



## **Métodos para Análise do Tempo desde a Deposição de Manchas de Sangue em Cenas de Crime: Um Diagnóstico Comparativo**

### **Methods for Analysis of the Time since Deposition of Bloodstains in Crime Scenes: A Comparative Diagnosis**

Douglas Rodrigues Cavalcanti<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Criminalística – Superintendência de Polícia Técnico-Científica de Goiás/SPTC

Received 20 December 2016

**Resumo:** Manchas de sangue estão entre os vestígios mais frequentes em cenas de crime. Esses vestígios biológicos, quando interpretados dentro desses locais, podem determinar a dinâmica de uma infração penal, a identidade de um suspeito e o momento em que um crime foi cometido. Estabelecer o tempo desde a deposição (*time since deposition* - TSD) dessas manchas, pode ser o primeiro indício dos investigadores forenses acerca do momento em que um crime foi cometido. Essa análise é bastante útil, quando uma mancha de sangue constitui a única peça de evidência disponível, por exemplo, em homicídios violentos. Vários métodos de análise já foram propostos, buscando solucionar este importante quesito durante a investigação de uma cena de crime, e o presente estudo apresenta e compara os principais métodos de análise da idade de uma mancha de sangue já relatados pela literatura.

**Palavras-chave:** Idade de manchas de sangue; Cenas de crime; *Time since deposition* (TSD); Análise criminal.

**Abstract:** Bloodstains are among the most frequent traces in crime scenes. These biological traces, when interpreted within these locations, can determine the dynamics of a criminal offense, the identity of a suspect, and the time at which a crime was committed. Establish the time since deposition (TSD) of these stains may be the first indication, for forensic investigators, of the moment a crime was committed. This analysis is most useful when a blood stain is the only piece of evidence available, for example, in violent murders. Several methods have already been proposed, seeking to solve this important issue

during the investigation of a crime scene, and the present study compares the main methods of analysis the age of a blood spot already reported by forensic researchers.

**Keywords:** Age of bloodstains; Crime scenes; Time since deposition (TSD); Criminal analysis.

## 1. Introdução

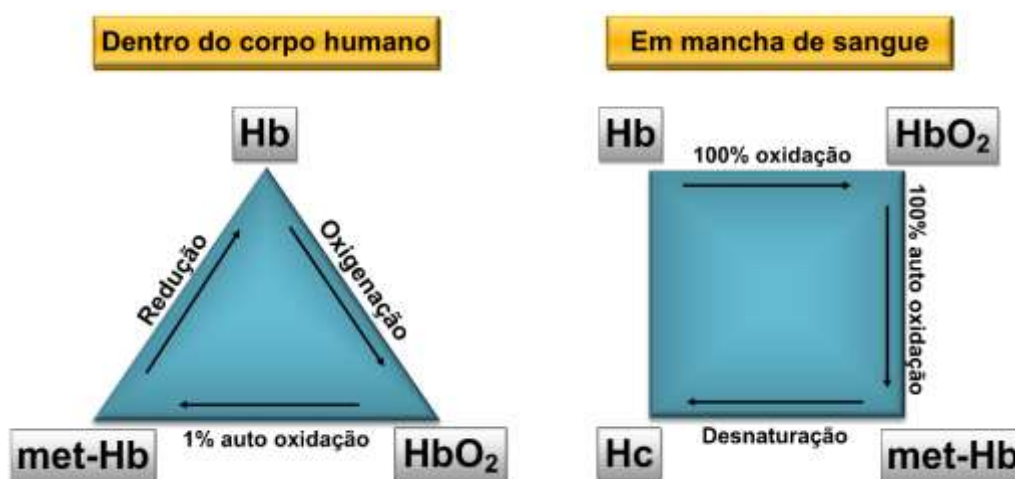
A determinação dos padrões de dispersão das manchas de sangue em cenas de crime pode fornecer elementos importantes para uma investigação forense, auxiliando na análise da dinâmica criminosa<sup>1</sup>. Estabelecer o tempo desde a deposição (*time since deposition* - TSD) dessas manchas, pode ser o primeiro indício dos investigadores forenses acerca do momento em que um crime foi cometido. Isso é particularmente útil quando esses vestígios constituem a única peça de evidência disponível em um crime<sup>2</sup>.

Uma prova criminal pode perder a sua relevância jurídica, caso não seja demonstrado que o seu tempo de produção está relacionado com o momento em que um crime foi cometido<sup>3</sup>, e essa indagação está entre as mais desafiadoras no campo das ciências forenses<sup>4</sup>. O processamento de uma cena de crime é considerado como um dos aspectos mais críticos de investigações criminais eficazes. Locais de crime analisados inadequadamente podem resultar em provas jurídicas de qualidade baixa, aumentando o risco de investigações ineficazes e/ou condenações injustas<sup>5</sup>.

