

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ANDRÉ BARBOSA
CIRURGIÃO-DENTISTA

**“COMPARAÇÃO ENTRE OS CRISTAIS DE TEICHMANN NO
SANGUE HUMANO E DE ANIMAIS E SUA IMPORTÂNCIA
PERICIAL”.**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Mestre em
Odontologia Legal e Deontologia

PIRACICABA-SP
2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

465 5100015 597

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

ANDRÉ BARBOSA
CIRURGIÃO-DENTISTA

**“COMPARAÇÃO ENTRE OS CRISTAIS DE TEICHMANN DO
SANGUE HUMANO E DE ANIMAIS E SUA IMPORTÂNCIA
PERICIAL”.**

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG-036/83
CCPG, 04/07/90

Assinatura do Orientador

Orientador: Prof. Dr. ROBERTO JOSÉ GONÇALVES

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba, da
Universidade Estadual de Campinas,
para obtenção do grau de Mestre em
Odontologia Legal e Deontologia

PIRACICABA-SP

2000



UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

UNIDADE	B e
N.º CHAMADA	T/unicamp
	B234c
	E.
COMBO B.	42703
PROC.	161278100
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/10/00
N.º CPD	

CM-00146976-0

115 ID 276918

Ficha Catalográfica

B234c	<p>Barbosa, André.</p> <p>Comparação entre os cristais de Teichmann do sangue humano e de animais e sua importância pericial. / André Barbosa. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2000.</p> <p>74p. : il.</p> <p>Orientador : Prof. Dr. Roberto José Gonçalves.</p> <p>Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>I. Odontologia legal. I. Gonçalves, Roberto José. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p>
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Mariene Girello CRB / 8 – 6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de MESTRADO, em sessão pública realizada em 26 de Abril de 2000, considerou o candidato ANDRÉ BARBOSA aprovado.

1. Prof. Dr. ROBERTO JOSÉ GONÇALVES

2. Prof. Dr. NELSON MASSINI

3. Prof. Dr. EDUARDO DARUGE

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**Homenagem ao prof.
Eduardo Daruge, pois com
trabalho e dedicação em
favor da Odontologia
Legal conseguiu cativar a
admiração e o respeito da
comunidade acadêmica.**

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

**Agradecimento especial ao
Prof. e orientador Dr.
Roberto José Gonçalves pela
paciência e dedicação.**

**Agradecimento ao Prof. Nelson
Massini, exemplo de dedicação
e amor à ciência.**

**Gratidão também aos Profs. Luis
Renato Costa, Romildo Rabbi, Glicio
da Cruz e José Carlos, pela acolhida,
confiança e oportunidade de
trabalhar no D.M.L. de Vitória.**

Aos meus pais Altamir L. Barbosa e Dinea Barbosa exemplos de amor e honestidade.

À minha esposa Ivalcira N. Raymundo pelo incentivo e colaboração.

À CAPES cujo financiamento foi decisivo na elaboração deste trabalho.

Aos amigos do Departamento de Criminalística de Vitória, Asdrúbal Norbim, José P. Coradini, Maria Angela de Resende, Antônio C. Trancoso e Humberto de Oliveira Souza, pela compreensão e companheirismo.

AGRADECIMENTOS:

Aos professores e engenheiros Rogério Queiroz, Maxsuel Marcos Rocha Pereira e Hermes Vazzoler Júnior que colaboraram com a medição dos ângulos.

Ao médico veterinário Dr. Marcelo Athadeu que coletou as amostras de sangue.

À professora Áurea Scárdua Saad Cavalcanti, responsável pelo Departamento de Histologia da Faculdade de Farmácia e Bioquímica do Espírito Santo, que colaborou com as fotografias das lâminas.

A Alan Barbosa e Renan Fracalossi que me ajudaram na confecção dos gráficos, figuras e tabelas.

Às peritas toxicologistas do Departamento Médico Legal de Vitória, Dr^{as}. Josidéia Barreto Mendonça, Marcela Fafá de Oliveira, Maria das Graças Correa de Faria, Maria do Carmo Frechiani, Nivalda Borba Sant'Ana, Raquel Hastenreiter dos Santos e Tânia Mara Pioroti, pela ajuda durante a confecção das lâminas.

Aos amigos da FOP, Luís Franceschini Junior, Célia R. Manesco e Dinoly A. Lima que colaboraram com a bibliografia.

À bibliotecária Heloísa Ceccotti, à Érica A. Pinho e Sônia M. Lordello, da pós-graduação, pela orientação na montagem do trabalho.

Às professoras de inglês Christine Santana de Almeida e Giovanna Ferreira Miranda, pela ajuda nas traduções dos textos.

*“ Se o sol pudesse ver
tudo o que ia acontecer
Talvez não nascesse
aquele dia*

*Se as orações das mães
tivessem sido ouvidas
Nada disso acontecia*

*Mas naquele dia até
Deus se escondeu
Não quis ouvir
pedidos de socorro
A voz da razão sumiu
Quando a polícia civil
Subiu o morro...”*

Herbert Vianna

SUMÁRIO:

Página:

Lista de Elementos e Fórmulas Químicas.....	01
Lista de Figuras.....	03
Lista de Gráfico.....	03
Listra de Espectro.....	03
Lista de Tabela.....	04
Resumo.....	05
Abstract.....	07
1 - Introdução.....	09
2 - Revisão da Literatura.....	15
2.1- Estudo do Sangue.....	27
2.1.1- Definição de Sangue.....	27
2.1.2- Sistema Circulatório.....	27
2.1.3- Constituição do Sangue.....	30
2.1.4- Estrutura da Hemoglobina.....	40

2.1.5- Estudo dos Cristais de Hemina.....	45
3 - Proposição.....	51
4 - Material e Métodos.....	53
4.1- Materiais Utilizados.....	53
4.2- Metodologia.....	53
5 - Resultados.....	57
6 - Discussão dos Resultados.....	63
7 – Conclusões.....	67
- Referência Bibliográfica.....	69
- Bibliografia.....	73

LISTA DE ELEMENTOS E FÓRMULAS QUÍMICAS

H.....	Hidrogênio
N.....	Nitrogênio
Br.....	Bromo
I.....	Iodo
Cl.....	Cloro
Mg.....	Magnésio
Ag.....	Prata
Cu.....	Cobre
Co.....	Cobalto
Ni.....	Níquel
Zn.....	Zinco
O ₂	Oxigênio
CO.....	Monóxido de Carbono
Fe.....	Ferro
Fe ⁺⁺	Ferro Divalente
Fe ⁺⁺⁺	Ferro Trivalente (ferri)
C ₃₂ H ₃₂ N ₄ Fe O ₄	Hematina
HCl.....	Ácido Clorídrico
H ₂ O.....	Água
C ₃₂ H ₃₁ N ₄ Fe O ₃ Cl.....	Cloridrato de Hematina
HBr.....	Ácido Bromídrico
HI.....	Ácido Iodídrico
C ₂ H ₄ O ₂	Ácido Acético
NaCl.....	Cloreto de Sódio

LISTA DE FIGURAS

Página:

Figura 01...Forma de um cristal de hemina.....	22
Figura 02...Modelo de mioglobina.....	41
Figura 03...Constituinte orgânico da hemoglobina.....	42
Figura 04...Detalhe de um cristal do sangue de cão.....	58
Figura 05...Detalhe de um cristal do sangue de galinha.....	58
Figura 06...Detalhe de um cristal do sangue de gato.....	58
Figura 07...Detalhe de um cristal do sangue humano.....	58
Figura 08...Cristais de Teichmann.....	63
Figura 09...Cristais do sangue de cão.....	63
Figura 10...Cristais do sangue de gato.....	64
Figura 11...Cristais do sangue de galinha.....	64

LISTA DE GRÁFICO

Página:

Gráfico 01...Variação dos ângulos dos cristais.....	57
---	----

LISTA DE ESPECTRO

Página:

Espectro 01.Variáveis encontradas em cada espécie.....	59
--	----

LISTA DE TABELAS

Página:

Tabela 01...Resumo dos ângulos internos dos cristais.....	60
---	----

RESUMO:

Este trabalho visa evidenciar os cristais de hemina do sangue humano, pela técnica preconizada por Teichmann, através da utilização do ácido acético glacial e, utilizando-se a mesma técnica, comparar com os cristais de hemina do sangue de animais domésticos (cão, gato e galinha), animais que possuem um maior convívio com o homem; nesses cristais, observou-se a cor, forma e ângulos, no intuito de serem notadas possíveis diferenças, porventura existentes, entre os ângulos internos dos cristais de hemina do sangue humano e os cristais originados a partir do sangue dos animais pesquisados.

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram coletadas amostras de sangue humano em locais de crimes e durante a necropsia de cadáveres não identificados no Departamento Médico Legal de Vitória; essas amostras foram utilizadas para a obtenção dos cristais de hemina, pela técnica de Teichmann, através da dissociação iônica da hematina pelo ácido acético e seus ângulos internos foram medidos.

Com a colaboração de um médico veterinário, foram coletadas amostras de sangue de galinha, cachorro e gato e, utilizando-se a mesma técnica de Teichmann, os cristais originados tiveram seus ângulos internos também medidos e comparados com os ângulos dos cristais do sangue humano, na tentativa de se diferenciar a espécie animal pelos ângulos internos dos cristais. Foram selecionadas cerca de vinte e cinco amostras de cada espécie animal e de pessoas vítimas de mortes violentas, todos adultos.

Pelos resultados obtidos, foi observado que:

A técnica de obtenção dos cristais de hemina não diferencia, morfológicamente, sangue humano do sangue de outros animais pesquisados.

A análise comparativa dos ângulos internos dos cristais formados, tanto no sangue humano quanto no sangue dos animais estudados, não diferencia um do outro. A presença dos cristais de Teichmann, no sangue humano, é prova de certeza de sangue; em amostras sangüíneas e manchas levantadas em locais de crime, entretanto, não diferencia o sangue humano do sangue de animais domésticos como cão, gato e galinha.

ABSTRACT:

This work seeks to evidence the crystals of hemina present in the human blood, using the technique proclaimed by Teichmann, through the use of the glacial acetic acid and, using the same technique, comparing to the crystals of hemina of domestic animals (dog, cat and chicken) which possess a larger familiarity with men, observing its color, form, size and angles with the aim of noticing possible differences that may exist, among the internal angles of the hemina crystals, of the human blood from the blood of the researched animals.

For the development of this work samples of human blood were picked up in places of crimes and during the necropsy non identified of corpses in the Legal Medical Department of Vitória; samples which were used for the obtaining of the hemina crystals, by the technique of Teichmann through the chemical reaction of the hemoglobin for the acetic acid and its internal angles were measured.

With a veterinary doctor's collaboration, samples of chicken, dog and cat bloods were picked up, and being used this same Teichmann's technique, the originated crystals also had their internal angles measured and compared with the angles of the crystals of the human blood, in the attempt of differing the animal species through the internal angles of the crystals. They were selected about twenty-five samples of each animal species and of people victims of people victims of violent deaths, all adults.

Results showed that:

The technique of obtaining the hemina crystals doesn't differentiate, morphologically, human blood from the blood of other researched animals. The comparative analysis made in the internal angles of the formed crystals,

as much in the human blood as in the blood of the animals studied, doesn't differentiate one blood from the other. The presence of the Teichmann's crystals in the human blood is a proof that it is real blood, in blood samples and in blood stains collected in the scenes of crime; however it doesn't differentiate human blood from blood of domestic animals like dog, cat and chicken.

1- INTRODUÇÃO:

Durante o desenvolvimento dos trabalhos periciais, em casos em que são encontradas manchas com suspeição de que se trate de sangue, as principais questões a serem respondidas, pelos peritos, baseiam-se em responder:

- A mancha encontrada é sangue?
- Em caso positivo, é sangue humano?

Segundo FRANÇA (1995), a primeira providência é saber se o material pesquisado é sangue. Podemos utilizar uma técnica muito simples que consiste na evidenciação dos cristais de Teichmann. Após a técnica, e em caso positivo, observa-se a presença de cristais de forma rômbrica, alongados, cor de chocolate, isolados ou em grupos, na forma de charutos ou rosetas, conforme as disposições em que encontrarem-se.

Para o perito de local, é comum encontrar manchas de variados tipos e tamanhos em locais onde ocorreu algum tipo de crime. No entanto, este profissional não pode afirmar com segurança que esta ou aquela mancha trata-se de sangue.

Por isso é necessário que o perito, de local, tenha conhecimento e habilidade para classificar o tipo de mancha pelo seu aspecto, saber colhê-la e armazená-la adequadamente, para que seja encaminhada ao perito bioquímico.

Uma outra questão que pode surgir para o perito, nos locais de crimes, é a presença de manchas suspeitas, semelhantes a sangue, que podem pertencer a animais sacrificados para ocultar um crime. Por isso é necessária a mesma pesquisa, também em sangue de animais, criando assim parâmetros para comparações e diferenciações entre o sangue humano e o sangue de animais.

