



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANBIOTECNOLOGIA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**APLICAÇÃO DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA NA ANÁLISE DO  
TEMPO DESDE A DEPOSIÇÃO DE HEMÁCIAS EM MANCHAS DE  
SANGUE: UMA CONTRIBUIÇÃO ÀS CIÊNCIAS FORENSES**

**DOUGLAS RODRIGUES CAVALCANTI**

**2017**

**DOUGLAS RODRIGUES CAVALCANTI**

**APLICAÇÃO DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA NA ANÁLISE DO  
TEMPO DESDE A DEPOSIÇÃO DE HEMÁCIAS EM MANCHAS DE  
SANGUE: UMA CONTRIBUIÇÃO ÀS CIÊNCIAS FORENSES**

**ORIENTADOR:**

**PROFESSOR LUCIANO PAULINO DA SILVA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

À comunidade pericial, que este estudo sirva de incentivo ao constante aprofundamento científico da perícia criminal brasileira.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder força e sabedoria para prosseguir. Aos meus pais Deborah e Eliezer, pelos eternos ensinamentos e pelas constantes palavras de afeto. À minha esposa Camila Cavalcanti, por todo amor, amizade e companheirismo. Ao meu irmão Diego e sua esposa Camila, pelos momentos de apoio.

Ao meu orientador Prof. Dr. Luciano Paulino da Silva (UnB/Embrapa), pelos memoráveis ensinamentos sobre a pesquisa e valorosa orientação, o qual proporcionou a linha de pesquisa aplicada às Ciências Forenses e o desenvolvimento do presente estudo.

À Embrapa, a qual proporcionou a estrutura física laboratorial para desenvolvimento da pesquisa e ao grupo do Laboratório de Nanobiotecnologia – LNANO/Embrapa, pelos excelentes momentos que passamos juntos, dentro e fora do laboratório. Agradeço imensamente à Cínthia Bonatto, Ariane Pandolfo, Lívia Viol, Ivy Garcez, Giselle Zayra, Jéssika Ribeiro, Jorge Taquita, Marco Antônio, e demais integrantes do grupo.

Ao grupo do Núcleo de Apoio a Programação – NAP/Embrapa, Dr. Joseane Padilha e, principalmente, Prof. Dr. Luis Alberto Martins Palhares de Melo pelo apoio fundamental nas análises estatísticas, utilização dos mapas de Kohonen (SOM - *self-organizing map*) e auxílio na interpretação dos resultados.

Aos amigos Rodrigo Meneses de Barros e Henrique Arakawa, pelo incentivo ao desenvolvimento acadêmico e pela iniciativa de me encorajar na produção desse estudo.

Ao amigo Hérico Avohai, pela constante parceria dentro da área pericial e nas diversas análises conjuntas no 3º NRPTC/SPTC/GO. Aos colegas Peritos Criminais Laécio Carneiro, Claudia Magalhães, Waldir Carvalho, Bruno Matos e Bruno Pinheiro.

À Amiga Aline Sbardelotto, pelo incentivo na elaboração e conclusão desta dissertação de mestrado.

À Superintendência de Polícia Técnico-Científica – SPTC/GO por proporcionar a bagagem prática de ensinamentos sobre locais de crime.

Ao CNPq e à UnB pelo fomento do projeto de pesquisa e pela abertura do curso de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia.

E a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o desenvolvimento e conclusão do presente trabalho.

*“...Não sabeis que entre todos os que correm no estádio, na verdade, somente um vai receber o prêmio? Corra, então, de tal maneira que consiga alcançar! Assim, eu não corro como quem corre sem um alvo, e não luto como quem apenas soca o ar...”*

*1 Coríntios 9:24 e 26*

## PREFÁCIO

Segundo dados do IPEA<sup>i</sup>, nos últimos 35 anos, ocorreram cerca 1,5 milhão de assassinatos no Brasil, colocando o país na condição de campeão mundial em histórico de homicídios. O relatório anual de estatísticas (*World Health Statistics 2016*)<sup>ii</sup> da Organização Mundial da Saúde – OMS classificou 194 países, entre eles o Brasil, quanto à taxa de homicídios para 100.000 habitantes. Países como Portugal, Argentina, Angola, Paraguai e Índia permaneceram com taxas abaixo de 10 homicídios/100.000 habitantes, entretanto, o Brasil apresentou índice de 32,4 homicídios/100.000 habitantes, sendo classificado na 11<sup>a</sup> posição entre os países com a maior taxa mundial. A sensação de violência conecta-se intimamente ao fenômeno do assassinato, o qual corresponde à solidificação de insegurança que se encontra disseminada por toda uma sociedade. Conforme pesquisa do Sistema de Indicadores de Percepção Social – SIPS<sup>iii</sup> sobre Segurança Pública, 70,4% dos entrevistados na região centro-oeste brasileira, por exemplo, declaram possuir muito medo de serem vítimas de assassinato.

A carência de recursos para a estrutura da Segurança Pública brasileira, principalmente a Perícia Criminal, é histórica, o que compromete a atuação eficiente desta instituição, também chamada de polícia técnico-científica. Uma das implicações deste crítico cenário é que muitos processos penais de homicídio, os quais tramitam no Poder Judiciário, acabam não sendo instruídos com os elementos necessários para se demonstrar autoria e materialidade de um crime. Nesse sentido, a aproximação científica entre as Universidades e as polícias técnico-científicas estaduais, através de políticas públicas para formação e capacitação de recursos humanos, utilização de tecnologias e equipamentos de alta precisão, pode representar uma importante rota de redução da impunidade.

Este estudo é fruto da necessária integração entre Perícia Criminal/Universidade e visa contribuir com os métodos para levantamentos periciais de locais de crime, através da utilização da microscopia de força atômica e a análise de hemácias em manchas de sangue.

---

<sup>i</sup> **Violência e segurança pública em 2023: cenários exploratórios e planejamento prospectivo** - IPEA, 2015. Disponível em: [http://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com\\_content&view=article&id=26752](http://www.ipea.gov.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=26752). Acesso em 04/03/2017.

<sup>ii</sup> *World Health Statistics (2016)*, disponível em: [http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/2016/en/](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2016/en/). Acesso em 04/03/2017

<sup>iii</sup> **SIPS (2012)**, disponível em: [http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/SIPS/120705\\_sips\\_segurancapublica.pdf](http://www.ipea.gov.br/portal/images/stories/PDFs/SIPS/120705_sips_segurancapublica.pdf). Acesso em 04/03/2017.

## RESUMO

Manchas de sangue estão entre os vestígios mais recorrentes em cenas de crime. Estabelecer o tempo desde a deposição (*time since deposition* - TSD) dessas manchas, pode constituir o primeiro indício dos investigadores forenses acerca do momento em que um crime foi cometido. O sangue inicia o processo de envelhecimento a partir do momento em que sai do corpo humano e entra em contato com o ambiente físico. As propriedades biofísicas (morfologia e elasticidade) das hemácias (RBCs) sofrem uma série de mudanças, muitas das quais podem ser avaliadas utilizando técnicas microscópicas como a microscopia de força atômica (MFA). O objetivo geral do estudo foi avaliar por MFA e espectroscopia de força o processo de envelhecimento associado às possíveis modificações das características das RBCs em manchas de sangue, determinando se há algum padrão de transformação temporal. Os resultados qualitativos demonstraram que não há diferença morfológica na estrutura da RBC, quando do exame de imagens de MFA pela simples comparação visual, durante o período de 28 dias de análise aplicado no estudo. Entretanto, os resultados quantitativos, pelas análises micro- e nanométricas de MFA, demonstraram a tendência de aumento linear das medidas médias, tais como área da superfície e volume dessas células durante esse período, quando a mancha de sangue foi depositada sobre superfície de vidro e mantida sob condição ambiental não controlada. Observou-se também que a variação da temperatura e da umidade pode alterar a avaliação dessas medidas médias durante a estimativa do TSD. O tipo de superfície para deposição de mancha de sangue deve ser levado em consideração durante análises para o cálculo temporal, e os resultados obtidos sobre os suportes de vidro, metal e cerâmica evidenciaram diferenças significativas nas medidas das RBCs. A superfície de metal apresentou valores maiores, quando comparado com as outras duas superfícies. Para avaliar a possibilidade de aplicação dos dados obtidos, pelo padrão temporal das RBCs foram utilizados mapas auto-organizáveis de Kohonen (*Self-Organizing Maps* – SOM). Apesar das observações aqui obtidas, a utilização da MFA, durante levantamentos periciais em locais de crime, ainda requer a ampliação e o desenvolvimento de estudos científicos para a determinação de um método capaz de avaliar, com precisão, o TSD de manchas de sangue.

**Palavras-chave:** hemácias, microscopia de força atômica, idade de manchas de sangue, cenas de crime, tempo desde a deposição, análise criminal.

## ABSTRACT

Bloodstains are among the most recurring traces in crime scenes. Establishing the time since deposition (TSD) of these spots may be the first clue of forensic investigators as to when a crime was committed. The blood starts the aging process from the moment it leaves the human body and comes into contact with the physical environment. The biophysical properties (morphology and elasticity) of red blood cells (RBCs) undergo a series of changes, many of which can be evaluated using microscopic techniques such as atomic force microscopy (AFM). The overall aim of the study was to evaluate by AFM and force spectroscopy the aging process associated with possible modifications of the characteristics of RBCs in blood spots, determining if there is any pattern of temporal transformation. The qualitative results demonstrated that there is no morphological difference in the structure of the RBC when examining AFM images by simple visual comparison during the 28 day period of analysis applied in the study. However, the quantitative results, by micro- and nanometric analyses of AFM, demonstrated the linear increase trend of the average measurements, such as surface area and volume of these cells during that period, when the blood stain was deposited on glass surface and maintained under uncontrolled environmental conditions. It was also observed that the variation of temperature and humidity may alter the evaluation of these mean measurements during the estimation of TSD. The type of surface for blood stain deposition should be taken into account during analyzes for the temporal calculation, and the results obtained on glass, metal and ceramic supports showed significant differences in RBC measurements. The metal surface presented higher values when compared to the other two surfaces. Kohonen's self-organizing maps (SOM) were used to assess the possibility of applying the data obtained by the temporal pattern of RBCs. In spite of the observations obtained, the use of AFM in crime scenes still requires the expansion and development of more scientific studies to determine the method capable of evaluating the TSD in blood spots.

**Keywords:** red blood cells, atomic force microscopy, age of bloodstains, crime scenes, time since deposition (TSD), criminal analysis.

## SUMÁRIO

<b>PREFÁCIO</b> .....	I
<b>RESUMO</b> .....	II
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	VI
<b>LISTA DE QUADROS E TABELAS</b> .....	XIII
<b>LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS</b> .....	XIV
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Manchas de sangue e a análise de vestígios criminais .....	1
1.2. Microscopia de Força Atômica (MFA) e a análise de materiais biológicos .....	4
1.3. Transformações morfológicas das hemácias quando fora do organismo humano .....	7
1.4. Métodos descritos na literatura para análise do tempo desde a deposição (TSD) de manchas de sangue .....	9
1.4.1. - Espectroscopia de Reflectância.....	9
1.4.2. - Espectroscopia no Ultravioleta Visível – UV-Vis .....	10
1.4.3. - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR).....	10
1.4.4. - Espectroscopia Raman .....	11
1.4.5. - RT – PCR/qPCR (Análise de Ácido Ribonucleico - RNA).....	11
1.4.6. - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (HPLC).....	12
1.4.7. - Microscopia de Força Atômica – MFA .....	13
1.4.8. - Métodos alternativos para análise do TSD.....	15
1.5. Comparação entre os métodos para análise do TSD em manchas de sangue.....	16
1.6. Classificação e análise de padrões em manchas de sangue.....	19
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
2.1. Objetivo Geral.....	22
2.2. Objetivos Específicos.....	22
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	23
3.1. Indivíduos.....	23
3.2. Produção e análise das manchas de sangue.....	23
3.3. Etapas dos experimentos de desenvolvimento da pesquisa.....	25
3.4. Aplicação da Microscopia de Força Atômica – MFA.....	29
3.4.1. Parâmetros utilizados para análise no presente estudo.....	32
3.5. – Processamento das imagens e obtenção dos dados quantitativos.....	36
3.6. Análises estatísticas dos dados .....	39
3.6.1. Análise estatística descritiva .....	39
3.6.2. Análise de variância .....	39
3.6.3. Mapas auto organizáveis de Kohonen (Self-Organizing Map – SOM).....	40
<b>4. RESULTADOS</b> .....	43

4.1. Informações sobre o questionário aplicado aos indivíduos.....	43
4.2. Análise da correlação entre os parâmetros celulares.....	46
4.3. Descrição dos resultados obtidos nas etapas da pesquisa.....	49
4.3.1. - 1ª Etapa .....	50
4.3.2. - 2ª Etapa .....	67
4.3.3. - 3ª Etapa .....	77
4.3.4. - 4ª Etapa .....	90
4.4 - Aplicação dos dados obtidos na 1ª etapa, através de mapas auto organizáveis de Kohonen (Self-Organizing Map – SOM) – Modelagem Matemática .....	95
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>101</b>
5.1. Considerações sobre o TSD das amostras de manchas de sangue analisadas nas etapas do presente estudo .....	101
5.1.1. Considerações sobre as alterações dos parâmetros celulares obtidos na 1ª Etapa – Deposição das manchas de sangue sobre vidro e condição ambiental não controlada .....	102
5.1.2. Considerações sobre as alterações dos parâmetros celulares obtidos na 2ª Etapa - Deposição das manchas de sangue sobre vidro e condição ambiental controlada .....	104
5.1.3. Considerações sobre as alterações dos parâmetros celulares obtidos na 3ª Etapa - Deposição das manchas de sangue sobre diferentes suportes e condição ambiental não controlada.....	105
5.1.4. Considerações sobre as alterações dos parâmetros celulares obtidos na 4ª Etapa – Análise das Curvas de Força×Distância, e condição ambiental não controlada .....	107
5.2. Considerações sobre a aplicação da MFA como um método capaz de determinar o TSD em manchas de sangue e a sua aplicabilidade para locais de crime.....	108
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>110</b>
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E LIMITAÇÕES .....</b>	<b>112</b>
<b>8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>115</b>
<b>ANEXO I - Questionário QVS-80 (adaptado) .....</b>	<b>127</b>
<b>ANEXO II - Parecer Consubstanciado CEP/FM/UnB .....</b>	<b>130</b>
<b>ANEXO III - TCLE – CEP/FM/UnB .....</b>	<b>135</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Ilustração do princípio de funcionamento do microscópio de força atômica. Fonte: Herrmann, Paulo S. P. *et al* (1997) <sup>[23]</sup>. **Pg. 5**

**Figura 2:** Simplificação da transformação de reação da hemoglobina dentro do corpo (esquerda) e em manchas de sangue (direita). Desoxihemoglobina (Hb), oxi-hemoglobina (HbO<sub>2</sub>), met-hemoglobina (met-Hb) e hemichromo (Hc). Fonte: Strasser *et al.*, 2007<sup>[33]</sup>, modificado. **Pg. 8**

**Figura 3:** Moléculas de ligação com o ferro no sangue. Estrutura molecular heme em oxihemoglobina com o ferro em sua forma reduzida (Fe<sup>2+</sup>) coordenado pelo O<sub>2</sub> na sexta posição de coordenação (deoxihemoglobinas não possuem ligantes nesta posição) (A); estrutura molecular com o ferro na forma oxidada (Fe<sup>3+</sup>) e a ligação de um ion hidróxido (B). Fonte: Barni *et al.*, 2007<sup>[35]</sup>, com modificações. **Pg. 8**

**Figura 4:** Comparação dos métodos de análise, quanto ao tempo (TSD) utilizado pelos autores nos estudos com manchas de sangue (fonte: próprio autor). **Pg. 17**

**Figura 5:** Classificação taxonômica simplificada das manchas de sangue em locais de crime. Adaptado de Velho *et al.* (2013)<sup>[22]</sup>. **Pg. 20**

**Figura 6:** Exemplificação de imagens de sangue em locais de crime. Na imagem A, uma mancha de sangue irregular gerada por contato - arrastamento/esfregação. Na imagem B, uma sequência de manchas regulares geradas por espargimento, com angulação característica (seta em amarelo é o sentido do movimento gerador). Fonte: Próprio autor. **Pg. 21**

**Figura 7-A:** Esquema da punção capilar de dedo e da aplicação do sangue sobre o suporte. **B:** Esquema para produção do esfregação sobre o suporte, com o arraste da lâmina de vidro em ângulo de 45°. **Pg. 24**

**Figura 8:** Demonstração em representação esquemática das 4 etapas do estudo. **Pg. 26**

**Figura 9:** Esquema explicativo da análise da amostra de cada indivíduo doador na 1ª e 2ª etapas. **Pg. 27**

**Figura 10:** Esquema explicativo da análise da amostra do indivíduo doador para a 3ª etapa. **Pg. 28**

**Figura 11:** Esquema explicativo da análise da amostra dos indivíduos doadores para a 4ª etapa. **Pg. 28**

**Figura 12:** Microscópio de Força Atômica utilizado no estudo. **Pg. 30**

**Figura 13:** Ilustração do Diâmetro Máximo e da Largura Padrão<sup>[60]</sup>. **Pg. 33**

**Figura 14:** Ilustração do Perímetro e do C Perímetro<sup>[60]</sup>. **Pg. 33**

**Figura 15:** Ilustração da Área – Exclui e Inclui Concavidade<sup>[60]</sup>. **Pg. 34**

**Figura 16:** Ilustração da Área da Superfície<sup>[60]</sup>. **Pg. 34**

**Figura 17-A:** Ilustração da forma de obtenção de uma curva de Força×Distância<sup>[61]</sup>. **B:** Ilustração do processo de obtenção de uma curva de Força×Distância, bem como do mecanismo de registro da força e da deflexão vertical do cantilever<sup>[61]</sup>. **Pg. 36**

**Figura 18:** Caixa de diálogo do *labeling particle*, controle do *Z range* e do *XY Threshold*, seleção das células dentro da imagem<sup>[51]</sup>. **Pg. 38**

**Figura 19:** Esquema conceitual de um mapa de Kohonen e a ideia básica de treinamento/”calibragem” da estrutura. Fonte: Prof. Dr. Luis A. M. Palhares de Melo, gentilmente cedida para ilustração no estudo. **Pg.41**

**Figura 20:** Em “A” correlação entre Perímetro × C Perímetro, em “B” correlação da média ( $Z_{max}$  e  $Z_{min}$ ) × Média em Z, em “C” correlação da média (Área – AEC/AIC) × Área da Superfície. **Pg. 45**

**Figura 21:** Em “D” gráfico de correlação entre Diâmetro Máximo × Largura Padrão, em “E” gráfico de correlação entre Rugosidade × Grau de Circularidade, em “F” gráfico de correlação entre Volume × Área da Superfície. **Pg. 46**

**Figura 22:** Gráfico do tipo *boxplot* da Área da Superfície e do Perímetro em comparação realizada entre os gêneros masculino e feminino. Representa a distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média. **Pg. 49**

**Figura 23:** Foto das amostras de sangue dos 8 indivíduos em lamínulas de vidro sobre os porta-amostras do microscópio de força atômica. **Pg. 49**

**Figura 24:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 1 em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 51**

**Figura 25:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 2 em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 52**

**Figura 26:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 3 em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 53**

**Figura 27:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 4 em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 54**

**Figura 28:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 5 em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg 55**

**Figura 29:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 6 em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 56**

**Figura 30:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 7 em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 57**

**Figura 31:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 8 em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 58**

**Figura 32:** Em “A”, Linha vermelha representa gráfico da regressão linear da Média (DM/LP), a qual mostrou desvio significativo de zero ( $P = 0,0154$ ). Linha preta representa gráfico de regressão não linear. Os pontos vermelhos e as barras representam a média e o erro padrão da média. Em “B”, apresenta um gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média. **Pg. 60**

**Figura 33:** Em “C”, Linha vermelha representa gráfico da regressão linear do Raio Médio, o qual mostrou desvio significativo de zero ( $P = 0,0207$ ). Linha preta representa gráfico de regressão não linear. Os pontos vermelhos e as barras representam a média e o erro padrão da média. Em “D”, apresenta um gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média. **Pg. 61**

**Figura 34:** Em “E”, Linha vermelha representa gráfico da regressão linear do Perímetro, o qual mostrou desvio significativo de zero ( $P = 0,0253$ ). Linha preta representa gráfico de regressão não linear. Os pontos vermelhos e as barras representam a média e o erro padrão da média. Em “F”, apresenta um gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média. **Pg. 61**

**Figura 35:** Em “G”, Linha vermelha representa regressão linear da Média em Z (altura). Linha preta representa regressão não linear. Os pontos/barras representam a média/erro padrão. Em “H”, gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média. **Pg. 62**

**Figura 36:** Em “I”, Linha vermelha representa regressão linear da Área da Superfície. Linha preta representa regressão não linear. Os pontos/barras representam a média/erro padrão. Em “J”, gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média. **Pg. 62**

**Figura 37:** Em “K”, Linha vermelha representa regressão linear do Volume. Linha preta representa regressão não linear. Os pontos/barras representam a média/erro padrão da média. Em “L”, gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média. **Pg. 63**

**Figura 38:** Em “M”, Linha vermelha representa regressão linear do G. de Circularidade. Linha preta representa regressão não linear. Os pontos/barras representam a média/erro padrão da média. Em “N”, gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média. **Pg. 63**

**Figura 39:** Em “O”, Linha vermelha representa regressão linear da Rugosidade. Linha preta representa regressão não linear. Os pontos/barras representam a média/erro padrão da média. Em “P”, gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média. **Pg. 64**

**Figura 40:** Foto das amostras de sangue dos 2 indivíduos (1 e 2) depositadas em lamínulas de vidro sobre os porta-amostras do microscópio. **Pg. 67**

**Figura 41:** Imagens selecionadas para o indivíduo 1 em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 68**

**Figura 42:** Imagens selecionadas para o indivíduo 2 em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 69**

**Figura 43:** O gráfico representa a comparação da Média DM/LP entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 71**

**Figura 44:** O gráfico representa a comparação do Raio Médio entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 72**

**Figura 45:** O gráfico representa a comparação do Perímetro entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 72**

**Figura 46:** O gráfico representa a comparação da Média em Z (altura) entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn’s, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 72**

**Figura 47:** O gráfico representa a comparação da Área da Superfície entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 73**

**Figura 48:** O gráfico representa a comparação do Volume entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 73**

**Figura 49:** O gráfico representa a comparação do Grau de Circularidade entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn's, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 73**

**Figura 50:** O gráfico representa a comparação da Rugosidade entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn's, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 74**

**Figura 51:** Os gráficos representam a comparação do comportamento das retas de regressão linear entre as duas condições analisadas, para os 3 parâmetros com maior diferença significativa, mais a Área da Superfície. Em vermelho a condição controlada, em azul a condição não controlada. **Pg. 75**

**Figura 52:** Foto das amostras sobre os três diferentes suportes. 1 – Vidro, 2 – Metal, 3 - Cerâmica. **Pg. 77**

**Figura 53:** Análise da mancha de sangue sobre a cerâmica dentro do microscópio de força atômica. **Pg. 77**

**Figura 54:** Imagens representativas selecionadas para o suporte de vidro em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 79**

**Figura 55:** Imagens representativas selecionadas para o suporte de metal em cada um dos tempos T0 até T5 **Pg. 80**

**Figura 56:** Imagens representativas selecionadas para o suporte de cerâmica em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 81**

**Figura 57:** O gráfico representa a comparação da Média DM/LP entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 83**

**Figura 58:** O gráfico representa a comparação do Raio Médio entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 84**

**Figura 59:** O gráfico representa a comparação do Perímetro entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 84**

**Figura 60:** O gráfico representa a comparação da Média em Z entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn's, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 85**

**Figura 61:** O gráfico representa a comparação da Área da Superfície entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 85**

**Figura 62:** O gráfico representa a comparação do Volume entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 86**

**Figura 63:** O gráfico representa a comparação do Grau de Circularidade entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn's, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 86**

**Figura 64:** O gráfico representa a comparação da Rugosidade entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn's, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo. **Pg. 87**

**Figura 65:** Comparação das retas/curvas de regressão linear e não linear observadas para os três suportes. Os pontos representam médias e as barras representam os erros padrão. **Pg. 88**

**Figura 66:** Foto das amostras de sangue dos 2 indivíduos (1 e 6) depositadas em lamínulas de vidro sobre os porta-amostras do microscópio. **Pg. 90**

**Figura 67:** Curvas de Força×Distância e imagens 2D – Indivíduo 1, em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 91**

**Figura 68:** Curvas de Força×Distância e imagens 2D – Indivíduo 6, em cada um dos tempos T0 até T5. **Pg. 92**

**Figura 69:** Gráfico *boxplot* do módulo de Young, agrupamento dos indivíduos 1 e 6, representa a distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média. **Pg. 93**

**Figura 70:** Linha vermelha representa gráfico da regressão linear do módulo de Young, o qual mostrou desvio não significativo de zero ( $P = 0,2257$ ). Linha preta representa gráfico de regressão não linear. Os pontos vermelhos e as barras representam a média e o erro padrão da média. **Pg. 93**

**Figura 71:** Estrutura da Rede de Kohonen aplicada com os dados da 1ª Etapa, utilizando na camada de entrada os 5 parâmetros selecionados, e para a camada de saída os 20 Neurônios (N) – *clusters*. **Pg. 95**

**Figura 72:** Fórmula de normalização utilizada para os 5 parâmetros aplicados no SOM. **Pg. 95**

**Figura 73:** O vetor de pesos (*code book vectors*) dos 20 neurônios (*clusters*) do mapa de Kohonen, após a conclusão do algoritmo de treinamento da rede. **Pg. 96**

**Figura 74:** A camada de saída da rede de Kohonen apresentando o diagrama de ventilador (*fan diagram*) que enfatiza graficamente o valor dos pesos de cada variável no neurônio (N) específico. **Pg. 97**

**Figura 75:** RBCs alocadas por neurônio da camada de saída com base no TSD. **Pg. 98**

**Figura 76:** Frequência absoluta e relativa das hemácias alocadas por neurônio da camada de saída com base no tempo desde a deposição (T0 até T5). **Pg. 98**

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

**Quadro 1:** Comparação entre os diferentes métodos de análise (TSD de manchas de sangue) (Fonte: próprio autor). **Pg. 19**

**Quadro 2:** Condições para obtenção das imagens no microscópio. **Pg. 30**

**Quadro 3:** Parâmetros considerados relevantes para o presente estudo. **Pg. 32**

**Quadro 4:** Dados coletados dos indivíduos doadores, pelo questionário QVS-80 (adaptado – Vilela Junior *et al.*, 2007)<sup>[56]</sup>. **Pg. 44**

**Quadro 5:** Parâmetros aplicados para análise do TSD das RBCs. **Pg. 47**

**Quadro 6:** Análise, pelos testes Bonferroni e Dunn's, da diferença estatística significativa entre os tempos. **Pg. 66**

**Tabela 1:** Análise tempo-dependente das manchas de sangue. **Pg. 25**

**Tabela 2:** Comparação entre os gêneros masculino e feminino. **Pg. 48**

**Tabela 3:** Número de células analisadas por indivíduo e por tempo – 1ª etapa. **Pg. 50**

**Tabela 4:** Parâmetros quantitativos de hemácias analisadas por tempo (8 indivíduos) e Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) dos parâmetros. **Pg. 59**

**Tabela 5:** Dados das retas/curvas de regressão linear e não linear dos parâmetros – 1ª etapa. **Pg. 65**

**Tabela 6:** Número de células analisadas por indivíduo e por tempo – 2ª etapa. **Pg. 67**

**Tabela 7:** Hemácias analisadas por tempo (2 indivíduos) e Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) dos parâmetros. **Pg. 70**

**Tabela 8:** Dados das retas de regressão linear dos parâmetros – 2ª etapa. **Pg. 76**

**Tabela 9:** Número de células analisadas por suporte e por tempo – 3ª etapa. **Pg. 78**

**Tabela 10:** Hemácias analisadas por tempo (2 indivíduos) e Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) do módulo de Young. **Pg. 90**

## LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

<b>AD</b>	Adimensional
<b>AEC</b>	Área - Exclui Concavidade
<b>AIC</b>	Área - Inclui Concavidade
<b>bp</b>	<i>base pair</i> (par de bases)
<b>CLAE</b>	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>DM/LP</b>	Diâmetro Máximo/Largura Padrão
<b>DP</b>	Desvio Padrão
<b>EP</b>	Erro Padrão
<b>EPR</b>	Ressonância Paramagnética Eletrônica
<b>Hb</b>	hemoglobina
<b>HbO<sub>2</sub></b>	oxi-hemoglobina
<b>Hc</b>	hemichromo
<b>HPLC</b>	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>IABPA</b>	<i>International Association of Bloodstain Pattern Analysts</i>
<b>meta-Hb</b>	meta-hemoglobina
<b>MFA</b>	Microscopia de Força Atômica
<b>NNI</b>	<i>National Nanotechnology Initiative</i>
<b>qPCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i> em tempo real
<b>QVS-80</b>	Teste Qualidade de Vida e Saúde - 80
<b>RBC</b>	Hemácias, Glóbulos Vermelhos ou Eritrócitos
<b>RNA</b>	Ácido Ribonucleico
<b>RT-PCR</b>	<i>Polimerase Chain Reaction</i> transcriptase reversa
<b>SOM</b>	<i>Self-Organizing Map</i>
<b>TSD</b>	<i>Time Since Deposition</i>
<b>UV-Vis</b>	Espectroscopia no Ultravioleta Visível
<b>1D</b>	Unidimensional
<b>2D</b>	Bidimensional
<b>3D</b>	Tridimensional



## **1. INTRODUÇÃO**

## 1.1. Manchas de sangue e a análise de vestígios criminais

Manchas de sangue estão entre os vestígios, mais frequentemente, encontrados em cenas de crime<sup>[1]</sup>. Quando se considera os crimes contra a vida, que envolvem disparo de arma de fogo, utilização de arma branca ou qualquer outro meio aplicado para causar lesão corporal, a presença de sangue nesses locais é quase uma constante a ser considerada durante o processo investigativo<sup>[2]</sup>.

A determinação dos padrões de dispersão das manchas de sangue, em cenas de crime, pode fornecer elementos importantes para uma investigação forense, auxiliando na análise da dinâmica criminosa<sup>[3]</sup>. Estabelecer o tempo desde a deposição (*time since deposition* - TSD) dessas manchas pode ser o primeiro indício dos investigadores forenses acerca do momento em que um crime foi cometido. Isso é particularmente útil quando esses vestígios constituem a única peça de evidência disponível em um crime<sup>[4]</sup>.

Vestígios de sangue em locais de crime representam provas de enorme valor forense, permitindo desde a possibilidade de se determinar o perfil genético de um suspeito, até mesmo a reconstrução do evento criminoso. Porém, até o presente momento, o potencial para utilização de manchas de sangue na determinação do momento em que um crime foi cometido, ainda não foi estabelecido como um método eficaz, apesar das diversas tentativas nesse sentido<sup>[5]</sup>. Assim, seria altamente desejável que o TSD de uma mancha de sangue pudesse ser determinado com precisão, pois poderia estabelecer uma conexão temporal acerca do momento de um assassinato, por exemplo.

Basicamente, o sangue inicia o processo de envelhecimento a partir do momento em que é removido do corpo humano e entra em contato com o ambiente físico. Um exemplo, é o fato de que as propriedades biofísicas (morfologia, rigidez e outras) das hemácias (RBCs) sofrem uma série de mudanças assim que deixam o ambiente

fisiológico<sup>[6]</sup>. Para a interpretação forense, o sangue geralmente é expelido do corpo humano, durante a produção de uma lesão criminosa. Então, estimar o TSD de uma mancha de sangue pode, por exemplo, definir termos de referência para um álibi, restringir o alcance de um inquérito policial ou mesmo a extensão de um processo penal<sup>[7]</sup>.

Uma prova criminal pode perder a sua relevância jurídica caso não seja demonstrado que o seu tempo de produção está relacionado com o momento em que um crime foi cometido<sup>[8]</sup>, e essa indagação está entre as mais desafiadoras no campo das ciências forenses<sup>[9]</sup>. A interpretação imperfeita ou a falha na análise de um vestígio observado em local de crime é um aspecto crucial, principalmente, se a data e hora de um evento criminoso não puderem ser estabelecidas por outros métodos investigativos<sup>[10]</sup>. Nesse sentido, o processamento de uma cena de crime é considerado como um dos aspectos mais críticos de investigações criminais eficazes. Locais de crime analisados inadequadamente podem resultar em provas jurídicas de qualidade baixa, aumentando o risco de investigações ineficazes e/ou condenações injustas<sup>[11]</sup>.

O “Princípio da Troca” de Edmond Locard afirma que quando um crime é cometido, há uma transferência cruzada de evidências entre a cena de crime e o seu autor: “Todo contato deixa uma marca”<sup>[12]</sup>. Desse modo, os investigadores forenses se esforçam para utilizar a ciência na busca dessas evidências, em uma tentativa de desvendar seu significado<sup>[13]</sup>. Porém, a busca por vestígios nem sempre é missão de fácil execução, já que em muitos casos tais elementos resultantes da ação delituosa, quer originários dos autores de um crime, quer originários das vítimas, somente podem ser detectados por meio de análises moleculares, microscópicas e mesmo em nanoescala, sendo que, na maioria dos casos, requerendo equipamentos científicos de altíssima acurácia e precisão<sup>[14]</sup>.

As metodologias utilizadas em nanociência e a nanobiotecnologia podem contribuir com as ciências forenses na análise e detecção de provas criminais em nanoescala. Vestígios que não eram recolhidos ou considerados anteriormente, devido aos limites de detecção dos instrumentos, agora podem ser utilizados para subsidiar as investigações. Alguns exemplos dessas aplicações em nanoescala podem ser observados nas detecções forenses de pequenas quantidades de resíduos de pólvora, metais pesados, explosivos, drogas, sangue, em *fingerprint* de DNA ou em impressões papiloscópicas [15].

Algumas agências estrangeiras já começaram a financiar projetos de pesquisa sobre as aplicações de nanotecnologia em ciências forenses, para a área de segurança. Em 2000, a agência *National Nanotechnology Initiative – NNI* ([www.nano.gov](http://www.nano.gov)) foi criada pelo governo dos Estados Unidos para coordenar os esforços Federais e promover a competitividade do país em nanotecnologia. Em 2008, a NNI publicou o seu primeiro plano estratégico envolvendo áreas como meio ambiente, saúde e segurança. O investimento NNI total acumulado desde o ano fiscal de 2001, incluindo a proposta para 2016, totalizam mais de US\$ 22 bilhões. Os investimentos acumulados em meio ambiente, saúde e segurança, de 2006 a 2015, já atingiram quase US\$ 1 bilhão<sup>iv</sup>.

Com o crescente investimento em nanotecnologias na área de segurança, o desenvolvimento de instrumentos de investigação em nanoescala contribui diretamente com as análises de locais de crime, proporcionando a obtenção, por investigadores forenses, de micro- e nano- vestígios. Devido ao seu potencial para obtenção de informações em nanoescala, a microscopia de força atômica - MFA tornou-se uma técnica muito versátil para medir as pequenas forças envolvidas em sistemas

---

<sup>iv</sup>Dados coletados do *NNI - Supplement to the President's 2016 Budget*, documento preparado pelo Subcommittee on Nanoscale Science, Engineering, and Technology/National Science and Technology Council – U.S. Disponível em: [http://www.nano.gov/sites/default/files/pub\\_resource/nni\\_fy16\\_budget\\_supplement.pdf](http://www.nano.gov/sites/default/files/pub_resource/nni_fy16_budget_supplement.pdf). Acesso em 10/11/2016.

biológicos<sup>16</sup> e as pesquisas sugerem que este método pode muitas vezes complementar as técnicas mais tradicionais utilizadas nas investigações policiais<sup>17</sup>.

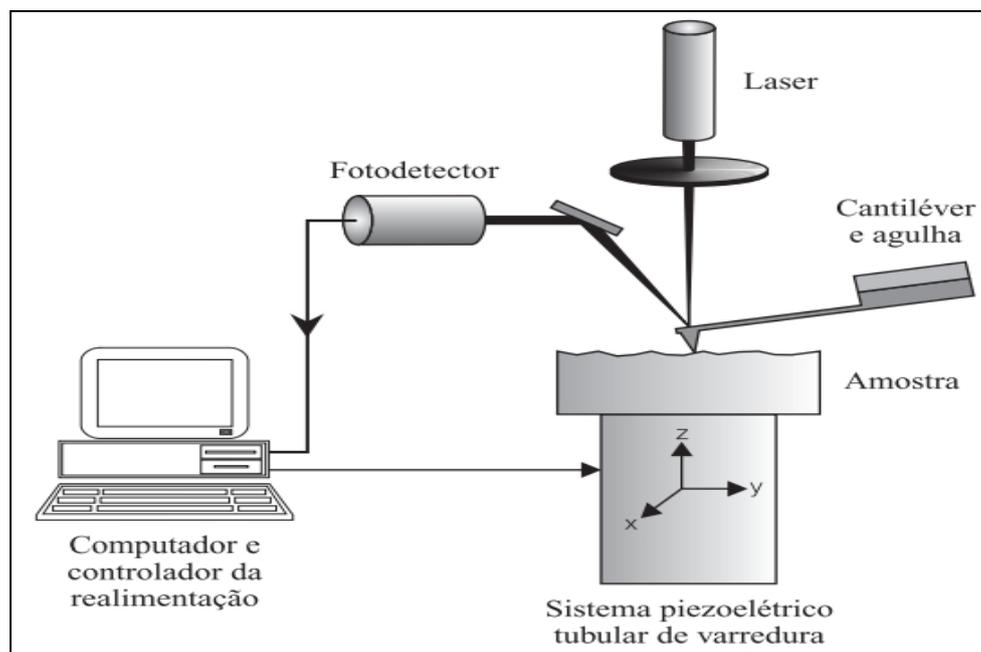
## 1.2. Microscopia de Força Atômica (MFA) e a análise de materiais biológicos

Desde a invenção do microscópio de força atômica por Binnig *et al.* (1986)<sup>[18]</sup>, um grande número de pesquisas, dedicadas à aplicação em citologia e medicina, foram realizadas, como, por exemplo, a análise de células cancerígenas<sup>[19 - 21]</sup>. Diversos estudos já demonstraram que esse tipo de microscopia permite visualizar materiais biológicos em alta resolução e medir suas características biofísicas e morfológicas<sup>[22]</sup>.

A MFA apresenta a capacidade de obter imagens de alta resolução, por meio das medidas das forças de atração ou repulsão entre a superfície de uma amostra (p. exemplo, esfregaço de sangue) e uma ponteira (agulha) bem fina integrada a um cantiléver, o qual percorre a superfície topográfica da amostra. Esta varredura é realizada por intermédio de um sistema piezoelétrico, com deslocamento, nas posições x, y e z (Fig. 1). Desta forma, a deflexão no cantiléver (integrado com a ponteira), causada pela interação com a amostra, pode ser medida. Um sistema óptico, com feixe a laser e um fotodetector, determinam o quanto o cantiléver deflete para cima ou para baixo, devido à topografia da amostra. Com os dados da deflexão da ponteira ao longo dos eixos x, y e z, reconstrói-se a imagem por intermédio de software específico. No modo contato, a força que o cantiléver exerce sobre a superfície da amostra, provocada pelo deslocamento do eixo z do piezo, permite a quantificação das propriedades do material que está sendo analisado<sup>[23]</sup> (Fig. 1).

Antes do desenvolvimento da MFA, as únicas ferramentas utilizadas para investigar as características morfológicas de glóbulos vermelhos eram microscópios de luz e os microscópios eletrônicos de transmissão e de varredura. A resolução obtida com

o uso do microscópio de luz é limitada a, aproximadamente, metade do comprimento de onda da luz; porém com a microscopia eletrônica, a resolução permite a visualização de componentes estruturais em escala nanométrica, desde que as amostras sejam devidamente processadas para investigação ultraestrutural. Contudo, em nenhuma dessas técnicas há a possibilidade de se obter medições precisas e estruturais ao longo do eixo z (altura) de uma amostra<sup>[24]</sup>.



**Figura 1:** Ilustração do princípio de funcionamento do microscópio de força atômica.  
Fonte: Herrmann, Paulo S. P. *et al* (1997)<sup>[23]</sup>.

Com o uso da MFA, é possível investigar estruturalmente e também mecanicamente a superfície das RBCs, quando estes são dispersos em uma mancha de sangue seca e exposta. Consequentemente, a MFA fornece informações qualitativas e quantitativas da topografia de superfície de eritrócitos, tais como o raio, volume, área de superfície, perímetro e altura, bem como permite determinar as propriedades nanomecânicas, tais como a dureza e viscoelasticidade<sup>[25]</sup>. No modo de mapeamento de força (curvas força×distância ou espectroscopia de força), também, é possível assinalar pontos de interesse sobre um eritrócito e por meio de uma força predefinida, a ponta

(sonda) do cantilever pode ser pressionada nesses pontos assinalados e, assim, investigar diversos parâmetros nanomecânicos locais<sup>[26]</sup>. Sumarizando, a MFA fornece informações em micro- e nanoescala sobre as geometrias das células, bem como acerca das propriedades mecânicas de sua superfície<sup>[27]</sup>.

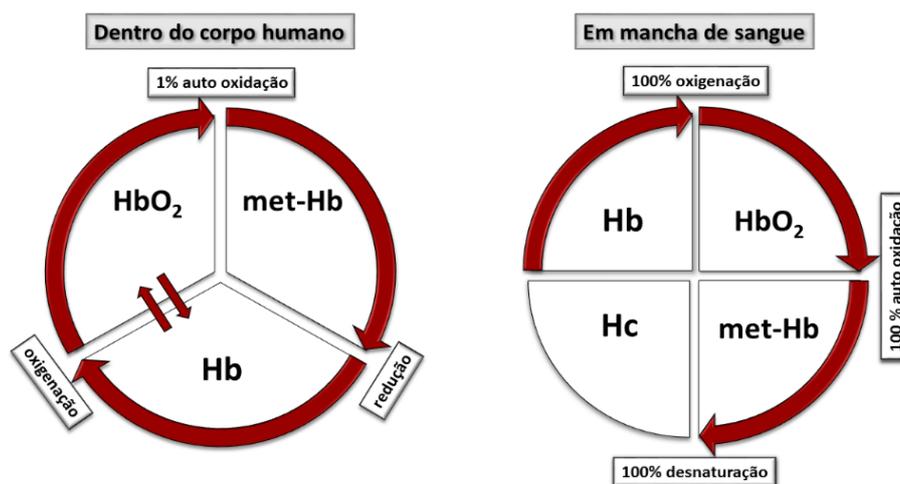
Diversos estudos já avaliaram a estrutura lipídica e proteica da membrana plasmática das RBCs<sup>[28, 29]</sup>. Para manter sua morfologia, conservando a forma bicôncava natural, típica de mamíferos, a membrana das RBCs dispõe de um citoesqueleto, que se encontra sob a membrana plasmática. Uma técnica bastante utilizada para analisar a função do citoesqueleto tem sido a microscopia eletrônica<sup>[30]</sup>. No entanto, uma desvantagem deste método, para estudos e análises forenses, é o fato de que apenas as células submetidas a processamentos químicos podem ser estudadas adequadamente, o que dificulta a análise de células secas em manchas de sangue depositadas em superfícies ou em um ambiente fisiológico normal<sup>[30]</sup>. Assim, uma das vantagens da MFA em relação à microscopia eletrônica, na análise de vestígios obtidos em locais de crime, é a possibilidade de se obter imagens de estruturas em condições ambientais. A MFA não necessita da aplicação de vácuo e nem da modificação do vestígio, por meio de revestimento condutor metálico (no caso da microscopia eletrônica de varredura) ou da ação de fixadores químicos e processos de desidratação, inclusão em resina e seccionamento (no caso da microscopia eletrônica de transmissão). Consequentemente, essa microscopia pode ser considerada um método conservativo (não destrutivo)<sup>[31]</sup>, característica fundamental dentro das análises forenses, principalmente em locais de crime com poucos vestígios

### 1.3. Transformações morfológicas das hemácias quando fora do organismo humano

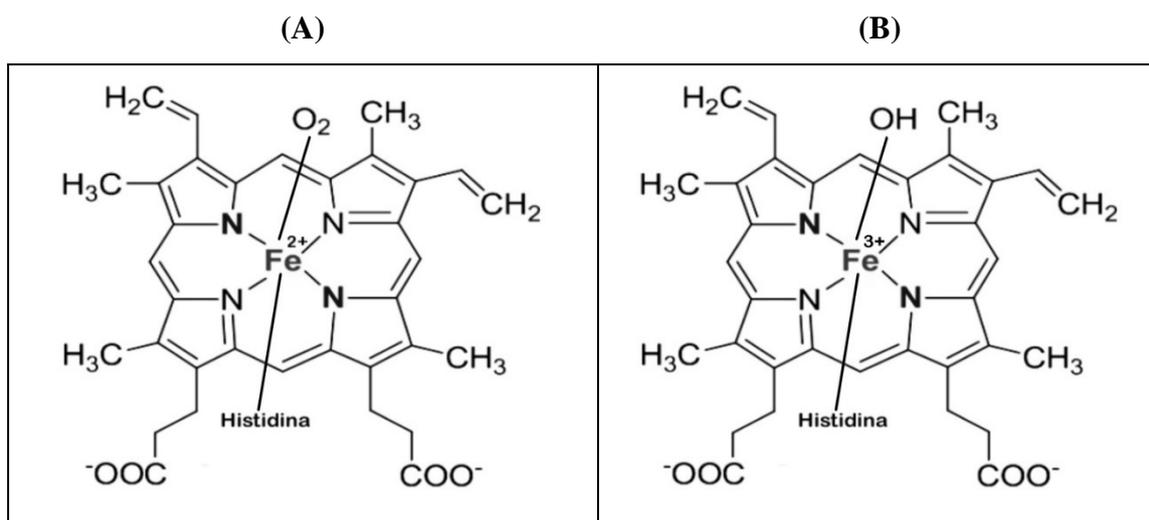
No interior do corpo humano, o sangue é responsável pelas trocas gasosas, pelo transporte de hormônios e nutrientes, pela defesa contra patógenos, coagulação, homeostase e também pela regulação da pressão osmótica<sup>[32]</sup>. Em sistemas sanguíneos humanos, as moléculas de hemoglobina estão presentes, principalmente, em duas formas: uma sem oxigênio - desoxihemoglobina (Hb) e outra saturada com oxigênio - oxi-hemoglobina (HbO<sub>2</sub>). O nível de saturação médio de sangue arterial é > 90% e de sangue venoso > 70%. Apenas uma pequena parte, cerca de 1%, de HbO<sub>2</sub> é auto oxidada em uma terceira forma, met-hemoglobina (met-Hb) (Fig. 2)<sup>[33]</sup>. A hemoglobina, quando está ativa na circulação sanguínea, torna-se protegida contra a desnaturação, pois se encontra internalizada nos glóbulos vermelhos do sangue e os íons de ferro do grupamento heme são mantidos no estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>) por mecanismos, tanto enzimáticos, quanto não enzimáticos, de modo que a formação de met-Hb, composto que não possui afinidade pelo oxigênio, é dificultada<sup>[34]</sup>.