Cientistas forenses, por mais de cem anos, buscam encontrar uma metodologia que permita determinar o tempo desde a deposição (TSD) de uma mancha de sangue seca em uma superfície<sup>6</sup>. Desde então, várias abordagens foram propostas, visando solucionar este importante quesito durante a investigação de uma cena de crime. Porém, até o momento, nenhum dos métodos desenvolvidos e aplicados pôde ser totalmente estabelecido e consolidado na prática forense<sup>6</sup>. Técnicas que incluem a microscopia de força atômica – MFA, ressonância paramagnética eletrônica e degradação do RNA têm sido recentemente exploradas, na tentativa de suprir essa omissão<sup>6-8</sup>. De fato, todas estas abordagens confirmam que as propriedades físicas e químicas de manchas de sangue mudam ao longo do tempo. No entanto, esses métodos precisam ser mais explorados e estudados, visando aperfeiçoar sua precisão e

sua reprodutibilidade para a determinação do lapso temporal associado às manchas de sangue na prática forense<sup>9</sup>.

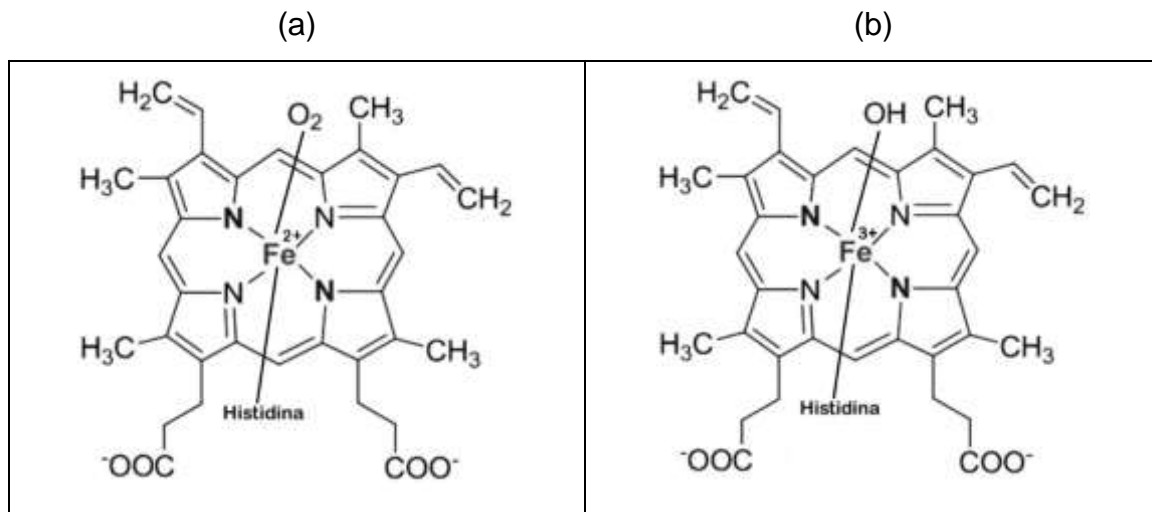
Em sistemas sanguíneos humanos, as moléculas de hemoglobina estão presentes, principalmente, em duas formas: uma sem oxigênio – desoxihemoglobina (Hb) e outra saturada com oxigênio – oxi-hemoglobina (HbO<sub>2</sub>). O nível de saturação médio de sangue arterial é > 90% e de sangue venoso > 70%. Apenas uma pequena parte (cerca de 1%) de HbO<sub>2</sub> é auto oxidada numa terceira forma, met-hemoglobina (met-Hb)<sup>6</sup> (Figura 1). A hemoglobina, quando está ativa na circulação sanguínea, torna-se protegida contra a desnaturação, pois se encontra internalizada nos glóbulos vermelhos – RBCs (também chamados eritrócitos ou hemácias) do sangue e os íons de ferro do grupamento heme são mantidos no estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>) por mecanismos, tanto enzimáticos, quanto não enzimáticos, de modo que a formação de met-Hb, composto que não possui afinidade pelo oxigênio, é dificultada<sup>10</sup>.



**Figura 1:** Simplificação da transformação de reação da hemoglobina dentro do corpo (esquerda) e em manchas de sangue (direita). Desoxihemoglobina (Hb), oxi-hemoglobina (HbO<sub>2</sub>), met-hemoglobina (met-Hb) e hemichromo (Hc). Fonte: Strasser *et al.* (2007), modificado.

Porém, em cenas de crime, quando há uma lesão e a consequente exposição de sangue sobre um substrato qualquer, ocorrerá uma série de processos de degradação sobre o sangue exposto. A maioria dos eritrócitos (RBCs) sofrerá hemólise e as moléculas biológicas estarão envolvidas em reações de hidrólise e/ou oxirredução, principalmente catalisadas por suas próprias enzimas intracelulares<sup>2</sup>. Neste caso, ocorrerá a degradação da porção

polipeptídica da hemoglobina, e a oxidação espontânea do íon  $\text{Fe}^{2+}$  (ferroso) para íon  $\text{Fe}^{3+}$  (férico), uma vez que, nesta condição, os mecanismos intracelulares de redução do ferro, no grupamento heme, não existem mais<sup>11</sup> (Figura 2). o sangue satura-se totalmente à  $\text{HbO}_2$ , assim que entrar em contato com o oxigênio na atmosfera, e, devido à ausência da enzima citocromo b5, necessária para a redução de met-Hb no interior do corpo, a transição de  $\text{HbO}_2$  para met-Hb deixará de ser revertida<sup>6</sup>. Uma vez que a hemoglobina é auto oxidada para met-Hb, ocorrerá sua desnaturação para hemichromo (Hc), o qual é formado por meio de uma alteração na conformação interna do grupo heme<sup>12</sup> (Figura 1). Este processo pode levar a alterações estruturais expressivas nas proteínas e na estrutura morfológica das hemácias (RBCs) em manchas de sangue, as quais poderiam ser investigadas por diversos métodos analíticos.



