

**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO ACADÊMICO DE ENGENHARIA QUÍMICA
ENGENHARIA QUÍMICA**

ROBERTO MATTOS MENDES CAMARGO

**REAGENTE DE BIURETO COMO FERRAMENTA FORENSE PARA
DETECÇÃO DE SÊMEN SIMULADO**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PONTA GROSSA

2019

ROBERTO MATTOS MENDES CAMARGO

**REAGENTE DE BIURETO COMO FERRAMENTA FORENSE
PARA DETECÇÃO DE SÊMEN SIMULADO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química, do Departamento de Engenharia Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Matheus Pereira Postigo

PONTA GROSSA

2019



TERMO DE APROVAÇÃO

Reagente de Biureto como ferramenta forense para detecção de sêmen simulado

por

Roberto Mattos Mendes Camargo

Monografia apresentada no dia 29 de novembro de 2019 ao Curso de Engenharia Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Câmpus Ponta Grossa. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof. Dr. Matheus Pereira Postigo
(UTFPR)
Orientador

Prof. Dr. Mario José van Thienen da Silva
(UTFPR)

Profa. Dr. Eduardo Bittencourt Sydney
(UTFPR)

Profa. Dra. Juliana de Paula Martins
Responsável pelo TCC do Curso de Engenharia Química

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do Curso

Dedico este trabalho à minha família
e amigos, por serem ouvidos às
minhas teorias por longos anos.

AGRADECIMENTOS

Ao longo da jornada de 3 anos de pesquisa sobre este tema, devo agradecer a inúmeras pessoas.

Inicialmente, ao meu orientador Prof. Dr. Matheus Pereira Postigo, por ser o parceiro não apenas nesta jornada de pesquisa, mas também colaborador do desenvolvimento do meu Ikigai.

Aos meus amigos Jun, Victor, Luis e Carla, agradeço pela colaboração e apoio físico e moral necessário para este trabalho.

Aos meus amigos Igor, Jan, Lucas e Leonardo, por não estarem fisicamente apoiando o projeto, mas tomaram seus tempos para ler e me ajudar a aprimorar meu trabalho.

À minha família e a todos os profissionais da área relacionada que colaboraram, por fornecerem seus preciosos tempos para que nada aqui realizado fosse em vão.

Ao meu irmão Pedro, por apoiar a parte computacional da pesquisa, com o desenvolvimento da inteligência artificial, essencial para o projeto.

E, por último, mas não menos importante, ao Foo Fighters, responsáveis pelas músicas que tornaram possível a motivação de escrever esse trabalho em plena madrugada.

"Qualquer tecnologia suficientemente
avançada é indistinguível da magia".
Arthur Charles Clarke, 1973

RESUMO

CAMARGO, Roberto Mattos Mendes. **Reagente de Biureto como ferramenta forense para detecção de sêmen simulado**. 2019. 37.Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Ponta Grossa, 2019.

Diante dos diversos métodos forense existentes, buscamos analisar o reagente de Biureto como ferramenta forense que possa contornar os falsos-positivos e negativos conhecidos dos métodos tradicionais. O reagente de Biureto possui reação característica com mudança de coloração azul para violeta ao entrar em contato com solução proteica, sendo um ponto para fácil aplicação *in loco*. Para os outros métodos de aplicação, buscamos investigar a aplicação por método esfregado e espectrofotométrico. Na situação de conflito de coloração de reação e tecido, a possibilidade de aplicação de métodos de inteligência artificial é um modo de contornar o problema, dada a sensibilidade do computador em reconhecimento de cores. Todos os métodos estudados para aplicação mostraram-se promissores, exceto pela inteligência artificial, que ainda se encontra em desenvolvimento. Os resultados obtidos foram bastante satisfatórios, mostrando o reagente de Biureto como ótimo potencial para aplicação forense real.

Palavras-chave: biureto; ciência forense; química forense;

ABSTRACT

CAMARGO, Roberto Mattos Mendes. **Biuret reagent as forensics tool for simulated semen detection.** 2019. 37. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Federal Technology University - Parana. Ponta Grossa, 2019.

