthesis*. 2004, Vol. 15, 2591-2593.
46. **Mariana Beija, Carlos A. M. Afonso and Jose´ M. G. Martinho.** Synthesis and applications of Rhodamine derivatives as fluorescent probes. *Chemical Society Reviews*. 2009, Vol. 38, 2410-2433.
47. **Gharfeh, Samir George.** Preparation and identification of the sulfonic acids of fluorescein and the metallofluorochromic indicator Calcein. *Tese de Doutorado*. Ames : Universidade do estado de Iowa, 1978.

48. **Vikas S. Patil, Vikas S. Padalkar, Abhinav B. Tathe, N. Sekar.** ES IPT-inspired benzothiazole fluorescein: Photophysics of microenvironment pH and viscosity. *Dyes and Pigments* . 98, 2013, 507-517.
49. **Geberth, Vernon J.** Amazing Advances in Forensic Science Part 2: Advances in Criminalistics. *Law and Order*. 2010, Vol. 58, 9.
50. **Wordnik.** hemin. *Wordnik*. [Online] [Citado em: 14 de fevereiro de 2016.] https://www.wordnik.com/words/hemin?suggested_from=heman.
51. **Preston, Aldous.** Forensic Biology Screening Workshop Blood. What Is Blood? Slightly alkaline fluid made up of water, cells, enzymes, proteins, glucose, hormones, organic. *SlidePlayer*. [Online] [Citado em: 14 de fevereiro de 2016.] <http://slideplayer.com/slide/4462911/>.
52. **Terry Spear, Neda Khoshkebari, Jeanne Clarck, Michael Murphy.** *Summary of Experiments Investigating the Impact of Fingerprint Processing and Fingerprint Reagents on PCR-based DNA Typing Profiles*. s.l. : California Criminalistics Institute, 2002.
53. **section, North Carolina State Bureau of Investigation: Latent evidention.** *Technical Procedure Manual: Hungarian Red*. s.l. : Western Regional Laboratory, 1998.
54. **Velders, Theo.** *New Insight into the Chemical Improvement of Shoeprints and Fingerprints Placed with Blood on Non-Porous Surface*. s.l. : swgtread, 2012.
55. **Penven, Don.** Latent Blood Prints — Methods For Chemical Enhancement. *Crime scene investigator network*. [Online] [Citado em: 14 de fevereiro de 2016.] <http://www.crime-scene-investigator.net/chemicalenhancementlatentbloodprints.html>.
56. **Bodziak, William J.** *The use of Leuco Crystal Violet to enhance shoeprints in blood*. s.l. : FBI Laboratory, 1995.
57. **Sirchie.** Aqueous Leuco Crystal Violet Kit. *Sirchie*. [Online] [Citado em: 14 de fevereiro de 2016.] <http://www.sirchie.com/aqueous-leuco-crystal-violet-kit.html#.VsFi4vkrLIU>.
58. **Mattson, Pamela e Bilous, Peter.** Coomassie brilliant blue: an excellent reagent for the enhancement of faint bloody fingerprints. *Canadian Society of Forensic Science Journal*. 2014, Vol. 47, 1 - (20-36).
59. **Sirchie.** Coomassie Blue. *Sirchie*. [Online] [Citado em: 14 de fevereiro de 2016.] http://www.sirchie.com/products/blood-search-id-enhancement/blood-evidence-enhancement/coomassie-blue.html#.VsFI4_krLIU.
60. **Timothy A. Trozzi, Rebecca L. Schwartz, Mitchell L. Hollars.** *Processing Guide for Developing Latent Prints* . Virginia : U.S. Department of Justice, 2000.
61. **Department of public safety.** TITANIUM DIOXIDE. *Bureau of Criminal Apprehension*. [Online] [Citado em: 14 de fevereiro de 2016.] <https://dps.mn.gov/divisions/bca/bca-divisions/forensic-science/Pages/forensic-programs-crime-scene-titanium.aspx>.