**Figura 2:** (a) Moléculas de ligação com o ferro no sangue. Estrutura molecular heme em oxihemoglobina com o ferro em sua forma reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) coordenado pelo  $\text{O}_2$  na sexta posição de coordenação (deoxihemoglobinas não possuem ligantes nesta posição); (b) estrutura molecular com o ferro na forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e a ligação de um íon hidróxido. Modificado de Barni *et al.*<sup>11</sup>.

Assim, o presente estudo tem por objetivo avaliar, por meio de revisão bibliográfica integrativa, os principais métodos para análise do tempo desde a deposição (*time since deposition* - TSD) de manchas de sangue, com enfoque para cenas de crime, visando comparar e confrontar essas metodologias. No critério estabelecido para análise dos trabalhos da literatura, não foi utilizado limite temporal para inclusão de artigos científicos, porém, quando conflitantes e/ou

repercutidos, utilizou-se, como referência, de estudos com análises e informações mais recentes.

## **2. Métodos descritos na literatura para análise do tempo desde a deposição (TSD) de manchas de sangue**

Nos últimos anos, diversas técnicas, para análise do TSD de manchas de sangue, foram relatadas na literatura. Entretanto, conforme descrito no estudo de revisão de Bremmer *et al.*<sup>2</sup>, o potencial para se utilizar manchas de sangue na determinação do momento do crime, ainda não foi completamente consolidado nas análises de locais de crime, apesar das diversas tentativas nesse sentido. Dentre as técnicas já propostas, pode-se destacar: Espectroscopia de Reflectância, Espectroscopia no Ultravioleta Visível – UV-Vis, Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica, Espectroscopia Raman, RT – PCR/qPCR (Análise de RNA), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (HPLC), Microscopia de Força Atômica – MFA e métodos alternativos – como a análise por *smartphones* (dispositivos móveis) e imagens digitais. Para o presente estudo, foram considerados métodos alternativos, aqueles que não são aplicados: a) por instrumentos de análise por espectros; b) por instrumentos de alta resolução eletrônica/atômica; c) por instrumentos que possuem alta capacidade de separação analítica. Dentro desse cenário, para análises de glóbulos vermelhos ou brancos, apenas dispositivos móveis e análises de imagens digitais foram observados na literatura forense. Outros métodos alternativos foram observados para análises de proteínas/aminoácidos do plasma sanguíneo, porém, os estudos que envolveram moléculas do plasma não foram abordados nas comparações deste trabalho.

### **2.1 Espectroscopia de Reflectância**

Baseada na transformação da hemoglobina em seus derivados (oxi-hemoglobina, meta-hemoglobina e hemicromo), quando fora do corpo humano, Bremmer *et al.* (2011)<sup>13</sup> utilizaram espectroscopia de reflectância difusa para analisar manchas de sangue em ambiente controlado (laboratorial), durante 60 dias de análise. Um total de 1412 espectros de reflectância foram mensurados pelo grupo durante esse período. Os resultados demonstraram a possibilidade de se utilizar essa técnica na análise do TSD de manchas de sangue em ambiente controlado, porém outros

estudos são necessários para se utilizar a técnica em ambientes não-controlados, tais como locais de crime.

## 2.2 Espectroscopia no Ultravioleta Visível – UV-Vis

Hanson & Ballantyne<sup>14</sup>, desenvolveram um método para a estimativa do tempo desde a deposição (TSD) de manchas de sangue secas, usando a análise da espectroscopia no ultravioleta visível – UV-Vis da hemoglobina (Hb), a qual se baseia em sua química de oxidação característica. Um estudo detalhado da banda de Hb Soret ( $\lambda_{\max} = 412 \text{ nm}$ ) em manchas de sangue envelhecidas revelou uma alteração na banda azul (mudança para comprimento de onda mais curto) à medida que a idade da mancha de sangue aumenta. A estimativa do TSD foi conduzida por um período de 1 ano (365 dias). Os resultados demonstram que a banda azul de Soret é potencialmente promissora na aplicação de casos forenses, pois, segundo autores, possui boa resolução temporal (horas, dias e meses), sensibilidade e portabilidade para cenas de crime.

## 2.3 Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Fujita *et al.*<sup>7</sup> observaram que a desnaturação da hemoglobina em manchas de sangue secas é regulada por uma mudança no estado de spin do íon de ferro na molécula de hemoglobina, a qual pode ser medida por EPR (ressonância paramagnética eletrônica). O estudo demonstrou que manchas de sangue humanas apresentam quatro sinais de EPR bem definidos, observados nas regiões da estrutura do centro eletrônico paramagnético. Estes quatro sinais representam o íon férrico de alta rotação ( $g_6$ ), o íon férrico não-heme, ( $g_4$ ), o íon férrico de baixa rotação (H) e as espécies de radicais livres (R). Os pesquisadores notaram que o TSD de uma mancha de sangue pode ser relacionado com a medida da razão (H/ $g_4$ ) do sinal EPR. Porém, fatores ambientais como diferenças de absorção, exposição à luz e alterações da temperatura ambiental afetaram as análises dos compostos EPR-ativos, o que pode modificar os exames de TSD em locais não controlados. O estudo foi conduzido por um período acima de 432 dias.