Porém, em cenas de crime, quando há uma lesão e a conseqüente exposição de sangue sobre um substrato qualquer, ocorrerá uma série de processos de degradação sobre o sangue exposto. A maioria das RBCs sofrerá hemólise e as moléculas biológicas estarão envolvidas em reações de hidrólise e de oxirredução, ou então serão deterioradas a partir de enzimas de microrganismos que povoam o ambiente externo<sup>[4]</sup>. Neste caso, ocorrerá a degradação da porção polipeptídica da hemoglobina, e a oxidação espontânea do íon Fe<sup>2+</sup> (ferroso) para íon Fe<sup>3+</sup> (férico), uma vez que, nesta condição, os mecanismos intracelulares de redução do ferro, no grupamento heme, não existem mais (Fig. 3)<sup>[35]</sup>. O sangue satura-se totalmente à HbO<sub>2</sub> assim que entra em contato com o oxigênio na atmosfera, e, devido à ausência da enzima citocromo b5, necessária para a redução de met-Hb no interior do corpo, a transição de HbO<sub>2</sub> para met-Hb deixará de

ser revertida<sup>[33]</sup>. Uma vez que a hemoglobina é auto-oxidada para met-Hb, ocorrerá sua desnaturação para hemichromo (Hc), o qual é formado por meio de uma alteração na conformação interna do grupo heme<sup>[36]</sup>. Assim, a coloração marrom-avermelhada, observada nas manchas de sangue secas sobre um substrato, é uma consequência da transformação de  $\text{Fe}^{2+}$  em  $\text{Fe}^{3+}$ , transformando hemoglobina em hemichromo (Hc)<sup>[37]</sup>, conforme Figura 2.



**Figura 2:** Simplificação da transformação de reação da hemoglobina dentro do corpo (esquerda) e em manchas de sangue (direita). Desoxihemoglobina (Hb), oxi-hemoglobina (HbO<sub>2</sub>), met-hemoglobina (met-Hb) e hemichromo (Hc). Fonte: Strasser *et al.*, 2007<sup>[33]</sup>, modificado.



**Figura 3:** Moléculas de ligação com o ferro no sangue. Estrutura molecular heme em oxihemoglobina com o ferro em sua forma reduzida ( $\text{Fe}^{2+}$ ) coordenado pelo  $\text{O}_2$  na sexta posição de coordenação (deoxihemoglobinas não possuem ligantes nesta posição) (A); estrutura molecular com o ferro na forma oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e a ligação de um íon hidróxido (B). Fonte: Barni *et al.*, 2007<sup>[35]</sup>, com modificações.

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

Nos últimos anos, diversas técnicas para análise do TSD de manchas de sangue, foram relatadas na literatura. Entretanto, conforme descrito no estudo de revisão de Bremmer *et al.* (2012)<sup>[4]</sup>, o potencial para se utilizar manchas de sangue na determinação do momento do crime, ainda não foi completamente explorado nas análises de locais de crime, apesar das diversas tentativas nesse sentido. Dentre as técnicas já propostas, pode-se destacar: Espectroscopia de Reflectância, Espectroscopia no Ultravioleta Visível – UV-Vis, Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica, Espectroscopia Raman, *Polimerase Chain Reaction* - PCR transcriptase reversa/PCR em tempo real (RT – PCR/qPCR), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (HPLC), MFA e métodos alternativos de custo baixo – como a análise utilizando *Smartphones* (dispositivos móveis) e imagens digitais.

##### **1.4.1. - Espectroscopia de Reflectância**

Baseados na transformação da hemoglobina (Hb) presente nas hemácias em seus derivados (HbO<sub>2</sub>, met-Hb e Hc), quando fora do corpo humano, Bremmer *et al.* (2011)<sup>[5]</sup> utilizaram espectroscopia de reflectância difusa para analisar manchas de sangue em ambiente controlado (laboratorial), durante 60 dias de análise. Um total de 1412 espectros de reflectância foram medidos pelo grupo durante esse período. Os resultados demonstraram a possibilidade de se utilizar essa técnica na análise do TSD de manchas de sangue em ambiente controlado, porém outros estudos são necessários para se utilizar a técnica em ambientes não-controlados, tais como locais de crime.

#### 1.4.2. - Espectroscopia no Ultravioleta Visível – UV-Vis

Hanson & Ballantyne (2010)<sup>[38]</sup>, desenvolveram um método para a estimativa do TSD de manchas de sangue secas, utilizando a análise da espectroscopia no ultravioleta visível – UV-Vis da Hb, a qual se baseia em sua química de oxidação característica. Um estudo detalhado da banda de Hb Soret ( $\lambda_{\max} = 412 \text{ nm}$ ) em manchas de sangue envelhecidas revelou uma alteração na banda azul (mudança para comprimento de onda mais curto) à medida que a idade da mancha de sangue aumenta. A estimativa do TSD foi conduzida por um período de um ano (365 dias). Os resultados de Hanson & Ballantyne (2010)<sup>[38]</sup> demonstram que a banda azul de Soret é potencialmente promissora para aplicação em casos forenses, pois, segundo autores, apresenta boa resolução temporal (horas, dias e meses), sensibilidade e portabilidade para cenas de crime.

#### 1.4.3. - Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR)

Fujita *et al.* (2005)<sup>[39]</sup> observaram que a desnaturação da Hb em manchas de sangue secas é regulada por uma mudança no estado de spin do íon de ferro presente na molécula, a qual pode ser medida por EPR. O estudo demonstrou que manchas de sangue humanas apresentam quatro sinais de EPR bem definidos, observados nas regiões da estrutura do centro eletrônico paramagnético. Estes quatro sinais representam o íon férrico de alta rotação (g6), o íon férrico não-heme, (g4), o íon férrico de baixa rotação (H) e as espécies de radicais livres (R). Os pesquisadores notaram que o TSD de uma mancha de sangue pode ser relacionado com a medida da razão (H/g4) do sinal EPR. Porém, fatores ambientais como diferenças de absorção, exposição à luz e alterações da temperatura ambiental afetaram as análises dos

compostos EPR-ativos, o que pode modificar os exames de TSD em locais não controlados. O estudo foi conduzido por um período acima de 432 dias.

#### **1.4.4. - Espectroscopia Raman**

Analisando manchas de sangue por espectroscopia Raman, Boyd *et al.* (2010)<sup>[40]</sup> observaram que as intensidades relativas dos picos de dispersão detectados eram dependentes da idade da mancha de sangue. Os autores notaram que a intensidade relativa dos picos correspondentes a grupamentos químicos da HbO<sub>2</sub> diminuía após secagem da mancha de sangue. Já o sangue fresco, extraído diretamente de um doador, sem armazenamento prévio, exibiu também picos de dispersão em 1155 e 1511 cm<sup>-1</sup>, os quais desapareciam após secagem. Posteriormente, a espectroscopia Raman também foi utilizada, por Doty *et al.* (2016)<sup>[41]</sup>, para analisar o TSD de manchas de sangue secas em intervalos de tempo entre 1 e 168 h (1 semana). No estudo, os autores utilizaram espectroscopia Raman, juntamente com a espectroscopia de correlação bidimensional e modelagem estatística. Conforme observado por Doty *et al.* (2016)<sup>[41]</sup>, a abordagem de análise de dados utilizada durante o estudo demonstrou capacidade para estimar, com precisão, o TSD de manchas de sangue, em um período de até 1 semana. O estudo, porém, não explorou o potencial efeito das alterações de suportes para deposição de manchas de sangue, nem mesmo as mudanças na temperatura, umidade e exposição à luz solar.

#### **1.4.5. - RT – PCR/qPCR (Análise de Ácido Ribonucleico - RNA)**

Em 2005, Anderson *et al.*<sup>[42]</sup> relataram um método para determinar o TSD de manchas de sangue, por meio da avaliação de padrões de degradação do RNA. Os pesquisadores propuseram que diferentes tipos de RNA se degradam *ex vivo*, em

taxas diferentes, e conseguiram encontrar uma correlação entre a idade de uma mancha de sangue e a razão de dois tipos diferentes de RNA: RNA mensageiro (mRNA) de  $\beta$ -actina e RNA ribossomal (rRNA) 18S. Eles atribuíram a alteração na taxa de degradação desses RNAs à diferença estrutural entre eles. O mRNA de  $\beta$ -actina não é combinado com qualquer complexo de proteína e não possui proteção ambiental, enquanto que o rRNA 18S está protegido dentro da estrutura ribossomal maior, tornando-o menos propenso à degradação. Entretanto, em 2014, Alrowaiti *et al.*<sup>[43]</sup> publicaram uma carta ao editor contestando essa razão, mRNA *versus* rRNA, utilizada por Anderson *et al.*<sup>[42]</sup> em 2005. Na carta, os autores afirmaram que havia uma discrepância entre o método de análise dos dados e os resultados/conclusões obtidos com o estudo. Esta discrepância poderia impedir a repetição da técnica, por meio da razão (RNA) citada no documento, e por sua vez impedir a melhoria do método para utilização na prática forense. Em novo estudo, Anderson *et al.* (2011)<sup>[44]</sup> analisaram três pares de amplicons RNAs: 1º)  $\beta$ -actina 301 bp *versus* 89 bp; 2º) 18S 501 bp *versus* 171 bp; e 3º)  $\beta$ -actina 169 bp *versus* 18S 171 bp) em manchas de sangue *ex vivo*, visando determinar o TSD, por um período de 4 semanas. Os resultados obtidos pelo grupo indicaram que as diferenças no tamanho dos amplicons examinados podem ser explorados para estimar o TSD de uma mancha de sangue. O estudo utilizou RT-PCR/qPCR multiplex, além da aplicação de estatística multivariada.

#### **1.4.6. - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (HPLC)**

Jan Andrasko (1997)<sup>[45]</sup>, utilizando HPLC, descreveu um método para estimar o TSD de manchas de sangue quando depositadas em roupas. Pela técnica, as proteínas foram extraídas das manchas de sangue e eluídas em coluna cromatográfica seguindo

de detecção. No estudo, analisou-se a quantificação de produtos de degradação do grupo heme das manchas de sangue, utilizado esses produtos como biomarcadores para estimar a idade. Alguns anos antes, Inoue *et al.* (1992)<sup>[46]</sup> observaram a presença de uma proteína desconhecida 'X' em manchas de sangue secas, verificando que a área do pico dessa proteína tornava-se maior à medida que o TSD de manchas de sangue aumentava. No estudo de Inoue *et al.*, as manchas de sangue foram armazenadas, durante 52 semanas, no escuro, à temperatura de 37,8°C. Durante o estudo conduzido por Andrasko (1997)<sup>[45]</sup> foram analisadas as proteínas envolvidas no processo de envelhecimento de manchas de sangue, dentre elas a proteína "X" (observada por Inoue *et al.* <sup>[46]</sup>, em 1992), verificando e comparando os picos nos cromatogramas de absorção, por um período de 14 dias. As amostras utilizadas no estudo de Andrasko (1997) foram mantidas em ambiente controlado (laboratório).

#### **1.4.7. - Microscopia de Força Atômica – MFA**

Strasser *et al.* (2007)<sup>[33]</sup> utilizou MFA para determinar a elasticidade de hemácias em manchas de sangue, buscando um método para determinar o TSD. Na metodologia aplicada no estudo, os pesquisadores depositaram uma mancha de sangue fresca, sobre uma lâmina de vidro, e analisaram, após a secagem da gota. A MFA foi utilizada para testar a elasticidade por meio do registro das curvas de força×distância (com determinação do parâmetro módulo de Young - *Young's modulus*). As medidas foram realizadas imediatamente após secagem da gota de sangue e nos seguintes tempos: 1,5 h, 30 h e 31 dias. Os pesquisadores notaram que a elasticidade das hemácias aumenta quando fora do corpo (*ex vivo*). Observou-se um aumento, na elasticidade dos glóbulos vermelhos, quando se comparou os três tempos analisados: 300 kPa, para medida 1,5 horas após formação da amostra; 600

kPa, após 30 horas; e 2,5 GPa, após 30 dias. O estudo observou, também, a morfologia das RBCs, durante um período de 4 semanas. Nessa análise, os pesquisadores geraram uma imagem de MFA para cada semana (4 imagens), porém, pela simples observação visual das RBCs nessas imagens, não observaram alterações morfológicas perceptíveis qualitativamente nas células. Nas análises conduzidas pelo grupo de Strasser *et al.* (2007)<sup>[33]</sup>, utilizou-se amostra de sangue de apenas um indivíduo (não há relato do número de células analisadas), e a amostra permaneceu armazenada à temperatura de 20°C e umidade de 30% (ambiente controlado).

Wu *et al.* (2009)<sup>[47]</sup> utilizaram MFA para analisar o TSD de manchas de sangue e sua potencial aplicação para investigação forense. No estudo, amostras de sangue foram depositadas em superfícies de vidro e de mica (silicato de alumínio), sendo testadas em três diferentes condições: (I) controlada (temperatura de 25°C e umidade de 76%), (II) não-controlada (temperatura entre 21,2 – 33,7°C e umidade entre 38,4 – 87,3%), (III) controlada - baixa temperatura (temperatura de 4°C e umidade de 62%). Os pesquisadores observaram mudanças na morfologia celular (volume celular) e viscoelasticidade (força adesiva superficial) das hemácias, ao longo de 60 dias de análise. Na conclusão do estudo, os autores relataram que as alterações observadas nas RBCs são dependentes do tipo de suporte onde estão depositadas, do tempo em que estão depositadas e das condições ambientais. As análises observadas por Wu *et al.* (2009)<sup>[47]</sup> foram realizadas em apenas 30 células (RBCs), e, apesar de não constar explicitamente no texto publicado do estudo, as amostras foram obtidas, aparentemente, de um indivíduo doador.

#### 1.4.8. - Métodos alternativos para análise do TSD

*Smartphones* (dispositivos móveis) e imagens digitais – estudos recentes vêm demonstrando a aplicação científica de imagens digitais obtidas por *Smartphones* devido à alta resolução e qualidade de cor observadas. Em 2013, Thanakiatkrai *et al*<sup>[48]</sup> utilizaram câmeras de *Smartphone* acopladas em sistema de iluminação de custo baixo como uma ferramenta para estimar a idade de manchas de sangue. No estudo, manchas de sangue foram depositadas em vários suportes e fotografadas com câmeras de *Smartphone*. O método foi comparado entre três dispositivos móveis (Samsung Galaxy S Plus, Apple iPhone 4 e Apple iPad 2). Os valores de cor das imagens digitais foram extraídos e correlacionados com o tempo desde a deposição (TSD). A alteração de cor observada foi consistente com o processo de desnaturação de Hb, quando fora do corpo humano. Para classificar as manchas, os pesquisadores utilizaram uma técnica de classificação estatística chamada *Random Forests<sup>TM</sup>*, sendo possível prever, segundo relatado no estudo, a idade da mancha de sangue com precisão de até 42 dias, com uma taxa de erro de 12%.

Shin *et al.* (2017)<sup>[49]</sup>, também, demonstraram a utilização de um sistema de detecção móvel, denominado, pelos autores, de *Smart Forensic Phone*. O estudo, segundo reivindicação dos autores, permitiu estimar, rápida e precisamente, a idade de uma mancha de sangue. Nas análises do estudo, manchas de sangue foram depositadas em cinco suportes diferentes (papel de parede, tecido, vidro, madeira e papel A4), sendo monitorados os valores de RGB (Vermelho, Verde e Azul) por pixel das imagens de sangue, em intervalos de 6 h, por meio da utilização de um aplicativo para *Smartphone* e a câmera de um celular Samsung Galaxy S3 LTE. Os valores RGB foram convertidos para o valor V de HSV (tonalidade, saturação e brilho). Observou-se um rápido declínio nos valores de RGB e V durante as

primeiras 42 h de análise e, posteriormente, manteve-se relativamente inalterado. A idade da mancha de sangue pôde ser calculada a partir da comparação de *V versus* tempo. Na análise dos autores, o método permitiu estimar o tempo desde a deposição de manchas de sangue com menos de 42 h de deposição.

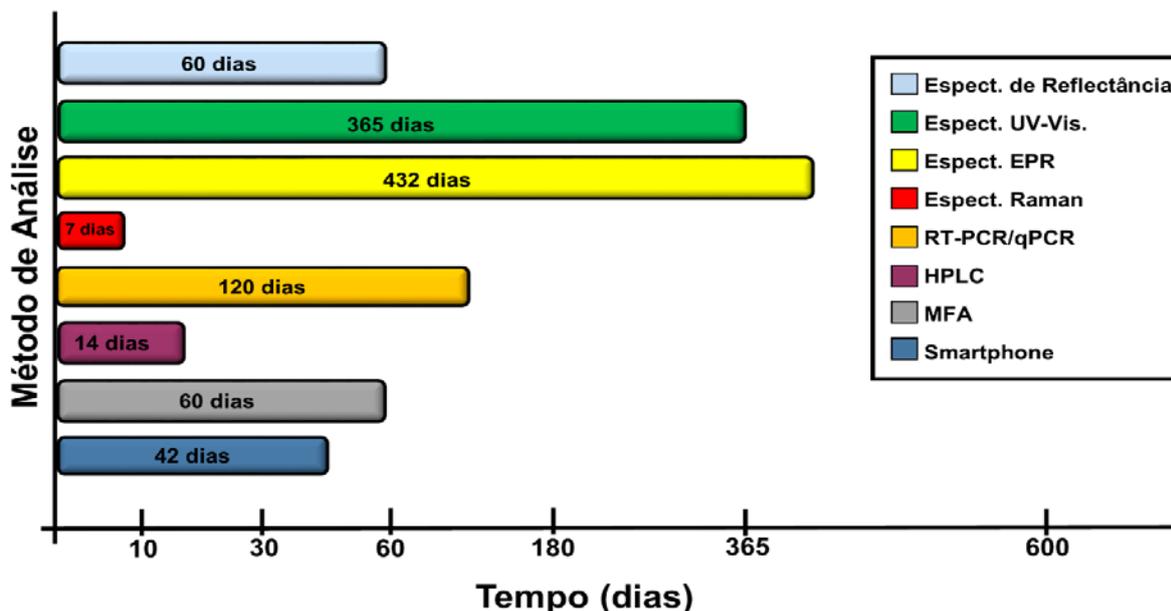
### **1.5. Comparação entre os métodos para análise do TSD em manchas de sangue**

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

Na comparação entre os alvos de medidas em manchas de sangue, o método RT-PCR/qPCR é o único que se baseia na análise da degradação e quantificação de RNAs de glóbulos brancos, enquanto os demais métodos analisam a degradação e a quantificação das transformações sofridas pelas RBCs e suas proteínas, principalmente, Hb. A análise de aminoácidos e proteínas no plasma sanguíneo também já foi alvo de pesquisas para o TSD de manchas de sangue em cenas de crime, nesse sentido, por meio da medida da taxa de racemização do (D-L) ácido aspártico<sup>[50]</sup>, da análise de biomarcadores circadianos<sup>[51]</sup> ou da desnaturação natural da creatina quinase e da alanina transaminase<sup>[52]</sup>. Esses biomarcadores mostraram que também podem contribuir com análises temporais. Porém, os estudos que envolvem moléculas do plasma sanguíneo não foram abordados no escopo do presente estudo.

Destaca-se, também, o TSD aplicado nas pesquisas para cada método, os quais apresentaram grande variação, conforme observado na Figura 4. Desde a espectroscopia Raman, por Doty *et al.* (2016)<sup>[41]</sup>, os quais relataram estudo de análise com TSD de 1

semana (7 dias), até Fujita *et al.* (2005)<sup>[39]</sup>, com análises por EPR com análises do TSD superiores a 432 dias.



**Figura 4:** Comparação dos métodos de análise, quanto ao tempo (TSD) utilizado pelos autores nos estudos com manchas de sangue (fonte: próprio autor).

Outra abordagem necessária é a aplicabilidade dos métodos em locais de crime. Algumas variáveis contribuem para modificar as medidas do TSD as quais podem ser influenciadas pela variação dos fatores ambientais e pelos diversos tipos de suportes para deposição de manchas de sangue. Nos trabalhos desenvolvidos com RT-PCR/qPCR<sup>[42]</sup>, HPLC<sup>[45]</sup>, *Smartphones*<sup>[49]</sup>, MFA<sup>[47]</sup> e com as espectroscopias de reflectância<sup>[5]</sup>, UV-Vis<sup>[38]</sup> e EPR<sup>[39]</sup>, as principais variáveis levadas em consideração pelos autores foram os fatores ambientais, como temperatura, umidade e exposição à luz solar. Para a espectroscopia Raman, além das variáveis ambientais, os autores<sup>[40, 41]</sup> destacaram que diferentes substratos para deposição de manchas de sangue podem alterar as medidas do TSD. Dentre os trabalhos científicos analisados, apenas espectroscopia UV-Vis<sup>[38]</sup>, Raman<sup>[41]</sup> e MFA<sup>[47]</sup> arriscaram testar as técnicas em ambientes não controlados. Em locais de crime, as condições ambientais são altamente diversas, sendo necessária a ampliação de estudos científicos para aplicação dos

métodos em ambientes com variação de temperatura, umidade e substratos para deposição.

Dentro de uma abordagem criminal, devido à exiguidade de vestígios em locais de crime, e a necessidade de aplicação de diversos diagnósticos ao longo de uma investigação forense, métodos de análise destrutivos para provas criminais são sempre preteridos. Devido às características peculiares dos equipamentos, espectroscopia Raman, RT-PCR/qPCR e HPLC apresentam especialidades que os tornam métodos efetivamente destrutivos. Essa característica pode impedir que tais métodos de análise sejam aplicados em um exame criminal, caso o vestígio seja completamente consumido durante um diagnóstico, impedindo futuras apreciações. Dentro dessa abordagem, quanto mais sensível for o método, maior será a sua possibilidade de aplicação. A sensibilidade é característica imprescindível, principalmente para locais de crime com poucos vestígios. Dentro das pesquisas aplicadas para o cálculo do TSD de manchas de sangue, os autores que utilizaram os métodos das espectroscopias de reflectância<sup>[5]</sup> e EPR<sup>[39]</sup>, e de HPLC<sup>[45]</sup> não demonstraram a quantidade de sangue utilizado para aplicação da metodologia, não sendo possível, então, abordá-los quanto à sensibilidade. Os métodos de espectroscopia no UV-Vis<sup>[38]</sup>, Raman<sup>[41]</sup>, RT-PCR/qPCR<sup>[42]</sup>, MFA<sup>[47]</sup> e *Smartphone*<sup>[49]</sup> demonstraram-se bastante sensíveis, apresentando capacidade de medida para quantidades ínfimas de manchas de sangue, dentro da escala de poucos microlitros ( $\mu\text{L}$ ). Especificamente para MFA, Wu *et al.* (2009)<sup>[47]</sup> não citaram a quantidade de sangue analisado no estudo, entretanto, foram específicos no que diz respeito à informação de quantidade, relatando medidas de cerca de 30 RBCs em manchas de sangue, o que demonstra, ainda mais, a alta sensibilidade do método, pois, mesmo com tão poucas células seria possível a obtenção de conclusões acerca do TSD conforme demonstrado no Quadro 1.

**Quadro 1:** Comparação entre os diferentes métodos de análise (TSD de manchas de sangue) (Fonte: próprio autor)

	<b>Alvo do método</b>	<b>Destruição da amostra</b>	<b>Sensibilidade do método</b>	<b>Quantidade de amostra</b>
<b>Reflectância</b>	RBC	Não destrutivo	**	**
<b>UV-Vis</b>	RBC	Não destrutivo	Alta	50 µL
<b>EPR</b>	RBC	Não destrutivo	**	**
<b>Raman</b>	RBC	Destrutivo	Alta	30 µL
<b>PCR</b>	Leucócitos	Destrutivo	Alta	10 µL
<b>HPLC</b>	RBC	Destrutivo	**	**
<b>MFA</b>	RBC	Não destrutivo	Alta	30 células
<b>Smartphones</b>	RBC	Não destrutivo	Alta	50 µL

\*\* parâmetro não medido

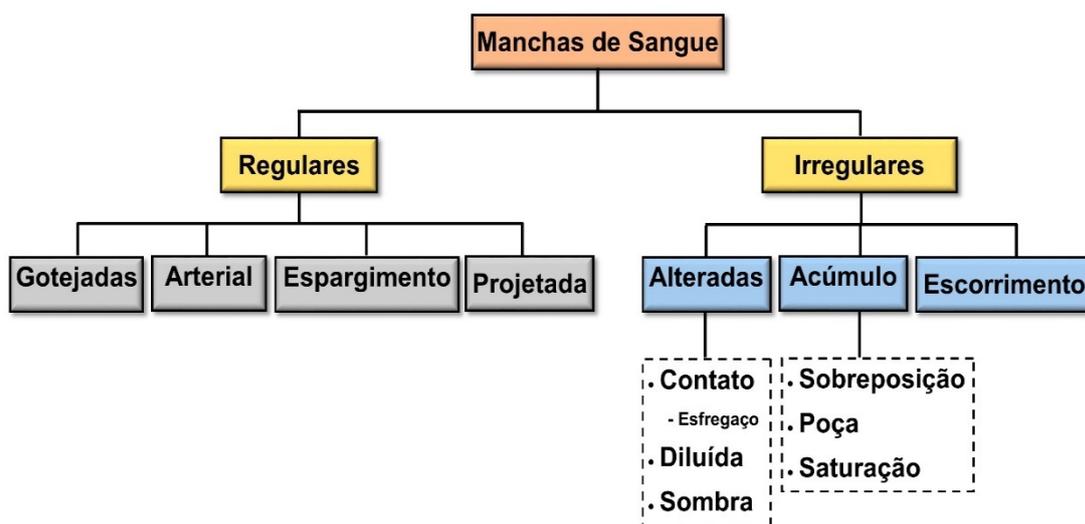
## 1.6. Classificação e análise de padrões em manchas de sangue

A análise de padrões em manchas de sangue (*bloodstain pattern analysis* - BPA) é uma subdisciplina científica da criminalística, frequentemente, utilizada para auxiliar na reconstrução de incidentes criminais. O principal objetivo dessa disciplina forense é definir "o que gerou" e "como foi gerada" uma determinada mancha de sangue, em locais de crime<sup>[53]</sup>. Dessa forma, a base científica que sustenta esse ramo das ciências forenses determina que o sangue, como um fluido coloidal, reagirá às forças externas (extracorpóreas) de uma forma previsível e padronizada. As forças coesivas da tensão superficial e a viscosidade do sangue, bem como as várias forças externas ambientais (resistência à gravidade e ao ar, por exemplo) atuarão em conjunto para produzir resultados de dispersão similares quando manchas de sangue forem produzidas em cenas de crime<sup>[54]</sup>. Esses padrões de dispersão das manchas de sangue são alvos da interpretação da BPA, a qual possui suas terminologias reguladas pela *International Association of Bloodstain Pattern Analysts* (IABPA). Essa associação, que é formada

por mais de 750 membros de diversos países, destina-se à uniformização nos métodos de análise de padrões de manchas de sangue em locais de crime<sup>[1]</sup>.

O formato dessas manchas pode ser utilizado para determinar a direção de seu movimento gerador, além de poder determinar a velocidade, altura, e o tipo de objeto gerador de uma lesão (projétil de arma de fogo, objetos perfurocortantes, etc)<sup>[55]</sup>.

Na literatura científica, há algumas formas de classificação taxonômica dos formatos de manchas de sangue em locais de crime. Velho *et al.* (2013)<sup>[2]</sup>, simplificaram a classificação produzida por Bevel & Gardner (2008)<sup>[54]</sup>, os quais desenvolveram uma complexa taxonomia baseada na geometria circular ou elíptica (*spatter stains*), e em manchas sem um formato padrão definido (*non-spatter stains*), denominadas respectivamente de regulares e irregulares<sup>[2]</sup>. Na classificação simplificada de Velho *et al.* (2013)<sup>[2]</sup>, as manchas de sangue regulares foram divididas em: gotejadas, arterial, espargimento (*cast-off*) e projetadas. Já as manchas irregulares foram divididas em: alteradas (contato-esfregaço, diluídas e sombra), acúmulo (sangue sobre sangue, poça e saturação) e escorrimento (Fig. 5).



**Figura 5:** Classificação taxonômica simplificada das manchas de sangue em locais de crime. Adaptado de Velho *et al.* (2013)<sup>[2]</sup>.



**Figura 6:** Exemplificação de imagens de sangue em locais de crime. Na imagem A, uma mancha de sangue irregular gerada por contato - arrastamento/esfregaço. Na imagem B, uma sequência de manchas regulares geradas por espargimento, com angulação característica (seta em amarelo é o sentido do movimento gerador). Fonte: Próprio autor

Nos estudos que envolvem análises de RBCs por microscopias, é comum a utilização de amostras de esfregaços sanguíneos para exames celulares. A utilização da MFA no diagnóstico dos parâmetros dimensionais das hemácias requer a observação individualizada da célula, sem sobreposição celular, o que é obtido, com maior facilidade, em manchas de sangue irregulares geradas por contato – tipo esfregaço, conforme ilustrado na Figura 6-A. Manchas de sangue regulares, devido à geometria circular característica, formam aglomerados de células, empilhadas entre si, o que dificulta a medida por MFA dos parâmetros individuais.

Portanto, as RBCs presentes em manchas de sangue irregulares geradas por contato – tipo esfregaço foram a análise principal do estudo, pois formam um filme sanguíneo, apresentando monocamada de células não coalescidas. Dentro desse contexto, a hipótese principal desta pesquisa é a investigação das possíveis alterações morfológicas das RBCs em manchas de sangue, através das análises por MFA, determinando a existência ou não de um padrão tempo-dependente, assim como a influência do tipo de superfície e condições ambientais de armazenamento.



## **2. OBJETIVOS**

## **2.1. Objetivo Geral**

Analisar o tempo desde a deposição (TSD) em manchas de sangue secas, mediante análises de possíveis alterações das hemácias (RBCs) humanas, em diferentes intervalos de tempo, quando depositadas em diferentes superfícies, aplicando a microscopia de força atômica (MFA).

## **2.2. Objetivos Específicos**

- a) Avaliar o processo de modificação das RBCs em manchas de sangue, determinando se há algum padrão de transformação temporal, e se esse padrão pode ser aplicado para vestígios de sangue em locais de crime;
- b) Aplicar a técnica de MFA para avaliação em alta resolução das características estruturais e mecânicas das RBCs presentes em manchas de sangue, buscando verificar os possíveis padrões tempo-dependentes;
- c) Investigar a possível influência das alterações ambientais sobre o processo de modificação em manchas de sangue, e se há alguma influência no processo de transformação temporal das RBCs;
- d) Comparar diferentes superfícies (vidro, metal e cerâmica) para a deposição de manchas de sangue, buscando avaliar se há alguma variação nos processos tempo-dependentes das RBCs em manchas de sangue entre as superfícies;
- e) Analisar a aplicação do método de MFA, visando determinar se a técnica do TSD das RBCs em manchas de sangue é passível de aplicação nas práticas forenses de levantamentos em locais de crime.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### 3.1. Indivíduos

Os indivíduos humanos utilizados (4 masculinos e 4 femininos), com idades entre 20 e 40 anos, foram selecionados aleatoriamente dentro de uma amostra de conveniência. Para avaliar a possível influência de diferentes variáveis, informações sobre o gênero, tipo sanguíneo, idade, medicação eventualmente utilizada, doenças eventualmente existentes, qualidade do sono, consumo de cigarros e bebidas alcoólicas e a prática regular de exercícios físicos foram coletadas de todos os indivíduos, após o preenchimento de um questionário prévio – Anexo I (adaptação do teste Qualidade de Vida e Saúde - QVS-80 – Vilela Junior *et al.*, 2007)<sup>[56]</sup>.

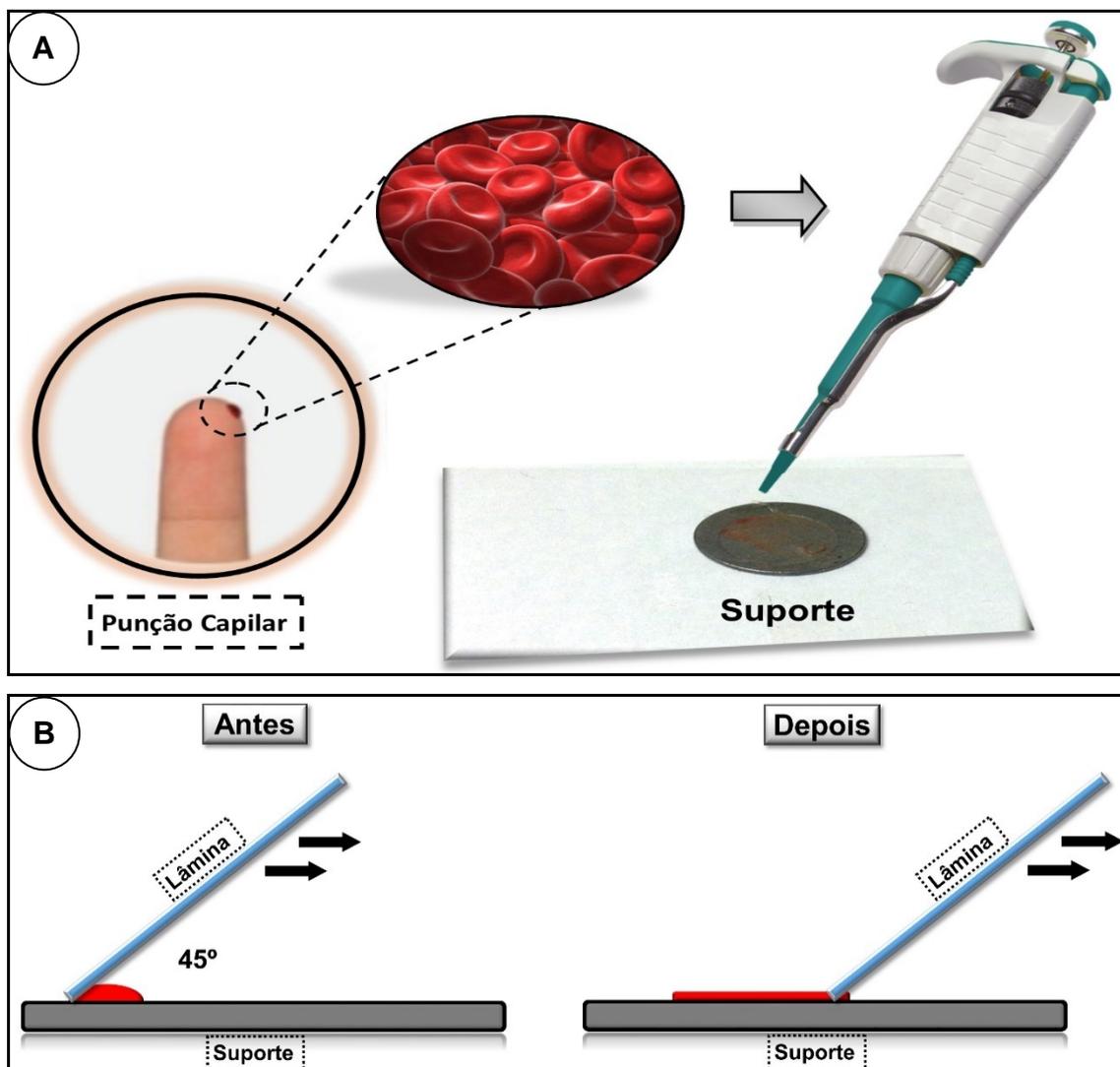
Foi obtida autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina - Universidade de Brasília – CEP/FM/UnB para a realização do presente estudo (CAAE nº 57964516.5.0000.5558), sendo aprovado, por unanimidade, pelo parecer substanciado do CEP/FM/UnB nº: 1.755.017 (Anexo II), em concordância com a Declaração de Helsinki (WMA, 2008)<sup>[57]</sup>, que regula a pesquisa com seres humanos. A concordância dos indivíduos da pesquisa formalizou-se a partir da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido – TCLE, conforme modelo estabelecido pelo CEP/FM/UnB (Anexo III).

### 3.2. Produção e análise das manchas de sangue

As manchas de sangue foram obtidas por punção capilar de dedo (Fig. 7-A), sendo colhido cerca de 1 (um)  $\mu\text{L}$  (microlitro) de sangue periférico de cada doador. A punção capilar foi gerada pela utilização de lancetas e de um lancetador, modelo Accu-Chek Active, lote: 06029618, marca Roche Diagnostics. A amostra de sangue foi

coletada, utilizando-se micropipeta automática monocanal (P10), marca HTL, e depositada sobre o suporte. Em seguida, foram geradas manchas de sangue por esfregaço sobre a superfície dos suportes, utilizando-se uma lâmina de vidro em um ângulo de aproximadamente  $45^\circ$ , conforme se observa na Figura 7-B.

As amostras de sangue, quando coletadas dos indivíduos doadores, foram depositadas, imediatamente após sua obtenção, sobre um dos suportes analisados no presente estudo (descritos em detalhes posteriormente), deixando-se secar ao ar livre por 10 minutos. Logo após, a amostra foi levada para o microscópio de força atômica para análise no tempo T0.



**Figura 7-A:** Esquema da punção capilar de dedo e da aplicação do sangue sobre o suporte. **B:** Esquema para produção do esfregaço sobre o suporte, com o arraste da lâmina de vidro em ângulo de  $45^\circ$ .

Para o processo de análise do TSD das manchas de sangue, nas diversas etapas aplicadas no estudo, todas as amostras passaram por 06 (seis) análises temporais, seguindo uma progressão temporal iniciada no tempo T0 (0 h) e finalizada no tempo T5 (28 dias), conforme tabela 1:

**Tabela 1:** Análise tempo-dependente das manchas de sangue

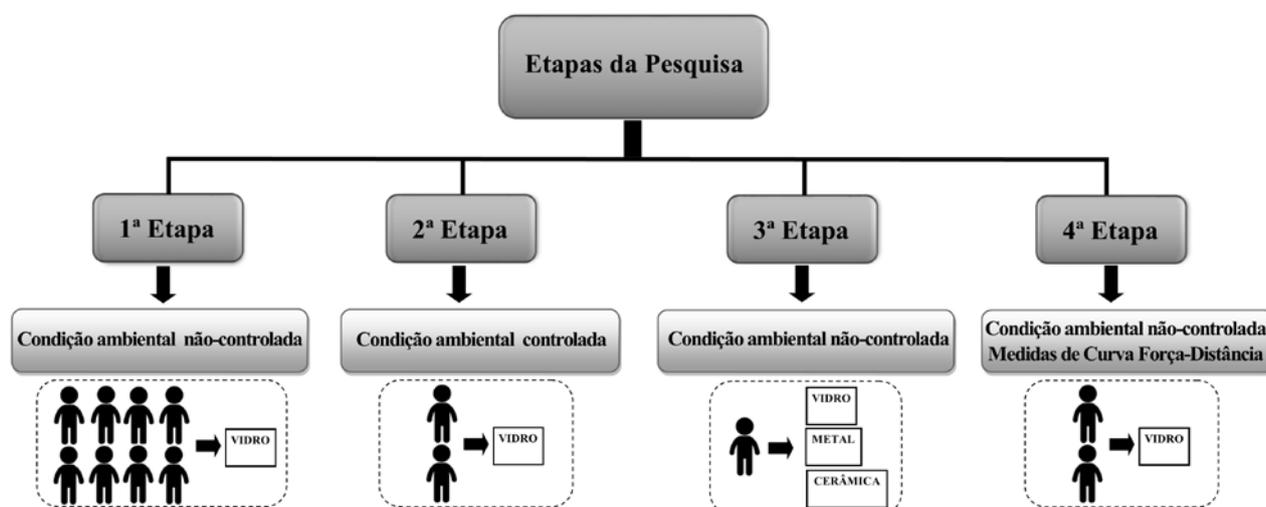
<b>Análises</b>	<b>Tempo</b>	<b>Período de secagem</b>
<b>Análise 0</b>	T <sub>0</sub>	0 hora
<b>Análise 1</b>	T <sub>1</sub>	1 dia
<b>Análise 2</b>	T <sub>2</sub>	7 dias
<b>Análise 3</b>	T <sub>3</sub>	14 dias
<b>Análise 4</b>	T <sub>4</sub>	21 dias
<b>Análise 5</b>	T <sub>5</sub>	28 dias

Durante as análises temporais, as manchas de sangue permaneceram sob duas condições ambientais distintas: não-controladas e controladas, dependendo da etapa experimental a qual a amostra seria submetida. Na condição não-controlada, visando simular cenas de crime, as amostras permaneceram em processo tempo-dependente, em ambiente *indoor* sob temperatura variando entre 20 e 30°C e umidade relativa do ar variando entre 20 e 65% (ambos os parâmetros previstos para Brasília/DF, em dados observados do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET)<sup>[58]</sup>. Na condição controlada, as amostras permaneceram em processo tempo-dependente, em ambiente *indoor* sob temperatura fixa de 25°C e umidade relativa do ar de 80%.

### **3.3. Etapas dos experimentos de desenvolvimento da pesquisa**

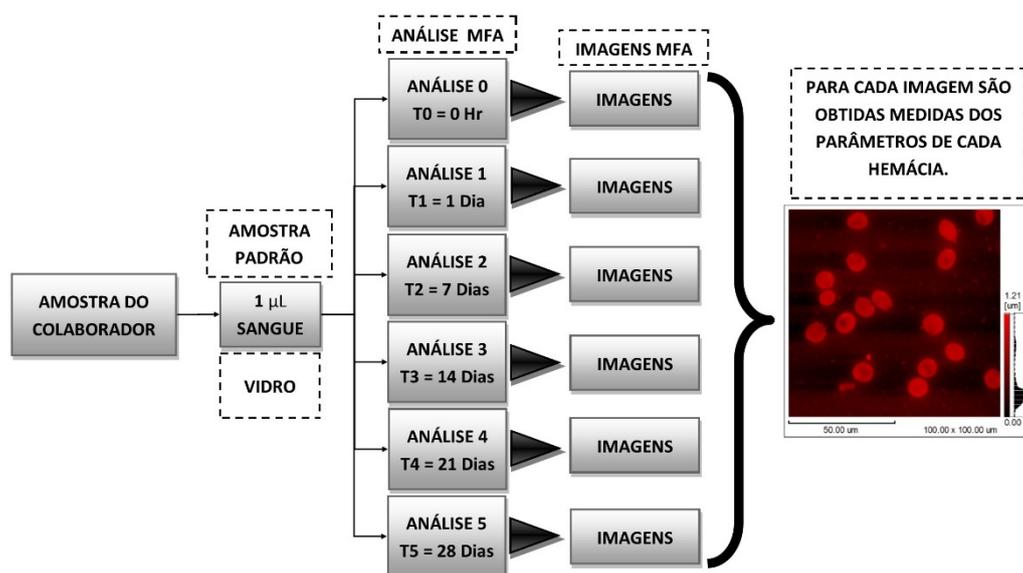
A pesquisa foi dividida em uma programação formada por quatro etapas (Fig. 8), conforme descrito abaixo:

- **1ª etapa** – Análise do TSD das RBCs em manchas de sangue de diferentes indivíduos doadores (4 masculinos e 4 femininos), sobre um tipo de suporte (vidro), mediante condições ambientais não-controladas, por meio da avaliação qualitativa e quantitativa das RBCs presentes em imagens obtidas por MFA;
- **2ª etapa** - Análise do TSD de hemácias em manchas de sangue de diferentes indivíduos doadores (1 masculino e 1 feminino), sobre um tipo de suporte (vidro), mediante condições ambientais controladas, por meio da avaliação qualitativa e quantitativa das RBCs presentes em imagens obtidas por MFA;
- **3ª etapa** - Comparação da influência de diferentes tipos de suportes (vidro, metal e cerâmica) nas análises do TSD das RBCs em manchas de sangue, mediante condições não-controladas, por meio da avaliação qualitativa e quantitativa das RBCs presentes em imagens obtidas por MFA;
- **4ª etapa** – Análise do TSD das RBCs em manchas de sangue de diferentes indivíduos doadores (1 masculino e 1 feminino), sobre um tipo de suporte (vidro), mediante condições ambientais não-controladas, por meio da avaliação das curvas de força×distância obtidas a partir das RBCs presentes em imagens de MFA.