Nos locais de sinistros, o perito deve observar a presença de manchas de sangue nos homicídios, nas lesões corporais, nos locais de furto, nos acidentes, nos suicídios, etc. Segundo autores como JÚNIOR (1957) e ARBENZ (1988), deve-se observar, também, sob as mesas, frestas do piso, nos carpetes, no solo e nas paredes. Na vítima, deverão ser observados resquícios de sangue sob as unhas, nos cabelos e barba.

A presença de sangue poderá ser notada em locais, nas roupas e nas armas que já tenham sido lavadas, com a utilização de luz ultra-violeta.

Nos instrumentos utilizados na prática do crime, também poderão ser observados resquícios de sangue nas frestas dos cabos das armas, nas lâminas, no chassi, no interior do cano das armas de fogo, nos bastões, nas pedras, nas cordas e nas armas de ocasião.

Segundo JÚNIOR (1957), a quantidade de sangue perdida poderá ser avaliada pela contagem dos números de poças de sangue e pelo volume.

Ainda segundo ARBENZ (1988), a coloração do sangue pode ser um indicativo do tempo em que o mesmo esteve presente no local. Sua coloração inicial, quando recente, é vermelho vivo, vermelho acastanhado com o passar do tempo, devido a formação da metahemoglobina e, mais tardiamente, de coloração vermelho escura, devido a produção de hematina.

Segundo JÚNIOR (1957), as manchas mais antigas e ressecadas apresentam-se, macroscopicamente, com rachaduras e numa maior aproximação, em escamas. Quanto mais antiga a mancha, menor a sua solubilidade.

O estudo da topografia das manchas é muito importante, pois podem indicar se a vítima estava em pé ou deitada, quando recebeu os golpes ou os tiros, se conseguiu caminhar após ter sido ferida, se o agressor atingiu a

mesma com vários golpes utilizando a arma suja de sangue, além de indicar a direção do criminoso.

Para o perito é importante observar, também, o formato das manchas. Dependendo da altura em que a mancha de sangue se origine, da inclinação, do deslocamento da vítima ou do objeto e do tipo de vaso atingido, a mancha poderá originar diferentes e indicativas formas.

Dependendo do local em que a mancha for encontrada, a mesma poderá ser transportada, juntamente com o objeto, ou na impossibilidade, a mesma deverá ser raspada sobre papéis ou colhidas em tubos de ensaio.

Segundo MOREIRA (1962), quanto a sua natureza, as manchas podem ser do tipo biológicas (sangue, esperma, urina, saliva, fezes, líquido amniótico, céfalo-raquidiano, alimentos, etc.) e não biológicas (combustível, graxa, tinta, resina etc.).

Entre as manchas de sangue, são as do tipo biológicas que se destacam das demais, pela grande quantidade de informações que oferecem ao perito.

Um dos principais problemas para o perito criminal é conseguir identificar a presença de sangue humano colhidos em locais expostos ao tempo, em objetos e veículos que foram lavados e em locais inidôneos.

Para o perito criminal, é muito importante o estudo das manchas de sangue encontradas em local de crime, no cadáver, em objetos relacionados e em veículos, pois é possível, por exemplo, saber em um local de crime contra a pessoa, se um cadáver foi retirado de sua posição original antes da chegada da perícia, baseando-se no tempo de coagulação do sangue.

Através do aspecto das gotas de sangue, o perito pode avaliar se no local aconteceu algum ato violento e traçar a dinâmica dos fatos. Restos de sangue encontrados sob a coronha de uma arma de fogo, sob o cabo de uma faca, no assoalho, nas paredes, nos tapetes, almofadas e em lugares menos

aparentes, como as bordas inferiores de camas e gavetas, podem elucidar os fatos ocorridos.

Devemos, também, observar as roupas de cama, toalhas, cestas de lixo e o sifão da pia. A luz ultravioleta, como já foi dito, poderá ser utilizada em objetos e roupas mesmo após terem sido lavados.

A pesquisa de sangue nas vítimas, assim como nos suspeitos, poderá ser feita observando-se sob as unhas, cabelos e barba. A identificação de sua origem, poderá significar a responsabilidade criminal de um elemento ou a prova de sua inocência.

Ainda segundo MOREIRA (1962), é de suma importância a observação da quantidade de sangue e sua distribuição no espaço, podendo indicar a direção do deslocamento da vítima ou do agressor, o local onde a vítima recebeu o primeiro golpe ou tiro e onde a mesma permaneceu.

A coagulação do sangue também é importante, pois indica o tempo do fato e se algum objeto foi retirado do local ou de sua posição original. Sangue do tipo gotejado indica que o mesmo incidiu sobre um anteparo, obedecendo apenas a ação da gravidade e, dependendo do seu aspecto, poderá oferecer dados sobre a altura de onde se originou :

- de formato circular e bordas regulares, indica ter se originado de uma pequena altura;

- de bordas estreladas, indica que se originou de uma altura maior, em torno de meio metro;

- quando estreladas e com gotículas distantes, indica que caiu de uma altura maior, superior a um metro e meio;

- quando na forma de gotículas, indica que se originou de uma altura considerável, de pelo menos dois metros e desmanchou-se em gotículas menores.

Quando são encontrados salpicos de sangue sobre os objetos e paredes, pode indicar: o movimento da arma do crime pelo criminoso, quando o mesmo golpeia, novamente, a sua vítima, a luta entre a vítima ensangüentada e o criminoso, até o esguicho de sangue provocado pelo rompimento de uma artéria calibrosa.

Em virtude das possíveis confusões ocorridas nos locais de crimes, envolvendo o sangue humano e dos animais, resolvemos fazer o presente trabalho com o intuito de tentar diferenciar o sangue humano do sangue de animais.

2- REVISÃO DA LITERATURA:

Vários autores têm estudado, ao longo dos anos, o sangue e suas propriedades, valendo-se da observação direta das células, dos métodos de coloração, da técnica de soro precipitação e da micro-cristalização, sendo esta última baseada nas alterações da hemoglobina e seus derivados.

Segundo PASQUALÉ (1932), os cristais de cloridrato de hematina foram obtidos, pela primeira vez, por L. P. Teichmann em 1853; este anatomista austríaco, da Universidade de Cracovia, demonstrou que se fazendo agir, sobre o sangue dessecado, o ácido acético glacial aquecido, resultaria um depósito de cor azul escuro, constituído por micro-cristais rômnicos e achatados, terminados em ângulos agudos. Os cristais obtidos eram insolúveis em água, ácidos diluídos, álcool, éter e clorofórmio. Foi Brücke quem primeiro empregou a reação de Teichmann nas pesquisas do sangue em perícias médico-legais. Foi Erdmann quem divulgou o método.

Ainda, conforme PASQUALÉ (1932), em 1875, Husson propôs uma modificação ao método de Teichmann, consistindo em substituir o cloreto por uma solução de brometo de sódio a 20%.

Segundo JÚNIOR (1957), Kraus, em 1897, observou o fenômeno da reação de soro precipitação quando, ao imunizar coelhos com culturas microbianas, extraiu o soro de seu sangue e deixou em contato com o caldo das culturas inoculadas; observou que ocorria o aparecimento de um precipitado. Foi Uhlenhuth que utilizou, pela primeira vez, esta técnica com a finalidade médico legal.

Quando se injeta albumina de um animal em outro, de espécie diferente, o soro do animal receptor adquire a capacidade de reagir e turvar o soro

derivado do doador, pois a albumina injetada funciona como antígeno, sendo formado o anticorpo no sangue do animal receptor, turvando a solução e formando um precipitado no fundo do recipiente. O soro extraído do animal receptor é conhecido como anti-soro. É considerado a melhor prova de diagnóstico específico do sangue.

Sarda, em 1906, estudou o emprego dos brometos de potássio, sódio, estrôncio e amônio, em solução aquosa a 1:1000, na obtenção do bromidrato de hematina, concluindo que estes cristais se formam mais facilmente e são maiores que os cristais de cloridratos.

Strzyzowski, em seu livro publicado em 1910, intitulado “Bioquímica Normal e Patológica”, propôs a obtenção de cristais de iodhemina, um reagente que sobrepujou todos os demais, alcançando notoriedade no campo da Medicina Legal.

O professor Strzyzowski propôs a utilização de um reagente, que hoje leva seu nome, composto pelo ácido acético, álcool e água em partes iguais, além do ácido iodídrico (duas gotas do incolor ou três gotas do colorido). Quando substituído o ácido acético pelo láctico, ocorre uma maior sensibilização e estabilidade da fórmula.

MARTINS (1929), estudou os cristais de oxi-hemoglobina, utilizando sangue humano, de cachorro, cavalo, gato e cobaia, valendo-se de várias técnicas e concluindo que a de Reichert, após modificação, favorecia o aparecimento dos cristais; aconselhou o seu emprego na prática médico legal, servindo para diagnose específica do sangue em medicina legal. Este assunto também fora estudado por autores como Kölliker, Brown e Carlos Costa.

O processo original, descrito por Teichmann, consiste, simplesmente, em aquecer o sangue dessecado, juntamente com ácido acético glacial, onde o ácido atua sobre o cloreto de sódio existente no próprio sangue, originando

ácido clorídrico, que posteriormente age sobre a hemina formando a clorhemina.

Em sangues antigos ou lavados pela chuva, convém acrescentar cloreto de sódio diluído ou cloretos com outros elementos eletro-positivos como potássio, lítio, cálcio, bário, estrôncio, magnésio, estanho ou ferro, para facilitar a cristalização. O excesso de cloreto de sódio, segundo Xavier da Costa, citado por PASQUALÉ (1932), além de mascarar os cristais de hemina também impede a sua formação.

FERREIRA (1932), em seu livro “Da Técnica Médico Legal na Investigação Forense”, demonstrou a presença de cristais de hemoglobina no sangue humano e suas diferentes formas e propriedades no sangue de animais, sendo, esses cristais, específicos para cada espécie.

FERREIRA (1948), relatou em seu livro “A Perícia Técnica em Criminologia e Medicina Legal” a importância do estudo das manchas de sangue e as técnicas de sua evidenciação.

JÚNIOR (1957), através de seu livro “Lições de Medicina Legal” descreveu as técnicas de evidenciação das manchas de sangue e sua importância em locais de crime.

FERREIRA (1962), no capítulo dedicado ao estudo pericial do sangue recomenda, como excelentes, os processos para a obtenção de cristais de hemoglobina, pelas técnicas de Carlos Costa, afirmando que, com a utilização destes métodos, o perito poderá obter, com facilidade, os cristais de hemoglobina.

Segundo FERREIRA (1962), este assunto fora estudado por autores estrangeiros com Kölliker, Reichert e Brown, e por autores nacionais como Silvio Varela Martins e Carlos Costa. Segundo este autor, cada variedade de

hemoglobina possui características cristalográficas específicas, com sua qualidade óptica e seu arranjo nas preparações.

Após a obtenção dos cristais, estes deverão ser imediatamente fotografados e estudados, pois os mesmos são susceptíveis às mudanças de forma, características cristalográficas e ópticas.

A obtenção de perfeitos cristais de hemoglobina permite ao profissional diagnosticar o tipo específico de hemoglobina.

MOREIRA (1962), afirmou que mancha, no conceito criminalístico, é toda mudança de coloração, é todo acréscimo de material estranho sobre a superfície de um material ou objeto, podendo ser de consistência sólida, pastosa ou líquida.

Ainda sob o ponto de vista criminalístico, as manchas são importantes quanto ao aspecto e quanto a sua constituição. Em seu trabalho, enfatizou o estudo das manchas de sangue nas perícias criminais no capítulo intitulado “O Exame de Sangue em Medicina Legal”.

Ainda segundo MOREIRA (1962), a prova espectroscópica também é considerada prova de certeza. A luz branca, ao passar pela solução, antes de passar pelo prisma, emite certas faixas de cores, as quais, pelo número, largura e posição, identificam a substância. Entre as cores existem linhas escuras conhecidas como faixas de Fraunhofer, de posição fixa. São classificadas de A,B,C no vermelho; D no amarelo; E no verde; F no azul; G no índigo; H,K,L no violeta.

Segundo Rondoni, citado por MOREIRA (1962), a hematina é um produto da oxidação do hemocromogênio sendo, este último, derivado da metahemoglobina. O hemocromogênio contém ferro e compõe-se de quatro anéis pirrólicos, dos quais dois apresentam o ferro bivalente, substituindo os hidrogênios do grupo imínico, sendo estes cristais obtidos a frio ou a quente.

Para a formação destes cristais a frio, ainda segundo MOREIRA (1962), pode-se utilizar o sangue “in natura” ou previamente macerado, disposto sobre uma lâmina de vidro e aquecido lentamente para concentrá-lo. Sobre o sangue utiliza-se o reagente de Donogany, constituído de uma gota de piridina misturado a uma gota de sulfidrato de amônio, sendo coberto por uma laminula; em torno de trinta minutos os cristais serão formados.

Os cristais obtidos por Amado Ferreira, citado por MOREIRA (1962), são rômnicos, róseo-avermelhados, birrefringentes e com cerca de 3 a 15 micras de tamanho.

Com a reação de Donogany, ainda citado por MOREIRA (1962), os cristais se apresentam em forma de feixes de capim ou em retângulos finos. Este reativo conserva-se bem por um mês quando guardado em vidro escuro.