## 2.4 Espectroscopia Raman

Analisando manchas de sangue por espectroscopia Raman, Boyd *et al.*<sup>15</sup> observaram que as intensidades relativas dos picos de dispersão eram

dependentes da idade da mancha de sangue. Os autores notaram que a intensidade relativa dos picos de oxihemoglobina diminuía após secagem da mancha de sangue. Já o sangue fresco, extraído diretamente de um doador, sem armazenamento prévio, exibiu também picos de dispersão de 1155 e 1511  $\text{cm}^{-1}$ , os quais desapareciam após secagem. Posteriormente, a espectroscopia Raman foi utilizada, por Doty *et al.*<sup>16</sup>, para analisar o TSD de manchas de sangue secas com idade entre 1 e 168 hs (1 semana). No estudo, os autores utilizaram Raman, juntamente com a espectroscopia de correlação bidimensional e modelagem estatística. Conforme observado pelos autores, a abordagem de análise de dados utilizada durante o estudo demonstrou capacidade para estimar, com precisão, o TSD de manchas de sangue, em um período de 1 semana. O estudo, porém, não explorou o potencial efeito das alterações de substratos para deposição de manchas de sangue, nem as mudanças na temperatura, umidade e exposição à luz solar.

## 2.5 RT – PCR/qPCR (Análise de RNA)

Em 2005, Anderson *et al.*<sup>17</sup> relataram um método para determinar o TSD de manchas de sangue, através da avaliação da degradação do RNA. Os pesquisadores propuseram que diferentes tipos de RNA se degradam *ex vivo*, em taxas diferentes, e conseguiram encontrar uma correlação entre a idade de uma mancha de sangue e a razão de dois tipos diferentes de RNA: mRNA  $\beta$ -actina e rRNA 18S. Eles atribuíram a alteração na taxa de degradação desses RNAs à uma diferença estrutural entre eles. O mRNA  $\beta$ -actina não é combinado com qualquer complexo de proteína e não possui proteção ambiental, enquanto que o rRNA 18S está protegido dentro da estrutura ribossomal maior, tornando-o menos propenso à degradação. Entretanto, em 2014, Alrowaithi *et al.*<sup>18</sup> publicaram uma carta ao editor contestando essa razão, mRNA versus rRNA, utilizada por Anderson *et al.*<sup>17</sup> em 2005. Na carta, os autores afirmaram que havia uma discrepância entre o método de análise de dados e os resultados/conclusões feitas no estudo. Esta discrepância poderia impedir a replicação da técnica, através da razão (RNA) citada no documento, e por sua vez impedir a melhoria do método para utilização na prática forense. Em novo estudo, Anderson *et al.* (2011)<sup>8</sup> analisaram três pares de amplicons RNAs ((1<sup>o</sup>)  $\beta$ -actina 301 bp versus 89 bp; (2<sup>o</sup>) 18S 501 bp versus 171 bp; e (3<sup>o</sup>)  $\beta$ -actina 169 bp versus 18S 171 bp) em

manchas de sangue *ex vivo*, visando determinar o TSD, por um período de 4 semanas. O estudo utilizou RT-PCR/qPCR multiplex, além da aplicação de estatística multivariada.

## 2.6 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (HPLC)

Jan Andrasko<sup>19</sup>, utilizando HPLC, descreveu um método para estimar o TSD de manchas de sangue quando depositadas em roupas. Pela técnica, as proteínas foram extraídas das manchas de sangue e transportadas através de uma coluna até o detector. No estudo, analisou-se a quantificação de produtos de degradação do grupo heme das manchas de sangue, utilizando esses grupos como marcadores para estimar a idade. Alguns anos antes, Inoue *et al.*<sup>20</sup> observaram a presença de uma proteína desconhecida 'X' em manchas de sangue secas, verificando que a área do pico dessa proteína tornava-se maior à medida que o TSD de manchas de sangue aumentava. No estudo de Inoue *et al.*, as manchas de sangue foram armazenadas, durante 52 semanas, no escuro, em temperatura de 37,8°C. Durante o estudo conduzido por Andrasko<sup>19</sup> foram analisadas as proteínas envolvidas no processo de envelhecimento de manchas de sangue, dentre elas a proteína "X" (observada por Inoue *et al.*<sup>20</sup>, em 1992), verificando e comparando os picos nos espectros de absorção, por um período de 14 dias. As amostras utilizadas no estudo de Andrasko foram mantidas em ambiente controlado (laboratório).