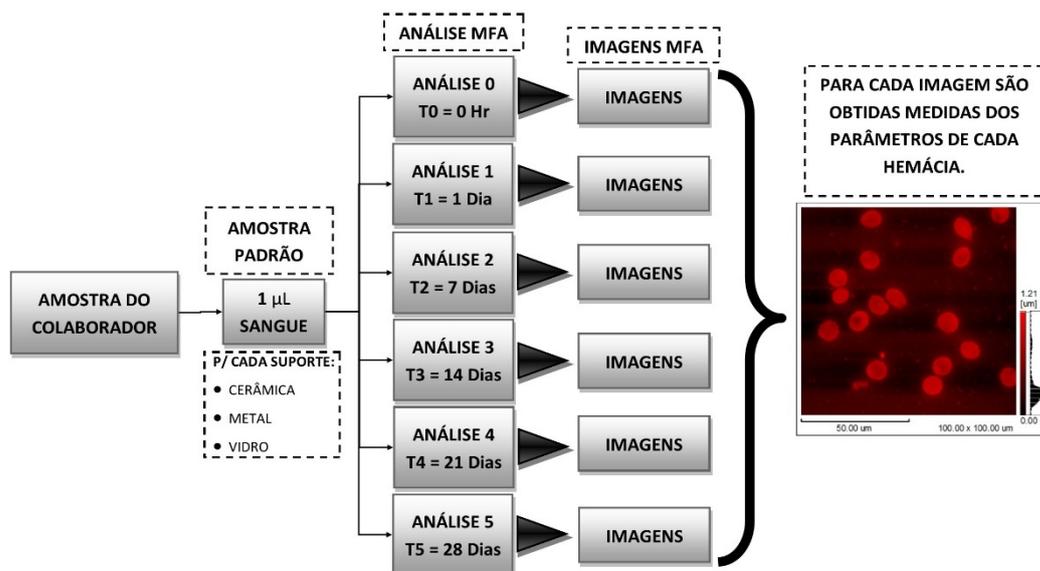
**Figura 8:** Demonstração em representação esquemática das 4 etapas do estudo

Nas 1ª e 2ª etapas foram avaliados o comportamento das RBCs, por meio da análise de parâmetros celulares estruturais (morfométricos), os quais serão descritos em tópico próprio. Esses parâmetros foram verificados pelo diagnóstico da progressão temporal (T0 até T5), dentro de condições ambientais não-controladas e de condições ambientais controladas, respectivamente. O suporte utilizado nessas duas etapas foi o de vidro – Tipo lamínula de vidro circular (10 mm de diâmetro). Nessas etapas, as análises para cada indivíduo doador seguiram o esquema apresentado na Figura 9.



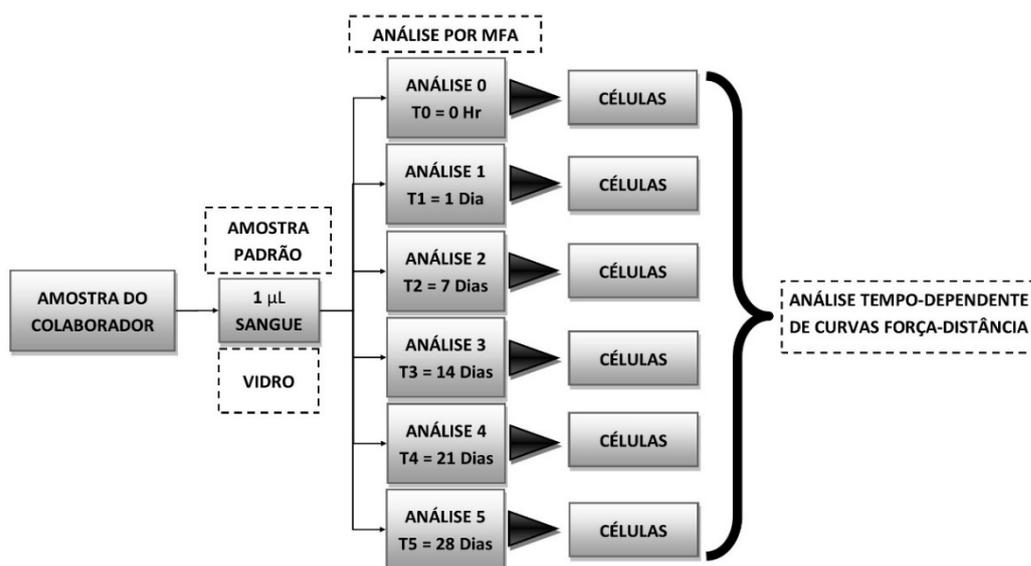
**Figura 9:** Esquema explicativo da análise da amostra de cada indivíduo doador na 1ª e 2ª etapas

Na 3ª etapa foi observado o comportamento das RBCs quando depositadas em diferentes suportes (vidro, metal e cerâmica), analisando-se, também, os parâmetros celulares estruturais. Esses parâmetros foram verificados pelo diagnóstico da progressão temporal (T0 até T5), dentro de condições ambientais não-controladas. Os suportes utilizados na presente etapa apresentavam as seguintes características: Cerâmica – Tipo bold, com revestimento de coloração branca; Metal – Tipo lâmina de aço; Vidro – Tipo lamínula de vidro circular (10 mm de diâmetro). Nessa etapa, as análises para o indivíduo doador seguiram o esquema da Figura 10.



**Figura 10:** Esquema explicativo da análise da amostra do indivíduo doador para a 3ª etapa

Na 4ª etapa foi observado o comportamento das RBCs, mediante análises de curvas de força×distância, por meio do exame da elasticidade celular, medida pelo módulo de Young. Essas medidas foram verificadas pelo diagnóstico da progressão temporal (T0 até T5), dentro de condições ambientais não-controladas. O suporte utilizado nessa etapa foi de Vidro – Tipo lamínula de vidro circular (10 mm de diâmetro). Dentro dessa etapa, as análises para cada indivíduo doador seguiram o esquema da Figura 11.



**Figura 11:** Esquema explicativo da análise da amostra dos indivíduos doadores para a 4ª etapa

### 3.4. Aplicação da Microscopia de Força Atômica – MFA

As amostras de manchas de sangue foram analisadas por meio da aplicação da MFA, empregando um equipamento SPM-9600 (Shimadzu, Japão), como mostrado na Figura 12, operando em modo contato e sempre considerando parâmetros específicos de análise. Uma ponteira do tipo V-shape cantilever  $\text{Si}_3\text{N}_4$  (Asylum Research – *Oxford Instruments*, Santa Barbara, CA, EUA), modelo: TR800PSA, lote: 92251B, com flexão normal constante de  $K = 0,15 \text{ N/m}$  e uma ponta de raio de aproximadamente 20 nm foi utilizada no presente estudo.

Para cada análise/tempo das 3 primeiras etapas, as amostras passaram, primeiramente, por inspeção visual em menor resolução, sendo, posteriormente, geradas entre 5 a 10 imagens topográficas em alta resolução, por MFA, das manchas de sangue e obtidos um número de células variando entre 100-300 para cada tempo e para cada indivíduo. A inspeção visual em menor resolução teve o objetivo de obter imagens de diferentes posições sobre as amostras de sangue. Para análise/tempo da 4ª etapa foram obtidas uma curva de força×distância para cada RBC, sendo avaliadas 25 células/tempo para cada indivíduo, escolhidas aleatoriamente sobre a mancha de sangue.

A formação das imagens obtidas por MFA é baseada em uma representação da topografia da superfície de digitalização *raster* (movimentos em zigue-zague – traço/retraço) do cantiléver (ponteira) sobre a amostra. A constituição da imagem baseia-se no princípio físico quântico de encapsulamento de elétrons entre a ponteira e a amostra, as imagens de MFA são um resultado de uma multiplicidade de forças que interagem entre ponteira e a amostra como, por exemplo, forças de Van der Waals e forças eletrostáticas<sup>[59]</sup>.

Todas as imagens utilizadas foram de traço e descida, com resolução de  $512 \times 512$  linhas (pixels) e com varredura nos eixos x e y de  $100 \mu\text{m}$  e no eixo z de até um

máximo de 7  $\mu\text{m}$ . Sobre cada imagem foram selecionadas entre 10 a 40 hemácias, sendo que o número de células era dependente da concentração do esfregaço. As condições de varredura para obtenção das imagens podem ser observadas no Quadro 2.



**Figura 12:** Microscópio de Força Atômica utilizado no estudo.

**Quadro 2:** Condições para obtenção das imagens no microscópio.

<b>Condições para obtenção das Imagens</b>	
<b>Tamanho:</b>	100 × 100 $\mu\text{m}$
<b>Taxa de Varredura:</b>	1 Hertz
<b>Resolução:</b>	512 × 512 pixels
<b>Modo:</b>	Contato
<b>Ponto de Operação: (Operating point)</b>	3 Volts
<b>Ganho Proporcional: (Proportional Gain)</b>	0
<b>Ganho Integral: (Integral Gain)</b>	300
<b>Escaneamento: (Scanning)</b>	Força Constante
<b>Escâner</b>	x,y = 125 $\mu\text{m}$ ; z = 7 $\mu\text{m}$

Pelas análises das imagens de MFA, sobre cada hemácia, o programa computacional de análise de partículas que acompanha o instrumento permite obter medidas de 29 parâmetros, conforme descrito no manual de instruções da Shimadzu Corporation<sup>[60]</sup>. Entretanto, dentro desses parâmetros adquiridos foram destacados no Quadro 3 apenas aqueles cujas medidas representassem informações quantificáveis para as RBCs.

Esses parâmetros são determinados por meio de processamento e segmentação de imagem a partir das aquisições da ponteira do microscópio sobre cada célula individual. A análise desses parâmetros, ao longo da progressão temporal (T0 até T5), foi a base de comparação utilizada para observar o comportamento tempo-dependente das RBCs presentes nas amostras (manchas de sangue) analisadas nas 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> etapas do estudo.

A última análise experimental realizada, ao longo da progressão temporal (T0 até T5) foi a análise das curvas de força×distância sobre RBCs observadas aleatoriamente nas imagens de MFA obtidas. Essa medida foi utilizada, durante o período temporal, para determinar o comportamento de elasticidade da membrana celular das RBCs analisadas durante a 4<sup>a</sup> etapa. Nessa análise, convencionou-se obter uma curva de força×distância para cada RBC, sempre na região central dessas células examinadas pela ponteira.

Os parâmetros determinados e utilizados podem ser divididos quanto à dimensão em: unidimensionais (1D) – Diâmetro Máximo, Largura Padrão, Raio Médio, Perímetro e Altura (Z); bidimensionais (2D) – Área; tridimensionais (3D) – Volume; Adimensional (AD) – Grau de Circularidade, Rugosidade e parâmetros extraídos das curvas de Força×Distância.

**Quadro 3:** Parâmetros considerados relevantes para o presente estudo

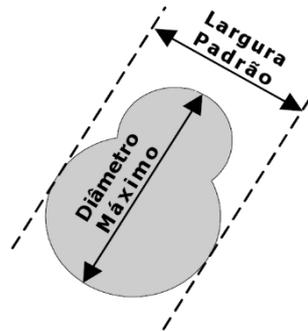
Nº	Parâmetro	Dimensão	Nº	Parâmetro	Dimensão
1	Diâmetro Máximo ( <i>Maximum Diameter</i> )	1D - XY	9	Área (Exclui Concavidade) ( <i>Area - Exclude Hole</i> )	2D - Área
2	Largura Padrão ( <i>Pattern Width</i> )	1D - XY	10	Área (Inclui Concavidade) ( <i>Area - Include Hole</i> )	2D - Área
3	Raio Médio ( <i>Mean Radius</i> )	1D - XY	11	Área de Superfície ( <i>Surface Area</i> )	2D - Área
4	Perímetro ( <i>Perimeter</i> )	1D - XY	12	Volume ( <i>Volume</i> )	3D - Volume
5	C Perímetro ( <i>C Perimeter</i> )	1D - XY	13	Grau de Circularidade ( <i>Circular Degree</i> )	AD - Proporção
6	Z Máximo ( <i>Maximum Z</i> )	1D - Z	14	Rugosidade ( <i>Roughness</i> )	AD - Proporção
7	Z Mínimo ( <i>Minimum Z</i> )	1D - Z	15	Curvas de Força×Distância	AD - Pressão
8	Média em Z ( <i>Average Z</i> )	1D - Z			

### 3.4.1. Parâmetros utilizados para análise no presente estudo

O manual de instruções do software de análises de partículas da Shimadzu Corporation<sup>[60]</sup> descreve cada um dos parâmetros determinados pelas análises no microscópio de força atômica SPM-9600. No presente tópico serão descritos, de forma sucinta, cada um dos parâmetros obtidos pelas medidas sobre as RBCs:

**3.4.1.1. - Diâmetro Máximo (*Maximum Diameter*)** - Obtém a distância máxima entre dois pontos ao longo da extensão de uma célula (Fig. 13);

**3.4.1.2. - Largura Padrão (*Pattern Width*)** - Obtém a distância entre duas linhas retas através de uma célula, essas duas linhas são paralelas à reta imaginária que conecta dois pontos que fazem o Diâmetro Máximo absoluto de uma célula (Fig. 13);



**Figura 13:** Ilustração do Diâmetro Máximo e da Largura Padrão<sup>[60]</sup>

**3.4.1.3. - Raio Médio (*Mean Radius*)** - Obtém a média das distâncias do centro de gravidade da célula, para o seu contorno;

**3.4.1.4. - Perímetro (*Perimeter*)** - Obtém o comprimento do exato contorno da célula (Fig. 14);

**3.4.1.5. - C Perímetro (*C Perimeter*)** - Obtém o perímetro conectando convexidades da célula (Fig. 14);



**Figura 14:** Ilustração do Perímetro e do C Perímetro<sup>[60]</sup>

**3.4.1.6. - Z Máximo (*Maximum Z*)** - Obtém o valor do Z máximo (altura máxima), a partir dos pixels que constituem a imagem da célula analisada;

**3.4.1.7. - Z Mínimo (*Minimum Z*)** - Obtém o valor do Z mínimo (altura mínima), a partir dos pixels que constituem a imagem da célula analisada;

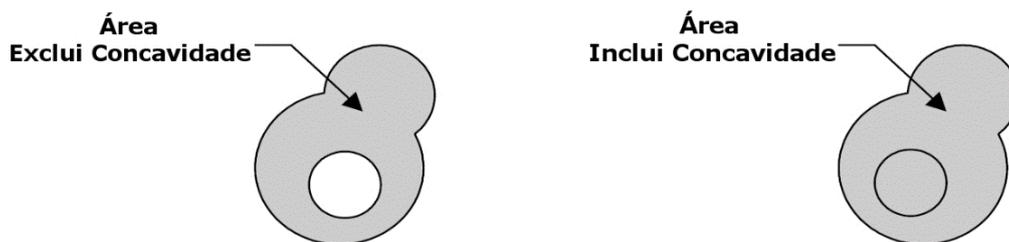
**3.4.1.8. - Média em Z (Average Z)** - Obtém o valor médio dos dados Z (altura média), a partir dos pixels que constituem a imagem da célula analisada;

**3.4.1.9. - Área - Exclui Concavidade - AEC (Area - Exclude Hole)** - Obtém uma área a partir da seguinte equação (Fig. 15):

$$\text{Área Exclui Concavidade} = \text{Área por pixel} \times \text{Número de pixels da célula}$$

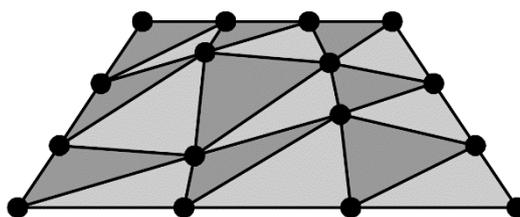
**3.4.1.10. - Área - Inclui Concavidade - AIC (Area - Include Hole)** - Obtém uma área a partir da seguinte equação (Fig. 15):

$$\text{Área Inclui Concavidade} = \text{Área por pixel} \times (\text{Número de pixels da célula} + \text{Número de pixels na concavidade da célula})$$



**Figura 15:** Ilustração da Área – Exclui e Inclui Concavidade<sup>[60]</sup>

**3.4.1.11. - Área de Superfície (Surface Area)** - O cálculo da área de superfície usa grades imaginárias, onde pontos de rede são criados organizando espacialmente valores Z dos pixels individuais que constituem a imagem da célula. Quadrângulos formados com os pontos de rede são divididos em dois para criar triângulos. A soma das áreas desses triângulos é então calculada, fornecendo a Área da Superfície (Fig. 16);



**Figura 16:** Ilustração da Área da Superfície<sup>[60]</sup>

**3.4.1.12. - Volume (*Volume*)** - Obtém o volume a partir da seguinte equação:

$$\text{Volume} = \text{Área - Exclui Concavidade} \times \text{Valor da média em Z (altura)}$$

**3.4.1.13. - Grau de Circularidade (*Circular Degree*)**: É calculado a partir da seguinte equação:

$$\text{Grau de Circularidade} = \frac{\pi (\text{Diâmetro Máximo Absoluto})^2}{4 \text{ Área Exclui Concavidade}}$$

Este valor é 1 quando uma partícula é circular. Quanto maior este valor é comparado com 1, menor será o grau de circularidade;

**3.4.1.14. - Rugosidade (*Roughness*)** - É calculado a partir da seguinte equação:

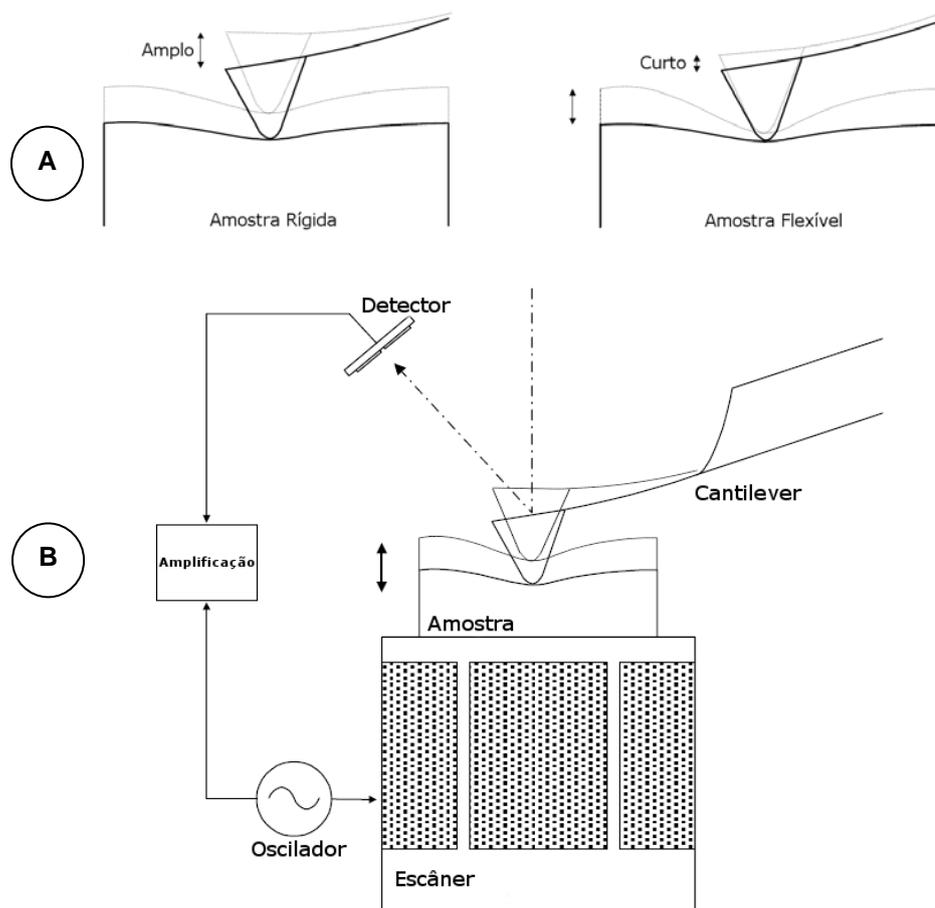
$$\text{Rugosidade} = \frac{1}{4\pi} \frac{(\text{Perímetro})^2}{\text{Área Exclui Concavidade}}$$

Este valor é 1 quando uma partícula é circular. Quanto maior este valor é comparado com 1, maior será a rugosidade.

**3.4.1.15. – Medição de curvas de Força×Distância (Espectroscopia de força) –**

Uma curva de força×distância é calculada pelo registro do valor da força e da deflexão vertical do cantilever (Fig. 17-B). Através dessa análise, o parâmetro utilizado para fins de comparação foi o módulo de Young (*Young's modulus*), medido em Pascal, o qual examina a deformação de uma superfície, quando submetida à uma determinada pressão, sendo que esse módulo calcula a rigidez (elasticidade) de uma amostra. A superfície examinada e medida quanto à elasticidade foi a membrana plasmática da RBC.

Curvas de Força×Distância foram obtidas, nos tempos T0 até T5, em um ponto fixo sobre as células, o qual foi convencionado na porção central das RBCs. Essa convenção foi estabelecida visando padronizar um método geral para obtenção das curvas sobre as células. Essas medidas das curvas Força×Distância contêm informações sobre interações de longo e curto intervalo (Fig. 17-A), representando a base para a estimativa do *Young's modulus* de uma amostra<sup>[25]</sup>.



**Figura 17-A:** Ilustração da forma de obtenção de uma curva de Força×Distância<sup>[61]</sup>. **B:** Ilustração do processo de obtenção de uma curva de Força×Distância, bem como do mecanismo de registro da força e da deflexão vertical do cantilever<sup>[61]</sup>

### 3.5. – Processamento das imagens e obtenção dos dados quantitativos

Todas as imagens adquiridas foram processadas utilizando o software de análise de imagens SPM-9600 *Off-line* da Shimadzu Corporation<sup>[61]</sup>, sempre antes da obtenção

dos dados quantitativos (medidas) das hemácias. O processamento utilizado consistiu em uma correção do plano de imagem, chamado de “*flattening*”, empregando a ferramenta de correção *plane fit (auto)*, dentro da opção *modify* do software. Essa correção foi necessária para retificar possíveis distorções de plano de imagem ocasionadas durante a aquisição de imagem.

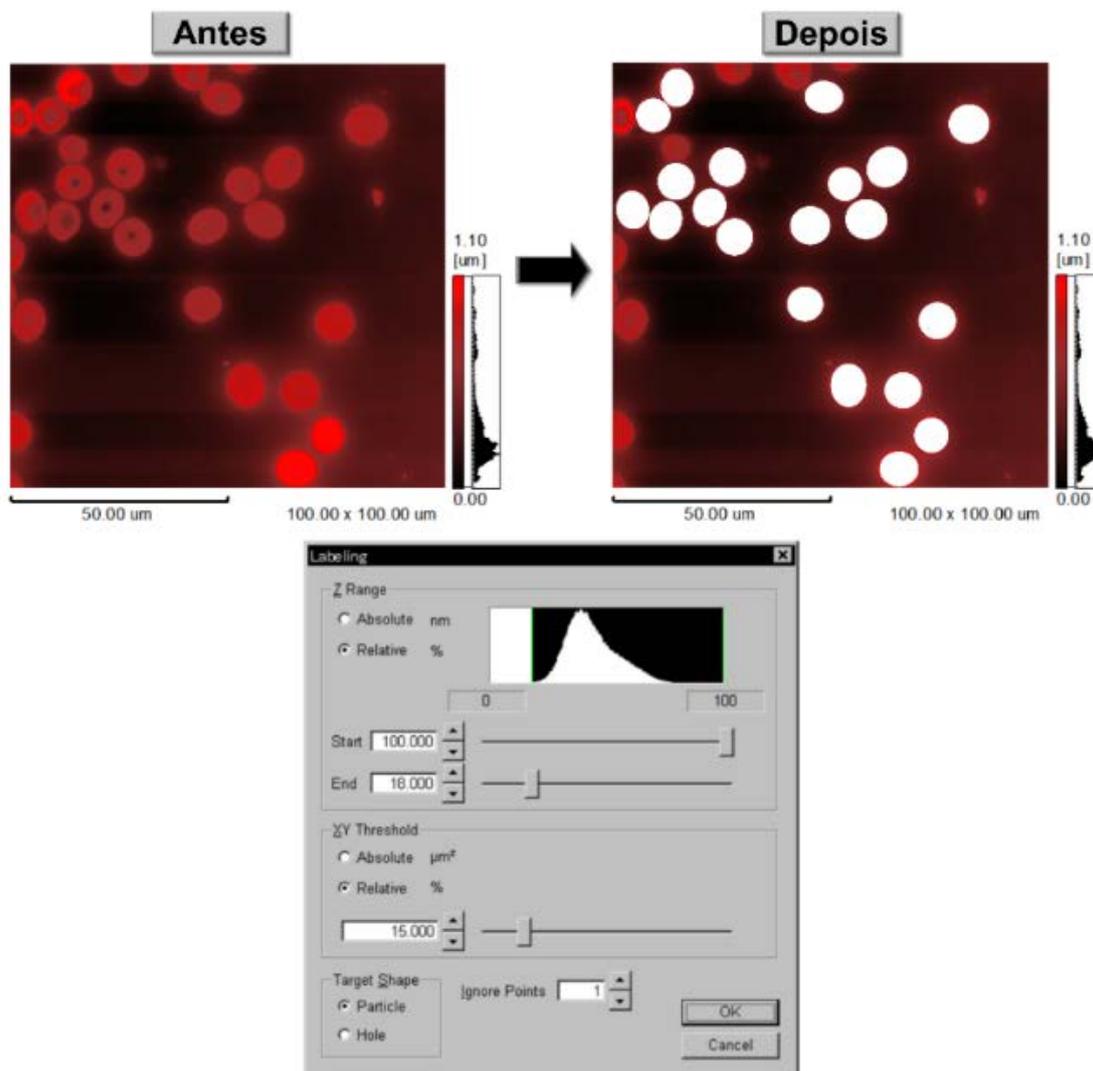
Após correção do plano das imagens, para a determinação das medidas, utilizou-se o software de análise de partículas da Shimadzu Corporation<sup>[61]</sup>, dentro da opção *particle*. Por essa opção, o software de análise seleciona, dentro da imagem captada, as partículas de interesse, por meio da ferramenta *labeling particles*. A segmentação das partículas na imagem é realizada pelo software, utilizando o parâmetro de altura (*Z Range*) e também como uma função do tamanho das partículas (*XY Threshold*). O controle do nivelamento, por meio da modulação das curvas de Gauss do *Z Range* (start/end), e o estabelecimento do tamanho XY das partículas, dentro da caixa de diálogo do *labeling particle* (Fig. 18), permite o exato refinamento da seleção das partículas observadas na imagem. Adicionalmente, foram excluídas manualmente as partículas que eram interceptadas pelas bordas da imagem, assim como as segmentações que visualmente continham mais do que uma única célula. As partículas selecionadas representavam as RBCs presentes nas amostras de manchas de sangue.

Com as células já segmentadas e selecionadas, o software de análise de partículas possibilita calcular e listar as medidas de diversos parâmetros, conforme exemplificado no Quadro 2, disponibilizando essas informações em uma caixa de diálogo chamada lista de partículas (*particle list*), de onde são exportadas para uma planilha do Microsoft Excel<sup>®</sup>.

Já a obtenção de curvas de força×distância foi realizada no modo *On-line* do microscópio, durante a aquisição de imagens no modo contato. Enquanto o microscópio

realiza a leitura da imagem, células podem ser selecionadas e pressionadas pela ponteira do cantilever, gerando a aquisição dessas curvas.

Para análise das curvas obtidas, utilizou-se o software Scanning Probe Image Processor – SPIP™, modelo 5.1.11, da empresa Image Metrology, o qual interpreta e calcula parâmetros como o módulo de Young e a energia dissipada pelo processo.



**Figura 18:** Caixa de diálogo do *labeling particle*, controle do *Z range* e do *XY Threshold*, seleção das células dentro da imagem<sup>[51]</sup>

### 3.6. Análises estatísticas dos dados

#### 3.6.1. Análise estatística descritiva

Após aquisição e processamento das imagens, os resultados qualitativos adquiridos por MFA foram apresentados como imagens topográficas em 2D e 3D (figuras a serem apresentadas em tópico específico) e as informações quantitativas foram determinadas e tabuladas para análises estatísticas (descritivas – médias e desvios padrão da média ou erros padrão da média e de análise de variância). O software estatístico R e os programas Prism<sup>®</sup> 5 (Graphpad, EUA) e OriginPro 8 foram utilizados para a aplicação dos testes estatísticos e para a representação gráfica.

Os dados obtidos com as análises estatísticas dos parâmetros foram apresentados, em estatística descritiva, por meio de representação gráfica, médias  $\pm$  erro padrão (EP) ou média  $\pm$  desvio padrão (DP) e de gráficos *boxplot*, com medidas de 1º e 9º percentil, mediana e o agrupamento dos dados no *box* central, distribuídos em 1º e 3º quartis.

#### 3.6.2. Análise de variância

O teste t pareado Student foi aplicado para verificar a relação entre os gêneros masculino e feminino, e também a opção pela análise conjunta dos dados. Para testar a normalidade, foram utilizados dois testes estatísticos: teste de Kolmogorov-Smirnov - KS e o teste de D'Agostino & Pearson (*omnibus K2*) – D&P, sendo que em seguida foi aplicado o teste one-way ANOVA (análise da variância), caso os dados fossem paramétricos ou parcialmente paramétricos (aproximação gaussiana), ou o teste de Kruskal-Wallis, caso os dados fossem não paramétricos.

Para verificar a correlação entre os parâmetros indicados no Quadro 2, verificando a possibilidade de retirada daqueles com alta correlação ou avaliação

conjunta de algum deles, foram aplicados os testes de Pearson, quando os dados eram paramétricos, ou o teste de Spearman, quando os dados eram não paramétricos.

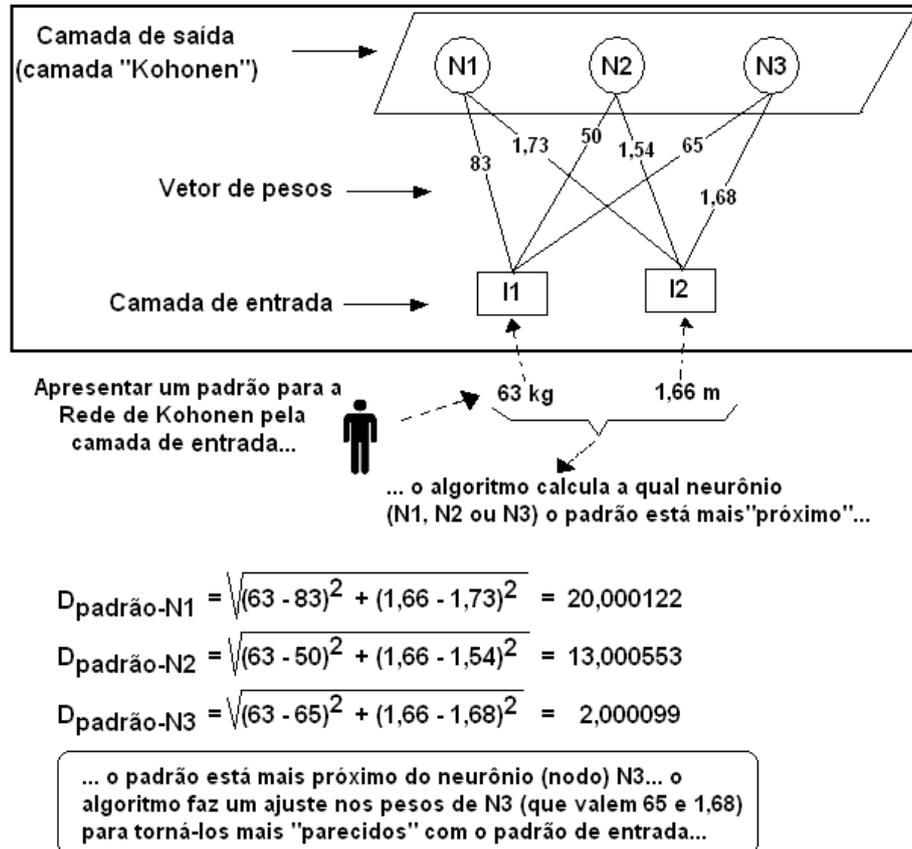
Para múltiplas comparações (pós-teste) entre os dados obtidos nos diferentes tempos (T0 até T5), foi aplicado o teste de múltiplas comparações de Bonferroni, com nível de significância fixado em 5%. Para dados não paramétricos, utilizou-se o pós-teste de múltiplas comparações de Dunn's, com nível de significância fixado em 5%.

### 3.6.3. Mapas auto organizáveis de Kohonen (*Self-Organizing Map* – SOM)

Para a aplicação dos dados obtidos na 1ª Etapa, utilizou-se o software estatístico R na verificação de *clusters*, pelo algoritmo *K-means*, e na produção de um mapa auto organizável de Kohonen (*Self-Organizing Map* – SOM). Os mapas de Kohonen também conhecidos por SOM ou ainda como Redes de Kohonen, são um método computacional muito útil para visualização de megadados (*Big data*)<sup>[62]</sup>. A rede SOM - *self-organizing map* - é o modelo de redes neurais competitivas com maior aplicação na atualidade, e tem apresentado diversas abordagens, incluindo agrupamento e visualização de dados multidimensionais<sup>[63]</sup>.

Na Figura 19 é apresentado um esquema conceitual, bastante simplificado, de uma rede de Kohonen, e a ideia básica do funcionamento para treinamento/“calibração” dessa rede. A rede SOM é estruturada por uma camada de entrada de dados, contendo  $k$  neurônios (nodos), onde cada neurônio de entrada representa uma determinada variável numérica descritora de um padrão. No exemplo da Figura 19,  $k = 2$ , onde os neurônios I1 e I2 representam duas variáveis de classificação: peso e altura de um indivíduo. A camada de saída apresenta três neurônios (N1, N2 e N3), os quais representam, em última instância, os três *clusters* de classificação. O primeiro *cluster*, representado pelo neurônio N1, seria de pessoas com peso e altura de aproximadamente 83 kg e 1,73 m,

pois são estes os valores do vetor de pesos que conectam N1, com os neurônios de entrada I1 e I2. Raciocínio análogo é realizado para os neurônios N2 e N3.



**Figura 19:** Esquema conceitual de um mapa de Kohonen e a ideia básica de treinamento/"calibragem" da estrutura. Fonte: Prof. Dr. Luis A. M. Palhares de Melo, gentilmente cedida para ilustração no estudo.

No exemplo da Figura 19, para a formação da SOM, primeiramente, foi inserida uma massa de dados com informações de peso e altura de um grupo de pessoas, dentro de uma amostra referencial. Então, com a rede já calibrada, são oferecidos os valores de entrada aos neurônios I1 e I2. O neurônio "vencedor" na camada de saída, que irá acomodar o padrão apresentado, será aquele que exibir menor distância euclidiana, em relação aos valores oferecidos na camada de entrada. Para a Figura 19, o padrão apresentado de peso e altura foi de (63; 1,66) e o neurônio N3 é o que apresenta menor distância euclidiana = 2,000099.

A ideia central, para a aplicação da rede SOM nesta pesquisa, é gerar um mapa de Kohonen a partir dos dados obtidos pelas medidas (parâmetros) das RBCs na 1ª Etapa, com a possibilidade de gerar um método de classificação temporal para obtenção do TSD.



#### **4. RESULTADOS**

#### 4.1. Informações sobre o questionário aplicado aos indivíduos

A pesquisa foi conduzida em quatro etapas de análise por meio do padrão temporal das RBCs em manchas de sangue de até oito indivíduos. Na 1ª etapa foram estudados o padrão temporal conjunto dos indivíduos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8, sobre superfície de vidro, mediante condições ambientais não-controladas. Na 2ª etapa foram comparados o padrão temporal dos indivíduos 1 e 2, sobre superfície de vidro, em condições ambientais controladas. Na 3ª etapa comparou-se o padrão temporal do indivíduo 1, quando depositadas em superfície de vidro, metal e cerâmica, mediante condições ambientais não-controladas. Na 4ª etapa foram comparados o padrão temporal dos indivíduos 1 e 6, sobre superfície de vidro, em condições ambientais não-controladas, pela análise das curvas de força×distância.

O Quadro 4 apresenta os dados obtidos pelo questionário QVS-80 (adaptado – Vilela Junior *et al.*, 2007)<sup>[56]</sup>, coletados dos oito indivíduos utilizados nesta pesquisa. A amostra foi composta por 4 indivíduos do gênero masculino e por 4 indivíduos do gênero feminino com idades entre 20 e 40 anos. Conforme declarado pelos sujeitos da pesquisa, 3 indivíduos possuem tipo sanguíneo “A” (positivo), 3 indivíduos possuem tipo sanguíneo “O” (positivo), 1 indivíduo possui tipo sanguíneo “A” (negativo) e 1 indivíduo possui tipo sanguíneo “B” (positivo).

Quanto à presença ou não de doenças previamente diagnosticadas, 75% dos indivíduos declararam não apresentarem doenças como: diabetes, colesterol alto, asma/bronquite/rinite, pressão alta, triglicerídeos altos, alteração da tireoide, câncer, doenças cardíacas/circulatórias, anemias, hematocitose, talassemia e ou gripe. Vinte e cinco por cento declararam apresentar doenças como: asma/bronquite/rinite.

Em relação ao sono, 25% consideram ruim a qualidade do seu sono, enquanto 75% dos indivíduos consideram boa a qualidade do seu sono.

Quanto ao uso de cigarro, 100% dos indivíduos se declaram não fumantes, porém, em relação ao consumo de bebidas alcoólicas, 50% dos indivíduos declararam o consumo de 1 a 4 doses por semana. Os outros 50% declararam não consumirem bebidas alcoólicas.

Em relação à prática regular de exercícios físicos, 50% dos indivíduos declararam que praticam atividades físicas frequentemente. Já os demais 50% declararam que praticam atividade física muito raramente ou que nunca praticam (sedentários).

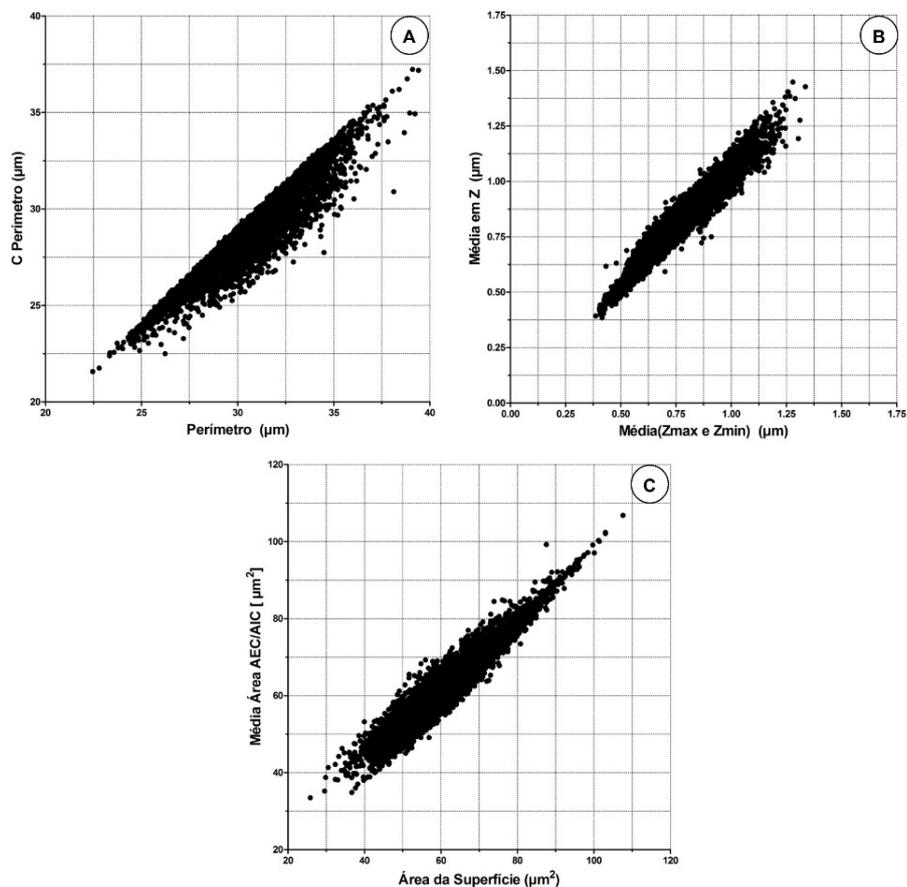
Apesar da escolha aleatória dos indivíduos, a amostra populacional seguiu um padrão homogêneo, conforme observado no Quadro 4.

**Quadro 4:** Dados coletados dos indivíduos doadores, pelo questionário QVS-80 (adaptado – Vilela Junior *et al.*, 2007)<sup>[56]</sup>

Doador	Idade	Gênero	Tipo sanguíneo	Doenças	Doenças Familiares	Qualidade do sono	Cigarro	Bebidas alcoólicas	Exercícios físicos
<b>Indivíduo 1</b>	33	Masculino	A (negativo)	Nenhuma	Alteração da tireoide Colesterol alto Pressão alta Câncer	Boa	Não fumante	Não consome	Frequentemente
<b>Indivíduo 2</b>	29	Feminino	A (positivo)	Asma/Bronquite/Rinite	Diabetes Colesterol alto Asma/Bronquite/Rinite Pressão alta Câncer Cardíacas/circulatórias	Ruim	Não fumante	Não consome	Muito raramente
<b>Indivíduo 3</b>	23	Feminino	B (positivo)	Nenhuma	Diabetes	Boa	Não fumante	1 a 4 doses/semana	Frequentemente
<b>Indivíduo 4</b>	24	Masculino	O (positivo)	Nenhuma	Nenhuma	Ruim	Não fumante	Não consome	Muito raramente
<b>Indivíduo 5</b>	30	Feminino	A (positivo)	Nenhuma	Colesterol alto Pressão alta Cardíacas/circulatórias	Boa	Não fumante	1 a 4 doses/semana	Muito raramente
<b>Indivíduo 6</b>	28	Feminino	O (positivo)	Asma/Bronquite/Rinite	Cardíacas/circulatórias	Boa	Não fumante	1 a 4 doses/semana	Frequentemente
<b>Indivíduo 7</b>	38	Masculino	A (positivo)	Nenhuma	Nenhuma	Boa	Não fumante	Não consome	Não pratica
<b>Indivíduo 8</b>	32	Masculino	O (positivo)	Nenhuma	Cardíacas/circulatórias	Boa	Não fumante	1 a 4 doses/semana	Frequentemente

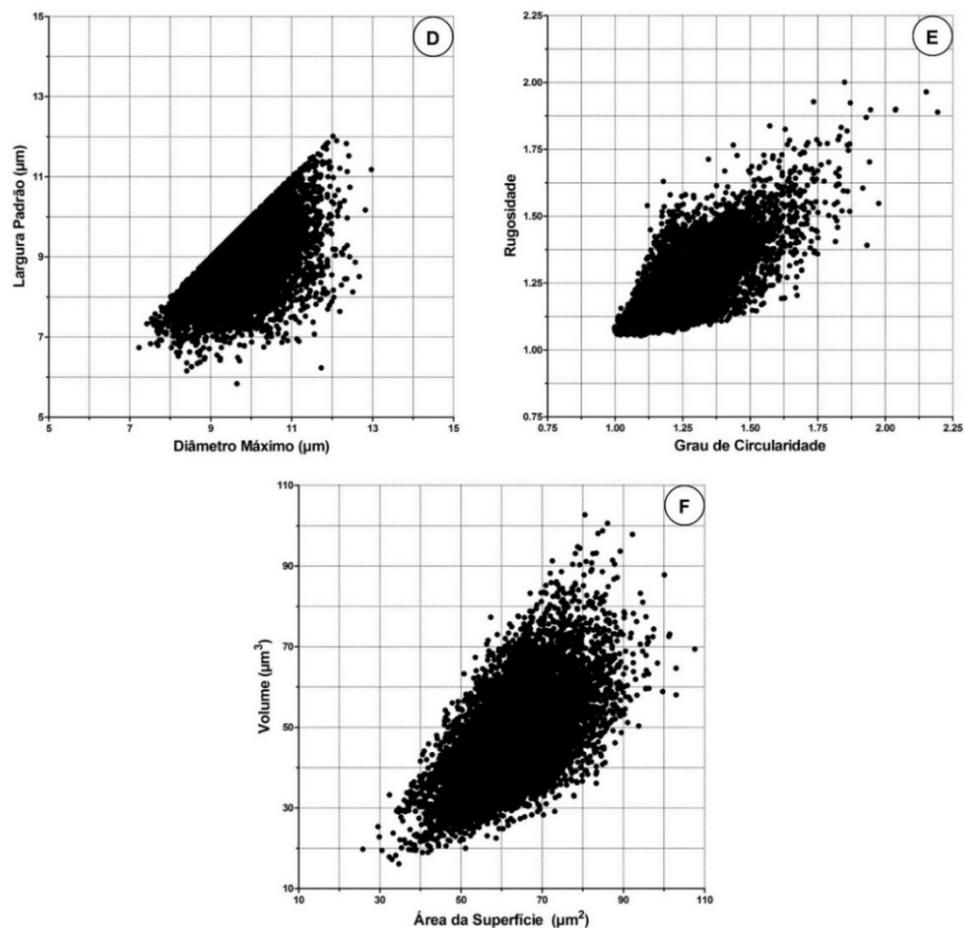
## 4.2. Análise da correlação entre os parâmetros celulares

Após verificação dos resultados obtidos pelos parâmetros das RBCs na 1ª Etapa, observou-se que algumas dessas medidas expressavam informações correlacionadas, ou que a associação matemática conjunta entre dois parâmetros, através da média, por exemplo, resultava em um parâmetro cuja informação também era aplicável à estimativa do TSD. Tal fato foi observado entre a (A) correlação dos parâmetros Perímetro e C Perímetros; (B) a correlação da média (Z máximo e Z mínimo) com o parâmetro média em Z (altura); e (C) a correlação da média da Área - AEC e Área - AIC com o parâmetro Área da Superfície. Essas comparações demonstraram um padrão de correlação estatisticamente significativa, pelo método não paramétrico de Spearman, com coeficientes de correlação  $r$ , respectivamente,  $r_A = 0,9479$ ,  $r_B = 0,9709$ ,  $r_C = 0,9576$ , conforme observado na Figura 20.



