

1 2 9 0



UNIVERSIDADE D  
COIMBRA

Ana Carolina Marques de Jesus

**COMPARAÇÃO DE RESULTADOS ENTRE  
TESTES PRESUNTIVOS/INDICADORES DE  
SANGUE, EM CONTEXTO DE  
LOCAL DO CRIME**

Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense,  
orientada pelo Dr. Bruno Possidónio Mendes Antunes  
e coorientada pela Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio e  
apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia  
da Universidade de Coimbra.

Setembro de 2021



Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia

# COMPARAÇÃO DE RESULTADOS ENTRE TESTES PRESUNTIVOS/INDICADORES DE SANGUE, EM CONTEXTO DE LOCAL DO CRIME

Ana Carolina Marques de Jesus



Dissertação no âmbito do Mestrado em Química Forense, orientada pelo Dr. Bruno Possidónio Mendes Antunes e coorientada pela Professora Doutora Maria Ermelinda da Silva Eusébio e apresentada ao Departamento de Química da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra.

**Setembro de 2021**

1 2  9 0

UNIVERSIDADE D  
COIMBRA



***“Life can only be understood backwards;  
but it must be lived forwards.”***

Soren Kierkegaard



# Agradecimentos

Quero começar por agradecer à pessoa que tornou tudo isto possível, apesar de todas as dificuldades, ao meu pai. Obrigada por me forneceres tudo o que preciso para continuar a realizar os meus sonhos a cada dia que passa e por fazeres de mim a pessoa que sou hoje. Agradeço muito o carinho e confiança que depositas em mim.

De seguida, quero agradecer ao Dr. Bruno Antunes pela sua incrível orientação, pelos inúmeros ensinamentos, pela constante disponibilidade e, sobretudo, pelo apoio. Atrevo-me a dizer que esta tese não é minha, mas sim nossa.

Gostaria de deixar um agradecimento geral ao Laboratório de Polícia Científica da Polícia Judiciária e a todos os membros da instituição que, de alguma forma, fizeram parte do meu percurso. Agradeço, em especial, ao chefe do Setor de Local do Crime, Dr. Fernando Viegas, pela sua disponibilidade e por me proporcionar a oportunidade de aprender mais do que alguma vez esperei. Também ao Dr. José Carlos Paiva pela sua simpatia, disponibilidade e pela partilha da sua sabedoria e experiência.

À Professora Doutora Ermelinda Eusébio, por investir no Mestrado de Química Forense e por fornecer aos seus alunos incríveis oportunidades de aprendizagem e de desenvolvimento pessoal. Acima de tudo, agradeço a sua orientação, dedicação, ajuda e constante disponibilidade.

Ao meu namorado, por estar presente nos bons e maus momentos, pelo seu apoio, incentivo, carinho, paciência e, principalmente, pela cumplicidade. Obrigada pela dedicação e por me ajudar a completar mais uma etapa de tamanha importância.

Ao meu irmão, o menino dos meus olhos, que me motiva todos os dias a ser uma pessoa melhor. Agradeço toda a companhia, carinho e afeto, assim como todas as brincadeiras e momentos de descontração que me proporciona.

Aos meus amigos e família, por me acompanharem diariamente nesta jornada e se mostrarem sempre disponíveis para viver novas experiências. Em particular ao meu grupo de amigas mais antigo, que me faz acreditar que a amizade pode ser perene.

A todos, um grande e sentido obrigada!



## Resumo

Os vestígios biológicos representam, atualmente, tremendas fontes de informação no meio forense. O sangue, em particular, além de ser uma boa fonte de ADN, permite realizar a reconstituição de crimes, através da análise de padrões de manchas de sangue, assim como detetar a presença de substâncias tóxicas e estupefacientes no corpo, identificar armas e locais do crime e validar ou descreditar depoimentos. Os testes presuntivos, através de uma reação colorimétrica catalisada pela hemoglobina, permitem aumentar o nível de confiança dos técnicos relativamente à natureza dos vestígios, poupando, simultaneamente, tempo e recursos.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o desempenho de cinco testes presuntivos, nomeadamente, luminol, fluoresceína, Kastle-Meyer, *leucomalachite green* e tetrabase, em situações limite, que podem ser encontradas em múltiplos locais do crime. Assim, inicialmente, foi estudada a sensibilidade dos vários testes presuntivos, em dois substratos distintos, avaliando a influência do substrato na análise. Posteriormente, foi estudado o efeito da lavagem de têxteis manchados de sangue, na resposta dos testes, utilizando dois substratos constituídos pelo mesmo material, mas estruturalmente distintos, e múltiplas condições de lavagem, de forma a definir os fatores com maior influência nos resultados. Foi ainda estudado o efeito das temperaturas elevadas na estabilidade das amostras e, conseqüentemente, na resposta dos testes, em quatro substratos, dos quais dois eram inflamáveis.

Complementarmente, foi realizado um estudo exploratório onde se avaliou a eficácia das fontes de luz infravermelha e azul na deteção de manchas de sangue em vinte têxteis, maioritariamente escuros, onde a bibliografia não é totalmente clara quanto ao seu desempenho. Neste contexto, foi realizada uma análise de contraste que permitiu agrupar as amostras, através de HCA. Simultaneamente, foi estudado o efeito da idade das manchas na análise, com recurso a ANOVA de fator único.

*Palavras-chaves:* Testes Presuntivos, Sangue, Luminol, Fluoresceína, Kastle-Meyer, Leucomalachite Green, Tetrabase, Fontes de Luz



# Abstract

Currently, biological traces represent tremendous sources of information in the forensic field. Blood, in particular, in addition to being a good source of DNA, allows for the reconstruction of crimes, through bloodstain pattern analysis (BPA), detection of toxic and narcotic substances in the body, identification of weapons and crime scenes and validation of testimonies. Presumptive tests, through a colorimetric reaction catalyzed by hemoglobin, allow technicians to increase their confidence in the nature of the traces, while saving time and resources.

This study aimed to evaluate the performance of five presumptive tests, namely, luminol, fluorescein, Kastle-Meyer, leucomalachite green and tetrabase, in limit situations, which can be found at multiple crime scenes. Thus, the sensitivity of the presumptive tests was determined, on two different substrates, evaluating the influence of the substrate in the analysis. Subsequently, we studied the effect of washing bloodstained clothes on the tests' response, using two substrates made of the same material, but structurally different, and multiple washing conditions, in order to define the factors with the greatest influence on the results. The effect of high temperatures on the stability of the samples and, consequently, on the test results, was also studied, using four substrates, two of which were flammable.

In addition, an exploratory study was carried out to evaluate the effectiveness of infrared and blue light sources in detecting bloodstains on twenty textiles, mostly dark, where the bibliography is not totally clear as to their performance. In this context, a contrast analysis was performed and allowed to cluster the samples through HCA. Simultaneously, a study was conducted to evaluate the effect of the bloodstains' age in the analysis, using a one way ANOVA.

*Keywords:* Presumptive tests, Blood, Luminol, Fluorescein, Kastle-Meyer, Leucomalachite Green, Tetrabase, Light Sources



# Índice

<b>Resumo.....</b>	<b>v</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>vii</b>
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>xi</b>
<b>Índice de Figuras.....</b>	<b>xiii</b>
<b>Índice de Tabelas.....</b>	<b>xv</b>
<b>Capítulo I - Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Local do crime.....	3
1.1.1. O método técnico-científico de abordagem ao local do crime.....	4
1.1.2. A abordagem inicial ao local do crime.....	5
1.1.3. O exame ao local do crime.....	6
1.2. Sangue.....	7
1.2.1. Funções biológicas do sangue.....	7
1.2.2. Componentes sanguíneos.....	8
1.2.3. Propriedades físicas do sangue.....	12
1.3. Importância do sangue no contexto de local do crime.....	14
1.3.1. O vestígio biológico sangue em local do crime.....	14
1.3.2. Análise de ADN.....	20
1.3.3. Interpretação de padrões de manchas de sangue.....	22
1.4. Testes presuntivos.....	26
1.4.1. Luminol.....	27
1.4.2. Fluoresceína.....	29
1.4.3. Tetrabase.....	31
1.4.4. Kastle-Meyer.....	33
1.4.5. Leucomalachite Green.....	35
1.5. Fontes de luz.....	37
1.6. Objetivo.....	39
<b>Capítulo II – Materiais e Métodos.....</b>	<b>41</b>
2.1. Reagentes e Amostras.....	43
2.2. Preparação dos testes presuntivos.....	43
2.3. Registo fotográfico e fonte de luz forense.....	44

2.4. Método de utilização dos testes presuntivos.....	45
2.5. Critérios de aceitação dos testes.....	46
2.6. Sensibilidade dos testes presuntivos.....	47
2.7. Efeito das lavagens em materiais têxteis.....	48
2.8. Efeito das temperaturas elevadas na integridade das amostras .....	49
2.9. Estudo da utilização de fontes de luz em diferentes têxteis .....	50
2.9.1. Análise de contraste .....	52
2.9.2. Análise de Agrupamentos Hierárquica .....	53
<b>Capítulo III – Resultados e Discussão.....</b>	<b>55</b>
3.1. Sensibilidade dos testes presuntivos.....	57
3.2. Efeito das lavagens em materiais têxteis.....	62
3.3. Efeito das temperaturas elevadas na integridade das amostras .....	68
3.4. Estudo da utilização de fontes de luz em diferentes têxteis .....	73
<b>Capítulo IV - Conclusão .....</b>	<b>83</b>
<b>Bibliografia.....</b>	<b>89</b>
<b>Anexos .....</b>	<b>95</b>

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>ANOVA</b>	Análise de Variância
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BKA</b>	<i>Bundeskriminalamt</i>
<b>BPA</b>	Análise de Padrões de Manchas de Sangue do inglês <i>Bloodstain Pattern Analysis</i>
<b>EDTA</b>	Ácido Etilenodiaminotetracético
<b>HCA</b>	Análise de Agrupamentos Hierárquica
<b>IABPA</b>	<i>International Association of Bloodstain Pattern Analysis</i>
<b>ICP-OES</b>	Espectrometria de Emissão Atômica com Plasma Acoplado Indutivamente
<b>IV</b>	Infravermelho
<b>KM</b>	<i>Kastle-Meyer</i>
<b>LMG</b>	<i>Leucomalachite Green</i>
<b>LPC-PJ</b>	Laboratório de Polícia Científica – Polícia Judiciária
<b>MSDS</b>	<i>Material Safety Data Sheet</i>
<b>mtADN</b>	ADN mitocondrial
<b>PCR</b>	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphisms</i>
<b>STR</b>	<i>Short Tandem Repeats</i>
<b>SWGSTAIN</b>	<i>Scientific Working Group for Bloodstain Pattern Analysis</i>
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>VIS</b>	Vísivel

Expressões usualmente empregues em inglês são apresentadas a itálico.



# Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Método científico utilizado atualmente. Adaptado de [2].....	5
<b>Figura 2.</b> Estrutura de uma molécula de hemoglobina (esquerda) e do grupo heme (direita) [15].....	10
<b>Figura 3.</b> (A) Estrutura de um nucleótido composto por desoxirribose, grupo fosfato e base azotada, neste caso adenina; (B) esquema da complementaridade de bases e estrutura do ADN, com duas cadeias antiparalelas dispostas em dupla hélice. Adaptado de [12][24]. .....	21
<b>Figura 4.</b> Sistema de classificação proposto por James & Kish. Adaptado de [10].....	25
<b>Figura 5.</b> Estrutura molecular do luminol.....	27
<b>Figura 6.</b> Reação química do teste presuntivo luminol.....	28
<b>Figura 7.</b> Estrutura molecular da fluoresceína.....	29
<b>Figura 8.</b> Reação química do teste presuntivo de fluoresceína.....	30
<b>Figura 9.</b> Estrutura molecular da N, N'-tetrametil-diaminodifenilmetano.....	32
<b>Figura 10.</b> Estrutura molecular da fenolftaleína.....	33
<b>Figura 11.</b> Reação química do teste presuntivo de Kastle-Meyer.....	34
<b>Figura 12.</b> Estrutura molecular de verde de leucomalaquite.....	35
<b>Figura 13.</b> Reação química do teste presuntivo LMG.....	36
<b>Figura 14.</b> Espectro eletromagnético.....	38
<b>Figura 15.</b> Exemplos de reações positivas dos vários testes, realizados com amostras de sangue total.....	46
<b>Figura 16.</b> Exemplo da seleção de regiões de interesse no ImageJ. Os círculos amarelos indicam as áreas utilizadas para os cálculos de contraste.....	52
<b>Figura 17.</b> Mancha de sangue não diluído em tecido e controlos positivos dos testes luminol e fluoresceína.....	58
<b>Figura 18.</b> Mancha de sangue não diluído em cimento e controlos positivos dos testes luminol e fluoresceína.....	58
<b>Figura 19.</b> Sensibilidade dos testes fluoresceína e luminol, em tecido e cimento. Substratos antes da aplicação do teste (A,B,C e D) e após a aplicação do teste de fluoresceína (E e G) e luminol (F e H).....	61

<b>Figura 20.</b> Diferenças na estrutura das fibras na ganga (A) e num tecido convencional de algodão (B). Adaptado de [85].	62
<b>Figura 21.</b> Reações do luminol, nas condições: secagem à temperatura ambiente e lavagem na máquina, com água quente e sem detergente (A.M.q.sd); em tecido de algodão comum (A e B) e ganga (C e D).	66
<b>Figura 22.</b> Amostras após serem submetidas às temperaturas de 100, 150, 200, 250, 300 e 400°C. Alteração da coloração do sangue em substratos não inflamáveis (A e B) e inflamáveis (C e D).	69
<b>Figura 23.</b> Exemplo de um tecido pouco absorvente onde ocorreu a formação de uma película (A) e resultado da sua remoção (B).	73
<b>Figura 24.</b> Exemplo de um tecido (A) no qual existem ambas manchas de sangue (indicador vermelho) e descolorações (indicador amarelo) e respetiva fotografia com luz IV (B).	75
<b>Figura 25.</b> Exemplo de 2 tecidos (tecido 5-A e tecido 13-B) em que na zona de deposição a mancha tomou uma coloração mais clara e intensidade de três regiões distintas da mancha (pontos 1 a 6).	76
<b>Figura 26.</b> Diferenças observadas na coloração das manchas entre os 2 dias (A) e as 2 semanas (B), com recurso a luz branca. Nota: a película existente na imagem da esquerda foi removida antes das análises com a fonte de luz restando apenas o que consta na imagem da direita.	79
<b>Figura 27.</b> Dendrograma obtido através de HCA, utilizando o método de ligação de Ward, realizada sobre os resultados da análise de contraste.	80

# Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Reagentes utilizados na preparação dos testes presuntivos. ....	43
<b>Tabela 2.</b> Método de utilização dos diversos testes presuntivos.....	45
<b>Tabela 3.</b> Diluições utilizadas para a determinação da sensibilidade.....	47
<b>Tabela 4.</b> Condições de lavagem para os diferentes têxteis.....	49
<b>Tabela 5.</b> Temperaturas a que cada substrato foi submetido, durante um período de 5 minutos.....	50
<b>Tabela 6.</b> Cor e material dos tecidos escolhidos para o estudo.....	51
<b>Tabela 7.</b> Resultados obtidos para a sensibilidade dos vários testes em tecido 100% algodão.....	59
<b>Tabela 8.</b> Resultados obtidos para a sensibilidade dos vários testes em cimento.....	59
<b>Tabela 9.</b> Resultados obtidos para a sensibilidade dos testes à lavagem de tecidos, no substrato tecido 100% algodão.....	63
<b>Tabela 10.</b> Resultados obtidos para a sensibilidade dos testes à lavagem de tecidos, no substrato ganga.....	64
<b>Tabela 11.</b> Resultados obtidos para a estabilidade das amostras sujeitas a aquecimento, no substrato azulejo.....	70
<b>Tabela 12.</b> Resultados obtidos para a estabilidade das amostras sujeitas a aquecimento, no substrato cimento.....	70
<b>Tabela 13.</b> Resultados obtidos para a estabilidade das amostras sujeitas a aquecimento, no substrato tecido 100% algodão.....	71
<b>Tabela 14.</b> Resultados obtidos para a estabilidade das amostras sujeitas a aquecimento, no substrato madeira.....	71
<b>Tabela 15.</b> Visibilidade das manchas produzidas nos tecidos aos 2 dias, 2 semanas e 2 meses, com recurso a luz branca (B), infravermelha (IV) e azul (Az).....	74
<b>Tabela 16.</b> Contrastes proporcionados pelas luzes infravermelha e azul nos vinte tecidos, após 2 dias, 2 semanas e 2 meses da deposição das manchas de sangue.....	77
<b>Tabela 17.</b> ANOVA de fator único, para o estudo do efeito do tempo na análise de contraste.....	82





# Capítulo I

Introdução



## 1.1. Local do crime

Segundo o Manual de Inspeção Judiciária, o local do crime é definido como um espaço delimitado, direta ou indiretamente relacionado com a prática de um crime, o qual é objeto da inspeção judiciária. Por sua vez, a inspeção judiciária tem por base um conjunto de procedimentos e metodologias que visam interpretar e avaliar o local, assim como pesquisar, localizar, registrar, recolher, proteger, acondicionar, armazenar e transportar todos os meios de prova e vestígios nele existentes, os quais poderão contribuir para a reconstituição da ação criminosa, para o estabelecimento de nexos probatórios entre esta e o seu autor e para a formulação de hipóteses de trabalho [1].

Um local do crime pode surgir em qualquer lugar, desde áreas urbanas movimentadas a áreas rurais pouco frequentadas, dentro de uma casa ou mesmo debaixo de água, envolvendo uma ou múltiplas pessoas. Ou seja, considera-se qualquer área física, seja esta externa, interna ou mista [2]. Tendo em conta a variedade aparentemente infinita de espaços existentes, pode parecer impossível definir corretamente o local do crime. Contudo, embora existam diferenças evidentes entre os vários locais, existem simultaneamente algumas semelhanças. Por exemplo, os assaltos têm padrões semelhantes e, no entanto, cada um acontece num local diferente, é cometido por um ladrão diferente ou, no caso do criminoso ser o mesmo, em dias diferentes. Tal como supramencionado, os locais do crime não são apenas aqueles em que ocorreu o delito, mas também todos os locais associados à prática do mesmo. Assim sendo, enquadram-se neste perfil os espaços onde foram feitos os preparativos, onde um corpo ou uma arma foram descartados, caminhos utilizados, entre outros [3].

O princípio de Locard evidencia a importância da análise ao local do crime. Segundo este, sempre que dois objetos estão em contato, haverá uma troca mútua de matéria entre ambos. Associado ao princípio anterior está o princípio da individualidade, que estabelece a inexistência de dois objetos absolutamente iguais. No presente contexto, isto significa que existe sempre um intercâmbio entre o autor, a vítima e o local, seja este de carácter voluntário ou involuntário, o qual dá origem a vestígios [4]. Assim, tendo em consideração a informação contida nos vestígios e o facto de os mesmos terem elevado valor probatório, analítico e interpretativo, torna-se crucial a utilização de um método que permita uma seleção e interpretação corretas [5].

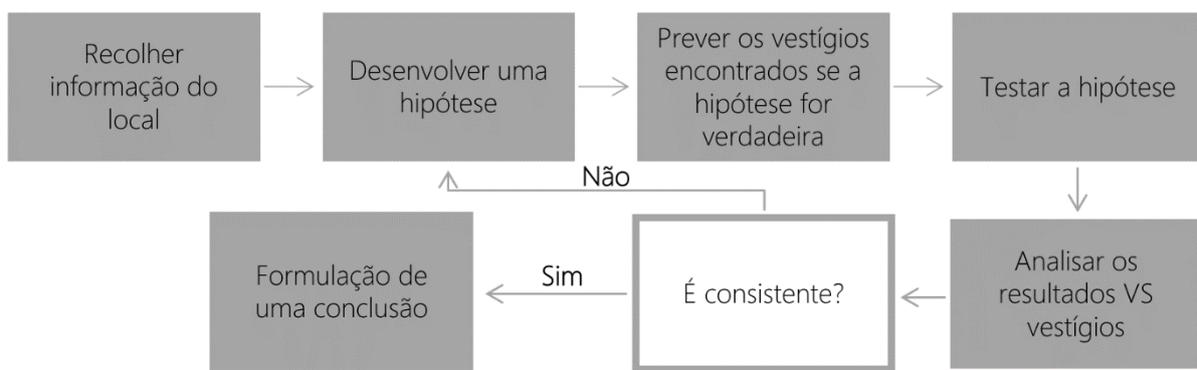
*" Wherever he steps, whatever he touches, whatever he leaves, even unconsciously, will serve as silent evidence against him. Not only his fingerprints or his footprints, but his hair, the fibers from his clothes, the glass he breaks, the tool mark he leaves, the paint he scratches, the blood or semen he deposits or collects – all these and more bear mute witness against him. This is evidence that does not forget. It is not confused by the excitement of the moment. It is not absent because human witnesses are. It is factual evidence. Physical evidence cannot be wrong; it cannot perjure itself; it cannot be wholly absent. Only its interpretation can err. Only human failure to find it, study and understand it, can diminish its value. "* – Paul Kirk, Crime Investigation, 1953 [6].

### **1.1.1. O método técnico-científico de abordagem ao local do crime**

No passado, a recolha de prova material no local do crime limitava-se essencialmente ao exame direto de objetos, vestígios visíveis e impressões digitais, sendo o trabalho efetuado consoante o tipo de crime. Contudo, este método negligenciava alguns vestígios de elevada importância e era desprovido de validação científica. De forma a solucionar este problema, nos últimos anos, passou a ser implementado o método técnico-científico. Este pressupõe que o exame ao local seja realizado com recurso a metodologia apropriada, recorrendo a um elevado número de equipamentos e produtos químicos para a pesquisa, fixação, recolha e acondicionamento de todo o tipo de vestígios. Além disso, em contraste com o método anterior, o trabalho passou a ser efetuado de acordo com o tipo de vestígios e com a interpretação técnico/científica do local. Adicionalmente, este implica a utilização de princípios físicos e cálculos matemáticos que, juntamente com a interpretação do formato e organização dos vestígios, permitem determinar sequências de eventos e posições relativas da vítima e do agressor [2].

A metodologia de trabalho atual tem em atenção não só a deteção como a proteção de todos os potenciais vestígios com valor probatório recorrendo, portanto, à criação de caminhos de acesso, à utilização de testes presuntivos, fontes de luz forense e demais [2][4]. Deste modo, para além de se verificar uma melhoria na qualidade dos resultados obtidos pelas várias análises, existe também uma redução evidente dos custos e tempo despendidos, como consequência de uma recolha ponderada de vestígios.

O método científico de trabalho procura, sobretudo, evitar a “visão em túnel” e a tomada de conclusões precipitadas. Assim, seguindo o esquema indicado na Figura 1, o primeiro passo será a interpretação geral do local, através da qual se desenvolverá uma hipótese. Posteriormente, deve fazer-se uma previsão daquilo que seria espectável encontrar nas circunstâncias previstas. Após uma pesquisa e análise cuidadas, realiza-se uma comparação entre os dados e vestígios encontrados e os contemplados na hipótese inicial, sendo que, caso os mesmos sejam concordantes, pode depreender-se que a hipótese é suportada pela informação presente no local. Caso tal não se verifique, deverá formular-se uma nova hipótese.



**Figura 1.** Método científico utilizado atualmente. Adaptado de [2].

### 1.1.2. A abordagem inicial ao local do crime

Em situações normais, a equipa de inspeção judiciária dificilmente será a primeira entidade a entrar em contacto com o local do crime. Geralmente, antes da sua chegada, surgem cidadãos, equipas médicas, bombeiros e membros da polícia local. Tendo em consideração que o princípio das trocas de Locard rege em todos os locais de crime, é previsível que qualquer contato humano com os vestígios resulte na sua contaminação ou perda. Idealmente, após a ocorrência de um ato delituoso, o lugar onde o mesmo ocorreu permaneceria inalterado, contudo, tal não se verifica em casos reais. Uma das causas para que tal se suceda é a intervenção dos socorristas que é realizada, sobretudo, por reflexo ou instinto, sendo o seu foco principal prestar auxílio, o que, por vezes, implica a destruição ou alteração dos vestígios [4][6]. Deste modo, cabe, eventualmente, aos primeiros intervenientes institucionais a recolha da informação inicial para a determinação das circunstâncias e eventual avaliação da natureza do crime [1].

No que concerne à polícia local, esta, após tomar conhecimento da ocorrência e, respetivamente, se deslocar ao local, tem as indispensáveis funções de isolar, determinar a natureza do crime e reencaminhar o caso para os órgãos responsáveis pela investigação criminal. Relativamente à definição dos vários tipos de crime, aplica-se a Lei da Organização da Investigação Criminal (Lei nº49/2008 de 27 de agosto). Por outro lado, o nº1 do artigo 262º do Código de Processo Penal define a finalidade e o âmbito do inquérito, estabelecendo que a investigação criminal *"compreende o conjunto de diligências que visam investigar a existência de um crime, determinar os seus agentes e a responsabilidade deles e descobrir e recolher provas, em ordem à decisão sobre a acusação"* [1].

A primeira abordagem ao local do crime ocorre após uma ação por parte dos primeiros membros policiais, que visa a reposição da ordem pública, e é também levada a cabo pelos intervenientes referidos. Esta abordagem incide na prevenção e proteção do local e de tudo o que nele se encontra, através de medidas cautelares que intentam o isolamento e a preservação dos mesmos. Posto isto, a abordagem inicial ao local do crime possui três objetivos centrais: a caracterização sumária do evento; o isolamento, preservação e controlo do local do crime; e a recolha de informação através da observação atenta do local, da descrição da situação no local aquando da sua chegada e da identificação de pessoas e veículos presentes no mesmo, considerando que se devem separar as testemunhas, se as houver [1].

### **1.1.3. O exame ao local do crime**

Após a realização dos procedimentos referidos no ponto supra, dá-se a comunicação do crime por parte dos primeiros intervenientes no local, devendo esta incluir dados como a tipificação e caracterização do evento, a determinação rigorosa da data/hora e do local e a identificação do comunicante e da vítima. Tendo por base a informação fornecida, é destacada uma equipa de inspeção judiciária, de acordo com as características e exigências do caso em questão, que se deslocará até ao local do crime. Esta equipa tem a missão de descobrir elementos de prova que sirvam de auxílio à investigação, conduzindo à descoberta da verdade material e, numa fase final, à reconstituição do evento. A inspeção judiciária, no que toca à prova material, decorre em duas fases que, embora distintas, são indivisíveis: a primeira inclui a pesquisa e localização de todos os vestígios de interesse criminalístico; e a segunda a

recolha, preservação, acondicionamento, armazenamento e transporte dos mesmos. Tal como referido anteriormente, nesta etapa deve recorrer-se a um vasto conjunto de metodologias técnico-científicas, que serão aplicadas de acordo com o tipo de vestígio em análise [1].

## **1.2. Sangue**

O sangue é um tecido conjuntivo líquido integrado no sistema circulatório, presente em humanos e animais e crucial à existência de vida. O seu papel é estudado desde a antiguidade até aos tempos modernos, sendo este frequentemente considerado a “essência da vida”. O seu interesse na medicina é inegável, o que implica que este seja alvo de múltiplas análises, visto ser uma enorme fonte de informação [8].

Este fluído, cujo pH normal varia entre 7.35 e 7.45, é constituído por uma variedade de células em suspensão num meio líquido, denominado de plasma [9]. No organismo humano, as suas principais funções são de transporte e defesa, sendo que um adulto saudável possui, normalmente, entre 4 a 6L de sangue, o que representa aproximadamente 8% do seu peso corporal [10].

### **1.2.1. Funções biológicas do sangue**

O sangue é bombeado pelo coração para os vasos sanguíneos, que se estendem por todo o corpo. Assim, devido à sua distribuição e às suas funções, este desempenha um papel fulcral na manutenção da homeostase [8].

Ao nível do transporte, o sangue é conhecido, sobretudo, por transportar oxigénio até às células e dióxido de carbono, produzido pelas mesmas, até aos pulmões, onde será expelido [11]. Contudo, este faz a distribuição de outros compostos, que não gases, nomeadamente, nutrientes, eletrólitos, água, produtos de degradação, resíduos metabólicos, medicamentos, moléculas reguladoras (hormonas e enzimas) e células de defesa [1][5]. Estas substâncias são encaminhadas para os órgãos alvo, onde atuarão de acordo com a sua função, ou para órgãos encarregues de fazer a sua remoção, tais como os rins ou o fígado [11].

Por outro lado, este fluído participa também na regulação do pH e da osmose e na manutenção da temperatura corporal, através da distribuição do excesso de calor, o que facilita a dissipação do mesmo [8].

Uma parte importante do sistema imunitário é constituída por células e produtos químicos do sangue, os quais atuam na defesa do corpo contra substâncias estranhas, tais como microrganismos e toxinas [1][4]. Mais ainda, é atribuída a este tecido a função de coagulação, isto é, a proteção contra a perda excessiva de sangue aquando de uma lesão. Assim, quando os tecidos são danificados, os coágulos sanguíneos representam a primeira fase para a reparação dos mesmos [8].

## **1.2.2. Componentes sanguíneos**

Tal como referido anteriormente, o sangue é constituído por células e fragmentos de células envolvidos por uma matriz líquida. Esta porção líquida é denominada de plasma e representa 55% do volume total de sangue. Por contraste, a porção celular constitui os restantes 45% e é composta por glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas [6][7]. Os três tipos de células sanguíneas mencionados derivam de uma única população de células indiferenciadas, localizadas na medula óssea. Estas precursoras, posteriormente, sofrem diferenciação durante a hematopoiese [8][14].

### **1.2.2.1. Plasma**

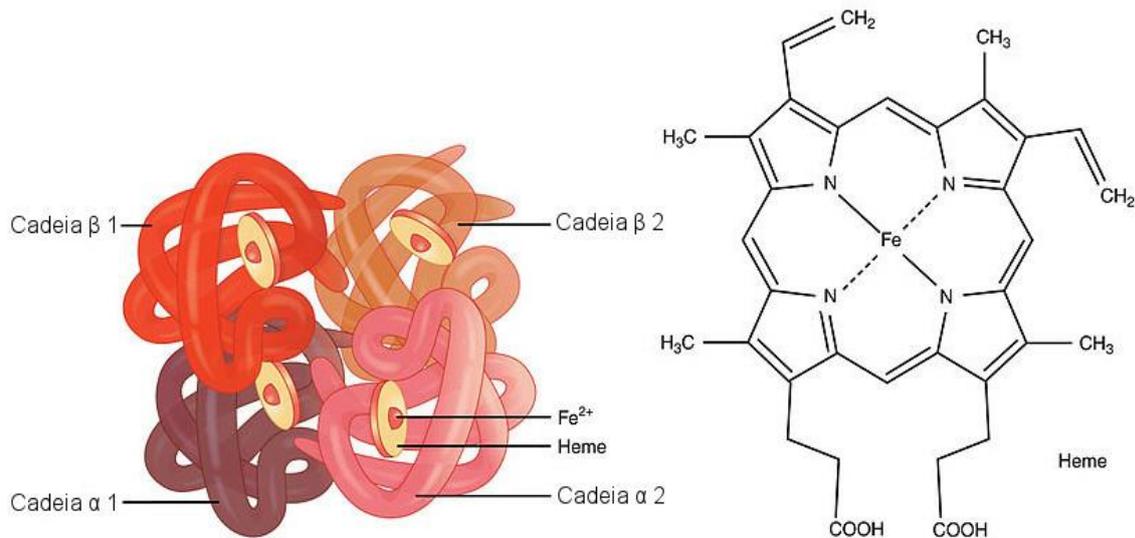
O plasma é um fluído transparente que, em circunstâncias normais, tem uma coloração amarela clara e é composto por 91% de água e 9% de proteínas, sais, lípidos e glucose [3][13]. É uma substância coloidal, ou seja, é um líquido com substâncias em suspensão, que na sua maioria são proteínas plasmáticas, tais como, albumina, globulinas e fibrinogénio, o qual desempenha um papel importante na coagulação [8][14]. Este líquido representa o principal meio de transporte dos nutrientes, eletrólitos e hormonas até às células e dos produtos de degradação produzidos nas mesmas até aos órgãos responsáveis pela sua eliminação [11]. Para além disso, o plasma é o meio de suspensão das células sanguíneas, permitindo às mesmas uma deslocação rápida até aos locais onde atuam e cumprem as suas funções [5].

### 1.2.2.2. Eritrócitos

Os glóbulos vermelhos, ou eritrócitos, são produzidos na medula óssea e representam a componente celular mais abundante do sangue, o que se reflete em 4.8 a 5.4 milhões de células por milímetro cúbico [9][14]. Durante a hematopoiese, os eritrócitos perdem o núcleo e alguns organelos, nomeadamente, as mitocôndrias. Juntamente com outras, esta é uma das causas pelos quais apresentam uma curta vida, de 3 a 4 meses [12]. Ao envelhecer, estes perdem as suas capacidades acabando por ser removidos da circulação pelo fígado e baço [11].

As reduzidas proporções dos glóbulos vermelhos (7 a 8  $\mu\text{m}$ ) e o seu formato bicôncavo, permitem aos mesmos atravessar capilares de dimensões bastante reduzidas. Para além disso, a sua forma garante uma ampla área superficial, o que maximiza o transporte de oxigénio e dióxido de carbono [11]. É também na membrana destas células que se encontram os oligossacarídeos que determinam os grupos sanguíneos [5].

O componente principal dos eritrócitos é a hemoglobina, uma proteína pigmentada, responsável pela sua cor vermelha. Contudo, estas células contêm também lípidos, adenosina trifosfato (ATP) e a enzima anidrase carbónica [8]. A sua função principal é o transporte de oxigénio para os tecidos e de dióxido de carbono dos tecidos para os pulmões, sendo esta, maioritariamente, desempenhada pela hemoglobina [3]. Esta molécula é constituída por quatro cadeias polipeptídicas, cada uma ligada a um grupo heme com um ião ferro na posição central (Figura 2). Tendo em conta que cada grupo heme consegue estabelecer uma ligação ao oxigénio, uma molécula de hemoglobina é capaz de transportar quatro moléculas de oxigénio. Todavia, existem alguns produtos tóxicos com elevada afinidade para o grupo heme, tais como o monóxido de carbono e o cianeto, ambos extremamente prejudiciais para o ser humano [3][12]. Embora não possuam ADN, estas células, devido à presença da hemoglobina, são extremamente importantes para análises forenses, mais concretamente, no campo da deteção de sangue.