Given the various existing forensic methods, we seek to analyze the biuret reagent as a forensic tool that can circumvent the known false positives and negatives of traditional methods. The biuret reagent has a characteristic reaction with a blue to violet color change upon contact with a protein solution, making it a point for easy on-site application. For other application methods, we sought to investigate the application by smearing and spectrophotometric method. In the case of conflicting reaction and tissue staining, the possibility of applying artificial intelligence methods is a way around the problem, given the sensitivity of the computer in color recognition. All the methods studied for application were promising except by artificial intelligence, which is still under development. The results obtained were quite satisfactory, showing the biuret reagent as a great potential for real forensic application.

Keywords: biuret test; forensics science; forensics chemistry;

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Reação do Luminol, mostrando antes e depois, respectivamente	11
Figura 2. Mecanismo de reação do Luminol.....	12
Figura 3. Reagente de Biureto aplicado em caldo de carne, sendo A, a referência, e B em diante concentrações crescentes do caldo	15
Figura 4. Adição de gradiente de imagens de guepardo em imagem de gavião	17
Figura 5. Gráfico Precisão x Número de fotografias.....	18
Figura 6. Aplicação por metodologia <i>in loco</i>	20
Figura 7. Metodologia de esfregaço e espectrofotômetro	21
Figura 8. Criação e separação da base de imagens	22
Figura 9. Reagente de Biureto sem reação (à esquerda), e com soluções protéicas (ao centro e à direita).....	23
Figura 10. Reagente de biureto preparado com ácido cítrico.....	25
Figura 11. Reagente de Biureto	26
Figura 12. Modo de aplicação por spray, <i>in loco</i>	27
Figura 13. Tecidos com e sem sêmen simulado, respectivamente, após aplicação do reagente	27
Figura 14. Reação do Biureto sob aplicação de spray de hidróxido, antes e depois, respectivamente	28
Figura 15. Método de coleta por esfregaço	29
Figura 16. Coleta de solução salina e sêmen simulado, respectivamente	29
Figura 17. Varredura do reagente de Biureto	30
Figura 18. Gráfico da primeira derivada da varredura	30
Figura 19. Curva de calibração Concentração (g/L) x Absorbância	31
Figura 20. Tecido com reação do Biureto	32
Figura 21. Tecido sem reação do Biureto	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Interferentes relacionados ao reagente de Biureto.....	16
Quadro 2. Comportamento das soluções com $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6 mM	24
Quadro 3. Comportamento das soluções com $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 30 mM.....	24
Quadro 4. Comportamento das soluções com $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 60 mM.....	24
Quadro 5. Comportamento das soluções com $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,3 M	25
Quadro 6. Absorbância x Concentração (g/L)	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1. QUÍMICA FORENSE.....	14
2.2. REAGENTE DE BIURETO	15
2.3. DEEP LEARNING	16
3. MATERIAIS E MÉTODOS	19
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
4.1. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO E AGENTE COMPLEXANTE.....	23
4.2. METODOLOGIA <i>IN LOCO</i>	26
4.3. MÉTODO DO ESFREGAÇO E ESPECTROFOTOMÉTRICO	28
4.4. METODOLOGIA DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL	32
5. CONCLUSÃO	34
6. REFERÊNCIAS.....	35

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios do processo civilizatório da sociedade a perícia criminal, é considerada como uma ação destinada a proporcionar provas periciais a investigações judiciais.

No ramo da química forense, o primeiro caso documentado envolvendo a química na perícia criminal ocorreu no século XIX, no caso Mary Blandy, um caso em que a ciência foi aplicada a um suposto envenenamento por arsênio na Inglaterra.

No século XXI, com a evolução da ciência, a gama de ferramentas químicas que podem ser utilizados na solução de crimes cresceu de forma a originar bibliografias destinadas a informar o perito dos diversos métodos para buscar a prova pericial, como o *handbook* de química forense de Kobilinsky.

Na análise de fluidos biológicos, com maior destaque ao sangue e sêmen, a gama de ferramentas varia de análises visuais a ensaios imunocromatográficos. Dentre os métodos para a detecção de sêmen, o uso de luz ultravioleta é um dos métodos de detecção mais antigos, datado de 1927. Porém, o método é inconclusivo, podendo ocorrer diversos falsos-positivos.

No caso do sangue como prova, o Luminol é uma das ferramentas oxirredutoras mais utilizada no mundo para detecção de sangue. O Luminol possui uma reação característica de quimiluminescência, isto é, a liberação de energia em forma de luz, ao acontecer a reação, como visto na figura 1.