**Figura 20:** Em “A” correlação entre Perímetro  $\times$  C Perímetro, em “B” correlação da média (Zmax e Zmin)  $\times$  Média em Z, em “C” correlação da média (Área – AEC/AIC)  $\times$  Área da Superfície.

Outras correlações testadas não demonstraram um padrão estatisticamente significativo, conforme observado na Figura 14, onde os gráficos de correlação do (D) Diâmetro Máximo com a Largura Padrão; correlação da (E) Rugosidade com o Grau de Circularidade; e correlação do (F) Volume com a Área da Superfície, os quais todas apresentam dispersão dos dados alta. As correlações entre esses parâmetros foram avaliadas, também, pelo método não paramétrico de Spearman, exibindo coeficientes de correlação  $r$ , respectivamente,  $r_D = 0,5728$ ,  $r_E = 0,7688$ ,  $r_F = 0,5883$ , conforme observado na Figura 21.



**Figura 21:** Em “D” gráfico de correlação entre Diâmetro Máximo × Largura Padrão, em “E” gráfico de correlação entre Rugosidade × Grau de Circularidade, em “F” gráfico de correlação entre Volume × Área da Superfície.

As análises dos dados das correlações citadas acima foram obtidas pela comparação entre as medidas celulares conjuntas de todos os oito indivíduos em todos os 6 tempos (T0 até T5), obtidos na análise da 1ª Etapa.

Essa comparação possibilitou a alteração de parâmetros com informações similares (correlacionadas), onde a retirada ou a associação matemática em um novo parâmetro não implicaria em prejuízo para as demais análises. Assim, houve a associação entre os parâmetros Diâmetro Máximo (DM) e Largura Padrão (LP), por se tratarem de medidas lineares de uma dimensão (1D), sendo empregada a média entre os dois parâmetros, aqui denominada de Média (DM/LP). Os parâmetros Z máximo (1D), Z mínimo (1D), Área - Exclui Concavidade – AEC (2D), Área - Inclui Concavidade – AIC (2D) e C Perímetro (1D) foram deixados em segundo plano, pois apresentaram correlação estatisticamente significativa, quando comparado à parâmetros similares. Z máximo (1D) e Z mínimo (1D) passaram a ser representados pelo parâmetro Média em Z (1D); as Áreas AEC e AIC (2D) passaram a ser representadas apenas pela Área da Superfície (2D); e por último, C Perímetro passou a ser representado pelo Perímetro (1D).

Os parâmetros listados no Quadro 5 foram, então, utilizados em primeiro plano, durante as análises das etapas empregadas por esta pesquisa.

**Quadro 5:** Parâmetros aplicados para análise do TSD das RBCs

Nº	Parâmetro	Dimensão	Nº	Parâmetro	Dimensão
1	Média (DM/LP)	1D - XY	6	Volume ( <i>Volume</i> )	3D - Volume
2	Raio Médio ( <i>Mean Radius</i> )	1D - XY	7	Grau de Circularidade ( <i>Circular Degree</i> )	AD - Proporção
3	Perímetro ( <i>Perimeter</i> )	1D - XY	8	Rugosidade ( <i>Roughness</i> )	AD - Proporção
4	Média em Z ( <i>Average Z</i> )	1D - Z	9	Curvas de Força×Distância	AD - Pressão
5	Área da Superfície ( <i>Surface Area</i> )	2D - Área			

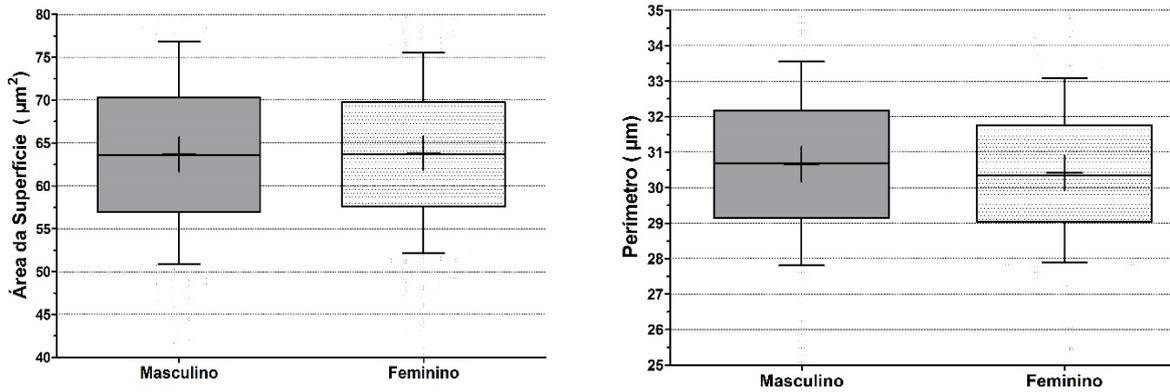
### 4.3. Descrição dos resultados obtidos nas etapas da pesquisa

A análise dos dados quantitativos para a descrição dos resultados foi realizada de forma agrupada, entre os indivíduos, para todas as etapas aqui descritas. A opção pela associação dos dados foi direcionada, principalmente, pela resposta ao objetivo geral, que é analisar o TSD em manchas de sangue, mediante análises de alterações das RBCs, em diferentes intervalos de tempo. A resposta a esse objetivo visa observar tendências temporais em manchas de sangue, não sendo abordadas peculiaridades individuais, ainda que algumas tenham sido detectadas (dados não apresentados neste estudo).

Além da resposta à hipótese principal, após análise dos dados da 1ª Etapa, a comparação entre os gêneros masculino e feminino, quando agregados todos os tempos e todos os indivíduos para cada gênero, demonstrou não haver diferença significativa pelo teste t pareado Student, conforme exemplificado na tabela 2, pela comparação entre o Raio Médio, Perímetro, Área da Superfície e Grau de Circularidade das células, bem como na Figura 22, do gráfico do tipo *boxplot* da Área da Superfície e do Perímetro. Esses dados de pareamento entre as amostras dos gêneros reforçaram o prognóstico de análise agrupada dos dados.

**Tabela 2:** Comparação entre os gêneros masculino e feminino

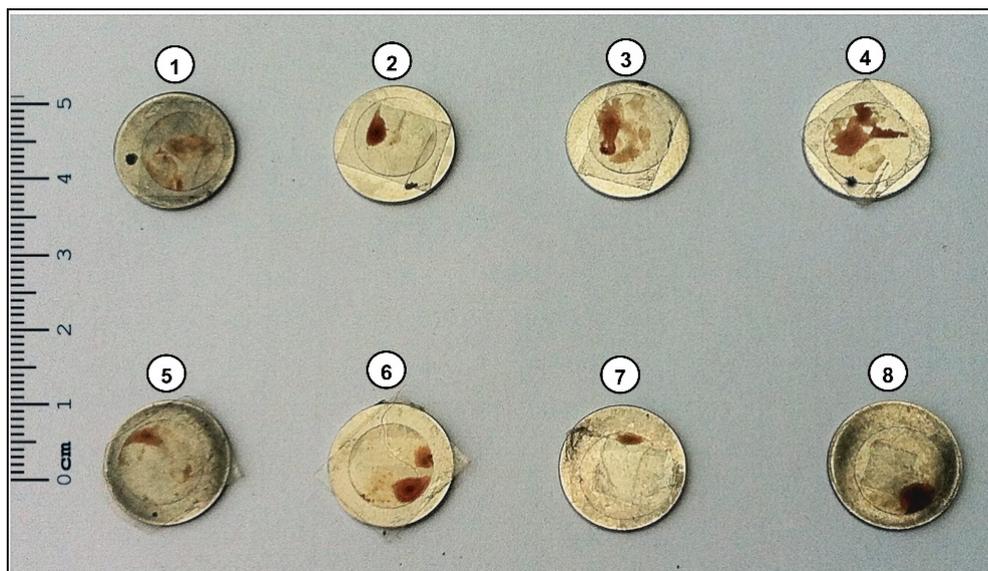
	Masculino			Feminino		
	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão
<b>Raio Médio</b>	4,435	0,3353	0,0047	4,506	0,3386	0,0044
<b>Perímetro</b>	30,66	2,264	0,0321	30,42	2,049	0,0269
<b>Área da Superfície</b>	63,69	10,17	0,1444	63,81	9,201	0,1209
<b>Grau de Circularidade</b>	1,223	0,1354	0,0019	1,237	0,1456	0,0019



**Figura 22:** Gráfico do tipo *boxplot* da Área da Superfície e do Perímetro em comparação realizada entre os gêneros masculino e feminino. Representa a distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média.

#### 4.3.1. - 1ª Etapa

A presente etapa, teve por objetivo observar o TSD de manchas de sangue de diferentes indivíduos doadores (Fig. 23), quando depositadas em suporte de vidro, mediante condições ambientais não-controladas. Dentro dessa perspectiva, seguindo a metodologia estabelecida, foram obtidas amostras de sangue dos oito indivíduos doadores (Quadro 4). As amostras foram analisadas conforme estabelecido na tabela 1, entre os tempos T0 até T5 (28 dias).



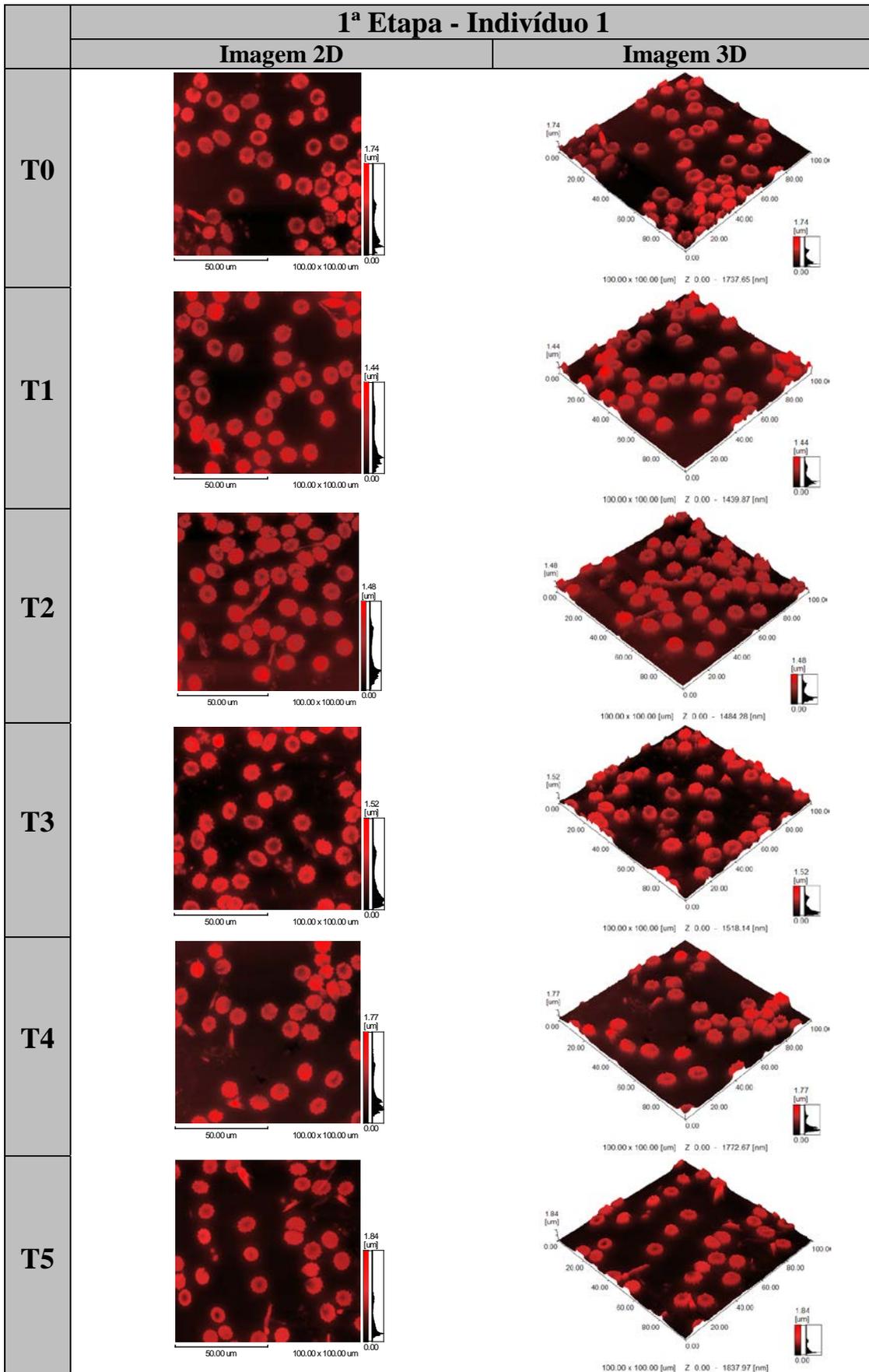
**Figura 23:** Foto das amostras de sangue dos 8 indivíduos em lamínulas de vidro sobre os porta-amostras do microscópio de força atômica.

Pelas análises tabulares, obtidas por meio de MFA, foram avaliados os parâmetros de 1 até 8 – Quadro 5. Devido à quantidade de indivíduos analisados e ao tempo utilizado para obtenção das imagens de MFA, cerca de 9 minutos por imagem ( $512 \times 512$  pixels), as análises de aquisição de imagens foram realizadas com dois indivíduos por ciclo, sendo obtidas cerca de 10 imagens para cada indivíduo e para cada tempo, totalizando aproximadamente 60 imagens de MFA por indivíduo, ao longo dos tempos T0 até T5. A quantidade de células analisadas por indivíduo/tempo pode ser observada na Tabela 3.

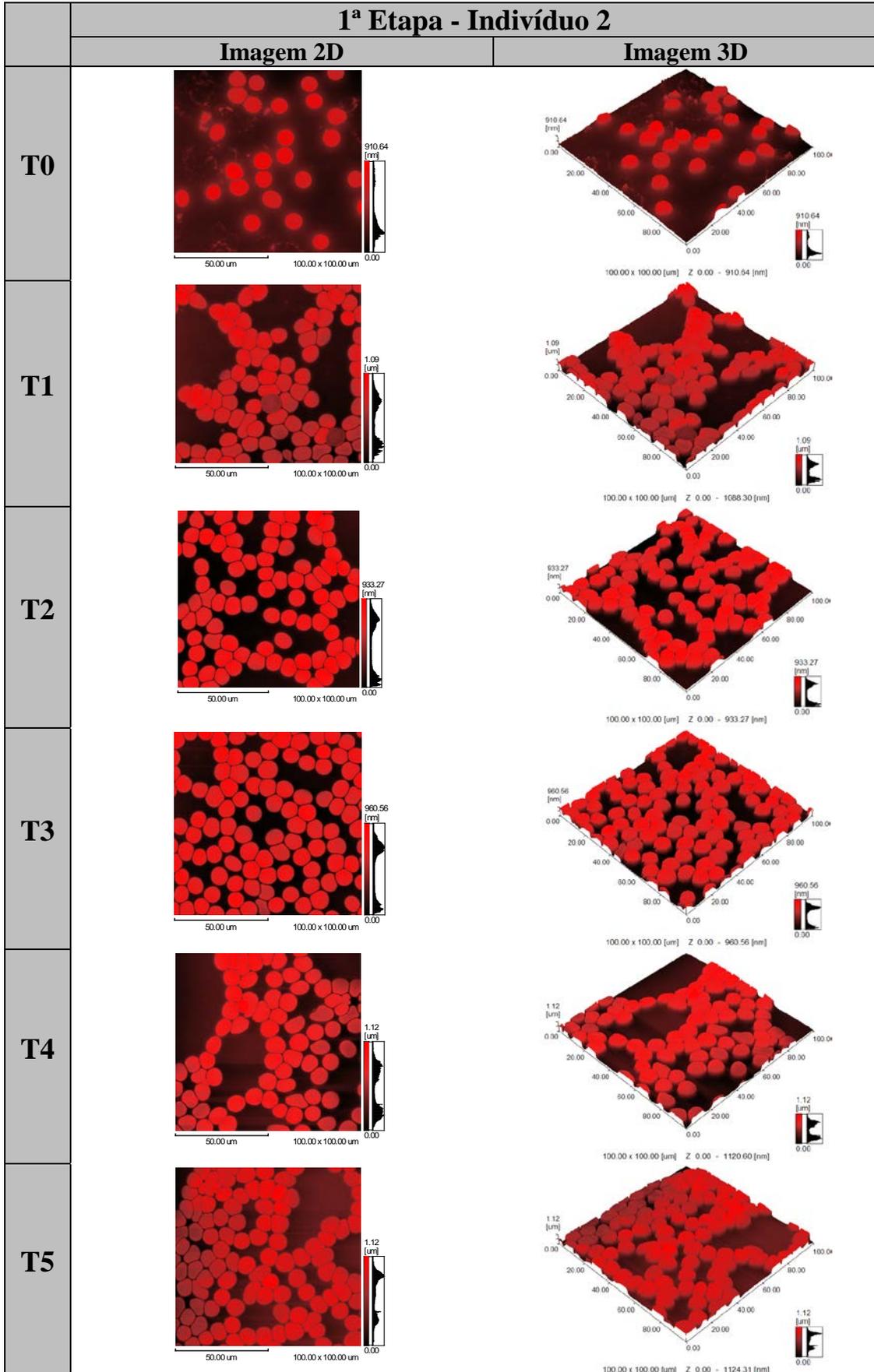
**Tabela 3:** Número de células analisadas por indivíduo e por tempo – 1ª etapa.

	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>Média</b>
<b>Indivíduo 1</b>	197	210	247	204	279	258	232,5
<b>Indivíduo 2</b>	286	356	394	287	310	294	321,2
<b>Indivíduo 3</b>	227	267	177	252	239	188	225,0
<b>Indivíduo 4</b>	192	160	185	238	256	271	217,0
<b>Indivíduo 5</b>	219	194	151	130	158	146	166,3
<b>Indivíduo 6</b>	233	321	175	258	254	272	252,2
<b>Indivíduo 7</b>	220	167	170	202	110	134	167,2
<b>Indivíduo 8</b>	220	250	153	155	242	243	210,5
<b>Total</b>	1794	1925	1652	1726	1848	1806	Total = 10751

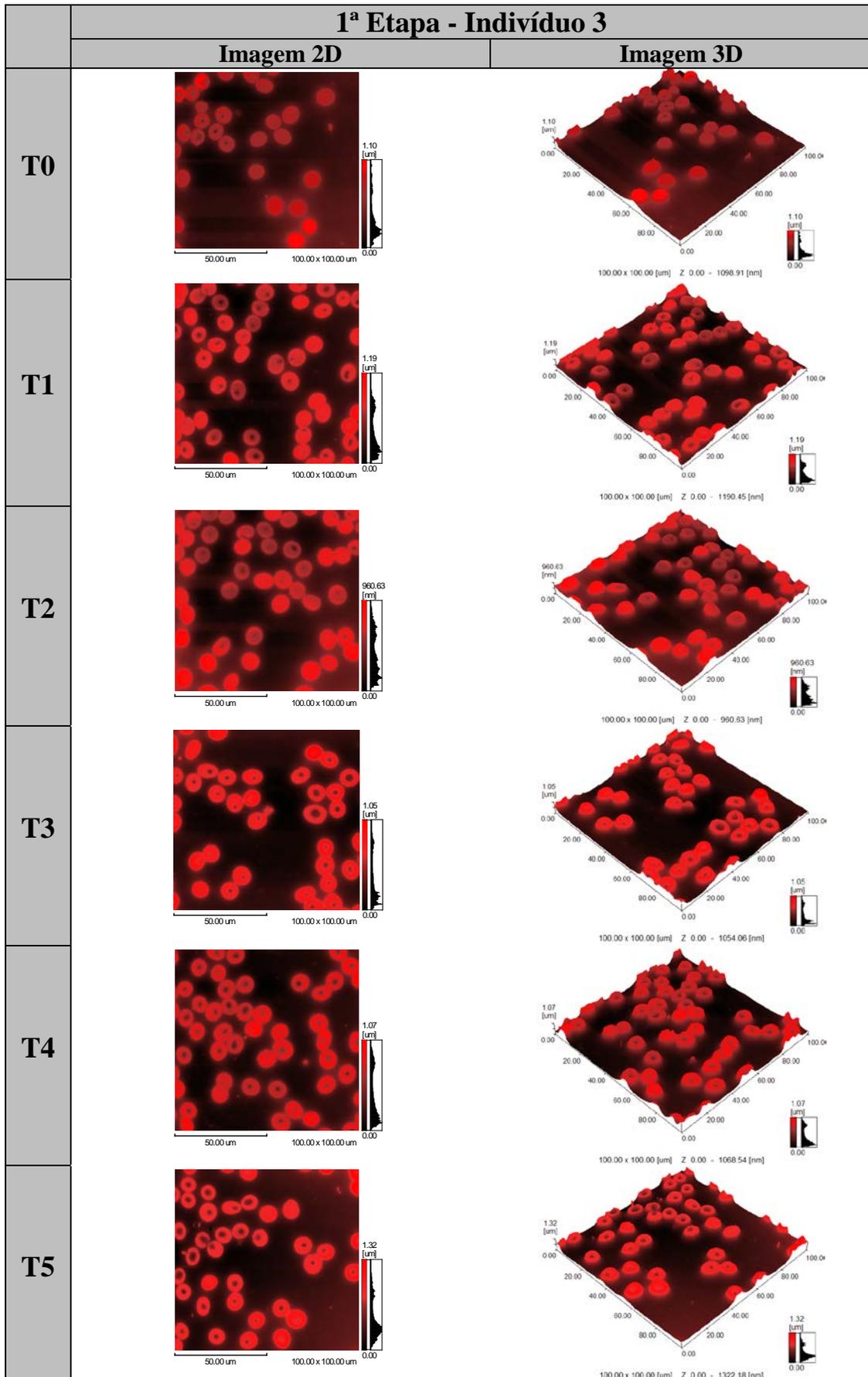
Das cerca de 60 imagens de MFA adquiridas para cada indivíduo foi selecionada uma imagem representativa para cada tempo, e apresentada nos formatos 2D e 3D, conforme ilustradas sequencialmente nas Figuras 24 - 31. Pela simples observação visual dessas imagens, não é possível identificar qualquer tipo de diferença morfológica temporal entre as RBCs, quando se compara as imagens entre os tempos T0 até T5. Existem diferenças na concavidade das RBCs de um mesmo indivíduo, porém, essas alterações não foram relacionadas aos padrões de transformação temporal dessas células.



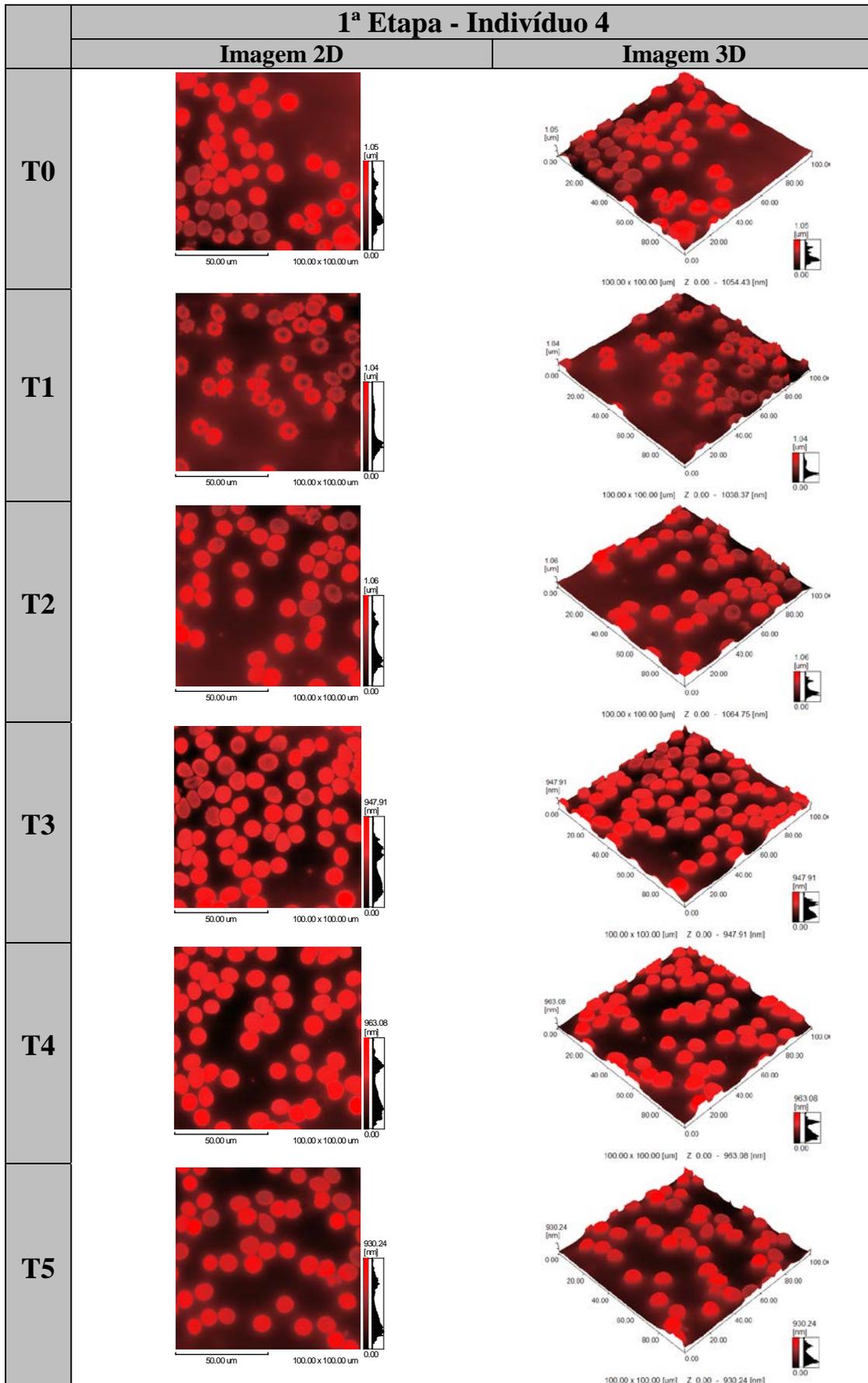
**Figura 24:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 1 em cada um dos tempos T0 até T5.



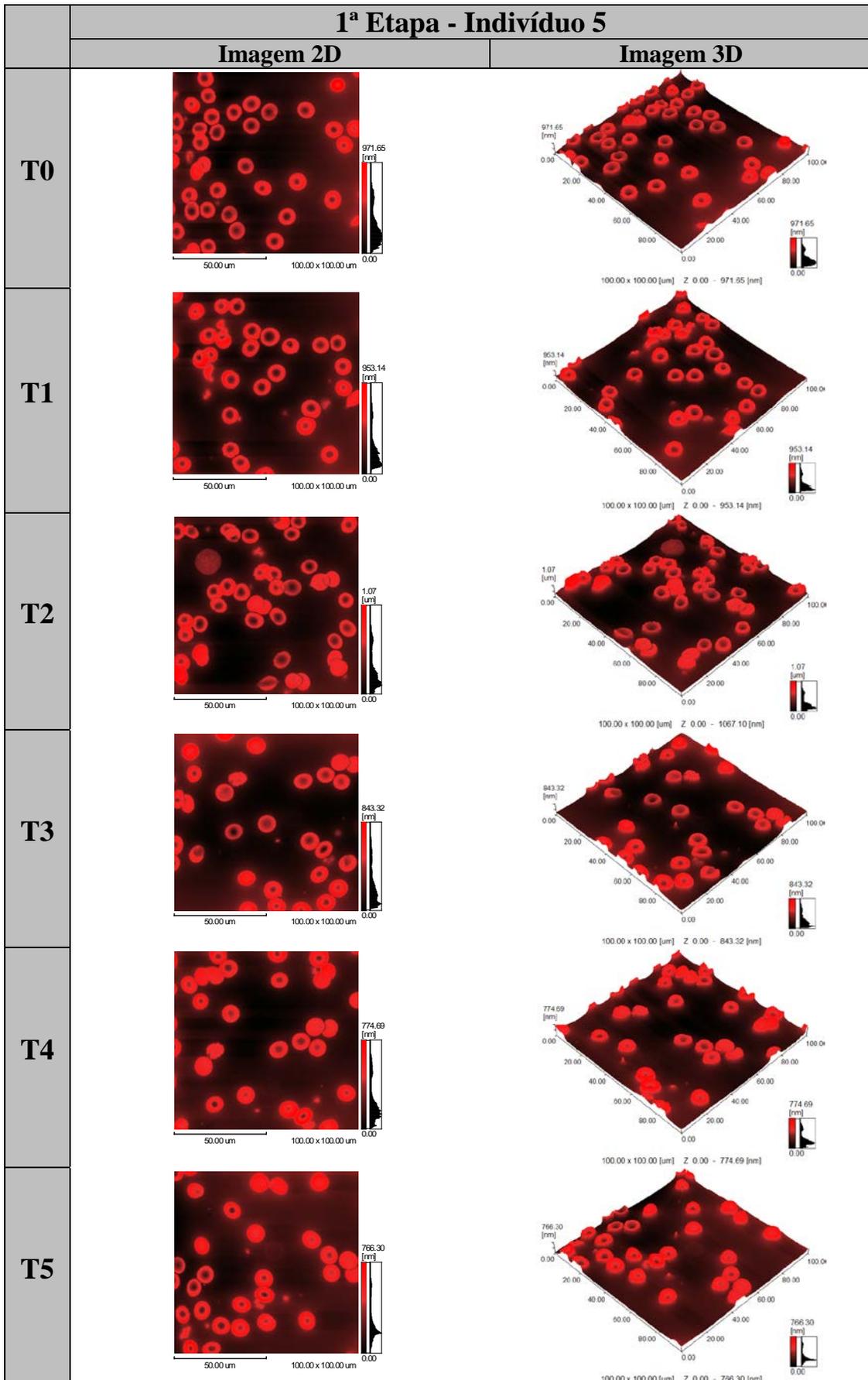
**Figura 25:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 2 em cada um dos tempos T0 até T5.



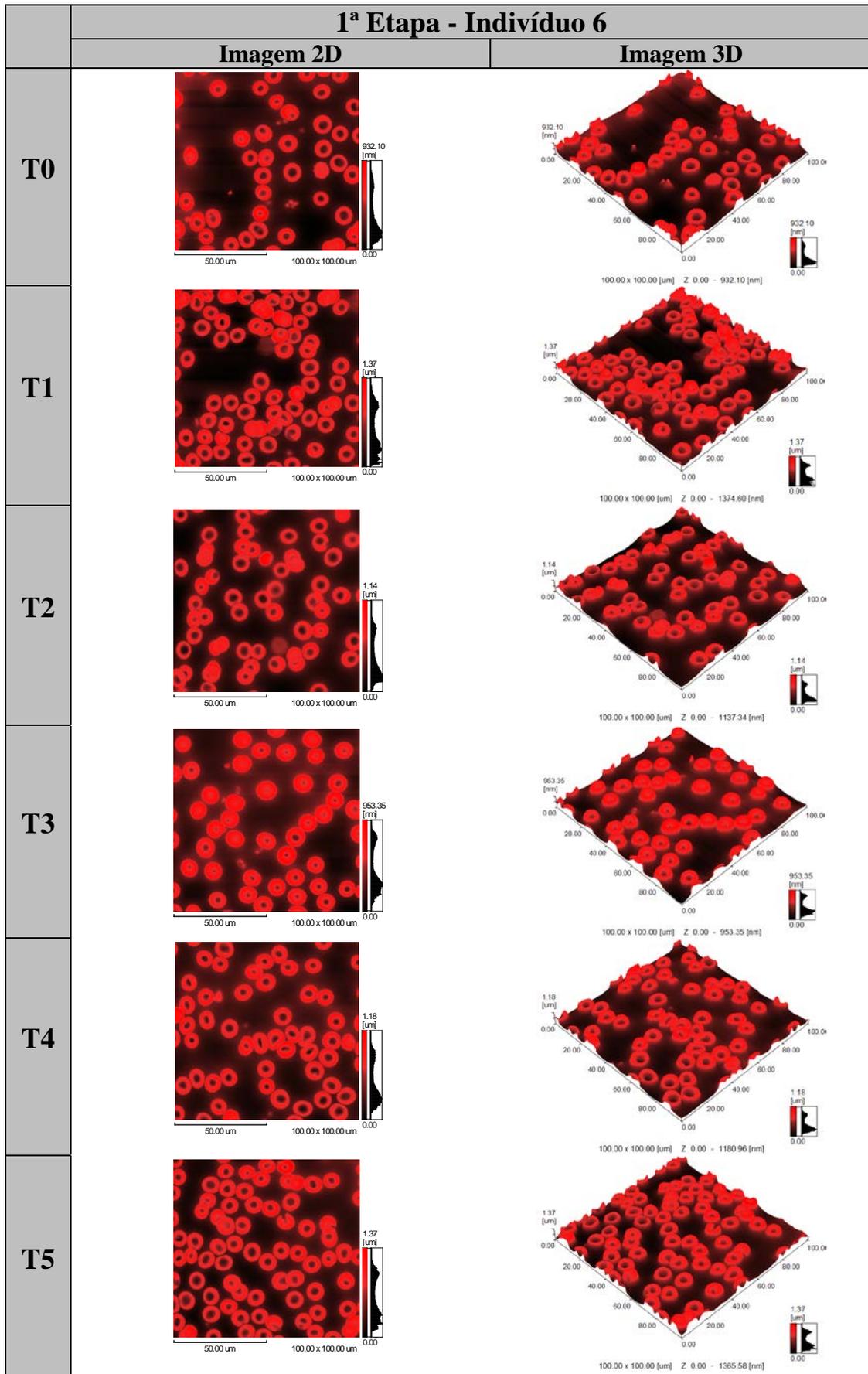
**Figura 26:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 3 em cada um dos tempos T0 até T5.



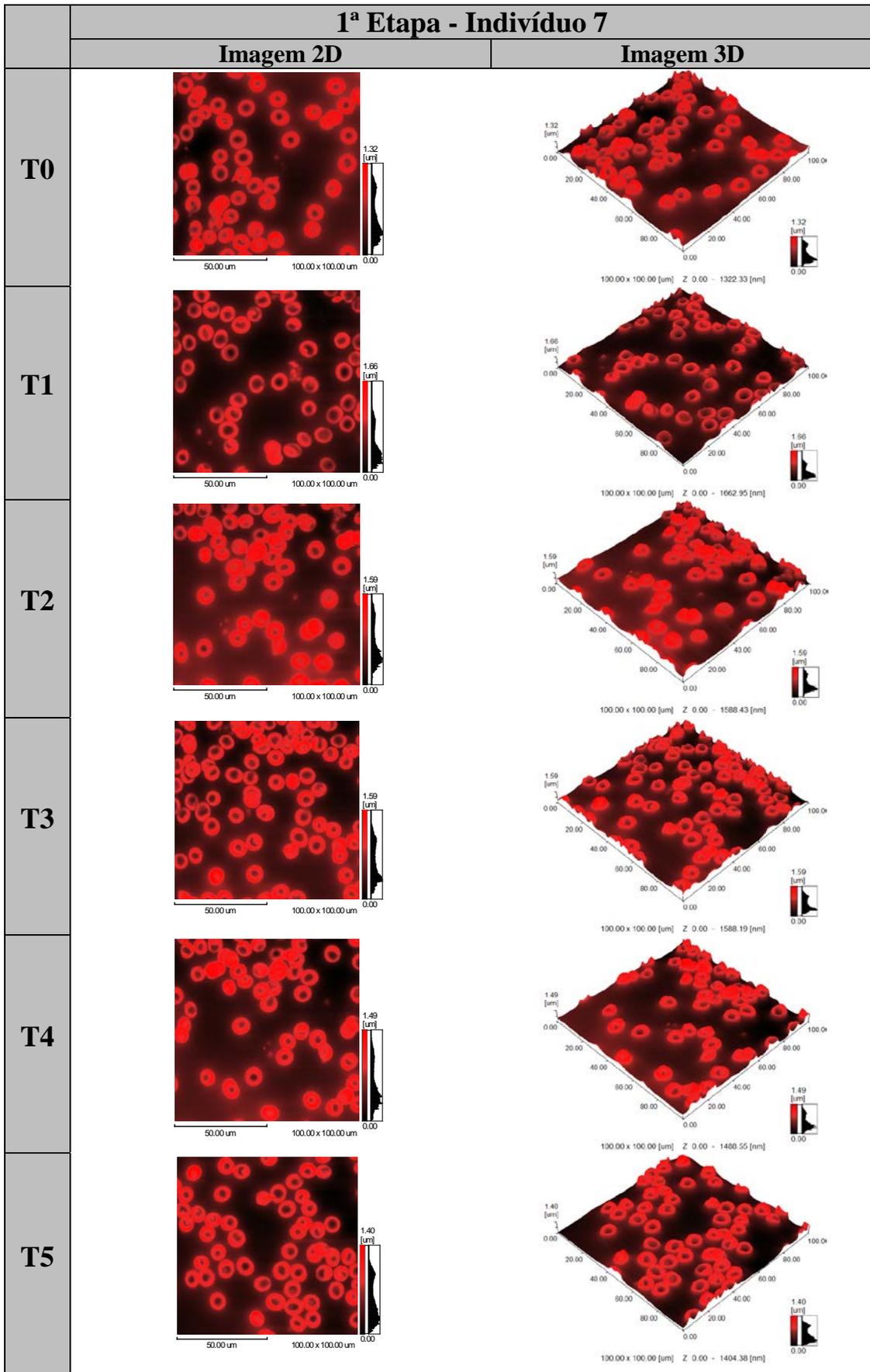
**Figura 27:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 4 em cada um dos tempos T0 até T5.



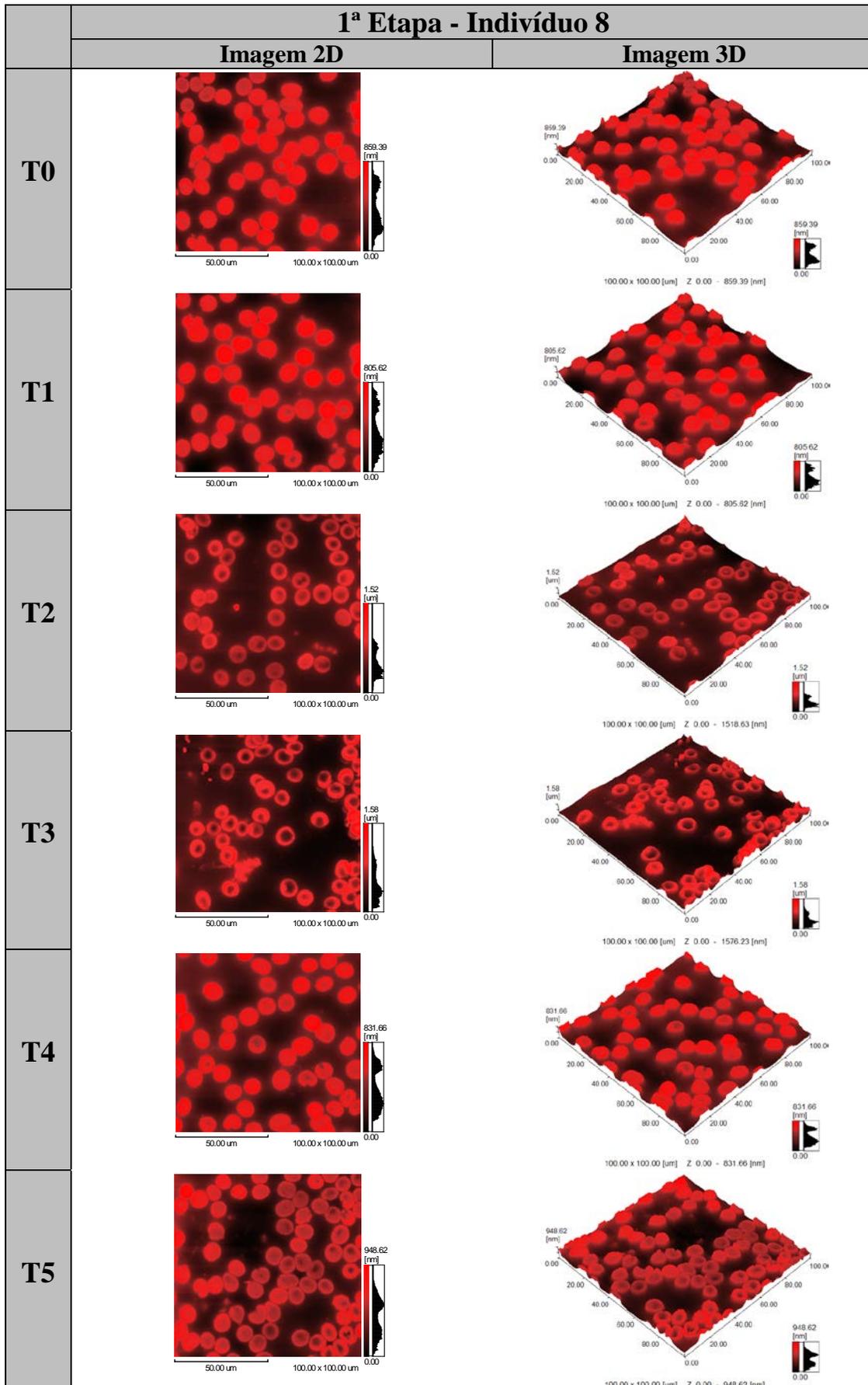
**Figura 28:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 5 em cada um dos tempos T0 até T5



**Figura 29:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 6 em cada um dos tempos T0 até T5



**Figura 30:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 7 em cada um dos tempos T0 até T5



**Figura 31:** Imagens obtidas por MFA em modo contato selecionadas para o indivíduo 8 em cada um dos tempos T0 até T5

Os dados obtidos pelas análises na 1ª etapa foram avaliados de forma agrupada (conjunto dos oito indivíduos) distribuídos nos tempos fixados na tabela 1. Essa análise quantitativa visou demonstrar a possível evolução temporal das características das RBCs e o comportamento temporal conjunto dos dados, conforme observado na tabela 4 e nos gráficos das Figuras 32 - 39.