**Figura 2.** Estrutura de uma molécula de hemoglobina (esquerda) e do grupo heme (direita) [15].

### 1.2.2.3. Leucócitos

Em contraste com os eritrócitos, os glóbulos brancos ou leucócitos, não contêm hemoglobina, mas são nucleados. Estas células esbranquiçadas e esféricas são, predominantemente, produzidas nos tecidos linfoides e medula óssea e podem ser divididas em dois grandes grupos: os granulócitos e os não granulócitos, de acordo com a visibilidade dos organelos celulares [2][6]. Existem cinco tipos de leucócito, sendo estes, os neutrófilos, eosinófilos, basófilos, linfócitos e monócitos. Embora diferentes todos estes desempenham um papel crucial na defesa do organismo, atuando, sobretudo, fora dos vasos sanguíneos [5]. Na sua totalidade correspondem a aproximadamente 1% da porção celular do sangue, o que equivale a cerca de 5000 a 7000 leucócitos por milímetro cúbico [14].

Os leucócitos, no geral, atuam na defesa do corpo contra microrganismos invasores e na remoção de células mortas e de corpos estranhos do organismo [8]. Aquando de uma infeção, estes acumulam-se no local, fagocitando bactérias, corpos estranhos e células mortas. Após este processo os leucócitos morrem e, juntamente com outras substâncias, formam um fluido chamado de pus [8]. Além das funções supramencionadas, estes participam também na remoção de pequenos coágulos de sangue, de eritrócitos em fim de vida e de resíduos de outras partículas [11].

Atualmente, os glóbulos brancos são os únicos componentes sanguíneos com utilidade na análise de ADN, seja este nuclear ou mitocondrial [14]. A individualização de um sujeito é obtida através do ADN nuclear, o qual resulta de um processo de recombinação, contendo uma mistura do material genético da mãe e do pai. Ao contrário do ADN nuclear, o ADN mitocondrial (mtADN) é uma herança da mãe. Assim, excluindo eventuais mutações, a sequência de mtADN de irmãos e de todos os parentes maternos é idêntica. Esta característica pode ser útil para a identificação de restos mortais em que se conhece a linhagem materna, sendo esta utilizada como referência, para comparação. Para além disso, visto que numa célula existe maior número de cópias de mtADN do que de ADN nuclear, este pode representar a solução para casos em que existe pouco ADN nuclear ou o mesmo se encontra extremamente degradado [16].

#### **1.2.2.4. Plaquetas**

As plaquetas, ou trombócitos, são células anucleadas com uma forma irregular e dimensões muito reduzidas [6][8]. Derivam dos megacariócitos e têm cerca de 5 a 9 dias de vida, sendo que, normalmente, existem entre 250 000 a 400 000 plaquetas por milímetro cúbico de sangue. A sua ação está fortemente relacionada com a hemóstase, ou seja, a suspensão de uma hemorragia. As funções que desempenham são imprescindíveis para o organismo, nomeadamente na prevenção de perdas de sangue através da formação do rolhão plaquetário, capaz de fechar orifícios nos vasos mais pequenos, e da ativação dos processos de coagulação sanguínea [8][9].

A rutura de um vaso sanguíneo deixa as plaquetas expostas ao colagénio, presente nas zonas mais exteriores dos vasos, o que fará com que estas aumentem o seu tamanho e se tornem ainda mais irregulares. Simultaneamente à sua alteração estrutural, ficam pegajosas e começam a aderir às fibras presentes nas paredes do vaso, o que, em vasos menores, pode controlar com eficácia a perda de sangue. Para além disso, libertam substâncias que causam vasoconstrição, diminuindo a quantidade de sangue perdido [14].

### 1.2.3. Propriedades físicas do sangue

O sangue é um fluido opaco e viscoso, cuja cor varia de acordo com a quantidade de oxigênio presente. Isto é, quando existe pouco oxigênio no sangue, este é vermelho escuro e, por contraste, quando tem muito oxigênio é vermelho alaranjado [13]. Sendo este um líquido, não tem uma forma própria, ou seja, ajusta-se ao ambiente onde se encontra [10]. Embora, nos líquidos, as moléculas se consigam mover livremente, o espaço existente entre elas permanece constante, a não ser que ocorram alterações de pressão ou temperatura [11].

Conhecer as propriedades físicas de um líquido é de extrema importância para a compreensão do seu comportamento. Assim sendo, relativamente ao sangue, estas podem explicar as características de voo e os padrões de manchas produzidos, ambos bastante importantes no contexto de local do crime. Neste sentido, existem três propriedades particularmente importantes: viscosidade, tensão superficial e densidade relativa [10].

#### 1.2.3.1. Viscosidade

A viscosidade resulta da atração mútua entre moléculas, que cria resistência à alteração de forma ou de fluxo [13]. De uma forma mais simples, pode dizer-se que esta reflete a consistência de um líquido, isto é, se é mais ou menos espesso [5]. A viscosidade do sangue resulta do facto de existirem nas membranas dos eritrócitos elevadas concentrações de ácido siálico, o qual produz uma forte carga eletronegativa [11].

De acordo com o seu comportamento, os fluidos podem ser classificados em Newtonianos ou não-Newtonianos. Deste modo, um fluido Newtoniano é aquele cuja viscosidade ( $\mu$ ) é constante, não apresentando variações no tempo, e a tensão ( $\tau$ ) é diretamente proporcional à taxa de deformação ( $\dot{\gamma}$ ), tal como acontece, por exemplo, com a água [13][17]:

$$\tau = \mu \cdot \dot{\gamma} \quad (1.1)$$

Contrariamente, a viscosidade dos fluidos não-Newtonianos varia quando é aplicada uma força, não existindo proporcionalidade entre a tensão e a taxa de deformação [11]. No geral, o sangue representa um fluido não-Newtoniano onde são formadas gotas individuais devido à coesão interna, ou seja, a atração entre moléculas do mesmo corpo, demonstrando uma elevada estabilidade durante o voo [17].

### 1.2.3.2. Tensão superficial

No sentido de entender o conceito de tensão superficial e a forma como esta influência o sangue, é importante esclarecer os conceitos de adesão e coesão. Assim sendo, a adesão é definida como a tendência de moléculas diferentes se ligarem por forças intermoleculares. Um exemplo deste fenómeno será uma gota de sangue fixada numa parede ou numa faca. Por outro lado, a coesão é a tendência de moléculas semelhantes se ligarem pela ação das forças intermoleculares [10].

Os líquidos são substâncias não rígidas onde as moléculas se movem livremente. Contudo, em condições controladas, o espaço entre elas é constante e as atrações elétricas existentes geram forças coesivas. Assim, num recipiente, as moléculas de líquido são atraídas igualmente por todos os planos adjacentes. Tal não se aplica às moléculas de superfície, onde as forças coesivas são mais intensas. Nesta situação, de forma a minimizar a superfície exposta, as moléculas procuram atingir o arranjo mais estável e menos energético. Como consequência, existe o aumento das forças coesivas na zona superficial, fenómeno ao qual se dá o nome de tensão superficial [11].

De forma simplificada, pode dizer-se que a tensão superficial estabelece a resistência de um líquido à separação ou penetração. Esta grandeza é expressa como força por unidade de comprimento ou energia por unidade de área [11].

Antes de sair de uma ferida ou superfície corporal, a massa e a gravidade de uma gota de sangue têm de superar a sua tensão superficial. Mais ainda, as forças coesivas associadas a esta são responsáveis pela forma esférica das gotas durante o voo e a manutenção dessa forma deve-se, sobretudo, à viscosidade. Quando em queda, a ação da força da gravidade, a resistência do ar e os movimentos intermoleculares levam a alterações da forma [10].

### 1.2.3.3. Densidade relativa

Outrora conhecida como gravidade específica, a densidade relativa é uma medida de comparação que define a razão entre a densidade de uma determinada substância e a densidade da água, que é  $1\text{g/cm}^3$ . Tendo em consideração que esta medida é o resultado de uma razão onde ambos os fatores têm as mesmas unidades, estas cancelam-se, ou seja,

a densidade relativa não tem unidades. Sendo a água o termo de comparação, pode dizer-se que compostos com densidade inferior flutuam nela, enquanto que, compostos com densidade superior afundam. No caso do sangue, este tem uma densidade relativa de 1.06 [11].

### **1.3. Importância do sangue no contexto de local do crime**

#### **1.3.1. O vestígio biológico sangue em local do crime**

Em local do crime é bastante comum a presença de vestígios de natureza biológica, os quais são recolhidos após ser efetuada uma interpretação cuidada dos acontecimentos que possam ter ocorrido e a devida valoração dos mesmos. No geral, este tipo de vestígio representa uma boa fonte de ADN e, portanto, tem elevado valor probatório. Contudo, estes são extremamente frágeis e podem encontrar-se danificados ou degradados, devendo, por isso, ser rapidamente recolhidos e preservados, de forma a manter a sua integridade e, conseqüentemente, valor [1].

Os vestígios biológicos integram os fluídos corporais como sangue, sémen, saliva, secreções vaginais ou qualquer outra fonte de ADN, como ossos, dentes, unhas e tecidos [18]. Contudo, a introdução do ADN é relativamente recente no contexto forense, sendo que, antes desta revolução, a biologia forense baseava-se, sobretudo, na análise das diferenças de classe no sangue humano, tal como são exemplo os grupos sanguíneos ABO e as variações nos antígenos sanguíneos [19]. Associados às várias classes existem múltiplos estudos estatísticos, que estabelecem a probabilidade de encontrar uma determinada característica numa população [18].

O sangue, devido ao alargado leque de informações que contém, é considerado um dos vestígios mais importantes em local do crime [20]. Este, para além de ser tão individualizador quanto uma impressão digital, pode fornecer informação sobre a sequência de eventos do crime, permite a identificação de infeções e doenças e a deteção de substâncias tóxicas e estupefacientes [1]. Assim sendo, na presença deste vestígio, é extremamente importante determinar a sua origem. Por outro lado, o sangue pode ser encontrado em múltiplos substratos, nomeadamente, no chão, numa parede, num objeto presente no local, na arma do crime, nas roupas usadas pela vítima ou pelo suspeito, ou mesmo no corpo dos mesmos.

Mais ainda, este pode encontrar-se fresco, seco, parcialmente degradado ou putrefeito. Por vezes, pode haver uma quantidade muito reduzida de sangue, limitando ou impedindo as análises que podem ser realizadas ao mesmo [9]. Tendo em consideração estes fatores, torna-se evidente a importância de uma colheita e preservação adequadas, acompanhadas da devida documentação das amostras recolhidas [19]. Para tal, é necessário um complexo treino e experiência por parte dos técnicos forenses [21].

### **1.3.1.1. Pesquisa**

Tipicamente, e de acordo com o manual de procedimentos de inspeção judiciária, a pesquisa de vestígios hemáticos é realizada com o auxílio de fontes de luz forense e de testes presuntivos e indicadores apropriados para o efeito [1].

Uma mancha de sangue relativamente recente, sem a ação de interferentes, tem uma cor vermelha-acastanhada associada a um leve brilho. Contudo, devido às alterações climáticas e à ação humana a que pode estar sujeita, a mancha poderá assumir múltiplas colorações. Da mesma forma, também a superfície onde se encontra o vestígio hemático pode provocar mudanças estéticas drásticas. Nos vários cenários possíveis, a idade da amostra pode ser um fator limitante, visto que, com o decorrer do tempo, o sangue fica sujeito a mais interferências [22]. Tendo em conta esta informação, existem vários materiais e compostos capazes de ser confundidos com sangue, daí ser importante estabelecer essa diferença anteriormente à recolha de amostras. Para além disso, considerando que alguns vestígios podem ser de natureza animal, deve ser efetuado um teste de confirmação para a espécie humana [1]. Em suma, durante a pesquisa, as manchas não devem ser classificadas de acordo com a cor e caráter, pois nem sempre estas seguem um padrão comum.

Um técnico de local do crime pode encontrar vestígios de sangue em lugares e materiais, aparentemente, ilimitados. Após a ocorrência de um crime, num local fechado, é frequente a presença de manchas no chão, nas paredes, ou mesmo no teto. Nestas circunstâncias, é possível que os criminosos tentem, imediatamente, eliminar o sangue do seu corpo e roupa, limpando-se impulsivamente na mobília próxima, o que, em determinados materiais, pode gerar vestígios de difícil deteção. Para além disso, em cenas de crime extremamente sangrentas, podem ser encontradas pegadas do suspeito em várias superfícies, assim como

manchas de sangue no calçado do mesmo, ambos bastante importantes para provar a presença deste no local [19].

Aquando da pesquisa, deve ser aplicada uma fonte de luz branca obliquamente à superfície examinada, sendo que, por vezes, as manchas podem ser mais evidentes quando expostas a radiação no visível, de diferentes comprimentos de onda [22]. Em situações em que existe uma tentativa de lavagem e de ocultação dos vestígios de natureza hemática, estes passam a estar presentes de uma forma latente, o que torna a sua deteção bastante difícil. Deste modo, se existir uma forte convicção da investigação criminal relativa à existência dos referidos vestígios, mas os mesmo não forem detetados pelos métodos acima descritos, devem ser aplicados reagentes específicos para a revelação de manchas latentes, como o luminol. Contudo, tendo em conta que estes produtos químicos podem diluir a amostra e destruir os padrões, os mesmos devem ser utilizados com a máxima precaução. Em superfícies pequenas, o reagente de verde de leucomalaquite pode representar uma alternativa viável [1].

A busca realizada pelos profissionais de investigação deve contemplar todo o local, incluindo zonas menos visíveis, móveis e utensílios nele presentes. Relativamente à pesquisa de sangue em roupas, esta deve ser realizada com especial pormenor, sendo comum que estas tenham sido lavadas após o crime, tornando as manchas menos evidentes. Assim, dependendo da peça, é importante verificar, por exemplo, as costuras, o forro, os bolsos e o interior das mangas [19].

### **1.3.1.2. Documentação**

A documentação é crucial para a compreensão e perceção de tudo o que foi encontrado e realizado no local do crime e garante o valor probatório dos vestígios recolhidos. Mais ainda, uma documentação adequada representa um forte auxílio à interpretação e reconstrução do local [20][21].

Uma das formas mais simples e eficazes de documentação para os vários intervenientes da investigação é a anotação. As notas retiradas podem incluir informação sobre a condição dos vestígios e o material utilizado no seu acondicionamento, descrever as manchas encontradas e apresentar os resultados dos testes presuntivos e confirmatórios realizados.

Este tipo de dados pode ser importante para suportar as conclusões dos relatórios, ou mesmo servir de auxílio à memória do técnico para eventuais testemunhos em tribunal [21].

Qualquer que seja o crime em questão, o local e todos os vestígios encontrados devem ser documentados fotograficamente. Este método permite registar detalhes complexos e objetos de vários tamanhos em escala ou em tamanho real. No caso dos vestígios de sangue, dependendo da superfície onde este se encontra, podem ser utilizados filtros para facilitar a visualização das manchas. Um exemplo frequente é a utilização de um filtro infravermelho para a documentação de manchas de sangue em superfícies escuras [19]. Para além disso, devem ser obtidas fotografias gerais, de médio alcance e também fotografias aproximadas dos padrões de sangue pertinentes, sendo, neste caso, bastante importante a adição de uma escala para questões de interpretação do padrão [22]. A escala permite conhecer o tamanho real de salpicos, impressões de calçado e impressões digitais, assim como realizar a análise e comparação de padrões [20].

Atualmente, a fotografia é um dos métodos de documentação mais importantes e úteis nos vários cenários possíveis. Contudo, esta estabelece apenas distâncias relativas entre objetos e detalhes e pode, por vezes, distorcer as relações espaciais entre os mesmos [19]. Deste modo, é importante incluir nos relatórios esboços com medições exatas. Cada mancha deve ter um número de identificação único e as suas características e localização devem ser documentadas tendo em conta o número que lhe foi atribuído [21]. Para além disso, a utilização de tecnologias como o laser scanner 3D, permite digitalizar todo o local do crime e fazer registos extremamente precisos das áreas que contêm vestígios de sangue, dando origem a modelos 3D virtuais para posteriores análises [20].

Quando o sangue é um dos vestígios predominantes no local, pode ser relevante a gravação em vídeo. Este procedimento facilita a compreensão das relações existentes entre os padrões encontrados e as manchas que os constituem. Por outro lado, permite registar e seguir rastros que podem pertencer ao suspeito, ou mesmo mostrar a disposição de várias áreas relevantes [19]. Nestas situações deve manter-se a zona filmada com uma iluminação adequada, podendo, para tal, recorrer-se a fontes de luz.

Um método de documentação transversal a todo o tipo de vestígios é a cadeia de custódia. Esta contém todas as informações pertinentes sobre uma dada amostra e deve acompanhar a

mesma desde a sua recolha. O seu papel é, sobretudo, documentar temporalmente o movimento das provas e quem esteve na sua posse, de forma a garantir a integridade e segurança destas. Este procedimento pode contribuir para a prevenção de contaminações e adulterações de prova até ao momento da sua apresentação em tribunal. Os documentos da cadeia de custódia devem ser preenchidos aquando da recolha dos vestígios e após serem utilizados os métodos de documentação acima referidos [19].

### **1.3.1.3. Recolha e manuseamento de amostras**

Uma vez documentados todos os vestígios encontrados no local, pode ser iniciada a fase de recolha. Tal como todos os procedimentos realizados pelos profissionais de investigação, também este deve ser realizado cautelosamente, sendo que está em causa a integridade e o valor probatório do vestígio. Assim sendo, o processo de recolha deve começar com os vestígios mais frágeis ou suscetíveis a interferências [19]. O sangue pode enquadrar-se neste perfil e, portanto, é recolhido prioritariamente. Para a sua colheita devem ser utilizadas ferramentas devidamente esterilizadas. Quando o sangue encontrado não está totalmente seco, deve ser recolhido e deixado secar naturalmente sendo que, se for possível, deve ser levado o objeto onde se encontra a mancha. Ao extrair uma amostra de sangue de uma determinada superfície, é importante obter amostras do substrato como controlo. Estas podem ser especialmente úteis se forem detetadas misturas de ADN na amostra de sangue, podendo existir, por exemplo, células epiteliais no substrato [21].

O acondicionamento depende de vários fatores, ou seja, de acordo com as características dos vestígios e da superfície existem embalagens e técnicas de preservação específicas. Relativamente ao sangue, este nunca deve ser colocado em recipientes herméticos, visto que pode acumular-se humidade no seu interior, a qual provoca a degradação e contaminação das amostras [22]. Assim sendo, existem várias formas de recolher amostras secas, nomeadamente com recurso a uma zaragatoa, raspagem, extração com fita, eluição ou recuperação do objeto. Quando são utilizadas zaragatoas, estas devem ser humedecidas com água destilada e, após a recolha, colocadas num recipiente que permita a secagem da amostra sem contaminação. Os rótulos devem ter em atenção a ordem de recolha [21].

Para a raspagem é necessário um instrumento afiado e esterilizado, capaz de remover o sangue da superfície onde se encontra. Este é então colocado num saco de papel, o qual é armazenado num pacote secundário. Uma vantagem deste método é o facto de não diluir a amostra, ou seja, facilita a análise de ADN [21]. O método de extração com fita requer a aplicação de uma força no lado não aderente, para garantir o máximo de contacto entre a fita adesiva e o sangue. Contudo, o sucesso desta técnica depende bastante da superfície onde se encontra a mancha [21]. O último recurso será a eluição da amostras, sendo esta feita com recurso a uma solução salina, que fará a dissolução da mancha, posteriormente transferida para um tubo estéril [21].

Quando se trata de sangue fresco, as opções são mais reduzidas. O método mais comum é a utilização de um material absorvente diretamente em contacto com a mancha, sendo que, de seguida, a amostra deve secar naturalmente num local onde a contaminação e degradação sejam mínimas [21].

As amostras referências das vítimas e suspeitos são recolhidas para tubos de tampa roxa com EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético), específicos para sangue. É recomendada a extração de 3µL de sangue total. Alternativamente e mais comum, é a utilização de uma zaragatoa bucal para o interior da bochecha, a qual permite a obtenção de uma amostra de referência de ADN, que será usada para comparação com os vestígios hemáticos recolhidos [21].

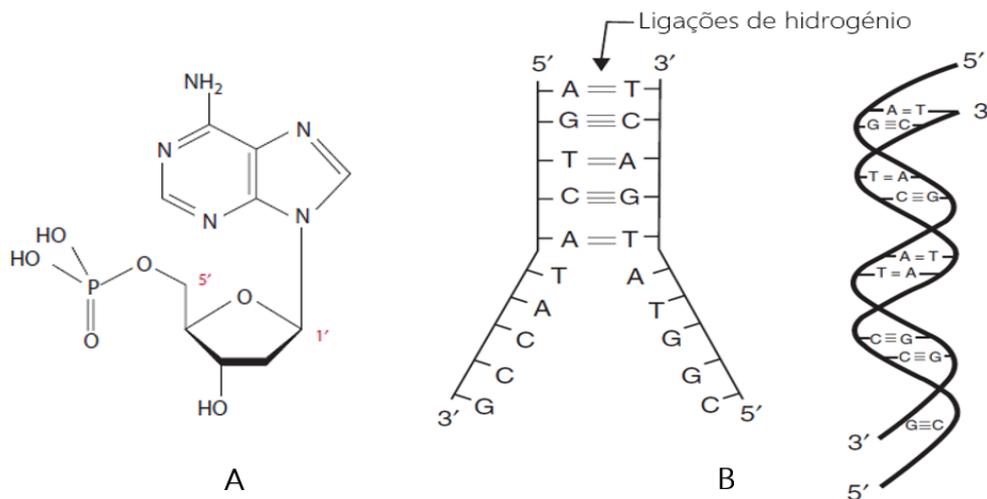
#### **1.3.1.4. Transporte e armazenamento**

Antes de serem transportados para os seus destinos, todos os vestígios devem ser verificados de forma a certificar que os mesmos estão corretamente acondicionados e não serão danificados durante o percurso. Relativamente aos vestígios hemáticos, estes devem ser armazenados à temperatura ambiente, sem exposição a calor ou humidade excessivos, e enviados para as entidades competentes pela sua análise o mais rapidamente possível [19]. Quando se trata de roupas ou tecidos, estes devem ser inicialmente acondicionados em folhas de papel e mantidos em embalagens do mesmo material [1].

### 1.3.2. Análise de ADN

O ADN (ácido desoxirribonucleico) é um polímero formado por nucleótidos, que apresenta uma estrutura em dupla hélice, e pode ser encontrado no núcleo das células. Salvo raras situações, o ADN é idêntico em todas as células, não muda durante a vida e é único para cada indivíduo [23]. Os nucleótidos são as unidades fundamentais da molécula de ADN e são formados por uma pentose (desoxirribose), um grupo fosfato e uma de quatro bases azotadas, nomeadamente, adenina, citosina, timina ou guanina. Estas unidades estão ligadas entre si por ligações fosfodiéster. Por sua vez, as bases encontram-se no interior das cadeias polinucleotídicas e estabelecem ligações químicas fracas, denominadas pontes de hidrogénio, de acordo com a sua complementaridade, isto é, timina-adenina e citosina-guanina (Figura 3) [24]. O ADN tem como função principal a codificação da informação genética essencial para a formação e funcionamento normal dos sistemas vivos. Esta informação, nos humanos, está inserida em 46 cromossomas, formando 23 pares, sendo que os gâmetas possuem apenas 23 cromossomas, ou seja, cada cromossoma de um par é herdado de um dos progenitores [12]. Um desses pares é constituído pelos cromossomas sexuais (X e Y) e permite estabelecer o sexo de um indivíduo. Os 22 pares restantes são chamados de autossómicos e são homólogos em ambos os sexos. A localização física de um gene num cromossoma é chamada de locus. Quando um indivíduo é definido como homozigótico para uma determinada característica significa que possui alelos idênticos num locus específico dos cromossomas homólogos, ou seja, herdou o mesmo alelo de ambos os progenitores. Por contraste, se os alelos forem diferentes o indivíduo é considerado heterozigótico [25].

As regiões do ADN que codificam e regulam a síntese de proteínas são chamadas de genes. Atualmente, sabe-se que o genoma humano contém apenas 20 000–25 000 genes e que apenas cerca de 1.5% do genoma está diretamente envolvido na codificação de proteínas. Ainda assim, aproximadamente 23.5% do genoma é classificado como sequência génica, visto que, apesar de não codificar proteínas, contém vários elementos envolvidos na regulação dos genes. A restante porção do genoma é constituída por ADN extragénico, que se subdivide em ADN de cópia única e ADN repetitivo. Dentro da porção repetitiva existem, essencialmente, dois grupos: repetições agrupadas, ou em *tandem*, e repetições dispersas. No presente contexto, são particularmente importantes as repetições *tandem* visto serem herdadas dos progenitores e apresentarem elevado polimorfismo [26].



**Figura 3.** (A) Estrutura de um nucleótido composto por desoxirribose, grupo fosfato e base azotada, neste caso adenina; (B) esquema da complementaridade de bases e estrutura do ADN, com duas cadeias antiparalelas dispostas em dupla hélice. Adaptado de [12][24].

Quando nos referimos à análise de ADN para fins forenses, comumente, associamos à identificação de vítimas e agressores em crimes violentos, como a violação ou homicídio. Contudo, esta técnica não se cinge a este tipo de delitos, sendo também aplicada, por exemplo, em casos de roubo ou para a identificação de remetentes de cartas de ameaça. Ainda neste contexto, a análise de ADN por ser utilizada para testes de paternidade ou para estabelecer ligações entre familiares [23]. As suas potencialidades são infindas, tanto a nível médico como forense, levando a que a molécula de ADN seja alvo de constantes e intensos estudos.

Gregor Mendel, conhecido como o pai da genética, publicou entre 1865 e 1866 a teoria mendeliana, que se revelou o ponto partida para a genética moderna e para a compreensão da hereditariedade. Ainda assim, só em 1953 foi descrita a estrutura da molécula de ADN, pelos cientistas James Watson e Francis Crick. Nos anos que se seguiram, foi também descoberto que o material genético contém um total de 46 cromossomas e que existem pequenas variações entre indivíduos diferentes. Todas estas constatações foram cruciais para que, em 1985, Sir Alec Jeffreys verificasse que existem algumas sequências de ADN se repetem múltiplas vezes em diversos locais da molécula, as quais variam entre indivíduos. Conjuntamente, desenvolveu uma técnica capaz de analisar a variação do comprimento destas sequências, introduzindo a identificação humana através da análise de ADN.

Também nesta altura, Kary Mullis desenvolveu a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction) que permite a análise forense de quantidades bastante reduzidas de ADN, aumentando significativamente a sensibilidade dos métodos de análise [27].

Atualmente, a análise de STR's (Short Tandem Repeats) é o método mais comum de análise de ADN devido ao facto de estas sequências serem altamente polimórficas e poderem ser amplificadas por PCR. Contudo, em determinados casos pode tornar-se relevante a análise de ADN mitocondrial, de marcadores STR associados ao cromossoma Y (apenas possível em indivíduos do sexo masculino) ou de SNP's (Single Nucleotide Polymorphisms). É relevante referir que, no que concerne aos testes presuntivos, a sua aplicação deve causar o menor dano possível ao material genético, possibilitando a extração de perfis genéticos.

### **1.3.3. Interpretação de padrões de manchas de sangue**

De acordo com a *International Association of Bloodstain Pattern Analysis* (IABPA), a análise de padrões de manchas de sangue (BPA) é o estudo da forma, localização e distribuição das mesmas, com o objetivo de determinar os eventos que lhes deram origem, através da aplicação de conceitos de biologia, bioquímica, física e matemática [7][8]. Esta informação, juntamente com outros dados obtidos durante a investigação do crime, permite a reconstrução do incidente e a avaliação de depoimentos prestados por vítimas, testemunhas ou suspeitos [9][10]. Enquanto técnica forense, o seu foco é a colheita, categorização e interpretação das manchas de sangue presentes no local do crime. Deste modo, podemos referir-nos à mesma como um método de análise de vestígios, ou seja, esta rege-se pelo princípio das trocas de Locard [28].

Tendo em conta o cariz da análise, existem vários pressupostos que lhe estão inerentes, nomeadamente: o sangue comporta-se de acordo com a mecânica dos fluídos e as leis da física; os padrões de manchas de sangue são reproduzíveis e previsíveis; as características físicas de uma mancha estão sempre suscetíveis a alterações [28][14].

A utilidade da análise de padrões de manchas de sangue é incontestável dado que através deste método é possível obter bastantes informações sobre os eventos que ocorreram no local do crime, que dificilmente seriam conhecidas de outro modo. Dentro do leque de informações contidas nestes padrões são de destacar:

- O ângulo de impacto;
- A natureza do objeto utilizado para a realização do crime;
- A quantidade de força aplicada, sendo que quanto maior esta for, menor será a mancha produzida;
- A direção de aplicação de uma força, reconhecida através do estudo da direção de voo do sangue. A cauda das manchas, denominada "*cast-off*", indica a direção em que o sangue estava a viajar até atingir uma dada superfície;
- O número mínimo de golpes proferidos;
- As posições relativas da vítima, do suspeito e de alguns objetos relevantes;
- Movimentação de objetos após o crime, indicada por áreas "limpas" rodeadas de manchas de sangue;
- Sequência de eventos associados a um crime, determinada através da sobreposição de padrões;
- Mão que infligiu os golpes [10][11].

Assim sendo, o objetivo final da utilização desta técnica prende-se com descrição dos eventos associados à prática de um crime, estabelecendo também a natureza das ações delituosas, o local onde decorreram, as movimentações e o papel dos sujeitos envolvidos. Contudo, sempre que possível, a sequência proposta deve ser corroborada por outros procedimentos forenses, designadamente, análises de ADN de manchas estratégicas e relatórios elaborados pelo médico legista, relativos à autópsia da vítima [9][10]. Por vezes, a presença de padrões sobrepostos pode representar uma forte limitação na medida em que dificulta a interpretação dos vários acontecimentos. Portanto, nestas circunstâncias, é relevante para o investigador entender, inicialmente, o local do crime como um todo e, posteriormente, após adquirir uma noção geral sobre o mesmo, diferenciar e analisar os padrões individualmente [5].

Embora a presença de sangue no local do crime seja comum desde os primeiros casos de investigação criminal, durante muitos anos o potencial deste vestígio foi negligenciado. Ainda assim, tendo em consideração a sua natureza, é inevitável tentar estabelecer uma relação entre a sua presença num determinado local e a ocorrência de um crime. Deste modo, ao longo dos anos, vários investigadores procuraram obter informação através da análise de padrões de

manchas de sangue, independentemente de, na altura, esta não ser uma técnica validada e aceite pela comunidade [14].

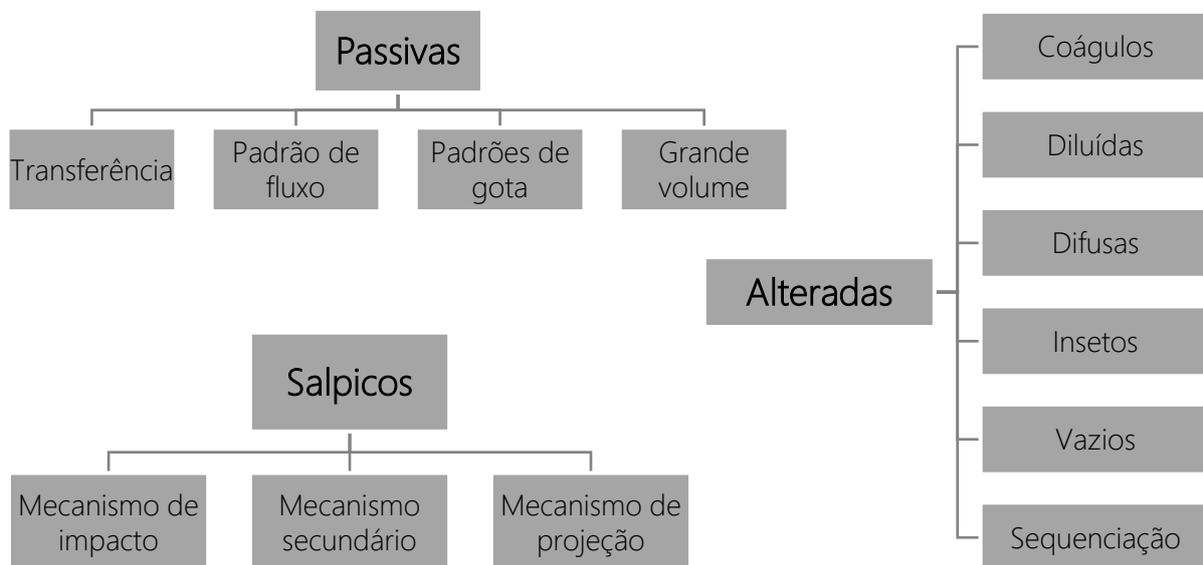
Um dos primeiros e mais relevantes estudos realizados neste contexto foi efetuado em 1895 pelo Dr. Eduard Piotrowski. No seu trabalho, o autor discute a importância da análise de manchas de sangue e, de entre as conclusões obtidas, são de destacar o facto de a força aplicada sobre o alvo se refletir nos padrões de sangue gerados e a existência de uma relação entre a cauda de uma mancha e a direção de voo da gota aquando do impacto [28]. Nos anos que se seguiram, surgiram inúmeros trabalhos sobre o tema, dos quais se pode realçar a investigação realizada por Balthazard e colegas, onde constataram que o ângulo de impacto pode ser determinado através da largura e do comprimento de uma mancha de sangue [9][10].