Figura 1. Reação do Luminol, mostrando antes e depois, respectivamente



Fonte: De Vasconcellos; De Paula (2017)

Porém, é uma ferramenta importada e de custo elevado, chegando ao

valor de 0,97dólares¹ por ml de solução, sendo assim um método de alto valor para utilização em cenas do crime. Não obstante, o mecanismo de reação que ocorre no Luminol é no íon Fe^{2+} presente na hemoglobina, como visto na figura 2, que em diversos casos pode ocasionar falso-positivos ou falso-negativos.

Figura 2. Mecanismo de reação do Luminol



Fonte: De Vasconcellos; De Paula (2017)

Na busca por uma alternativa de menor custo e ampla para utilização forense, analisamos a possibilidade de utilizar o reagente de Biureto como reagente químico forense. O reagente de Biureto já possui documentação na literatura que trabalha especificamente com sêmen, e possui preço extremamente baixo comparado ao Luminol, custando apenas 0,00037 dólares² por mililitro.

A especificidade da reação do reagente de Biureto com proteínas, e a mudança visível de cor é um ponto positivo ao se comparar o reagente de Biureto aos métodos tradicionais forenses destinados aos fluídos biológicos, contornando falsos-positivos ou negativos de interferentes externos.

Já com o conhecimento de que a cor é um item fundamental na reação do Biureto, a busca por ferramentas que possam contornar situações de conflitos de coloração é fundamental. O uso de inteligência artificial pode ser eficiente, visto que o computador é capaz de reconhecer mais de 16 milhões de cores diferentes, logo, variações mínimas de cor em um tecido, resultantes de reação, podem ser percebidas por um computador, mas não pelo olho humano,

¹Cotação do preço Luminol feito com a representante da Sirchie no Brasil, na data de 17 de abril de 2017

²Cotação do dólar do dia 14 de julho de 2019

tornando assim, a máquina como uma potente aliada na ciência forense.

O trabalho abordou a temática da possibilidade de uso do reagente de Biureto como possível ferramenta complementar forense, através do estudo de viabilidade de aplicação do reagente, pela análise da concentração ideal do reagente, pelos métodos de aplicação em campo e laboratoriais, como os métodos *in loco*, esfregaço e espectrofotométrico, e pelo contorno de possíveis empecilhos decorrentes de superfícies analisadas e coloração da reação. de contorno de conflitos da reação em relação à coloração dos tecidos.

Com a indicação literária que nos dá apoio ao uso do reagente como ferramenta forense, o objetivo da pesquisa é avaliar o reagente de Biureto como possível reagente forense, e especificamente, as formas de aplicação e análise do material a ser coletado, visto sua vasta aplicação possível na quantificação de proteína, composto fundamental em fluídos biológicos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. QUÍMICA FORENSE

Na ocorrência de um crime, é o ato da perícia criminal que responde pela responsabilidade de investigação e obtenção das evidências para o julgamento.

Datando a perícia criminal, documentos relatam nos tempos antigos, de médicos redigindo relatórios de ferimentos, à inspetores especializados em geometria e medição de áreas, enviados pelo rei por requisição de lesados por perda de terreno (DA SILVA, 2010).

Rodrigues et al. (2012, p. 855), ressalta que “a perícia criminal desempenha um papel relevante na rede interorganizacional de segurança pública e justiça criminal. O valor essencial do serviço é fazer o link entre a ciência e a justiça.”.

A química como proporcionadora da prova pericial ocorreu apenas no século seguinte, no assassinato de Gustave Fougnyes. A vítima era cunhado do conde Hippolyte Visart de Bocarmé, que junto com a irmã da vítima, teria obrigado Gustave a ingerir óleo da planta de tabaco. O químico belga Jean Servais Stas (1813-91) foi responsável por provar o envenenamento pela planta.

Como não havia métodos destinados à busca de evidências no ramo da química, foi o caso Fougnyes que deu início à química forense, ao criar um método inédito que culminou na evidência necessária para prender os responsáveis pelo crime.