DARUGE e MASSINI (1975), estudaram, entre outros assuntos, as rugosidades palatinas, a saliva, o sangue e sua importância em Odontologia Legal.

FÁVERO (1980), em seu brilhante trabalho, reafirmou a importância do sangue nas investigações policiais. Segundo este autor, substâncias diversas como suor, urina, ferrugem e suco de frutas podem simular a presença de sangue. Como diagnóstico, são usadas as reações de orientação que servem apenas para selecionar o material e são baseadas, geralmente, na mudança de cor das substâncias utilizadas.

Segundo FÁVERO (1980), existe um número variado de reagentes, sendo os mais comuns a reação de Van Deen, onde o reativo é preparado utilizando-se uma resina de Guaiacol a 10% em álcool etílico a 95%. O sangue é dissolvido em água destilada e, posteriormente, será acrescentada uma ou duas gotas do reativo, além de uma gota de água oxigenada.

A reação é positiva com coloração azul, sendo também positiva, para soluções orgânicas que contenham enzimas oxidases como manchas de saliva, pus, esperma e, também para suco de frutas, sais de ferro, de cobre e manganês, além de restos de tecidos e líquidos que contenham formol.

Outras reações muito utilizadas são a de Kastle-Meyer, baseada na utilização da fenolftaleína; de Adler, baseada na benzidina e de Amado Ferreira, baseada, também, na utilização da benzidina.

Como provas de certeza, ainda segundo FÁVERO (1980), podemos citar a espectroscopia, baseada na observação direta das hemácias, utilizando-se um microscópio; existem, ainda, as reações microcristalográficas, que se dividem na observação da formação de cristais de hemocromogênio, onde as substâncias alcalinas separam a parte heme da globina, desnaturando-a. Posteriormente, a parte heme se une a globina desnaturada, formando o hemocromogênio, e a formação dos cristais de Teichmann onde, pela técnica do autor, obtém-se a formação de cristais de hemina ou cloridrato de hematina.

A reação a quente, para a formação dos cristais de hemocromogênio, é feita com o reagente de Takayama, onde o sangue ou macerado é deixado sobre uma lâmina de vidro e aquecido levemente para evaporação lenta, coberto por uma lamínula e, pelas bordas da mesma, é colocado o reagente para continuar a evaporação.

O reagente deverá ser aquecido sobre uma chama sem ebulir, e o processo repetido diversas vezes, sendo observado a mudança de coloração do material. Ao final, observar a lâmina ao microscópio.

Reagente de Takayama:

Solução de glicose a 10%.....3 ml

Solução de soda a 10%.....3 ml

Piridina3 ml

Água destilada..... 7 ml

Ainda, segundo FÁVERO (1980), podemos utilizar a técnica de Teichmann, como prova de certeza da presença de hemácias (reação cristalográfica), baseada na formação dos cristais de hemina, podendo-se observar a formação destes cristais utilizando-se amostras de sangue humano. Esta técnica prima pela simplicidade, sendo por isso a mais usada (formação de cloridrato de hematina). No caso do sangue humano, eles aparecem, ao microscópico, na forma de pequenos cristais em paralelogramo, variando de um a sessenta micra, de cor castanha, sendo encontrados isolados, agrupados em forma de roseta ou dispostos irregularmente (fig. 01). São insolúveis em água, álcool e água oxigenada (FRANÇA, 1995).

Tendo como base esta técnica, a metodologia de trabalho variará de acordo com a disposição do sangue (FERREIRA, 1948). Caso a quantidade de sangue fresco seja grande, deve-se seguir a seguinte metodologia:

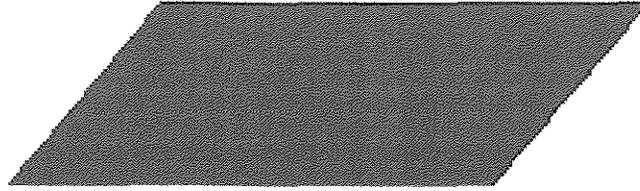


Fig. 01- Cor e forma de um cristal de Teichmann.

- * Colher uma gota de sangue e deixá-lo sobre a lâmina de vidro e concentrá-lo em fogo brando sobre o bico de Bünsen;
- * sobre o sangue; deitar uma gota de ácido acético glacial P.A., aquecê-lo ligeiramente e cobri-lo com uma lamínula;
- * aquecer o material, levemente, para a evaporação lenta do ácido, evitando fervura;
- * depositar, após a evaporação, mais ácido pelas bordas da lamínula e continuar o aquecimento. Repetir este procedimento de dez a quinze vezes ;
- * deixar esfriar e examinar no microscópico.

Considerando as manchas de sangue seco, seguir-se-á as seguintes etapas:

- * Fragmentar a mancha num tubo de ensaio com soro fisiológico de modo a obter-se um macerado concentrado, após a mesma ter sido raspada com auxílio de uma lâmina;
- * depositar o macerado sobre uma lâmina e concentrá-lo sobre calor brando;
- * depositar uma gota de ácido acético sobre o macerado, aquecendo-o ligeiramente e cobrindo-o com uma lamínula;
- * seguir as demais etapas.

Sangue em crosta:

- * Raspar a crosta com uma lâmina de bisturi e depositar os fragmentos no interior de um gral;
- * depositar soro fisiológico sobre a mesma e, utilizando o pistilo, procurar dissolvê-lo;
- * deitar uma gota do macerado sobre uma lâmina de vidro;
- * concentrar o material em fogo brando;
- * continuar a seqüência de eventos.

A conservação da lâmina é feita com a introdução de glicerina sob a lamínula, para uma conservação relativa, e definitiva quando a lâmina é untada com cera de Krönig (FERREIRA, 1948).

Reagente de Teichmann: Ácido acético glacial P.A.

Dos vários processos preconizados para a obtenção dos cristais de hemina, dois são atualmente os mais aconselhados: o da evaporação lenta e o da evaporação rápida.

Atendendo as regras da cristalização, se faz necessário uma evaporação lenta, a fim de obtermos cristais com formas mais perfeitas, pois a evaporação violenta produz cristais mal definidos.

Xavier da Costa, citado por FERREIRA, (1948), sobre os cristais de hemina dizia: “As dimensões e a regularidade dos cristais dependem da rapidez ou lentidão na qual se evapora o ácido. As formas mais perfeitas e

maiores obtêm-se com a evaporação demorada e os mais belos exemplares foram obtidos com a evaporação espontânea a frio, no prazo de 6 a 24 horas”.

Os cristais podem ser obtidos quando a lâmina é aquecida em uma estufa, entre 45° a 60°, ou sobre o bico de Bunsen sem, contudo, exceder 60°. Quando o preparado excede tal temperatura, as formas obtidas são irregulares e pequenas.

Uma outra fórmula de obtenção dos cristais de hemina seria a utilização do ácido láctico, misturado com álcool a 96° em partes iguais, como recomenda Wachholz, citado por PASQUALÉ (1932), podendo ser modificado para três partes de ácido para uma de álcool. Os cristais formados são maiores, de cor castanho-clara, agrupados em estrela, em forma de cruz, porém todos de contornos definidos. A sensibilidade da reação com o ácido láctico puro é tão grande, que basta uma gota sobre o macerado ou sangue “in natura”, concentrado em lâmina e evaporado para que se forme um grande número de cristais, sendo tanto mais belos e numerosos quanto mais gotas de ácido se colocarem sobre a lâmina.

Ainda, segundo Wachholz, todos os ácidos fortes, minerais ou orgânicos, desde que estejam diluídos em álcool a 90 a 95 %, se prestam à formação de clorhemina; os ácidos da preferência dos pesquisadores, porém, são os ácidos láctico e acético.

Considerando as manchas de sangue antigas, é recomendável a maceração da mancha em solução de NaCl a 1%, ou soluções de brometo de potássio ou de sódio ou ainda de iodeto de potássio ou de sódio segundo Teichmann (PASQUALÉ, 1932).

Segundo Tamassia, citado por PASQUALÉ, (1932), o sangue, fervido em tubos de ensaio por 10 minutos, também fornece um bom número de cristais. Xavier da Costa, citado pelo mesmo autor, afirma que o sangue

calcinado não produz cristais, pois sua parte orgânica foi destruída. O sangue putrefeito também produz a cristalização.

Tamassia, Montalti, Misuraca e Zanelli, citados por PASQUALÉ (1932), obtiveram cristais de hemina com o ácido acético, utilizando sangue putrefeito de vários anos.

Segundo Montalvi, também citado pelo mesmo autor, a putrefação favorece a separação do pigmento do glóbulo sangüíneo permitindo, assim, um contato mais íntimo com os reagentes e, com o progredir da putrefação, a hematina tenderá a decompor-se.

Teichmann, citado por PASQUALÉ (1932), propôs a formação de cristais de fluorhemina, obtidos pela ação do fluoreto de sódio em solução aquosa a 1%, com a utilização do ácido acético glacial. Tanner de Abreu porém, relata a predominância de cristais fusiformes e atípicos.

ARBENZ (1988), enfatizou o estudo do sangue, em Medicina Legal, e a evidenciação dos cristais de Teichmann como prova de certeza de sua presença.

FRANÇA (1995), enfatizou o estudo dos cristais de Teichmann, como prova de certeza, para responder a dois quesitos básicos, comumente questionados numa investigação:

A amostra coletada é sangue?

Em caso positivo, trata-se de sangue humano?

Segundo VANRELL (1996), a presença de cristais incolores, prismáticos e de tamanho variável, são importantes na cronotanatognose, pois resultam da decomposição das hemácias, podendo ser tingidos de azul pelo ferrocianeto de potássio ou de castanho pelo iodo, e somente aparecem a partir do 3º dia após o óbito, desaparecendo após o 35º. São conhecidos como cristais de Westenhöfer–Rocha-Valverde.

2.1- ESTUDO DO SANGUE

2.1.1- DEFINIÇÃO DE SANGUE:

Segundo autores como DOREA (1989), o sangue é considerado um tecido conjuntivo líquido, mais espesso que a água, que circula no sistema cardiovascular, exceto nas unhas e epiderme, de sabor salgado e cheiro desagradável, responsável por cerca de 1/3 do peso corporal, alcançando cerca de cinco a seis litros num indivíduo adulto.

O sangue é formado por uma parte líquida, o plasma, e por elementos sólidos que são os elementos figurados, as plaquetas, os leucócitos e as hemácias suspensas em meio líquido. Suas características são perenes e imutáveis. Possui coloração variando do vermelho vivo, quando rico em oxigênio, ao vermelho escuro, quando rico em gás carbônico. No meio externo, sua cor varia de acordo com a circunstância e o suporte onde se forma a mancha, o tempo decorrido desde o sangramento e o local do corpo onde se origina. Seu pH está situado em torno de 7,54. Nos mamíferos, as hemácias são anucleadas e circulares; no homem, medem aproximadamente sete micras. Nos demais vertebrados, apresentam-se nucleadas e elípticas.

2.1.2- SISTEMA CIRCULATORIO:

Segundo autores como FONSECA (1980), JUNQUEIRA & CARNEIRO (1985) e GUYTON (1992), a circulação sanguínea promove a integração dos diversos órgãos de um animal, distribuindo as substâncias

nutritivas (aminoácidos) por todo o corpo, além do oxigênio, retirando as substâncias indesejáveis, como os catabólitos e o gás carbônico.

Ainda segundo esses autores, as principais funções do sangue, no homem, são:

- Transporte de aminoácidos dos intestinos para as demais partes do corpo;
- Transporte das excretas para os rins, a partir das demais partes do corpo;
- Transporte dos gases respiratórios (oxigênio e dióxido de carbono) entre os pulmões e as demais partes do corpo;
- Transporte de hormônios (substâncias controladoras de atividades de alguns órgãos).

Segundo DOREA (1989) e GUYTON (1992), as artérias são vasos elásticos que conduzem o sangue rico em oxigênio. Este sangue possui coloração vermelho vivo. Quando rompidas, emitem sangue em esguicho.

As veias são vasos pouco elásticos, que conduzem o sangue com maior teor de gás carbônico. Normalmente este sangue é de coloração vermelho escuro. Quando rompido, emite sangue por escorrimento.

Os vasos capilares são muito delgados e comunicam as artérias com as veias. A este nível, ocorrem as trocas de nutrientes e oxigênio entre o sangue e as células.

Segundo FONSECA (1980) e VANDER (1981), didaticamente, a circulação no homem é dividida em pequena e grande circulação.

A primeira, também conhecida como circulação pulmonar, é o trajeto do sangue, rico em gás carbônico, que chega na aurícula direita proveniente da veia cava superior (que recebe o sangue da cabeça e dos membros superiores) e da veia cava inferior (que recebe o sangue venoso dos membros inferiores, tórax e abdômen), sai do ventrículo direito, através da artéria pulmonar,

passando pelos pulmões, para liberar o gás carbônico e receber o oxigênio, atingindo, posteriormente, a aurícula esquerda do coração através das veias pulmonares.