## 2.7 Microscopia de Força Atômica – MFA

Strasser *et al.*<sup>6</sup> utilizou MFA para determinar a elasticidade de hemácias em manchas de sangue, buscando um método para determinar o TSD. Na metodologia aplicada no estudo, os pesquisadores depositaram uma mancha de sangue fresca, sobre uma lâmina de vidro, e analisaram, após a secagem da gota de sangue. O MFA foi utilizado para testar a elasticidade através do registo das curvas força-distância (*Young's modulus*). As medidas foram realizadas imediatamente após secagem da gota de sangue, nos seguintes tempos: 1,5 h, 30 hs e 31 dias. Os pesquisadores notaram que a elasticidade das hemácias aumenta quando fora do corpo (*ex vivo*). Observou-se um aumento, na elasticidade dos glóbulos vermelhos, quando se comparou os três tempos analisados: 300 kPa, medida 1,5 horas após formação da amostra; 600 kPa,



após 30 horas; e 2,5 GPa, após 30 dias. O estudo observou, também, a morfologia das RBCs, durante um período de 4 semanas. Nessa análise, os pesquisadores geraram uma imagem de MFA para cada semana (4 imagens), porém, pela simples observação visual das RBCs nessas imagens, não observaram alterações morfológicas nas células. Nas análises conduzidas pelo grupo de Strasser *et al.*<sup>6</sup>, utilizou-se amostra de sangue de apenas um indivíduo (não há relato de quantidade de células analisadas), e a amostra permaneceu armazenada à temperatura de 20 ° C e umidade de 30%.

Wu *et al.*<sup>21</sup> utilizaram MFA para analisar o TSD de manchas de sangue e sua potencial aplicação para investigação forense. No estudo, amostras de sangue foram depositadas em superfícies de vidro e mica, sendo testadas em três diferentes condições: (I) controlada (temperatura de 25 C° e umidade de 76%), (II) não-controlada (temperatura entre 21,2 – 33,7 C° e umidade entre 38,4 – 87,3%), (III) controlada - baixa temperatura (temperatura de 4 C° e umidade de 62%). Os pesquisadores observaram mudanças na morfologia celular (volume celular) e viscoelasticidade (força adesiva superficial) das hemácias, ao longo de 60 dias de análise. Na conclusão do estudo, os autores relataram que as alterações observadas nas RBCs são dependentes do tipo de substrato onde estão depositadas, do tempo em que estão depositadas e das condições climáticas ambientais. As análises observadas por Wu *et al.*<sup>21</sup> foram realizadas em cerca de 30 células (RBCs), e, apesar de não constar explicitamente no texto publicado do estudo, as amostras foram confeccionadas, aparentemente, com apenas um indivíduo doador.

## **2.8 Métodos alternativos para análise do TSD:**

### **2.8.1 Smartphones (dispositivos móveis) e imagens digitais**

Estudos recentes vêm demonstrando a aplicação de imagens digitais por *smartphones*. Em 2013, Thanakiatkrai *et al.*<sup>22</sup> utilizaram câmeras de *smartphone* acopladas em sistema de iluminação de baixo custo como uma ferramenta para estimar a idade de manchas de sangue. No estudo, manchas de sangue foram depositadas em vários substratos e fotografadas com câmeras de *smartphone*. O método foi comparado entre três dispositivos móveis (Samsung Galaxy S Plus, Apple iPhone 4 e Apple iPad 2). Os valores de cor das imagens digitais foram extraídos e correlacionados com o tempo desde a deposição (TSD). A alteração

de cor observada foi consistente com o processo de desnaturação de hemoglobina, quando fora do corpo humano. Para classificar as manchas, os pesquisadores utilizaram uma técnica de classificação estatística chamada *Random Forests*<sup>TM</sup>, sendo possível prever, segundo relatado no estudo, a idade da mancha de sangue com precisão de até 42 dias, com uma taxa de erro de 12%.