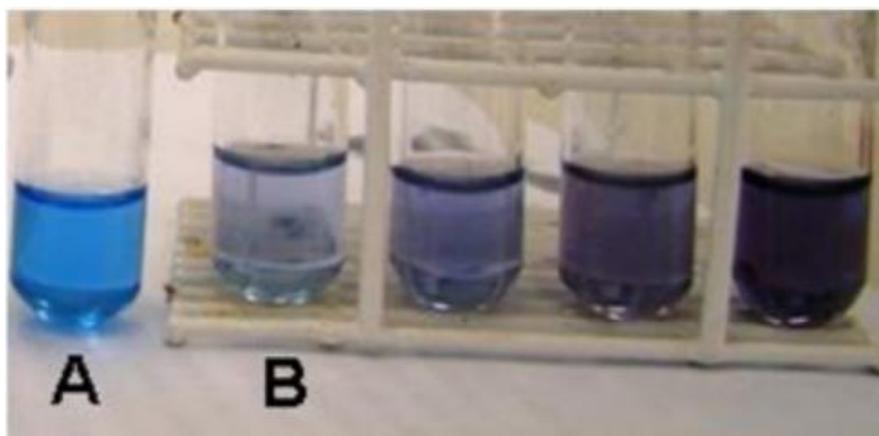
Prosseguindo com sua análise dos órgãos de Gustave, Stas conseguiu elaborar um método para detectar a presença de nicotina no corpo. [...] Stas foi capaz de identificar a presença de nicotina nos órgãos de Gustave, e Heughebaert pôde prender e condenar os Bocarmés pelo assassinato de Gustave. (NEWTON, 2007, p.3)

O início da química forense no século XIX foi lento, mas é no século XXI que a gama de ferramentas possíveis se tornou densa e ampla, criando uma grande área na ciência forense, em que a química é uma das primordiais aliadas na investigação criminal.

2.2. REAGENTE DE BIURETO

O reagente ou método de Biureto, de acordo com Zaia et al. (1998), se baseia na complexação do cobre em solução, em conjunto com hidróxido de sódio, reagindo com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica, gerando bandas de absorção em 270 e 540 nm (FIGURA 3).

Figura 3. Reagente de Biureto aplicado em caldo de carne, sendo A, a referência, e B em diante concentrações crescentes do caldo



Fonte: De Almeida et al. (2013)

A geração de bandas de absorção é um ponto fundamental na ação do Biureto, pela mudança de coloração visível a olho nu, caracterizando uma fácil observação de reação. A ampla utilização já é reconhecimento pela literatura, principalmente na quantificação de proteínas.

As origens do método do Biureto podem ser traçadas desde a proposta inicial de Autenrieth, em 1915; [...] tem sido aplicado para determinar a concentração de proteínas totais em diversos meios, sendo eles: soro ou plasma sanguíneo, líquido cérebro espinal (líquor), urina, saliva, alimentos” (ZAIA et al., 1998, p. 787)

A simplicidade da reação do Biureto acaba possibilitando a ação de interferentes, que podem, numa aplicação específica, acabar sendo um ponto negativo. Existem interferentes conhecidos para o reagente de Biureto (Quadro 1):

Quadro 1. Interferentes relacionados ao reagente de Biureto

INTERFERENTES	COMENTÁRIOS
Bilirrubina	Absorve em 540 nm, sério interferente acima de 70 mg/L.
Amônio	Sulfato de amônio usado como precipitante de proteínas; em meio alcalino amônia complexa cobre.
Lipídios	Provocam turbidez nas amostras, com conseqüente aumento da absorção das mesmas.
Hemoglobina	Aumenta a absorção das amostras.
Dextran-40 e 70	Causa turbidez nas amostras, em meio alcalino com tartarato, devido à formação de um complexo insolúvel entre o dextran e cobre.
Peptídeos e aminoácidos livres (His, Ser, Thr)	Reagem com cobre, sendo interferentes em métodos baseados em cinética de reação.
Melanina	Provoca falso positivo
Tampão tris-HCl e glicose	Reage com o cobre presente no reativo de biureto.
Lactose	Provoca falso positivo
Amido	Provoca falso positivo

Fonte: Zaia et al. (1998)

A ação de interferentes com o reagente é extremamente circunstancial, ocorrendo apenas em algumas situações, dependendo da solução a ser analisada.