No ciclo geral ou grande circulação, o sangue, rico em oxigênio, flui do ventrículo esquerdo para todo o organismo, através da artéria aorta, que se curva para a esquerda. Dela, saem as artérias coronárias, as carótidas, as torácicas, a hepática, a gástrica, esplênica, mesentérica, pancreática, renais, etc., retornando à aurícula direita pelo sistema venoso. Além do oxigênio, este sangue também é rico em nutrientes, que são liberados e, concomitantemente, recolhidas as excretas.

O sangue é impelido, no interior das artérias, através de uma sucessão de eventos que, em conjunto, são chamados de ciclo cardíaco, ou seja, ocorrem as sístoles das aurículas e ventrículos, que são as contrações do coração. O sangue, ao chegar na aurícula direita, é propelido pela sístole ao ventrículo do mesmo lado que, por sua vez, estando na fase diastólica (de relaxamento), recebe este sangue entrando, automaticamente, em sístole, propelindo o sangue para os pulmões.

Em cada sístole, a pressão sangüínea eleva-se para 120 mm. de Hg, enquanto em cada diástole a pressão cai para cerca de 80 mm. de Hg.

Dos pulmões, o sangue é propelido novamente para o coração, através da aurícula esquerda, e desta para o ventrículo, pela sucessão de eventos já citados.

O sangue retorna dos membros inferiores, ao coração, com auxílio da contração da musculatura esquelética situada ao redor das veias. Para orientar o movimento ascendente, existem válvulas, nas veias, que se fecham após a passagem do sangue, impedindo o retorno sangüíneo.

Os batimentos cardíacos possuem um ritmo tal, que o sangue flui das aurículas para os ventrículos, onde este ritmo é controlado por dois grandes nervos, os vagos, que são cardiomoderadores, liberando a acetilcolina e os cardioaceleradores, que liberam a adrenalina. Além destes dois nervos, a baixa concentração de oxigênio e a alta concentração de dióxido de carbono também controlam o ritmo cardíaco.

Num indivíduo adulto, em repouso, a frequência cardíaca varia entre 60 a 70 batimentos por minuto, enquanto, em atividade, varia de 70 a 90 batimentos.

2.1.3- CONSTITUIÇÃO DO SANGUE:

WHITE (1976), FONSECA (1980) e VANDER (1981), afirmam que o plasma é uma solução aquosa, clara e transparente, formada por cerca de 90% de água e 10% de substâncias representadas por proteínas (7% do total), sais minerais (cerca de 0,9%), monossacarídeos, gorduras, colesterol e uréia.

É, essencialmente, constituído por uma solução aquosa contendo sais orgânicos. Além desses componentes, são encontrados, no plasma sangüíneo, os gases respiratórios (oxigênio e gás carbônico), hormônios, enzimas, etc.

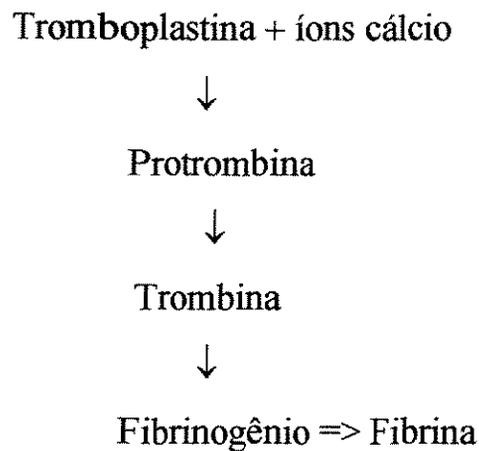
Segundo autores como WHITE (1976), VANDER (1981), GUYTON (1992) e HARPER (1994), entre as proteínas, no plasma, encontram-se as albuminas alfa, beta e gama, globulinas e fibrinogênio.

As albuminas, que são as proteínas predominantes, possuem um papel fundamental na manutenção da pressão osmótica do sangue, auxiliando a regulação das trocas aquosas entre o plasma e o líquido intersticial.

As gamas globulinas também são chamadas de imunoglobulinas, por constituírem os anticorpos.

Segundo WHITE (1976), o fibrinogênio é uma proteína solúvel, relacionada com a coagulação sangüínea, e que, no sangue coagulado, transforma-se em fibra (fibrina), uma proteína insolúvel, soro-albumina e soro-globulina.

O plasma sem o fibrinogênio, que foi removido depois que o sangue coagulou-se, é chamado de soro sangüíneo.



A fibrina é uma proteína insolúvel que se precipita, formando uma rede de filamentos, onde as plaquetas ficam retidas formando um tampão que obstrui o vaso lesado.

Após um determinado tempo, o coágulo se retrai, deixando, na superfície, um líquido amarelado e claro, que não se coagula, o plasma sem o fibrinogênio.

Em contrapartida, a heparina, que é sintetizada pelos mastócitos presentes no tecido conjuntivo pericapilar, principalmente do fígado e pulmões, impede a transformação de protrombina em trombina.

Segundo FONSECA (1980), VANDER (1981) e GUYTON (1992), de um modo geral, as células sangüíneas são classificadas em três grupos funcionais: glóbulos vermelhos (eritrócitos), glóbulos brancos (leucócitos) e plaquetas (trombócitos).

Os eritrócitos estão envolvidos no transporte de oxigênio e dióxido de carbono; os leucócitos estão envolvidos na defesa imunológica do organismo, enquanto as plaquetas estão envolvidas no processo de coagulação sangüínea. Todos os três tipos celulares são formados na medula óssea, por um processo conhecido como hematopoiese (LEAVEL, 1979). Os eritrócitos e as plaquetas exercem suas funções somente no interior dos vasos, enquanto os leucócitos atuam fora deles, nos tecidos.

Plaquetas:

As plaquetas são fragmentos de células, responsáveis pela proteção dos vasos, evitando perdas sangüíneas através da aglutinação em torno do ferimento e estimulando a sua regeneração.

Essas células são originadas na medula óssea, por brotamento do citoplasma de células volumosas, denominadas megacariócitos, que são células biconvexas, ovóides variando de 2 a 3 μm . de diâmetro, com tendência a aderirem-se uma às outras. Seu formato é mantido graças a um feixe de microtúbulos, dispostos no centro, dirigindo-se à periferia.

Grupos de plaquetas obliteram pequenos defeitos nos vasos e contribuem na formação e retração do coágulo. Produzem e liberam a serotonina, reduzindo o volume do fluxo sangüíneo pela constrição dos vasos (WHITE, 1976).

Células Brancas:

Autores como WHITE (1976), LEAVEL (1979) e SMITH (1982), citam que os leucócitos são responsáveis pela proteção de todo o organismo, pois destroem os microrganismos invasores. Possuem duas importantes propriedades que são a fagocitose (capacidade de englobar e destruir corpos estranhos) e a diapedese (capacidade de atravessar os vasos sanguíneos e penetrar nos tecidos); desempenham importante papel na defesa do organismo contra os agentes invasores, sendo os granulócitos e os monócitos fagocitários ativos, englobando microrganismos, fragmentos de células e partículas inespecíficas. A atividade fagocitária poderá ser ampliada quando dirigida para as respostas imunitárias.

Existem cinco tipos de leucócitos que, por sua vez, são divididos em dois grupos, de acordo com os grânulos presentes nos seus citoplasmas e características gerais dos núcleos:

Mononucleares – agranulócitos - (monócitos e linfócitos) e polimorfonucleares – granulócitos- (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Os granulócitos se caracterizam por encerrarem proeminentes grânulos no citoplasma e um núcleo multilobulado, de formato variado, sendo também denominados de polimorfos.

Estas células possuem dois tipos de grânulos, sendo um grupo fagocítico, contendo lisosomas, e um outro contendo grânulos específicos ao tipo de célula. Estes grânulos, de acordo com sua afinidade tintorial, são divididos em neutrófilos, eosinófilos e basófilos.

Os agranulócitos, grupo em que estão incluídos os linfócitos e monócitos, foram assim designados pelo fato de que seus grânulos não são

facilmente visíveis na microscopia óptica. Por seus núcleos não serem lobulados, também são conhecidos como mononucleares.

Em geral, os leucócitos exercem suas funções nos tecidos, utilizando o sangue como veículo. Deslocam-se, através de movimentos amebóides, do sangue para os tecidos.

Células-tronco, situadas na medula óssea, dão origem a três linhagens granulocíticas distintas, ou seja, os neutrófilos, os eosinófilos e os basófilos. O controle da diferenciação celular é basicamente hormonal, sendo as colônias formadas por linhagens granulocíticas, ou linhagem de monócitos macrófagos, enquanto outras são mistas.

A atividade estimuladora da formação de colônias é elaborada por monócitos circulantes e macrófagos teciduais fixos; estimulam a formação de colônias de neutrófilos, enquanto os linfócitos sensibilizados favorecem a produção de eosinófilos. A atividade formadora de colônias (CSA), foi purificada, revelando-se tratar de uma glicoproteína, com peso molecular variando entre 50.000 a 100.000, com estabilidade relativa, resistindo a uma temperatura de 60°, durante trinta minutos.

Neutrófilos:

O mieloblasto é seu precursor mais imaturo. Seu núcleo é grande em relação ao citoplasma, apresentando formato arredondado ou ligeiramente oval, contendo um ou mais nucléolos proeminentes.

O citoplasma apresenta uma coloração azul escura e carece de organelas citoplasmáticas. Menos de 5% das células mielóides são mieloblastos.

Os mieloblastos proliferam no decorrer de 24 horas, dando origem a promielócitos e posteriormente a metamielócitos. Seu núcleo é endentado,

alongando-se para adquirir uma forma bilobulada, em ferradura ou bastonete, e finalmente tri e tetralobulada nos neutrófilos.

Os grânulos dos neutrófilos não possuem afinidade tanto pelos corantes ácidos quanto pelos básicos, enquanto os eosinófilos se coram intensamente pelos corantes ácidos (eosina) e os basófilos se coram pelos corantes básicos (hematoxilina e o azul de metileno).

Os neutrófilos são os tipos mais comuns de leucócitos, constituindo de 40 a 70% dos leucócitos circulantes. O aspecto multilobulado de seu núcleo é característico, sendo geralmente cinco lóbulos nucleares, unidos por finas pontes de material nuclear.

Em neutrófilos de fêmeas, aparecem, em cerca de 3% destes, com os corpúsculos de Barr, constituído do cromossoma X, condensado em forma de baqueta, preso a um dos lóbulos do núcleo.

Os grânulos dos neutrófilos contêm um grupo de proteínas com ação antibacteriana, conhecidos como fagocitinas. A principal função dos neutrófilos é englobar microrganismos invasores, principalmente bactérias, apresentando maior envolvimento nas respostas inflamatórias agudas.

Possuem uma capacidade limitada para regenerar os lisosomas gastos e as vezes específica nas atividades fagocitárias, sendo incapazes de uma atividade contínua após sua ação, degenerando logo em seguida, sendo, portanto, o principal constituinte do pus (células do pus). Seu pequeno número de mitocôndrias e a abundância de glicogênio indicam a predominância do metabolismo anaeróbio, permitindo-lhes atuarem em ambientes anaeróbios, como em tecidos danificados.

Os neutrófilos envolvem os corpos estranhos, através de pseudópodes, formando um vacúolo contendo as bactérias, onde são liberadas as enzimas chamadas de fagossomas.

Eosinófilos:

Possui características em comum com os neutrófilos, diferindo destes pela sua antigenicidade de superfície, composição enzimática e sobrevida na circulação.

Em 1879, Ehrlich, citado por WHITE (1976), observou que os grânulos grosseiros desta célula tinham afinidade pelos corantes ácidos e utilizou o termo eosinófilo. Os eosinófilos e neutrófilos derivam de uma célula precursora hematopoiética comum e possuem características semelhantes de maturação. O promielócito eosinófilo é a célula mais imatura e identificável da série eosinófila. Com o processo de maturação, os grânulos tornam-se proeminentes e numerosos. O eosinófilo maduro possui um núcleo bilobulado, com grânulos eosinófilos proeminentes. Estes grânulos possuem zinco e proteína básica rica em arginina, porém quando isolados carecem de atividade anti-histamínica, antibacteriana e não aumentam a permeabilidade vascular.

No sangue, os eosinófilos constituem de 1% a 3% dos leucócitos circulantes, sendo mais raros que os anteriores. Seu citoplasma é repleto de grânulos que se coram de uma cor rósea-escura. Seu número aumenta em infestações parasitárias. Fagocitam o complexo antígeno-anticorpo.

Basófilos:

Exibem muitas características em comum com os mastócitos teciduais. Possuem grandes quantidades de grânulos que preenchem o citoplasma e recobrem parcialmente o núcleo. Seus grânulos volumosos possuem uma grande quantidade de mucopolissacarídeos ácidos, incluindo heparina e histamina, com ação vasoativa. Os basófilos são os granulócitos mais raros,

constituindo de 0,5% a 1,0% dos leucócitos circulantes e das células nucleadas da medula.

Possuem, também, um núcleo bilobulado, normalmente mascarado pela grande quantidade de grânulos que se coram na cor azul escuro (basófilos). Da série granulocítica são as que possuem menor poder fagocitário.