O início da aceitação e consequente introdução desta técnica na investigação criminal deu-se em 1955, quando Dr. Paul Kirk, no âmbito do caso *State of Ohio vs. Samuel Sheppard*, utiliza a análise de padrões de manchas de sangue para determinar a posição relativa do ofensor em relação à vítima no momento do ataque [11]. O seu sucesso viria a ser marcante para a utilização desta técnica, a qual, gradualmente, passou a ter valor probatório perante o tribunal. Dai por diante, o progresso científico neste campo tem sido constante, sendo que, em Portugal, os primeiros peritos em análise de padrões de manchas de sangue foram formados no ano de 2006.

A implementação deste método de análise implica a utilização de um sistema de classificação que tem por base as características físicas das manchas de sangue. A utilização de uma linguagem comum na comunidade permite a compreensão de relatórios e depoimentos pelos vários profissionais envolvidos no caso. Contudo, atualmente, existem múltiplos sistemas de classificação, propostos por diferentes autores, ou seja, nem sempre existe unanimidade na forma como as manchas são caracterizadas [18]. Apesar das divergências, os vários sistemas existentes apresentam uma estrutura de divisão semelhante, tendo em consideração os seguintes fatores: dispersão de sangue devido à aplicação de uma força; ejeção de sangue como consequência de um objeto em movimento; ejeção de sangue sob pressão; dispersão de sangue devido à força da gravidade; acumulação ou escorrência de sangue numa superfície; transferência de sangue [5][30].

Os métodos de classificação mais conhecidos foram propostos por Bevel & Gardner, em *Bloodstain Pattern Analysis with an Introduction to Crime Scene Reconstruction* (2008), e James & Kish, em *Principles of Bloodstain Pattern Analysis* (2005). O primeiro tem como critério principal a aparência geral da mancha enquanto que o segundo se foca nas características físicas das manchas, mais concretamente nos mecanismos que estiveram na sua origem [5].

Em Portugal, o sistema de classificação utilizado é o aconselhado pela IABPA, que se baseia na terminologia proposta pelo *Scientific Working Group for Bloodstain Pattern Analysis* (SWGSTAIN). A aplicação da nomenclatura apropriada depende de uma correta análise por parte dos peritos, sendo que as manchas são tipicamente distribuídas em três grandes grupos, de forma semelhante à classificação proposta por James & Kish (Figura 4). Assim sendo, as manchas podem ser definidas como passivas, quando o sangue está somente sujeito à força da gravidade e à resistência do ar. Em contraste, as manchas de salpicos são produzidas através da aplicação de uma força externa na fonte ou devido a um impacto sobre a mesma. Por último as manchas podem ser classificadas como alteradas, quando o seu aspeto indica que foram sujeitas alterações físicas ou fisiológicas, causadas por condições ambientais, ou não.



**Figura 4.** Sistema de classificação proposto por James & Kish. Adaptado de [10].

## 1.4. Testes presuntivos

Tipicamente, ao pensar em manchas de sangue atribuímos às mesmas uma coloração em tons de vermelho. Contudo, de acordo com a idade, o ambiente e o substrato onde estas se encontram, a sua cor pode apresentar inúmeras variações [22]. Por contraste, nem todas as manchas vermelhas são sangue, visto que existem múltiplos líquidos, como tintas, molhos, corantes ou mesmo água com óxido de ferro, cujo aspeto é semelhante [7]. Assim sendo, na investigação forense, de forma a poupar tempo e recursos, é crucial estabelecer quais as amostras hemáticas. De forma a solucionar o problema referido, foram criados testes presuntivos, capazes de simplificar a pesquisa e análise de manchas de sangue. Deste modo, ao encontrar uma mancha suspeita, e antes de proceder à recolha e processamento da mesma, é realizado um teste presuntivo, que aumenta o nível de confiança dos técnicos relativamente à sua natureza [3][4].

Embora o papel principal da hemoglobina seja o transporte de oxigénio às várias regiões do corpo, esta, devido à sua capacidade de mimetizar o funcionamento das peroxidases, é frequentemente utilizada para catalisar determinadas reações [18]. Os testes presuntivos, tomando proveito desta característica, utilizam a hemoglobina, seja ela humana ou animal, para catalisar a oxidação de um composto cromogéneo, induzindo uma mudança de cor [21]. A reação química que representa este fenómeno é:

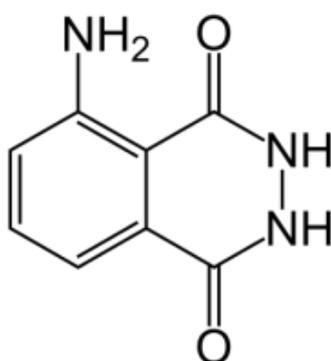


Nesta transformação, o grupo heme catalisa a decomposição do peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), o qual oxidará o reagente incolor  $RH_2$  no produto R colorido [31][32].

Os testes são, na generalidade, bastantes sensíveis, podendo detetar facilmente quantidades extremamente reduzidas de sangue [22]. No entanto, apesar da sua utilidade, estes são meramente presuntivos para a presença de sangue, o que implica que sejam realizados testes de confirmação às amostras com resultado positivo [3][4]. O grau de confiança atribuído a este método analítico está relacionado com o facto de existirem múltiplos compostos capazes de produzir falsos positivos, sobretudo agentes oxidantes e catalisadores. São exemplos de interferentes comuns as plantas e vegetais, que contêm peroxidases, e alguns metais e sais metálicos [1][2].

### 1.4.1. Luminol

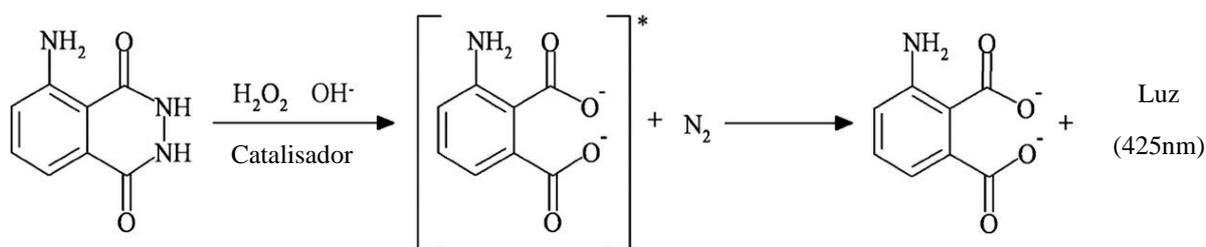
Descoberto no início do século XX e, posteriormente, descrito por Albrecht, em 1928, o luminol (5-amino-2,3-di-hidroftalazina-1,4-diona) é, provavelmente, o reagente mais conhecido no que toca à detecção de sangue (Figura 5) [1][2]. Em virtude da sua capacidade de emitir quimiluminescência, quando oxidado em meio alcalino, as suas aplicações na ciência têm-se revelado infindas. Foi introduzido na investigação forense, em grande parte, devido ao estudo realizado por Specht, em 1937, onde o mesmo testou a possibilidade de este ser utilizado para a identificação de sangue em diferentes substratos [35].



**Figura 5.** Estrutura molecular do luminol.

O termo quimiluminescência refere-se à emissão de radiação eletromagnética quando ocorre uma reação química. O fenómeno ocorre em circunstâncias onde um dos intermediários ou produtos de reação é formado num estado eletronicamente excitado, podendo este, de seguida, regressar ao estado fundamental com emissão de radiação, ou transferir a sua energia para outra molécula, passando esta a emitir radiação [2][4].

O luminol pertence à classe das acil-hidrazinas e é tipicamente sintetizado a partir de ácido de 3-nitroftálico [37]. Para que o fenómeno de quimiluminescência seja produzido é necessário adicionar ao reagente um agente oxidante, em meio alcalino. Nas condições referidas e na presença de sangue, a atividade catalítica do grupo heme acelera a oxidação do luminol, formando-se um intermediário excitado (3-aminoftalato) que, ao regressar ao estado fundamental, emite uma radiação azul característica (Figura 6) [21][38]. Apesar da sua popularidade, este composto não é específico para sangue humano e o seu funcionamento é sensível a fatores como pH, luz e presença de oxidantes fortes [37].



**Figura 6.** Reação química do teste presuntivo luminol.

A técnica de detecção de sangue do luminol não utiliza reagentes cancerígenos ou tóxicos, daí permanecer uma prática comum por tantos anos [39]. A sua utilização é aconselhada, sobretudo, quando há a necessidade de analisar grandes áreas, ou quando existem vestígios hemáticos antigos [22][40]. Estudos onde foi avaliado o efeito do fator idade no desempenho do teste provaram que amostras antigas dão origem a quimiluminescência mais intensa e duradoura [35][21]. Para além disso, este é frequentemente estabelecido como o teste mais sensível, dado que é capaz de detetar sangue com um fator de diluição de 1:5 000 000, embora haja uma diminuição significativa da quimiluminescência em amostras extremamente diluídas [39][41][42]. Assim sendo, o luminol é também bastante útil para a detecção de sangue em locais do crime limpos, superfícies pintadas ou roupas lavadas [21]. Tendo em conta a sua capacidade de emissão de radiação, este método pode ainda ser utilizado para realce de manchas hemáticas em superfícies coloridas ou padronizadas, que dificultem a visualização das mesmas a olho nu [43].

A utilização do teste e interpretação correta dos seus resultados estão condicionadas pelo facto de este exigir um ambiente totalmente escurecido para a visualização da radiação emitida. Esta forte desvantagem implica que se torne inapropriado para determinados locais do crime exteriores ou para pesquisas realizadas durante o dia [11][12]. Para além disso, o reagente é aplicado diretamente na mancha e a reação dura aproximadamente 1 minuto, ou seja, em materiais não absorventes há risco de destruição do padrão e, no geral, existe pouco tempo para a documentação fotográfica do resultado [21].

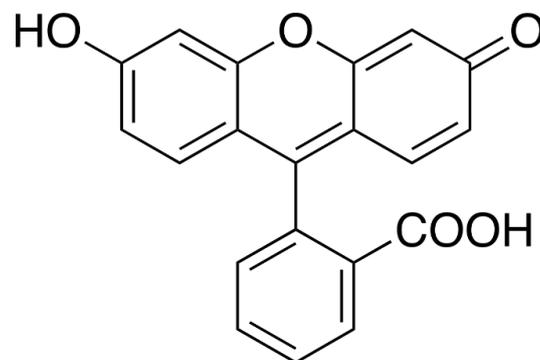
Existe uma ampla gama de compostos com capacidade de reação com o luminol, dando origem a quimiluminescência. São interferentes comuns alguns metais e sais metálicos, como sulfato de cobre ou sulfato de ferro, hemoglobina animal, peroxidases vegetais e agentes oxidantes, como hipoclorito de sódio [3][5][12]. Contudo, os derivados de hipoclorito de sódio,

por exemplo, fornecem uma reação mais intensa e brilhante do que o sangue, o que permite aos técnicos mais experientes diferenciar as reações [41]. Acredita-se que este tipo de diferenças está associado à absorção de radiação pelas espécies em solução, o que produz um efeito de filtragem interno [35].

Devido à importância atual das análises de ADN, foram realizados múltiplos estudos para avaliar o efeito deste teste na obtenção de material genético. Os resultados obtidos são concordantes entre os vários autores, isto é, não se verifica uma degradação significativa do ADN [21][12][14]. Deste modo, dependendo da quantidade de material biológico disponível, a degradação causada pelo luminol tem uma probabilidade muito reduzida de impedir a obtenção de perfis de ADN [40].

### 1.4.2. Fluoresceína

A fluoresceína (Figura 7) é frequentemente utilizada como substituta do luminol, sendo que ambos emitem radiação na presença de hemoglobina e de um oxidante. Ainda assim, em contraste com o luminol, a fluoresceína emite radiação por fluorescência e não quimiluminescência [9].

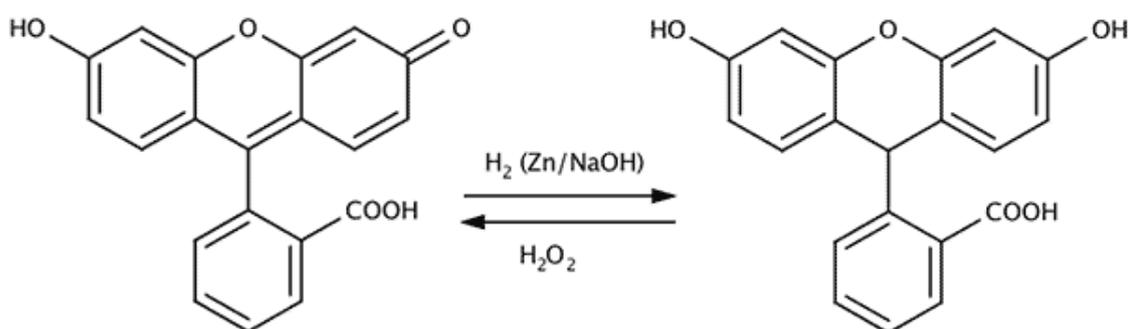


**Figura 7.** Estrutura molecular da fluoresceína.

Esta surgiu no contexto forense através dos estudos de Cheeseman, alguns nos anos 90, altura em que o luminol começou a constar nas listas MSDS como “potencialmente cancerígeno” [45]. No entanto, até então esta era utilizada para fins médicos, nomeadamente para estudar o fluxo sanguíneo em determinadas zonas do corpo, sendo injetada diretamente nos vasos próximos da zona investigada. Ainda neste enquadramento, serviu de agente tópico capaz de auxiliar o diagnóstico de úlceras, infeções e abrasões da córnea [46].

Por outro lado, foi utilizada como marcador de moléculas de interesse na eletroforese capilar e como marcador de *primers* no sequenciamento de ADN [47].

A aplicação de fluoresceína numa zona de interesse requer que esta se encontre na sua forma reduzida, a qual é obtida através de uma mistura com uma solução alcalina onde é adicionado zinco. Quando em contacto com sangue e após a adição de peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), a atividade catalítica do grupo heme permite a oxidação da molécula de fluoresceína (Figura 8) [48]. Nestas circunstâncias, a fluoresceína passa a emitir fluorescência (cor verde/amarela) quando excitada por uma fonte de luz com um comprimento de onda entre 420 e 485nm (luz azul, UV) [46][49]. Deste modo, para que seja possível visualizar as manchas, devem ser utilizados óculos de proteção laranja, os quais bloqueiam a luz azul. O seu espectro de emissão é constituído por duas bandas a 425 e a 520nm, sendo esta última específica para a molécula em questão [48]. Estudos indicam que a fluorescência e absorvância da fluoresceína dependem do pH, sendo ambos os processos mais eficientes a pH 8 [47].



**Figura 8.** Reação química do teste presuntivo de fluoresceína.

As aplicações preferenciais da fluoresceína são sobretudo em locais do crime antigos, locais recentes com sinais de limpeza como método de ocultação de provas, situações em que devido às cores do substrato é difícil identificar sangue, manchas diluídas e invisíveis a olho nu e veículos ou roupas que foram lavados após o crime [46]. Adicionalmente, esta permite realizar pesquisa de sangue em grandes áreas. Quando comparada com o luminol, a fluoresceína apresenta, entre outras, as vantagens de não exigir um ambiente totalmente escurecido para o seu normal funcionamento e da emissão de radiação possuir uma persistência relativamente superior, facilitando os processos de observação e aquisição de imagem [48].

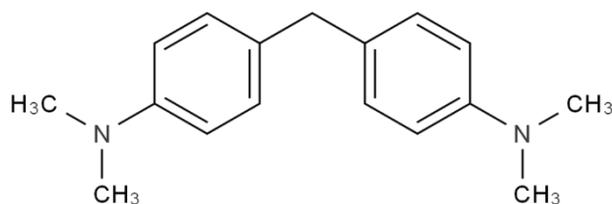
Contudo, esta técnica tem algumas desvantagens, nomeadamente o facto de a molécula de fluoresceína ser bastante instável na forma reduzida, ou seja, oxida rápido e naturalmente devido ao oxigénio presente no ar, o que provoca interferências por fluorescência de *background*. A aplicação dos reagentes pode ainda diluir a amostra, o que em superfícies verticais pode implicar a destruição do padrão de sangue [49]. Para além disso, alguns substratos têm fluorescência inerente, dificultando a análise. Todavia, esta nem sempre tem a mesma intensidade e padrão que a fluorescência alvo, o que permitirá a um técnico experiente distingui-las [46].

Tal como para os restantes testes, uma reação positiva nem sempre significa a presença de sangue. Isto é, materiais de limpeza, urina humana ou de determinados animais (com ou sem vestígios de sangue), peroxidases de plantas, determinados metais, como ferro e cobre, e alguns agentes oxidantes fortes originam falsos positivos [2][7].

Sendo a análise de ADN um procedimento cada vez mais frequente no contexto forense, é crucial garantir que os reagentes utilizados na identificação de sangue não afetam a integridade da amostra para posteriores estudos. No que toca à fluoresceína, a bibliografia, de um modo geral, indica que esta não degrada o material genético, nem interfere com as análises de ADN realizadas. Assim sendo, é possível obter perfis genéticos desde que exista uma quantidade e qualidade suficiente de amostra de sangue, a qual pode ser extraída de inúmeros substratos sem que os mesmos prejudiquem o procedimento [51][40].

### 1.4.3. Tetrabase

O tetrabase (Figura 9) é um teste presuntivo relativamente recente, que apenas se tornou uma prática comum no início do século XXI. Ainda assim, este tem sido utilizado predominantemente nos Países Baixos. A descoberta das suas potencialidades deu-se em 1997 com um estudo realizado por *Lomholt e Keiding*, onde os mesmos estabelecem o teste tetrabase como um eficaz substituto da benzidina e da ortotolidina, para identificação de hemoglobina na urina. Adicionalmente, foi sugerido pelos autores que existe proporcionalidade entre a concentração de hemoglobina nas amostras e o tempo de extinção da reação [52].



**Figura 9.** Estrutura molecular do N, N'-tetrametil-diaminodifenilmetano.

No campo da detecção de sangue, o teste com tetrabase comporta-se como a maioria dos testes presuntivos, visto que se baseia numa reação de oxidação-redução onde a hemoglobina atua como catalisador, de forma semelhante às peroxidases [53]. O teste é realizado em dois passos sendo o primeiro a adição do reagente, *N,N'*-tetrametil-diaminodifenilmetano, e o segundo a adição de peróxido de bário, à amostra em análise [54]. Na presença de hemoglobina, ocorre a oxidação do composto e há a formação um produto de cor azul [55][54].

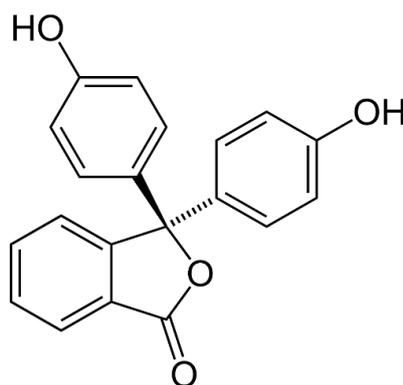
Esta técnica tem um custo reduzido e as soluções utilizadas são facilmente produzidas em laboratório. Para além disso, o manuseamento do teste e a interpretação dos seus resultados são relativamente simples, tendo em consideração que a realização em duas fases permite uma fácil identificação de determinados falsos positivos [55]. Ainda neste contexto, é relevante referir que podem originar reações positivas substâncias oxidantes, agentes de limpeza, vegetais ou mesmo alguns fungos e bactérias [53][54].

Além de não ser específico para sangue humano, o tetrabase apresenta uma sensibilidade reduzida comparativamente a alguns dos testes utilizados atualmente, o que pode representar uma das razões pelo qual não é utilizado na maioria dos países [4][5]. No entanto, estas não são as suas únicas limitações, visto que o mesmo se mostrou ineficaz quando ocorre a lavagem dos vestígios de sangue, o que representa um cenário relativamente comum [55].

A bibliografia não é clara quanto à possibilidade de obter um perfil de ADN após a realização do teste tetrabase sobre uma mancha de interesse, ou seja não é conhecido o seu efeito sobre o material genético [54].

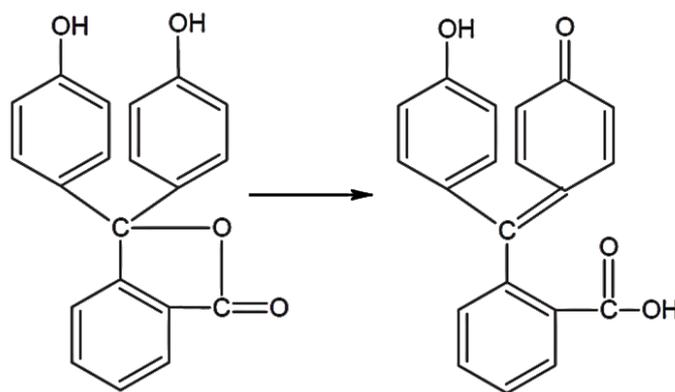
#### 1.4.4. Kastle-Meyer

O teste de Kastle-Meyer (KM), amplamente utilizado a nível mundial, tem como reagente a fenolftaleína (Figura 10), que é comumente utilizada como um indicador de ácido-base [11][21]. Foi desenvolvido por *Kastle e Shedd* em 1901 e, posteriormente, adaptado por *Meyer*, em 1903, mas apenas após vários anos de aperfeiçoamento passou a ser utilizado para fins médico-legais e forenses [57][58][59].



**Figura 10.** Estrutura molecular da fenolftaleína.

Este teste catalítico, tal como os restantes, baseia-se no facto de, na presença de sangue, a fenolftaleína sofrer uma oxidação, passando a solução a exibir uma coloração em tons de rosa [59]. Nesta reação, inicialmente, a fenolftaleína encontra-se na sua forma reduzida e incolor, numa solução alcalina, e após ocorrer a decomposição da molécula de peróxido de hidrogénio, por parte do grupo heme da hemoglobina, esta passa ao estado oxidado, uma mudança que é observável através da alteração de cor (Figura 11) [21][38]. O tempo de obtenção do resultado do teste é um fator importante para a tomada de decisões, isto é, se a mancha analisada for de facto sangue, é espectável que a reação ocorra num curto período de tempo, idealmente entre 10 a 15 segundos após a aplicação dos reagentes, o que implica que reações mais demoradas sejam estabelecidas como falsos positivos [11]. O teste é, normalmente, realizado em três passos, sendo o primeiro a adição de etanol, cujo papel é aumentar a sensibilidade do mesmo.



**Figura 11.** Reação química do teste presuntivo de Kastle-Meyer.

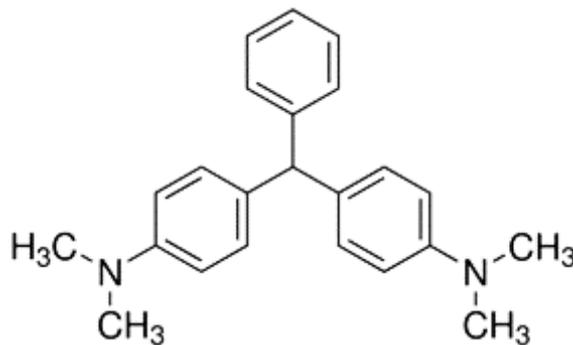
O teste de Kastle-Meyer não só não é específico para sangue humano, como também tem um desempenho fortemente influenciado por fatores como a diluição, a lavagem, a queima ou a decomposição da amostra [60][61]. Alguns dos compostos que ocasionam falsos positivos comuns são plantas, agentes de limpeza, metais e sais metálicos, como derivados de ferro [21][42][62]. Adicionalmente, um estudo realizado por *Vennemenn e Scott* indica que, na presença de ácido ascórbico, um antioxidante presente em algumas plantas e vegetais, o teste não funciona [62].

Não existe conformidade entre os resultados obtidos por vários autores relativamente à sensibilidade, embora o resultado mais frequente estabeleça como limite a diluição de 1:10 000 [60][63][64][39]. Por outro lado, o teste é capaz de obter resultados positivos em manchas relativamente antigas, sendo que a coloração da mancha pode, por vezes, dificultar a interpretação dos resultados [21].

No que diz respeito ao material genético obtido através das amostras analisadas com o referido teste, é concordante, entre a bibliografia, que existe uma perda significativa de informação, isto é, ocorre a degradação do ADN com a realização do teste. Todavia, quando a amostra é relativamente abundante, é possível realizar a extração de informação genética e obter perfis de ADN [60][61][42][65].

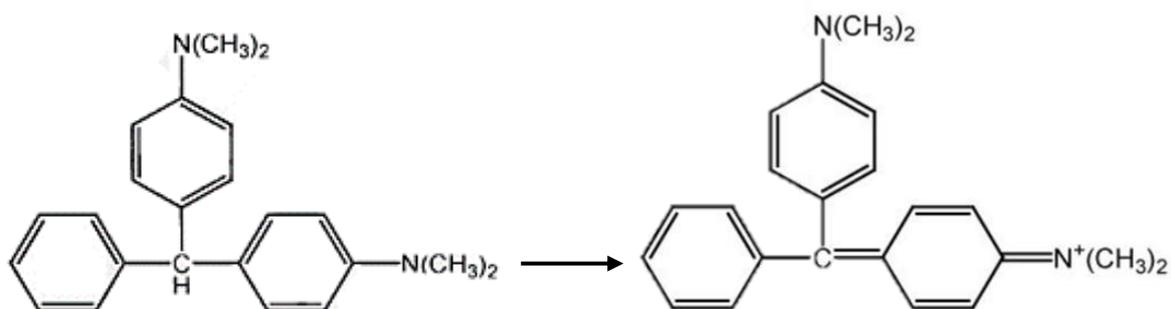
### 1.4.5. Leucomalachite Green

Verde de leucomalaquite (Figura 12) é o nome atribuído à forma leuco (incolor) e reduzida do verde de malaquite, o qual integra o grupo dos corantes triarilmetano [66]. Esta foi uma das moléculas estudadas por *Adler and Adler* (1904) que, devido à sua eficiência na detecção de sangue, passou a ser de uso comum na área forense, sendo ainda hoje um dos reagentes de eleição [57]. A sua utilização na serologia é bastante frequente devido à sua capacidade de identificação não só de sangue, mas também de vestígios biológicos, como urina ou saliva [66].



**Figura 12.** Estrutura molecular de verde de leucomalaquite.

Tal como a maioria dos testes presuntivos de sangue, o teste *leucomalachite green* (LMG) é um método colorimétrico que se baseia numa reação de oxidação-redução [32]. A sua preparação requer um leve aquecimento do verde de malaquite em condições ácidas até que a solução apresente um aspeto incolor, deixando as moléculas de reagente na sua forma reduzida [21]. Para que a reação desejada ocorra é necessário a adição de um agente oxidante, como o peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ), e a presença de um catalisador, que no presente caso será o grupo heme das moléculas de hemoglobina (Figura 13) [67][68]. Um resultado positivo é indicado pelo aparecimento de uma cor verde/azul num curto período de tempo [42]. É também importante referir que o teste é sensível ao ar e à luz, podendo o reagente oxidar naturalmente, o que inviabiliza os resultados obtidos se o mesmo não for corretamente manuseado [43][66]. Para além disso, uma alteração de cor antes da adição de  $H_2O_2$ , indica a presença de um oxidante químico e o resultado do teste deve ser considerado inconclusivo [67].



**Figura 13.** Reação química do teste presuntivo LMG.

Apesar de não ser específico para a espécie humana, o teste LMG é considerado um dos mais específicos para detecção de sangue, visto que existem poucos compostos capazes de produzir falsos positivos e que a maioria dos mesmos reage antes da adição de  $H_2O_2$  ou de forma diferente do sangue, facilitando a distinção [42][69][70]. Por outro lado, este é pouco sensível relativamente aos restantes (1:1000 a 1:10000), sendo por isso menos adequado para situações em que a amostra se encontra diluída ou em situação limite [39][63].

A sua utilização é bastante eficaz em manchas de sangue latentes e, tal como o luminol, é especialmente indicado para situações em que há suspeitas de tentativa de limpeza ou para manchas de difícil visualização [21]. Contudo, tem diversas vantagens sobre o mesmo, nomeadamente o facto de possuir uma maior longevidade de reação e de não necessitar de um ambiente escurecido [71]. Atualmente, para além do referido, esta técnica tem sido utilizada no realce/reavivamento de impressões digitais em sangue, provando-se especialmente eficaz em superfícies porosas [66].

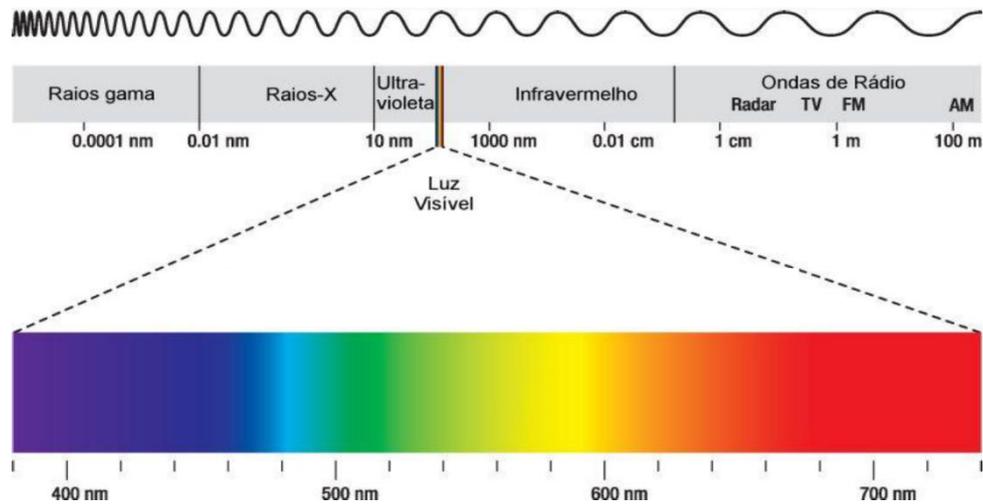
Vários estudos avaliaram os efeitos do teste nas análises de ADN, sendo comum a conclusão de que o mesmo pode degradar o material genético impedindo a obtenção de perfis [42][65]. Porém, *Tsukada* (2011) indica que a neutralização da solução de LMG com o tampão Tris-HCl (pH 8.0) pode representar uma solução para o problema anteriormente mencionado, considerando que a causa do mesmo é o pH ácido da solução, o qual impede o normal funcionamento da proteinase K, ou seja, impede a extração de ADN das células [71].

## 1.5. Fontes de luz

Os vestígios latentes são particularmente difíceis de encontrar com recurso à luz branca natural [72]. Deste modo, a utilização de uma luz branca de elevada intensidade, para uma pesquisa inicial, pode ser um forte auxílio para a detecção dos mesmos. Ainda assim, de acordo com as características do vestígio e do substrato onde o mesmo se encontra, este pode ser impercetível [73].

O sangue pode depositar-se em qualquer tipo de superfície, seja esta porosa ou não porosa [49]. Tipicamente, em fundos claros a visualização de manchas de sangue não é problemática, contudo, quando estas se encontram em superfícies escuras a sua identificação pode tornar-se bastante complexa. Uma das principais causas para que tal aconteça é a oxidação da oxihemoglobina em metemoglobina, que leva à formação de hemicromos. Este processo leva a que o sangue adquira uma coloração escura, em tons de castanho, que dificulta a sua detecção em determinados substratos [74]. Alguns testes presuntivos, tais como o luminol e a fluoresceína, podem ser utilizados para localizar vestígios hemáticos, porém a sua aplicação pode alterar a morfologia das manchas impedindo que sejam realizadas análises de BPA [4][5]. Em alternativa, são utilizados meios não destrutivos, nomeadamente, irradiação com fontes de luz de comprimentos de onda apropriados [72].

A detecção de sangue com recurso a fontes de luz assenta no princípio de que a matéria interage com as ondas eletromagnéticas dando origem a três fenómenos distintos: absorção, reflexão ou transmissão (Figura 14) [76]. O sangue, ao contrário de outros líquidos corporais, não apresenta uma fluorescência significativa, no entanto, absorve radiação entre 300 e 900nm, o que inclui radiação ultravioleta (UV), visível (VIS) e no infravermelho (IV) [73]. Deste modo, numa situação normal, ao incidir uma fonte de luz, com um comprimento de onda compreendido no intervalo referido, os vestígios hemáticos surgirão como uma mancha escura num fundo mais claro [49]. De acordo com a literatura, o pico máximo de absorção do sangue é a 415nm, o que corresponde a radiação violeta [77]. Contudo, em determinados substratos o contraste produzido por esta radiação pode não ser suficiente para a detecção das manchas, o que implica que sejam utilizados vários comprimentos de onda durante a pesquisa de sangue.



**Figura 14.** Espectro eletromagnético.

Tal como mencionado anteriormente, a luz branca é bastante proficiente no que toca à pesquisa geral de vestígios. Ainda assim, em determinadas circunstâncias, é importante realizar uma análise ao local com recurso a fontes de luz, acompanhadas de filtros adequados. Relativamente ao sangue, inicialmente é utilizada uma fonte de luz azul de aproximadamente 450nm, juntamente com óculos de proteção laranja. De modo a aumentar o contraste em superfícies luminescentes ou levemente coloridas, deve recorrer-se a uma fonte de luz violeta de cerca de 415nm, junto com óculos amarelos. Por outro lado, quando se pretende detetar vestígios hemáticos em substratos absorventes e escuros, deve ser utilizada luz no infravermelho, entre 700 a 900nm, junto com o respetivo filtro.

## 1.6. Objetivo

A utilização de testes presuntivos em local do crime tornou-se uma prática indispensável, com vista a poupar tempo e recursos e a facilitar a análise e recolha de vestígios. Até aos dias que correm, foram desenvolvidos múltiplos testes capazes de detetar sangue com algum grau de confiança. Estes, ainda que utilizados para o mesmo fim, possuem características que os tornam mais, ou menos, adequados para determinadas circunstâncias. Assim, tendo por base o estado da arte, pretende-se estabelecer os métodos mais indicados para situações recorrentes em local do crime, mimetizando algumas das alterações a que o sangue pode estar sujeito após se depositar sobre uma superfície.