**Tabela 4:** Parâmetros quantitativos de hemácias analisadas por tempo (8 indivíduos) e Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) dos parâmetros

	T0	T1	T2	T3	T4	T5
<b>Nº de Hemácias</b>	1794	1925	1651	1726	1846	1805
<b>Média (DM/LP) (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	9,177 $\pm 0,682$	9,299 $\pm 0,647$	9,321 $\pm 0,668$	9,385 $\pm 0,656$	9,446 $\pm 0,692$	9,436 $\pm 0,681$
<b>Raio Médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	4,402 $\pm 0,311$	4,451 $\pm 0,302$	4,453 $\pm 0,319$	4,501 $\pm 0,303$	4,518 $\pm 0,326$	4,507 $\pm 0,316$
<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	29,88 $\pm 2,09$	30,36 $\pm 2,11$	30,48 $\pm 2,12$	30,69 $\pm 2,13$	30,96 $\pm 2,13$	30,83 $\pm 2,14$
<b>Média em Z (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	0,7361 $\pm 0,145$	0,7618 $\pm 0,132$	0,7834 $\pm 0,168$	0,7576 $\pm 0,144$	0,7782 $\pm 0,168$	0,7889 $\pm 0,171$
<b>Área da Superfície (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	61,79 $\pm 9,61$	62,10 $\pm 9,38$	63,36 $\pm 9,64$	65,20 $\pm 9,09$	65,19 $\pm 9,67$	64,98 $\pm 9,88$
<b>Volume (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	44,20 $\pm 10,28$	46,10 $\pm 10,24$	48,27 $\pm 12,02$	48,09 $\pm 10,57$	49,14 $\pm 11,62$	49,59 $\pm 11,84$
<b>G. Circularidade</b>	1,220 $\pm 0,137$	1,253 $\pm 0,147$	1,234 $\pm 0,144$	1,207 $\pm 0,127$	1,234 $\pm 0,142$	1,234 $\pm 0,143$
<b>Rugosidade</b>	1,192 $\pm 0,115$	1,226 $\pm 0,132$	1,211 $\pm 0,130$	1,188 $\pm 0,114$	1,215 $\pm 0,128$	1,211 $\pm 0,131$

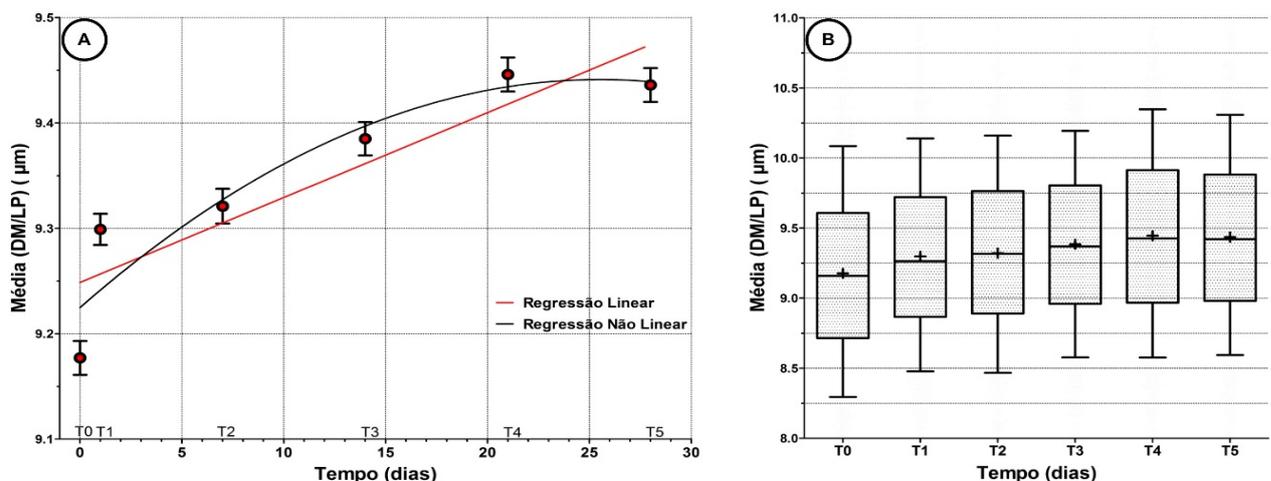
Esses parâmetros foram avaliados pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov - KS e de D'Agostino & Pearson (*omnibus K2*) – D&P, demonstrando a prevalência de dados com distribuição normal (gaussianos), utilizando-se alfa = 0,05, para os seguintes parâmetros: Média DM/LP, Raio Médio, Perímetro e Área da Superfície. Os parâmetros Média em Z (altura), Volume, Grau de Circularidade e Rugosidade permaneceram fora da distribuição normal.

Para os parâmetros que seguiram a distribuição normal, foi utilizado o teste one-way ANOVA, apresentando valor ANOVA  $P < 0,0001$ , para os quatro parâmetros, com diferença

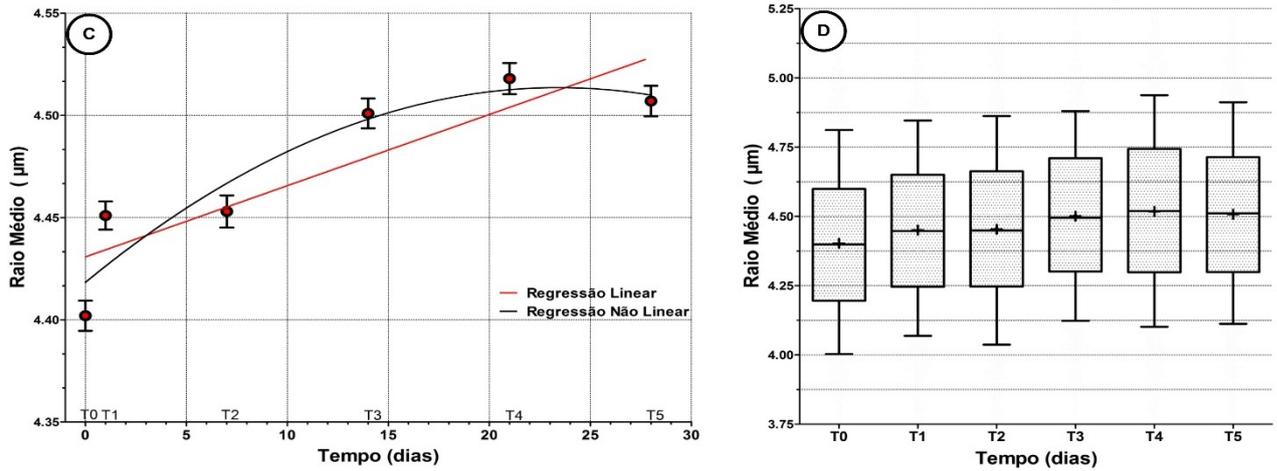
significativa entre os tempos. Em seguida, utilizou-se o pós-teste de Bonferroni para as múltiplas comparações entre o tempo T0 e os demais tempos investigados (T0vsT1, T0vsT2, T0vsT3, T0vsT4, T0vsT5), com nível de significância fixado em 5%.

Os parâmetros Média em Z, Volume, Grau de Circularidade e Rugosidade foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, utilizando-se  $\alpha = 0,05$ , apresentando valor  $P < 0,0001$  para esses quatro parâmetros, oferecendo, também, diferença estatística significativa entre os tempos (quando comparados ao T0). O pós-teste utilizado neste caso foi o Dunn's, com nível de significância fixado em 5%, para as múltiplas comparações entre os tempos investigados.

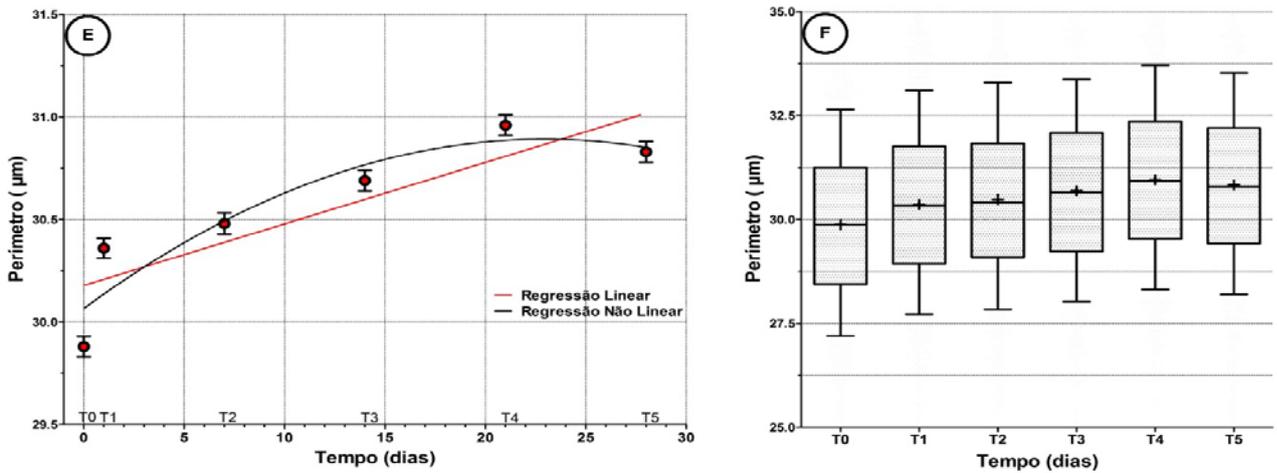
Para as medidas em uma dimensão - 1D (Média DM/LP, Raio Médio, Perímetro e Média em Z), os gráficos de regressão linear mostraram desvio significativo de zero para os três primeiros parâmetros, Figuras 32-A, 33-C, 34-E, com valores P, respectivamente,  $P = 0,0154$ ,  $P = 0,0207$ ,  $P = 0,0253$ . Porém, para o parâmetro Média em Z (Altura), o gráfico de regressão linear (Fig. 35-G) mostrou um desvio não significativo, valor  $P = 0,1185$ , com nível de significância fixado em 5%. As análises temporais dos parâmetros de 1D podem ser observadas, também, nos gráficos tipo *boxplot* Figuras 32-B, 33-D, 34-F e 35-H.



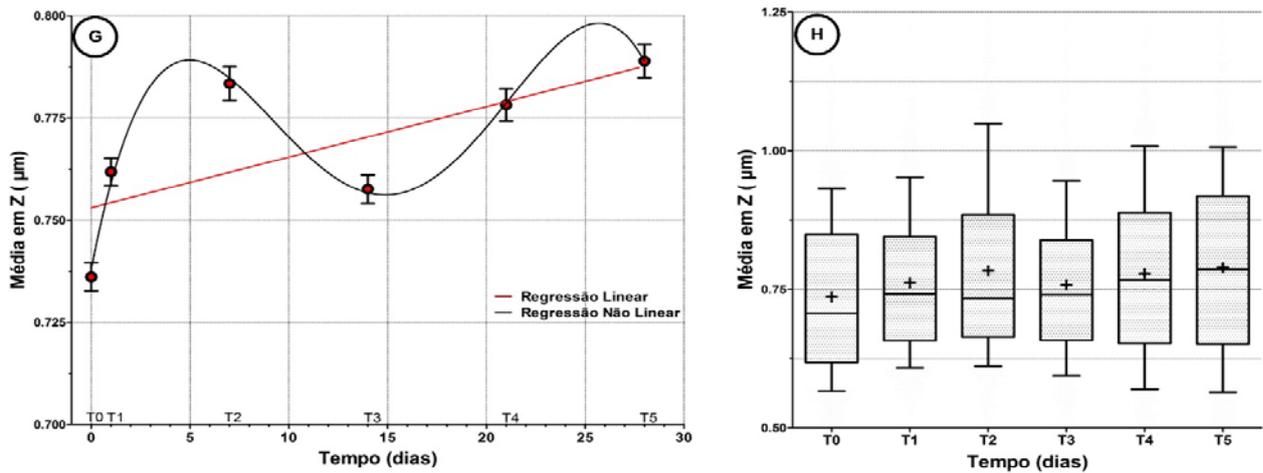
**Figura 32:** Em “A”, Linha vermelha representa gráfico da regressão linear da Média (DM/LP), a qual mostrou desvio significativo de zero ( $P = 0,0154$ ). Linha preta representa gráfico de regressão não linear. Os pontos vermelhos e as barras representam a média e o erro padrão da média. Em “B”, apresenta um gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média.



**Figura 33:** Em “C”, Linha vermelha representa gráfico da regressão linear do Raio Médio, o qual mostrou desvio significativo de zero ( $P = 0,0207$ ). Linha preta representa gráfico de regressão não linear. Os pontos vermelhos e as barras representam a média e o erro padrão da média. Em “D”, apresenta um gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média.

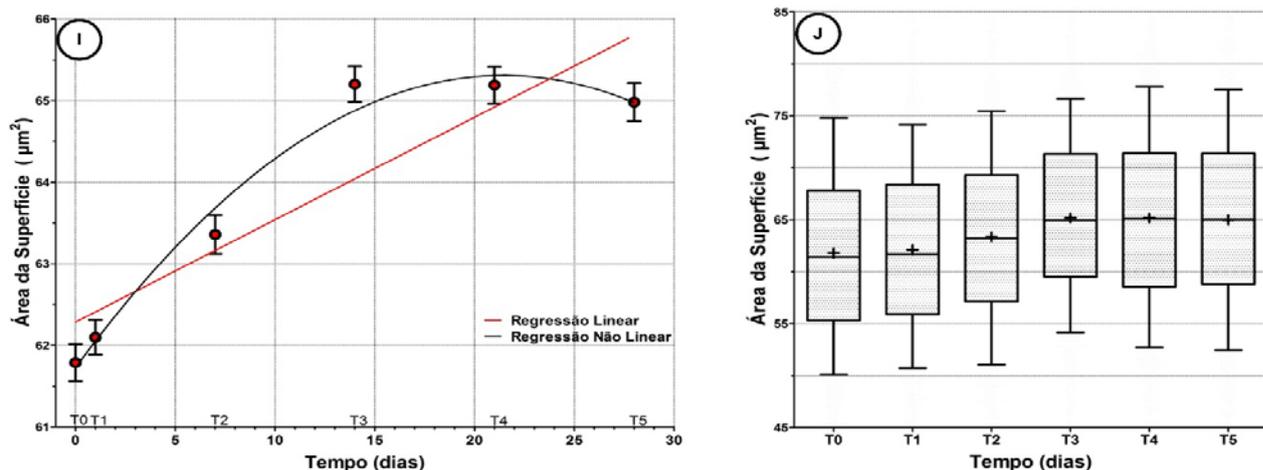


**Figura 34:** Em “E”, Linha vermelha representa gráfico da regressão linear do Perímetro, o qual mostrou desvio significativo de zero ( $P = 0,0253$ ). Linha preta representa gráfico de regressão não linear. Os pontos vermelhos e as barras representam a média e o erro padrão da média. Em “F”, apresenta um gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média.

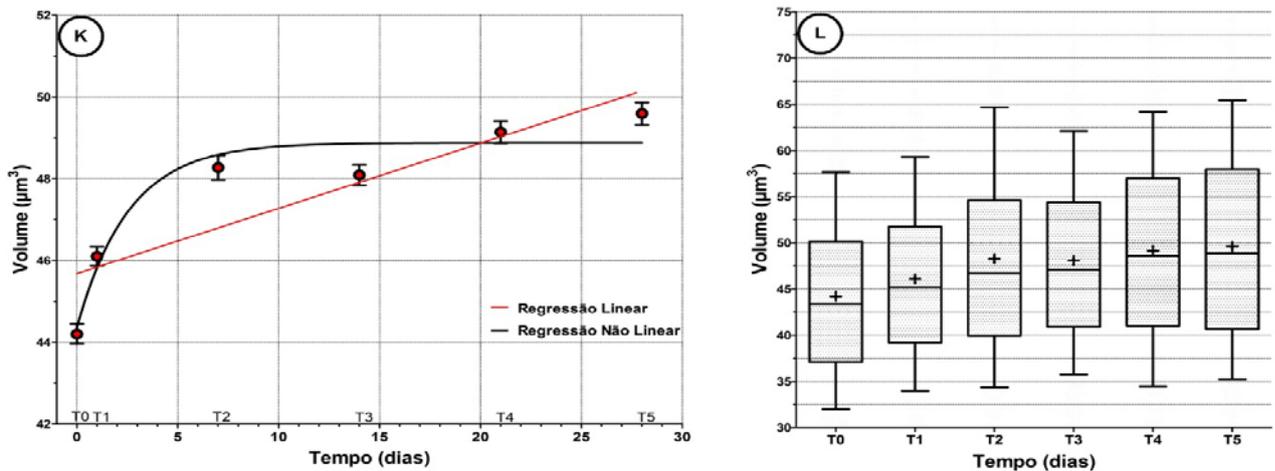


**Figura 35:** Em “G”, Linha vermelha representa regressão linear da Média em Z (altura). Linha preta representa regressão não linear. Os pontos/barras representam a média/erro padrão. Em “H”, gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média.

Para as medidas de duas e três dimensões - 2D e 3D (Área da Superfície e Volume), os gráficos de regressão linear demonstraram desvio significativo de zero para os dois parâmetros, Figuras 36-I e 37-K, com valores P, respectivamente,  $P = 0,0159$ ,  $P = 0,0215$ , com nível de significância fixado em 5%. As análises temporais dos parâmetros de 2D e 3D podem ser observadas, também, nos gráficos tipo *boxplot* Figuras 36-J e 37-L.

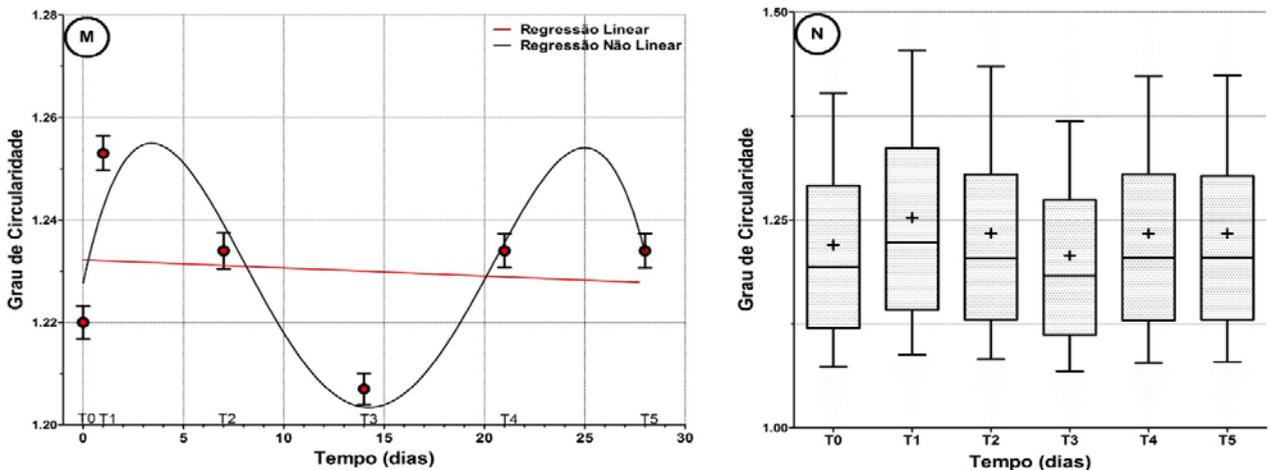


**Figura 36:** Em “I”, Linha vermelha representa regressão linear da Área da Superfície. Linha preta representa regressão não linear. Os pontos/barras representam a média/erro padrão. Em “J”, gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média.

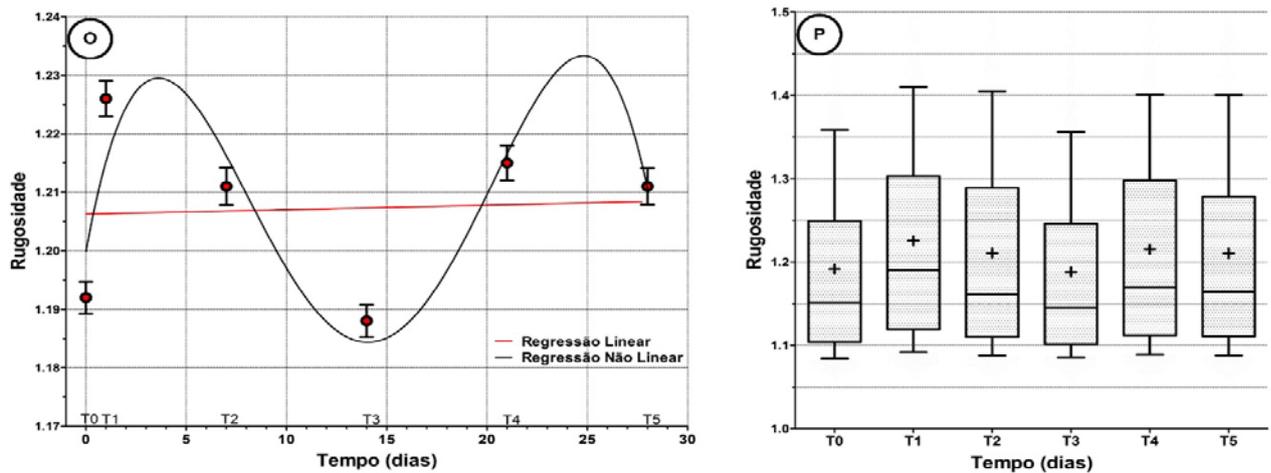


**Figura 37:** Em “K”, Linha vermelha representa regressão linear do Volume. Linha preta representa regressão não linear. Os pontos/barras representam a média/erro padrão da média. Em “L”, gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média.

Para as medidas Adimensionais - AD (Grau de Circularidade e Rugosidade), os gráficos de regressão linear demonstraram desvio não significativo de zero para os dois parâmetros, Figuras 38-M e 39-O, com valores P, respectivamente,  $P = 0,8310$ ,  $P = 0,9092$ , com nível de significância fixado em 5%. As análises temporais dos parâmetros AD podem ser observadas, também, nos gráficos tipo *boxplot* Figuras 38-N e 39-P.



**Figura 38:** Em “M”, Linha vermelha representa regressão linear do G. de Circularidade. Linha preta representa regressão não linear. Os pontos/barras representam a média/erro padrão da média. Em “N”, gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média.



**Figura 39:** Em “O”, Linha vermelha representa regressão linear da Rugosidade. Linha preta representa regressão não linear. Os pontos/barras representam a média/erro padrão da média. Em “P”, gráfico *boxplot* com distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média.

Apesar das análises de regressão linear (valor  $r^2$ ) demonstrarem alta significância para alguns parâmetros aqui analisados, as curvas de regressão não linear apresentaram coeficiente de determinação (valor  $R^2$ ) com porcentagem superior em todos os parâmetros, conforme Tabela 5.

O valor  $r^2$  (coeficiente de determinação) das retas de regressão linear dos parâmetros Média DM/LP, Raio Médio, Perímetro, Área da Superfície e Volume permaneceram acima de 75% (0,75), demonstrando uma regressão linear positiva (aumento médio linear) dessas medidas celulares ao longo dos 28 dias de análise. Já o valor  $R^2$  (coeficiente de determinação) da curva de regressão não linear do Volume demonstrou, além dessa tendência de aumento médio linear, comportamento exponencial nos primeiros 7 dias e platô subsequente até o 28º dia. Na interpretação desse coeficiente, quanto mais próximo de 1 forem os valores  $r^2$  e  $R^2$  da reta/curva, mais homogênea e linear será a distribuição das médias do parâmetro. Assim, o modelo proposto, poderá ser adequado para explicar o fenômeno. Porém, quanto mais próximo de zero, menos linear e mais heterogêneo será esta distribuição. Para os parâmetros Média DM/LP, Raio Médio, Perímetro e Área da Superfície, curvas de função polinomial

quadrática se adequaram melhor aos dados, demonstrando valores  $R^2$  acima de 85%. Para os parâmetros Média em Z, Grau de Circularidade e Rugosidade, curvas de função polinomial de quarta ordem demonstraram valores  $R^2$  acima de 78%, conforme Tabela 5

**Tabela 5:** Dados das retas/curvas de regressão linear e não linear dos parâmetros – 1ª etapa

	<b>Valor <math>r^2</math></b>	<b>%</b>	<b>Valor <math>R^2</math></b>	<b>%</b>
<b>Média DM/LP</b>	0,8041	80,41	0,8837	88,37
<b>Raio Médio</b>	0,7748	77,48	0,8874	88,74
<b>Perímetro</b>	0,7517	75,17	0,8720	87,20
<b>Média em Z</b>	0,4955	49,55	0,9928	99,28
<b>Área da Superfície</b>	0,8013	80,13	0,9815	98,15
<b>Volume</b>	0,7703	77,03	0,9342	93,42
<b>Grau de Circularidade</b>	0,0128	1,28	0,8239	82,39
<b>Rugosidade</b>	0,0037	0,37	0,7878	78,78

As análises de múltiplas comparações de Bonferroni e Dunn's, na avaliação entre os tempos T0 até T5, considerando o tempo T0 como o momento de produção da amostra (analogamente aquele que seria o momento do crime), demonstraram diferença significativa na comparação T0vsT1, T0vsT2, T0vsT3, T0vsT4 e T0vsT5 para os parâmetros Média DM/LP, Raio Médio, Perímetro, Média em Z (altura), Área da Superfície e Volume (Quadro 6). Os resultados desses dois testes apenas confirmam os resultados já observados nas análises gráficas, com a observação de aumento linear médio desses parâmetros celulares, ao longo dos 28 dias de análise, quando em condições ambientais não controladas e deposição em suporte de vidro.

**Quadro 6:** Análise, pelos testes Bonferroni e Dunn's, da diferença estatística significativa entre os tempos.

<b>Há diferença significativa?</b>		<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>
<b>Média DM/LP</b>	<b>T0</b>	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Raio Médio</b>		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Perímetro</b>		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Média em Z</b>		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Área da Superfície</b>		Não	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Volume</b>		Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
<b>Grau de Circularidade</b>		Sim	Não	Não	Sim	Sim
<b>Rugosidade</b>		Sim	Sim	Não	Sim	Sim

#### 4.3.2. - 2ª Etapa

A 2ª etapa teve por objetivo observar o TSD de manchas de sangue de diferentes indivíduos doadores (Fig. 40) quando depositadas em suporte de vidro mediante condições ambientais controladas (temperatura fixa de 25°C e umidade de 80%).

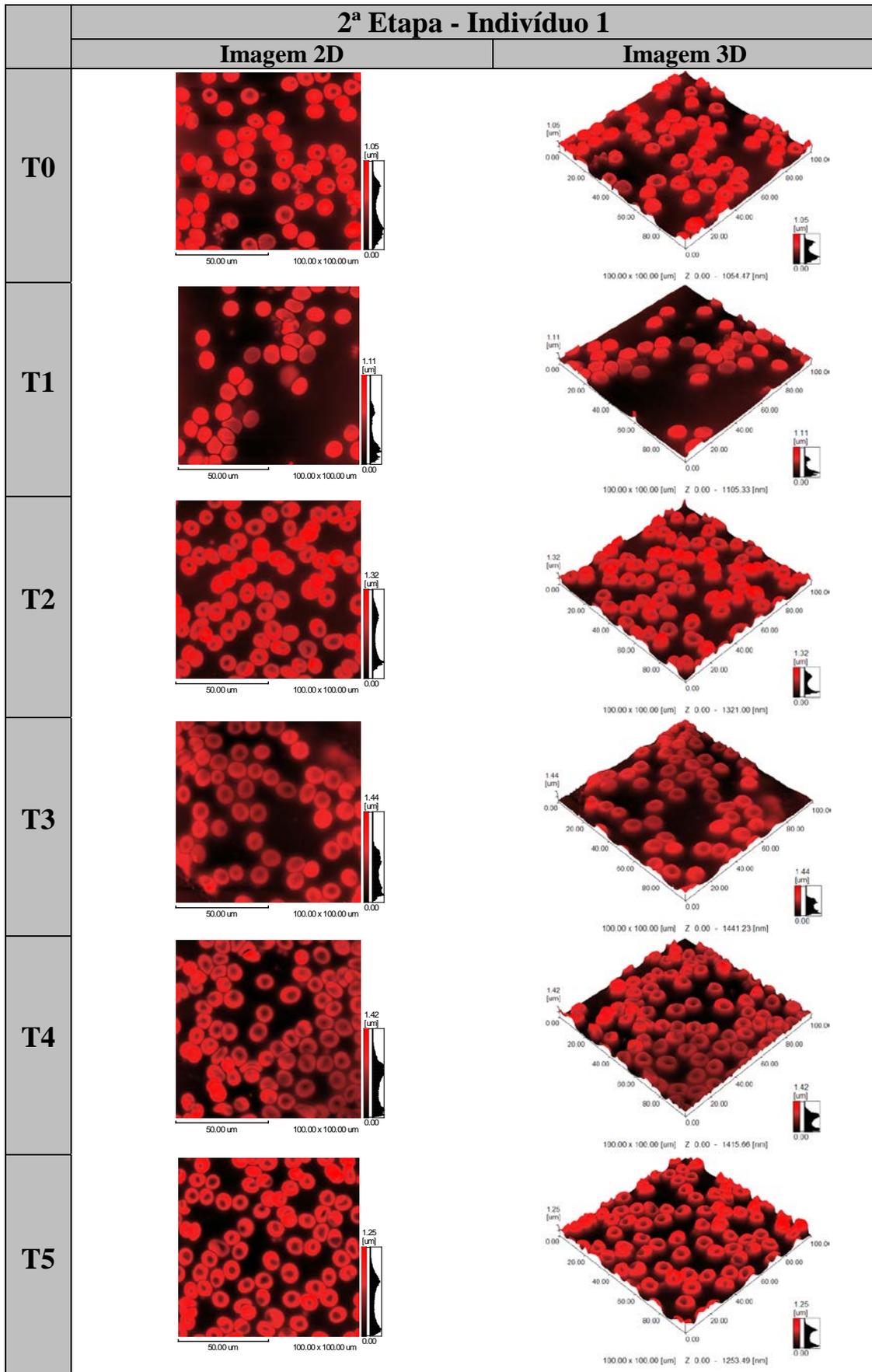
Seguindo a metodologia estabelecida, foram obtidas amostras de sangue de dois indivíduos (Indivíduo 1 e Indivíduo 2 – Quadro 4). As amostras foram analisadas conforme estabelecido na tabela 1, entre os tempos T0 até T5 (28 dias). Pelas análises tabulares, obtidas por meio de MFA, foram avaliados os parâmetros de 1 até 8 – Quadro 5. As amostras permaneceram juntas dentro do mesmo ambiente climático controlado. Os diagnósticos foram realizados dentro do mesmo período com os dois indivíduos, sendo obtidas cinco imagens por tempo para cada um deles, totalizando 30 imagens adquiridas utilizando MFA por indivíduo, ao longo dos tempos T0 até T5. O número de células analisadas por indivíduo/tempo pode ser observado na Tabela 6.

**Tabela 6:** Número de células analisadas por indivíduo e por tempo – 2ª etapa.

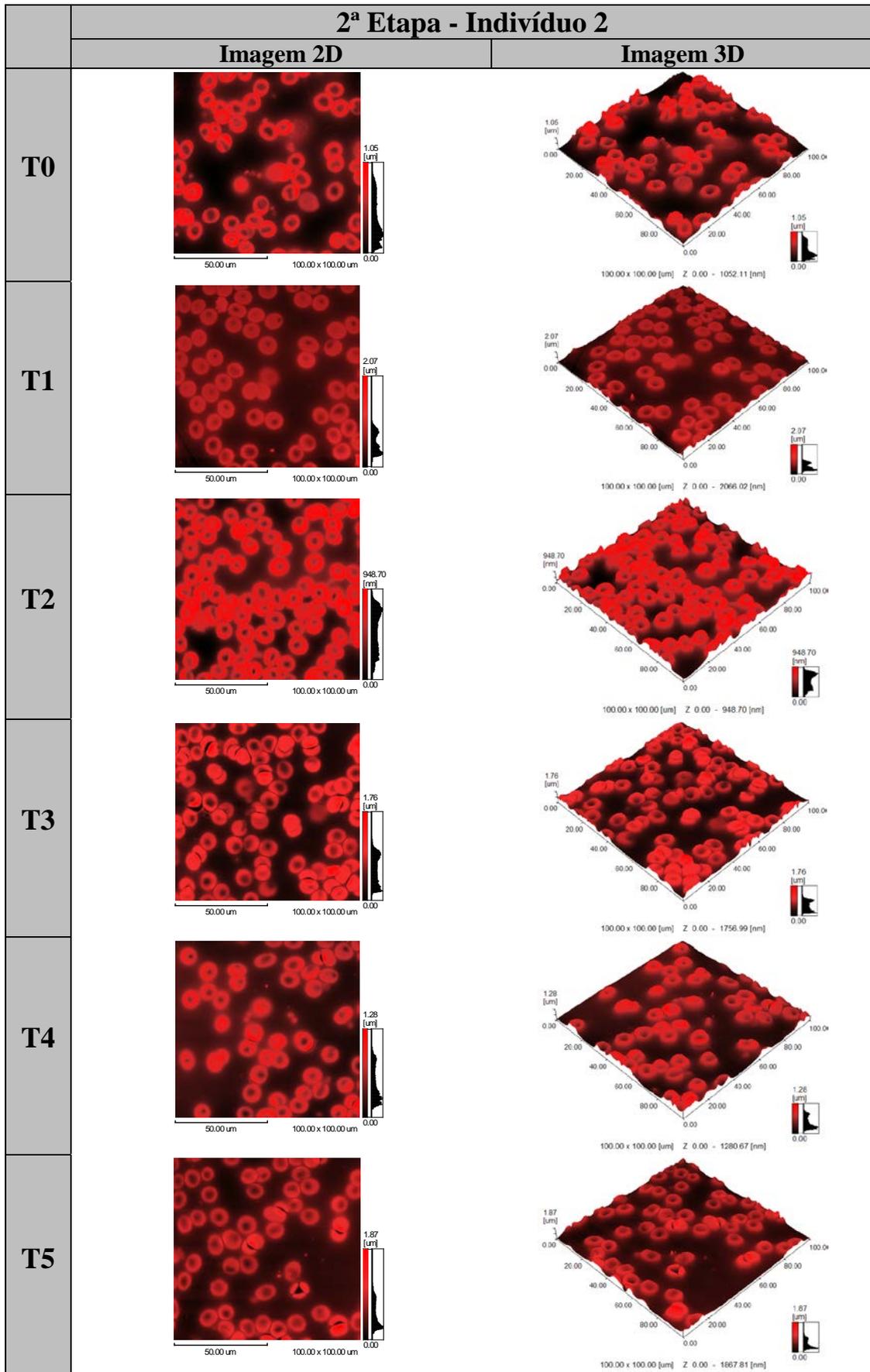
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	Média
<b>Indivíduo 1</b>	152	118	161	119	168	138	142,67
<b>Indivíduo 2</b>	90	124	131	121	127	116	118,17
<b>Total</b>	242	242	292	240	295	254	Total = 1565

**Figura 40:** Foto das amostras de sangue dos 2 indivíduos (1 e 2) depositadas em lamínulas de vidro sobre os porta-amostras do microscópio.

Das 30 imagens de MFA adquiridas para cada indivíduo, na presente etapa, foi selecionada uma imagem para cada tempo, e apresentada nos formatos 2D e 3D, conforme ilustradas nas figuras 41 e 42. Pela simples observação visual dessas imagens, não é possível identificar qualquer tipo de diferença morfológica temporal entre as RBCs, quando se compara as imagens entre os tempos T0 até T5. Existem diferenças na concavidade das RBCs de um mesmo indivíduo, porém, essas alterações não foram relacionadas aos padrões de transformação temporal dessas células. Também não foram identificadas alterações morfológicas tempo-dependentes na comparação visual entre as imagens da condição controlada, com a condição não controlada.



**Figura 41:** Imagens selecionadas para o indivíduo 1 em cada um dos tempos T0 até T5



**Figura 42:** Imagens selecionadas para o indivíduo 2 em cada um dos tempos T0 até T5

Os dados obtidos pelas análises na 2ª etapa do presente estudo foram avaliados conforme 1ª etapa, de forma agrupada (conjunto dos dois indivíduos) distribuídos nos tempos fixados na tabela 1. Essa análise quantitativa visa demonstrar a evolução temporal das características das hemácias e o comportamento temporal conjunto dos dados, conforme observado na Tabela 7. Os resultados adquiridos com os dois indivíduos na presente etapa (condição ambiental controlada), foram confrontados com os resultados obtidos, para os mesmos dois indivíduos (1 e 2), na 1ª etapa (condição ambiental não controlada), sendo plotados gráficos de média  $\pm$  erro padrão, Figuras 43-50.

**Tabela 7:** Hemácias analisadas por tempo (2 indivíduos) e Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) dos parâmetros

	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>
<b>Nº de Hemácias</b>	242	242	292	240	295	254
<b>Média (DM/LP) (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	9,340 $\pm 0,6920$	9,360 $\pm 0,7118$	9,288 $\pm 0,6768$	9,650 $\pm 0,6474$	9,692 $\pm 0,6634$	9,533 $\pm 0,7140$
<b>Raio Médio (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	4,466 $\pm 0,2856$	4,482 $\pm 0,3067$	4,437 $\pm 0,3164$	4,593 $\pm 0,2806$	4,621 $\pm 0,3004$	4,557 $\pm 0,3028$
<b>Perímetro (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	30,46 $\pm 2,103$	30,39 $\pm 2,204$	30,05 $\pm 2,087$	31,34 $\pm 2,096$	31,47 $\pm 2,059$	30,96 $\pm 2,125$
<b>Média em Z (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	0,7180 $\pm 0,0885$	0,7955 $\pm 0,1492$	0,7726 $\pm 0,0540$	0,7416 $\pm 0,1082$	0,7938 $\pm 0,0919$	0,8134 $\pm 0,1142$
<b>Área da Superfície (<math>\mu\text{m}^2</math>)</b>	61,74 $\pm 9,701$	63,84 $\pm 10,42$	57,72 $\pm 9,251$	64,88 $\pm 9,903$	64,80 $\pm 9,437$	62,64 $\pm 9,695$
<b>Volume (<math>\mu\text{m}^3</math>)</b>	43,28 $\pm 8,773$	49,22 $\pm 10,06$	46,88 $\pm 9,608$	47,39 $\pm 8,802$	50,64 $\pm 9,336$	49,97 $\pm 10,25$
<b>G. Circularidade</b>	1,295 $\pm 0,1908$	1,246 $\pm 0,1675$	1,353 $\pm 0,1924$	1,284 $\pm 0,1709$	1,307 $\pm 0,1527$	1,318 $\pm 0,1692$
<b>Rugosidade</b>	1,244 $\pm 0,1452$	1,191 $\pm 0,1289$	1,286 $\pm 0,1633$	1,234 $\pm 0,1364$	1,248 $\pm 0,1188$	1,258 $\pm 0,1395$

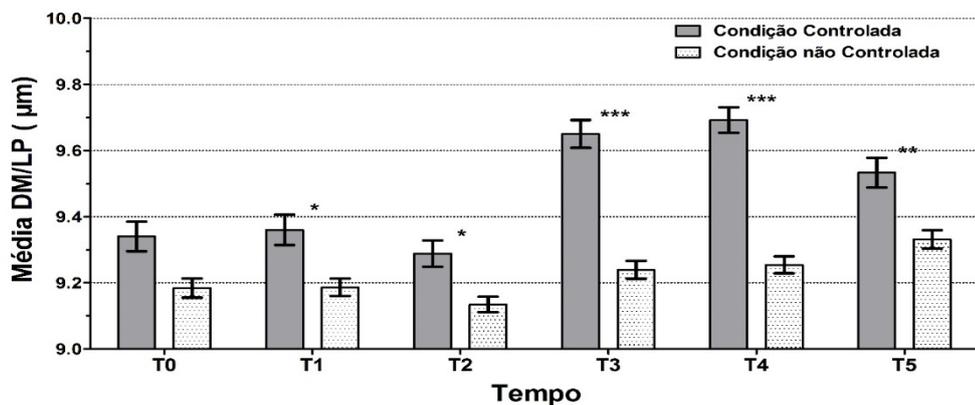
Os parâmetros da presente etapa foram avaliados pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov - KS e de D'Agostino & Pearson (*omnibus K2*) – D&P, com distribuição normal (gaussiana), utilizando-se alfa = 0,05, para as seguintes variáveis: Média DM/LP, Raio Médio, Perímetro, Área da Superfície e Volume. Os parâmetros Média em Z (altura), Grau de Circularidade e Rugosidade permaneceram fora da distribuição normal.

Aqueles que seguiram a distribuição normal foram avaliados pelo teste one-way ANOVA apresentando valor ANOVA  $P < 0,0001$ , para os cinco parâmetros avaliados. Em

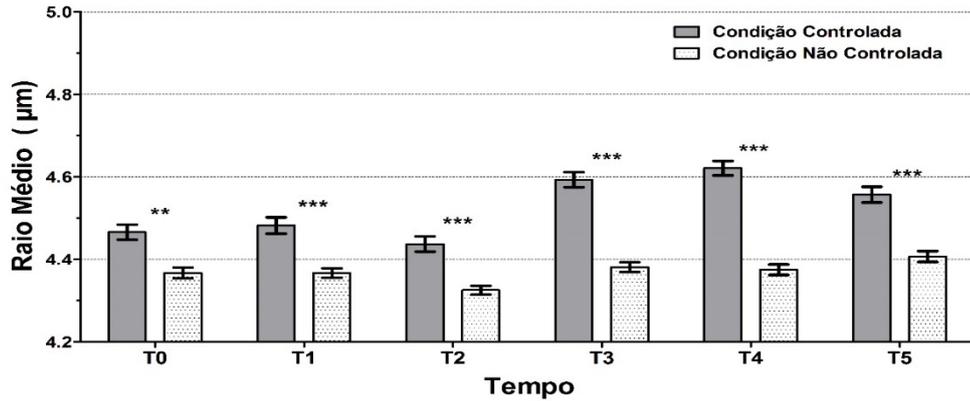
seguida, utilizou-se o pós-teste de Bonferroni para as múltiplas comparações entre os tempos investigados na 1ª Etapa - Condição não Controlada com aqueles investigados na 2ª Etapa – Condição Controlada (T0vsT0, T1vsT1, T2vsT2, T3vsT3, T4vsT4, T5vsT5), com nível de significância fixado em 5%.

Os parâmetros Média em Z (altura), Grau de Circularidade e Rugosidade foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, apresentando valor  $P < 0,0001$  para as três variáveis. O pós-teste utilizado neste caso foi o Dunn's, com nível de significância fixado em 5%, para as múltiplas comparações entre os tempos das duas etapas.

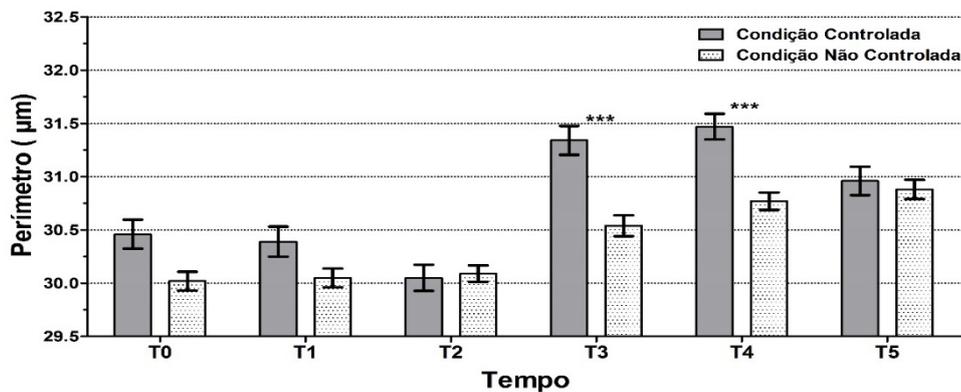
O grau de significância entre os tempos das duas condições, gerado pelos testes de múltiplas comparações de Bonferroni ou de Dunn's, foi plotado por asteriscos nos gráficos a seguir. Quanto maior for a quantidade de asteriscos, maior será a diferença significativa na comparação entre os tempos das condições analisadas. A ausência de asteriscos demonstra não haver diferença significativa.