Monócitos:

O número de monócitos circulantes é influenciado por uma série de fatores. Em crianças e adultos normais, sua contagem varia de 1% a 6% da percentagem global de leucócitos. No adulto, a contagem absoluta varia entre 0,285 e 0,5 x 1000.000.000 por litro. Dentre as causas de monocitose, estão incluídas aquelas relacionadas a infecções crônicas e prolongadas, além de neoplasias malignas. A administração de endotoxina, assim como de glicocorticóides, pode gerar a monocitopenia.

São bastante ativos na fagocitose e, dependendo do seu tamanho, podem ser denominados macrófagos ou micrófagos.

São as maiores células da série leucocitária, constituídas de um núcleo volumoso, excêntrico e freqüentemente em forma de ferradura. Seu citoplasma é rico em nucléolos, aparelho de Golgi e mitocôndrias, indicando sua contínua atividade e capacidade de regeneração, podendo utilizar as vias anaeróbias e aeróbias. São células com grande mobilidade e capacidade fagocitária, podendo migrar para o tecido conjuntivo onde são denominados macrófagos tissulares.

Linfócitos:

Os linfócitos desempenham um papel importante em todas as respostas imunitárias, sendo sua ação dirigida a agentes exógenos específicos. São as células leucocitárias de menor tamanho, sendo que seu volume citoplasmático varia de acordo com a intensidade da célula, encontrando-se freqüentemente na forma inativa. Seu núcleo é pequeno e esférico.

Hemácias:

Segundo WHITE (1976), LEAVEL (1979), SMITH (1982), STRYER (1992) e HARPER (1994), as hemácias (glóbulos vermelhos ou eritrócitos) são células que possuem formato de disco, com as bordas arredondadas e com uma depressão central que abrange as duas faces (biconvexo), o que proporciona uma extensa área em relação ao volume, facilitando enormemente as trocas gasosas, alcançando, em média, cinco milhões por milímetro cúbico de sangue. Sua principal função é transportar o oxigênio e o dióxido de carbono; as hemácias originam-se de células precursoras da medula óssea.

Durante a sua diferenciação, grandes quantidades de hemoglobina são formadas. Antes de serem liberadas na circulação, seu núcleo é eliminado, assim como todas as organelas se degeneram. Quando totalmente diferenciada consiste somente de uma membrana plasmática externa contendo hemoglobina e um limitado número de enzimas, necessárias para a manutenção de sua integridade e para a função de transporte de gases. A fluidez da membrana plasmática, combinada com a forma bicôncava, permite ao eritrócito

deformar-se prontamente. Devido a essa propriedade, esta célula possui diâmetro entre 6 a 8 μm .

Sua forma é determinada pelo volume de água e, pela concentração de íons sódio presentes no seu interior, são continuamente bombeados para fora da mesma, sendo utilizada a energia do ATP, do metabolismo anaeróbico da glicose. Devido a ausência de mitocôndrias, estas células são totalmente dependentes da glicose como fonte de energia.

Estas células duram em torno de vinte dias, tempo determinado por sua capacidade de manter a forma bicôncava. Não dispendo de organelas adequadas, o eritrócito é incapaz de sintetizar novas proteínas para substituir as enzimas em deteriorização e as membranas plasmáticas; daí surge a diminuição da capacidade de bombeamento dos íons sódio para fora do glóbulo, resultando na entrada de água, tornando-o esférico. Nessa fase, esses glóbulos são retirados da circulação e destruídos no fígado e no baço.

Segundo JÚNIOR (1957), nos mamíferos estas células são esféricas (exceto nos camelídeos que são elípticas) anucleadas, e o seu principal componente é a hemoglobina, que dá a cor vermelha ao sangue. Nos répteis, anfíbios e peixes, estas células são elípticas e nucleadas.

São derivados de células precursoras, os eritroblastos, que se localizam na medula óssea. Quando se transformam em hemácias, vão acumulando hemoglobina. Posteriormente o núcleo se degenera.

Os reticulóides são as formas imaturas de eritrócitos, encontrados na circulação sangüínea, ocorrendo seu amadurecimento em cerca de um dia após a liberação. O ritmo de entrada dos reticulóides é semelhante ao ritmo de retirada, constituindo-se em menos de 1% das células circulantes.

O número de reticulóides circulantes aumenta quando ocorrem grandes hemorragias e em determinadas doenças.

A hemoglobina, presente nas hemácias, é responsável pela coloração vermelha do sangue e possui a função de fixar o oxigênio do ar, transformando-se em oxiemoglobina, composta por quatro moléculas de oxigênio, por uma ligação química muito tênue. O oxigênio é transportado até os tecidos e órgãos e recolhido o gás carbônico destes mesmos órgãos, transformando-se em carboxiemoglobina, composta por quatro moléculas de CO através de uma ligação química mais estável, porém foto-sensível, dissociando-se e liberando o CO. A metahemoglobina diferencia-se da oxiemoglobina pela maior capacidade de união com o O₂.

2.1.4- ESTRUTURA DA HEMOGLOBINA:

Segundo STRYER (1992), a hemoglobina é um cromoproteídio presente nas hemácias e varia sua constituição de acordo com a espécie animal considerada. É um cromoproteídio composto por um núcleo protídico, a globina (fig. 02), e um núcleo prostédico tetrapirrólico ferruginoso, resultante da união de uma porfirina com o ferro (fig. 03). No mesmo sangue poderá ocorrer uma ou diversas variedades de hemoglobina, sempre constituída por uma proteína incolor, a globina, combinada com a ferroprotoporfirina, ou grupo heme.

As variações das hemoglobinas são devidas às diferentes seqüências de aminoácidos e conformações da cadeia da globina. O grupamento heme é sempre o mesmo em todas as cadeias de hemoglobina, seja nos vertebrados ou nos invertebrados.

Segundo BROWN & DELLMANN (1982), o grupo heme é um derivado da porfirina, sendo o mais comum a protoporfirina tipo III. As

porfirinas podem se combinar com íons metálicos como o Zn, Ni, Co, Cu, Ag, e os mais importantes o Fe e Mg. O íon metálico substitui os átomos de hidrogênio, no centro da cadeia, unidos aos átomos de nitrogênios. Estes compostos de ferro distinguem-se pelo prefixo ferro para Fe^{++} e ferri para Fe^{+++} , sendo o primeiro o constituinte da ferroprotoporfirina.

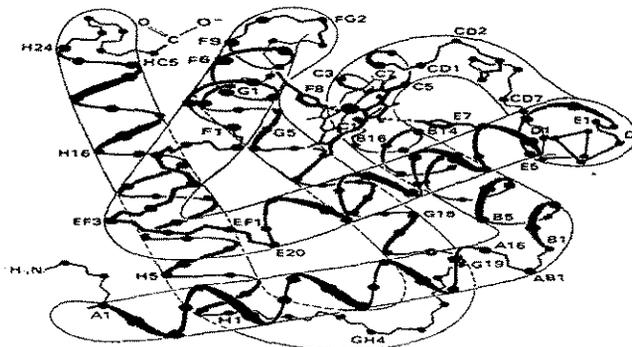


Fig. 02- Modelo da mioglobina em alta resolução (STRYER, 1992).

A ferroprotoporfirina ou hemina contém Fe^{+++} , sendo obtida geralmente na forma de cloretos, onde o complexo resultante é uma pirâmide quadrangular com o ligamento adicional preso perpendicularmente ao plano da porfirina.

A hemina cristalizada é obtida aquecendo-se a solução de hemoglobina com ácido acético, juntamente com uma pequena quantidade de cloreto de sódio.

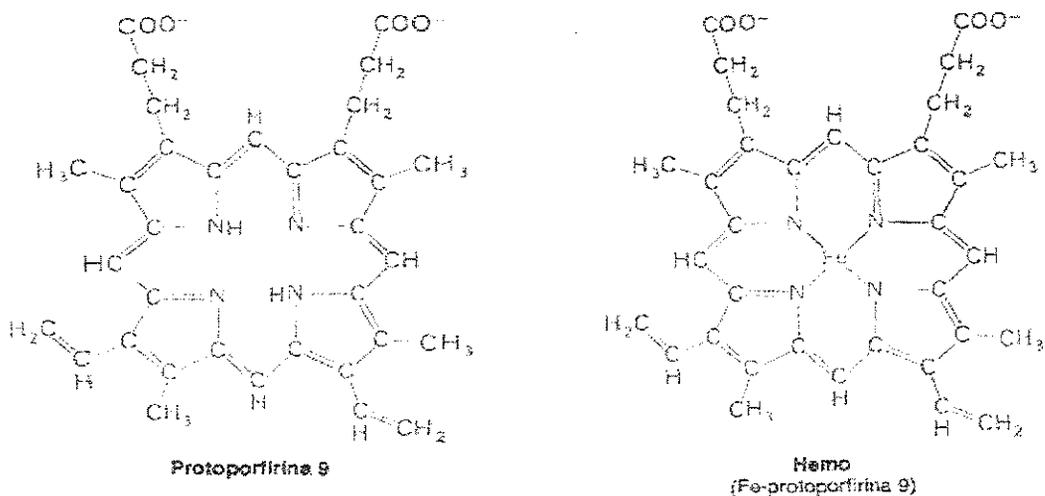


Fig. 03- Núcleo prostético (heme) da hemoglobina (STRYER, 1992).

O grupamento heme é instável, sendo oxidado rapidamente, formando-se a hemina. A hemina cristalizada é obtida aquecendo-se a solução de hemoglobina.

Dessas combinações podemos obter (FERREIRA, 1928):

- a-) Cloridrato de Hematina cuja fórmula química é $C_{34} H_{32} O_4 N_4 Fe Cl$
- b-) Iodidrato de Hematina: $C_{34} H_{32} O_4 N_4 Fe I$
- c-) Hemocrogênio: $C_{34} H_{36} O_4 N_4 Fe$
- d-) Hematoporfirina: $C_{34} H_{38} O_6 N_4$

Estes compostos poderão ser obtidos a partir do sangue “in natura”, do sangue coagulado e das manchas.

Os reagentes variam de acordo com a técnica preconizada pelo autor (FÁVERO, 1980):

a-) Teichmann:

ácido acético

⇒

Cloridrato de Hematina

b-) Amado Ferreira:

ácido láctico

álcool à 98°

c-) Strzyzowski:

ácido acético

álcool

ácido iodídrico

⇒

Iodidrato de Hematina

d-) Amado Ferreira:

ácido láctico

álcool

ácido iodídrico

e-) Donogany:

piridina

sulfidrato de amônio

⇒ Hemocrogênio

f-) Amado Ferreira:

sacarose

lactose

solução de OHK a 10%

piridina

Segundo STRYER (1992), existem cerca de trezentas espécies diferentes de hemoglobina. No homem, a molécula é aproximadamente esférica, com peso molecular de 64.400 Daltons. Na maioria das hemoglobinas humanas, a porção proteica ou globina, consiste em duas cadeias polipeptídicas diferentes, formadas por 140 resíduos de aminoácidos.

São compostas por várias cadeias polipeptídicas, que diferem nas seqüências de aminoácidos e são designados por letras gregas ($\alpha, \beta, \delta, \gamma$, etc...).

A estrutura primária da globina, isto é, a seqüência exata de aminoácidos, já foi estabelecida. Acredita-se que a estrutura primária determine, por sua vez, a forma helicoidal tridimensional das cadeias secundárias e terciárias, bem como a interação das quatro cadeias (estruturas quaternárias). As configurações terciárias e quaternárias são decisivas para a função fisiológica da hemoglobina.

Um grupo heme liga-se, de modo covalente, a cada cadeia polipeptídica, e o ferro no interior da porção hêmica encontra-se na forma divalente ou ferrosa.

Os grupos heme, na maioria dos mamíferos, não variam, mas a porção globínica exibe consideráveis variações dentro de uma determinada espécie e entre espécies diferentes.

2.1.5- ESTUDO DOS CRISTAIS DE HEMINA:

A-) Hematina:

Segundo MOREIRA (1962), trata-se de uma matéria corante, não protéica, obtida do sangue quando devidamente tratado com água quente, ácidos ou álcalis, estável até 180° e não cristalizável. Constitui uma das formas em que se apresenta o núcleo pigmentado dos glóbulos vermelhos, sendo conhecida desde os trabalhos de Tiedmann, Gmelin e Lecanau.

Existem diversos tipos de hematina, nas diferentes espécies animais, variando dentro de uma mesma espécie. Há controvérsias entre os autores com relação à sua fórmula bruta:

$C_{34} H_{25} N_5 Fe O_5$ (R. V. Zeynek);

$C_{34} H_{34} N_4 Fe O_5$ (Gautier);

$C_{32} H_{36} N_4 Fe O_5$ (Hoppe-Seyler);

Substâncias como cloratos, nitratos, ferrocianetos de potássio e anilinas, agem sobre a oxiemoglobina, transformando-a em um isômero, a metahemoglobina, matéria corante de cor cinza, cristalizável, diferindo da primeira por uma união mais estável com o oxigênio (FERREIRA, 1948):

Hemoglobina = globina + hemocromogênio

Oxiemoglobina = globina + peróxido de hemocromogênio

Metahemoglobina = globina + hematina

Oxiemoglobina→Metahemoglobina→Hemocromogênio→Hematina→
Hemina (Hematina + Halogênio).