Com o conhecimento do princípio de reação do reagente de Biureto, e dos possíveis interferentes que podem ser empecilhos, conhecer a melhor forma de aplicação do reagente de Biureto e aplicações ideais

2.3. DEEP LEARNING

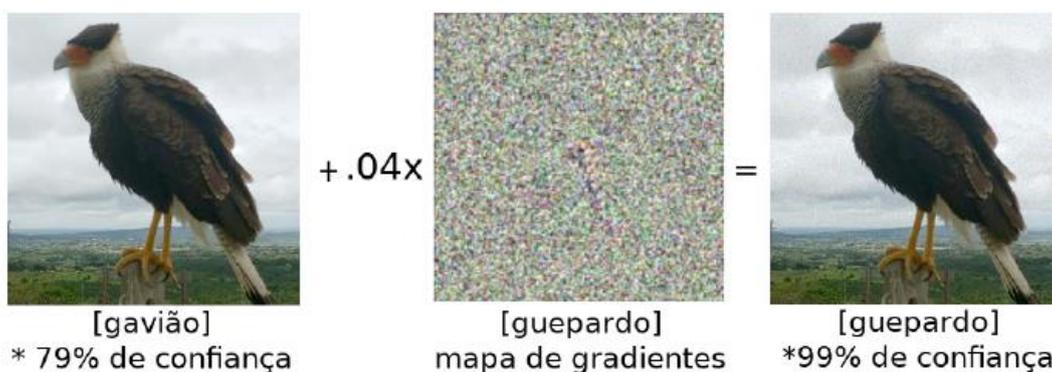
Deep Learning é uma evolução da inteligência artificial, utilizando redes neurais mais profundas, com mais camadas de processamento, possibilitando melhores resultados.

De acordo com Ponti e Da Costa (2017), Deep Learning revolucionou diversas áreas de aprendizado de máquina, principalmente pela disponibilidade de base de dados com milhões de dados e computadores com tempo de

processamento reduzido.

Porém, existem estudos que mostram que, mesmo em tarefas triviais, o Deep Learning pode falhar em classificação, ao por exemplo, se adicionar ruídos em imagens, como pode ser visto na figura 4. Outros exemplos de falha de classificação são imagens invertidas, ou apenas ruídos característicos de uma classe.

Figura 4. Adição de gradiente de imagens de guepardo em imagem de gavião



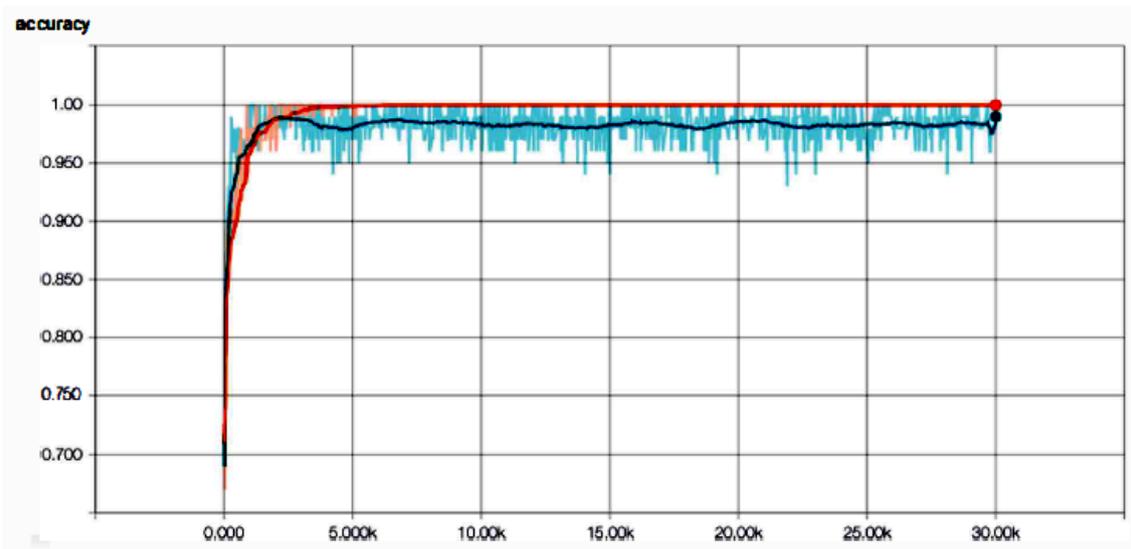
Fonte: Ponti e Da Costa (2017)

Uma das principais *framework* de uso de Deep Learning é o TensorFlow, criado pelo time Google Brains, e utilizado pela maior ferramenta de pesquisa da internet, o Google, além de diversas outras ferramentas que dependem de processamento profundo de inteligência artificial.