No presente estudo são avaliadas a sensibilidade e especificidade dos testes, assim como a influência da integridade da amostra nos resultados dos mesmos. A escolha dos testes que foram alvo de análise teve em consideração a segurança da sua aplicação e o facto de os mesmos serem utilizados atualmente por algumas entidades, sendo, portanto, excluídos testes que entraram em desuso. Por outro lado, os substratos foram escolhidos de modo a englobar no estudo superfícies que são alvo comum de pesquisa de vestígios hemáticos.

De modo a compreender a importância do sangue, para fins de análise de padrões de manchas de sangue, foi desenvolvido um trabalho adicional onde foram estudados e classificados diversos padrões em meio de simulação, constando o relatório elaborado em anexo (Anexo I). Adicionalmente, para aplicar os conhecimentos adquiridos relativos à área de biologia forense, foram realizadas extrações de perfis de ADN em amostras de sangue aquecidas a temperaturas elevadas.

O objetivo eminente é a produção de um trabalho que possa servir de base no meio forense, em particular no campo da deteção de sangue, no qual se estabelece a utilidade dos vários testes e métodos em análise, definindo qual ou quais os mais eficazes nas condições avaliadas.



# Capítulo II

## Materiais e Métodos



## 2.1. Reagentes e Amostras

As amostras de sangue utilizadas para as diferentes análises foram obtidas de um suíno e armazenadas com EDTA a 2% (v/v), a uma temperatura de  $-19^{\circ}\text{C}$ , até ao momento da sua aplicação nos substratos. O sangue de suíno foi utilizado para os estudos devido à facilidade de obtenção e ao elevado grau de semelhança com o sangue humano.

Na Tabela 1 são apresentados os reagentes necessários para a preparação das soluções utilizadas nos testes presuntivos.

**Tabela 1.** Reagentes utilizados na preparação dos testes presuntivos.

Composto	Fabricante	Fórmula Molecular	Pureza
Fenolftaleína	Panreac	$\text{C}_{20}\text{H}_{14}\text{O}_4$	99%
Hidróxido de Sódio	Merck	$\text{NaOH}$	99%
Zinco em pó	Himedia	$\text{Zn}$	99.9%
Verde de Leucomalaquite	Sigma-Aldrich	$\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_2$	-
Ácido Acético Glacial	Merck	$\text{CH}_3\text{COOH}$	99.8-100 %
Fluoresceína Sódica	Sigma	$\text{C}_{20}\text{H}_{10}\text{Na}_2\text{O}_5$	-
Tetrabase	Fluka	$\text{C}_{17}\text{H}_{22}\text{N}_2$	90%
Hidróxido de Potássio	Merck	$\text{KOH}$	85%
Peróxido de Bário	Merck	$\text{BaO}_2$	-
Perborato de Sódio	Aldrich	$\text{NaBO}_3$	-

## 2.2. Preparação das soluções utilizadas nos testes presuntivos

Dos testes presuntivos escolhidos para o estudo apenas o luminol foi utilizado na sua versão comercial, cujo fabricante é BVDA. As soluções necessárias para os testes Kastle-Meyer e *leucomalachite green* foram preparadas de acordo com os protocolos estabelecidos pelo

*National Forensic Science Technology Center* [78]. Para o teste KM foi inicialmente produzida uma solução stock dissolvendo 2g de fenolftaleína e 20g de hidróxido de potássio em 100ml de água destilada. De seguida, a solução foi aquecida e agitada ligeiramente por 1h, com 20g de zinco em pó, até perder toda a cor. Por fim, esta foi decantada para um recipiente contendo zinco granulado. A solução de trabalho foi preparada através da diluição de 2ml da solução stock em 10ml de água destilada e 2ml de etanol. Quanto ao teste LMG, o protocolo estabeleceu a preparação de uma solução através da dissolução de 0.25g de verde de leucomalaquite em 100ml de ácido acético glacial e 150ml de água destilada. Tal como anteriormente, esta mistura foi aquecida e agitada, gentilmente, na presença de 5g de zinco em pó, até que a solução ficasse incolor. Esta foi, posteriormente, decantada e armazenada com zinco granulado, para preservar a forma reduzida. Por sua vez, para o teste de fluoresceína foram preparadas as soluções de acordo com o procedimento proposto por *Cheeseman et al.* [45]. Assim, inicialmente, foi preparada uma solução stock de hidróxido de sódio a 10%, através da dissolução de 10g de hidróxido de sódio em 100ml de água destilada. Seguidamente, foi dissolvido 1g de fluoresceína na solução descrita anteriormente. À mistura foram adicionadas 10g de zinco em pó e a solução foi agitada e aquecida suavemente até perder a maioria da sua cor. Mais uma vez, a solução foi decantada e armazenada com zinco granulado. O protocolo utilizado para o teste tetrabase foi fornecido pela agência *Bundeskriminalamt*, também conhecida como BKA, e estabelece a preparação de duas soluções distintas. A primeira solução foi preparada dissolvendo 0.5g de tetrabase (N,N'-tetrametil-diaminodifenilmetano) em 10mL de ácido acético e perfazendo com água destilada até aos 100mL. Quanto à segunda solução, esta consistiu na dissolução de 5g de peróxido de bário numa solução aquosa de ácido acético a 10% (v/v). A preparação das soluções teve em consideração os prazos de validade referidos nos respetivos protocolos e, portanto, soluções de utilização rápida foram preparadas imediatamente antes de cada análise.

### **2.3. Registo fotográfico e fonte de luz forense**

O registo fotográfico dos vários procedimentos e resultados foi realizado com recurso a uma câmara Canon EOS 6D Mark II. As fontes de luz utilizadas pertencem ao kit Crime-lite 82s, da Foster and Freeman. Para a análise foram utilizadas apenas a luz infravermelha (800-900nm) e azul (420-470nm).

## 2.4. Método de utilização dos testes presuntivos

Relativamente ao método de aplicação, os testes presuntivos podem ser divididos em dois grupos distintos, nomeadamente de aplicação direta no substrato ou de raspagem. Neste sentido, o luminol e a fluoresceína enquadram-se nos testes de aplicação direta, dado que são realizados diretamente no substrato. Por outro lado, os testes Kastle-Meyer, *leucomalachite green* e tetrabase são efetuados recorrendo à raspagem da amostra com papel de filtro dobrado, sendo os reagentes posteriormente aplicados sobre o mesmo.

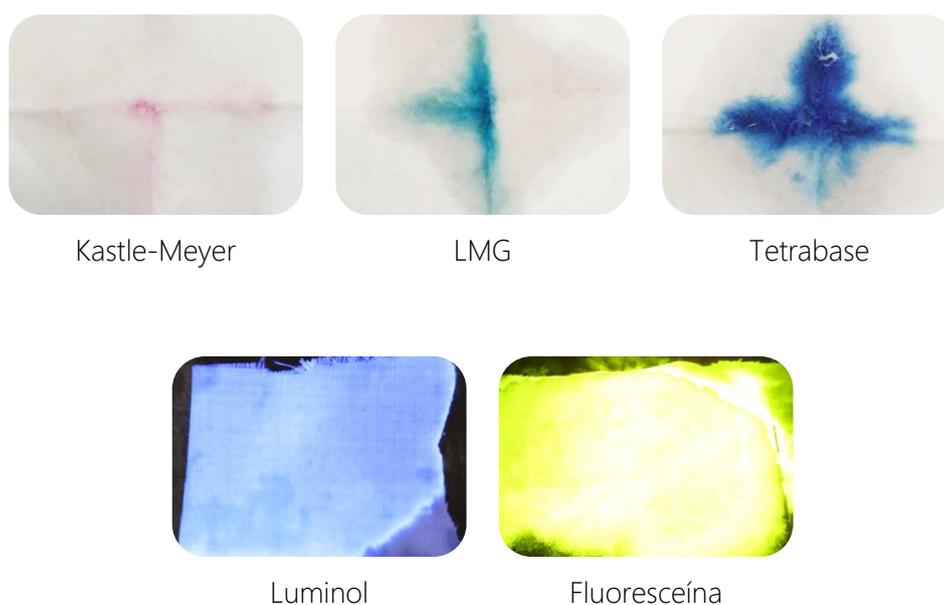
Para além do parâmetro anterior, os testes utilizados divergem ainda no processo de utilização, dado que podem apresentar diversas fases (Tabela 2).

**Tabela 2.** Método de utilização dos diversos testes presuntivos.

Teste presuntivo	Método de utilização
Luminol	Aplicação do reagente em spray, diretamente sobre a mancha ou região de interesse, em ambiente escurecido.
Fluoresceína	Aplicar o reagente de fluoresceína diretamente sobre a mancha ou região de interesse, seguido da aplicação do agente oxidante, peróxido de hidrogénio. Simultaneamente incidir sobre a região uma fonte de luz com comprimento de onda entre 420 e 485nm, em ambiente parcialmente escurecido.
Kastle-Meyer	Com recurso a papel de filtro, raspar a mancha ou zona de interesse. Sobre a região de raspagem do papel de filtro aplicar uma gota de etanol. Seguidamente, adicionar uma gota do reagente de fenolftaleína, esperar alguns segundos e adicionar o agente oxidante, peróxido de hidrogénio.
Leucomalachite Green	Com recurso a papel de filtro, raspar a mancha ou zona de interesse. Sobre a região de raspagem do papel de filtro aplicar uma gota do reagente de verde de leucomalaquite. Após alguns segundos adicionar o agente oxidante, peróxido de hidrogénio.
Tetrabase	Com recurso a papel de filtro, raspar a mancha ou zona de interesse. Sobre a região de raspagem do papel de filtro aplicar uma gota do reagente de tetrabase. Após alguns segundos adicionar a solução oxidante de peróxido de bário.

## 2.5. Critérios de aceitação dos testes

Antes de realizar os estudos previamente definidos, é importante estabelecer critérios para a aceitação dos resultados obtidos para os vários testes, isto é, o que será considerado um resultado positivo. Tal como referido ao longo do capítulo anterior, uma alteração colorimétrica nem sempre é indicativa da presença de sangue. Assim, tendo em conta o método de utilização de cada teste, foram definidas algumas diretrizes para uma interpretação adequada. No que diz respeito aos testes LMG, fluoresceína e tetrabase, os critérios são relativamente semelhantes, designadamente, um resultado é dado como positivo quando é adicionado o reagente sobre a zona de interesse, não se verificando qualquer alteração de cor, e após cerca de 10 segundos é adicionado o agente oxidante que deverá provocar uma reação praticamente imediata. Do mesmo modo, aquando da realização do teste KM deve decorrer um período de cerca de 10 segundos entre as três etapas que o constituem, não devendo existir qualquer reação antes da adição de  $H_2O_2$ , mas sim poucos segundos após. Assim sendo, qualquer reação que ocorra antes da adição do agente oxidante é estabelecida como um falso positivo, tal como as reações mais demoradas, dado que na presença de oxigénio os reagentes oxidarão naturalmente após alguns minutos. Relativamente ao luminol, uma reação positiva deve ocorrer imediatamente após a aplicação do reagente sobre a mancha de sangue. Seguidamente, são apresentados os ensaios realizados como controlo, com sangue total, para que fosse conhecido o aspeto de uma reação positiva (Figura 15).



**Figura 15.** Exemplos de reações positivas dos vários testes, realizados com amostras de sangue total.

## 2.6. Sensibilidade dos testes presuntivos

De modo a estabelecer a sensibilidade dos testes presuntivos referidos foram realizadas múltiplas diluições da amostra de sangue total com água destilada, com a finalidade de simular situações limite provocadas, por exemplo, pela chuva, particularmente em ambientes exteriores, ou pela limpeza. Os substratos em estudo foram o tecido 100% algodão e o cimento. Considerando o manuseamento adequado dos vários testes e a necessidade de repetição dos mesmos foram preparadas 39 parcelas de cada substrato, com as medidas 5x5cm. Com base no estado da arte e no método de análise escolhido, as diluições preparadas variaram desde 1/1 a 1/100 000 (Tabela 3).

**Tabela 3.** Diluições utilizadas para a determinação da sensibilidade.

		Sangue total (mL)	Volume final (mL)
Diluições	1/1	50	50
	1/10	5	50
	1/100	0,5	50
	1/200	0,25	50
	1/500	0,1 (100 µL)	50
	1/1 000	0,05 (50 µL)	50
	1/2 000	0,025 (25 µL)	50
	1/5 000	0,01 (10 µL)	50
	1/10 000	0,005 (5 µL)	50
	1/20 000	0,0025 (2,5 µL)	50
	1/50 000	0,002 (2 µL)	100
	1/100 000	0,002 (2 µL)	200

Após homogeneizar as diversas amostras, foram aplicadas duas a três gotas das mesmas sobre os substratos. As amostras, devidamente identificadas, foram deixadas a secar por 24h, período após o qual se iniciou a realização dos testes presuntivos. A cada ensaio estiveram associadas três repetições, sendo os resultados dos mesmos “positivos” ou “negativos”, de acordo com a presença ou ausência de reação. A sensibilidade atribuída a cada teste corresponde ao último fator de diluição para o qual se verificaram três resultados positivos.

Os controlos do presente estudo consistiram em amostras de substrato sem sangue e com sangue não diluído.

## 2.7. Efeito das lavagens em materiais têxteis

O principal método de ocultação de vestígios hemáticos em têxteis é a lavagem e, como tal, é de extrema importância avaliar os seus efeitos na resposta dos testes presuntivos. Assim sendo, no presente estudo foram lavados dois têxteis diferentes, nomeadamente, tecido 100% algodão e ganga, com diversas condições de lavagem, procurando estabelecer quais os fatores com maior influência no resultado dos testes.

Inicialmente, foram obtidos 48 pedaços de cada substrato, com as medidas 5x5cm, e colocado sobre os mesmos o sangue. Depois de um período de secagem de 24h, cada pedaço foi devidamente identificado com as condições de lavagem a que seria submetido, as quais constam na Tabela 4. Imediatamente após este processo foram iniciadas as lavagens dos tecidos. Para a lavagem e secagem mecânica das amostras foram utilizados aparelhos domésticos comuns, ajustando-se o programa às condições pretendidas. As lavagens mecânicas tiveram uma duração de 45 minutos. Foi utilizado um só detergente para os vários ensaios que o requereram, designadamente *Skip* em pó, sendo utilizadas 50g do mesmo para cada lavagem.

Dando por terminada a preparação das amostras, sucedeu-se a realização dos testes presuntivos sobre as manchas ou regiões de interesse, novamente, com um total de três repetições para cada ensaio. Os resultados foram estabelecidos como “positivo” ou “negativo”, de acordo com a presença ou ausência de reação, sendo que para se considerar que um teste funciona numa determinada condição de lavagem, o mesmo teve de ser positivo nas três repetições realizadas. Para controlo foram utilizadas amostras de substrato sem sangue lavadas nas condições anteriormente definidas e amostras com sangue não lavadas.

**Tabela 4.** Condições de lavagem para os diferentes têxteis.

Condições de Lavagem	Lavagem à mão ( $\approx 20-30^{\circ}\text{C}$ )		Lavagem na máquina de lavar			
	Com detergente	Sem detergente	A "frio" ( $\approx 20^{\circ}\text{C}$ )		A "quente" ( $\approx 60^{\circ}\text{C}$ )	
			Com detergente	Sem detergente	Com detergente	Sem detergente
	Secagem à Temperatura Ambiente / na Máquina de Secar					

## 2.8. Efeito das temperaturas elevadas na integridade das amostras

De forma a avaliar a estabilidade dos vestígios hemáticos que sofrem a ação do calor, foram preparadas e aquecidas, a diferentes temperaturas, múltiplas amostras de sangue em diferentes substratos. O foco deste estudo será, essencialmente, apreender se o sangue existente em cenários de incêndio pode estar comprometido ao ponto de provocar uma reação negativa com os testes presuntivos. O alvo serão apenas vestígios que não sofrem a ação direta da chama, mas do calor que advém da mesma, dado que em situações reais, vestígios atingidos pelas chamas ficam parcial ou completamente destruídos.

Os substratos escolhidos para a presente análise foram cimento, madeira, azulejo vidrado e tecido 100% algodão, sendo preparados 24 fragmentos de cada material, com as medidas 5x5cm. O sangue foi aplicado nos substratos e deixado a secar, à temperatura ambiente, por um período de 24h. Posteriormente, as amostras foram submetidas a temperaturas entre os 100 e os 400°C, durante um período de 5 minutos (Tabela 5). Para o efeito foi utilizada uma mufla *Carbolite-Gero Elf*, cuja amplitude de temperaturas varia entre os 30 e os 3000°C. A determinação das temperaturas alvo de estudo teve em atenção o facto de o sangue iniciar o processo de carbonização algures entre os 400 e os 600°C, dependendo do substrato onde se encontra. Por outro lado, o tempo foi estabelecido considerando que, em casos reais, após um determinado período as chamas progridem causando a destruição completa dos vestígios ou regridem, verificando-se uma descida nas temperaturas. Para além disso, nestas circunstâncias, as temperaturas não são constantes pelo que, submeter uma amostra à mesma temperatura durante muito tempo não seria representativo da realidade.

**Tabela 5.** Temperaturas a que cada substrato foi submetido, durante um período de 5 minutos.

Temperaturas (°C)					
100	150	200	250	300	400

Após a preparação das amostras nas condições suprarreferidas, foram realizados os testes presuntivos. Tal como no estudo anterior, a cada ensaio estiveram associadas três repetições, sendo os resultados dos mesmos “positivos” ou “negativos”, de acordo com a presença ou ausência de reação. Os controlos consistiram em amostras de substrato sem sangue submetidas às várias temperaturas e amostras com sangue que não sofreram a ação do calor.

## 2.9. Estudo da utilização de fontes de luz em diferentes têxteis

De modo a avaliar a eficácia das fontes de luz foram escolhidos vinte têxteis diferentes com cores escuras, padrões complexos ou estampados. A seleção foi realizada de forma a englobar diversos tecidos em que o sangue possa ser facilmente confundido ou mesmo impercetível. A composição dos materiais variou entre natural, sintética ou mista (Tabela 6). Tendo em consideração a literatura existente sobre o tema, todos os tecidos, com exceção das peles, foram lavados com um detergente convencional antes das análises. Este procedimento foi realizado de modo a remover eventuais químicos impregnados de origem, dado que os mesmos foram estabelecidos como possíveis interferentes [76].

Nos diversos substratos, com recurso a uma pipeta de *pasteur*, foram inseridas três manchas com proporções diferentes, particularmente com três, duas ou uma gota de sangue. Posteriormente, as mesmas foram deixadas a secar por um período de 48h, à temperatura ambiente, de modo a que o sangue fosse absorvido pelos tecidos e a água presente no mesmo evaporasse.

Uma vez que as manchas de sangue com o tempo apresentam alterações na sua coloração, foram realizadas três análises, nomeadamente aos 2 dias de secagem (48h), às 2 semanas e aos 2 meses, de modo a compreender o efeito deste fator nos resultados. Nas várias fases mencionadas, as manchas presentes nos tecidos foram examinadas com recurso a luz branca, azul e infravermelha e devidamente fotografadas, procedendo-se também à respetiva anotação da visibilidade das mesmas.

**Tabela 6.** Cor e material dos tecidos escolhidos para o estudo.

Tecido	Cor	Material
1	Vermelho com Padrão	Cetim + Algodão
2 *	Vermelho com Padrão	Cetim + Algodão
3	Azul Escuro	Lã + Nylon + Rayon
4	Padrão de Neutros	Algodão + Poliéster
5	Preto	Poliéster + Algodão
6	Cinzento Escuro	Lã
7	Preto	Algodão + Elastano
8	Preto	Poliuretano
9	Preto	Poliéster
10	Preto	Nylon
11	Vermelho	Nylon
12	Preto	Nylon
13	Preto	Algodão + Elastano
14	Preto	Pele
15 *	Preto	Pele
16	Preto	Pele
17	Azul Escuro	Nylon
18	Padrão de Azuis	Poliéster
19	Preto	Poliéster
20	Preto	Algodão + Poliéster

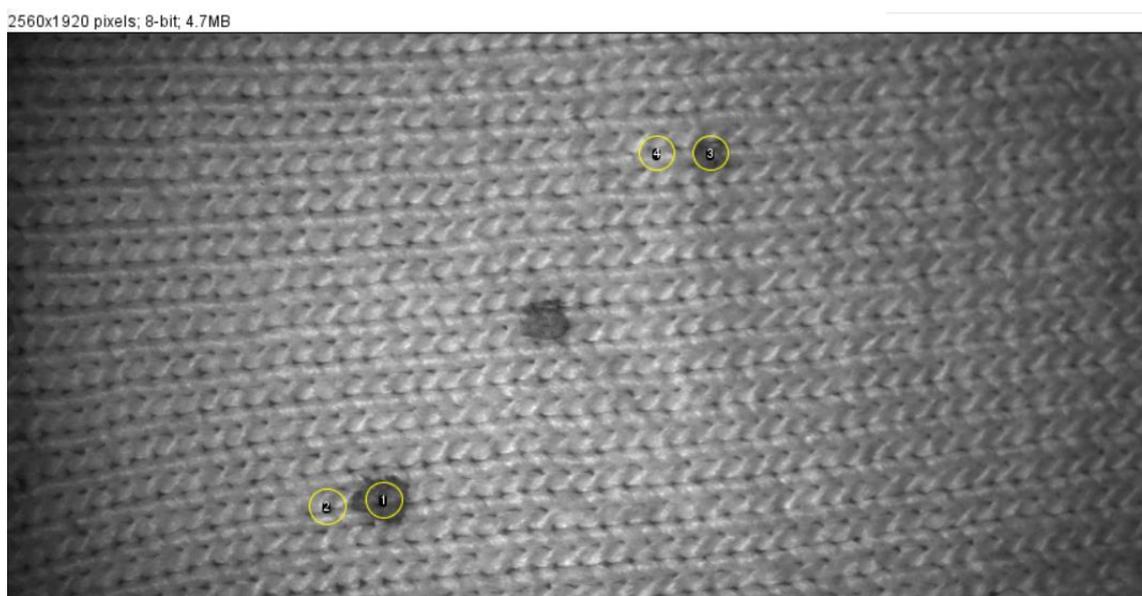
\* Os tecidos 2 e 15 correspondem ao interior dos tecidos 1 e 14, respetivamente.

### 2.9.1. Análise de contraste

De modo a estabelecer qual a fonte de luz mais eficaz para a pesquisa de sangue nos tecidos em análise, foi realizado um estudo de contraste. Para tal foi utilizado o software de acesso livre ImageJ (v1.53e), o qual permite atribuir um valor ao contraste existente entre as manchas de sangue e o tecido.

Uma fotografia digital é constituída por pixéis que podem ter qualquer cor do espectro. Contudo, quando é utilizado o formato 8-bit a imagem é convertida para escala de cinza e é atribuído a cada pixel um valor entre 0 e 255, sendo que o valor 0 representa o preto e o 255 o branco [79]. O contraste estabelece a diferença de brilho entre dois objetos distintos, porém no ImageJ esta variável é definida como intensidade. Assim sendo, o contraste entre a mancha e o tecido é igual à média de intensidades da área não manchada menos a média de intensidades da área manchada [76].

Para a presente análise, as fotografias adquiridas foram carregadas no ImageJ e convertidas no formato 8-bit. Posteriormente, foram definidas manualmente as regiões de interesse selecionando as manchas e uma região semelhante do tecido, tal como exemplificado na Figura 16, e foram calculadas as respetivas médias de intensidade. Para cada um dos tecidos em estudo foram avaliadas duas das manchas produzidas, sendo o contraste do mesmo estabelecido como a média entre o contraste obtido para as duas manchas selecionadas.



**Figura 16.** Exemplo da seleção de regiões de interesse no ImageJ. Os círculos amarelos indicam as áreas utilizadas para os cálculos de contraste.

As regiões delimitadas a amarelo indicam as áreas que foram medidas. Para as manchas e respetivo background foram definidas regiões com o mesmo tamanho, de forma a que o número de pixéis fosse igual para o cálculo do valor médio de intensidades na mancha e no fundo. Em situações em que as manchas não foram visíveis ou distinguíveis de características do tecido foi atribuído o valor 0 ao contraste. Nas fotografias obtidas com recurso à luz infravermelha, as manchas de sangue surgem normalmente como uma mancha escura num fundo relativamente mais claro, contudo em determinados substratos esta relação não se verifica, ou seja, o sangue reflete a radiação e o substrato absorve. Nestas circunstâncias o valor do contraste será negativo. Atendendo ao objetivo do estudo, nomeadamente a avaliação da eficácia das fontes de luz nos diferentes tecidos, os valores finais de contraste foram calculados em módulo.

### **2.9.2. Análise de Agrupamentos Hierárquica**

Os resultados obtidos na análise de contraste foram submetidos a tratamento estatístico, sendo realizada sobre os mesmos uma análise de agrupamentos hierárquica, com recurso à ferramenta de programação RStudio.

A análise de agrupamentos hierárquica, ou HCA, permite formar grupos, denominados de *clusters*, através de um processo iterativo em que os mesmos são unidos ou separados sucessivamente. O método pode ser divisivo, quando começa com todo o conjunto de dados integrado num só grupo que se vai dissociando, progressivamente, em grupos menores até que cada um seja constituído por apenas um elemento; ou aglomerativo, quando todos os elementos começam separados e vão sendo, sucessivamente, agrupados em diversas etapas até se obter um único *cluster* com todos os elementos. Assim sendo, a HCA é “uma técnica de análise de dados que, quando aplicada a um conjunto de objetos heterogéneos, identifica subgrupos homogéneos conforme definido por um determinado modelo ou medida de similaridade” [80][81].

Para a realização desta análise, inicialmente, devem ser definidos o tipo de ligação e a medida de similaridade entre os dados. Tendo por base estes parâmetros, o método conduzirá à produção de uma estrutura que descreve uma hierarquia de agrupamentos sobre os dados, designada por dendrograma, sendo que para um número inicial de N objetos, serão realizadas N-1 associações. Assim sendo, o dendrograma corresponde à representação bidimensional das várias associações realizadas entre objetos, de acordo com sua similaridade [6][7].

No presente estudo a medida de similaridade utilizada foi a distância euclidiana, visto que permite estabelecer o grau de semelhança entre os vários objetos, de uma forma simples e intuitiva. A distância euclidiana entre os objetos A e B é dada por:

$$d(A,B) = \sqrt{|x_{A1} - x_{B1}|^2 + |x_{A2} - x_{B2}|^2 + \dots + |x_{An} - x_{Bn}|^2} \quad (2.1)$$

Adicionalmente, foi escolhido o método de Ward que, em contraste com os restantes métodos de ligação existentes, realiza uma análise de variância, cujo objetivo é a produção de grupos onde o seu valor seja o menor possível. Enquadra-se nos métodos aglomerativos, portanto, inicialmente, admite que cada um dos objetos constitui um único grupo. O primeiro agrupamento estabelecido será aquele em que os objetos apresentem o menor erro da soma de quadrados e o maior valor de  $R^2$ . O procedimento repete-se sucessivamente até que todos os objetos constituam um só grupo [83].

O erro da soma dos quadrados (ESS, do inglês *Error Sum of Square*), o total da soma dos quadrados (TSS, do inglês *Total Sum of Squares*) e o  $R^2$  (*R-Square*), são dados por:

$$ESS = \sum_i \sum_j \sum_k (x_{ijk} - \bar{x}_{i.k})^2 \quad (2.2)$$

$$TSS = \sum_i \sum_j \sum_k (x_{ijk} - \bar{x}_{.k})^2 \quad (2.3)$$

$$R^2 = \frac{TSS-ESS}{TSS} \quad (2.4)$$

# Capítulo III

## Resultados e Discussão

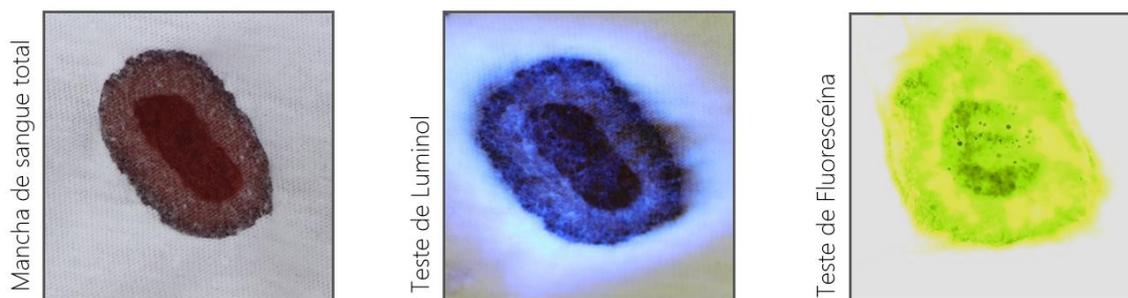


Atualmente, na casuística do Setor de Local do Crime do LPC-PJ, são utilizados os testes KM e Luminol para a detecção e identificação de manchas de sangue, sendo que estes funcionam de forma complementar, utilizando-se o primeiro, essencialmente, para manchas visíveis e o segundo para manchas latentes. Para auxiliar a pesquisa de vestígios hemáticos são utilizadas fontes de luz, cujo comprimento de onda varia de acordo com o substrato em análise. Tal como referido anteriormente, o presente trabalho teve como objetivo estabelecer a eficiência destes e outros testes presuntivos em diversas situações limite, avaliando a sua resposta às mesmas.

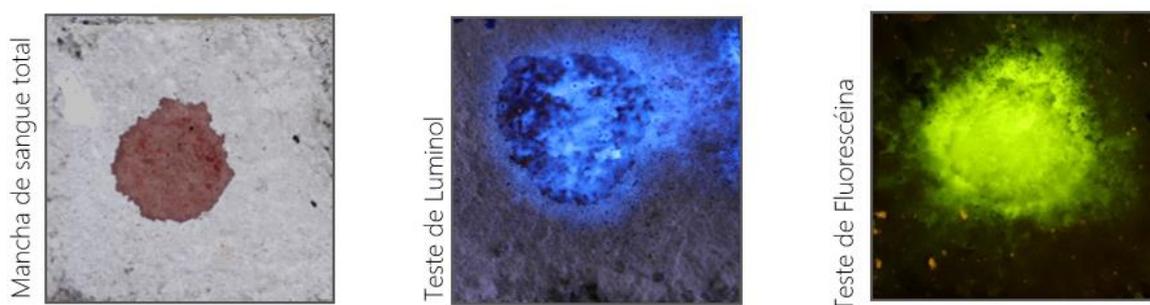
### **3.1. Sensibilidade dos testes presuntivos**

Embora a sensibilidade dos testes presuntivos seja um tema bastante abordado na literatura, os valores estabelecidos pelos vários autores são, na sua maioria, discordantes. Esta medida é extremamente relevante uma vez que reflete a capacidade de um dado teste para a detecção de concentrações bastante reduzidas de hemoglobina. Ainda assim, os resultados obtidos neste campo são fortemente influenciados pela formulação utilizada na preparação dos reagentes, pelo substrato utilizado e pelo método de aplicação escolhido para a análise. Neste sentido, o presente estudo foi realizado com o objetivo primário de estabelecer a sensibilidade dos diversos testes preparados, tendo em consideração os procedimentos utilizados em local do crime. Os resultados obtidos foram, posteriormente, confrontados com os valores descritos na bibliografia, sendo identificadas eventuais causas para as variações significativas. Os dois substratos escolhidos, nomeadamente, cimento e tecido 100% algodão, foram selecionados de modo a testar a influência do substrato na análise, sendo que ambos são materiais de deposição comum de sangue em situações reais (Anexo II).

A primeira etapa do estudo consistiu na realização de controlos positivos e negativos para os diversos testes, em ambos os substratos. Assim, no tecido, verificou-se a ausência de reação nas amostras sem sangue e a ocorrência de uma reação praticamente instantânea em amostras de sangue total não diluído, para todos os testes (Figura 17). Por outro lado, quando foram realizados controlos para o cimento, todos os testes foram negativos para as amostras sem sangue, com exceção do tetrabase que reagiu com o substrato e, portanto, foi excluído de todas as análises realizadas em cimento. Os restantes testes reagiram positivamente ao controlo com sangue não diluído (Figura 18).



**Figura 17.** Mancha de sangue não diluído em tecido e controlos positivos dos testes luminol e fluoresceína.



**Figura 18.** Mancha de sangue não diluído em cimento e controlos positivos dos testes luminol e fluoresceína.

O teste tetrabase, à semelhança dos restantes, está suscetível a falsos positivos, sendo que no presente contexto foram registados falsos positivos em cimento. Assim, de modo a compreender a existência de reação com o substrato, foi avaliada a sua composição. Para a produção do cimento foi utilizada água subterrânea bastante férrea. Tendo em consideração que o teste é sensível à presença de ferro, foi estudada a possibilidade de existir uma concentração significativa do mesmo na amostra, equiparável à concentração normal de ferro no sangue, a qual é suficiente para provocar uma forte reação do teste. A análise da água foi realizada por ICP-OES num laboratório externo, constando o relatório em anexo (anexo III). O resultado obtido indica que a concentração de ferro na amostra de água é de 270  $\mu\text{g}/\text{dL}$ , que é superior aos valores normais de ferro no sangue, 65 a 175  $\mu\text{g}/\text{dL}$  [84]. Deste modo, o valor obtido é compatível com a hipótese de que o teste pode estar a reagir ao ferro presente na água utilizada na preparação do cimento.

Após a realização dos controlos foram testadas as sensibilidades dos diversos testes nas condições previamente definidas (Tabelas 7 e 8).