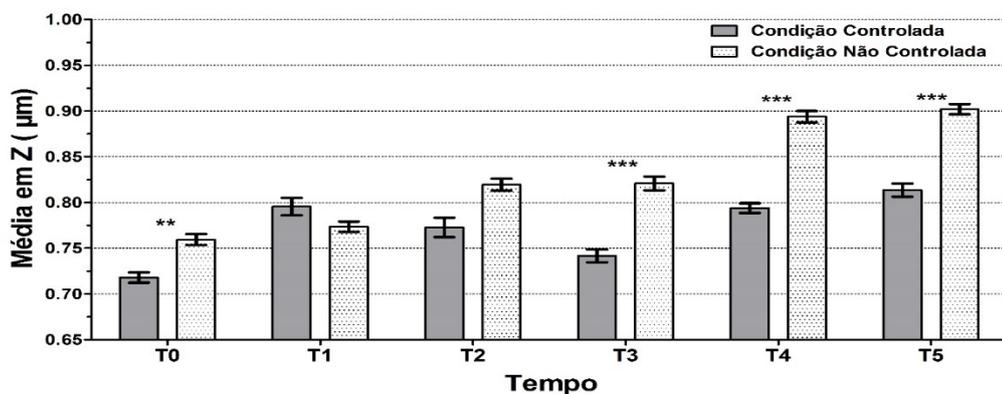
**Figura 43:** O gráfico representa a comparação da Média DM/LP entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor  $P < 0,001$ ; (\*\*) Muito significativo – Valor  $P$  entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor  $P$  entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



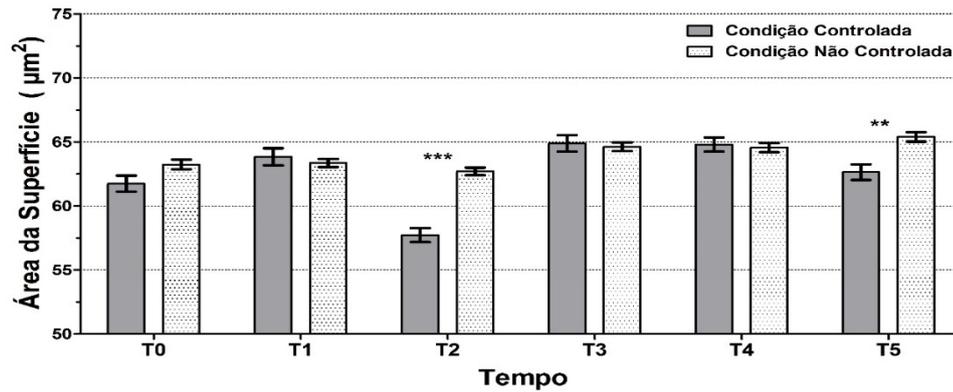
**Figura 44:** O gráfico representa a comparação do Raio Médio entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor  $P < 0,001$ ; (\*\*) Muito significativo – Valor  $P$  entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor  $P$  entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



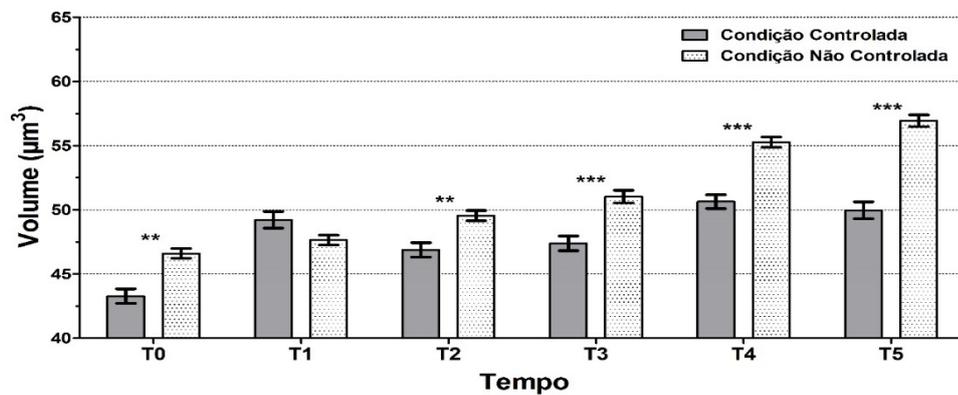
**Figura 45:** O gráfico representa a comparação do Perímetro entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor  $P < 0,001$ ; (\*\*) Muito significativo – Valor  $P$  entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor  $P$  entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



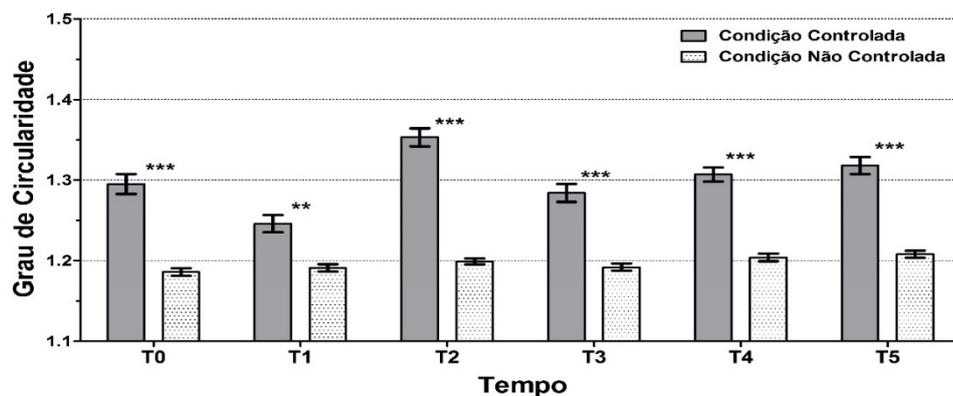
**Figura 46:** O gráfico representa a comparação da Média em Z (altura) entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn's, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor  $P < 0,001$ ; (\*\*) Muito significativo – Valor  $P$  entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor  $P$  entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



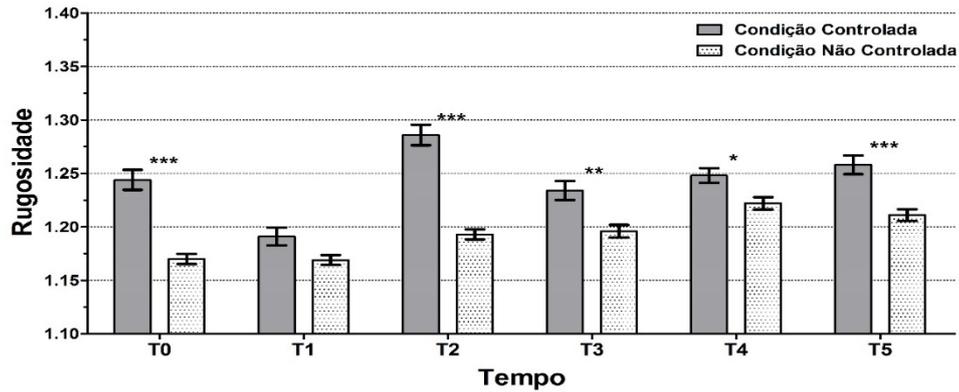
**Figura 47:** O gráfico representa a comparação da Área da Superfície entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



**Figura 48:** O gráfico representa a comparação do Volume entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



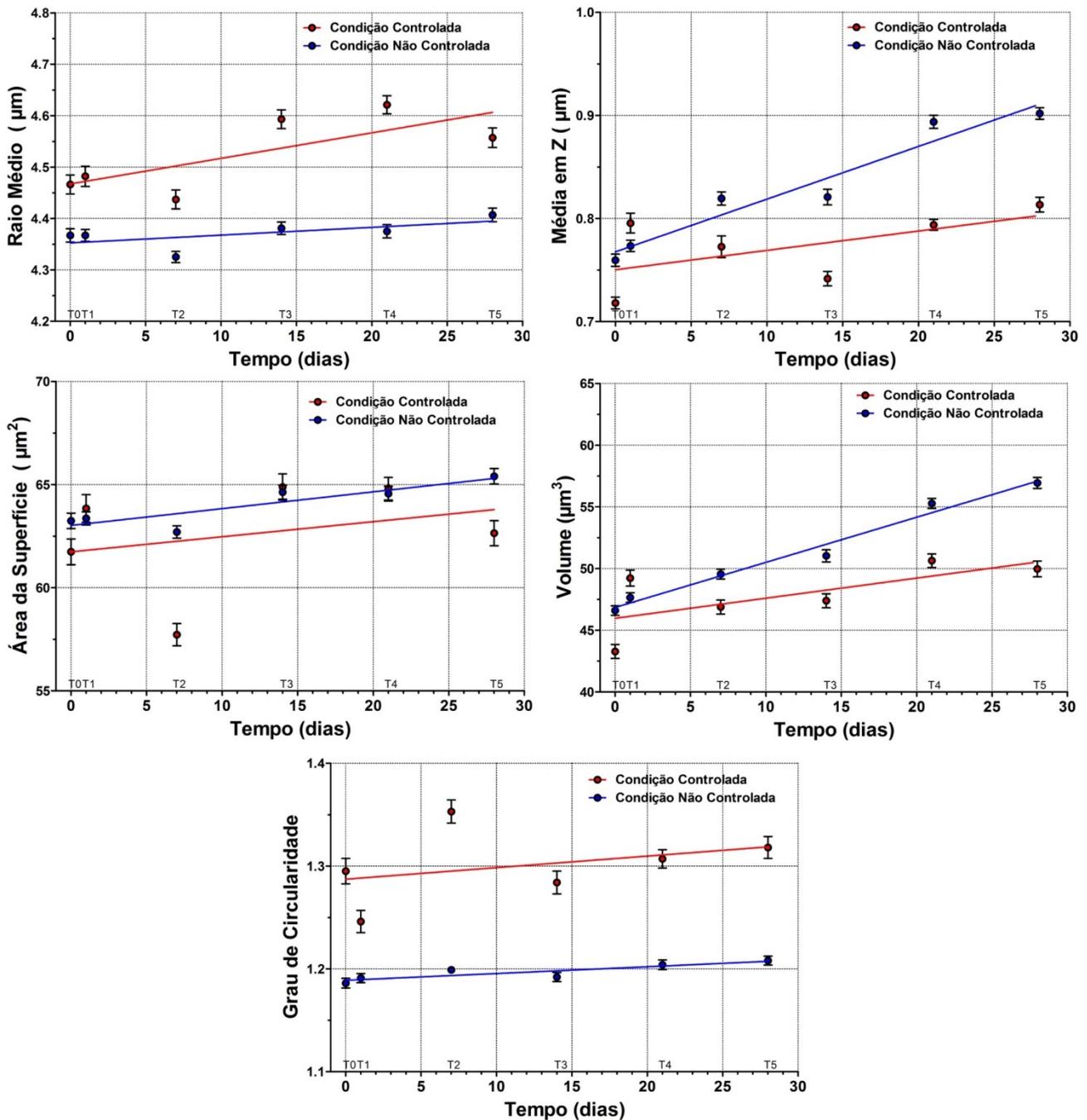
**Figura 49:** O gráfico representa a comparação do Grau de Circularidade entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn's, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



**Figura 50:** O gráfico representa a comparação da Rugosidade entre as duas condições analisadas. É formado por barras da média, delimitada por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn's, entre os tempos das duas condições. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor  $P < 0,001$ ; (\*\*) Muito significativo – Valor  $P$  entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor  $P$  entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.

Pelas análises estatísticas de múltiplas comparações entre tempo/tempo, foram observadas algumas diferenças significativas entre a condição controlada e a condição não controlada, em todos os parâmetros. Porém, os parâmetros Raio Médio, Volume e Grau de Circularidade demonstraram as maiores diferenças significativas entre os tempos, na comparação com os testes de Bonferroni e Dunn's, conforme observado pela quantidade de asteriscos para os três parâmetros. Para observar o comportamento da média  $\pm$  erro padrão desses parâmetros, obteve-se os valores  $r^2$  das retas da regressão linear desses três parâmetros com maior diferença significativa, sendo comparados na Figura 51.

O comportamento das retas de regressão linear dos parâmetros analisados na Figura 51, evidenciam que houve aumento das médias, para as duas condições, quando se compara a evolução entre os tempos de T0 até T5. Os valores  $r^2$  das retas demonstram que o aumento foi mais linear, em média, para a condição não controlada, quando comparado com a condição controlada, conforme observado na Tabela 8.



**Figura 51:** Os gráficos representam a comparação do comportamento das retas de regressão linear entre as duas condições analisadas, para os 3 parâmetros com maior diferença significativa, mais a Área da Superfície. Em vermelho a condição controlada, em azul a condição não controlada.

O comportamento das retas de regressão linear dos parâmetros analisados na Figura 51, evidenciam que houve regressão linear positiva (aumento das médias) para as duas condições ambientais, quando se compara a evolução entre os tempos de T0 até T5. Os

valores  $r^2$  das retas demonstram que o aumento foi mais linear para a condição não controlada, quando comparado com a condição controlada, conforme observado na Tabela 8, com exceção do Raio Médio.

**Tabela 8:** Dados das retas de regressão linear dos parâmetros – 2ª etapa

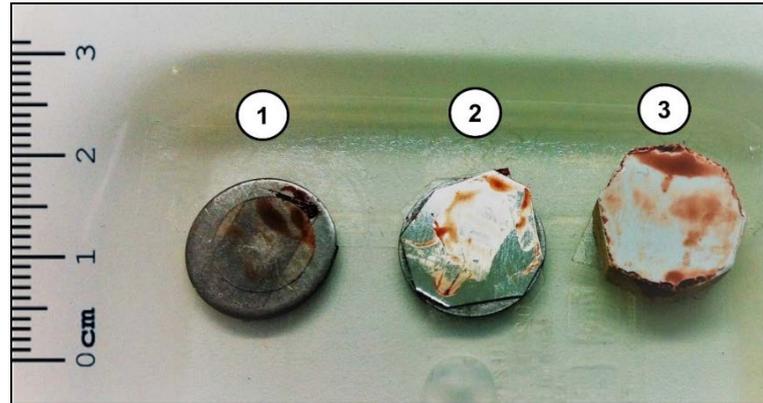
	Condição Controlada			Condição Não Controlada		
	Valor P	Valor $r^2$	%	Valor P	Valor $r^2$	%
<b>Raio Médio</b>	0,0882	0,5574	55,74	0,1743	0,4050	40,50
<b>Média em Z</b>	0,2261	0,3381	33,81	0,0015	0,9378	93,78
<b>Área da Superfície</b>	0,5564	0,0931	9,31	0,0194	0,7817	78,17
<b>Volume</b>	0,1370	0,4628	46,28	0,0002	0,9798	97,98
<b>G. de Circularidade</b>	0,4922	0,1248	12,48	0,0207	0,7745	77,45
<b>Média Total</b>	0,2999	0,3152	31,52	0,0432	0,7757	77,57

#### 4.3.3. - 3ª Etapa

A 3ª etapa teve por objetivo avaliar o TSD de manchas de sangue quando depositadas sobre diferentes suportes (vidro, metal e cerâmica) mediante condições ambientais não-controladas (Fig. 52). As amostras foram analisadas conforme estabelecido na tabela 1, em um período de 28 dias.

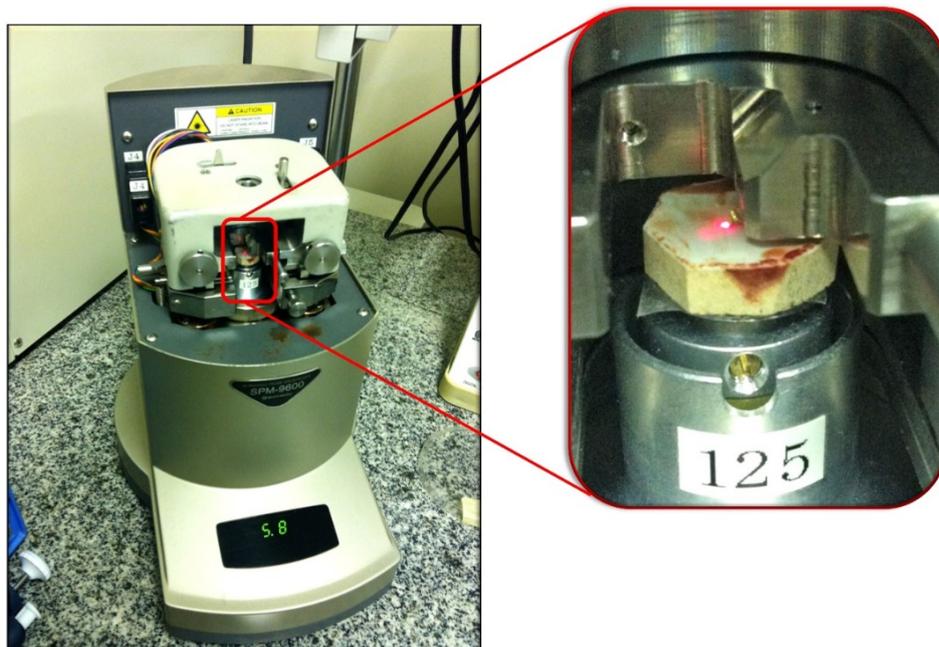
Seguindo a metodologia estabelecida foram obtidas amostras de sangue de um indivíduo (Indivíduo 1 – Quadro 4), e depositadas sobre os seguintes suportes:

1. **Vidro** – Tipo lamínula de vidro circular, com 10 mm de diâmetro;
2. **Metal** – Tipo lâmina flexível de aço, com aproximadamente 10 mm de diâmetro;
3. **Cerâmica** – Tipo bold, revestimento de coloração branca, com aproximadamente 10 mm de diâmetro e 5 mm de altura.



**Figura 52:** Foto das amostras sobre os três diferentes suportes. 1 – Vidro, 2 – Metal, 3 - Cerâmica.

Pelas análises tabulares obtidas por meio de MFA foram avaliados os parâmetros de 1 até 8 – Quadro 5. Os diagnósticos foram realizados dentro do mesmo período, e as amostras permaneceram juntas dentro do mesmo ambiente climático. A amostra de sangue foi obtida do indivíduo 1, sendo adquiridas 5 imagens por tempo para cada um dos três suportes, totalizando 30 imagens de MFA, ao longo dos tempos T0 até T5. O número de células avaliadas por suporte e por tempo de análise pode ser observada na Tabela 9. A Figura 53 demonstra a análise direta do suporte cerâmica no interior do microscópio de força atômica.



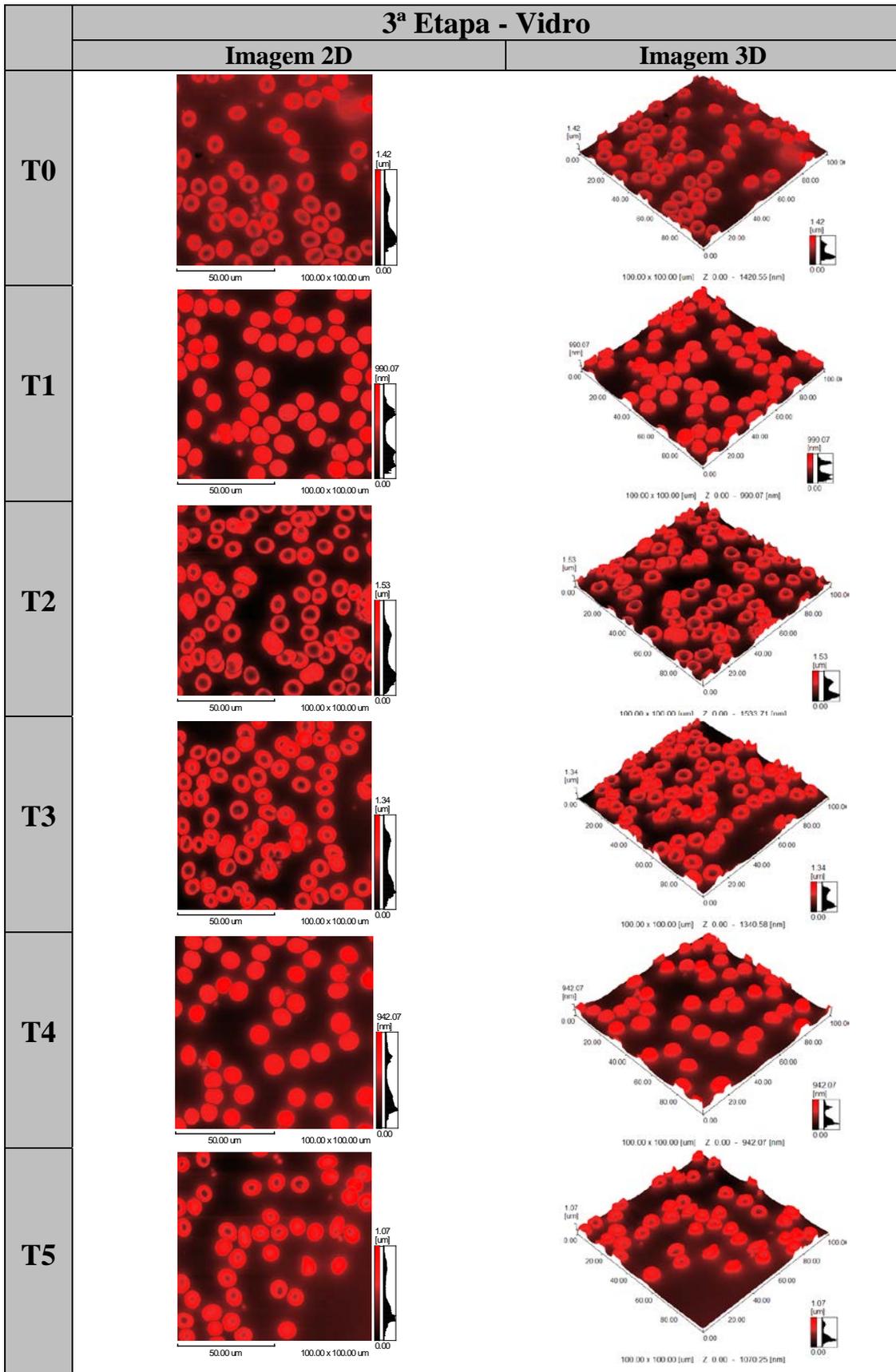
**Figura 53:** Análise da mancha de sangue sobre a cerâmica dentro do microscópio de força atômica

**Tabela 9:** Número de células analisadas por suporte e por tempo – 3ª etapa.

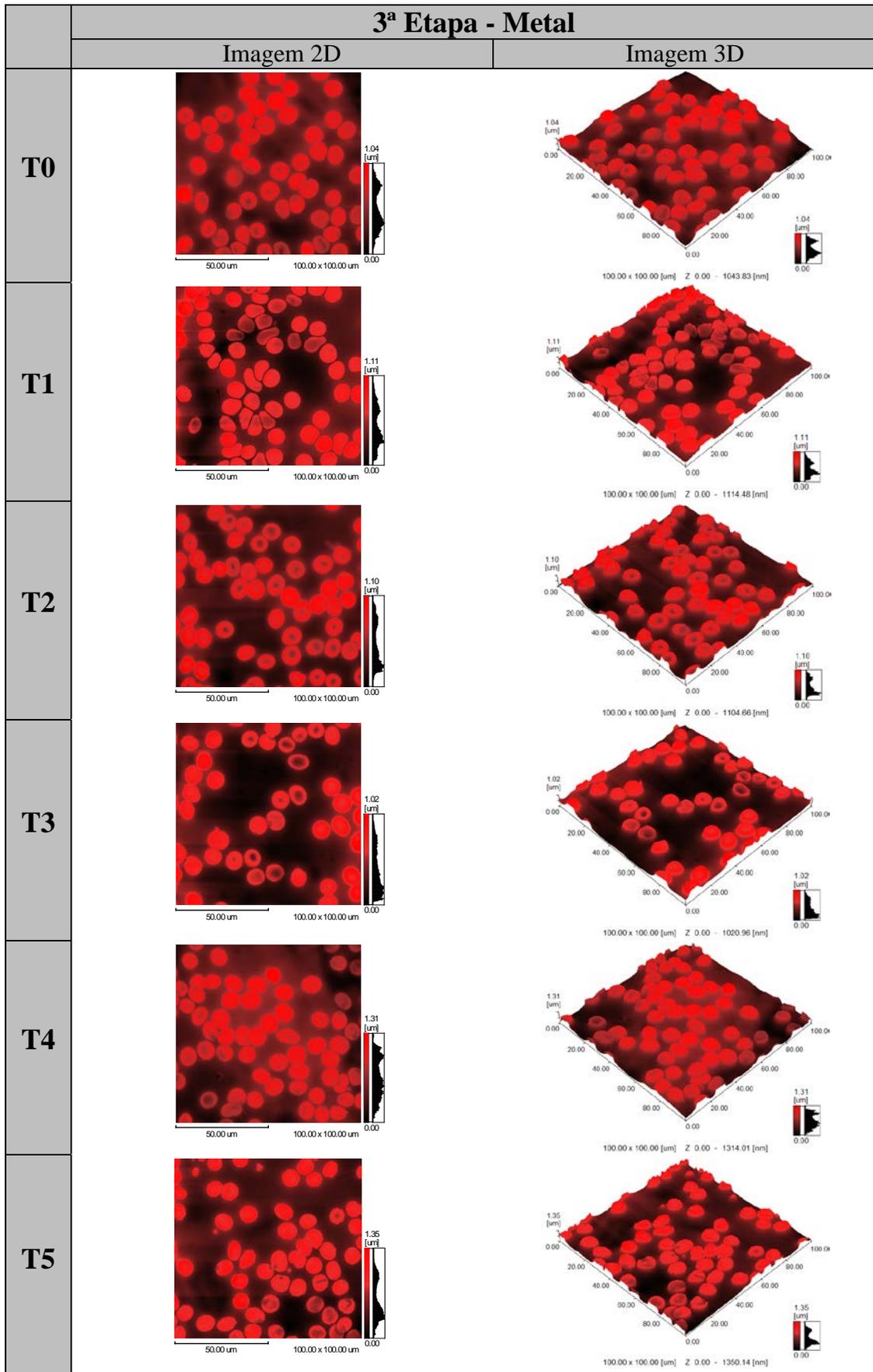
	<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>	<b>Média</b>
<b>Vidro</b>	162	199	128	134	147	135	150,83
<b>Metal</b>	111	136	128	122	115	143	125,83
<b>Cerâmica</b>	181	181	196	176	174	194	183,67
<b>Total</b>	454	516	452	432	436	472	Total = 2762

Das 30 imagens de MFA adquiridas para cada tipo de suporte na presente etapa foi selecionada uma imagem para cada tempo, e apresentada nos formatos 2D e 3D, conforme ilustradas nas Figuras 54 - 56.

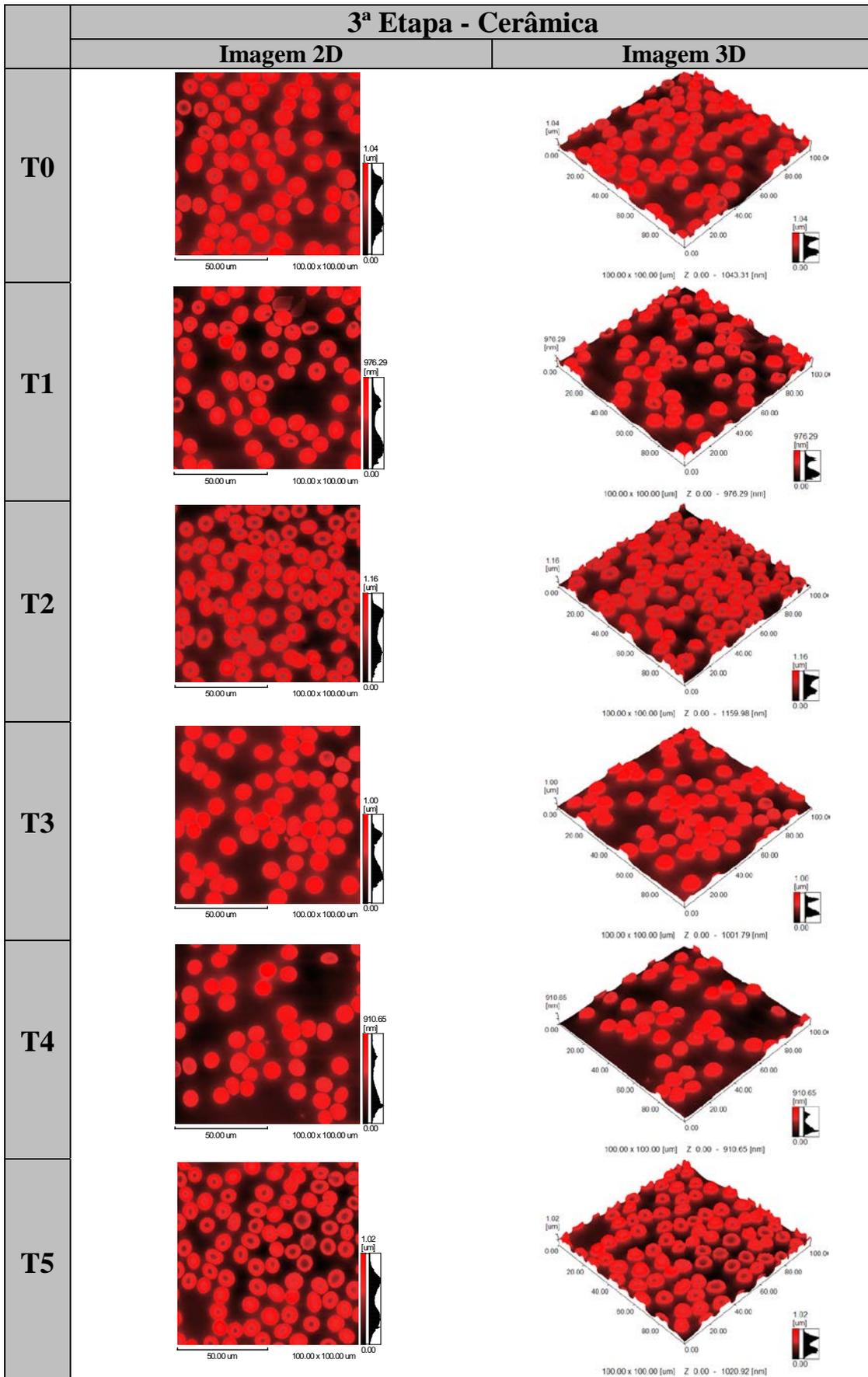
Pela simples observação visual das imagens de manchas de sangue obtidas sobre os suportes, não é possível identificar qualquer tipo de diferença morfológica temporal entre as RBCs, quando se compara as imagens entre os tempos T0 até T5. Existem diferenças naturais na concavidade dessas células, porém, essas alterações não foram relacionadas aos padrões de transformação temporal. Também não foram identificadas alterações morfológicas tempo-dependentes pela simples comparação visual entre as imagens dos três tipos de suportes analisados.



**Figura 54:** Imagens representativas selecionadas para o suporte de vidro em cada um dos tempos T0 até T5



**Figura 55:** Imagens representativas selecionadas para o suporte de metal em cada um dos tempos T0 até T5



**Figura 56:** Imagens representativas selecionadas para o suporte de cerâmica em cada um dos tempos T0 até T5

Os dados obtidos na presente etapa foram avaliados pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov - KS e de D'Agostino & Pearson (*omnibus K2*) – D&P, demonstrando distribuição normal (gaussiana), utilizando-se  $\alpha = 0,05$ , para todos os parâmetros de medidas 1D, 2D e 3D dos três suportes: Média DM/LP, Raio Médio, Perímetro, Média em Z (altura), Área da Superfície e Volume. Os parâmetros Adimensionais (AD) Grau de Circularidade e Rugosidade permaneceram fora da distribuição normal.

Para os parâmetros que seguiram a distribuição normal utilizou-se o teste one-way ANOVA, permanecendo com valor P abaixo de 0,05 para os três suportes, exceto para os parâmetros Média DM/LP, Raio Médio e Perímetro, para o suporte de vidro, os quais não apresentaram diferença significativa entre os tempos.

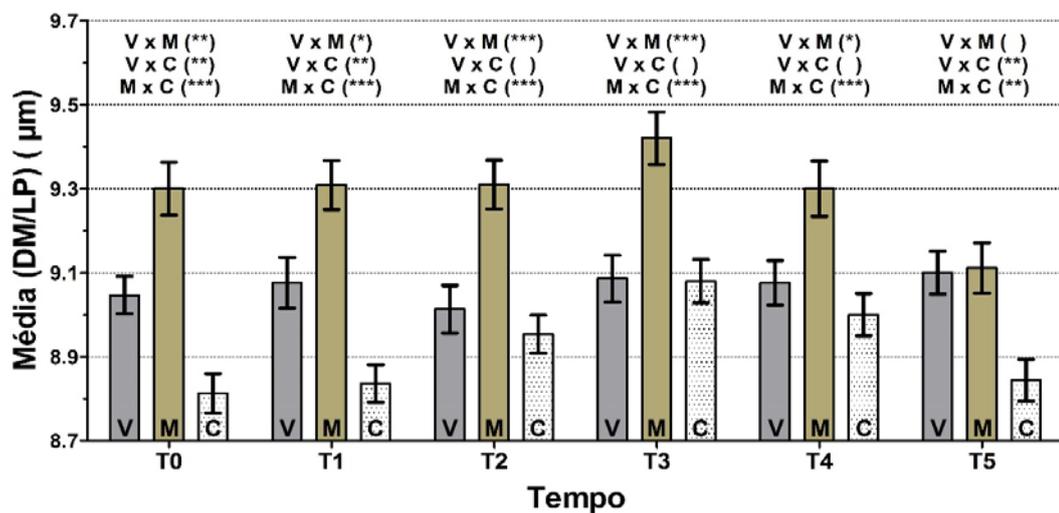
Os parâmetros Grau de Circularidade e Rugosidade, nos suportes de vidro e cerâmica, foram avaliados pelo teste de Kruskal-Wallis, apresentando valor  $P < 0,0001$  para ambos. A exceção foi o parâmetro Grau de Circularidade, para o suporte de metal, o qual não apresentou diferença significativa entre os tempos.

Os dados obtidos pelas análises na 3ª etapa do presente estudo foram avaliados de forma separada, para cada suporte, porém, confrontados nos gráficos para cada parâmetro específico. Essa análise comparativa visa demonstrar a evolução temporal das RBCs quando depositadas em diferentes suportes, conforme observado nas Figuras 54-61.

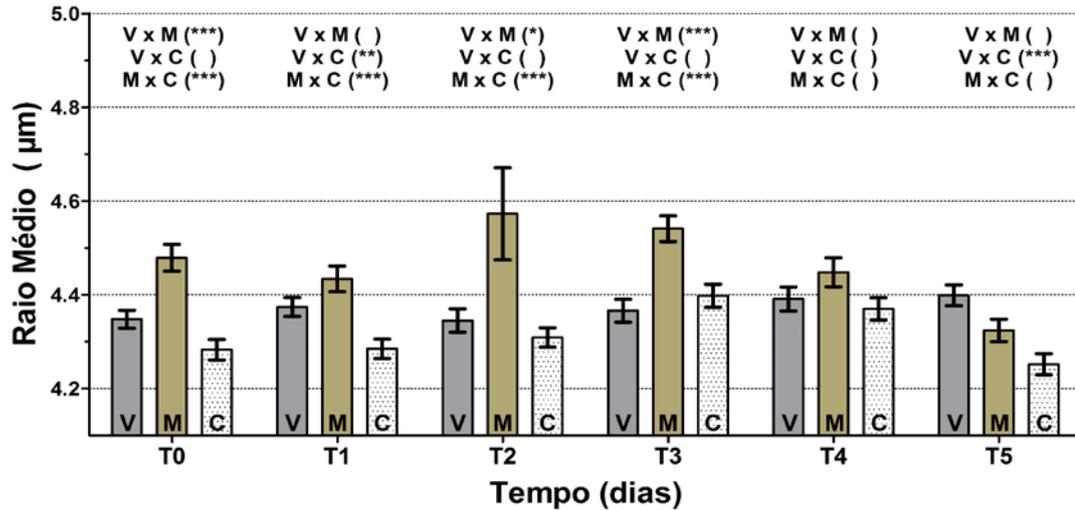
Para as análises dos testes de múltiplas comparações de Bonferroni e Dunn's, na avaliação entre os tempos iniciais dos diferentes suportes (VidroT0 vs MetalT0, VidroT0 vs CerâmicaT0, MetalT0 vs CerâmicaT0), observou-se diferença estatística significativa, na comparação entre os parâmetros, logo no primeiro contato da mancha de sangue com o suporte. A ponteira do microscópio de força atômica foi capaz de medir essas diferenças, considerando o tempo T0 como o momento de produção da amostra (analogamente seria o

momento do crime). As diferenças são perceptíveis, também, na evolução do confronto com os demais tempos, conforme observado nos gráficos das Figuras 54 - 61.

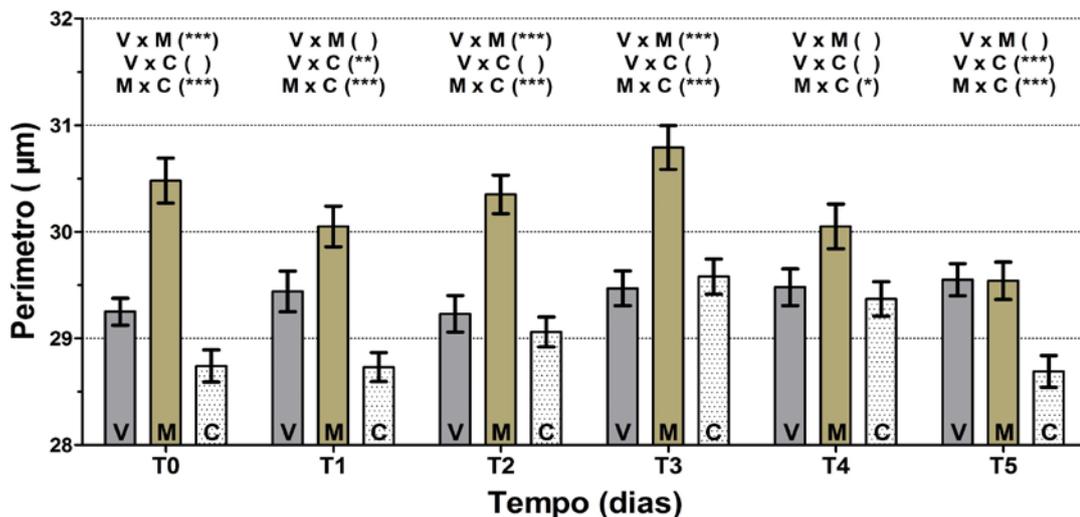
O grau de significância entre os tempos dos três suportes, gerado pelos testes de múltiplas comparações de Bonferroni ou de Dunn's, foi plotado por asteriscos nos gráficos a seguir. Quanto maior for a quantidade de asteriscos, maior será a diferença significativa na comparação entre os tempos das condições analisadas. A ausência de asteriscos demonstra não haver diferença significativa.



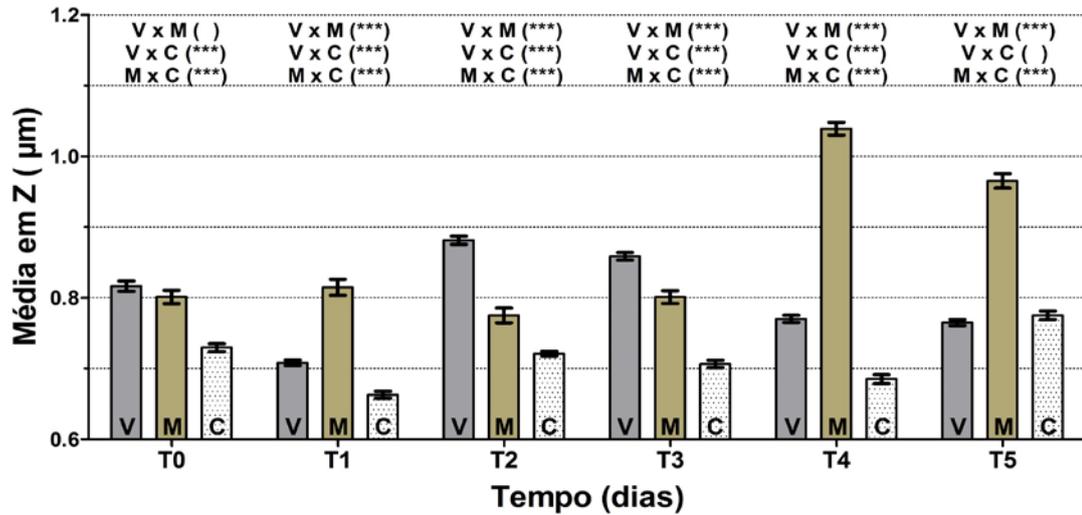
**Figura 57:** O gráfico representa a comparação da Média DM/LP entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



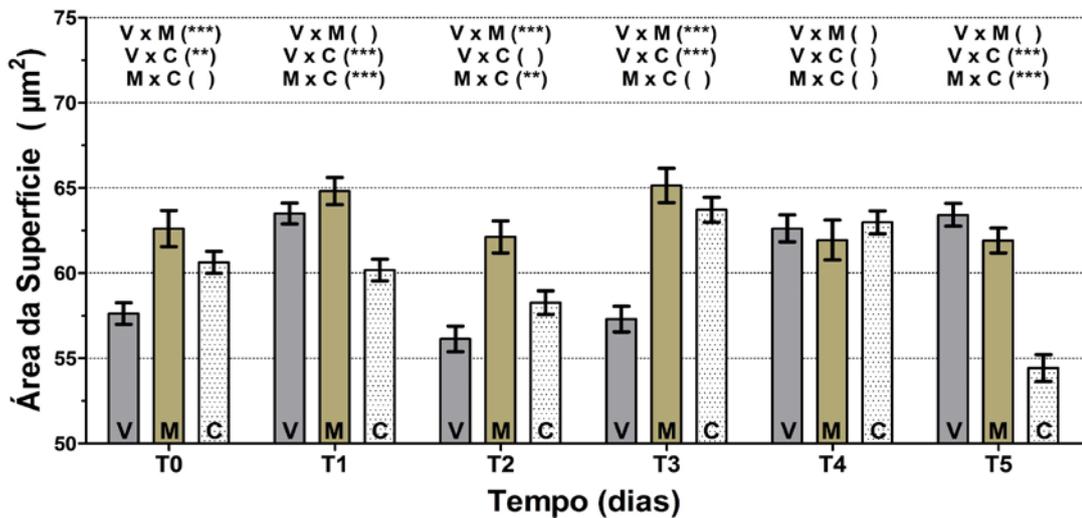
**Figura 58:** O gráfico representa a comparação do Raio Médio entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



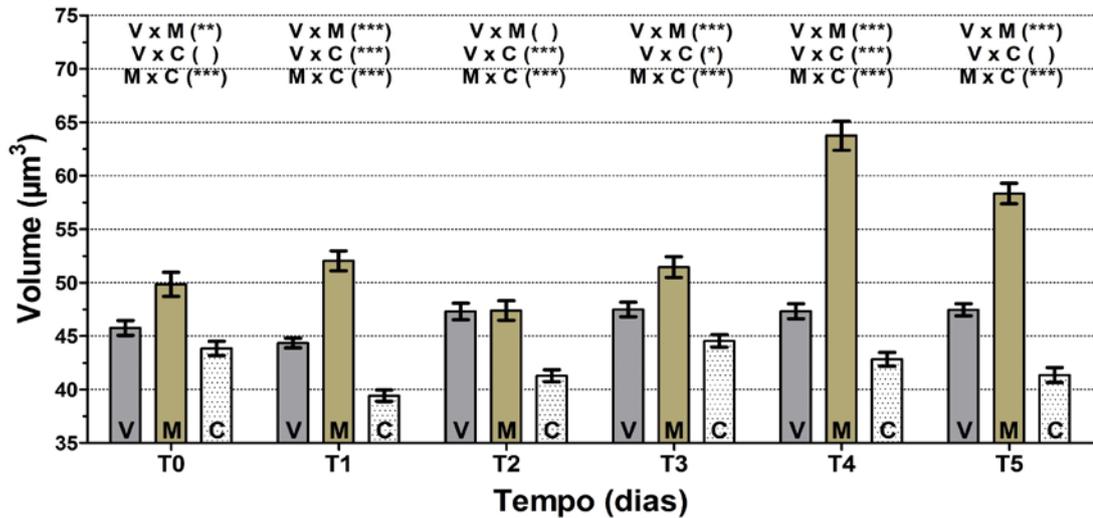
**Figura 59:** O gráfico representa a comparação do Perímetro entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



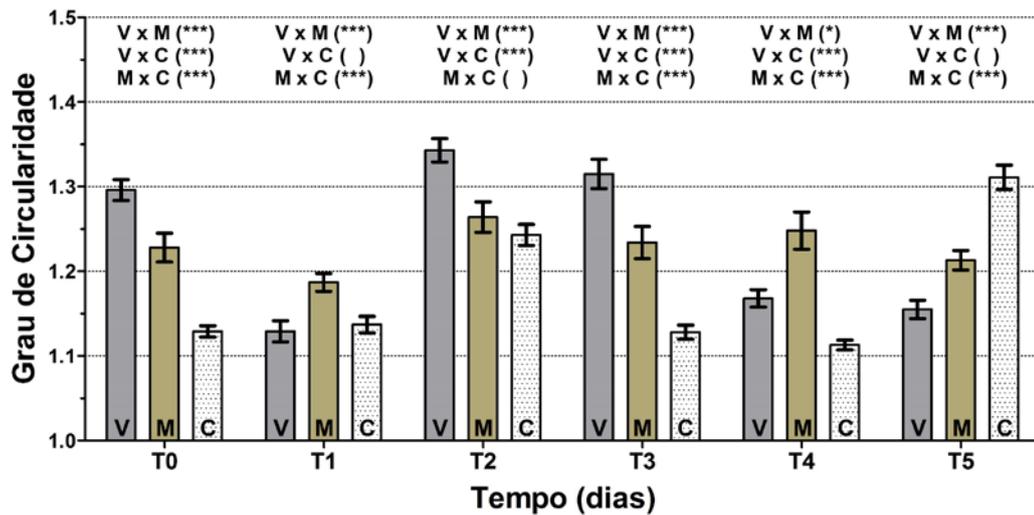
**Figura 60:** O gráfico representa a comparação da Média em Z entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn's, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



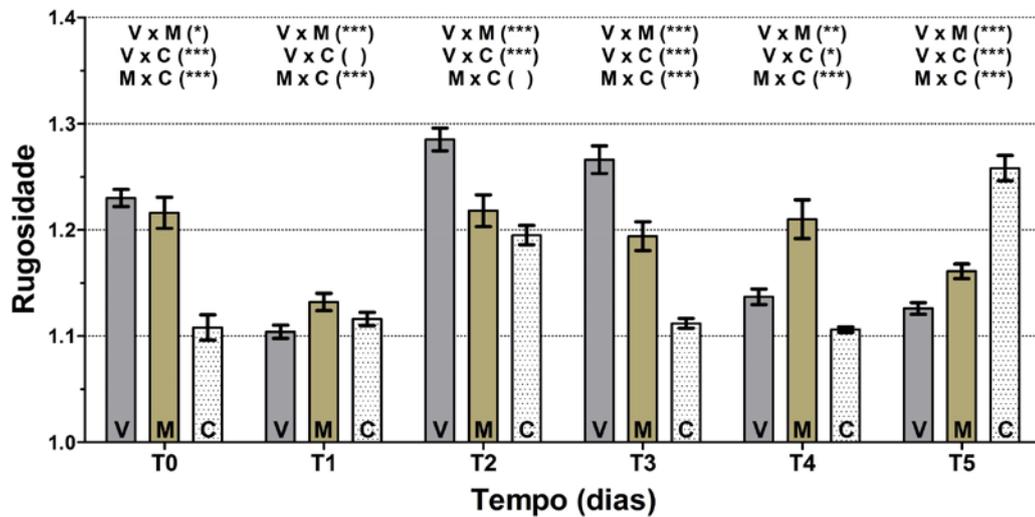
**Figura 61:** O gráfico representa a comparação da Área da Superfície entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



**Figura 62:** O gráfico representa a comparação do Volume entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Bonferroni, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.