62. **Latent forensic services.** Acid yellow 7. *Latent Forensics*. [Online] [Citado em: 14 de fevereiro de 2016.] <http://www.latentforensics.com/product/acid-yellow-7/>.
63. **Silverstein, Richard.** *Forensic Science: from de CRIME SCENE to the CRIME LAB*. s.l. : Pearson.
64. **Márcico, José Eduardo.** Sistema de classificação de Vucetich. *Papiloscopia*. [Online] 2002. [Citado em: 2 de junho de 2016.] <http://www.papiloscopia.com.br/classifica.html>.
65. **Barros, Hélio.** Síntese e caracterização de novos derivados benzazólicos fluorescentes por esipt e sua aplicação na ciência forense como reveladores de impressões digitais latentes em diferentes tipos de fitas adesivas. *Dissertação de mestrado*. Porto Alegre : Universidade federal do Rio Grande do Sul, 2015.
66. **Silva, Lara Rosana Vieira.** DETERMINAÇÃO DE VARIAÇÕES MORFOMÉTRICAS EM IMPRESSÕES. *Dissertação de Mestrado*. Distrito Federal : s.n., 2015.
67. **Chemello, Emiliano.** Serie Ciência Forense. *Professor Emiliano Chemello*. [Online] dezembro de 2006. [Citado em: 07 de março de 2016.] <http://www.quimica.net/emiliano/especiais/cienciaforense/index.html>.
68. **Marston Taylor Bogert, Leopold Boroschek.** Some Experiments with the mononitroortho-phthalic acids . *Journal of the American Chemical Society. Am. Chem. Soc*, 23:740-61. 23, 1901, 740-761.
69. **Gautam Chattopadhyay, Partha Sinha Ray.** Hydrazine-hydroquinone complex as an efficient solid phase hydrazine donor: high yield synthesis of luminol and isoluminol. *Journal of Chemical Research*. junho, 2011, 326-328.
70. **Maria C. Nagan, Eric V. Patterson and James M. McCormick.** *Synthesis and Characterization of Luminol*. Kirksville : Truman State University.
71. **Organic Chemistry Laboratory.** *A Synthesis of Luminol* . Northridge : California State University.
72. **Williamson, Kenneth.** *Macroscale and Microscale Organic Experiments*. s.l. : Houghton Mifflin Company, 2003.
73. **Valentin Radipoiu, Luminipa wagner, Alina Radipoiu, Petrea Ardeleanu, Viorica Amăriupei, Ana-Alexandra Sorescu.** Synthesis and Characterization of Some Phthalic Acid Derivatives Precursors for Phthalocyanine Chromogens. *Revista de Chimie*. 59, 2008, Nr. 9. 973-978.
74. **Hideyuki Yoshida, Ryuji Nakao, Hitoshi Nohta, Masatoshi Yamaguchi.** Chemiluminescent properties of some luminol-related compounds - part 3. *Dyes and Pigments*. 47, 2000, 239-245.
75. **Shui Wang, Qun-Sheng Li, Xiu Zhuan Lin, Hai Rui Wang, and Liang Liu.** Solubility of 3-Nitrophthalic Acid in Different Solvents between 278 K and 353 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*. 52, 2007, 876-877.
76. **Hideyuki yoshida, Kiyoshi Ureshino, Junichi Ishida, Hitoshi Nohta, Masatoshi Yamaguchi.** Chemiluminescent properties of some luminol related compounds (II). *Dyes and pigments*. 41, 1999, 177-182.

77. **Junichi Ishida, Maki Takada, Tomohiro Yakabe, Masatoshi Yamaguchi.** Chemiluminescent properties of some related compounds. *Dyes and pigments* . 1, 1995, Vol. 27, 1-7.
78. **Levy and Stephen, J. Chem. Soc. 1931, 79.** The preparation of 4-nitrophthalimide and derivatives. *Journal of the chemical society.* 79, 1931.
79. **Venkayah Chowdary, Pulla Reddy.** *A process for the preparation of 3- and 4-aminophthalimide.* WO2004/043919A1 india, 21 de agosto de 2003.
80. **Silverstaein, Robert, Webste, Francis e Kiemle, David.** *Spectrometric Identification of Organic Compounds.* New York : John Wiley & sons, 2005.
81. **BVDA.** Finger- and footprint gelatin lifters. *BVDA.* [Online] [Citado em: 4 de Março de 2016.] http://www.bvda.com/EN/sect1/en_1_2a.html.