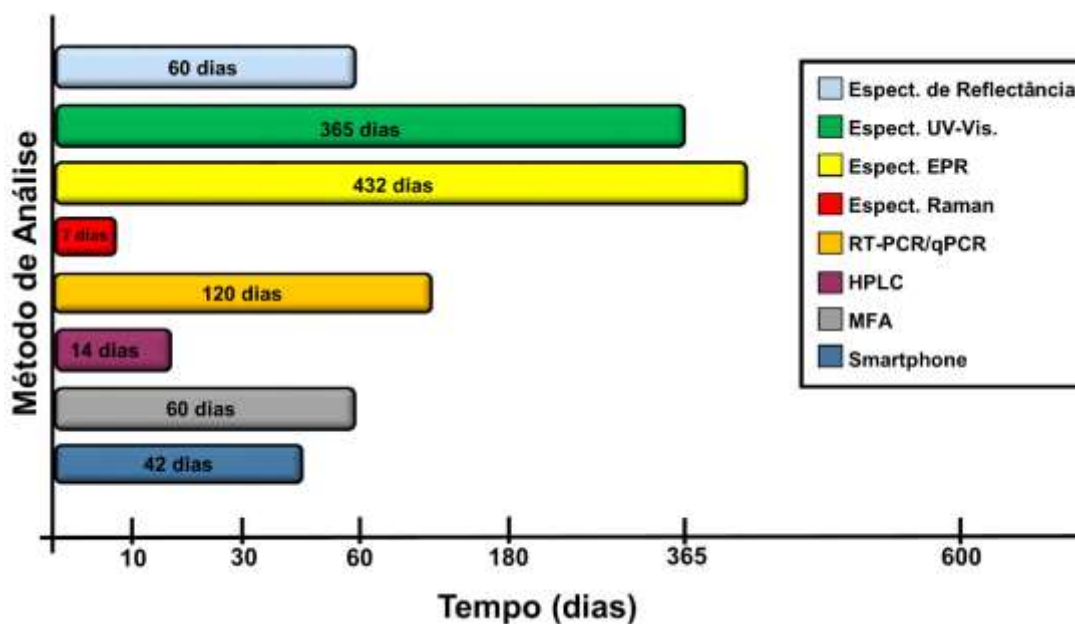
Shin *et al.*<sup>23</sup>, também, demonstraram um sistema de detecção móvel, denominado, pelos autores, de *Smart Forensic Phone*. O estudo, segundo julgamento dos autores, permitiu estimar, rápida e precisamente, a idade de uma mancha de sangue. Nas análises do estudo, manchas de sangue foram depositadas em cinco materiais diferentes (papel de parede, tecido, vidro, madeira e papel A4), sendo monitorados os valores de RGB (Vermelho, Verde e Azul) por pixel das imagens de sangue, em intervalos de 6 horas, através da utilização de um aplicativo para *smartphone* e a câmera de um celular Samsung Galaxy S3 LTE. Os valores RGB foram convertidos para o valor V de HSV (tonalidade, saturação e brilho). Observou-se um rápido declínio nos valores de RGB e V durante as primeiras 42 horas de análise e, posteriormente, manteve-se relativamente inalterado. A idade da mancha de sangue pôde ser calculada a partir da comparação de V versus tempo. Na análise dos autores, o método permitiu estimar o tempo desde a deposição de manchas de sangue com menos de 42 horas de idade.

### **3. Comparação entre os métodos para análise do TSD em manchas de sangue**

Apesar das especificidades de cada um dos oito métodos de análise citados neste estudo, pode-se compará-los pelos seguintes critérios: quanto aos alvos de mensuração em manchas de sangue (RBCs, glóbulos brancos, etc), quanto ao tempo de análise (TSD), quanto à aplicabilidade em locais de crime, quanto à destruição das amostras (destrutivo ou não) e quanto a sensibilidade.

Na comparação entre os alvos de mensuração em manchas de sangue, o método RT-PCR/qPCR é o único que se baseia na análise da degradação e quantificação de RNAs por glóbulos brancos, enquanto os demais métodos analisam a degradação e a quantificação das transformações sofridas pelos glóbulos vermelhos (RBCs) e suas proteínas, principalmente, hemoglobina. A

análise de aminoácidos e proteínas no plasma sanguíneo também já foi alvo de pesquisas para o TSD de manchas de sangue em cenas de crime, nesse sentido, a taxa de racemização do (D-L) ácido aspártico<sup>24</sup>, a análise de biomarcadores circadianos<sup>25</sup>, e a mensuração da desnaturação natural da creatina quinase e da alanina transaminase<sup>26</sup>, também, podem contribuir com análises temporais. Entretanto, os estudos que envolvem moléculas do plasma sanguíneo não foram utilizados no escopo do presente trabalho.



**Figura 3:** Comparação dos métodos de análise, quanto ao tempo (TSD) utilizado pelos autores nos estudos com manchas de sangue.

Destaca-se, também, o TSD aplicado nas pesquisas para cada método, os quais apresentaram grande variação, conforme observado na Figura 3. Desde a espectroscopia Raman, por Doty *et al.* (2016)<sup>16</sup>, os quais relataram estudo de análise com TSD de 1 semana (7 dias), até Fujita *et al.* (2005)<sup>7</sup>, com Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR), com análise do TSD superior a 432 dias.

Outra abordagem necessária é a aplicabilidade dos métodos para vestígios obtidos em locais de crime. Muitas variáveis podem influenciar na mensuração do TSD, e as medidas podem ser alteradas pela variação dos fatores ambientais e dos diversos suportes para deposição de manchas de sangue. Nos trabalhos desenvolvidos com RT-PCR/qPCR<sup>17</sup>, HPLC<sup>19</sup>, *smartphones*<sup>23</sup>, MFA<sup>21</sup> e com as Espectroscopias de Reflectância<sup>13</sup>, UV-Vis<sup>14</sup> e EPR<sup>7</sup>, as principais

variáveis levadas em consideração, pelos autores, foram os fatores ambientais, como temperatura, umidade e exposição à luz solar. Para a espectroscopia Raman, além das variáveis ambientais, os autores<sup>15, 16</sup> destacaram que diferentes substratos para deposição de manchas de sangue podem alterar as mensurações do TSD. Dentre os trabalhos científicos analisados, apenas espectroscopia UV-Vis<sup>14</sup>, Raman<sup>16</sup> e MFA<sup>21</sup> ousaram testar as técnicas em ambientes não controlados. Em locais de crime, as condições ambientais são altamente diversas, sendo necessário a ampliação de estudos científicos para a aplicação dos métodos em ambientes com variação de temperatura, umidade e substratos para deposição.