**Tabela 7.** Resultados obtidos para a sensibilidade dos vários testes em tecido 100% algodão.

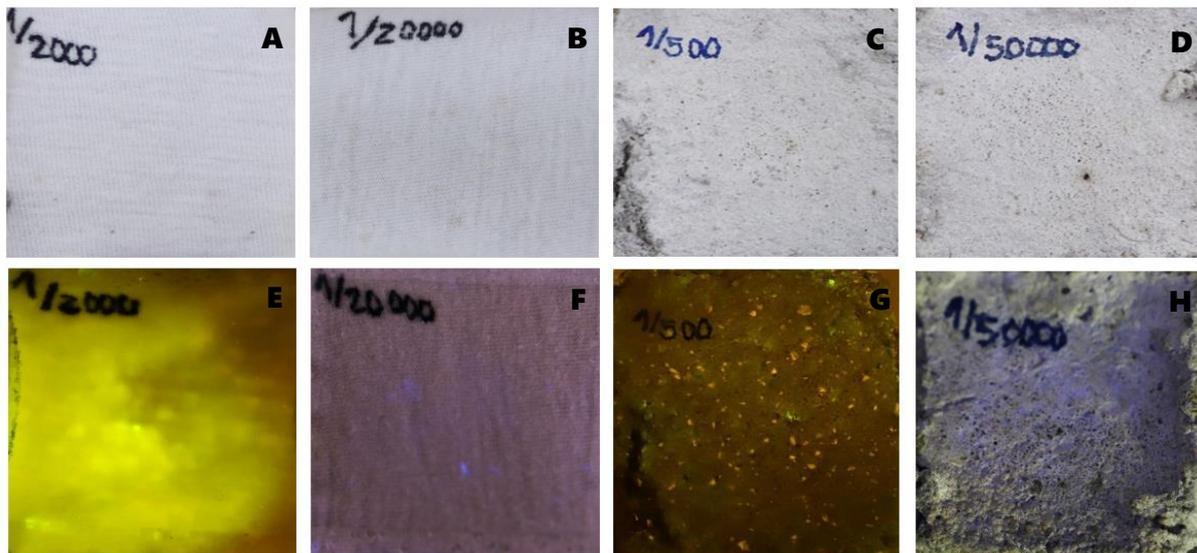
		KM	LMG	Tetrabase	Luminol	Fluoresceína
Diluições	1/1	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	1/10	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	1/100	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	1/200	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	1/500	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	1/1 000	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	1/2 000	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	1/5 000	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo
	1/10 000	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	1/20 000	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
	1/50 000	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
	1/ 100 000	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

**Tabela 8.** Resultados obtidos para a sensibilidade dos vários testes em cimento.

		KM	LMG	Tetrabase	Luminol	Fluoresceína
Diluições	1/1	Positivo	Positivo	-----	Positivo	Positivo
	1/10	Positivo	Positivo	-----	Positivo	Positivo
	1/100	Negativo	Negativo	-----	Positivo	Positivo
	1/200	Negativo	Negativo	-----	Positivo	Positivo
	1/500	Negativo	Negativo	-----	Positivo	Positivo
	1/1 000	Negativo	Negativo	-----	Positivo	Negativo
	1/2 000	Negativo	Negativo	-----	Positivo	Negativo
	1/5 000	Negativo	Negativo	-----	Positivo	Negativo
	1/10 000	Negativo	Negativo	-----	Positivo	Negativo
	1/20 000	Negativo	Negativo	-----	Positivo	Negativo
	1/50 000	Negativo	Negativo	-----	Positivo	Negativo
	1/ 100 000	Negativo	Negativo	-----	Negativo	Negativo

No estudo realizado em tecido 100% algodão, inicialmente, os testes KM, LMG e tetrabase foram apenas realizados através do método de raspagem da amostra com papel de filtro, contudo, verificou-se que os resultados obtidos para a sensibilidade dos mesmos eram bastante inferiores aos valores apresentados na literatura. Dado que na maioria dos estudos existentes os reagentes são aplicados diretamente sobre o substrato, quando os testes referidos deixaram de obter resultados positivos através de raspagem, foi utilizado este procedimento. Assim, as quadrículas de cor cinzenta, na tabela 7, representam as diluições em que os testes foram aplicados diretamente sobre o substrato. Este procedimento foi realizado de modo a provar que o método de utilização dos testes tem elevada influência nos resultados obtidos, devendo frisar-se que em situações reais os três testes supramencionados são utilizados através de raspagem e não de aplicação direta na mancha. Todavia, na raspagem pode ser utilizada água destilada para facilitar a transferência do material celular para o papel de filtro, que na presente situação não se realizou visto que iria interferir com o valor real da diluição em estudo.

Através da análise da Tabela 7, relativa à sensibilidade dos testes com o tecido 100% algodão como substrato, pode verificar-se que o teste mais sensível foi o tetrabase, tanto com o método de raspagem com papel de filtro, como através de aplicação direta, alcançando as diluições de 1/200 e 1/50 000, respetivamente. Por contraste, o teste KM apresentou a menor sensibilidade, conseguindo apenas detetar sangue até às diluições de 1/10, pelo método indireto, e 1/2000, quando aplicado diretamente. Na Tabela 8, em que foi utilizado o cimento como substrato, são observáveis algumas variações nas sensibilidades relativamente aos valores anteriores. Neste caso, tanto o teste LMG como o KM registaram uma sensibilidade reduzida, alcançando apenas a diluição de 1/10, com o método indireto. Por outro lado, o luminol foi o teste mais sensível detetando a presença de hemoglobina até à diluição de 1/50 000. A análise conjunta das tabelas permite estabelecer o luminol como o teste mais sensível (Figura 19). Para além disso, pode verificar-se que os teste LMG e fluoresceína apresentaram menor sensibilidade para a deteção de vestígios hemáticos em cimento, comparativamente a tecido. No geral, o teste KM foi o menos sensível, obtendo-se resultados inferiores ao espectável.



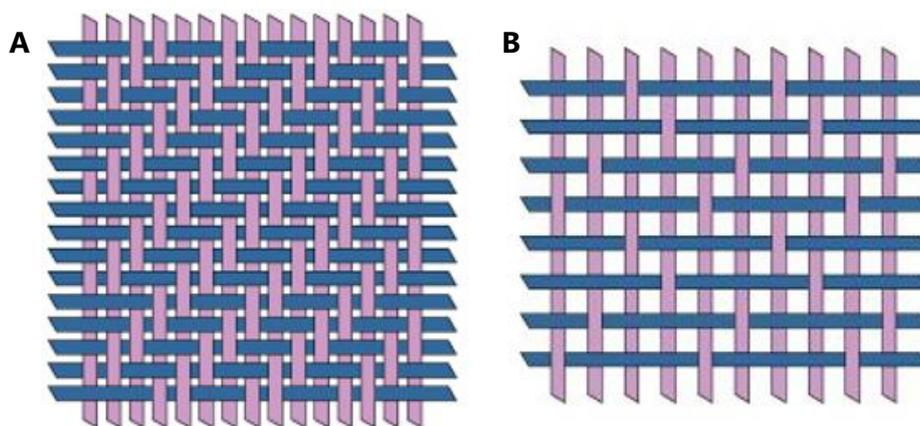
**Figura 19.** Sensibilidade dos testes fluoresceína e luminol, em tecido e cimento. Substratos antes da aplicação do teste (A,B,C e D) e após a aplicação do teste de fluoresceína (E e G) e luminol (F e H).

Os resultados obtidos foram confrontados com as sensibilidades previamente descritas na literatura, para condições semelhantes às estudadas. Num estudo realizado por *Casali et al.*, com sangue de mamífero não humano, o teste KM obteve uma reação positiva até à diluição de 1/16, utilizando o método indireto e tecido como substrato [60]. Este resultado é coerente com os valores obtidos no presente trabalho. Por outro lado, *Fonseca et al.* estabeleceu uma sensibilidade de 1/10 000 para o teste KM, realizado por raspagem, numa superfície não porosa, o que realça o efeito do substrato nos resultados obtidos [59]. Quanto ao teste LMG, *Andersson et al.* obteve uma sensibilidade de 1/64, utilizando o método indireto em algodão, e 1/2048, testando diretamente [43]. Apesar de próximos, os resultados obtidos pelo autor são inferiores aos verificados neste trabalho. Em contrapartida, *Durnez et al.* alcançou uma sensibilidade ligeiramente superior à obtida para o teste tetrabase, isto é, 1/1000 por raspagem e 1/100 000 através de aplicação direta [55]. Os testes luminol e fluoresceína foram comparados num estudo realizado por *Garafano et al.*, e, em algodão, ambos reagiram positivamente para a diluição de 1/1000, mas não para 1/100 000, tal como se verificou acima. Todavia, não foi possível comparar os resultados das diluições intermédias, dado que estas não foram analisadas no seu trabalho [40]. Em contraste com o anterior, num estudo realizado por *Webb et al.*, em tecido 100% algodão, o luminol detetou quantidades residuais de hemoglobina até à diluição de 1/5 000 000 [39].

### 3.2. Efeito das lavagens em materiais têxteis

Foram lavados dois tecidos diferentes, de acordo com diversas condições e testada a sensibilidade dos testes presuntivos à presença de sangue em materiais lavados. Os tecidos utilizados para o estudo são ambos compostos por algodão, contudo apresentam uma estrutura de fibras diferente, que interfere com a sua porosidade e, conseqüentemente, absorvência (Figura 20) [85]. Segundo *Mushtaq et al.*, quanto mais absorvente for o tecido, maior o diâmetro da mancha e a quantidade de sangue retida no mesmo, o que facilita a sua detecção usando os testes presuntivos [86].

No presente estudo as variáveis analisadas foram o método de lavagem (manual/mecânico); método de secagem (natural/mecânico); a utilização de detergente e a temperatura da água utilizada na lavagem. Como controlo foram utilizados pedaços de ambos os tecidos com sangue total não lavados e sem sangue lavados nas condições previamente estabelecidas. Todos os testes deram resultado positivo com as amostras de tecido com sangue total e negativo com as amostras sem sangue lavadas, o que permitiu prosseguir o estudo com todos os testes.



**Figura 20.** Diferenças na estrutura das fibras na ganga (A) e num tecido convencional de algodão (B). Adaptado de [85].

Os resultados obtidos constam nas Tabelas 9 e 10, correspondendo a primeira a tecido convencional 100% algodão, de cor branca, e a segunda a ganga, azul.

**Tabela 9.** Resultados obtidos para a sensibilidade dos testes à lavagem de tecidos, no substrato tecido 100% algodão. Legenda: **A** – Secagem à temperatura ambiente; **E** – Secagem na máquina; **m** – Lavagem à mão; **M** – Lavagem na máquina; **d** – Com detergente; **sd** – Sem detergente; **q** – Quente; **f** – Frio.

		KM	LMG	Tetrabase	Luminol	Fluoresceína
Condições de lavagem	A.m.sd	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	A.m.d	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	E.m.sd	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	E.m.d	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	A.M.q.sd	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	A.M.q.d	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	A.M.f.sd	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	A.M.f.d	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	E.M.q.sd	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	E.M.q.d	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	E.M.f.sd	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	E.M.f.d	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

**Tabela 10.** Resultados obtidos para a sensibilidade dos testes à lavagem de tecidos, no substrato ganga. Legenda: **A** – Secagem à temperatura ambiente; **E** – Secagem na máquina; **m** – Lavagem à mão; **M** – Lavagem na máquina; **d** – Com detergente; **sd** – Sem detergente; **q** – Quente; **f** – Frio.

		KM	LMG	Tetrabase	Luminol	Fluoresceína
Condições de lavagem	A.m.sd	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	A.m.d	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	E.m.sd	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	E.m.d	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	A.M.q.sd	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	A.M.q.d	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	A.M.f.sd	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	A.M.f.d	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	E.M.q.sd	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	E.M.q.d	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo
	E.M.f.sd	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo
	E.M.f.d	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo

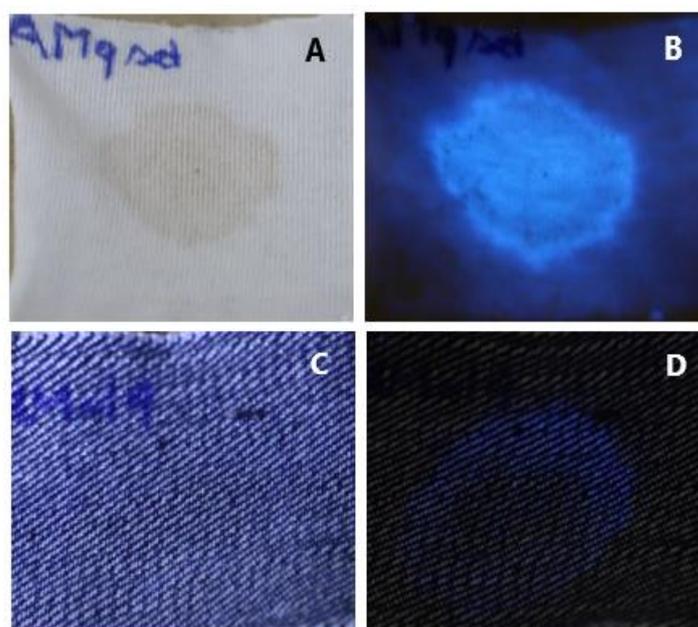
Algumas das manchas impregnadas nos tecidos foram visíveis mesmo após a lavagem das mesmas, sobretudo no tecido de algodão branco. Tal pode ser impulsionado pelo tempo de repouso de 24h, o qual permitiu que as manchas secassem completamente. Anteriormente, *Hofmann et al.* verificou que o tempo de secagem influencia a detetabilidade das manchas, isto é, manchas mais antigas obtiveram um maior número de resultados positivos e reações mais evidentes com a aplicação de luminol [87].

Os resultados da Tabela 9, relativos à realização dos testes em tecido 100% algodão lavado, indicam que ambos os testes de aplicação direta reagiram em todas as condições avaliadas, revelando-se bastante sensíveis para a detecção de sangue. Para além disso, todos os testes reagiram positivamente para a presença de sangue em tecido lavado na máquina, com água fria e sem detergente, com ambos os métodos de secagem (M.f.sd.) e tecido lavado à mão com ou sem detergente, seco à temperatura ambiente (A.m.sd. e A.m.d.). Por outro lado, nenhum dos testes de raspagem deu positivo com tecido lavado na máquina, com água quente e detergente, qualquer que fosse o método de secagem (M.q.d.). Nas condições lavagem à mão, sem detergente e secagem na máquina (E.m.sd.), apenas o teste KM obteve um resultado negativo. Assim, à semelhança do estudo anterior, o teste KM foi o menos sensível.

Da análise da Tabela 10, verificou-se que, em contraste com os resultados obtidos num tecido padrão 100% algodão, em ganga, os testes tetrabase e fluoresceína reagiram positivamente em todas as condições. Tal como anteriormente, os testes menos sensíveis foram o KM e LMG, sendo que o teste KM apenas deu resposta positiva em ganga submetida a lavagem manual, com ou sem detergente e secagem à temperatura ambiente (A.m.sd. e A.m.d.). Por sua vez, o teste LMG, além das condições anteriores, deu resultado positivo também com a amostra lavada à mão, sem detergente e seca na máquina (E.m.sd.). O luminol foi novamente bastante sensível, contudo não detetou sangue em ganga lavada com detergente (d) e seca na máquina (E), independentemente do método de lavagem. Nesta situação, o método de secagem foi o fator decisivo para a ausência de reação do teste luminol. No geral, o processo de secagem mecânico é mais rápido do que o natural, dado que as roupas são submetidas a elevadas temperaturas enquanto alguma água é removida pelo processo de centrifugação, o que promove uma remoção mais eficaz da mancha, que nesta fase se encontra diluída. Por outro lado, a secagem à temperatura ambiente é mais lenta permitindo que a água se mantenha no tecido por mais tempo, assim como algum do sangue depositado, o que leva a uma remoção menos eficaz da mancha. Para além disso, na máquina de secar, os tecidos estão em contacto com outras roupas, o que potencia a limpeza dos mesmos. As características do material têxtil também representam um fator de elevada influência nos resultados. Devido à estrutura das suas fibras, a ganga é pouco absorvente, impedindo o sangue de penetrar eficazmente, ficando o mesmo concentrado no local de deposição, o que facilita a sua remoção durante a lavagem.

No geral, verificou-se que a utilização de detergente na lavagem proporciona um maior grau de limpeza, diminuindo a detetabilidade do sangue. Os detergentes comuns, tal como o *Skip*, têm na sua composição percarbonato de sódio, cuja dissolução em água leva à produção de peróxido de hidrogénio e carbonato de sódio. Tal como supramencionado, os testes em estudo utilizam a hemoglobina para catalisar a redução de um composto oxidante, como o peróxido de hidrogénio, que por sua vez oxidará o composto cromogénico. Assim, a presença de peróxido de hidrogénio, derivado do detergente, pode levar a que a hemoglobina presente na amostra de sangue seja utilizada durante o processo de lavagem [88]. Esta reação, juntamente com a remoção potenciada pela imersão do tecido em água com detergente, pode ser suficiente para reduzir o volume de sangue abaixo dos níveis de sensibilidade dos testes presuntivos, resultando em reações negativas.

Os tecidos utilizados são ambos 100% algodão, mas, devido à estrutura das fibras, a ganga é relativamente menos absorvente, o que facilita a remoção das manchas de sangue durante a lavagem e, conseqüentemente, origina um maior número de resultados negativos. Adicionalmente, o facto de na ganga algumas fibras estarem tingidas pode alterar as suas propriedades e dificultar a visualização das reações, principalmente do luminol (Figura 21).



**Figura 21.** Reações do luminol, nas condições: secagem à temperatura ambiente e lavagem na máquina, com água quente e sem detergente (A.M.q.sd); em tecido de algodão comum (A e B) e ganga (C e D).

A bibliografia no tema é bastante limitada, todavia é, maioritariamente, concordante com os resultados obtidos no presente estudo. A título de exemplo, *Hofmann et al.* analisaram o efeito de múltiplas variáveis associadas à lavagem mecânica, tais como a temperatura da água utilizada. As temperaturas avaliadas foram 30, 60 e 95°C, tendo-se verificado que os resultados não apresentaram variações significativas entre os 30 e os 60°C, porém ocorreu uma diminuição na detetabilidade das manchas à temperatura de 95°C [87]. Estas observações são análogas às presentes, dado que se verificou que para temperaturas de lavagem de 20 e 60°C os testes deram resultados semelhantes, não sendo este um fator de elevada influência. O trabalho desenvolvido por *Mushtaq et al.* teve como foco avaliar o efeito da utilização de diferentes detergentes. De entre os seus resultados pode destacar-se que os testes KM e LMG deixaram de detetar a presença de sangue em lavagens à mão, com detergente e duração superior a 30 minutos [86]. Assim, tal como no presente estudo, em que a lavagem durou aproximadamente 10 minutos, ambos os testes deram resultados positivos em tecido 100% algodão submetido a lavagem à mão, com detergente e secagem à temperatura ambiente.

Os resultados alcançados servirão como orientação para a futura aplicação de testes presuntivos em têxteis lavados, contudo existem múltiplos fatores capazes de interferir com os mesmos, tais como: tipo e composição do detergente; duração da lavagem; temperatura da água; número de lavagens e composição e estrutura do tecido. Tendo em vista os resultados obtidos e o facto de, regularmente, as manchas não serem visíveis após a lavagem, recomenda-se a utilização de testes de aplicação direta. Estes permitem a pesquisa e o realce de manchas de sangue latentes em substratos de grandes dimensões, e são, simultaneamente, fáceis de utilizar e bastante sensíveis.

### 3.3. Efeito das temperaturas elevadas na integridade das amostras

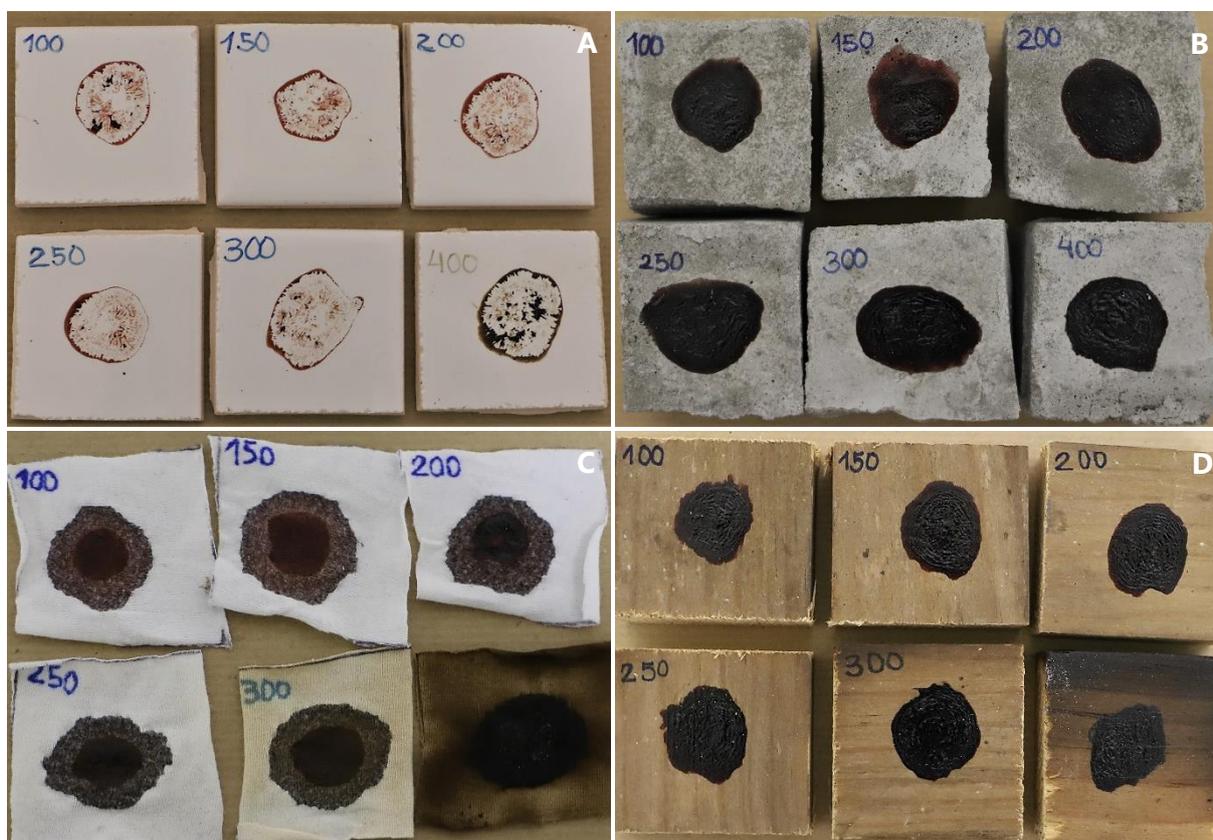
O calor extremo gerado pelas chamas pode modificar a química do sangue, alterando as suas propriedades, o que afeta a resposta dos métodos químicos e óticos mais comuns. Assim sendo, foi estudado o efeito das temperaturas elevadas na estabilidade de amostras de sangue e, conseqüentemente, no resultado dos testes presuntivos. Concomitantemente, foi avaliado o efeito do substrato na análise sendo, portanto, escolhidos quatro substratos diferentes, onde são frequentemente encontrados vestígios hemáticos, sendo eles o cimento, o azulejo, a madeira e o tecido, neste caso constituído integralmente por algodão. A aplicação principal do presente estudo será em cenários de crime de incêndio cuja intenção é a ocultação de vestígios.

A temperatura máxima do ar ou da chama a que uma mancha de sangue é submetida e consegue obter resultados positivos com métodos químicos depende da estrutura, rugosidade e propriedades térmicas do material onde a mesma está depositada. Num incêndio em ambiente fechado, as temperaturas do ar e dos gases podem ser significativamente superiores a 300°C, especialmente nas camadas superiores. Nestas condições, as temperaturas das chamas rondam os 800°C [89]. A definição do período de 5 minutos para o aquecimento das amostras teve em consideração que, em casos reais, após um determinado período as chamas progridem provocando a destruição dos vestígios, ou regridem, verificando-se uma descida nas temperaturas. Para além disso, nestas circunstâncias, as temperaturas não se mantêm estáveis durante um longo período de tempo.

Na mufla, as amostras foram submetidas a seis temperaturas, porém ocorreram oscilações até  $\pm 20^\circ\text{C}$  derivadas da abertura do aparelho para a introdução dos materiais. Nas amostras de madeira e tecido submetidas a 400°C, os substratos atingiram o ponto de ignição e iniciaram o processo de carbonização. Assim sendo, as mesmas foram removidas antes de terminar o período de 5 minutos pré-estabelecido. Os controlos positivos e negativos foram constituídos por amostras de substrato com sangue não submetidas a aquecimento e amostras de substrato sem sangue submetidas a aquecimento, respetivamente. Todos os testes presuntivos deram positivo com os controlos positivos. Tal como anteriormente, o teste tetrabase deu positivo com o cimento, sendo eliminado do estudo no substrato.

Com exceção do caso anterior, não ocorreu nenhuma reação com os controlos negativos, para os restantes testes presuntivos.

Foi possível observar diretamente algumas das alterações sofridas pelo sangue devido às elevadas temperaturas, nomeadamente no que toca a coloração e textura. As manchas ficaram sequencialmente mais escuras com o aumento da temperatura, sendo esta alteração mais acentuada nos substratos de maior inflamabilidade (Figura 22). Em azulejo vidrado, a maioria do sangue depositado foi removido naturalmente das amostras, durante o manuseamento das mesmas, dado que o substrato é bastante impermeável (Figura 22A).



**Figura 22.** Amostras após serem submetidas às temperaturas de 100, 150, 200, 250, 300 e 400°C. Alteração da coloração do sangue em substratos não inflamáveis (A e B) e inflamáveis (C e D).

Seguidamente, nas Tabelas 11 a 14 são apresentados os resultados da aplicação dos testes presuntivos nas diferentes condições apresentadas, de acordo com a ordem estabelecida acima, na Figura 22.

**Tabela 11.** Resultados obtidos para a estabilidade das amostras sujeitas a aquecimento, no substrato azulejo.

		KM	LMG	Tetrabase	Luminol	Fluoresceína
Temperaturas (°C)	100	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	150	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	200	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	250	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	300	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	400	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo

**Tabela 12.** Resultados obtidos para a estabilidade das amostras sujeitas a aquecimento, no substrato cimento.

		KM	LMG	Tetrabase	Luminol	Fluoresceína
Temperaturas (°C)	100	Positivo	Positivo	-----	Positivo	Positivo
	150	Positivo	Positivo	-----	Positivo	Positivo
	200	Positivo	Positivo	-----	Positivo	Positivo
	250	Positivo	Positivo	-----	Positivo	Positivo
	300	Positivo	Positivo	-----	Positivo	Positivo
	400	Positivo	Positivo	-----	Positivo	Positivo

**Tabela 13.** Resultados obtidos para a estabilidade das amostras sujeitas a aquecimento, no substrato tecido 100% algodão.

		KM	LMG	Tetrabase	Luminol	Fluoresceína
Temperaturas (°C)	100	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	150	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	200	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	250	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	300	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
	400	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

**Tabela 14.** Resultados obtidos para a estabilidade das amostras sujeitas a aquecimento, no substrato madeira.

		KM	LMG	Tetrabase	Luminol	Fluoresceína
Temperaturas (°C)	100	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	150	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	200	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	250	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	300	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
	400	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

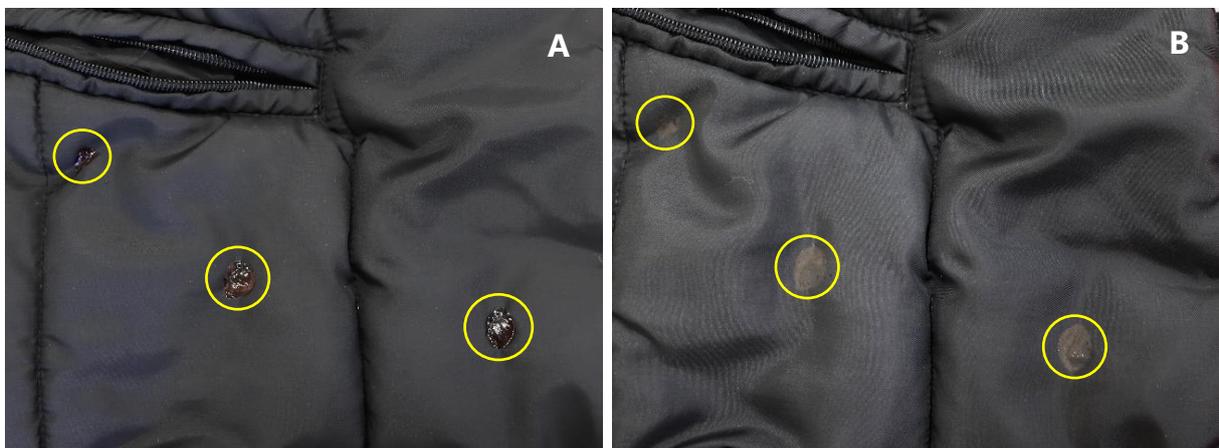
Da análise da Tabela 11, relativa a sangue em azulejo, retém-se que os testes de aplicação direta obtiveram reações positivas em todas as amostras, até à temperatura de aquecimento de 400°C. No entanto, os testes de raspagem apenas deram resultado positivo até aos 300°C. Tal como consta na Tabela 12, referente às observações em cimento, todas as amostras reagiram positivamente em todos os testes em estudo até aos 400°C. Embora ambos os substratos sejam não inflamáveis, os resultados foram ligeiramente diferentes. Tal pode ser consequência das propriedades intrínsecas dos materiais, assim como da espessura dos diferentes substratos, que impede o cimento de aquecer tanto quanto o azulejo, preservando melhor as manchas de sangue.

Com o substrato tecido 100% algodão, presente na Tabela 13, os testes de aplicação direta detetaram sangue até à temperatura de aquecimento de 300°C, enquanto os testes de raspagem reagiram positivamente apenas até aos 250°C. Por fim, em madeira, o último resultado positivo de todos os testes presuntivos foi aos 300°C. As amostras, de ambos os substratos, submetidas a 400°C foram retiradas antes de completar os 5 minutos, sendo o tecido extraído aos 2 minutos e 30 segundos e a madeira aos 4 minutos. Para além dos substratos, também o sangue iniciou o processo de carbonização, o que se refletiu em resultados negativos.

Quanto mais resistentes e menos inflamáveis forem os materiais utilizados como substrato, menor será a degradação do sangue, existindo, portanto, maior probabilidade de os testes presuntivos obterem resultados positivos. Não obstante o facto de os testes de aplicação direta serem mais sensíveis e eficazes na deteção de sangue, os mesmos destroem os padrões existentes através da sua diluição. Assim, dada a especificidade e sensibilidade dos testes KM e LMG, e a necessidade de preservar os padrões de manchas de sangue, estes são os mais adequados para amostras que sofrem a ação do calor, sendo que o teste KM já é utilizado na rotina do LPC-PJ.

### 3.4. Estudo da utilização de fontes de luz em diferentes têxteis

Este estudo exploratório consistiu na avaliação da eficácia das luzes infravermelha e azul na pesquisa de manchas de sangue em vinte tecidos onde a sua visualização a olho nu, ou com recurso a luz branca, pode estar comprometida. Foram escolhidos exemplares de materiais têxteis que já haviam sido referidos na bibliografia como problemáticos, alguns que foram pouco explorados pelos autores, anteriormente, e outros em que se sabe que as fontes de luz proporcionam um bom contraste. A primeira análise foi realizada 2 dias após a deposição das manchas, para que as mesmas pudessem secar completamente em tecidos absorventes e não absorventes. Nos últimos verificou-se a formação de uma película rígida sobre o material, a qual foi removida, sobrando apenas a mancha impregnada (Figura 23). Da análise com recurso aos diferentes tipos de luz resultaram as fotografias correspondentes a cada tecido e uma tabela onde se estabeleceu a visibilidade das manchas nos três períodos pré-estabelecidos, nomeadamente aos 2 dias, 2 semanas e 2 meses (Tabela 15). Manchas impercetíveis ou cujo aspeto não se assemelhe ao de sangue são consideradas não visíveis. Adicionalmente, em anexo encontram-se fotografias dos diferentes tecidos (anexo IV).



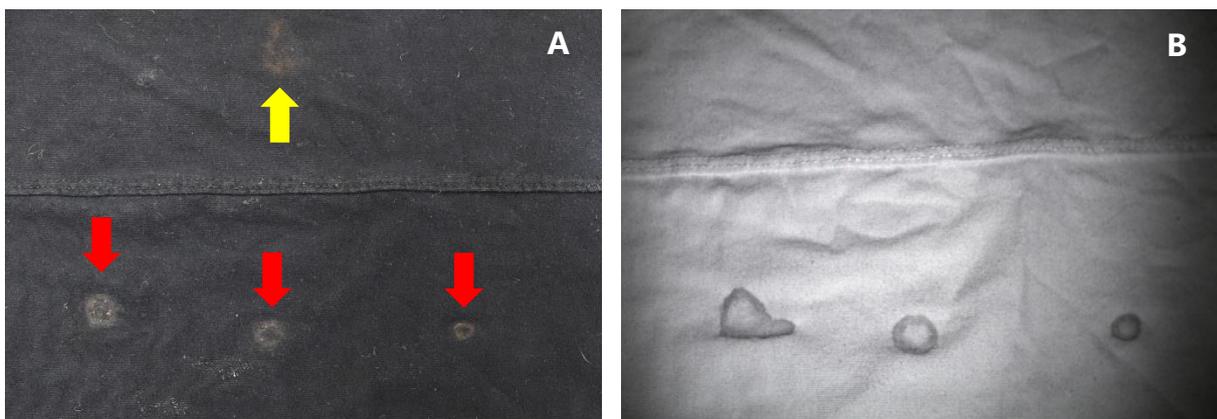
**Figura 23.** Exemplo de um tecido pouco absorvente onde ocorreu a formação de uma película (A) e resultado da sua remoção (B).

**Tabela 15.** Visibilidade das manchas produzidas nos tecidos aos 2 dias, 2 semanas e 2 meses, com recurso a luz branca (B), infravermelha (IV) e azul (Az).