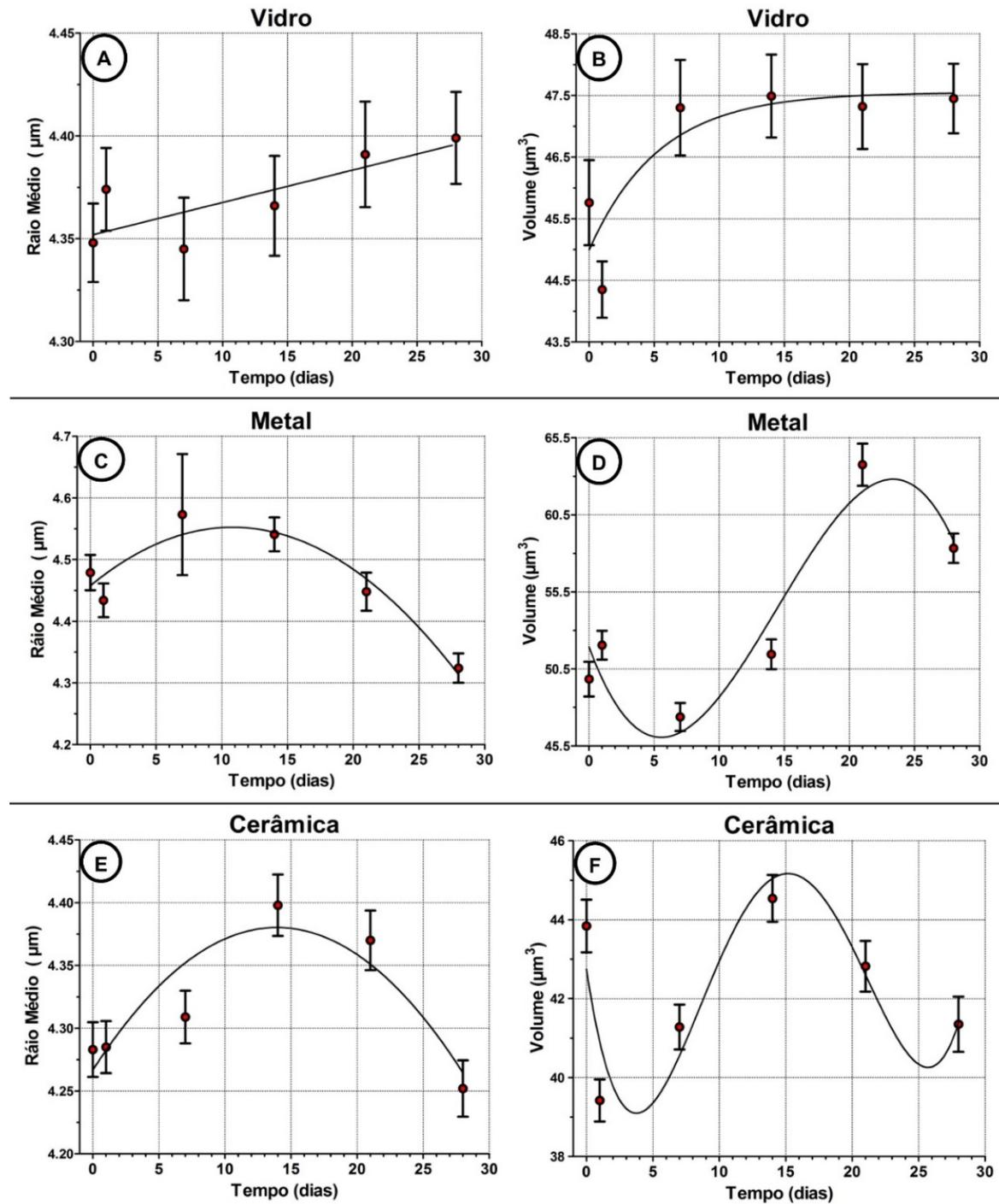


**Figura 63:** O gráfico representa a comparação do Grau de Circularidade entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn's, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.



**Figura 64:** O gráfico representa a comparação da Rugosidade entre os três suportes analisados, Vidro (V), Metal (M) e Cerâmica (C). O gráfico é formado por barras da média e por barras de erro padrão. Os asteriscos representam a diferença significativa, pelo teste de Dunn's, entre os tempos dos três suportes. (\*\*\*) Extremamente significativo – Valor P < 0,001; (\*\*) Muito significativo – Valor P entre 0,001 e 0,01; (\*) Significativo – Valor P entre 0,01 e 0,05; ( ) Não significativo.

Para os testes realizados nesta etapa, a amostra de mancha de sangue depositada sobre o vidro apresentou comportamento semelhante aos resultados observados para o conjunto dos indivíduos da 1ª etapa, demonstrando regressão linear positiva (tendência de aumento linear) para as medidas de 1D, 2D e 3D, conforme observado no gráfico de regressão linear do Raio Médio, com valor  $r^2 = 0,6423$  (Fig. 65-A) e no gráfico de regressão não linear (função exponencial) do Volume, com valor  $R^2 = 0,7584$  (Fig. 65-B). Os suportes de metal e cerâmica, apresentaram comportamentos diferentes entre si e entre o suporte de vidro, conforme observado para o gráfico de regressão não linear (função polinomial quadrática) do Raio Médio, com valor  $R^2 = 0,9051$  (Fig. 65-C) e no gráfico de regressão não linear (função polinomial cúbica) do Volume, com valor  $R^2 = 0,8983$  (Fig. 65-D). Já o suporte de cerâmica exibiu gráfico de regressão não linear (função polinomial quadrática) do Raio Médio, com valor  $R^2 = 0,8128$  (Fig. 65-E) e no gráfico de regressão não linear (função polinomial de quarta ordem) do Volume, com valor  $R^2 = 0,7606$  (Fig. 65-F).



**Figura 65:** Comparação das retas/curvas de regressão linear e não linear observadas para os três suportes. Os pontos representam médias e as barras representam os erros padrão.

#### 4.3.4. - 4ª Etapa

A 4ª etapa teve por objetivo observar, pela análise das curvas de Força×Distância, o TSD de manchas de sangue de diferentes indivíduos doadores (Fig. 66), quando depositadas em suporte de vidro, mediante condições ambientais não controladas.

Seguindo a metodologia estabelecida, foram obtidas amostras de sangue de dois indivíduos (Indivíduo 1 e Indivíduo 6 – Quadro 4). As amostras foram analisadas conforme estabelecido na tabela 1 entre os tempos T0 até T5 (28 dias).

Pelas análises tempo-dependentes por meio das curvas de Força×Distância – parâmetro 9 do Quadro 5 foi avaliada a rigidez (elasticidade) da membrana da hemácia, pelo módulo de Young (Fig 69).

As amostras permaneceram juntas em mesmo ambiente climático não controlado. Os diagnósticos foram realizados dentro do mesmo período com os dois indivíduos, sendo obtidas curvas de Força×Distância de 25 células por tempo/indivíduo, ao longo dos tempos T0 até T5.

Das 150 curvas de Força×Distância adquiridas para cada indivíduo, na presente etapa, foram selecionadas uma representativa para cada tempo e apresentadas juntamente com uma imagem 2D de uma hemácia analisada, conforme ilustradas nas Figuras 67 e 68. Pela simples observação visual das imagens das células, não é possível identificar qualquer tipo de diferença morfológica temporal entre as RBCs, quando se compara as imagens entre os tempos T0 até T5. Existem diferenças naturais na concavidade dessas células, porém, essas alterações não foram relacionadas aos padrões de transformação temporal pelas análises de curvas de Força×Distância.



**Figura 66:** Foto das amostras de sangue dos 2 indivíduos (1 e 6) depositadas em lamínulas de vidro sobre os porta-amostras do microscópio.

Pelas análises tabulares obtidas pela medida das curvas de Força×Distância obteve-se a média  $\pm$  erro padrão (Fig. 70) do módulo de Young (elasticidade) para cada indivíduo/tempo, conforme Tabela 10.

**Tabela 10:** Hemácias analisadas por tempo (2 indivíduos) e Média  $\pm$  Desvio Padrão (DP) do módulo de Young

		<b>T0</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>	<b>T5</b>
<b>Nº de Hemácias Total</b>		51	50	51	51	52	52
<b>Indivíduo 1</b>	<b>Média <math>\pm</math> DP</b>	30,39 $\pm 9,480$	27,32 $\pm 8,634$	23,03 $\pm 10,40$	20,33 $\pm 9,911$	17,22 $\pm 7,868$	25,56 $\pm 10,86$
<b>Indivíduo 6</b>		28,68 $\pm 9,975$	22,13 $\pm 6,986$	21,86 $\pm 8,686$	18,09 $\pm 9,498$	17,55 $\pm 6,170$	22,01 $\pm 9,383$
<b>Indivíduo (1 + 6)</b>		29,55 $\pm 9,666$	24,73 $\pm 8,203$	22,46 $\pm 9,520$	19,23 $\pm 9,680$	17,38 $\pm 7,002$	23,79 $\pm 10,21$

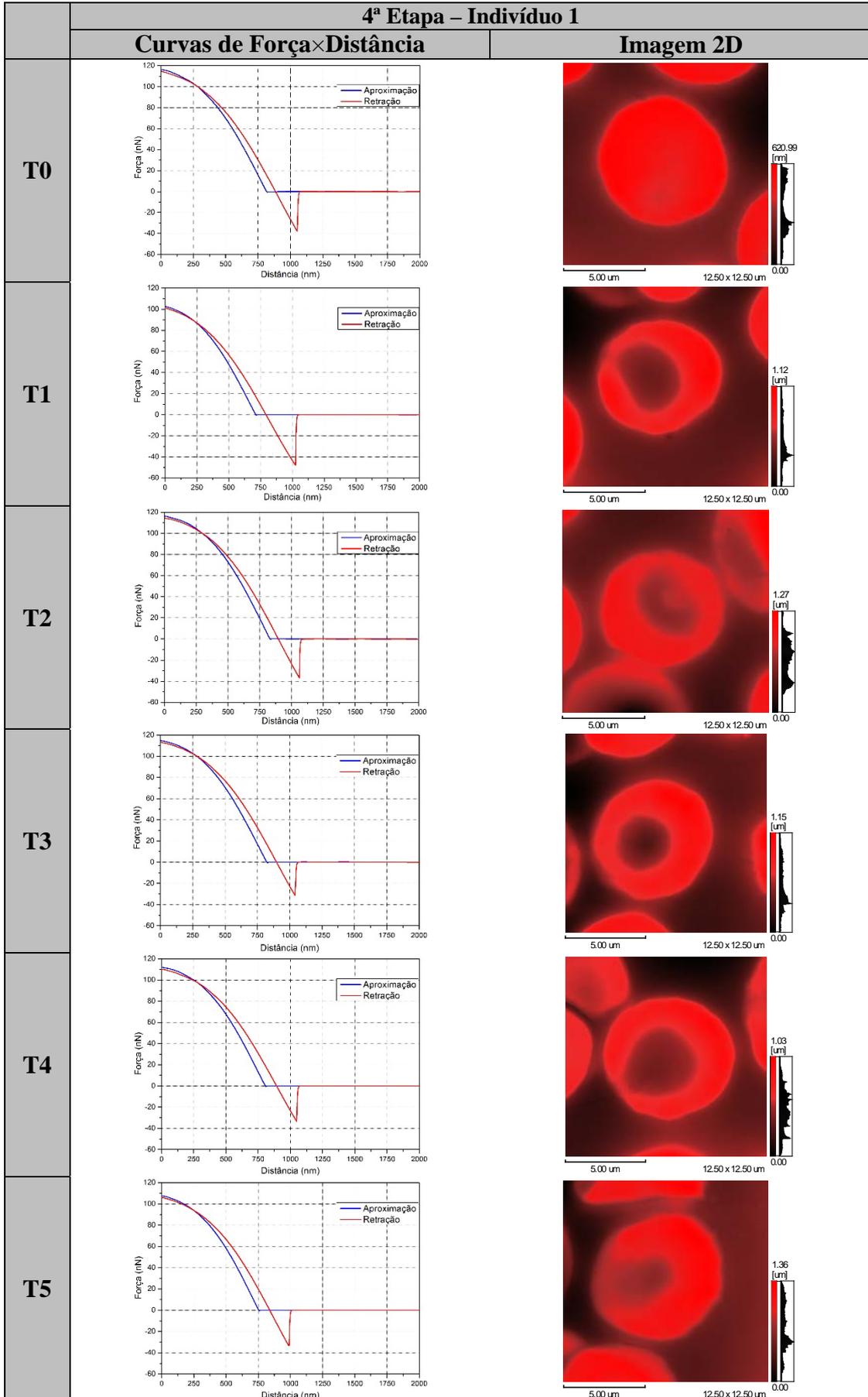


Figura 67: Curvas de Força×Distância e imagens 2D – Indivíduo 1, em cada um dos tempos T0 até T5

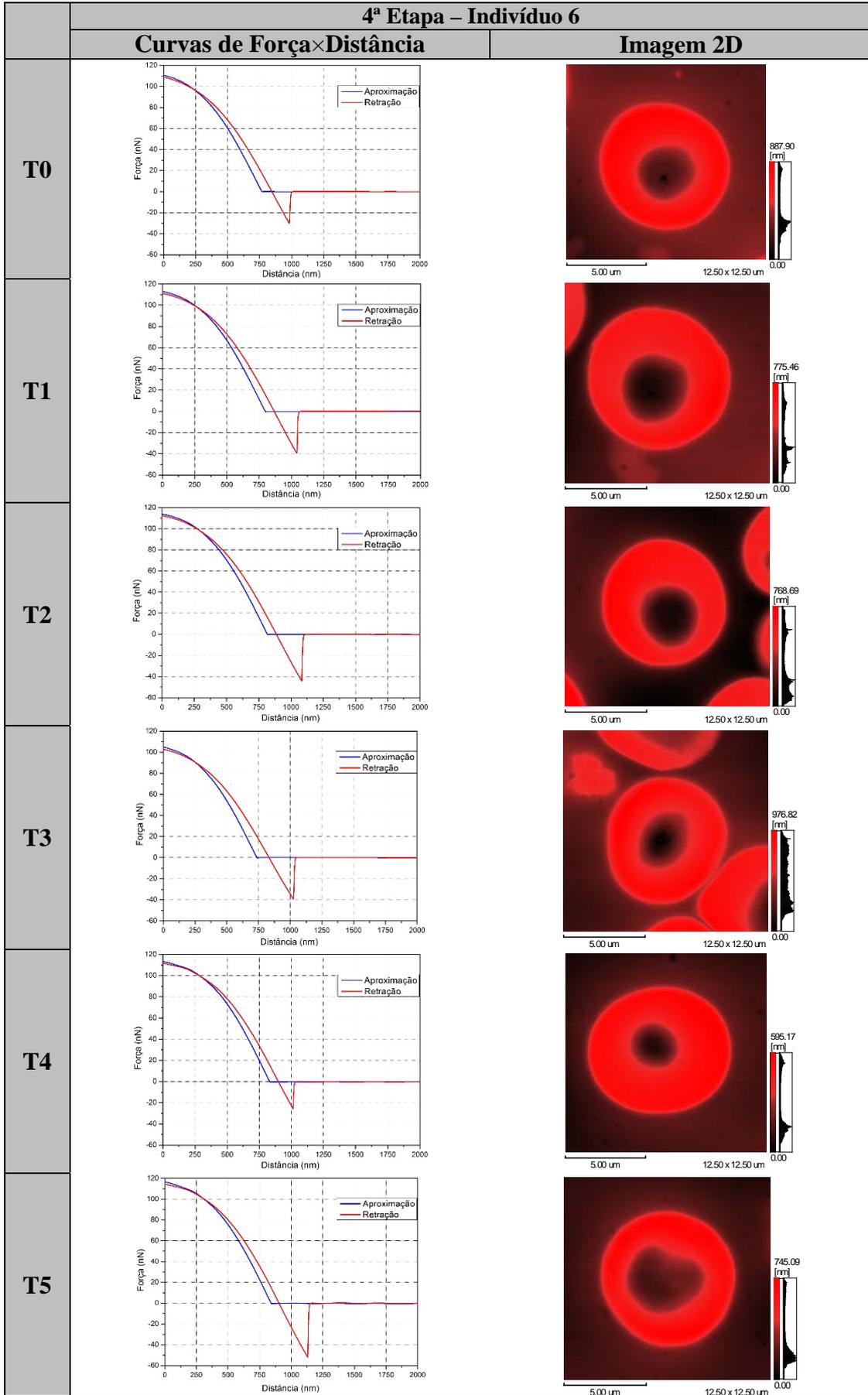
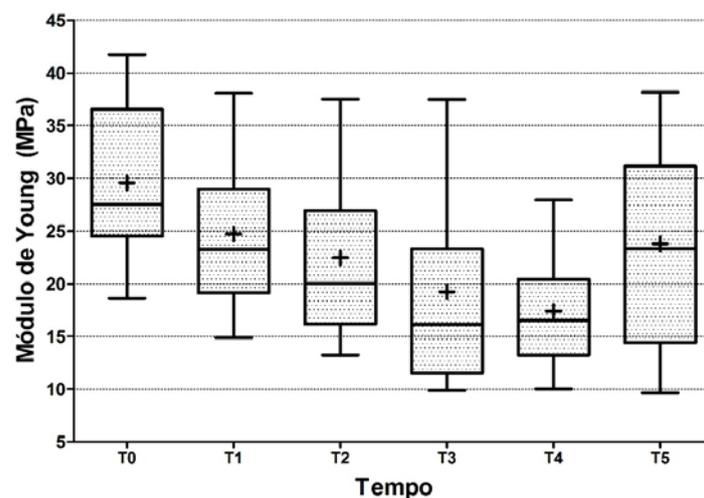
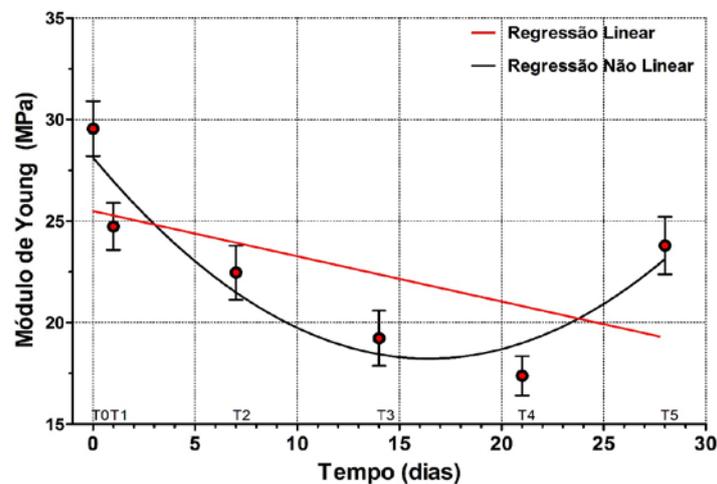


Figura 68: Curvas de Força×Distância e imagens 2D – Indivíduo 6, em cada um dos tempos T0 até T5

Os dados da presente etapa foram verificados pelos testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov - KS e de D'Agostino & Pearson (omnibus K2) – D&P. Em seguida, foram avaliados pelo teste one-way ANOVA, apresentando valor ANOVA  $P < 0,0001$ . Para as análises de múltiplas comparações entre os tempos, considerando o tempo T0 como o momento de produção da amostra (momento do crime), demonstraram diferença estatística significativa na comparação T0vsT2, T0vsT3, T0vsT4 e T0vsT5, com nível de significância fixado em 5%. O teste de Bonferroni não observou diferença significativa na comparação T0vsT1.



**Figura 69:** Gráfico *boxplot* do módulo de Young, agrupamento dos indivíduos 1 e 6, representa a distribuição de 1º e 9º percentil, concentração dos valores em cada quartil e a mediana ao centro. O símbolo (+) indica a média.



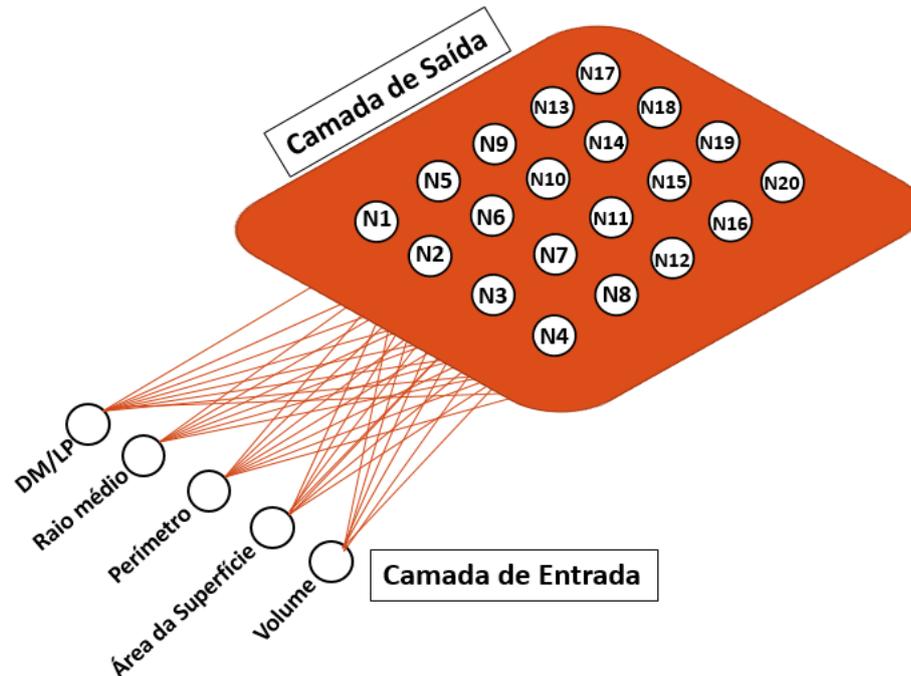
**Figura 70:** Linha vermelha representa gráfico da regressão linear do módulo de Young, o qual mostrou desvio não significativo de zero ( $P = 0,2257$ ). Linha preta representa gráfico de regressão não linear. Os pontos vermelhos e as barras representam a média e o erro padrão da média.

A análise de regressão linear do módulo de Young (Fig. 70) apontou um aumento médio nas medidas da elasticidade da membrana celular ao longo dos 28 dias de análise, porém, o modelo linear não foi suficiente para explicar o fenômeno, apresentando valor  $r^2 = 0,3386$  (33,86%). A curva de regressão não linear (função polinomial quadrática) se adequou ao fenômeno, demonstrando uma retomada no aumento da rigidez da membrana celular entre os tempos T3 e T4. A regressão não linear apresentou valor  $R^2 = 0,8748$  (87,48%).

#### **4.4 - Aplicação dos dados obtidos na 1ª etapa, através de mapas auto organizáveis de Kohonen (Self-Organizing Map – SOM) – Modelagem Matemática**

Para aplicação dos dados celulares adquiridos na 1ª Etapa, a massa de dados quantitativos obtidos, a partir das cerca de 10.700 RBCs analisadas (Tabela 3), foi empregada em uma rede de Kohonen visando à obtenção de um método capaz de determinar o TSD de manchas de sangue. Utilizando-se o software estatístico R, para a construção desse mapa, foram selecionados, pelas análises da 1ª Etapa, os parâmetros que apresentaram diferenças estatísticas significativas (valor  $r^2 > 0,75$ ) para a análise de regressão linear positiva (aumento linear médio) das medidas celulares (Tabela 5), entre os tempos T0 até T5, que foram: Média DM/LP, Raio Médio, Perímetro, Área da Superfície e Volume.

A camada de saída dessa rede de Kohonen foi projetada para ser uma matriz de  $5 \times 4 = 20$  neurônios (*clusters*), considerando-se o resultado do algoritmo *K-means*, de que 20 *clusters* representam um número razoável para registrar os diversos padrões observados para as medidas das RBCs na 1ª Etapa (Fig. 71).



**Figura 71:** Estrutura da Rede de Kohonen aplicada com os dados da 1ª Etapa, utilizando na camada de entrada os 5 parâmetros selecionados, e para a camada de saída os 20 Neurônios (N) – clusters.

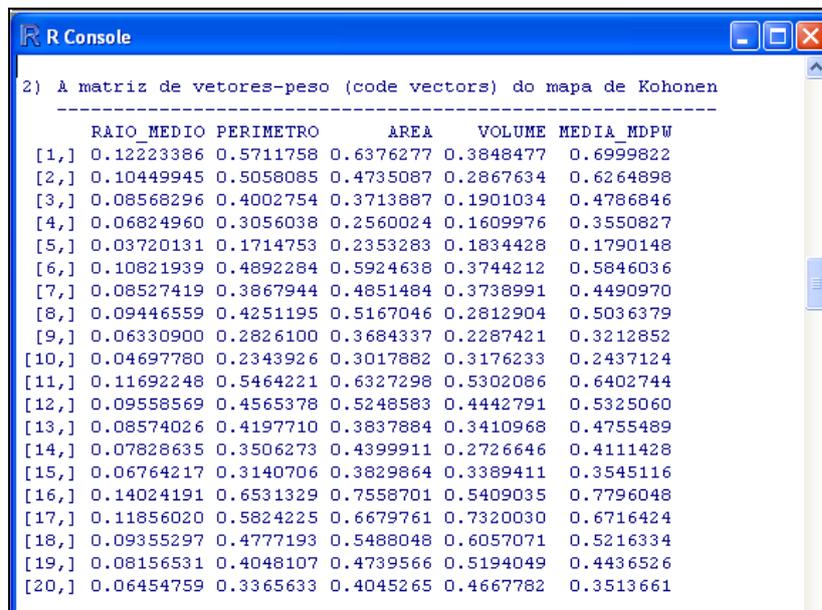
Geralmente, os mapas de Kohonen são implementados por meio da normalização das variáveis da camada de entrada. Por esta análise, a normalização dos 5 parâmetros de entrada foi realizada com base na fórmula apresentada na Figura 72.

$$\text{Var\_Norm} = \frac{X - X_{\min}}{X_{\max} - X_{\min}}$$

**Figura 72:** Fórmula de normalização utilizada para os 5 parâmetros aplicados no SOM.

Por exemplo, considerando-se o parâmetro Volume, entre todos os dados das RBCs, o maior valor de volume é  $X_{\max} = 102,70 \mu\text{m}^3$  e o menor valor de volume é  $X_{\min} = 16,15 \mu\text{m}^3$ . Desta forma, uma RBC, cujo volume seja  $X = 52,35 \mu\text{m}^3$  apresentará valor normalizado  $\text{Var\_Norm} = (52,35 - 16,15) / (102,70 - 16,15) = 0,4183$ . Esse processo foi aplicado para todos os 5 parâmetros utilizados para a confecção do mapa de Kohonen.

Na Figura 73 observam-se os valores dos vetores de pesos dos 20 neurônios (*clusters*) da camada de saída do mapa de Kohonen após a conclusão do algoritmo de treinamento da rede. Note que todos os valores já estão normalizados.



```

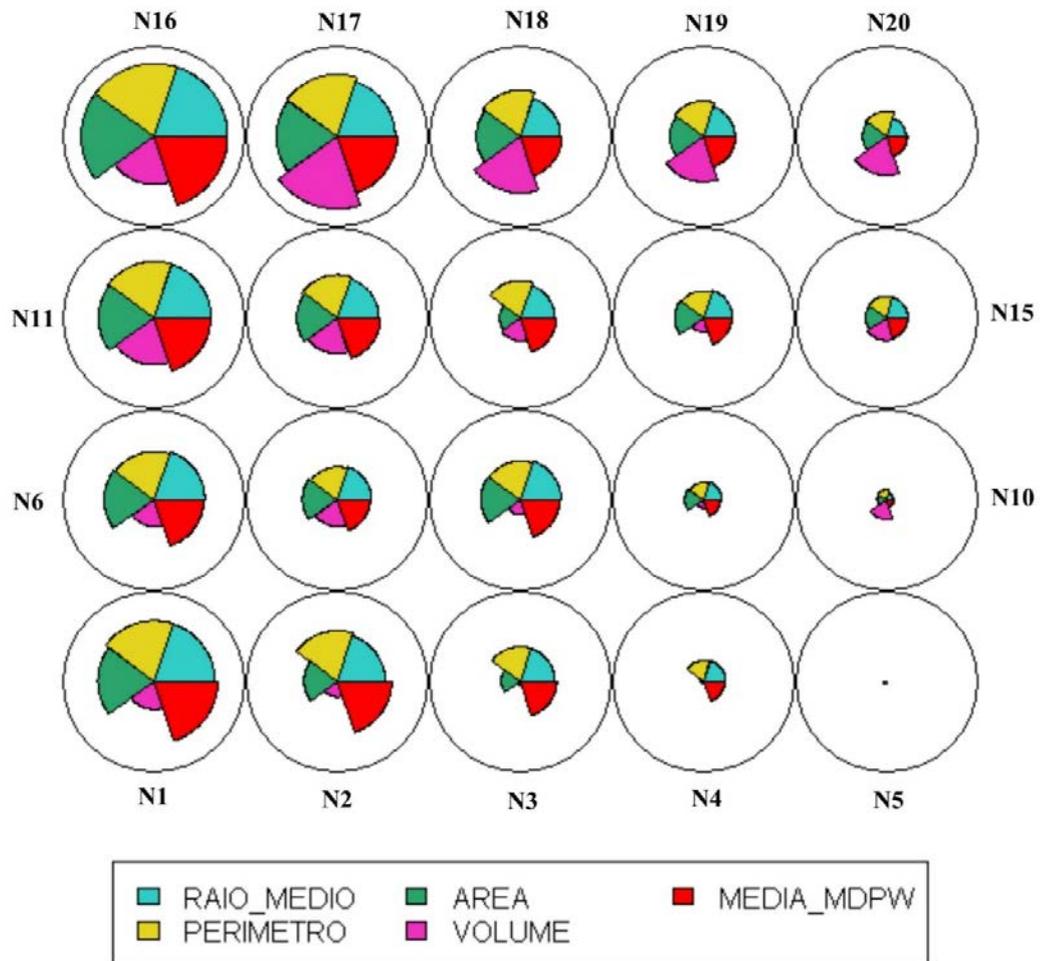
2) A matriz de vetores-peso (code vectors) do mapa de Kohonen
-----
      RAOIO_MEDIO PERIMETRO      AREA      VOLUME MEDIA_MDPW
[1,] 0.12223386 0.5711758 0.6376277 0.3848477 0.6999822
[2,] 0.10449945 0.5058085 0.4735087 0.2867634 0.6264898
[3,] 0.08568296 0.4002754 0.3713887 0.1901034 0.4786846
[4,] 0.06824960 0.3056038 0.2560024 0.1609976 0.3550827
[5,] 0.03720131 0.1714753 0.2353283 0.1834428 0.1790148
[6,] 0.10821939 0.4892284 0.5924638 0.3744212 0.5846036
[7,] 0.08527419 0.3867944 0.4851484 0.3738991 0.4490970
[8,] 0.09446559 0.4251195 0.5167046 0.2812904 0.5036379
[9,] 0.06330900 0.2826100 0.3684337 0.2287421 0.3212852
[10,] 0.04697780 0.2343926 0.3017882 0.3176233 0.2437124
[11,] 0.11692248 0.5464221 0.6327298 0.5302086 0.6402744
[12,] 0.09558569 0.4565378 0.5248583 0.4442791 0.5325060
[13,] 0.08574026 0.4197710 0.3837884 0.3410968 0.4755489
[14,] 0.07828635 0.3506273 0.4399911 0.2726646 0.4111428
[15,] 0.06764217 0.3140706 0.3829864 0.3389411 0.3545116
[16,] 0.14024191 0.6531329 0.7558701 0.5409035 0.7796048
[17,] 0.11856020 0.5824225 0.6679761 0.7320030 0.6716424
[18,] 0.09355297 0.4777193 0.5488048 0.6057071 0.5216334
[19,] 0.08156531 0.4048107 0.4739566 0.5194049 0.4436526
[20,] 0.06454759 0.3365633 0.4045265 0.4667782 0.3513661

```

**Figura 73:** O vetor de pesos (*code book vectors*) dos 20 neurônios (*clusters*) do mapa de Kohonen, após a conclusão do algoritmo de treinamento da rede.

Na Figura 74 observam-se os 20 neurônios da camada de saída por meio do diagrama de ventilador (*fan diagram*). Em cada neurônio representa-se, por meio de setores circulares, o valor do vetor de pesos para os 5 parâmetros das RBCs, semelhante a um gráfico circular de setores (pizza). Por exemplo, no neurônio N1, o componente do vetor de pesos referente à variável RAOIO\_MEDIO vale 0,12223386, conforme se observa na Figura 73. Já no neurônio N20, este valor vale 0,06454759. Ou seja, o peso desta variável em N1 é maior que em N20. Fato observado pelo setor correspondente no neurônio N1, no diagrama de ventilador, o qual é maior que o do neurônio N20. Deste modo, observando-se o neurônio N1, por exemplo, podemos dizer que o mesmo está treinado para reconhecer RBCs com considerável valor de RAOIO\_MEDIO, PERÍMETRO, AREA e MEDIA\_MDPW e um valor “modesto” de VOLUME.

## Vetor de Pesos dos Neurônios



**Figura 74:** A camada de saída da rede de Kohonen apresentando o diagrama de ventilador (*fan diagram*) que enfatiza graficamente o valor dos pesos de cada variável no neurônio (N) específico.

Na Figura 75 apresenta-se o resultado do *clustering* por SOM, de todos os dados das RBCs obtidos pela 1ª Etapa, alocados por neurônio (N) da camada de saída, com base no tempo (T0 até T5) e a Figura 76 mostra a distribuição percentual dessas RBCs pelos 20 neurônios com base, também, nos tempos (T0 até T5).

```

R Console
Alocação de hemáceas pelo 20 neurônios (clusters)
com base no tempo de exposição das mesmas

      T0  T1  T2  T3  T4  T5
1     45  38  24  30  52  52
2     34  64  47  44  53  44
3     77  76  54  26  55  38
4     49  59  52  28  33  26
5     76  47  32  22  22  39
6     84 101  88  94 106  82
7     93 135 109 161 111  81
8    109  76  77  99 100 103
9    118 104  70  91  67  64
10   95  66  59  46  56  52
11   29  55  45  82  99  88
12   78  87  82 120 117 117
13   43  93  45  42  48  58
14  135 132 125 114  90  97
15  133 126  92  99  90  87
16    9  19  22  33  30  26
17   13  14  22  18  26  34
18   24  42  52  49  66  84
19   58  63  74  56  84 101
20   43  48  68  41  78  81

```

**Figura 75:** RBCs alocadas por neurônio da camada de saída com base no TSD.

Frequência absoluta								Frequência relativa (%)						
Neurônio	T0	T1	T2	T3	T4	T5	Total	T0	T1	T2	T3	T4	T5	Total
1	45	38	24	30	52	52	241	18.67	15.77	9.96	12.45	21.58	21.58	100
2	34	64	47	44	53	44	286	11.89	22.38	16.43	15.38	18.53	15.38	100
3	77	76	54	26	55	38	326	23.62	23.31	16.56	7.98	16.87	11.66	100
4	49	59	52	28	33	26	247	19.84	23.89	21.05	11.34	13.36	10.53	100
5	76	47	32	22	22	39	238	31.93	19.75	13.45	9.24	9.24	16.39	100
6	84	101	88	94	106	82	555	15.14	18.20	15.86	16.94	19.10	14.77	100
7	93	135	109	161	111	81	690	13.48	19.57	15.80	23.33	16.09	11.74	100
8	109	76	77	99	100	103	564	19.33	13.48	13.65	17.55	17.73	18.26	100
9	118	104	70	91	67	64	514	22.96	20.23	13.62	17.70	13.04	12.45	100
10	95	66	59	46	56	52	374	25.40	17.65	15.78	12.30	14.97	13.90	100
11	29	55	45	82	99	88	398	7.29	13.82	11.31	20.60	24.87	22.11	100
12	78	87	82	120	117	117	601	12.98	14.48	13.64	19.97	19.47	19.47	100
13	43	93	45	42	48	58	329	13.07	28.27	13.68	12.77	14.59	17.63	100
14	135	132	125	114	90	97	693	19.48	19.05	18.04	16.45	12.99	14.00	100
15	133	126	92	99	90	87	627	21.21	20.10	14.67	15.79	14.35	13.88	100
16	9	19	22	33	30	26	139	6.47	13.67	15.83	23.74	21.58	18.71	100
17	13	14	22	18	26	34	127	10.24	11.02	17.32	14.17	20.47	26.77	100
18	24	42	52	49	66	84	317	7.57	13.25	16.40	15.46	20.82	26.50	100
19	58	63	74	56	84	101	436	13.30	14.45	16.97	12.84	19.27	23.17	100
20	43	48	68	41	78	81	359	11.98	13.37	18.94	11.42	21.73	22.56	100

**Figura 76:** Frequência absoluta e relativa das hemácias alocadas por neurônio da camada de saída com base no tempo desde a deposição (T0 até T5).

Os resultados observados para a classificação dos neurônios dentro dos tempos (T0 até T5), utilizando mapas de Kohonen, não foram tão satisfatórios. Pois, supondo que os cinco parâmetros fossem capazes de discriminar corretamente o tempo de deposição das RBCs, seria de se esperar que cada neurônio, de N1 até N20, tivesse alocado, majoritariamente,

RBCs de um mesmo tempo. Por exemplo, poderíamos esperar que o neurônio N1, em função dos valores das cinco variáveis, fosse “especializado” em detectar RBCs de tempo T3, com porcentagem acima de 80%, porém, esse tipo de proporção não foi observada entre os neurônios (*clusters*). Pode-se notar, nas Figuras 75 e 76, que no neurônio N1 foram alocadas 241 RBCs, sendo que, apenas 30 são do tempo T3, o que corresponde a 12,45% do total. No neurônio N1, observa-se que nenhum dos tempos apresenta um percentual majoritário, superior a 50 %, por exemplo.

Uma abordagem interessante dentro da análise pericial seria a classificação quinzenal, por meio das somas das porcentagens entre os tempos. Por exemplo, durante o levantamento em um local de crime, poderiam ser coletadas manchas de sangue, as quais, após analisadas por MFA e inseridas na camada inicial do mapa de Kohonen, apresentariam o neurônio N5 como vencedor. Os investigadores forenses precisam responder se a mancha de sangue possui mais de 15 dias ou menos de 15 dias. Pela observação da frequência relativa (Fig. 76) dos tempos do neurônio N5, a possibilidade dessa mancha de sangue ter sido depositada dentro dos 15 dias iniciais seria de 74,37% (T0+T1+T2+T3). Situação semelhante foi observada para o neurônio N9, com 74,51% das células classificadas até o tempo T3.

Apesar de ser uma abordagem pioneira e, ainda, sem precisão prática, a utilização de mapas auto-organizáveis de Kohonen (*self-organizing map* – SOM), para análise do TSD, mostrou uma interessante aplicabilidade forense. Outros estudos são necessários para aprofundar e ampliar esse método, buscando o aumento da população amostral, com a possibilidade estatística para ampla aplicação, bem como outros intervalos de tempo.



## **5. DISCUSSÃO**

### **5.1. Considerações sobre o TSD das amostras de manchas de sangue analisadas nas etapas do presente estudo**

As alterações nos derivados da hemoglobina ocorrem dentro das primeiras horas, e as mudanças na proteína e seus derivados tornam-se mínimas após cerca de dois meses<sup>[4]</sup>. Este processo de modificação das proteínas internas às RBCs pode causar alterações estruturais expressivas na morfologia dessas células.

Apesar dessas transformações celulares internas, estudos como os de Strasser *et al.* (2007)<sup>[33]</sup> e de Hortolà (2005)<sup>[64]</sup> afirmam que a morfologia das RBCs não se altera após a exposição do sangue em ambiente não fisiológico, apresentando, em seus trabalhos publicados, imagens de microscopia de força atômica (MFA) e de microscopia eletrônica de varredura (MEV), demonstrando uma forma intacta dessas células após a deposição em manchas de sangue. De fato, a observação visual não é capaz de perceber alterações mensuráveis nas medidas dessas células, e as observações qualitativas das imagens 2D e 3D de MFA para as etapas desta pesquisa, também, confirmam essa proposta.

Entretanto, as observações quantitativas seguiram uma rota complementar àquelas traçadas pelos autores acima citados, com observações micrométricas quantificáveis nas estruturas morfológicas das RBCs, após observações de cerca de 10.700 RBCs entre os tempos T0 (0 h) e T5 (28 dias) da 1ª Etapa. Não era de se estranhar que esse processo de colapso celular fosse, naturalmente, seguido por alterações celulares estruturais nas medidas dessas células e, conseqüentemente, essa foi a principal hipótese deste estudo. Pela utilização da MFA, as alterações estruturais das RBCs foram adquiridas por meio das medidas celulares de 1D, 2D, 3D e AD conforme observado pela análise gráfica das Etapas desta pesquisa. Conforme estudo aplicado por Curley *et al.* (2011)<sup>[65]</sup>, a aquisição de imagens topográficas de MFA com resolução inferior (128×128 ou 256×256 pixels) poderia também apresentar informações quantitativas similares na comparação com os resultados obtidos para resolução

512×512 pixels, obtidos dentro deste trabalho, reduzindo consideravelmente o tempo gasto para captação das imagens e aumentando o poder de análise dessa técnica.

### **5.1.1. Considerações sobre as alterações dos parâmetros celulares obtidos na 1ª Etapa – Deposição das manchas de sangue sobre vidro e condição ambiental não controlada**

Os parâmetros Média DM/LP, Raio Médio e Perímetro obtidos nas análises das RBCs presentes nas manchas de sangue da 1ª Etapa, apresentaram aumento linear estatisticamente significativo, apontado, pelas retas de regressão linear positiva. A comparação do tempo T0 com os demais tempos, pelos testes de Bonferroni e Dunn's, evidenciou essas diferenças no aumento linear dessas medidas, conforme Quadro 6.

Já o parâmetro Média em Z (altura) das RBCs na 1ª Etapa, apesar de demonstrar aumento nas médias para todos os tempos, quando comparado com T0, não apresentou crescimento linear estatisticamente significativo, o que ficou evidenciado pelo confronto com a análise da curva de regressão não linear, representando uma função polinomial de quarta ordem (Fig. 32), demonstrando picos e vales nessa função.

Para os parâmetros de 2D e 3D, obtidos das RBCs na 1ª Etapa, a Área da Superfície apresentou crescimento linear médio estatisticamente significativo, com aumento linear médio de 5,16%, na comparação entre as Áreas de T0 e de T5 (Fig. 33). O Volume demonstrou aumento exponencial de T0 até T2, dentro dos primeiros sete dias, atingindo o platô entre os tempos T2 e T5. A curva de crescimento exponencial foi suficiente para explicar o fenômeno observado para as médias  $\pm$  erro padrão do Volume, demonstrando valor  $R^2 = 0,9342$  (93,42 %). Wu *et al.* (2009)<sup>[47]</sup> observaram tendência temporal distinta ao estudar o volume celular das RBCs por um período de 35 dias. O grupo observou uma tendência não linear das médias temporais do volume, e o gráfico plotado no artigo publicado apresentou característica de uma curva com função polinomial de quarta ordem. O estudo de Wu *et al.* (2009)<sup>[47]</sup> utilizou

amostra de apenas um indivíduo, depositada sobre vidro, não havendo informação sobre o número de células medidas para a análise do parâmetro volume. Na análise da 1ª Etapa desta pesquisa, foram medidas, em média, 1790 RBCs por tempo, utilizando medidas celulares de 8 indivíduos.

A análise dos padrões adimensionais – AD, Grau de Circularidade e Rugosidade, apresentaram padrões bastante semelhantes entre si. Esses parâmetros não se comportaram de forma linear, mas apresentaram curvas expressivas de regressão não linear, função polinomial de quarta ordem, as quais se adequaram aos fenômenos dos dois parâmetros, demonstrando pico em T1 e vale em T3, em ambos os parâmetros.

Esses resultados demonstram que os parâmetros de 1D (Média DM/LP, Raio Médio e Perímetro) e 2D (Área da Superfície), devido às suas tendências lineares de aumento temporal médio (regressão linear positiva), podem ser utilizados como variáveis na aplicação de um método para avaliação do TSD de manchas de sangue, utilizando MFA. O volume, devido sua característica de aumento exponencial observada para os primeiros sete dias, poderia ser aplicado como variável na distinção temporal, dentro dos dias iniciais, T0 até T2.

Esses 5 parâmetros (Média DM/LP, Raio Médio, Perímetro, Área da Superfície e Volume) foram testados pela aplicação de mapas auto-organizáveis de Kohonen, para a determinação do TSD para manchas de sangue. Apesar desses mapas representarem o modelo de redes neurais competitivas com maior aplicação na atualidade<sup>[63]</sup>, a sua utilização para análise do TSD de manchas de sangue ainda não foi reportada pela literatura forense. Mesmo representando uma aplicação pioneira e ainda sem precisão concreta, os dados da 1ª Etapa, quando inseridos nessa rede, apresentaram possibilidade de classificação quinzenal do TSD para o modelo proposto.

Já os parâmetros Média em Z (altura), Grau de Circularidade e Rugosidade, por apresentarem comportamento não linear ou não expressarem comportamento ascendente ou

descendente de suas médias temporais, seriam maus indicadores para análises tempo-dependentes.

### **5.1.2. Considerações sobre as alterações dos parâmetros celulares obtidos na 2ª Etapa - Deposição das manchas de sangue sobre vidro e condição ambiental controlada**

Pela comparação entre a condição controlada (temperatura de 25°C e umidade de 80%) e a condição não controlada (temperatura de 20°C - 30°C e umidade 20% - 65%), foi possível observar diferenças estatísticas significativas na análise temporal dos parâmetros, quando comparados por Bonferroni e Dunn's.

As maiores diferenças foram observadas entre os tempos das duas condições ambientais para os parâmetros Raio Médio, Volume e Grau de Circularidade. Para esses parâmetros, o grau de linearidade foi maior nas retas de regressão linear da condição não controlada (Fig. 48), onde os coeficientes de determinação apresentaram valores  $r^2$  mais significativos, conforme Tabela 8.