Dentro de uma abordagem criminal, devido a exiguidade de vestígios em locais de crime, e a necessidade de aplicação de diversos diagnósticos ao longo de uma investigação forense, métodos de análise destrutíveis, para provas criminais, são sempre preteridos. No escopo deste estudo, devido as características peculiares dos equipamentos, espectroscopia Raman, RT-PCR/qPCR e HPLC apresentam especialidades que os tornam métodos destrutivos. Essa característica pode impedir que tais métodos de análise sejam aplicados em um exame criminal, caso o vestígio seja completamente consumido durante um diagnóstico, impedindo futuras apreciações. Dentro dessa abordagem, quanto mais sensível for o método, maior será a sua possibilidade de aplicação. A sensibilidade é característica imprescindível, principalmente para locais de crime com poucos vestígios. Dentro das pesquisas aplicadas para o cálculo do TSD de manchas de sangue, analisados no presente estudo, os autores que utilizaram os métodos das espectroscopias de Reflectância<sup>13</sup> e EPR<sup>7</sup>, e de HPLC<sup>19</sup> não demonstraram com exatidão a quantidade de sangue utilizado para aplicação da metodologia, não sendo possível, então, abordá-los quanto à sensibilidade. Os métodos de espectroscopia no UV-Vis<sup>14</sup>, Raman<sup>16</sup>, RT-PCR/qPCR<sup>17</sup>, MFA<sup>21</sup> e *Smartphone*<sup>23</sup> demonstraram-se bastante sensíveis, apresentando capacidade de mensuração para quantidades ínfimas de manchas de sangue, dentro da escala de microlitros ( $\mu\text{L}$ ). Para MFA, Wu *et al.*<sup>21</sup> não especificaram a quantidade de sangue analisado, entretanto, foram mais específicos e informaram a mensuração de mais de 30 hemácias em manchas de sangue, o que demonstra, ainda mais, a alta sensibilidade do método.

**Tabela 1:** Comparação entre os diferentes métodos de análise (TSD de manchas de sangue).

\*\* parâmetro não mensurado

	<b>Alvos de mensuração</b>	<b>Destruição da amostra</b>	<b>Sensibilidade</b>	<b>Quantidade</b>
<b>Reflectância</b>	RBC	Não destrutivo	**	**
<b>UV-Vis</b>	RBC	Não destrutivo	Sim	50 µL
<b>EPR</b>	RBC	Não destrutivo	**	**
<b>Raman</b>	RBC	Destrutivo	Sim	30 µL
<b>PCR</b>	G. Brancos	Destrutivo	Sim	10 µL
<b>HPLC</b>	RBC	Destrutivo	**	**
<b>MFA</b>	RBC	Não destrutivo	Sim	30 células
<b>Smartphones</b>	RBC	Não destrutivo	Sim	50 µL

#### 4. Considerações finais

Manchas de sangue estão entre os vestígios mais frequentes em cenas de crime<sup>27</sup>. Quando se considera os crimes contra a vida, que envolvem disparo de arma de fogo, utilização de arma branca ou qualquer outro meio utilizado para causar lesão corporal, a presença de sangue nesses locais é quase uma constante a ser considerada durante o processo investigativo<sup>28</sup>. Vestígios biológicos encontrados em cenas de crime representam pistas importantes na identificação e posterior confirmação de possíveis suspeitos. Técnicas químicas e bioquímicas utilizadas para a análise de vestígios biológicos em cenas de crime são o principal apoio científico das investigações criminais e processos judiciais subsequentes<sup>25</sup>. A literatura forense dedica grande atenção para análises de manchas de sangue em locais de crime, principalmente, devido aos múltiplos diagnósticos que esses vestígios fornecem. Porém, a análise do tempo desde a deposição (TSD) de manchas de sangue ainda não se transformou em uma prática corriqueira em locais de crime. Isso se deve, pois, à maioria dos métodos descritos no presente trabalho possuírem apenas estudos pioneiros, e em fase inicial de desenvolvimento. Apesar da potencial capacidade de futura aplicação em cenas de crime pelos métodos abordados, outros estudos precisam ser desenvolvidos visando aperfeiçoar as técnicas de aplicação e a sua utilização por peritos criminais, em locais de crime.