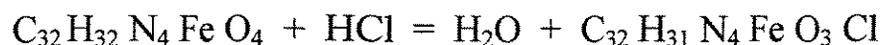
Assim, o tratamento transforma a oxi-hemoglobina em metahemoglobina e esta, por cisão, libera um núcleo ferruginoso em forma de hematina.

A hematina, núcleo ferruginoso da metahemoglobina, obtida também pela cisão da oxi-hemoglobina, é um composto em cuja fórmula encontram-se dois grupamentos carboxílicos (Rondoni, citado por PASQUALÉ (1932)).

A hematina reage, reversivelmente, com ácidos fortes, dando um produto isento de ferro, a hematoporfirina, cuja fórmula química, segundo alguns autores, seria: $C_{33}H_{38}N_4O_6$.

Segundo MOREIRA (1962), certos derivados do grupo prostético da hemoglobina podem ser obtidos cristalizados, sendo os mais pesquisados, na prática pericial, o cloreto ou cloridrato de hematina, o iodeto ou iodidrato de hematina, o brometo ou bromidrato de hematina, o hemocromogênio e a hematoporfirina. Todos os pigmentos, exceto a hematoporfirina, contém ferro. Estes compostos podem ser obtidos cristalizados, partindo-se do sangue “in natura”, em forma de manchas ou crostas.

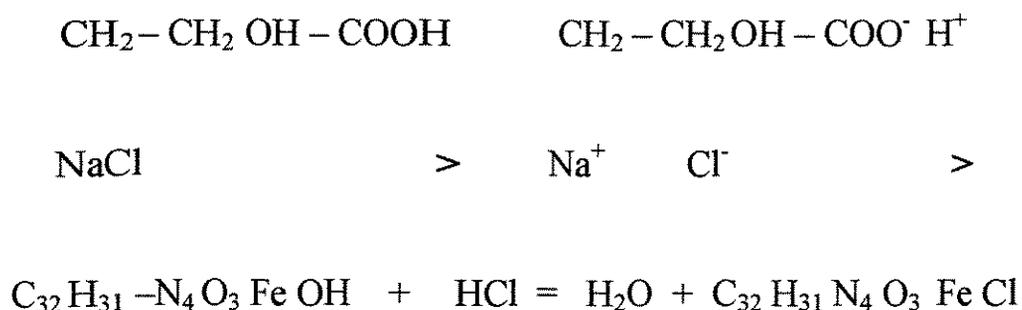
Segundo Nencki e Bialobrzieski, os cristais de Teichmann são constituídos por cloridratos de hematina, cuja molécula seria formada pela união de uma molécula de hematina com uma molécula de ácido clorídrico, sendo eliminado uma molécula de água (PASQUALÉ, 1932). A reação química seria explicada com a seguinte equação:



O cloridrato de hematina, obtido pela reação de Teichmann, é explicado pelo fato de que, na mistura do sangue com o reagente existem, dissociados, os elementos do ácido clorídrico.

A hematina tem a propriedade de se combinar com o cloro, bromo e iodo dos ácidos HCl, HBr e HI, para formar o cloridrato, o bromidrato e iodidrato de hematina, que se cristaliza em prismas do sistema rômboico. Na hematina, um átomo de cloro, bromo ou iodo, liga-se ao ferro trivalente, estando o cloro colocado ao lado do ferro da hematina.

Segundo o professor Mário Domingos de Campos, citado por PASQUALÉ (1932), esta reação é feita por dissociação iônica, sendo explicado pela seguinte equação:



Ainda, segundo Mário Domingos de Campos, os cristais de Teichmann podem ser preparados, tanto pelo ácido acético ou com outros ácidos orgânicos, sendo que o ácido acético desloca o cloro do cloreto de sódio, deixando-o em condições de reagir com a hematina, agindo também como solvente da globina. Hidrácidos de outros metalóides (halogênios) monovalentes, reagem com a hematina originando o bromidrato e iodidrato de hematina, conhecidos com a denominação genérica de heminas.

Segundo PASQUALÉ (1932), a forma dos cristais de Teichmann é variável, dependendo de fatores como o método de obtenção, a idade do material pesquisado, tempo de concentração do sangue e evaporação dos reativos, podendo ser observados como lâminas delgadas e rômbricas, com suas extremidades cortadas obliquamente em ângulo agudo. Pertencem ao sistema oblíquo de base paralelogramática. Outras formas poderão se formar, quando a cristalização for incompleta, assumindo aspectos alongados, semelhantes a grãos de arroz, de alpiste ou agulhas. Poderão ser agrupados em rosetas, estrelas ou cruces.

Os cristais de hemina poderão ser observados em microscópio óptico de pequeno aumento. Seu tamanho varia de acordo com os números de cristais que se formam em uma lâmina, variando em sentido inverso, além da temperatura de evaporação do reativo, onde temperaturas maiores que 60°C impedem a formação de cristais maiores. Sua faixa de formação está entre 40° a 60°C.

Em preparações, em que o número de cristais é grande, os cristais originados são menores, sendo os maiores formados em zonas de menor cristalização, principalmente nas margens da lâmina. Seu comprimento varia entre 1 a 60 μ .

A cor dos cristais varia com sua constituição, sendo os de clorhemina de cor cinza e os de fluorhemina de cor parda (Otto Leers); os de bromohemina de cor amarelada e os de iodhemina de cor violeta (Sarda); ambos autores citados por PASQUALÉ, 1932.

Segundo, ainda PASQUALÉ (1932), os cristais de Teichmann são insolúveis na água, no álcool, éter, ácidos clorídrico e acético a frio. São solúveis no ácido acético quente, ácido sulfúrico e álcalis concentrados, sendo que neste último, devido reversão da reação, liberam a hematina.

Para Nencki e Zaleski, a hemina obtida no método de Teichmann é provavelmente uma acetilhemina na qual, além do cloro, o radical acetil está combinado com o ferro (PASQUALÉ, 1932).

CAUSAS FAVORÁVEIS E DESFAVORÁVEIS PARA A FORMAÇÃO DOS CRISTAIS DE TEICHMANN:

a-) Idade da Mancha:

A idade da mancha não é um fator determinante para impedir a cristalização, pois Amado Ferreira, citado por PASQUALÉ (1932), obteve cristais em sangue de dois anos; Montalvi obteve cristais com sangue de quatorze anos; Scriba conseguiu cristalização com sangue de quarenta anos; Schiff, com sangue de cem anos, enquanto Vitali obteve cristais em sangue de mil e quinhentos anos e Dervieux obteve cristais em sangue de múmias de quatro mil anos.

b-) Natureza do Substrato:

Segundo autores como Lewis e Rosentein, também citados por PASQUALÉ (1932), substâncias como o ácido clorídrico concentrado, clorato de potássio em excesso, ácido sulfúrico, ferro metálico, cloretos de ferro e chumbo, sais de prata, cal, carbono e gás sulfídrico são capazes de impedir a formação dos cristais.

Substâncias como gordura (Lewis, Rosentein, Müller e Richter), o tanino (Richter, Nicoletti), anilina (Richter, Wachholz), o metanol a 4%

(Kobert, Wachholz) e o amoníaco (Salemi-Pace, Cazeneuve, Florence, Borri) não exercem influência na formação dos cristais (PASQUALÉ, 1932).

c-) Temperatura:

Segundo Katayana e Hammerl, a temperatura máxima compatível para a formação dos cristais está entre 140° a 160°c. Segundo Xavier da Costa, quando a solução é aquecida a 200°c., não há formação de cristais (PASQUALÉ, 1932).

Segundo MOREIRA (1962), o excesso de temperatura provoca a coagulação da albumina que impede, pela ação mecânica, a formação dos cristais. É aconselhável passar a lâmina sucessivas vezes acima da chama. Segundo Xavier da Costa, citado por PASQUALÉ (1932), o aquecimento excessivo do sangue, desde que não o carbonize, não constitui impedimento para a formação dos cristais.

d-) Luminosidade:

A exposição de uma mancha ao sol, altera a hemoglobina a ponto de impedir a formação dos cristais de hemina (Ferrari e Morache) (PASQUALÉ, 1932).

e-) Chuva:

Manchas de sangue expostas à chuva, devido a grande solubilidade do cloreto de sódio, dificultará ou impedirá a obtenção dos cristais de hemina pelo uso exclusivo de ácido (PASQUALÉ, 1932).

3. PROPOSIÇÃO:

Visando utilizar uma técnica simples e de certeza, para identificar a presença de sangue em locais de suspeição de crime, exigindo uma quantidade mínima de reagente, de baixo custo e de fácil obtenção (ácido acético glacial e soro fisiológico) e equipamentos simples (lâmpada a álcool, lâmina de vidro, lamínula e microscópio óptico), utilizamos a técnica de micro-cristalização do sangue preconizada por Teichmann.

Pela utilização dessa técnica, propusemo-nos a analisar:

- Se ao utilizarmos essa mesma técnica, utilizando sangue humano e sangue de animais, conseguimos observar diferenças morfológicas significativas que possam servir de parâmetro para distinguir as diferentes espécies animais;

- Se a análise dos ângulos internos dos cristais de hemina do sangue humano, comparados com os ângulos dos cristais obtidos do sangue de animais (cão, gato e galinha), fornece subsídios para diferenciar as espécies estudadas.

4. MATERIAL E MÉTODO:

4.1. Materiais Utilizados:

Os materiais utilizados neste trabalho foram os seguintes:

Lâminas de vidro 76,00 x 25,00 mm.; lamínulas celulósicas 22,00 x 22,00 mm.; microscópico ótico biocular, marca Wild - Heerbrugg - Leitz, modelo SM Lux, com objetivas 10 x 10, 40 x 10; Microscópico ótico biocular, marca Olympus, modelo BH, com máquina fotográfica acoplada, também da marca Olympus, modelo PM - 6, fotômetro da marca Olympus, modelo EMM - 7; tubos de ensaio com tampa; sangue humano fresco e em diferentes fases de coagulação; sangue de cachorro, galinha e gato; soro fisiológico a 0,9% e água destilada; ácido acético glacial P.A.; lamparina a álcool; palitos de madeira com algodão; gral e pistilo; esmalte incolor; câmera fotográfica Yashica f x 3 super 2000, lentes Yashica 28-80 com macro, flash eletrônico Mirage, modelo AT 42 e filmes de 100 e 400 ASA.

4.2. Metodologia:

Para o desenvolvimento deste trabalho, foram coletadas vinte e cinco amostras de sangue humano, sendo dez amostras obtidas diretamente de cadáveres, durante necropsias, com auxílio de seringas e espátulas, estando o sangue na fase líquida; dez amostras foram colhidas diretamente do solo e do corpo dos cadáveres, nos locais de crimes, com auxílio de espátulas, estando

o sangue coagulado; finalmente, cinco amostras foram coletadas sobre as vestes dos cadáveres, paredes e objetos, estando o sangue em fase sólida.

De cada espécie animal também foram coletadas vinte e cinco amostras de sangue, com auxílio de seringas. As amostras foram dispostas em tubos de ensaios, sendo que quinze delas foram utilizadas em fase líquida e as restantes usadas já coaguladas. Foi utilizada apenas uma amostra de sangue por pessoa e também de cada espécie animal, sendo todos adultos.

As amostras de sangue colhidas, tanto humanos como os dos animais, foram dissolvidas em soro fisiológico, seguindo a técnica desenvolvida por FERREIRA (1928), no interior de tubos de ensaio com bastões de vidro ou pipetas, no interior de um gral, com o auxílio de um pistilo ou, ainda, diretamente sobre as lâminas de vidro, de acordo com a quantidade de sangue recolhida e o seu estado físico.

Na etapa seguinte, as lâminas foram aquecidas, levemente, sobre uma lamparina a álcool, evitando-se a sua fervura, para melhor concentrá-las. Posteriormente, gotejamos sobre as mesmas ácido acético glacial P.A., continuando o aquecimento sem deixar o ácido evaporar-se completamente. Passando para outra etapa, as soluções foram cobertas com lamínulas e levemente aquecidas, sendo adicionadas novas gotas de ácido acético glacial sob as bordas das lamínulas, com o auxílio de um bastão de vidro, com o intuito de concentrar e acrescentar novas quantidades de ácido sobre as soluções.

Após repetir o acréscimo de ácido entre dez a quinze vezes, sempre observando a mudança de coloração, que no início é vermelha variando com o tempo para a cor castanha, deixamos as lâminas em repouso para esfriar.

Após o resfriamento, observamos as lâminas em um microscópico óptico, com o aumento em torno de 40 a 45 vezes. No caso de reação

positiva, apareceram os cristais de hemina. Segundo autores como FÁVERO (1980), ARBENZ (1988), e FRANÇA (1995), nos tecidos tingidos com tintas azul ou violeta (especialmente índigo), a reação poderá ser positiva mesmo na ausência de sangue, devido a presença de cristais de índigo, semelhantes aos de hemina, sendo estes últimos diferenciados dos primeiros por não serem solúveis em água oxigenada. Ainda, segundo esses autores, a utilização de oxalato de amônio pode acelerar a formação dos cristais, deixando-os com uma tonalidade escurecida.