Locais de crime geralmente apresentam condições ambientais não controladas e a observação de padrões temporais lineares, tanto ascendentes como descendentes, tornam-se importantes para a determinação de métodos tempo-dependentes para RBCs em manchas de sangue. Para os parâmetros aqui analisados, tanto em condições controladas como em não controladas, foram observadas tendências ascendentes (Fig. 48). A linearidade notada para os parâmetros citados, dentro de condições não controladas, pode auxiliar a comunidade científica forense a compreender melhor o comportamento das hemácias em manchas de sangue.

Para os trabalhos científicos que estudam essas tendências temporais em manchas de sangue, a literatura científica forense, geralmente, é negligente quanto à realização de estudos em condições não controladas, o que acaba por dificultar a aplicação dos métodos para locais

de crime. Entre os diversos estudos tempo-dependentes para manchas de sangue observados na literatura e citados no tópico Introdução do presente trabalho, apenas espectroscopia UV-Vis<sup>[38]</sup>, Raman<sup>[41]</sup> e MFA<sup>[47]</sup> ousaram testar suas técnicas em ambientes não controlados.

### **5.1.3. Considerações sobre as alterações dos parâmetros celulares obtidos na 3ª Etapa - Deposição das manchas de sangue sobre diferentes suportes e condição ambiental não controlada**

O suporte ou a superfície onde a mancha de sangue será depositada pode influenciar a análise do TSD de manchas de sangue. Geralmente, os estudos científicos que observam tendências temporais em manchas de sangue não levam em consideração outros tipos de superfície, além dos suportes para lâminas de vidro. No presente estudo, as comparações entre os três suportes (vidro, metal e cerâmica) demonstraram diferenças, estatisticamente significativas logo no primeiro contato das RBCs presentes nas manchas de sangue com o suporte, observado pelas comparações entre os tempos T0, pelos testes de Bonferroni e Dunn's.

Nas medidas de 1D (Média DM/LP, Raio Médio e Perímetro), 2D (Área da Superfície) e 3D (Volume), as RBCs depositadas sobre o suporte de metal, apresentaram medidas médias maiores que aquelas observadas para as células depositadas sobre os suportes de vidro e cerâmica. Esse fato pode estar relacionado com as cargas presentes na superfície de metal, as quais interagem com as cargas presentes nas superfícies das hemácias. Metais apresentam alta capacidade de condutividade elétrica, característica que pode ser explicada pela presença de elétrons livres em sua camada de valência. Outra hipótese a ser considerada, é a interação entre a ponteira do cantilever e o suporte metálico, a qual pode, também, influenciar no processo de obtenção da imagem pelo microscópio de força atômica, maximizando ou extrapolando as medidas dos parâmetros devido a interações secundárias.

O comportamento das RBCs, pelas análises de regressão linear e não linear, também demonstrou diferença na comparação do Raio Médio e do Volume, entre os três tipos de suporte (Fig. 62). Para a superfície de vidro, o Raio médio demonstrou crescimento médio linear das médias e o Volume apresentou curva de crescimento exponencial, conforme observado para 1ª Etapa, sendo que este fato já era esperado, pois as análises foram realizadas em condições semelhantes. Já o suporte de metal demonstrou, para o Raio Médio, uma curva de função polinomial quadrática, com tendência descendente, na comparação entre os tempos T0 e T5; enquanto o Volume apresentou curva de função polinomial cúbica, com diferenças significativas entre as medidas médias de T0 e de T5. O suporte de cerâmica demonstrou comportamento semelhante ao do metal, para a análise do Raio Médio. Porém, comportamento bastante distinto para a curva de regressão não linear do volume, com função polinomial de quarta ordem. Esses gráficos podem ser observados na Figura 62.

Strasser *et al.* (2007)<sup>[33]</sup> não compararam seus resultados, com outros tipos de suporte, porém, Wu *et al.* (2009)<sup>[47]</sup> testaram a deposição de manchas de sangue em superfícies de vidro e mica, analisando as alterações temporais das RBCs por um período de 35 dias. Pelas análises do grupo, foram observadas diferenças entre as medidas de volume das RBCs para os dois tipos de suporte, demonstrando também a influência das superfícies para análises de TSD por MFA.

Pelas análises desta pesquisa, a opção pelos três suportes testados, levou em consideração possíveis objetos presentes em cenas de crime, como, por exemplo, uma faca metálica ou a superfície de revestimento em cerâmica de uma residência. No estudo de Wu *et al.* (2009)<sup>[47]</sup>, a escolha da mica como suporte para teste forense parece não ter seguido qualquer critério de escolha para análise pericial. Esse tipo de situação, em que não se avalia possíveis cenários reais de cenas de crime, parece bem recorrente na literatura científica forense atual.

#### **5.1.4. Considerações sobre as alterações dos parâmetros celulares obtidos na 4ª Etapa – Análise das Curvas de Força×Distância, e condição ambiental não controlada**

A MFA tem sido utilizada para investigar as propriedades elásticas ou mecânicas das células biológicas<sup>[66]</sup>. A alteração nas propriedades biofísicas (por exemplo, morfologia e elasticidade) das RBCs representa um dos marcadores para saúde humana, diagnóstico, tratamento de doenças e outros. Porém, dentro das ciências forenses, a análise de curvas de Força×Distância para RBCs em manchas de sangue caracteriza uma interessante abordagem para investigações em cenas de crime<sup>[33]</sup>.

As curvas de Força×Distância representam um gráfico da interação da Força entre duas superfícies, sendo uma delas, a ponteira do cantilever e a outra, a superfície examinada<sup>[67]</sup>. Pelas análises dessas curvas, são obtidas as medidas do módulo de Young, o qual define o coeficiente básico de elasticidade material<sup>[68]</sup>. Nessa etapa, foi avaliada a elasticidade da membrana da RBC ao longo dos tempos T0 até T5.

Pela análise da Figura 66, foi possível observar que o módulo de Young médio, determinado na porção central da RBC, sofreu redução de suas medidas, entre os tempos T0 até T4, o que foi caracterizado pelo aumento da elasticidade e a redução da rigidez. Pelos dados obtidos da regressão não linear (Fig. 67) desse parâmetro, por meio da curva polinomial quadrática, foi possível observar uma tendência de queda até o tempo T3, com retomada no aumento do valor médio, dessa medida, para os tempos T4 e T5. Esse aumento da elasticidade da membrana das RBCs até o período compreendido entre 14° - 21° dia fora do corpo humano pode estar relacionado à alteração das proteínas das RBCs e principalmente às mudanças estruturais de seu citoesqueleto. Diferenças na elasticidade das células humanas já foram avaliadas por Lekka *et al.* (1999)<sup>[69]</sup> em estudos envolvendo células da bexiga normais e cancerosas, devido às transformações no citoesqueleto. Porém, o aumento da rigidez após o

período 14º - 21º dia pode ser explicado pela alteração da conformação lipídica da membrana celular das RBCs. Nesse sentido, estudos bioquímicos, já demonstraram que as alterações químicas na membrana das RBCs, especialmente na proporção entre os fosfolipídeos e o conteúdo de colesterol, podem levar ao aumento da rigidez da membrana celular em pacientes com diabetes mellitus<sup>[70]</sup>.

Strasser *et al.* (2007)<sup>[33]</sup> determinaram o módulo de Young da membrana das RBCs em um estudo conduzido em três intervalos de tempo: 1,5 h, 30 h e 31 dias. Os resultados encontrados na 4ª Etapa do presente estudo corroboram aquilo que já havia sido demonstrado pelo grupo de Strasser *et al.* (2007)<sup>[33]</sup>, demonstrando que a elasticidade dessas células sanguíneas aumenta, quando se tornam extracorpóreas. Esses resultados confirmam ainda, as análises obtidas também pelo grupo de Wu *et al.* (2009)<sup>[47]</sup>, o que torna, a medida da elasticidade das RBCs, um parâmetro que pode ser utilizado, como variável na aplicação de um método, para avaliação do TSD de manchas de sangue, principalmente por ser um método muito mais rápido que a aquisição de imagens.

## **5.2. Considerações sobre a aplicação da MFA como um método capaz de determinar o TSD em manchas de sangue e a sua aplicabilidade para locais de crime**

Cientistas forenses, por mais de cem anos, buscam encontrar uma metodologia que permita determinar o TSD de uma mancha de sangue depositada em uma superfície<sup>[33]</sup>. Louis Tomellini, em 1907, tornou-se pioneiro ao utilizar tabela de cores para classificar padrões de manchas de sangue<sup>[71]</sup>. Desde então, várias abordagens foram propostas, visando solucionar este importante quesito durante a investigação de uma cena de crime. Porém, até o momento, nenhum dos métodos desenvolvidos e aplicados pôde ser totalmente estabelecido e consolidado na prática forense<sup>[4]</sup>. Técnicas como aquelas citadas na Introdução do presente

estudo: Espectroscopia de Reflectância, Espectroscopia no Ultravioleta Visível – UV-Vis, Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica, Espectroscopia Raman, RT – PCR/qPCR (Análise de RNA), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE (HPLC), Microscopia de Força Atômica – MFA, têm sido apenas recentemente exploradas, na tentativa de suprir essa omissão. De fato, todas estas abordagens confirmam que as propriedades físicas e químicas de manchas de sangue mudam ao longo do tempo. No entanto, precisam ser mais exploradas e estudadas, visando aperfeiçoar sua precisão e sua reprodutibilidade para a determinação do TSD de manchas de sangue na prática forense<sup>[72]</sup>.

Pelo presente estudo, foi possível demonstrar o grande poder de mensuração e obtenção de dados com aplicabilidade forense da MFA. Além disso, essa técnica apresenta muitas vantagens bem conhecidas, tais como a sua operação não invasiva, o que o transforma em um método não destrutivo, além da sua fácil preparação das amostras. Estas características são bastante desejáveis para análise de vestígios, pois, diante das diversas fases de um processo penal, há grande possibilidade de reanálise de uma evidência, pelos atores envolvidos em litígios penais. Nos últimos anos até mesmo microscópios de força atômica portáteis vêm sendo desenvolvidos, o que pode representar mais uma característica desejável para análise de cenas de crime.

Além das análises morfológicas e biomecânicas, por meio de MFA, também é possível coletar informações, como eletromagnetismo e distribuição térmica de vestígios, por meio do uso de diferentes modos de operação<sup>[73]</sup>. A possibilidade de obtenção de imagens topográficas de materiais biológicos em 3D e a sua resolução em escala nanométrica representam, também, importantes características dessa técnica, as quais podem contribuir e aumentar o poder de captação em locais de crime.

A sensibilidade deste método foi bem evidenciada nas etapas deste trabalho, pois, para a obtenção dos dados analisados, foram utilizados apenas 1  $\mu\text{L}$  (um microlitro) de sangue para cada indivíduo. Quantidades, ainda, menores de sangue poderiam ser medidas por MFA.

Apesar das vantagens e características da técnica, para sua utilização nas práticas em locais de crime, outros estudos são necessários visando ao aprofundamento de sua aplicabilidade e reprodutibilidade. Por outro lado, de fato, o desenvolvimento de microscópios de força atômica compactos e portáteis já é cada vez mais real, principalmente com o avanço dos investimentos em instrumentos nanotecnológicos. A portabilidade desses instrumentos para locais de crime possivelmente representaria enorme avanço para análises periciais de vestígios.



## **6. CONCLUSÕES**

Os dados e análises obtidas no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

**6.1.** As análises do presente trabalho observaram transformações estatisticamente quantificáveis nas estruturas morfológicas das hemácias, sendo observado aumento linear médio dos parâmetros celulares: Diâmetro Máximo, Largura Padrão, Raio Médio, Perímetro, Área da Superfície e Volume, ao longo dos 28 dias de análise.

**6.2.** A exposição das hemácias em manchas de sangue aos ambientes de condições controladas e não controladas demonstrou diferenças significativas entre as medidas celulares obtidas para as duas condições. Tal observação demonstra que temperatura e umidade são fatores relevantes na análise do tempo desde a deposição de manchas de sangue.

**6.3.** Diferenças significativas foram observadas, também, entre os tipos de suporte (superfície) de deposição das manchas de sangue. Para os suportes testados no presente estudo (vidro, metal e cerâmica), o metal apresentou medidas maiores para os parâmetros 1D, 2D e 3D em comparação com as demais superfícies. Outra diferença observada foi o comportamento temporal linear e não linear dos parâmetros observados para os três suportes. Essas diferenças demonstram que o tipo de superfície, para deposição de uma mancha de sangue, deve ser considerado como fator relevante durante análises tempo-dependentes.

**6.4.** A utilização da espectroscopia de força na obtenção das curvas de Força×Distância para abordagem em ciências forenses demonstra possuir aplicabilidade prática para o cálculo do TSD de manchas de sangue, o aumento da

elasticidade da membrana plasmática das hemácias, seguido por um processo de rigidez nos tempos T4 e T5, durante os 28 dias de análise, representou um excelente parâmetro, para avaliação temporal, principalmente por ser um método mais rápido, quando comparado com a aquisição de imagens de MFA para obtenção dos parâmetros Diâmetro Máximo, Largura Padrão, Raio Médio, Perímetro, Área da Superfície e Volume.

**6.5.** Quanto a utilização dos mapas auto-organizáveis de Kohonen para os dados obtidos na 1ª Etapa, os resultados observados não foram tão satisfatórios, uma vez que as pequenas diferenças entre os tempos T0 até T5 não foram tão evidenciadas dentro dos 20 neurônios (*clusters*) aplicados pela rede SOM. Entretanto, apesar de ser uma aplicação pioneira para TSD de manchas de sangue e, ainda, sem precisão prática, essa abordagem mostrou uma interessante aplicabilidade forense. Outros estudos são necessários para aprofundar e ampliar esse método, buscando o aumento da população amostral, com a possibilidade estatística para ampla aplicação.



## **7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E LIMITAÇÕES**

A análise do local de crime ou do corpo de delito é o ponto de partida para uma investigação criminal. Nestes locais, quando ocorre um crime contra a vida, é comum observar a presença de manchas de sangue, sendo constante a presença desses vestígios nos crimes que envolvem o emprego de armas de fogo, armas brancas ou outros meios utilizados para causar lesão<sup>[14]</sup>

Vestígios biológicos encontrados em cenas de crime representam pistas importantes na identificação e posterior confirmação de possíveis suspeitos. Técnicas químicas e bioquímicas utilizadas para a análise de vestígios biológicos em cenas de crime são o principal apoio científico das investigações criminais e processos judiciais subsequentes<sup>[51]</sup>. A literatura forense dedica grande atenção para análises de manchas de sangue em locais de crime, principalmente, devido aos múltiplos diagnósticos que esses vestígios fornecem. Porém, a análise do TSD de manchas de sangue ainda não se transformou em uma prática corriqueira em locais de crime. Isso se deve, pois, os oito métodos citados na introdução desta pesquisa possuem apenas estudos pioneiros, e em fase inicial de desenvolvimento. Apesar da potencial capacidade de futura aplicação desses métodos em cenas de crime, outros estudos ainda precisam ser desenvolvidos visando aperfeiçoar as técnicas de aplicação desses métodos e a sua utilização, por peritos criminais, em locais de crime.

O objetivo principal do estudo foi avaliar o processo de modificação das RBCs em manchas de sangue, determinando se há algum padrão de transformação temporal. Ressalta-se, que o padrão encontrado nos resultados deste trabalho foi observado para o grupo populacional do presente estudo. Entretanto, a possibilidade de se transpor os resultados obtidos dessa amostra populacional, para apenas um indivíduo, fora desse grupo, não foi investigado nas análises deste trabalho (validação).

A utilização da MFA, durante as práticas corriqueiras de levantamentos periciais em locais de crime, ainda requer a ampliação e o desenvolvimento de estudos científicos para a

determinação de um método robusto, capaz de avaliar, com precisão, o TSD de manchas de sangue. Uma das principais dificuldades do presente trabalho foi a de encontrar estudos que abordassem de forma ampla e consistente a temática central aqui delimitada. Apesar das barreiras observadas, os resultados obtidos pelo presente trabalho apontam para a possibilidade futura de aplicação da MFA na obtenção de medidas celulares de 1D, 2D, 3D e AD para a determinação do TSD em manchas de sangue, visando finalidades periciais. Porém, considera-se importante a realização de estudos comparativos para análises de manchas de sangue, em função do tempo, visando identificar os padrões populacionais e os principais interferentes, tais como doenças que afetam as propriedades morfológicas e biomecânicas das células sanguíneas. Também é importante determinar a extensão das variações entre as análises tempo-dependentes dos diferentes indivíduos.



## **8. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS**

1. JAMES, Stuart H.; KISH, Paul E.; SUTTON, T. Paulette. **Principles of bloodstain pattern analysis: theory and practice**. Boca Raton: CRC Press. p. 7 e p. 369–389. 2005.
2. VELHO, Jesus Antônio; COSTA, Karina Alves; DAMASCENO, Clayton Tadeu Mota. **Locais de crime – Dos vestígios à dinâmica criminosa**. Campinas, SP: Millennium Editora. p. 3-26; p. 83-123. 2013.
3. GARDNER, Ross M. **Practical crime scene processing and investigation**. Boca Raton: CRC Press LLC, p. 267-312. 2004.
4. BREMMER, Rolf H. *et al.* Forensic quest for age determination of bloodstains. **Forensic Science International**, v. 216, n. 1-3, p. 1-11, 2012.
5. BREMMER, Rolf H. *et al.* Age estimation of blood stains by hemoglobin derivative determination using reflectance spectroscopy. **Forensic Science International**, v. 206, n. 1, p. 166-171, 2011.
6. CHEN, Yong; CAI, Jiye. Membrane deformation of unfixed erythrocytes in air with time lapse investigated by tapping mode atomic force microscopy. **Micron**, v. 37, n. 4, p. 339-346, 2006.
7. LI, Bo *et al.* The estimation of the age of a blood stain using reflectance spectroscopy with a microspectrophotometer, spectral pre-processing and linear discriminant analysis. **Forensic Science International**, v. 212, n. 1, p. 198-204, 2011.

8. WEYERMANN, Céline; ROUX, Claude; CHAMPOD, Christophe. Initial results on the composition of fingerprints and its evolution as a function of time by GC/MS analysis. **Journal of Forensic Sciences**, v. 56, n. 1, p. 102-108, 2011.
  
9. RIBAUX, O. *et al.* Intelligence-led crime scene processing. Part II: Intelligence and crime scene examination. **Forensic Science International**, v. 199, p. 63–71, 2010.  
In: BARROS, R. M. **Análise morfométrica de impressões palmares latentes em função do tempo: uma contribuição para a prática forense**. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Universidade de Brasília - UnB, 2013.
  
10. RIBAUX, O.; MARGOT, P. Inference structures for crime analysis and intelligence: the example of burglary using forensic science data. **Forensic Science International**, v. 100, n. 3, p. 193-210, 1999.
  
11. JULIAN, Roberta; KELTY, Sally; ROBERTSON, James. Get it right the first time: Critical issues at the crime scene. **Current Issues in Criminal Justice**, v. 24, p. 25, 2012.
  
12. ALMEIDA, Eduardo Carvalho *et al.* **Noções de perícia criminal e o vestígio entomológico na estimativa do IPM**. In: GOMES, Leonardo (Org). **Entomologia Forense: novas tendências e tecnologias nas ciências criminais**. 1ª ed. – Rio de Janeiro: Technical Books, p. 137, 2010.

13. HARRIS, Ryan. Arriving at an anti-forensics consensus: Examining how to define and control the anti-forensics problem. **Digital Investigation**, v. 3, p. 44-49, 2006.
14. DOREA, Luiz Eduardo; QUINTELA, Victor; STUMVOLL, Victor Paulo; organizador: Domingos Tocchetto. **Criminalística**. 5<sup>a</sup> Ed. Campinas, SP: Millennium Editora, p. 9-10, 2010.
15. CHEN, Yung-fou. Forensic Applications of Nanotechnology. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 58, n. 6, p. 828-835, 2011.
16. GRANDBOIS, Michel *et al.* Affinity imaging of red blood cells using an atomic force microscope. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, v. 48, n. 5, p. 719-724, 2000.
17. YAMASHINA, S.; KATSUMATA, O. Structural analysis of red blood cell membrane with an atomic force microscope. **Journal of Electron Microscopy**, v. 49, n. 3, p. 445-451, 2000.
18. BINNIG, Gerd; QUATE, Calvin F.; GERBER, Ch. Atomic force microscope. **Physical Review Letters**, v. 56, n. 9, p. 930, 1986.
19. SHARMA, Shivani; GIMZEWSKI, James K. Application of AFM to the Nanomechanics of Cancer. **MRS Advances**, v. 1, n. 25, p. 1817-1827, 2016.

20. LEKKA, M.; LAIDLER, P. Applicability of AFM in cancer detection. **Nature nanotechnology**, v. 4, n. 2, p. 72-72, 2009.
21. CROSS, Sarah E. *et al.* AFM-based analysis of human metastatic cancer cells. **Nanotechnology**, v. 19, n. 38, p. 384003, 2008.
22. LAMZIN, I. M.; KHAYRULLIN, R. M. The Quality Assessment of Stored Red Blood Cells Probed Using Atomic-Force Microscopy. **Anatomy Research International**, v. 2014, p. 1-5, 2014.
23. HERRMANN, Paulo S. P. *et al.* Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 97, p. 51-61, 1997.
24. GIRASOLE, M. *et al.* Artificially induced unusual shape of erythrocytes: an atomic force microscopy study. **Journal of Microscopy**, v. 204, n. 1, p. 46-52, 2001.
25. KUZNETSOVA, Tatyana G. *et al.* Atomic force microscopy probing of cell elasticity. **Micron**, v. 38, n. 8, p. 824-833, 2007.
26. HEKELE, O.; GOESSELSBERGER, C. G.; GEBESHUBER, I. C. Nanodiagnostics performed on human red blood cells with atomic force microscopy. **Materials Science and Technology**, v. 24, n. 9, p. 1162-1165, 2008.

27. PARSHINA, E. Yu *et al.* Combined Raman and atomic force microscopy study of hemoglobin distribution inside erythrocytes and nanoparticle localization on the erythrocyte surface. **Laser Physics Letters**, v. 10, n. 7, p. 075607, 2013.
28. VIITALA, J.; JÄRNEFELT, J. The red cell surface revisited. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 10, n. 10, p. 392-395, 1985.
29. STECK, Theodore L. The organization of proteins in the human red blood cell membrane: a review. **The Journal of cell biology**, v. 62, n. 1, p. 1, 1974.
30. NOWAKOWSKI, Robert; LUCKHAM, Paul; WINLOVE, Peter. Imaging erythrocytes under physiological conditions by atomic force microscopy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1514, n. 2, p. 170-176, 2001.
31. KASAS, Sandor; KHANMY-VITAL, Aita; DIETLER, Giovanni. Examination of line crossings by atomic force microscopy. **Forensic Science International**, v. 119, n. 3, p. 290-298, 2001.
32. SILVA, Rafaela Rogiski da. *et al.* Luminol in the forensic science. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4: p. 172-177, Nov. 2012.
33. STRASSER, Stefan *et al.* Age determination of blood spots in forensic medicine by force spectroscopy. **Forensic Science International**, v. 170(1), p. 8-14, 2007.

34. BUNN, Franklin H.; FORGET, Bernard G. **Hemoglobin: Molecular, Genetic, and Clinical Aspects**. W.B. Saunders Company, Philadelphia, p. 634-662, 1986.
35. BARNI, Filippo *et al.* Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection – Review. **Talanta**, v. 72, n. 3, p. 896-913, 2007.
36. MARRONE, April; BALLANTYNE, Jack. Changes in dry state hemoglobin over time do not increase the potential for oxidative DNA damage in dried blood. **PLoS one**, v. 4, n. 4, p. e5110, 2009.
37. VOET, Donald; VOET, Judith G.; PRATT, Charlotte W. **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular**. 2 ed. – Porto Alegre: Artmed, p. 182-200, 2008.
38. HANSON, Erin K.; BALLANTYNE, Jack. A blue spectral shift of the hemoglobin soret band correlates with the age (time since deposition) of dried bloodstains. **PLoS One**, v. 5, n. 9, p. e12830, 2010.
39. FUJITA, Yoshihiko *et al.* Estimation of the age of human bloodstains by electron paramagnetic resonance spectroscopy: long-term controlled experiment on the effects of environmental factors. **Forensic Science International**, v. 152, n. 1, p. 39-43, 2005.

40. BOYD, Samantha; BERTINO, Massimo F.; SEASHOLS, Sarah J. Raman spectroscopy of blood samples for forensic applications. **Forensic Science International**, v. 208, n. 1, p. 124-128, 2011.
41. DOTY, Kyle C.; MCLAUGHLIN, Gregory; LEDNEV, Igor K. A Raman “spectroscopic clock” for bloodstain age determination: the first week after deposition. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 15, p. 3993-4001, 2016.
42. ANDERSON, Stacey *et al.* A method for determining the age of a bloodstain. **Forensic Science International**, v. 148, n. 1, p. 37-45, 2005.
43. ALROWAITHI, Majid A.; MCCALLUM, Nicola A.; WATSON, Nigel D. A method for determining the age of a bloodstain. **Forensic Science International**, v. 234, p. e30, 2014.
44. ANDERSON, Stacey E.; HOBBS, Gerald R.; BISHOP, Clifton P. Multivariate analysis for estimating the age of a bloodstain. **Journal of Forensic Sciences**, v. 56, n. 1, p. 186-193, 2011.
45. ANDRASKO, Jan. The estimation of age of bloodstains by HPLC analysis. **Journal of Forensic Science**, v. 42, n. 4, p. 601-607, 1997.

46. INOUE, Hiroyuki *et al.* A new marker for estimation of bloodstain age by high performance liquid chromatography. **Forensic science international**, v. 57, n. 1, p. 17-27, 1992.
47. WU, Yangzhe *et al.* Time-dependent surface adhesive force and morphology of RBC measured by AFM. **Micron**, v. 40, n. 3, p. 359-364, 2009.
48. THANAKIATKRAI, Phuvadol; YAODAM, Alisa; KITPIPIT, Thitika. Age estimation of bloodstains using smartphones and digital image analysis. **Forensic Science International**, v. 233, n. 1, p. 288-297, 2013.
49. SHIN, Joonchul *et al.* Smart Forensic Phone: Colorimetric analysis of a bloodstain for age estimation using a smartphone. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 243, p. 221-225, 2017.
50. ARANY, Szilvia; OHTANI, Susumu. Age estimation of bloodstains: A preliminary report based on aspartic acid racemization rate. **Forensic Science International**, v. 212, n. 1, p. e36-e39, 2011.
51. ACKERMANN, Katrin; BALLANTYNE, Kaye N.; KAYSER, Manfred. Estimating trace deposition time with circadian biomarkers: a prospective and versatile tool for crime scene reconstruction. **International Journal of Legal Medicine**, v. 124, n. 5, p. 387-395, 2010.

52. AGUDELO, Juliana; HUYNH, Crystal; HALÁMEK, Jan. Forensic determination of blood sample age using a bioaffinity-based assay. **Analyst**, v. 140, n. 5, p. 1411-1415, 2015.
53. RISTENBATT III, Ralph R. Review of: Bloodstain Pattern Analysis with an Introduction to Crime Scene Reconstruction. **Journal of Forensic Sciences**, v. 54, n. 1, p. 234-234, 2009.
54. BEVEL, Tom; GARDNER, Ross M. **Bloodstain pattern analysis with an introduction to crime scene reconstruction**. 3 ed. Boca Raton: CRC Press, p. 37-43, 2008.
55. FISHER, Barry AJ. **Techniques of crime scene investigation**. 7 ed. Boca Raton: CRC Press, 7<sup>a</sup> ed., p. 201, 2012.
56. VILELA JUNIOR, G. B. *et al.* Objetividade e subjetividade: desafios no processo de validação do instrumento qualidade de vida e da saúde (QVS-80). **Qualidade de vida, esporte e sociedade**, v. 3, p. 59-62, 2007.
57. WMA - World Medical Association. Declaration of Helsinki, amended by 59th WMA General Assembly. Seoul, October (2008). Disponível em <http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/17c.pdf> (acessado em 10 de outubro de 2016).

58. RAMOS, Andrea Malheiros; DOS SANTOS, Luiz André Rodrigues; FORTES, Lauro Tadeu Guimarães (Ed.). **Normais climatológicas do Brasil, 1961-1990**. 2009.
59. GADEGAARD, N. Atomic force microscopy in biology: technology and techniques. **Biotechnic & Histochemistry**, v. 81, n. 2-3, p. 87-97, 2006.
60. SHIMADZU CORPORATION, Analytical & Measuring Instruments Division. **Manual de instruções – Software de análise de partículas**. Modelo 305-26118B. Versão 3.74. Quioto, Japão, 2007.
61. SHIMADZU CORPORATION, Analytical & Measuring Instruments Division. **Manual de instruções – Scanning Probe Microscope**. Modelo 305-26116. Quioto, Japão, 2005.
62. BIDARRA, Rui Manuel Proença. **Determinação de perfis de consumo baseada em mapas de Kohonen Modificados**. 2013. 108 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Eletrotécnica e de Computadores) – Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto, Porto – Portugal. 2013.
63. COSTA, José Alfredo Ferreira; ANDRADE NETTO, Márcio Luiz de. Segmentação de mapas auto-organizáveis com espaço de saída 3-D. **SBA: Controle & Automação Sociedade Brasileira de Automática**, v. 18, n. 2, p. 150-162, 2007.

64. HORTOLÀ, Policarp. SEM examination of human erythrocytes in uncoated bloodstains on stone: use of conventional as environmental-like SEM in a soft biological tissue (and hard inorganic material). **Journal of Microscopy**, v. 218, n. 2, p. 94-103, 2005.
65. CURLEY, R. C.; SILVA, L. P. Quantitative Scanning Condition Effects on Atomic Force Microscopy Measurements of Human Red Blood Cells. **Advanced Science Letters**, v. 4, n. 11-12, p. 3637-3643, 2011.
66. BREMMELL, Kristen E.; EVANS, Allan; PRESTIDGE, Clive A. Deformation and nano-rheology of red blood cells: An AFM investigation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 50, n. 1, p. 43-48, 2006.
67. BURNHAM, N. A.; COLTON, R. J.; POLLOCK, H. M. Interpretation of force curves in force microscopy. **Nanotechnology**, v. 4, n. 2, p. 64, 1993.
68. RADMACHER, Manfred. Measuring the elastic properties of biological samples with the AFM. **IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine**, v. 16, n. 2, p. 47-57, 1997.
69. LEKKA, M. *et al.* Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy. **European Biophysics Journal**, v. 28, n. 4, p. 312-316, 1999.

70. BRYCZEWSKA, Maria; WATALA, Cezary; TORZECKA, Wieslawa. Changes in fluidity and composition of erythrocyte membranes and in composition of plasma lipids in type I diabetes. **British Journal of Haematology**, v. 62, n. 1, p. 111-116, 1986.
  
71. TOMELLINI, Louis. De l'emploi d'une table chromatique pour les taches du sang. **Archives D'antropologie Criminelle de Criminologie**, v. 14, n. 2, 1907.
  
72. BREMMER, Rolf H. et al. Biphasic oxidation of oxy-hemoglobin in bloodstains. **PloS one**, v. 6, n. 7, p. e21845, 2011.
  
73. CHEN, Syuan-Zhen; TSAI, Tung-Lin; CHEN, Yung-Fou. Forensic application of atomic force microscopy—Questioned Document. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 59, n. 3, p. 283-288, 2012.

# **ANEXO I**

**Questionário QVS-80 (adaptado)**

## QUESTIONÁRIO SOBRE AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DE VIDA E DA SAÚDE - QVS

### (ADAPTAÇÃO DO TESTE QVS-80)

Este é um questionário sobre sua qualidade de vida e saúde. **ATENÇÃO:** você não precisa escrever o seu nome neste questionário. As suas respostas são anônimas e serão mantidas em sigilo. Por favor, responda todas as questões. Em caso de dúvida, pergunte ao instrutor.

O presente questionário pertence à pesquisa: “**Avaliação de padrões em escala nanométrica para o envelhecimento de manchas de sangue: uma contribuição para as práticas Forenses**”, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília – UnB.

### COLABORADOR n°

INFORMAÇÕES PESSOAIS	
<b>Idade (anos):</b> _____ <b>Peso (kg):</b> _____ <b>Altura (m):</b> _____	<b>Tipo sanguíneo:</b> _____ <b>Fator Rh (+ ou -):</b> _____
<b>1. Sexo:</b> ① Masculino    ② Feminino	
<b>2. Qual o seu Estado civil:</b> ① Solteiro(a)    ② Casado(a)/Vivendo com parceiro    ③ Divorciado(a)/Separado(a)    ④ Viúvo	
<b>3. Marque abaixo qual(is) doença(s) você apresenta atualmente:</b> ① Nenhuma doença    ② Diabetes    ③ Colesterol alto    ④ Asma/Bronquite/Rinite    ⑤ Pressão alta	
<b>4. Além das doenças citadas acima você apresenta alguma dessas outras doenças:</b> ① Nenhuma doença    ② Triglicerídeos altos    ③ da tireoide    ④ Câncer    ⑤ cardíacas e circulatórias	
<b>5. Além das doenças citadas nas perguntas acima você apresenta alguma dessas outras doenças:</b> ① Nenhuma doença    ② Anemias    ③ Hematocitose    ④ Talassemia    ⑤ Gripe	
<b>6. Seus familiares (pai, mãe, irmãos, avôs) apresentam ou faleceram por alguma das doenças abaixo:</b> ① Nenhuma doença    ② Diabetes    ③ Colesterol alto    ④ Asma/Bronquite/Rinite    ⑤ Pressão alta	
<b>7. Seus familiares (pai, mãe, irmãos, avôs) apresentam ou faleceram por alguma dessas outras doenças listadas abaixo:</b> ① Nenhuma doença    ② Triglicerídeos altos    ③ da tireoide    ④ Câncer    ⑤ cardíacas e circulatórias	

<b>ESTILO DE VIDA E SAÚDE</b>
<b>8. Como está sua saúde atualmente?</b> ①Excelente    ②Boa    ③Regular    ④Ruim    ⑤Muito ruim
<b>9. Como você considera a qualidade do seu sono?</b> ①Excelente    ②Boa    ③Regular    ④Ruim    ⑤Muito ruim
<b>10. Qual a duração média do seu sono?</b> ①Mais de 8 hs    ②7 a 8 hs    ③6 a 7 hs    ④5 a 6 hs    ⑤Menos de 5 hs
<b>11. Em relação ao cigarro:</b> ①Nunca fumei    ②Parei a mais de 2 anos    ③Parei de 1 ano a menos de 2 anos    ④Parei há menos de 1 ano    ⑤Sou fumante
<b>14. Se você é fumante, quantos cigarros você fuma por dia?</b> ①Não sou fumante    ②Menos de 5    ③5 a 14    ④15 a 20    ⑤Mais de 20 cigarros
<b>15. Em uma semana normal, quantas “doses” de bebidas alcoólicas você bebe? (1 dose = ½ garrafa de cerveja, 1 copo de vinho ou 1 dose de uísque/conhaque/cachaça):</b> ①Não bebo    ②1 a 4 doses    ③5 a 9 doses    ④10 a 13 doses    ⑤14 ou mais doses
<b>16. Você pratica exercícios físicos regularmente?</b> ①Muito frequentemente    ②frequentemente    ③ Às vezes    ④ Muito raramente    ⑤Nunca
<b>17. Há quanto tempo você pratica atividades físicas regulares?</b> ①Mais de 2 anos    ②de 1 a 2 anos    ③de 3 a 12 meses    ④Menos de 3 meses    ⑤Não pratico
Adaptado de: LEITE, N.; VILELA JÚNIOR, G.; CIESLAK, F.; ALBUQUERQUE, A.; - Questionário de Avaliação da Qualidade de Vida e da Saúde – QVS-80. In: MENDES, R. e LEITE, N. – Ginástica Laboral: Princípios e Aplicações Práticas. Barueri (SP): Manole, 2008.

# **ANEXO II**

**Parecer Consustanciado CEP/FM/UnB**

UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de padrões em escala nanométrica para o envelhecimento de manchas de sangue: uma contribuição para as práticas Forenses

**Pesquisador:** Douglas Rodrigues Cavalcanti

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 57964516.5.0000.5558

**Instituição Proponente:** Instituto de Biologia da Universidade de Brasília

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.755.017

#### Apresentação do Projeto:

O projeto de pesquisa apresenta a possibilidade da nanotecnologia auxiliar as ciências forenses na análise e na detecção de provas em nanoescala. Dessa forma, vestígios que não puderam ser recolhidos anteriormente ou mesmo considerados, devido aos limites de detecção dos instrumentos empregados pelos investigadores, poderiam por meio da nanotecnologia serem utilizados para subsidiar investigações criminais. O estabelecimento de uma idade estimada das manchas de sangue, por exemplo, pode ser a primeira evidência para os investigadores forenses do momento que um crime foi cometido. Até o momento, a microscopia óptica e a eletrônica têm sido amplamente aplicadas em ciências forenses. Recentemente, há também disponíveis a microscopia de força atômica (AFM) bem como a espectroscopia Raman, que podem ter maior sensibilidade e especificidade para análise do tempo de deposição das manchas de sangue secas.

As amostras de sangue a serem utilizadas no projeto serão obtidas de 10 pessoas (indivíduos saudáveis), sendo 05 do sexo masculino e 05 do feminino, ambos com mesma faixa etária. Serão também coletados dados sobre a idade, a saúde do indivíduo, o eventual consumo de remédios, o consumo de cigarros, a prática de esportes e o seu hábito alimentar.

Será necessário coletar de cada paciente 10 microlitros de sangue cuja obtenção da amostra será

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.910-900

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3107-1918

**E-mail:** fmd@unb.br

Continuação do Parecer: 1.755.017

realizada pela punção capilar do dedo.

A partir das amostras de sangue humano, serão geradas manchas de sangue por esfregaço ou gotejamento em três diferentes suportes de diferentes materiais, a saber:: cerâmica, metal e vidro. Os suportes possuirão o formato comum de lâminas para análises laboratoriais. A divisão das amostras de sangue em diferentes suportes é importante para aproximar os experimentos em laboratório das práticas forenses de locais de crime. As manchas de sangue serão depositadas

sobre os suportes, imediatamente após o seu recolhimento dos indivíduos doadores selecionados para as análises.

As manchas de sangue, depois de depositadas sobre os diferentes suportes, permanecerão em processo de secagem, em temperatura média de 21°C e umidade relativa média de 65% (ambos os parâmetros previstos para Brasília/DF, em dados observados do Instituto Nacional de Meteorologia – INMET17).

De acordo com os autores, a execução do projeto contará principalmente com a infraestrutura e equipamentos disponibilizados pelo Laboratório de Espectrometria de Massa – Sala de Nanobiotecnologia, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, coordenado pelo professor/pesquisador orientador Luciano Paulino da Silva. Os reagentes e outros materiais serão disponibilizados por parte da equipe na qual a pesquisa será realizada. A Superintendência de Polícia Técnico-Científica de Goiás – SPTC/GO poderá atuar, também, no fornecimento de equipamentos, materiais de coleta e reagentes para pesquisa científica.

### **Objetivo da Pesquisa:**

Objetivo Primário:

Analisar os padrões nanométricos de envelhecimento em manchas de sangue secas, mediante análises de transformação das hemácias, em um gradiente de tempo, quando depositadas em diferentes superfícies, aplicando a microscopia de força atômica – MFA associada à espectroscopia Raman.

Objetivos Secundários:

- Avaliar o processo de modificação das hemácias em manchas de sangue, determinando se há algum padrão de transformação temporal, e se esse padrão pode ser aplicado em locais de crime;
- Testar se o processo de modificação das hemácias em manchas de sangue secas possui um processo de transformação temporal convergente entre diferentes indivíduos humanos;
- Testar diferentes superfícies (suportes) para a deposição de manchas de sangue, buscando avaliar se há alguma variação nos processos de envelhecimento de manchas de sangue;
- Aplicar a técnica da microscopia de força atômica – MFA integrada à espectroscopia Raman para

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.910-900

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3107-1918

**E-mail:** fmd@unb.br

Continuação do Parecer: 1.755.017

avaliação em alta resolução das características nanoestruturais, nanomecânicas e moleculares das manchas de sangue depositadas em diferentes suportes, buscando verificar os possíveis padrões de envelhecimento dessas manchas, e se os suportes apresentam alguma influência sobre o padrão de envelhecimento;

- Analisar se o padrão de vida de um indivíduo pode influenciar no processo de envelhecimento de manchas de sangue, comparando, mediante a aplicação de questionários, o estilo de vida de indivíduos doadores com as análises de microscopia de força atômica – MFA integrada à espectroscopia Raman.

- Comparar e confrontar a aplicação da técnica de microscopia de força atômica – MFA acoplado à espectroscopia Raman com as práticas corriqueiras de levantamentos de locais de crime, visando determinar se a técnica de análise da transformação temporal de hemácias em manchas de sangue é passível de aplicação na prática forense.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Os autores garantem que não há riscos associados à condução do projeto de pesquisa. E como benefícios destacam que a aplicação da técnica para análise de locais de crime podem auxiliar na confecção de laudos periciais, inquéritos policiais e na formação da convicção do magistrado.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é muito relevante. Embora a técnica de coleta de amostragem seja simples e a quantidade de sangue seja bem pequena (10 microlitros) seria interessante descrever no projeto e no termo de consentimento de que forma será feito o procedimento (anti-sepsia local, agulha estéril e descartável, tamanho da agulha) e por quem (profissional capacitado).

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória estão todos presentes. Porém, é necessário adequar a planilha orçamentária ao projeto de pesquisa. Foi utilizado um modelo de planilha apenas, mas nela deve constar, por exemplo, a descrição dos reagentes que poderão ser utilizados, com seu respectivo valor, e fonte de recursos.

#### **Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

De acordo com a análise do projeto de pesquisa, sugiro que seja melhor esclarecido a técnica de obtenção das amostras de sangue e que seja apresentada uma planilha orçamentária com os itens que serão utilizados ou necessários para o desenvolvimento da pesquisa.

#### **Considerações Finais a critério do CEP:**

Projeto apreciado na Reunião Ordinária do CEP-FM-UnB. Após apresentação do parecer do Relator

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

**UNB - FACULDADE DE  
MEDICINA**



Continuação do Parecer: 1.755.017

(a, aberta a discussão para os membros do Colegiado. O projeto foi Aprovado por unanimidade.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_651759.pdf	12/07/2016 15:29:43		Aceito
Folha de Rosto	01_Folha_de_rosto2.pdf	12/07/2016 15:28:07	Douglas Rodrigues Cavalcanti	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	05_TCLE_novo.pdf	11/07/2016 17:03:31	Douglas Rodrigues Cavalcanti	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Luciano_P_Silva.pdf	11/07/2016 17:02:31	Douglas Rodrigues Cavalcanti	Aceito
Outros	Curriculo_Lattes_Douglas_Cavalcanti.pdf	11/07/2016 17:01:33	Douglas Rodrigues Cavalcanti	Aceito
Orçamento	07_Modelo_de_planilha_orcamentaria.pdf	05/07/2016 12:55:03	Douglas Rodrigues Cavalcanti	Aceito
Outros	06_Questionario_Adaptado.pdf	05/07/2016 12:54:39	Douglas Rodrigues Cavalcanti	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	04_Projeto_Douglas_Comite.pdf	05/07/2016 12:48:35	Douglas Rodrigues Cavalcanti	Aceito
Outros	03_Carta_de_responsabilidade.pdf	05/07/2016 12:48:01	Douglas Rodrigues Cavalcanti	Aceito
Outros	02_Carta_de_encaminhamento.pdf	05/07/2016 12:46:51	Douglas Rodrigues Cavalcanti	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 30 de Setembro de 2016

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:**  
**Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Universidade de Brasília, Campus Universitário Darcy Ribeiro - Faculdade de Medicina  
**Bairro:** Asa Norte **CEP:** 70.910-900  
**UF:** DF **Município:** BRASILIA  
**Telefone:** (61)3107-1918 **E-mail:** fmd@unb.br

# **ANEXO III**

**TCLE – CEP/FM/UnB**



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

1. Você está sendo convidado para participar da pesquisa: Avaliação de padrões em escala nanométrica para o envelhecimento de manchas de sangue: uma contribuição para as práticas Forenses;
2. Você foi selecionado e sua participação não é obrigatória;
3. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento;
4. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição;
5. Os objetivos deste estudo são: Analisar os padrões nanométricos de envelhecimento em manchas de sangue secas, mediante análises de transformação das hemácias, em um gradiente de tempo, quando depositadas em diferentes superfícies, aplicando a microscopia de força atômica – MFA associada à espectroscopia Raman;
6. Sua participação nesta pesquisa consistirá na doação de 10 µl (microlitros) de sangue periférico através de punção capilar do dedo;
7. Os riscos relacionados com sua participação são: não há riscos pessoais;
8. Os benefícios relacionados com a sua participação são: não há benefícios pessoais;
9. As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação;
10. Seus dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Seus dados pessoais não serão coletados, você não é obrigado(a) a informar seu nome ou qualquer tipo de dado que possa te identificar pessoalmente;
11. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone e o endereço do pesquisador principal, podendo tirar suas dúvidas sobre o Projeto de Pesquisa de sua participação, agora ou a qualquer momento.

a) **DADOS DO PESQUISADOR:**

Nome: Douglas Rodrigues Cavalcanti

---

Assinatura

Endereço:

Telefone:

Email:



## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - TCLE

b) **CONTATO - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP-FM/UNB:**

**Telefone:** (61) 3107-1918

**Email:** cepfm@unb.br

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

Brasília, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Sujeito da pesquisa \*

\_\_\_\_\_  
Pai / Mãe ou Responsável Legal