## Referências

1. Gardner RM. Practical crime scene processing and investigation. Boca Raton-Florida. CRC Press LLC, pp. 267-312, 2004.
2. Bremmer RH, De Bruin KG, Van Gemert MJC, Van Leeuwen TG, Aalders MCG. Forensic quest for age determination of bloodstains. *Forensic Science International*. 2012; v. 216: pp. 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.07.027>
3. Weyermann C, Roux C, Champod C. Initial results on the composition of fingerprints and its evolution as a function of time by GC/MS analysis. *Journal of forensic sciences*. 2011; v. 56, n. 1: pp. 102-108. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01523.x>
4. Ribaux O, Baylon A, Lock E, Delémont O, Roux C, Zingg C, & Margot P. Intelligence-led crime scene processing. Part II: Intelligence and crime scene examination. *Forensic Science International*. 2010; 199(1): pp.63-71. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.03.011>
5. Julian R, Kelty S, & Robertson J. (2012). Get it right the first time: Critical issues at the crime scene. *Current Issues Crim. Just.* 2012: v. 24: pp. 25.
6. Strasser S, Zink A, Kada G, Hinterdorfer P, Peschel O, Heckl WM, & Thalhammer S. Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy. *Forensic Science International*. 2007, 170(1): pp. 8-14. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2006.08.023>
7. Fujita Y, Tsuchiya K, Abe S, Takiguchi Y, Kubo SI, & Sakurai H. Estimation of the age of human bloodstains by electron paramagnetic resonance spectroscopy: long-term controlled experiment on the effects of environmental factors. *Forensic science international*. 2005, 152(1): pp. 39-43. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2005.02.029>
8. Anderson SE, Hobbs GR, & Bishop CP. Multivariate analysis for estimating the age of a bloodstain. *Journal of forensic sciences*. 2011, 56(1): pp. 186-193. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2010.01551.x>
9. Bremmer RH, De Bruin DM, De Joode M, Buma WJ, Van Leeuwen TG, & Aalders MC. Biphasic oxidation of oxy-hemoglobin in bloodstains. *PloS one*. 2011, 6(7): pp.e21845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021845>
10. Bunn FH, Forget BG. Hemoglobin: Molecular, Genetic, and Clinical Aspects. W.B. Saunders Company, Philadelphia, pp. 634–662, 1986.
11. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection – Review. *Science Direct, Talanta*. 2007; v. 72, issue 3: pp. 896–913. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.12.045>

12. Marrone A, Ballantyne J. Changes in dry state hemoglobin over time do not increase the potential for oxidative DNA damage in dried blood. *PloSone*. 2009, v. 4, n. 4: pp. e5110. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005110>
13. Bremmer RH, Nadort A, Van Leeuwen TG, Van Gemert MJ, & Aalders MC. Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy. *Forensic science international*. 2011, 206(1): pp. 166-171. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.07.034>
14. Hanson EK, Ballantyne J. A blue spectral shift of the hemoglobin soret band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains. *PLoS One*. 2010 v. 5, n. 9: pp. e12830. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012830>
15. Boyd S, Bertino MF, Seashols SJ. Raman spectroscopy of blood samples for forensic applications. *Forensic science international*. 2011, v. 208, n. 1: pp. 124-128. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2010.11.012>
16. Doty KC, Mclaughlin G, Lednev IK. A Raman “spectroscopic clock” for bloodstain age determination: the first week after deposition. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2016, v. 408, n. 15: pp. 3993-4001. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9486-z>
17. Anderson S, Howard B, Hobbs GR, & Bishop CP. A method for determining the age of a bloodstain. *Forensic science international*. 2005, 148(1): pp. 37-45. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2004.04.071>
18. Alrowaithi MA, Mccallum NA, Watson ND. A method for determining the age of a bloodstain. *Forensic science international*. 2014, v. 234: pp. e30. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.11.008>
19. Andrasko J. The estimation of age of bloodstains by HPLC analysis. *Journal of Forensic Science*. 1997, v. 42, n. 4: pp. 601-607. <https://doi.org/10.1520/JFS14171J>
20. Inoue H, Takabe F, Iwasa M, Maeno Y, & Seko Y. A new marker for estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography. *Forensic science international*. 1992, v. 57, n. 1: pp. 17-27. [https://doi.org/10.1016/0379-0738\(92\)90041-T](https://doi.org/10.1016/0379-0738(92)90041-T)
21. Wu Y, Hu Y, Cai J, Ma S, Wang X, Chen Y, & Pan Y. Time-dependent surface adhesive force and morphology of RBC measured by AFM. *Micron*. 2009, v. 40, n. 3: pp. 359-364. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2008.10.003>
22. Thanakiatkrai P, Yaodam A, Kitpipit T. Age estimation of bloodstains using smartphones and digital image analysis. *Forensic science international*. 2013, v. 233, n. 1: pp. 288-297. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2013.09.027>
23. Shin J, Choi S, Yang JS, Song J, Choi JS, & Jung HI. Smart Forensic Phone: Colorimetric analysis of a bloodstain for age estimation using a smartphone. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2016.

24. Arany S, Ohtani S. Age estimation of bloodstains: A preliminary report based on aspartic acid racemization rate. *Forensic science international*. 2011, v. 212, n. 1: pp. e36-e39. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2011.05.015>
25. Ackermann K, Ballantyne KN, Kayser M. Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: a prospective and versatile tool for crime scene reconstruction. *International journal of legal medicine*. 2010, v. 124, n. 5: pp. 387-395. <https://doi.org/10.1007/s00414-010-0471-3>
26. Agudelo J, Huynh C, Halánek J. Forensic determination of blood sample age using a bioaffinity-based assay. *Analyst*. 2015, v. 140, n. 5: pp. 1411-1415. <https://doi.org/10.1039/C4AN02269F>
27. James SH, Kish PE, Sutton TP. *Principles of bloodstain pattern analysis: theory and practice*. CRC Press. p. 369–389. 2005. <https://doi.org/10.1201/9781420039467>
28. Velho JA, Costa KA, Damasceno CTM. *Locais de crime – Dos vestígios à dinâmica criminosa*. Campinas, SP: Millennium Editora. p. 3 – 26; p. 83 – 123. 2013.