Os trabalhos foram realizados no Setor de Toxicologia do Departamento Médico Legal de Vitória-ES, na Faculdade Estadual de Farmácia e Bioquímica do Espírito Santo, na Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Federal do Espírito Santo e na Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP-SP.

As amostras de sangue ressecadas, recolhidas nos locais de crime, foram raspadas dos suportes, com auxílio de uma lâmina ou com palitos de madeira, que continham em sua extremidade, uma mecha de algodão umedecido em soro fisiológico; o material recolhido, foi acondicionado no interior de um tubo de ensaio, para o transporte.

FERREIRA (1948), recomenda o uso de um anel de cera ou parafina, com o qual circunda as manchas. No interior da cera, o sangue será dissolvido com soro fisiológico, sendo o mesmo aspirado com seringa. O mesmo Autor também cita a técnica de Taylor, que consiste no emprego de papel de filtro embebido de soro fisiológico, sendo adaptado sobre a mancha. JÚNIOR (1957), recomenda a raspagem e a coleta da mancha ressecada em papéis, que devem ser dobrados para o transporte.

O sangue dos animais foi coletado por um veterinário, com auxílio de seringas, durante os exames de rotina, e parte do sangue foi utilizado na presente pesquisa.

As fotos foram obtidas, diretamente, em um microscópio da marca Olympus, modelo BH, do tipo biocular, com uma máquina fotográfica acoplada, também da mesma marca, utilizando-se um fotômetro. As fotos foram digitalizadas por um scanner de mesa da marca TCE, modelo S 430 com alta resolução (9600 DPI), selecionados os cristais de forma definida e gravados em formato gráfico .pcx no HD e em disquetes 3,5" para que posteriormente pudessem ser expostas num software word 7.0.

Os cristais selecionados, contido em arquivo próprio, foram abertos no programa Autocad Release 14, onde foram traçadas as linhas acompanhando os seus contornos. Em seguida foram definidos seus ângulos internos para serem medidos.

Foram estudados noventa e seis cristais, divididos em quatro grupos, de acordo com a espécie, sendo suas imagens digitalizadas e arquivadas em disquetes 3,5" e em discos compactos, assim como o presente trabalho.

O programa Autocad é uma marca registrada da Autodesk, Inc. É um software conhecido mundialmente e utilizado em várias áreas, principalmente no campo da pesquisa, na Arquitetura, Engenharias Elétrica, Mecânica e Civil.

O programa permite fazer desenhos do tipo uni, bi e tridimensional, realizar simulações, medir ângulos criar circunferências, retas, retângulos, e etc.

Uma outra alternativa, simples de ser aplicada, é a ampliação dos cristais selecionados e sua impressão, para que seus ângulos internos possam ser medidos com auxílio de um transferidor.

5. RESULTADOS:

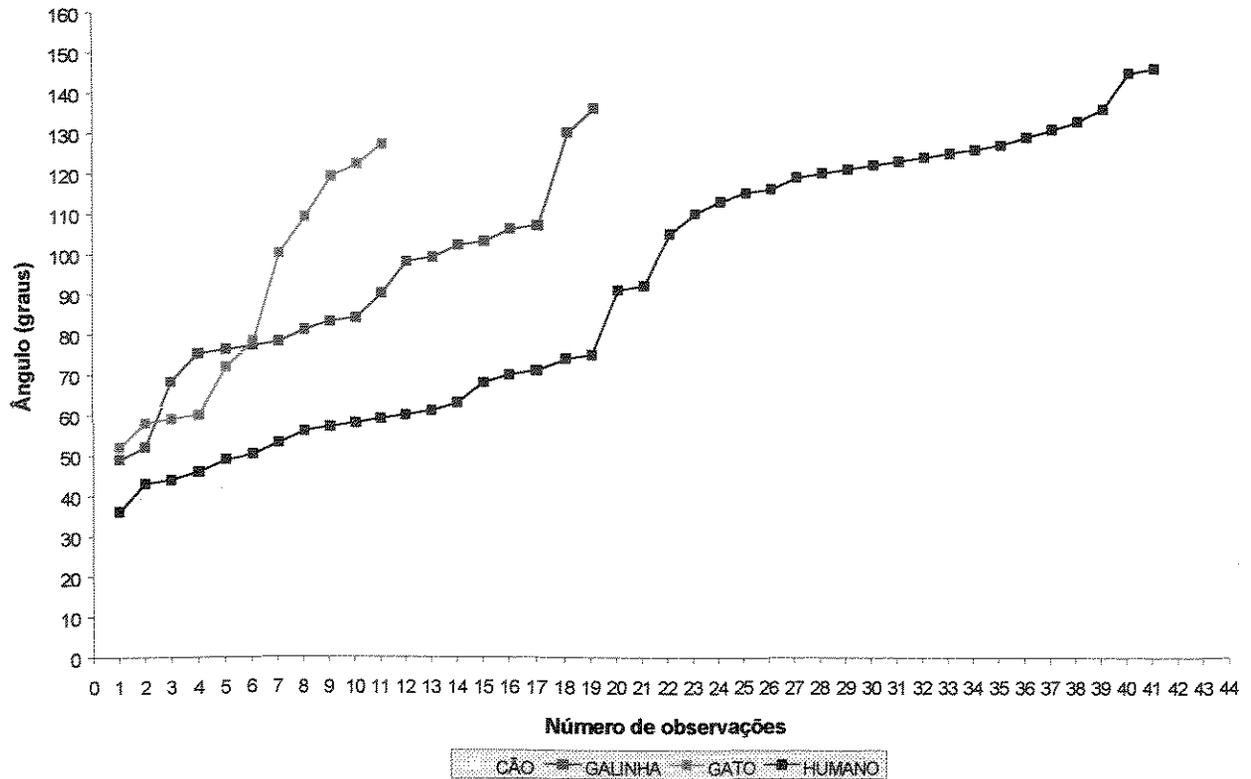


GRÁFICO 01: Número de cristais e variação de seus ângulos internos, derivados do sangue de cão, galinha, gato e humano.

Para melhor visualização, estabelecemos um padrão para o gráfico de linhas, em que a cor amarela indica os cristais derivados do sangue de cão, a rosa, os cristais do sangue de galinha, a verde, os cristais do sangue de gato e a cor negra, os cristais derivados do sangue humano.

A barra vertical representa os valores dos ângulos encontrados internamente nos cristais, enquanto a barra horizontal representa o número de cristais pesquisados.

Ao observarmos o gráfico 01, onde aparece a variação dos ângulos, podemos observar:

- Os ângulos internos dos cristais do sangue de cão (fig. 04), iniciam em **38°**, passando por 40°, 50°, 63°, elevando-se para 115°, 122°, 130° e **140°**;
- Os ângulos internos dos cristais do sangue de galinha (fig. 05), iniciam em **49°**, passando por 52°, 68°, 75°, 81°, 90°, 102° e **130°**;
- Já os ângulos dos cristais do sangue de gato (fig. 06), iniciam em **52°**, passando para 60°, 72°, elevando-se para 100° e **122°**;
- Finalmente, os ângulos internos dos cristais de sangue humano (fig. 07), começam em **36°**, passando para 43°, 50°, 60°, 70°, elevando-se para 91°, 110°, 120°, 131° e atingindo **145°**.

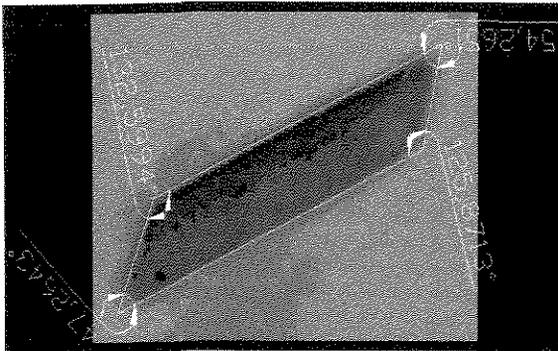


Fig. 04 Exemplo de cristal de sangue de cão.

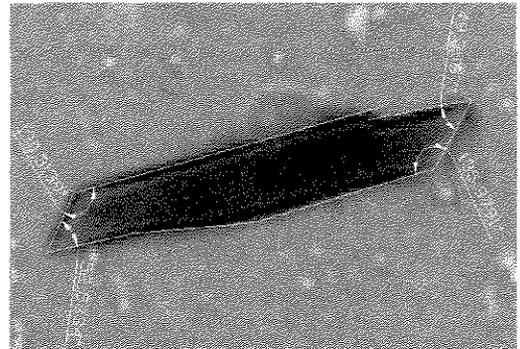


Fig. 05 Cristal de sangue de galinha.

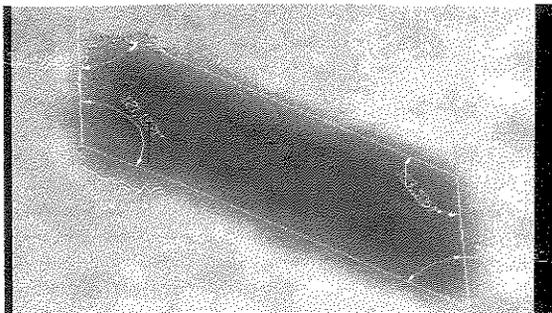


Fig. 06 Cristal de sangue de gato.

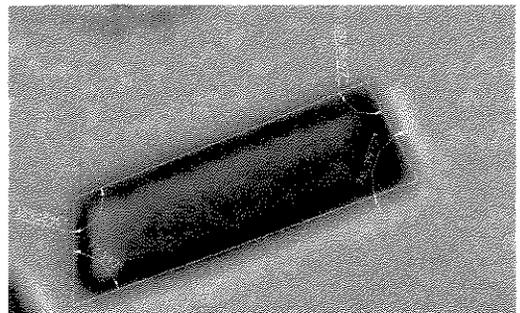
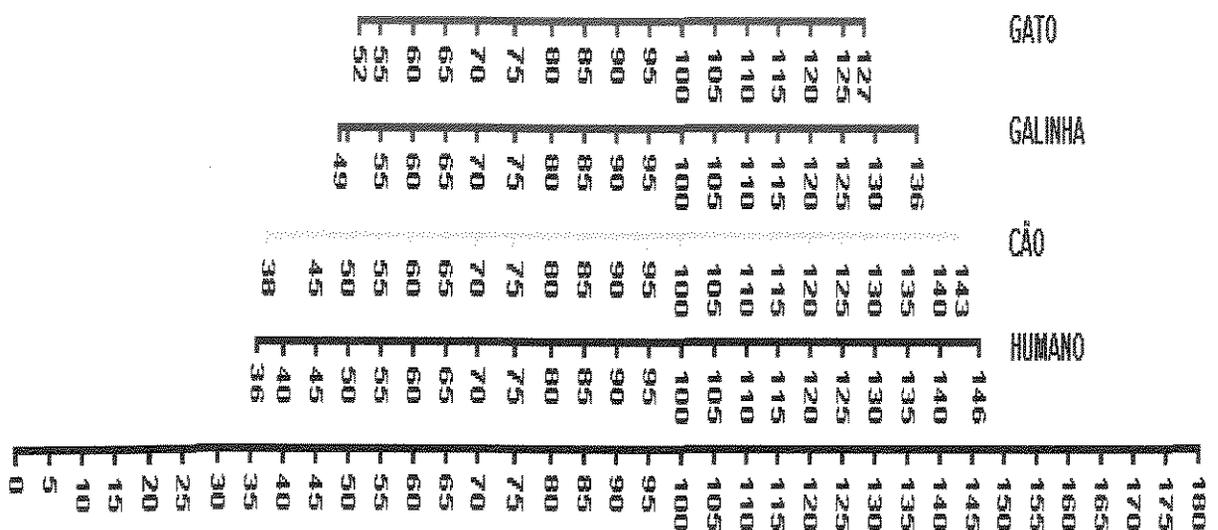


Fig. 07 Cristal de sangue humano.

As figuras 04 a 07 evidenciam que não somente as arestas dos cristais variam como também os seus quatro ângulos internos, sendo comum todos os ângulos serem diferentes no mesmo cristal.

O espectro 01 representa a variação possível dos ângulos encontrados no interior de um paralelogramo, ou seja, de 0° a 180°, sendo que esta figura a que mais se assemelha com a forma dos cristais encontrados.



ESPECTRO 01: Variação dos ângulos dos cristais do sangue humano e das diferentes espécies animais estudadas, comparados com os ângulos encontrados no paralelogramo.

Neste espectro, podemos observar, considerando as mesmas cores já padronizadas, que a variação dos ângulos internos dos cristais de sangue humano encontrados, está contida no intervalo dos ângulos do paralelogramo;

A variação dos ângulos internos dos cristais encontrados no sangue de cão, está contida no interior do intervalo dos cristais de sangue humano;

A variação dos ângulos internos dos cristais encontrados no sangue de galinha, está contida no intervalo dos cristais do sangue de cão;

A variação dos ângulos internos dos cristais encontrados no sangue de gato, está contida no intervalo dos cristais do sangue de galinha.

A tabela 01 demonstra melhor a pouca variação destes ângulos, devido a proximidade entre os menores (36° , 38° , 49° e 52°) e maiores valores dos ângulos (127° , 136° , 143° e 146°).