Tecido	2 dias			2 semanas			2 meses		
	B	IV	Az	B	IV	Az	B	IV	Az
1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
3	✓	✓	×	✓	✓	×	✓	✓	×
4	✓	×	×	✓	×	×	✓	×	×
5	×	✓	×	×	✓	×	×	✓	×
6	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
7	×	✓	✓	×	✓	✓	×	✓	✓
8	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
9	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
10	✓	×	✓	✓	×	✓	✓	×	✓
11	×	×	✓	×	×	✓	×	×	✓
12	✓	×	✓	✓	×	✓	✓	×	✓
13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
14	✓	✓	×	✓	✓	×	✓	✓	×
15	×	✓	×	×	✓	×	×	✓	×
16	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17	×	×	✓	×	×	✓	×	×	✓
18	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
19	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20	×	✓	×	×	✓	×	×	✓	×

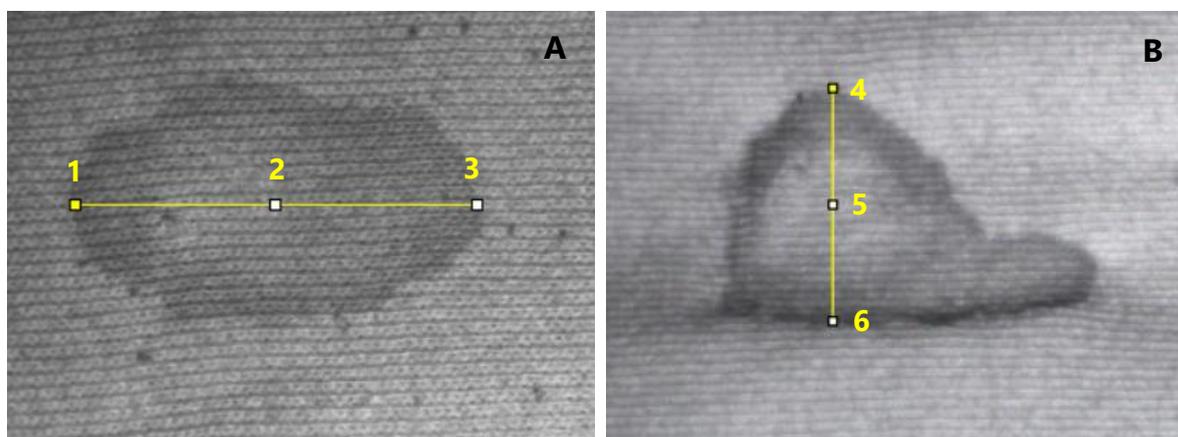
Em nove dos tecidos em análise as manchas de sangue foram identificadas utilizando todos os métodos de visualização, sendo estes o 1, 2, 6, 8, 9, 13, 16, 18 e 19. Neste conjunto encontram-se tecidos coloridos e escuros, com composições distintas. Por contraste, não existiu nenhum tecido no qual as manchas não fossem visualizadas com pelo menos um dos métodos. No tecido 4, as manchas depositadas não foram identificadas com auxílio das fontes de luz IV e azul, no entanto para um olho treinado as mesmas são detetáveis com recurso a luz branca. Atendendo aos resultados obtidos para a luz IV, pode verificar-se que a mesma não permitiu identificar manchas de sangue nos tecidos 10, 11, 12 e 17. Com base na Tabela 7, presente no capítulo anterior, onde constam a coloração e composição dos vários têxteis, constatou-se que todos os anteriores são compostos por nylon, o qual é utilizado, sobretudo, em vestuário impermeável. Neste sentido, as manchas podem não ser visíveis devido à elevada reflexão do material ou a interferências provocadas pelo tratamento de impermeabilização. Todavia, neste material a luz azul permitiu visualizar as diversas manchas.

Nos tecidos 5, 7, 13, 14, 15 e 20, todos eles escuros, a olho nu as manchas de sangue são impercetíveis ou o seu aspeto pouco sugestivo de sangue. Ainda assim, em todos estes têxteis a luz IV permitiu identificar eficazmente as três manchas e distingui-las, por exemplo, de descolorações do tecido (Figura 24). O mesmo não se verificou com a luz azul que, embora tenha permitido visualizar algumas das manchas, proporcionou um baixo contraste entre os tecidos e as mesmas.



**Figura 24.** Exemplo de um tecido (A) no qual existem ambas manchas de sangue (indicador vermelho) e descolorações (indicador amarelo) e respetiva fotografia com luz IV (B).

Tal como referido no capítulo anterior, de modo a determinar a eficácia das fontes de luz infravermelha e azul, foi realizada uma análise de contraste. Adicionalmente, através dos resultados obtidos, procurou determinar-se o efeito do fator tempo na identificação das manchas, dado que a coloração do sangue sofre alterações com a idade. Os contrastes calculados foram o resultado da subtração da intensidade das manchas de sangue à intensidade do fundo, que neste caso será o tecido. As regiões de interesse foram escolhidas de modo a manter as mesmas condições ao longo dos três períodos temporais avaliados. Em alguns dos tecidos verificou-se que as manchas na zona de deposição do sangue apresentavam uma coloração mais clara do que na restante porção. Por conseguinte, foi avaliado o efeito deste fenómeno na análise, através do cálculo da intensidade de três regiões diferentes da mancha, sendo uma delas a região “clara” (Figura 25). Uma vez que se constatou que nestas zonas os valores de intensidade eram significativamente mais elevados que nas restantes, sempre que tal se verificou a região de interesse escolhida não incluiu esta área para que o valor de contraste não ficasse reduzido relativamente às outras manchas, que por vezes se encontravam menos destacadas e obtinham valores superiores de contraste.



	1	2	3	4	5	6
Intensidade	72	122	90	112	177	89

**Figura 25.** Exemplo de dois tecidos (tecido 5-A e tecido 13-B) em que na zona de deposição a mancha adquiriu uma coloração mais clara e intensidade de três regiões distintas da mancha (pontos 1 a 6).

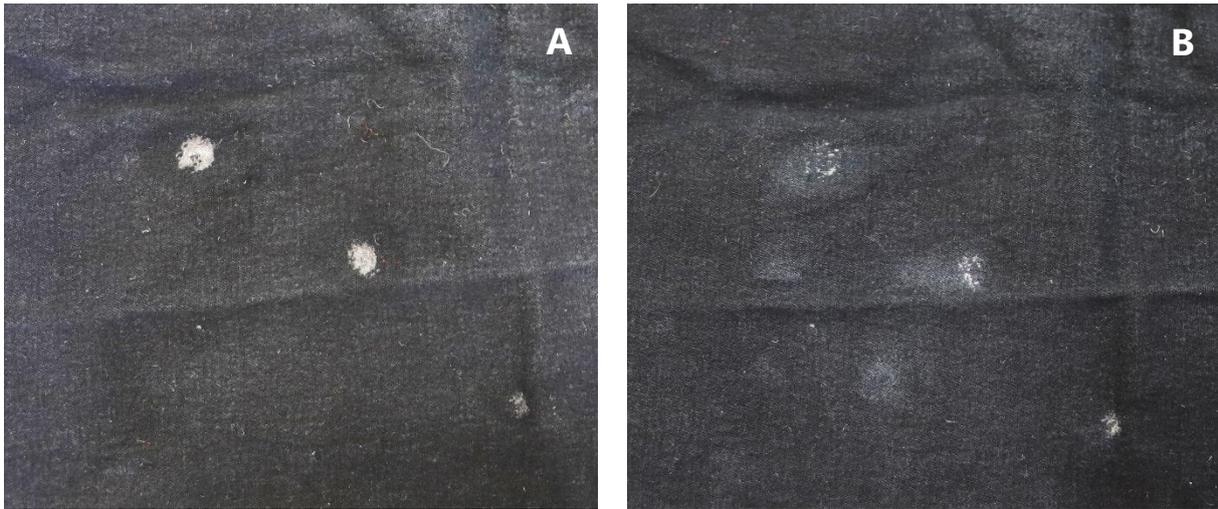
Seguidamente são apresentados os contrastes calculados para as diferentes fontes de luz, nos períodos 2 dias, 2 semanas e 2 meses (Tabela 16).

**Tabela 16.** Contrastes proporcionados pelas luzes infravermelha e azul nos vinte tecidos, após 2 dias, 2 semanas e 2 meses da deposição das manchas de sangue.

Tecido	Luz Infravermelha			Luz azul		
	2 dias	2 semanas	2 meses	2 dias	2 semanas	2 meses
1	10.19	17.39	44.60	10.47	24.52	37.05
2	40.37	26.80	20.82	7.12	6.81	9.34
3	51.87	53.65	49.37	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
5	28.23	34.78	36.30	2.95	4.28	4.03
6	70.90	68.79	66.00	23.00	25.69	20.76
7	39.67	4.71	3.21	9.21	9.88	13.78
8	42.28	22.02	20.55	9.38	13.94	20.38
9	52.76	35.01	33.25	22.46	35.61	28.16
10	0.00	0.00	0.00	23.35	20.51	18.37
11	0.00	0.00	0.00	19.24	19.81	17.29
12	0.00	0.00	0.00	6.75	7.88	6.10
13	44.44	48.78	40.06	35.00	35.57	35.67
14	10.98	8.22	14.12	0.00	0.00	0.00
15	62.47	35.34	58.41	0.00	0.00	0.00
16	28.56	18.98	14.14	17.00	16.54	18.80
17	0.00	0.00	0.00	13.55	10.19	11.77
18	28.02	20.30	26.22	29.00	31.63	27.07
19	13.98	15.40	9.35	23.13	23.61	26.34
20	13.63	12.48	9.84	0.00	0.00	0.00

A análise da Tabela 16 foi dividida em três partes, sendo interpretados individualmente os resultados de cada fonte de luz e, posteriormente, realizada a comparação entre os mesmos. Posto isto, focando nos contrastes alcançados pela luz IV, verifica-se que ocorreram variações significativas nos tecidos 1, 2, 7, 8, 9, 15 e 16. No geral, nestes têxteis o contraste diminui com a idade das manchas, contudo no tecido 1 ocorreu a situação inversa, isto é, o contraste entre a mancha e o tecido aumentou com a idade. Esta ocorrência pode ser consequência da oxidação do sangue que, neste tecido em particular, leva a uma alteração de coloração mais evidenciada. O sangue com o tempo oxida e escurece, passando de vermelho a um tom acastanhado. Visto que o tecido 1 também é vermelho, ambos absorvem a radiação de forma semelhante, o que se reflete num baixo contraste, que aumenta à medida que a mancha de sangue escurece. Para além disso, este material também apresenta um elevado grau de reflexão, que interfere com a forma como a radiação interage com o sangue nele depositado. Porém, o mesmo não se verifica no seu interior, presentemente denominado de tecido 2. O interior do tecido, para além da diferença anterior, é também mais absorvente, o que muda drasticamente o aspeto das manchas e a sua interação com a luz IV. No tecido 7 o contraste diminui excecionalmente entre os 2 dias e as 2 semanas. Por inspeção visual observou-se uma modificação na cor das manchas, de escuras para claras, que pode ser reflexo de uma alteração nas propriedades do sangue (Figura 26). Os tecidos com melhores contrastes foram o 3, 6, 9, 13 e 15. Estes têm em comum o facto de serem porosos e, conseqüentemente, bastante absorventes, no entanto, devido às propriedades das diferentes fibras têxteis, as manchas de sangue apresentaram aspetos bastante díspares. A variação de contraste verificada no tecido 15 aparenta estar relacionada com o método de aquisição de imagem e não com alterações sofridas pelo sangue.

Com a fonte de luz azul apenas se observaram variações significativas nos contrastes obtidos pelos tecidos 1, 8 e 9, sendo que, no tecido 9, tal como anteriormente, as alterações de contraste aparentam estar relacionadas com o método de aquisição. No geral, os contrastes fornecidos por esta fonte de luz são inferiores aos observados com luz IV, sobretudo em tecidos escuros, o que corrobora as informações presentes na bibliografia quanto à sua eficácia nestes substratos. Tal como supramencionado, a utilização de luz azul, nos tecidos em análise, foi crucial para a deteção e realce de manchas de sangue em tecidos constituídos por nylon.

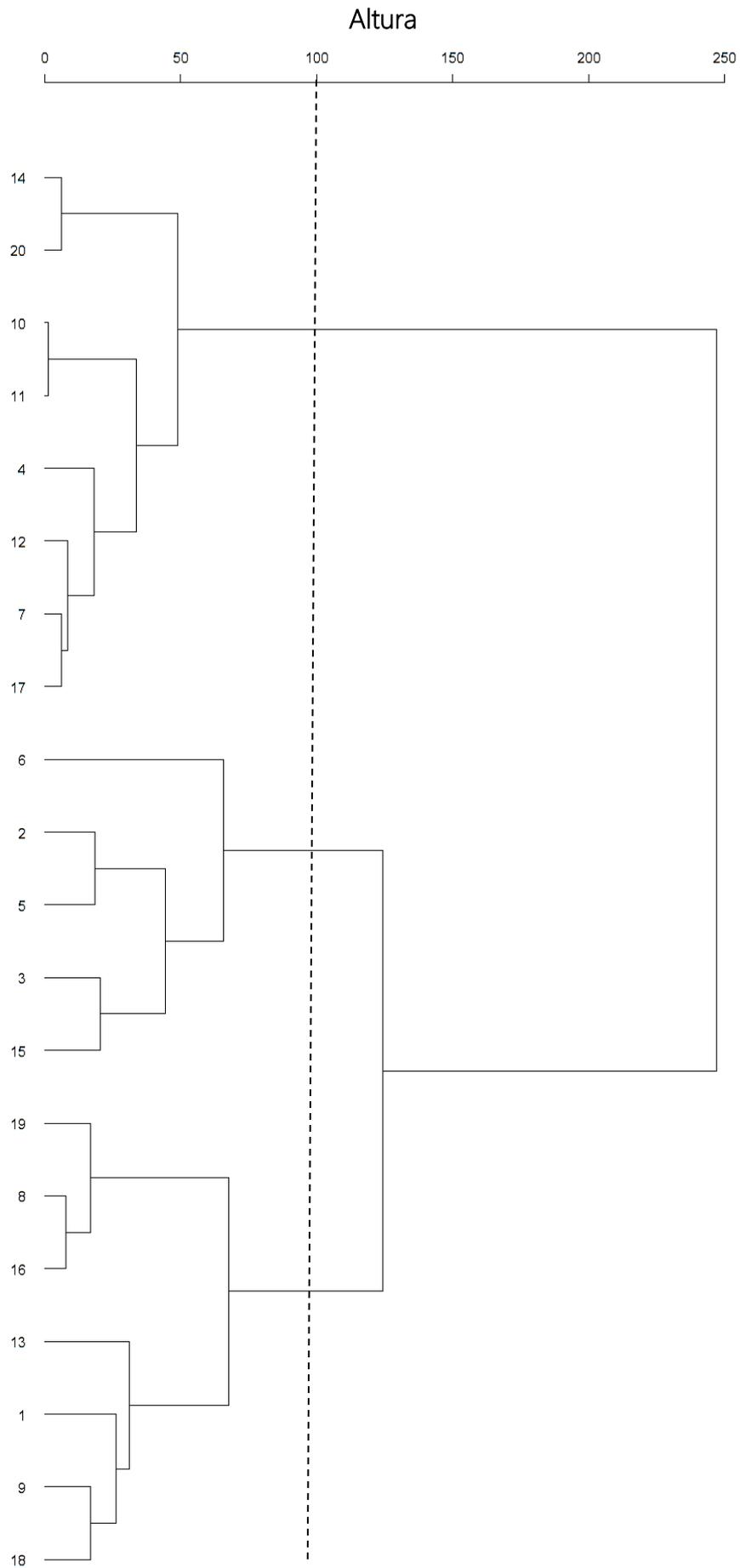


**Figura 26.** Diferenças observadas na coloração das manchas, no tecido 7, entre os 2 dias (A) e as 2 semanas (B), com recurso a luz branca. Nota: a película existente na imagem da esquerda foi removida antes das análises com a fonte de luz restando apenas o que consta na imagem da direita.

Analisando a Tabela 16 como um todo, pode verificar-se que algumas manchas apresentam um contraste bastante reduzido relativamente ao substrato, pelo que, numa situação normal em que se desconhece a localização ou existência de manchas, estas dificilmente seriam detetadas. Adicionalmente, não foi encontrada nenhuma ligação entre os resultados obtidos para os vários tipos de tecido, isto é, com exceção do nylon, o material e a composição do tecido, apesar de influenciarem os resultados, não determinam a forma como o tecido ou o sangue reagem com as diversas fontes de luz. Apesar de este ser um estudo exploratório onde foi utilizado um número reduzido de amostras, foram identificadas algumas possíveis interferências que devem ser alvo de futuro estudo, através da utilização de mais exemplares de têxteis com o mesmo material.

Ainda de modo a analisar a totalidade dos contrastes, foi efetuada uma análise de agrupamentos hierárquica sobre os dados. Esta permitiu estabelecer uma relação entre os vários tecidos, distribuindo-os por grupos, de modo a que existisse homogeneidade dentro dos grupos e heterogeneidade entre grupos. O dendrograma construído através da HCA, utilizando o método de ligação de Ward, consta na Figura 27.

**Figura 27.** Dendrograma obtido através de HCA, utilizando o método de ligação de Ward, realizada sobre os resultados da análise de contraste.



Através da análise da Figura 27, são identificáveis três grupos distintos. O agrupamento maior (4, 7, 10, 11, 12, 14, 17 e 20) contém os tecidos onde se obtiveram valores de contraste reduzidos com ambas as fontes de luz, ou, por vezes, inexistência de contraste entre a mancha e o substrato. Neste conjunto foram incluídos todos os tecidos de nylon e alguns têxteis de diferentes composições. Seguidamente, formou-se um agrupamento (2, 3, 5, 6 e 15) com os tecidos em que a luz IV forneceu contrastes substancialmente superiores aos da luz azul, que, em determinados casos, obteve um contraste nulo. Os elementos deste grupo, embora tenham composições diferentes, são todos bastante absorventes e, devido à sua elevada espessura, retêm eficazmente todo o sangue depositado. O último agrupamento (1, 8, 9, 13, 16, 18 e 19) inclui os tecidos em que ambas as fontes de luz obtiveram contrastes satisfatórios. Os seus constituintes foram todos os tecidos de poliéster, assim como peles não absorventes, tanto naturais como sintéticas (poliuretano), ou seja, materiais com algum grau de reflexão. De modo a explorar mais profundamente as semelhanças existentes entre os constituintes de cada grupo, seria relevante estudar as propriedades óticas das fibras constituintes dos vários tecidos, assim como a sua porosidade, com recurso a técnicas de microscopia. Para além disso, deveriam ser testadas mais amostras com características semelhantes às analisadas, de modo a verificar se as mesmas fariam parte dos grupos expectáveis.

Por fim, ainda com recurso aos valores de contraste, foi estudada a influência do fator tempo nos resultados, isto é, se de facto o processo de oxidação e conseqüente mudança de coloração afetam consideravelmente o desempenho das fontes de luz. Para tal foi realizada uma análise de variância (ANOVA). A ANOVA é uma ferramenta estatística utilizada para distinguir a contribuição de diversos fatores independentes para a variância total. Assim, num conjunto de dados, a variância total é resultado de fatores sistemáticos e fatores aleatórios. Para a aplicação desta metodologia de análise devem ser utilizadas distribuições independentes e normais e deverá existir homogeneidade da variância [90]. Na ANOVA de fator único é estudado o efeito de um fator, seguidamente designado de A, sobre a variabilidade de um sistema. Deste modo, a variabilidade total ( $SS_T$ ) é decomposta em componente puramente aleatória ( $SS_{pe}$ ) e componente associada ao fator A ( $SS_A$ ), assim como na equação 3.1:

$$SS_T = SS_{pe} + SS_A \quad (3.1)$$

A variância total, puramente aleatória e derivada do fator são obtidas através da divisão dos termos da equação 3.1 pelos respectivos graus de liberdade, e representam-se da seguinte forma:

$$\sigma_T^2 = \sigma_{pe}^2 + \sigma_A^2 \quad (3.2)$$

A hipótese nula, denominada  $H_0$ , segue que o fator não tem efeito sobre a variabilidade total, enquanto que a hipótese alternativa,  $H_1$ , propõe que o fator tem efeito na mesma. Mais detalhadamente,  $H_0$  diz que se o fator A não tiver efeito na variabilidade, a sua contribuição será menor ou igual à da componente puramente aleatória. Por contraste,  $H_1$  diz que se esta for superior à aleatória, então será responsável pela introdução de variabilidade nos dados.

$$H_0: \sigma_A^2 \leq \sigma_{pe}^2 \quad H_1: \sigma_A^2 > \sigma_{pe}^2$$

O valor de prova,  $\alpha$ , traduz a probabilidade de aceitação da hipótese nula e fornece a informação relativa ao efeito do fator. Deste modo, se os valores de prova forem superiores a 0.05 é aceite  $H_0$ , contudo, se os valores forem inferiores a 0.01, esta deve ser rejeitada. Quando se registam valores intermédios a aceitação de  $H_0$  é dúbia.

Na tabela 17 encontram-se os resultados obtidos através da ANOVA de fator único.

**Tabela 17.** ANOVA de fator único, para o estudo do efeito do tempo na análise de contraste.

ANOVA						
Fonte de variação	SQ	gl	MQ	F	valor P	F crítico
Entre grupos	82.88	2	41.441	0.132	0.877	3.074
Dentro dos grupos	36802.12	117	314.548			
Total	36885	119				

O valor de prova para a hipótese nula foi de 0.877 e, visto que  $p[H_0] > 0.05$ , então a hipótese nula é aceite, o que indica que o fator tempo não influencia significativamente o contraste fornecido pelas fontes de luz nos vários tecidos avaliados.

# Capítulo IV

Conclusão



O LPC-PJ é a entidade responsável pela pesquisa, recolha e tratamento dos vestígios presentes no local do crime, pelo que lhes são exigidas as ferramentas e o conhecimento técnico-científico adequados. Assim sendo, é de particular importância a implementação de metodologias validadas que potenciem o valor probatório dos vestígios.

Embora os testes presuntivos luminol e KM sejam os mais apropriados para a rotina de trabalho do Setor de Local do Crime do LPC-PJ, devido ao seu manuseamento simples e bom desempenho geral, em situações limite os mesmos podem não fornecer resultados satisfatórios. Assim, torna-se relevante realizar uma análise comparativa entre estes e outros testes presuntivos utilizados atualmente, de modo a estabelecer quais os mais eficientes em diferentes cenários.

A implementação da pesquisa de vestígios com recurso a luz IV é relativamente recente e, embora exista alguma bibliografia sobre o tema, esta nem sempre é clara quanto às verdadeiras limitações desta e de outras fontes de luz. Então, dado que a utilização primária da luz IV é em substratos escuros, estes foram o foco do estudo realizado no âmbito da eficácia das fontes de luz.

O primeiro estudo realizado consistiu na avaliação da sensibilidade dos testes presuntivos, em dois substratos distintos. Numa fase inicial, em que foram realizados os controlos, foi identificado um resultado falso positivo do teste tetrabase, visto que o mesmo deu resultado positivo com o substrato cimento. Esta ocorrência demonstra a importância da realização de controlos e levou a que o teste tetrabase fosse excluído das análises realizadas em cimento, ao longo de todo o trabalho. Numa primeira análise, verificou-se que o método de aplicação (direto ou indireto) dos testes influencia bastante os resultados obtidos, sendo que todos os testes são mais sensíveis quando aplicados diretamente sobre o substrato. No geral, o teste KM foi o menos sensível, enquanto o luminol foi o mais sensível em ambos os substratos. Constatou-se também que a sensibilidade dos testes foi diferente nos dois materiais, o que comprova a influência do substrato na análise. Assim, foram identificados vários fatores que afetam os resultados, os quais justificam algumas das discrepâncias encontradas na literatura.

Posteriormente, foi testada a sensibilidade dos testes à presença de sangue em têxteis lavados. Entre as várias variáveis estudadas, o método de lavagem e a utilização de detergente tiveram maior influência sobre os resultados. Para além disso, verificou-se que as propriedades

e características dos tecidos afetam a sua absorvência e a reação dos testes presuntivos. De modo geral, os testes de aplicação direta, luminol e fluoresceína, obtiveram resultados bastante satisfatórios, em ambos os substratos utilizados. Assim, é aconselhada a sua utilização nestas circunstâncias, dado que além de serem bastante sensíveis à presença de sangue, permitem realizar o realce das manchas.

No estudo relativo à estabilidade das amostras após aquecimento a elevadas temperaturas, constatou-se que quanto mais resistentes e menos inflamáveis forem os materiais utilizados como substrato, menor será a degradação do sangue, existindo, portanto, maior probabilidade de os testes presuntivos reagirem positivamente. Embora ligeiramente mais sensíveis, os testes de aplicação direta destroem os padrões de sangue, impedindo a sua análise. Consequentemente, é mais adequada a utilização de um teste de raspagem, tal como o KM.

Para as várias situações analisadas foi possível estabelecer os testes presuntivos com melhor desempenho e, como tal, mais adequados. Todavia, devem ser realizados estudos futuros onde sejam incluídas novas variáveis e diferentes substratos.

Na análise de têxteis com recurso a fontes de luz, foi identificado apenas um tecido no qual as luzes IV e azul não permitiram identificar as manchas de sangue, o qual apresentava um padrão complexo em tons neutros. Assim, nestas condições é mais apropriada a utilização de luz branca para uma análise minuciosa do material. A luz IV provou ser bastante eficiente para a pesquisa de manchas, particularmente em tecidos escuros, tal como referido na literatura. Ainda assim, em tecidos constituídos por nylon esta foi incapaz de realçar as manchas de sangue. Futuramente, esta particularidade deve ser alvo de estudo, através da análise de mais amostras com a mesma composição. Por contraste, a luz azul permitiu visualizar as manchas de sangue neste material, pelo que se evidencia a importância de utilizar as fontes de luz IV e azul de forma complementar, testando ambas no substrato. Com recurso aos valores de contraste calculados, a HCA permitiu separar as amostras de acordo com o seu grau de semelhança e identificar algumas das tendências seguidas pelos dados, nomeadamente ao nível do material constituinte de cada tecido e da sua absorvência. Ainda assim, neste contexto, seria relevante realizar estudos futuros que permitissem estabelecer concretamente a semelhança existente entre os tecidos constituintes de cada agrupamento, por exemplo, através da análise das suas propriedades óticas e da sua porosidade. Perante o exposto,

é também essencial que sejam analisadas mais amostras de constituição semelhante às testadas, de modo a perceber se seguem as tendências verificadas no presente estudo. A ANOVA de fator único realizada com os contrastes proporcionados pelas fontes de luz aos 2 dias, 2 semanas e 2 meses, demonstrou que a idade da mancha não influencia a sua eficácia na pesquisa de sangue. É importante ressaltar que sendo este apenas um estudo exploratório, onde foi utilizado um número reduzido de amostras, as conclusões podem não se aplicar a todo o universo de têxteis, contudo serão um auxílio para futuras análises.



## Bibliografia

- [1] Ministério da Justiça, *Inspecção Judiciária - Manual de Procedimentos*, 1ª edição. Lisboa, 2009.
- [2] B. Antunes, "Apresentação cedida no âmbito do estágio académico no Laboratório de Polícia Científica," 2020.
- [3] M. Houck, F. Crispino, and T. McAdam, *The Science of Crime Scenes*. San Diego: Academic Press, 2012.
- [4] M. T. Miller and P. Massey, *The Crime Scene*. San Diego: Elsevier, 2016.
- [5] T. M. Nogueira, "Dissertação de Mestrado: Análise de Padrões de Manchas de Sangue – A importância médico-legal," Universidade do Porto, 2013.
- [6] P. L. Kirk, *Crime Investigation*. New York: Interscience Publishers, 1953.
- [7] M. M. Okuda and F. H. Stephenson, *A Hands-on Introduction to Forensic Science*. New York: CRC Press, 2015.
- [8] R. Seeley, T. Stephens, and P. Tate, *Essentials of anatomy and physiology*, 6th editio. Boston: McGraw-Hill, 2005.
- [9] J. Siegel and K. Mirakovits, *Forensic Science: the basics*, 2nd editio. Boca Raton: CRC Press, 2010.
- [10] O. Peschel, S. N. Kunz, M. A. Rothschild, and E. Mützel, "Blood stain pattern analysis," *Forensic Sci. Med. Pathol.*, vol. 7, no. 3, pp. 257–270, 2011, doi: 10.1007/s12024-010-9198-1.
- [11] S. H. James, P. E. Kish, and T. P. Sutton, *Principles of Bloodstain Pattern Analysis*. Boca Raton: CRC Press, 2005.
- [12] R. Li, *Forensic Biology*, 2nd editio. New York: CRC Press, 2015.
- [13] M. Finez and C. Chiarato, "Análise dos Padrões de Manchas de Sangue: A Física e a Biologia nas Cenas de Crimes," Faculdade Grã Tietê, 2019.
- [14] T. Bevel and R. M. Gardner, *Bloodstain Pattern Analysis: with an introduction to crime scene reconstruction*, 2nd editio. Boca Raton: CRC Press, 2002.
- [15] "Anatomy and Physiology," *OpenStax*. <https://openstax.org/books/anatomy-and-physiology/pages/1-introduction> (accessed Jul. 12, 2021).
- [16] B. Budowle, M. W. Allard, M. R. Wilson, and R. Chakraborty, "Forensics and Mitochondrial DNA: Applications, Debates, and Foundations," *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.*, vol. 4, pp. 119–141, 2003, doi: 10.1146/annurev.genom.4.070802.110352.
- [17] A. Y. Wonder, *Bloodstain Pattern Evidence: Objective Approaches and Case Applications*. Amsterdam: Elsevier, 2007.
- [18] R. M. Gardner, *Practical Crime Scene Processing and Investigation*. Boca Raton: CRC Press, 2004.
- [19] G. Schiro, "Collection and Preservation of Blood Evidence from Crime Scenes," 2018. <https://www.crime-scene-investigator.net/blood.html> (accessed Feb. 07, 2021).
- [20] K. Pokupcic, "Blood as an Important Tool in Criminal Investigation," *J. Forensic Sci.*, vol. 3, no. 2, 2017, doi: 10.19080/jfsci.2017.03.555615.
- [21] D. M. Castro and H. M. Coyle, "Review: Biological Evidence Collection and Forensic Blood Identification," University of New Haven, 2013.

- [22] B. A. J. Fisher and D. R. Fisher, *Techniques of Crime Scene Investigation*, 8th editio. New York: CRC Press, 2012.
- [23] A. Gunn, *Essential Forensic Biology*, 2nd editio. New Jersey: Wiley-Backwell, 2009.
- [24] J. M. J. M. Butler, *Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers*. San Diego: Academic Press, 2005.
- [25] D. Primorac and M. Schanfield, "Forensic DNA applications: An interdisciplinary perspective," *Croatian Medical Journal*, vol. 55, no. 4. CRC Press, pp. 434–436, 2014, doi: 10.3325/cmj.2014.55.434.
- [26] W. Goodwin, A. Linacre, and S. Hadi, *An Introduction to Forensic Genetics*, 2nd editio. Chichester: Wiley-Backwell, 2011.
- [27] R. Dumache, V. Ciocan, C. Muresan, and A. Enache, "Molecular DNA analysis in forensic identification," *Clin. Lab.*, vol. 62, no. 1–2, pp. 245–248, 2016, doi: 10.7754/Clin.Lab.2015.150414.
- [28] H. Miles, "Bloodstain Pattern Analysis: Developing quantitative methods of crime scene reconstruction through the interpretation and analysis of environmentally altered bloodstains," University College of London, 2014.
- [29] I. K. Pepper, *Crime Scene Investigation*, 2nd Editio. Berkshire: Open University Press, 2010.
- [30] T. Bevel and R. M. Gardner, *Bloodstain Pattern Analysis with an Introduction to Crime Scene Reconstruction*, 3rd editio. Boca Raton: CRC Press, 2008.
- [31] C. Study, L. Chamberlain, and B. Wendy, "Presumptive and Confirmatory Blood Testing," in *Forensic Science Reform: Protecting the Innocent*, Amsterdam: Academic Press, 2017, pp. 239–269.
- [32] J. Everett Baxter, *Complete Crime Scene Investigation Handbook*, 1st editio. Boca Raton: CRC Press, 2015.
- [33] L. Dilbeck, "Use of Bluestar Forensic in Lieu of Luminol at Crime Scenes," *J. Forensic Identif. Dent.*, vol. 56, no. 5, pp. 706–720, 2006.
- [34] F. Barni, S. W. Lewis, A. Berti, G. M. Miskelly, and G. Lago, "Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection," *Talanta*, vol. 72, pp. 896–913, 2007, doi: 10.1016/j.talanta.2006.12.045.
- [35] A. Nilsson, "The forensic luminol test for blood: unwanted interference and the effect on subsequent analysis," Linköping, 2006.
- [36] L. H. Santos, "Dissertação de Mestrado: Análise Automática de Gentamicina por Quimiluminescência," Universidade do Porto, 2008.
- [37] R. Silva, B. C. Agustini, A. Silva, and H. Frigeri, "Luminol in the forensic science," *J. Biotechnol. Biodivers.*, vol. 3, no. 4, pp. 172–177, 2012, doi: 10.20873/jbb.uft.cemaf.v3n4.rogiskisilva.
- [38] E. Chemello, "Ciência Forense: manchas de sangue," *Quim. Virtual*, 2007, [Online]. Available: [http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2007jan\\_forense2.pdf](http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2007jan_forense2.pdf).
- [39] J. L. Webb, J. I. Creamer, and T. I. Quickenden, "A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques," *Luminescence*, vol. 21, pp. 214–220, 2006, doi: 10.1002/bio.908.
- [40] L. Garofano, M. Pizzamiglio, A. Marino, A. Brighenti, and F. Romani, "A comparative study of the sensitivity and specificity of luminol and fluorescein on diluted and aged bloodstains and

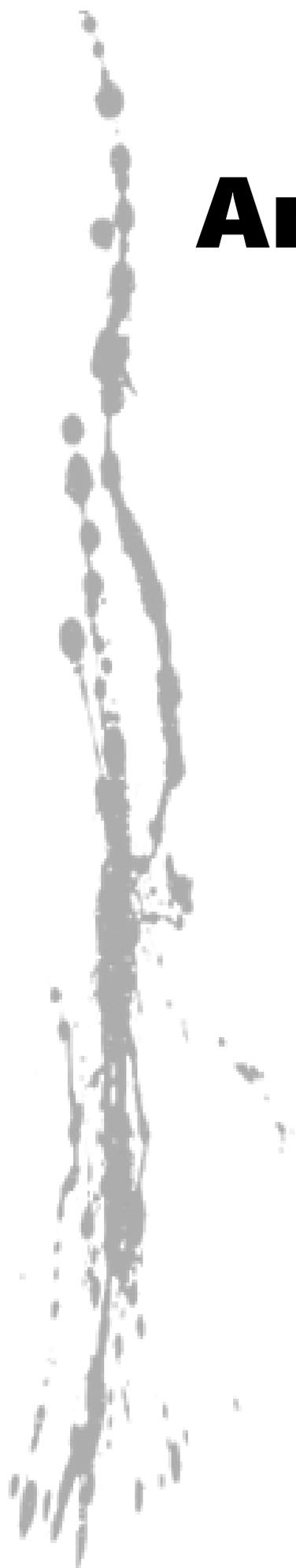
- subsequent STRs typing," vol. 1288, pp. 657–659, 2006, doi: 10.1016/j.ics.2005.10.048.
- [41] J. Butler, J. Chaseling, and K. Wright, "A Comparison of Four Presumptive Tests for the Detection of Blood on Dark Materials," *J. Forensic Sci.*, vol. 64, no. 6, pp. 1838–1843, doi: 10.1111/1556-4029.14091.
- [42] S. S. Tobe, N. Watson, and N. Daéid, "Evaluation of Six Presumptive Tests for Blood , Their Specificity , Sensitivity , and Effect on High," *J. Forensic Sci.*, vol. 52, no. 1, pp. 16–21, 2007, doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00324.x.
- [43] R. Andersson, "Master Thesis: An Evaluation of Two Presumptive Blood Tests and Three Methods to Visualise Blood," Linköping University, 2017.
- [44] C. Bonorino, J. Piva, D. Almeida, N. Glesse, and C. Bonorino, "Effect of presumptive tests reagents on human blood confirmatory tests and DNA analysis using real time polymerase chain reaction," *Forensic Sci. Int.*, vol. 206, no. 1–3, pp. 58–61, 2011, doi: 10.1016/j.forsciint.2010.06.017.
- [45] R. Cheeseman, "Fluorescein Bloodstain Detection Method," 5976886, 1999.
- [46] R. Tomboc, "The Fluorescein Method of Latent Blood Detection," Apr. 30, 2011. <https://www.crime-scene-investigator.net/fluoresceinmethod.html> (accessed Oct. 15, 2020).
- [47] L. Martin, "Master Thesis: DNA Recovery From Latent Blood After Identification by Fluorescein," University of Alaska Fairbanks, 2005.
- [48] M. Cheyne, "Master Thesis: Illuminating Latent Blood," University of Auckland, 2011.
- [49] J. Finnis, J. Lewis, and A. Davidson, "Comparison of methods for visualizing blood on dark surfaces," *Sci. Justice*, vol. 53, no. 2, pp. 178–186, 2013, doi: 10.1016/j.scijus.2012.09.001.
- [50] R. Cheesman and A. DiMeo, "Fluorescein as a Field-worthy Latent Bloodstain Detection System," *J. Forensic Identif.*, vol. 45, no. 6, pp. 631–645, 1995.
- [51] C. J. Jakovich, "STR Analysis Following Latent Blood Detection by Luminol , Fluorescein , and BlueStar," *J. Forensic Identif.*, vol. 57, no. 2, pp. 193–198, 2007.
- [52] B. Lomholt and N. Keiding, "Tetrabase, an alternative to benzidine and orthotolidine for detection of haemoglobin in urine," *Lancet.*, vol. 1, no. 8011, pp. 608–609, 1977, doi: 10.1016/s0140-6736(77)92044-x.
- [53] K. Van Dijck and M. Schaap, "Practicum Sporenleer Vaardigheidstoets." Nederlands Forensisch Instituut, 2008.
- [54] N. F. Instituut, "Forensisch onderzoek van sporen van lichaamsvloeistoffen," in *De Essenties van forensisch DNA-onderzoek*, no. 3, Den Haag: Nederlands Forensisch Instituut, 2007, pp. 7–8.
- [55] G. Durnez, "Master Thesis: Bloedvlekkentest Met Tetrabase Voor Forensische Doeleinden," Universiteit Gent, 2019.
- [56] W. Makkinga, "Validatierapport RSID™Blood Field Kit," 2010.
- [57] R. E. Gaensslen and F. R. Camp, "Identification of Blood," in *Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry*, Washington: National Institute of Justice, 1983, pp. 73–145.
- [58] O. Girdwood, "The Kastle-Meyer Test for Blood," *Br. Med. Journal*, vol. 1, p. 808, 1926, doi: <https://doi.org/10.1136/bmj.1.3406.650>.
- [59] R. I. Fonseca, E. Ricci, H. Spinosa, M. M. Bernardi, G. R. de Abreu, and P. A. F. Waziry, "Actual

- trends in the use of the kastle-meyer test: applications in different species and verification of the limit of detection of sensitivity and vestigiality," no. July, pp. 6–11, 2019, doi: 10.15406/jdvar.2019.08.00261.
- [60] F. Casali, S. A. Ciavaglia, C. Gannicliffe, N. Lidstone, and L. M. I. Webster, "Validation of presumptive tests for non-human blood using Kastle Meyer and Hemastix reagents," *Sci Justice*, vol. 60, no. 1, pp. 30–35, 2020, doi: 10.1016/j.scijus.2019.10.003.
- [61] J. Sloots, W. Lalonde, B. Reid, and J. Millman, "Kastle–Meyer blood test reagents are deleterious to DNA," *Forensic Sci. Int.*, vol. 281, pp. 141–146, 2017, doi: 10.1016/j.forsciint.2017.10.006.
- [62] M. Vennemann, G. Scott, L. Curran, F. Bittner, and S. S. Tobe, "Sensitivity and specificity of presumptive tests for blood, saliva and semen," *Forensic Sci Med Pathol*, vol. 10, pp. 69–75, 2014, doi: 10.1007/s12024-013-9515-6.
- [63] E. Johnston *et al.*, "Comparison of Presumptive Blood Test Kits Including Hexagon OBTI," *J. Forensic Sci.*, vol. 53, no. 3, pp. 687–689, 2008, doi: 10.1111/j.1556-4029.2008.00727.x.
- [64] S. Ashutosh, "Sensitivity of phenolphthalein and benzidine tests in field of Forensic sciences," *Int. J. Res. Cult. Soc.*, vol. 1, no. 4, pp. 1–7, 2017.
- [65] N. S. Alenazy, A. M. Refaat, and S. R. Babu, "Comparison of the effects of two presumptive test reagents on the ability to obtain STR profiles from minute bloodstains," *Egypt. J. Forensic Sci.*, vol. 5, no. 3, pp. 103–108, 2015, doi: 10.1016/j.ejfs.2015.01.007.
- [66] S. M. Casey and H. M. Stinnett, "Bachelor Thesis: Gory Dactyloscopy," Worcester Polytechnic Institute, 2009.
- [67] A.-S. Advenier, B. Paris, and E. Piaton, "Bloodstain Evidence: From Human Blood Identification to DNA Profiling," *Ann. Forensic Res. Anal.*, vol. 5, no. 1, p. 1049, 2018.
- [68] K. Virkler and I. K. Lednev, "Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene," *Forensic Sci. Int.*, vol. 188, pp. 1–17, 2009, doi: 10.1016/j.forsciint.2009.02.013.
- [69] M. Cox and D. Ed, "A Study of the Sensitivity and Specificity of Four Presumptive Tests for Blood," *J. Forensic Sci.*, vol. 36, no. 5, pp. 1503–1511, 1991.
- [70] C. Gomes *et al.*, "Presumptive tests: A substitute for Benzidine in blood samples recognition," *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, vol. 6, pp. 1–3, 2017, doi: 10.1016/j.fsigss.2017.09.213.
- [71] K. Tsukada, Y. Harayama, M. Shimizu, Y. Kurasawa, and K. Kasahara, "Influence of presumptive reagents on DNA typing," *Forensic Sci. Int. Genet. Suppl. Ser.*, vol. 3, no. 1, pp. 375–376, 2011, doi: 10.1016/j.fsigss.2011.09.049.
- [72] A. C. Y. Lin, H. M. Hsieh, L. C. Tsai, A. Linacre, and J. C. I. Lee, "Forensic applications of infrared imaging for the detection and recording of latent evidence," *J. Forensic Sci.*, vol. 52, no. 5, pp. 1148–1150, 2007, doi: 10.1111/j.1556-4029.2007.00502.x.
- [73] W. Lee and B. Khoo, "Forensic Light Sources for Detection of Biological Evidences in Crime Scene Investigation: A Review," *Malaysian J. Forensic Sci.*, vol. 1, pp. 17–27, 2010.
- [74] G. Edelman, V. Manti, S. M. Van Ruth, T. Van Leeuwen, and M. Aalders, "Identification and age estimation of blood stains on colored backgrounds by near infrared spectroscopy," *Forensic Sci. Int.*, 2012, doi: 10.1016/j.forsciint.2012.03.009.
- [75] V. Sterzik, S. Panzer, M. Apfelbacher, and M. Bohnert, "Searching for biological traces on different materials using a forensic light source and infrared photography," *Int. J. Legal Med.*,

- vol. 130, no. 3, pp. 599–605, 2016, doi: 10.1007/s00414-015-1283-2.
- [76] M. E. James, "Degrees of contrast: Detection of latent bloodstains on fabric using an alternate light source (ALS) and the effects of washing," *J. Forensic Sci.*, vol. 66, no. 3, pp. 1–9, 2020, doi: 10.1111/1556-4029.14643.
- [77] N. Vandenberg and R. A. H. Van Oorschot, "The use of Polilights in the detection of seminal fluid, saliva, and bloodstains and comparison with conventional chemical-based screening tests," *J. Forensic Sci.*, vol. 51, no. 2, pp. 361–370, 2006, doi: 10.1111/j.1556-4029.2006.00065.x.
- [78] National Institute of Justice, "DNA Analyst Training- Laboratory Training Manual." Washington, 2008.
- [79] Society for Industrial and Applied Mathematics, "Digital Image Basics," 2011. <https://www.whylomath.org/node/wavlets/imagebasics.html> (accessed Mar. 31, 2021).
- [80] J. A. Bunge and D. H. Judson, *Encyclopedia of Social Measurement*. Elsevier, 2005.
- [81] J. A. S. Almeida, L. M. S. Barbosa, A. A. C. C. Pais, and S. J. Formosinho, "Improving hierarchical cluster analysis: A new method with outlier detection and automatic clustering," *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, vol. 87, no. 2, pp. 208–217, 2007, doi: 10.1016/j.chemolab.2007.01.005.
- [82] S. Henriques, "Análise Espacial e Temporal de uma Base de Dados Criminais," Universidade de Coimbra, 2014.
- [83] "Ward's Method," *Pennsylvania State University*. <https://online.stat.psu.edu/stat505/lesson/14/14.7> (accessed Jun. 01, 2021).
- [84] H. Z. W. Grotto, "Diagnóstico laboratorial da deficiência de ferro," *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.*, vol. 32, no. 2, pp. 22–28, 2010, doi: 10.1590/S1516-84842010005000046.
- [85] "Dress Shirt Fabric Weaves Guide." <https://www.batchmens.com/pages/dress-shirt-fundamentals-shirt-fabrics-and-weaves-guide> (accessed Jul. 29, 2021).
- [86] S. Mushtaq, N. Rasool, and S. Firiyal, "Detection of dry bloodstains on different fabrics after washing with commercially available detergents," *Aust. J. Forensic Sci.*, vol. 48, no. 1, pp. 87–94, 2016, doi: 10.1080/00450618.2015.1029971.
- [87] M. Hofmann *et al.*, "Detectability of bloodstains after machine washing," *Int. J. Legal Med.*, vol. 133, no. 1, pp. 3–16, 2019, doi: 10.1007/s00414-018-1897-2.
- [88] D. Howard, J. Chaseling, and K. Wright, "Detection of blood on clothing laundered with sodium percarbonate," *Forensic Sci. Int.*, vol. 302, no. 109885, pp. 1–9, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.FORSCIINT.2019.109885.
- [89] B. Bastide, G. Porter, and A. Renshaw, "The effects of heat on the physical and spectral properties of bloodstains at arson scenes," *Forensic Sci. Int.*, vol. 325, p. 110891, Aug. 2021, doi: 10.1016/J.FORSCIINT.2021.110891.
- [90] W. Kenton, "Analysis of Variance (ANOVA)," Feb. 08, 2021. <https://www.investopedia.com/terms/a/anova.asp> (accessed Jul. 10, 2021).



# Anexos





## Anexo I- Excerto de relatório de Interpretação de Padrões de Manchas de Sangue, em contexto de simulação.



RELATÓRIO DE EXAME PERICIAL  
SIMULAÇÃO  
BLOODSTAIN PATTERN ANALYSIS

Finda a fixação fotográfica, procedeu-se à análise e interpretação de eventuais padrões de manchas de sangue existentes no apartamento alvo de exame. Para tal, foram tomadas por base as propriedades físicas do sangue as quais permitem um estudo ponderado da forma, tamanho e dispersão das manchas de sangue, assim como do seu relacionamento com a cena envolvente, possibilitando a determinação dos acontecimentos de natureza física que estiveram na sua origem.

A análise e interpretação dos padrões de manchas e salpicos de sangue existentes no local, foi realizada segundo os procedimentos emanados pela Associação Internacional de Analistas de Padrões de Sangue, e usando a terminologia recomendada pelo Grupo Científico de Trabalho sobre Análises de Padrões de Sangue (SWGSTAIN).

Desta análise resultou a referenciação de diversas manchas supostamente hemáticas que seguidamente se descrevem pormenorizadamente. De salientar que foram ainda detetadas diversas outras manchas no interior da habitação, as quais não foram alvo de referenciação por estarem já muito alteradas por ação de terceiros e/ou não serem pertinentes para a interpretação dos padrões de manchas e salpicos de sangue existentes no local.

Note-se ainda que sobre as manchas supostamente hemáticas foi efetuada a pesquisa da peroxidase existente no sangue, pelo teste de Kastle-Mayer, tendo o resultado em todas elas sido positivo. As manchas que designámos inicialmente como supostamente hemáticas serão designadas a partir de agora por manchas de sangue, dado que o resultado destas ao teste Kastle-Mayer foi **positivo**.

A **zona 1** foi atribuída à parede do lado direito do *hall* e ao chão junto à mesma, tendo em consideração a perspetiva de quem entra no apartamento. Os vários padrões identificados são apresentados detalhadamente ao longo dos pontos seguintes.



**Fotos 25 e 26.** Localização da zona 1.

Na parede pertencente à **zona 1**, apresentada na **Foto 26**, foram identificados cinco (5) padrões de manchas de sangue:

- **Vestígios 1.A, 1.B e 1.C:** Na região superior da parede, foram detetados três (3) padrões de manchas de sangue. Após uma análise minuciosa, tendo em conta as características das manchas, tais como a presença de bolhas de ar, conclui-se que se tratavam de **padrões de expiração** (padrão de manchas de sangue resultante de sangue forçado através de um fluxo de ar para fora do nariz, boca ou uma ferida).
- **Vestígio 1.D:** Na região superior esquerda da parede, junto ao corredor, foi detetado um (1) padrão que de acordo com as suas características, nomeadamente a existência de movimento relativo entre a superfície ensanguentada e não ensanguentada, conclui-se que se tratava de um **movimento padrão** (padrão de manchas de sangue resultante da transferência de sangue; de um sangue procedente/transportado de uma superfície para outra superfície, com características que indicam o movimento relativo entre as duas).
- **Vestígio 1.E:** Na região inferior da parede, foi detetado um (1) padrão onde verificou a existência de uma alteração causada pelo movimento de um dado objeto através da mancha pré-existente e ainda húmida, ou seja, conclui-se a presença de um (1) **padrão de limpeza** (padrão de manchas de sangue alteradas, resultantes do movimento de um objeto numa mancha de sangue húmida).

Neste contexto são de destacar os **vestígios 1.A, 1.B e 1.C**, correspondentes a **padrões de expiração**, que face à sua natureza e localização, indicam a ocorrência de pelo menos três (3) agressões, onde se verifica proximidade entre o agressor e a vítima.

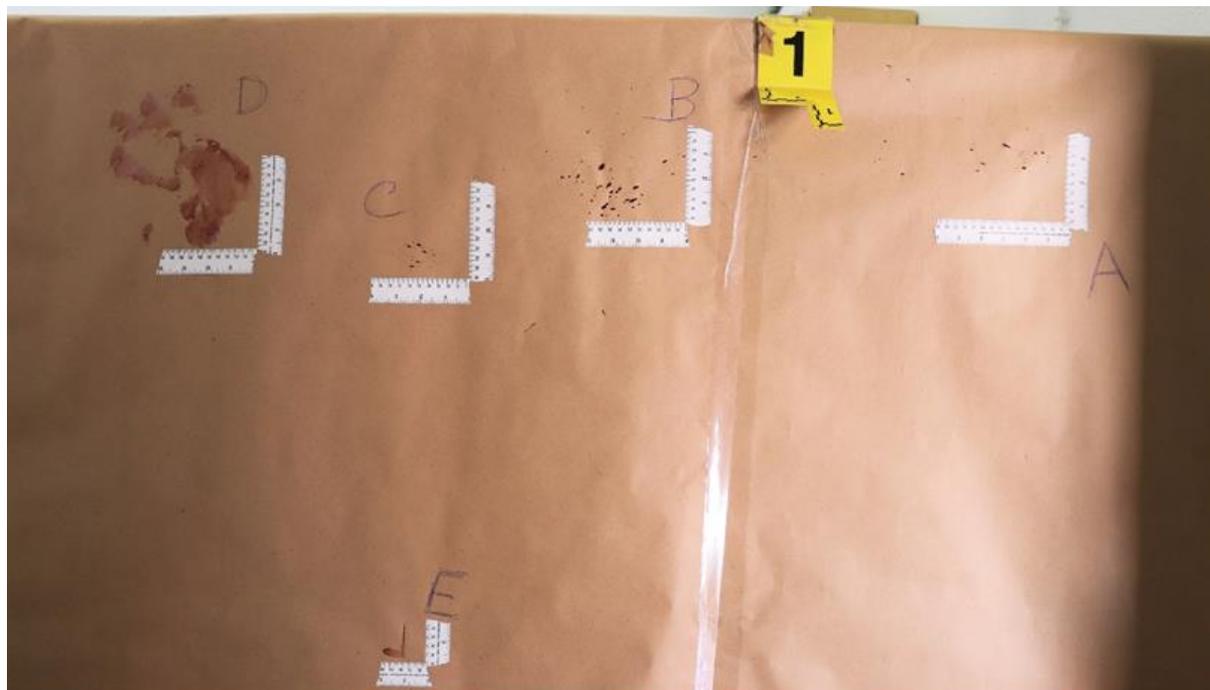


Foto 27. Localização e enquadramento dos vestígios 1.A, 1.B, 1.C, 1.D e 1.E.



Foto 28. Pormenor do vestígio 1.A.



Fotos 29 e 30. Pormenor do vestígio 1.B.



Fotos 31 e 32. Pormenor do vestígio 1.C.

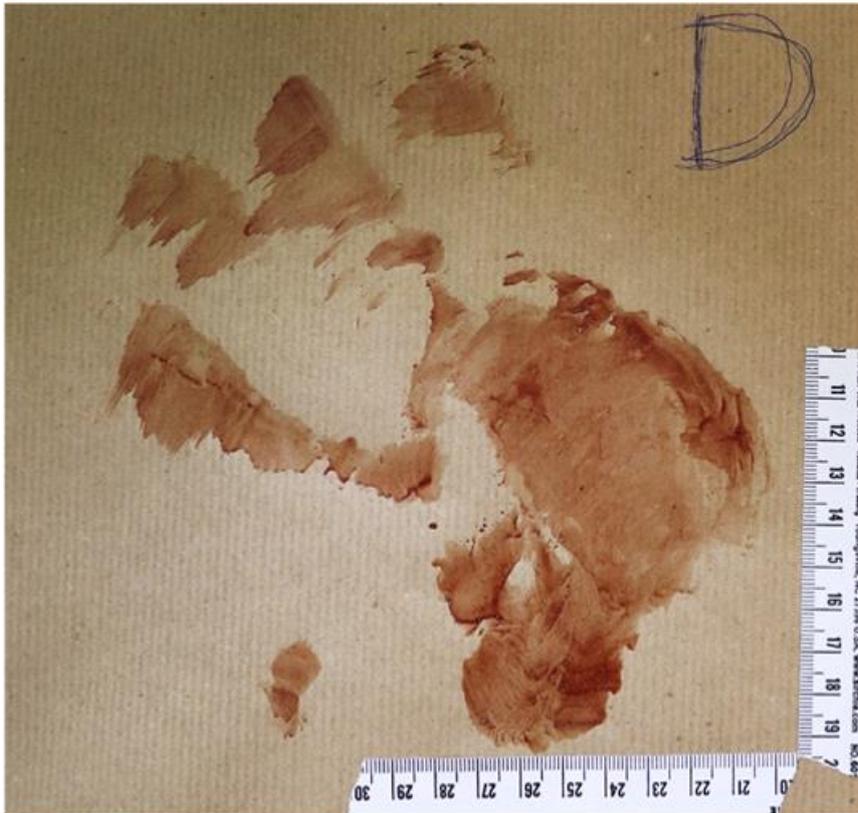


Foto 33. Pormenor do vestígio 1.D.

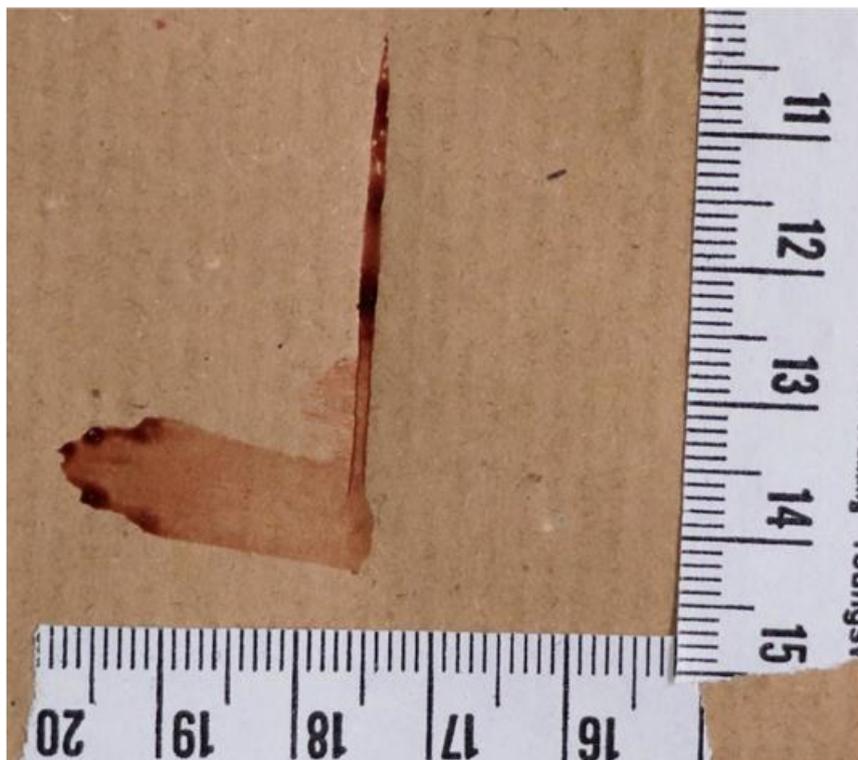


Foto 34. Pormenor do vestígio 1.E.

No chão pertencente à **zona 1**, apresentado na **Foto 27**, foram identificados dois (2) padrões de manchas de sangue:

- **Vestígio 1.F2:** Sensivelmente junto à porta de entrada, no encaminhamento para a sala de estar foi detetado um (1) **padrão de gota** (padrão de manchas de sangue resultante de um líquido que pinga em cima de outro líquido e em que pelo menos um deles é sangue) onde se constatou a existência de **manchas satélites** (pequena mancha de sangue que se produziu durante a formação da mancha origem/fonte, como resultado do impacto do sangue com a superfície) no seu redor.
- **Vestígio 1.F1:** Após uma observação minuciosa das **manchas satélite** do vestígio 1.F2, verificou-se a existência de duas (2) zonas onde o padrão foi interrompido. A falta de manchas de sangue numa determinada região sugere a presença de um (1) objeto ou objetos aquando da produção do padrão, os quais foram posteriormente retirados. Assim, pela análise pode-se atribuir a classificação de **vazio** (falta/ausência de sangue numa mancha de sangue ou padrão de manchas de sangue). Além disso, tendo em consideração a sua forma, este pode ser resultado da posição da fonte relativamente ao padrão.
- **Vestígio 1.G:** Junto aos vestígios 1.F1 e 1.F2, foram identificados dois (2) **padrões de gota** (padrão de manchas de sangue resultante de um líquido que pinga em cima de outro líquido e em que pelo menos um deles é sangue).

Finda a análise da **zona 1** e atendendo às características dos padrões detetados, sobretudo a quantidade de sangue associada à produção dos padrões de expiração, identificados como 1.A, 1.B e 1.C, esta região foi definida como o início das agressões.

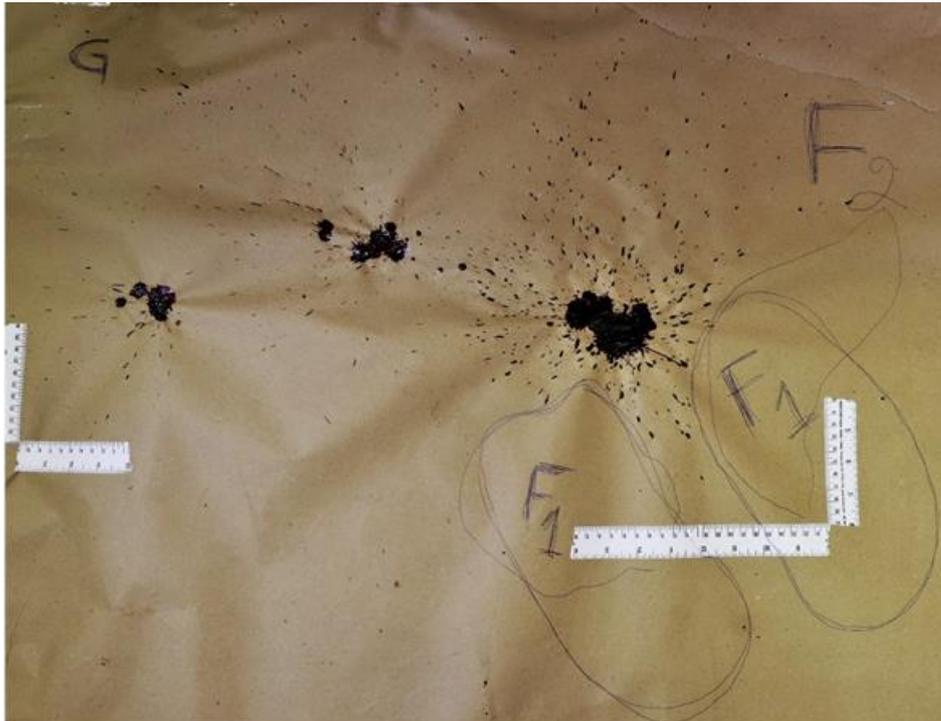


Foto 35. Localização e enquadramento e identificação dos vestígios 1.F1, 1.F2 e 1.G.

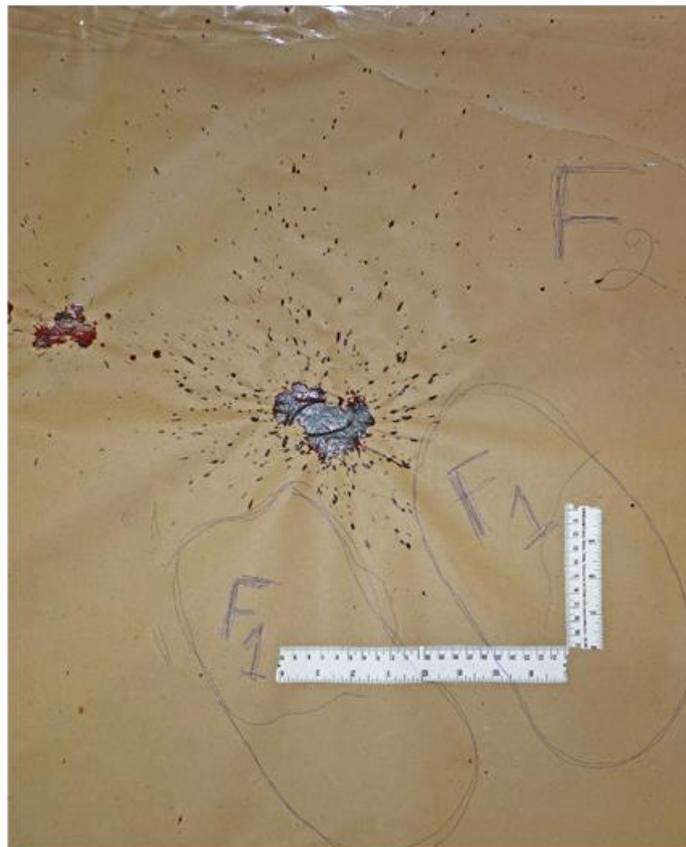


Foto 36. Pormenor do vestígios 1.F1 e 1.F2.



Foto 37. Pormenor do vestigio 1.G.

A **zona 2** foi atribuída ao canto direito da sala de estar, junto à entrada, de acordo com a perspetiva de quem entra. Os vários padrões identificados são apresentados detalhadamente ao longo dos pontos seguintes.



Foto 38. Localização zona 2.

Na parede contígua com a entrada na sala de estar, pertencente à **zona 2**, foram identificados cinco (5) padrões de manchas de sangue:

- **Vestígio 2.A:** Na região superior da parede, sensivelmente do lado direito, foi detetado um (1) padrão que, atendendo às suas características tais como, tamanho e dispersão, conclui-se que se tratava de **salpicos dianteiros** (padrão de manchas de sangue resultante de gotas de sangue que voam na mesma direção que a força do impacto). Esta observação foi corroborada pela existência de um (1) orifício na parede cujas características se assemelham às provocadas por projéteis de arma de fogo.
- **Vestígio 2.B:** Ainda na região superior da parede, junto ao vestígio 2.A., foi detetado uma (1) **mancha de transferência** (mancha de sangue resultante do contacto entre uma superfície transportando sangue sobre outra superfície).

- **Vestígio 2.C:** Sensivelmente à esquerda do padrão identificado como 2.B., foi identificado um (1) padrão no qual se verifica a existência de uma alteração causada pelo movimento de um dado objeto através da mancha pré-existente e ainda húmida, ou seja, conclui-se a presença de um (1) **padrão de limpeza** (padrão de manchas de sangue alteradas, resultantes do movimento de um objeto numa mancha de sangue húmida).
- **Vestígio 2.D:** Na região inferior da parede, lado esquerdo, foi detetado um (1) padrão que após uma análise minuciosa e de acordo com as suas características, tais como, dispersão em forma de “V”, concluiu-se que se tratava de um (1) **padrão de impacto** (padrão de manchas de sangue resultante de um objeto que toca/bate em sangue líquido), padrão característico resultante de uma agressão.
- **Vestígio 2.E:** Na região inferior da parede, sensivelmente abaixo do padrão de impacto, verificou-se a interrupção do padrão de manchas de sangue em toda a região, o que sugere a presença de um (1) objeto ou objetos aquando da produção do padrão, os quais foram posteriormente retirados. Pela análise pode-se atribuir a classificação de **vazio** (falta/ausência de sangue numa mancha de sangue ou padrão de manchas de sangue).



Foto 39. Localização e enquadramento dos vestígios 2.A, 2.B, 2.C, 2.D e 2.E.

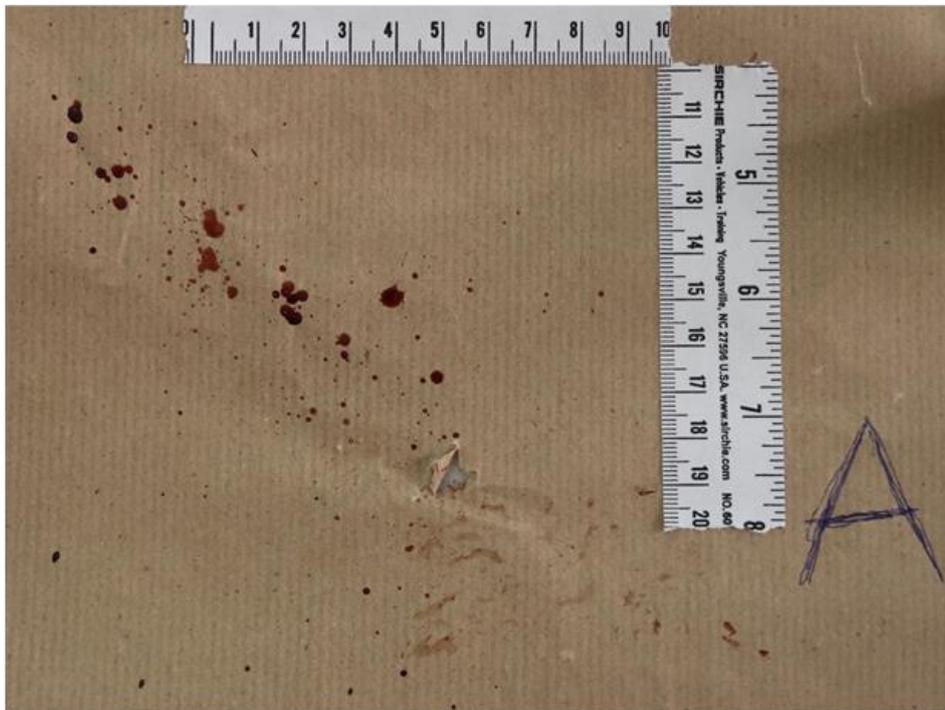


Foto 40. Pormenor do vestígio 2.A.