SANGUE	Ângulo mínimo	Ângulo máximo
CÃO	38	143
GALINHA	49	136
GATO	52	127
HUMANO	36	146

Tabela 01: Resumo dos ângulos internos dos cristais (mínimo e máximo).

Como podemos notar, na tabela 01, existem pequenas variações entre os ângulos mínimos e máximos dos cristais, principalmente entre o sangue de cão e o sangue humano (mínimos de 38 e 36 e máximos de 143 e 146 respectivamente). As demais variações, também, não são significativas.

Para facilitar o trabalho de comparação, os ângulos com números fracionários até o dígito cinco após a vírgula, foram arredondados para baixo, enquanto os números acima deste valor foram arredondados para cima.

Também foi observado que, em manchas de sangue humano, recolhidas em local de crime, e o sangue dos animais estudados, quando utilizado coagulado, originam mais rapidamente os cristais, devido a

seqüência de alterações que ocorrem no sangue, estar numa fase mais avançada em relação ao sangue fresco.

Também foi observado que os cristais derivados do sangue humano, conseguem manter sua forma por mais tempo, em relação aos cristais derivados do sangue dos outros animais, sendo que estes últimos apresentam alterações significativas após dez horas, mesmo estando as margens das lamínulas isoladas do ar e as lâminas devidamente guardadas numa caixa, longe da luz.

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS:

Visando contribuir com a Ciência Forense, fizemos pesquisas utilizando o sangue de animais, seguindo a técnica de microcristalização dos cristais de hemina, preconizada por Teichmann, e as comparamos com os trabalhos de autores consagrados, da área da Medicina Legal, como Amado Ferreira e Flaminio Fávero.

O primeiro autor, para identificar os cristais de Teichmann no sangue humano, utilizou o ácido láctico como reagente enquanto, neste trabalho, foi utilizado o ácido acético glacial. A análise de nossos resultados permitem, à semelhança do trabalho de Amado Ferreira, identificar os cristais de Teichmann no sangue humano (fig. 08).

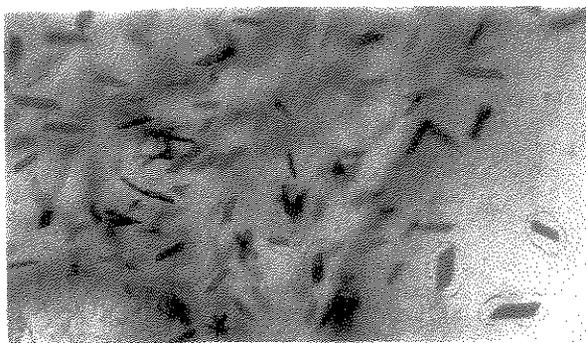


Fig. 08 - Cristais de Teichmann no sangue humano.

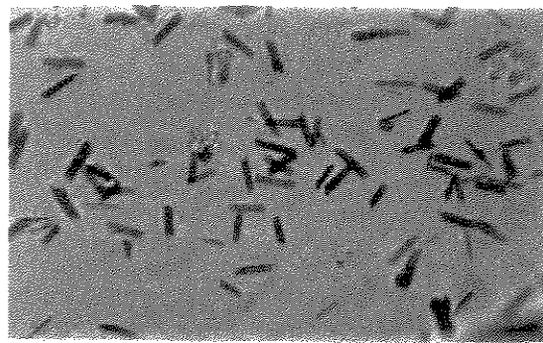


Fig. 09 - Cristais no sangue de cão.

As figuras 09, 10 e 11, permitem afirmar que cristais morfologicamente semelhantes foram obtidos pela mesma técnica no sangue dos animais estudados, sendo observadas diferenças no número, na cor e na birrefringência dos cristais formados. Dessa forma, somente profissionais experientes podem diferenciar o sangue humano do sangue de outros

animais, inviabilizando a identificação morfológica da espécie animal a qual pertence o sangue.

Pela medição dos ângulos internos dos cristais, foram encontrados valores que estão contidos na figura do paralelogramo, sendo esta figura a que mais se assemelha com os cristais originados.

Cada espécie animal estudada, possui um intervalo de valores que sempre está contida no intervalo de valores de outra espécie pesquisada.

Observando as fotografias das lâminas de sangue humano, de autores como Amado Ferreira e Carlos Pasqualé, notamos que nem todas as arestas dos cristais de cloremina são regulares, variando de reta a curvilínia. Isto pode ser comprovado, também, pelas figuras 07 e 08 deste trabalho.

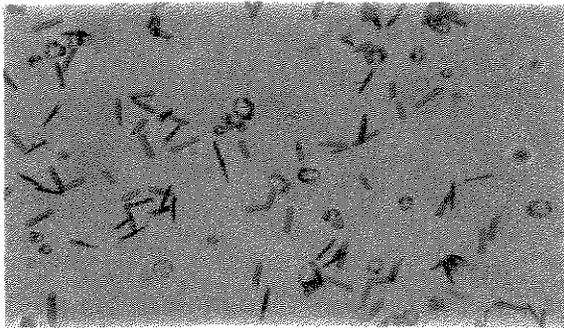


Fig. 10 - Cristais no sangue de gato.

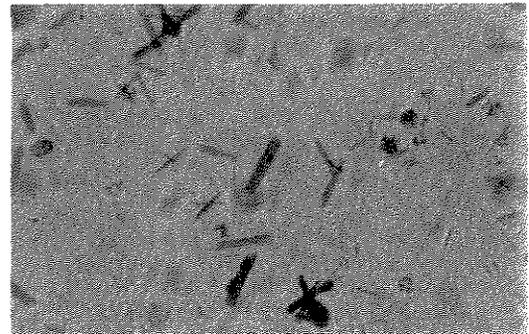


Fig. 11- Cristais no sangue de galinha.

Devido os valores extremos dos ângulos internos encontrados nos cristais serem muito próximos, tanto nos valores mínimos, quanto nos máximos, não houve a possibilidade de utilizarmos cálculos estatísticos.

Os animais pesquisados, foram selecionados devido sua proximidade com o homem, tanto na área rural quanto urbana, servindo de referência para as outras espécies, e, devido ao inter cruzamento dos valores encontrados e a conseqüente impossibilidade de distinção das espécies estudadas, não ampliamos o número de amostras.

O presente trabalho teve como meta, o estudo da morfologia e dos ângulos internos dos cristais, apesar de serem notadas diferenças na cor, na birrefringência, no tamanho e no número dos cristais originados entre as diferentes espécies, sendo mais evidente estas diferenças nos cristais formados no sangue de gato e de galinha.

Quanto a forma, os cristais formados de sangue humano, são os que mais se aproximam da forma de um paralelogramo.

Os cristais originados do sangue de gato e de galinha, possuem maior variedade no tamanho, número e forma, sendo mais alongados, apresentando uma coloração amarelada e clara.

Assim, a técnica utilizada permite definir, morfologicamente, se o material em questão é sangue, pela formação dos cristais e pelas características que os mesmos apresentam, mas não é possível determinar a espécie animal a qual o sangue pertence, levando-se em conta os ângulos internos dos cristais.

Pelo mesmo estudo, entretanto, podemos afirmar que a presença dos cristais de Teichmann é prova de certeza de sangue humano; não podemos, entretanto, pela metodologia empregada, diferenciar, em manchas levantadas em locais de crime, o sangue humano do sangue de animais, analisados no presente experimento.

Os cristais do sangue de outros animais (não humanos) são, semelhantes, morfologicamente aos cristais de sangue humano, podendo ser notadas diferenças quanto ao número, cor e birrefringência dos cristais. As diferenças morfológicas dos cristais, somente poderão ser observadas por profissionais com experiência na confecção deste tipo de lâmina.

7. CONCLUSÕES:

Pelos resultados obtidos, podemos concluir que:

1- A técnica de obtenção dos cristais de hemina descrito por Teichmann, somente poderá considerada como técnica de certeza quando for utilizada por profissionais experientes, que consigam diferenciar os cristais originados do sangue humano do sangue de outros animais domésticos (gato, galinha e cachorro), através da cor e birrefringência da luz, dada a semelhança morfológica que estes cristais apresentam;

2- Considerando os valores encontrados no espectro dos ângulos, o intervalo dos ângulos internos dos cristais do sangue de cão, gato e galinha, estão contidos no intervalo dos ângulos internos dos cristais do sangue humano, portanto, o intervalo dos ângulos do sangue humano contém as variáveis encontradas nos ângulos dos cristais das espécies estudadas;

Portanto, não há intervalos distintos para cada espécie animal pesquisada.

3- Do mesmo modo, a análise comparativa dos ângulos internos dos cristais formados, tanto no sangue humano quanto no sangue dos animais estudados, pela técnica preconizada por Teichmann, não diferencia o sangue humano do sangue das espécies analisadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

ARBENZ, G.O. **Medicina legal e antropologia forense:** hematologia forense. São Paulo: Atheneu, 1988. p.75-82.

BROWN, E.M., DELLMANN **Histologia veterinária.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p.66-87.

DÓREA, L.E.C. **As manchas de sangue como indícios em local de crime:** morfologia. Bahia: Franco Produções, 1989. p.13-47.

FÁVERO, F. **Medicina legal:** hematologia legal. 11. ed. São Paulo: Martins, 1980. p.183-193.

FERREIRA, A.A. **Cristais de Teichmann, contribuição para o seu estudo.** São Paulo: Irmãos Ferraz, 1928. p.3-13.

_____. **A perícia técnica em criminologia e medicina legal.**
São Paulo: Revista dos Tribunais, 1948. p.267-275.

_____. **Da técnica médico-legal na investigação forense:**
diagnose específica do sangue. São Paulo: Revista dos Tribunais, 1962. Vol. I, p.368-375.

FONSECA, A. **Biologia:** sistema circulatório dos mamíferos. São Paulo: Ática, 1980. p.227-231.

- FRANÇA, G.V. **Medicina legal**: identificação médico-legal. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1995. p.30.
- GUYTON, A.C. **Tratado de fisiologia médica**: visão geral da circulação e a física médica da pressão, do fluxo e da resistência. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992. p.132-137.
- HARPER **Bioquímica**: proteínas: mioglobina & hemoglobina. 7. ed. São Paulo: Atheneu, 1994. p.50-59.
- JÚNIOR, A.A. **Lições de medicina legal**: manchas de sangue – grupos e tipos sangüíneos. 4. ed. Rio de Janeiro: Nacional de Direito, 1957. p.77-88.
- JUNQUEIRA, L.C., CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. p.235-239.
- LEAVEL, B.S., JÚNIOR, O.A.T. **Hematologia clínica**: eritropoiese e o metabolismo da hemoglobina. 4. ed. São Paulo: Interamericana, 1979. p.18-28.
- LEHNINGER, A. L. **Princípios da bioquímica**: proteínas globulares: estrutura e funcionamento da hemoglobina. São Paulo: Savier, 1984. p.127-143.

MOREIRA, O. P. **O sangue e os grupos sangüíneos humanos em medicina legal**: o exame de sangue em medicina legal. Belo Horizonte: Saraiva, 1962. p.179-193.

PASQUALÉ, C. **Sobre duas modificações do método de Strzyzowski para a obtenção dos cristais de Teichmann**. São Paulo: Revista dos Tribunais, 1932. p.7-50.

SMITH, C.H. **Hematologia pediátrica**: as hemoglobinas humanas; distúrbio da granulocitopoiese. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p.352-479.

STRYER, L. **Bioquímica**: proteínas transportadoras de oxigênio: mioglobina e hemoglobina. Rio de Janeiro: 3. ed. Guanabara Koogan, 1992. p.117-133.

WHITE, A., HANDLER, P., SMITH, E. L. **Princípios da bioquímica**: sangue: composição do plasma. proteínas plasmática. coagulação do sangue. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1976. p.665-687.

VANDER, A.J. **Fisiologia humana**: circulação. São Paulo: Mc Graw-Hill, 1981. p.291-377.

VANRELL, J.P. **Manual de medicina legal**: cronotanatognose. São Paulo: Direito, 1996. p.168.

BIBLIOGRAFIA:

- ALCÂNTARA, H.R. **Perícia médica judicial:** sangue. São Paulo: Guanabara, 1982. p.297- 301.
- COSTA, A. C., CHAVES, P.R. **Tratado elemental de histologia y anatomia microscópica.** Buenos Aires: Científico-Médica, 1953. vol.1, p.260-269.
- COMARCK, D. H. **Histologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1984. p.103-106.
- DARUGE, E., MASSINI, N. **Ensaio e sistematização sobre o ensino da odontologia legal e deontologia:** sangue: importância do seu estudo em odontologia legal. São Paulo: Fop-Unicamp, 1975. p. 311-316.
- DI FIORI, M.S.H. **Diagnóstico histológico.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1960. p.401-431.
- GOMES, H. **Medicina legal:** genética forense. 32. ed. Rio de Janeiro: Freitas Bastos, 1997. p.840-841.
- WEART, P.R., BURKITT, H.G., DANIELS, V.G. **Histologia funcional.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1982. p.24.

ZARZUELA, J.L. **Aspectos biológicos do sangue de interesse criminalístico - estudo sumário.** São Paulo: Arquivos da Polícia Civil do Estado de São Paulo, 1982. p.155-159.