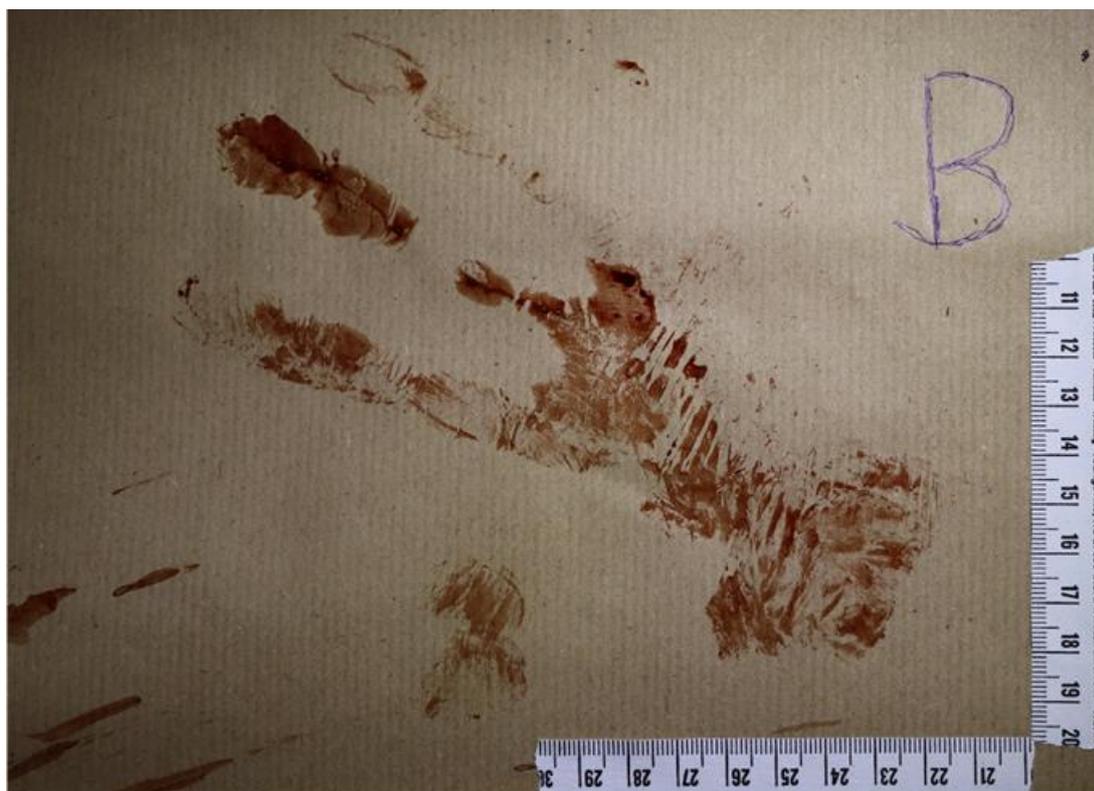


Foto 41. Pormenor do vestígio 2.B.

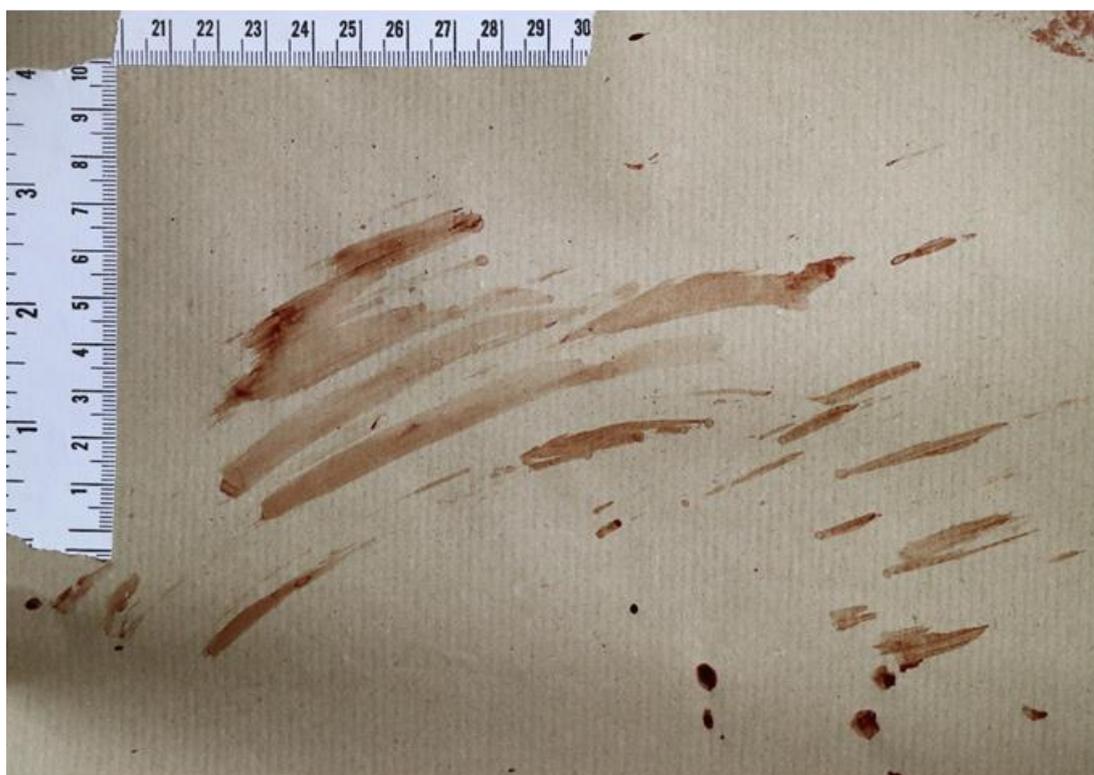


Foto 42. Pormenor do vestígio 2.C.

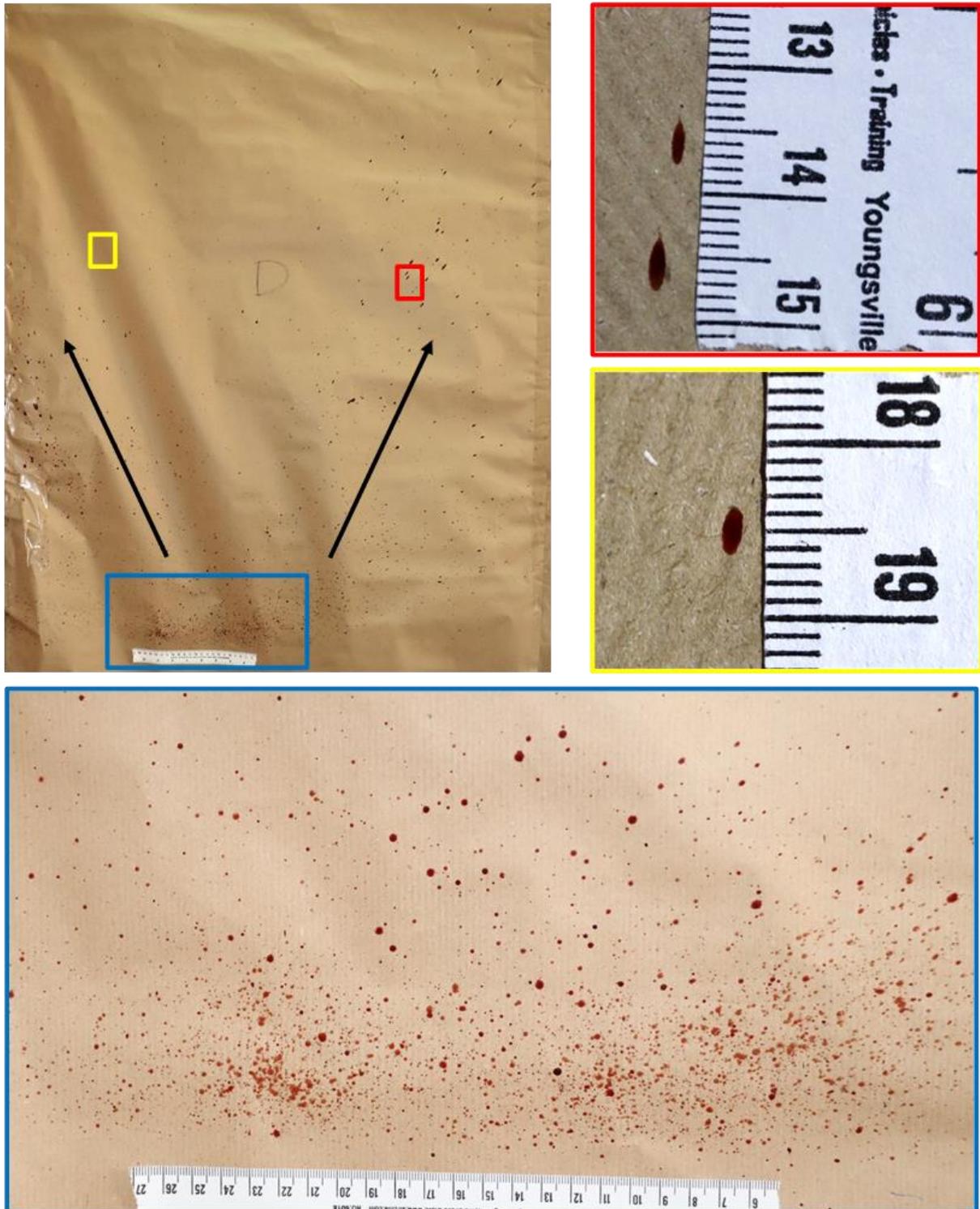


Foto 43 a 46. Pormenores do vestígio 2.D.

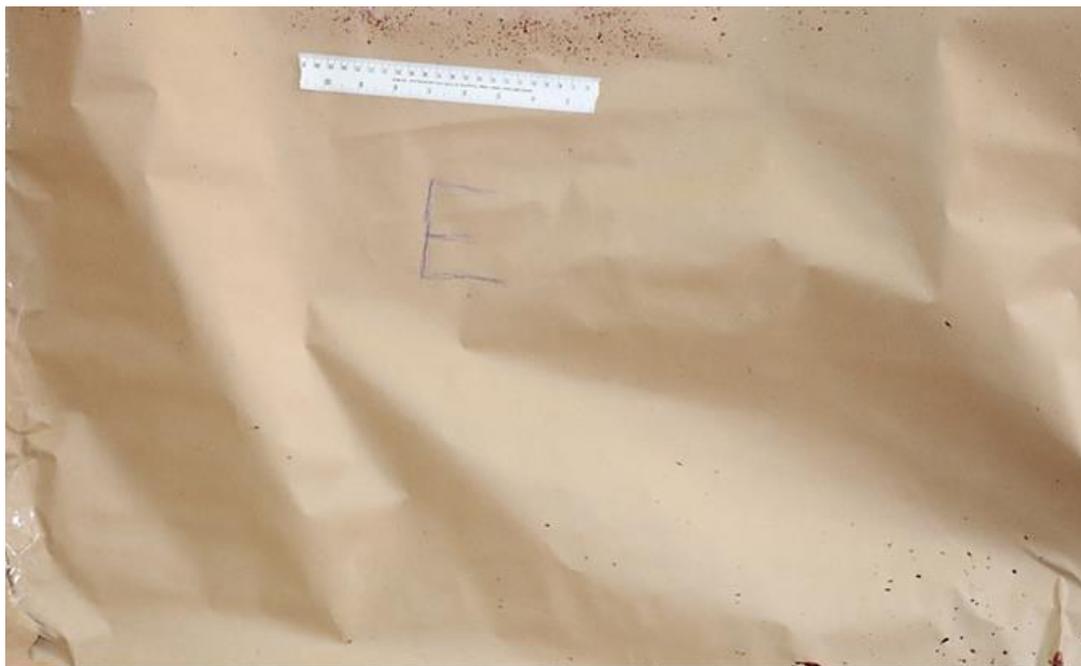
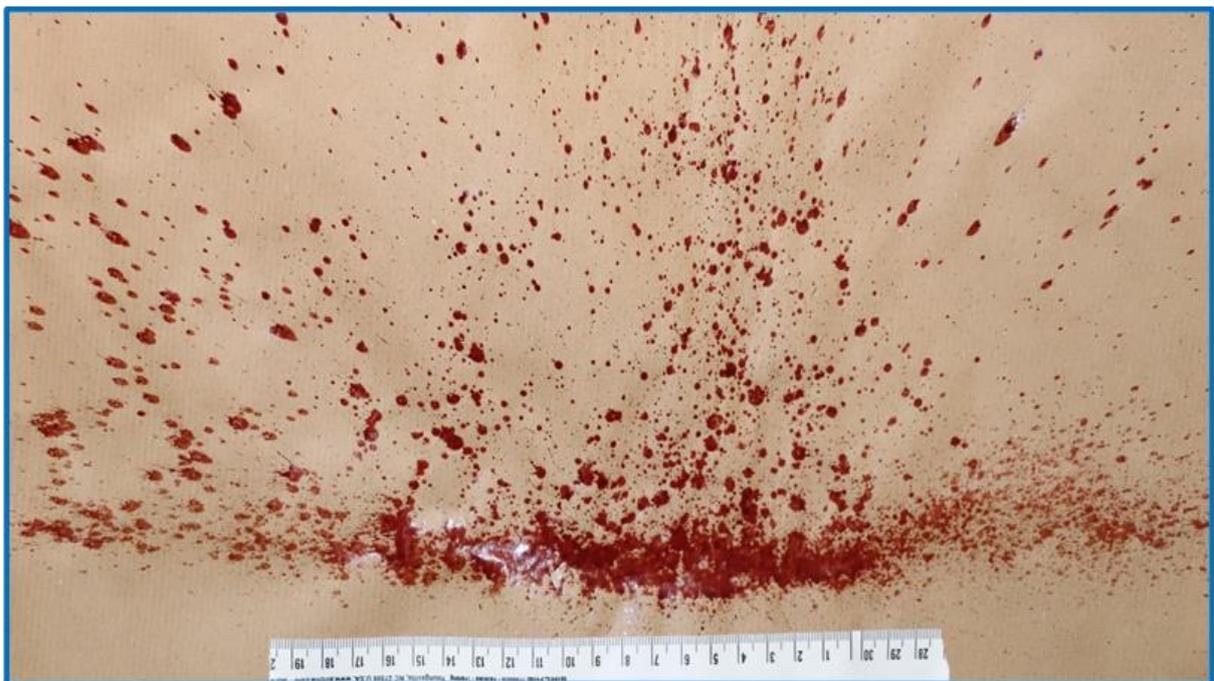
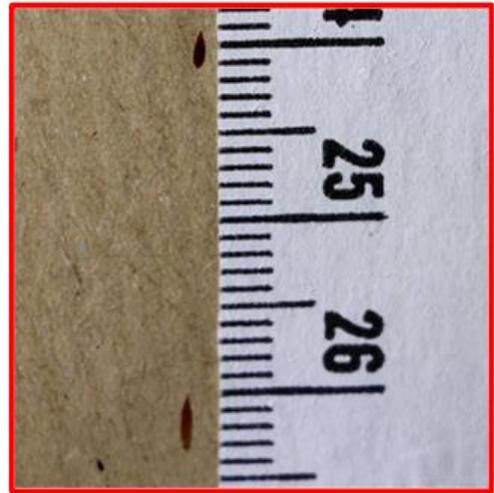
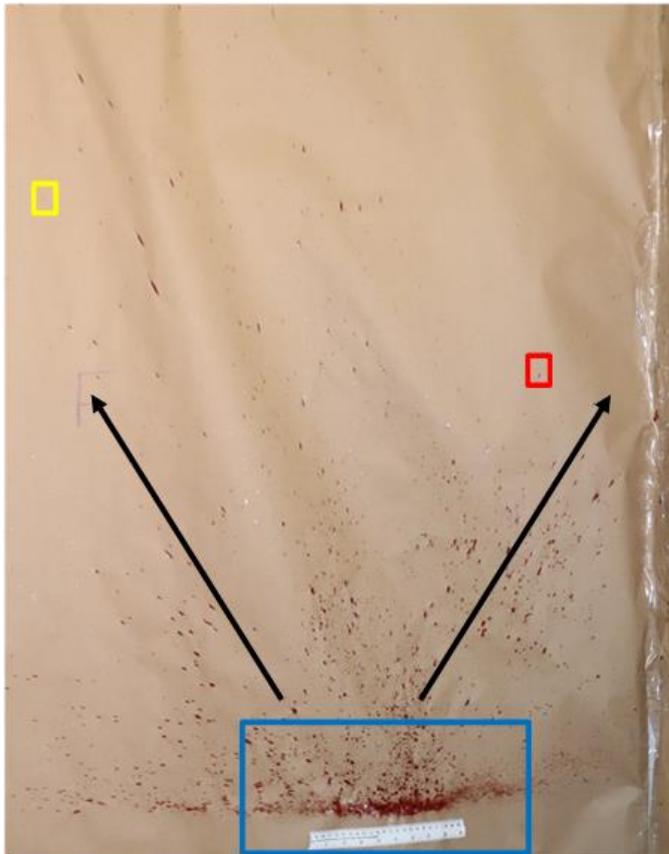


Foto 47. Pormenor do **vestígio 2.E**.

Na parede lateral direita relativamente à entrada da sala de estar, pertencente à **zona 2**, foram identificados dois (2) padrões de manchas de sangue:

- **Vestígio 2.F:** Na região superior da parede foi detetado um (1) padrão que após uma análise minuciosa e de acordo com as suas características, tais como, dispersão em forma de “V”, concluiu-se que se tratava de um (1) **padrão de impacto** (padrão de manchas de sangue resultante de um objeto que toca/bate em sangue líquido), padrão característico resultante de uma agressão.
- **Vestígio 2.G:** Na região inferior da parede, imediatamente abaixo do padrão de impacto, verificou-se a interrupção do padrão de manchas de sangue em toda a região, o que sugere a presença de um (1) objeto ou objetos aquando da produção do padrão, os quais foram posteriormente retirados. Pela análise pode-se atribuir a classificação de **vazio** (falta/ausência de sangue numa mancha de sangue ou padrão de manchas de sangue).



Fotos 48 a 51. Pormenores do vestígio 2.F.

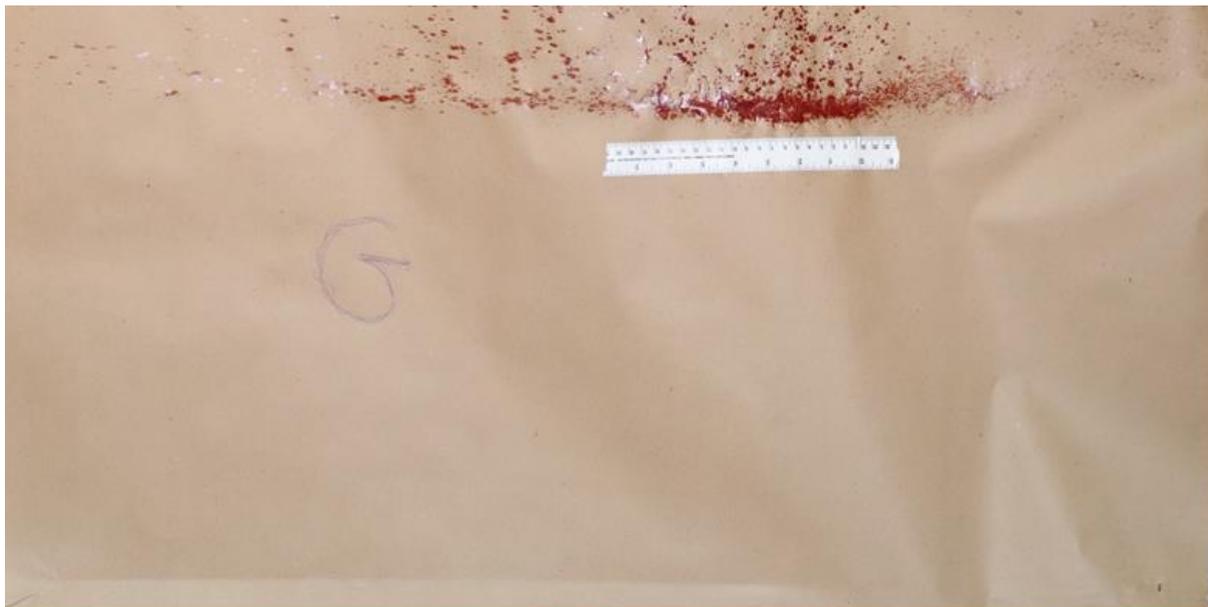


Foto 52. Pormenor do **vestígio 2.G**.

No chão à direita da entrada, pertencente à **zona 2**, foram detetados quatro (4) padrões de manchas de sangue:

- **Vestígio 2.H:** Na região inferior da parede contígua à entrada na sala de estar assim como no chão junto à mesma, foram detetadas **manchas de salpicos** (mancha de sangue resultante de uma gota de sangue que se dispersa através do ar devido a uma força externa aplicada a uma fonte de sangue líquido), padrão característico resultante de uma agressão.
- **Vestígio 2.I:** No chão, imediatamente junto do vestígio 2H, foi detetado uma acumulação de sangue característica de uma **poça** (mancha de sangue resultante do acumular de sangue líquido sobre uma superfície).
- **Vestígio 2.J1:** Junto à poça de sangue, identificada como vestígio 2I, foi observada uma (1) **mancha de transferência** (mancha de sangue resultante do contacto entre uma superfície transportando sangue sobre outra superfície), correspondente a uma (1) marca bidimensional de calçado impressa em sangue que, após comparação preliminar, se constatou pertencer à vítima.

- **Vestígio 2.J2:** Junto à poça de sangue, identificada como vestígio 2I, foi observada uma (1) **mancha de transferência** (mancha de sangue resultante do contacto entre uma superfície transportando sangue sobre outra superfície), correspondente a uma (1) marca bidimensional de calçado impressão em sangue que se pressupõe pertencer ao agressor.



Foto 53. Localização e enquadramento dos vestígios 2.H, 2.I, 2.J1 e 2.J2.



Foto 54. Pormenor do vestígio 2.H.



Foto 55. Pormenor do vestígio 2.I.



Foto 56. Pormenor dos vestígios 2.J1 e 2.J2.

Finda a análise da **zona 2** e atendendo às características dos **padrões de impacto** detetados, identificados como **vestígio 2D e 2F**, concluiu-se que ambos os padrões teriam a mesma área de origem. Salienta-se ainda que o **padrão de poça**, identificado como **vestígio 2I**, corresponde ao final das agressões.

A **zona 3** foi atribuída ao corredor da habitação e entrada da casa de banho. Os padrões detetados e referenciados na respetiva zona serão dispostos ao longo das páginas seguintes.



Foto 57 e 58. Localização da zona 3.

No corredor pertencente à **zona 3**, apresentado na **Foto 57**, foram identificados cinco (5) vestígios:

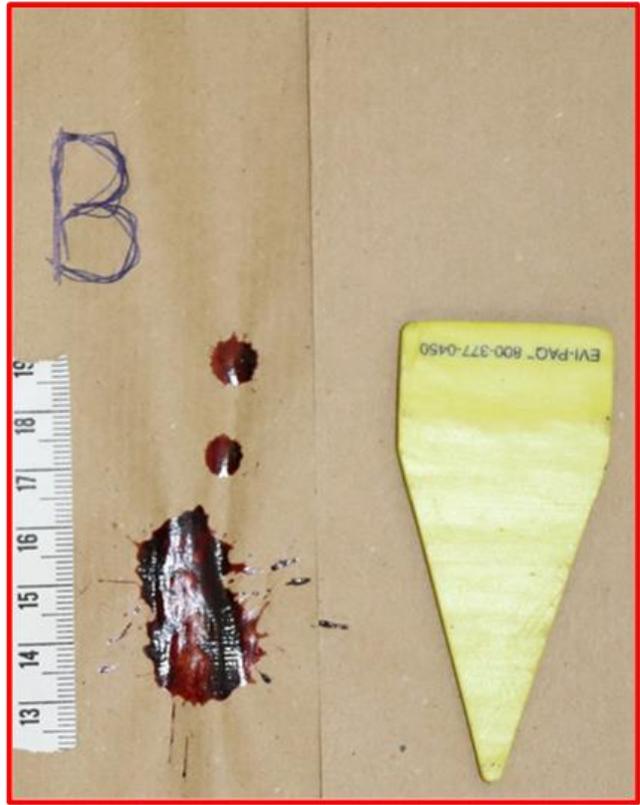
- **Vestígio 3.A:** Na margem direita do corredor, no sentido *hall*-casa de banho, foi detetado um (1) padrão cujas características, nomeadamente linearidade, forma e tamanho, permitiram concluir que se tratava de um **rasto de gota** (padrão de manchas de sangue resultante do movimento de uma fonte de manchas de gotas entre dois pontos).
- **Vestígio 3.B:** Na margem direita do corredor, no sentido casa de banho-*hall*, foi detetado um (1) padrão cujas características, nomeadamente linearidade, forma e tamanho, permitiram concluir que se tratava de um **rasto de gota** (padrão de manchas de sangue resultante do movimento de uma fonte de manchas de gotas entre dois pontos).
- **Vestígio 3.C:** Junto à entrada da casa de banho, foi identificada uma **mancha de transferência** (mancha de sangue resultante do contacto entre uma superfície transportando sangue sobre outra superfície), correspondente a uma (1) marca de calçado. Sobrepostas à mesma, foram observadas duas (2) **manchas passivas** o que permitiu concluir que estas se depositaram posteriormente.
- **Vestígio 3.D:** No chão, junto ao lavatório da casa de banho, foi detetada uma **mancha de transferência** (mancha de sangue resultante do contacto entre uma superfície transportando sangue sobre outra superfície), cujo aspeto se assemelha a um contacto entre a superfície e um (1) objeto, supostamente um martelo ensanguentado.
- **Vestígio 3.J2:** Ao longo do corredor foram detetadas várias **manchas de transferência** (mancha de sangue resultante do contacto entre uma superfície transportando sangue sobre outra superfície) no sentido sala-casa de banho com o mesmo padrão de calçado identificado na **zona 2**.



Fotos 59 e 60. Localização e enquadramento dos vestígios 3.A, 3.B, 3.C, 3.D e 3.J2.



Fotos 61 e 62. Pormenor do vestígio 3.A.



Fotos 63 e 64. Pormenor do vestígio 3.B.

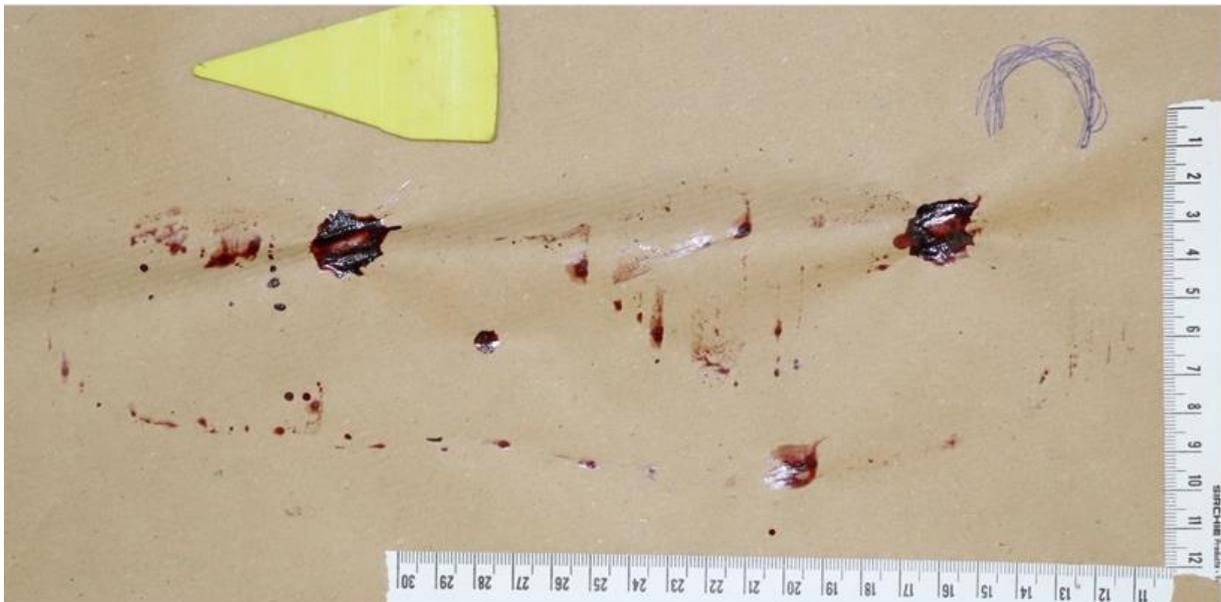


Foto 65. Pormenor do vestígio 3.C.



Foto 66. Pormenor do vestígio 3.D.



Fotos 67 e 68. Pormenor do vestígio 3.J2.

Tendo em conta a degradação gradual das marcas bidimensionais de calçado, isto é, a diminuição da quantidade de sangue depositado na superfície no percurso compreendido entre a sala de estar e a casa de banho, concluiu-se que os acontecimentos ocorridos na **zona 2** precederam os eventos da **zona 3**.

### - CONCLUSÃO -

Nos exames efetuados no âmbito da análise e interpretação dos padrões de sangue, numa habitação sita no RC/Esq do prédio B2, em Barro, Loures, foram observados e referenciados os padrões correspondentes aos vestígios 1 a 3, os quais foram devidamente descritos ao longo do presente relatório, tendo-se concluído o seguinte:

- Os três (3) **padrões de expiração** ou “**expiration pattern**” (padrão de manchas de sangue resultante de sangue forçado através de um fluxo de ar para fora do nariz, boca ou uma ferida), observados no *hall* de entrada, correspondentes aos **vestígios 1.A, 1.B e 1.C**, são consequência de agressões mútuas entre a vítima e o suspeito.
- Os dois (2) **padrões de impacto** ou “**impact pattern**” (padrão de manchas de sangue resultante de um objeto que toca/bate em sangue líquido), observados na sala de estar e correspondentes aos **vestígios 2.D e 2.F**, são consequência de agressões infligidas à vítima, com um objeto contundente.
- O rasto parcial bidimensional de calçado impresso em sangue, referenciado com **vestígios 2.J2 e 3.J2**, corresponde ao calçado pertença do suspeito.

**Anexo II- Aspeto das diluições de sangue em cimento e tecido 100% algodão.**



**Figura A1.** Aspeto das diluições de sangue no substrato cimento.



**Figura A2.** Aspeto das diluições de sangue no substrato tecido 100% algodão.

## Anexo III- Resultados da análise da água utilizada para produzir o cimento, obtidos por ICP-OES.



### Relatório de Ensaios

Relatório n.º QUI 385/21Data: 11/05/2021

#### Dados relativos ao cliente:

Cliente: Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra - Departamento de QuímicaEndereço: Rua Larga, 3004-535 CoimbraContacto: Prof.ª Ermelinda Eusébioe-mail: quierme@ci.uc.ptTel.: +351 239 854 459Fax: --

#### Dados relativos à amostra ensaiada:

Ref.º Itecons: QUI518A21Ref.º Cliente (\*): Água de poçoTipo de amostra (\*): Água subterrâneaResp. pela amostragem: ClienteMétodo de amostragem (\*): --Data da amostragem (\*): --Data de receção: 06/05/2021

#### Resultados:

Parâmetro	Método de ensaio	Limite de deteção	Limite de quantificação	Resultado	Unidade	Data de conclusão
Ferro	QU108.IE.01, Versão: 1 (Nov/15) equivalente a ISO 11885:2007	---	0.010	2.7	mg Fe/l	07/05/2021
Cobre	QU108.IE.01, Versão: 1 (Nov/15) equivalente a ISO 11885:2007	---	0.020	<LQ	mg Cu/l	07/05/2021

#### Observações:

<LQ - resultado inferior ao limite de quantificação.

"\*QU1xx.IE.xx" corresponde a método interno do Itecons. Método interno equivalente é aquele que cumpre as características de desempenho e obtém resultados comparáveis ao(s) método(s) normalizado(s) junto indicado(s).

Responsabilidade técnica



João Almeida  
Supervisor Técnico e Científico

A Direção

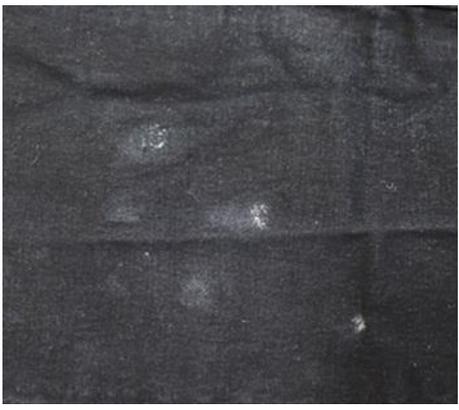


Documento validado

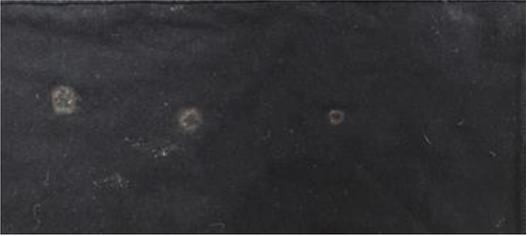
**Notas:** Os resultados apresentados referem-se, exclusivamente, aos itens ensaiados e aplicam-se à amostra conforme rececionada. O presente relatório não pode ser reproduzido, exceto na íntegra, sem o acordo escrito do Itecons. Os dados assinados com (\*) foram fornecidos pelo cliente.

**Anexo IV- Fotografias dos tecidos, às duas semanas.**

**Tabela A1.** Fotografias dos tecidos, duas semanas após a aplicação de sangue.

Tecido 1		Tecido 3		Tecido 5		Tecido 7	
Tecido 2		Tecido 4		Tecido 6		Tecido 8	

**Tabela A1.** Fotografias dos tecidos, duas semanas após a aplicação de sangue.

<p>Tecido 9</p> 	<p>Tecidos 11 e 12</p> 	<p>Tecido 14</p> 	<p>Tecido 16</p> 	<p>Tecidos 18</p> 	<p>Tecido 20</p> 
<p>Tecido 10</p> 	<p>Tecido 13</p> 	<p>Tecido 15</p> 	<p>Tecido 17</p> 	<p>Tecido 19</p> 