Abadi et al. (2016) mostra que o TensorFlow é capaz de suportar diversas aplicações, com foco em treinamento e inferência em redes neurais profundas.

Um dos pontos fundamentais do Deep Learning é a necessidade de uma base de dados maior comparada à Machine Learning e inteligência artificial padrão. Xia et al. (2017) mostra que, para classificação de espécies de flores, melhores resultados de classificação foram obtidos com banco de dados de milhares de fotografias, mas resultados plenamente satisfatórios só foram alcançados com banco de dados com quase 30 mil fotografias, com precisão de classificação de quase 100%. Esta análise pode ser feita pelo gráfico presente na figura 5.

Figura 5. Gráfico Precisão x Número de fotografias



Fonte: Xia et al. (2017)

Com bancos de dados suficientes, o Deep Learning pode ser um método de classificação de dados extremamente eficiente e amplo, para qualquer ramo, desde métodos numéricos, até classificação de fotografia de reações químicas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para o estudo da concentração do reagente de Biureto, utilizamos um protocolo de preparo padrão, para que a partir deste fossem alteradas as concentrações (Camargo et al, 2017). O protocolo de preparo original é:

- Sulfato de Cobre II penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 6 mmol/L;
- Tartarato duplo de sódio e potássio 0,021 mol/L;
- Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,75 mol/L.

O sêmen simulado para o experimento é uma solução de ovalbumina, em concentrações de 0,5 g/L; 1 g/L; 2,5 g/L; 5 g/L e 10 g/L. Para auxiliar na solvatação da ovalbumina, cloreto de sódio em concentração 0,5 mol/L na solução de ovalbumina é adicionado (Machado et al., 2007).

Para o preparo do reagente de Biureto e das soluções de ovalbumina, será utilizado:

- Balão volumétrico de 100 ml;
- Béquer;
- Balança analítica;
- Água destilada;
- Agitador magnético

O preparo do reagente de Biureto será realizado pesando as massas dos reagentes em um béquer, solvatado em água destilada, e avolumado no balão volumétrico para o volume de 100 ml. O sêmen simulado será feita pesando 1 g de ovalbumina em um béquer e 2,925 g de NaCl. Solubilizando com água destilada, será utilizado o agitador magnético para auxiliar no processo, e após a solvatação completa, será transferido para um balão volumétrico, e avolumado a 100 ml. Para as concentrações menores de ovalbumina, serão retirados 50 ml da solução e diluídos em outro balão volumétrico de 100 ml, de forma seriada para cada nova solução, até possuir todas as concentrações desejadas.

Também serão preparadas soluções do reagente do Biureto realizando a variação de concentração dos reagentes. Variou-se as concentrações³ em 5, 10 e 50 vezes, para verificar a intensidade da reação do Biureto com as

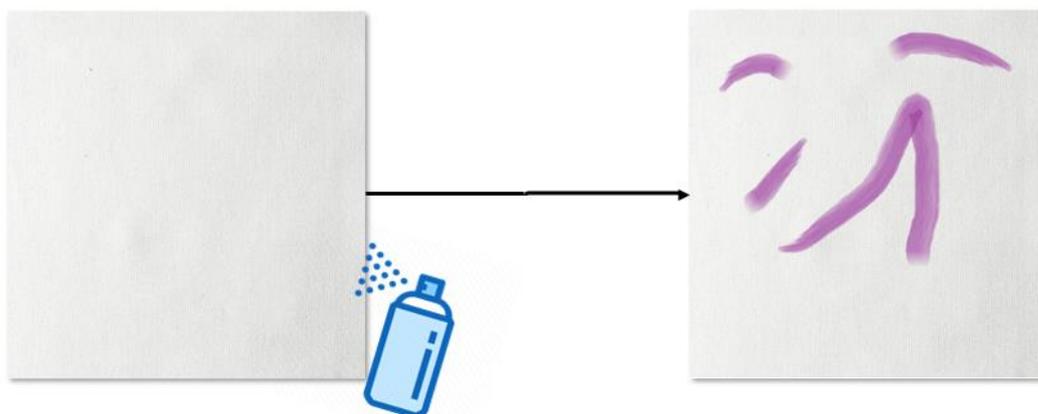
³A alteração da concentração não está limitada a apenas um, ou a todos os reagentes simultaneamente.

proteínas da solução de ovalbumina 10 g/L, em quantidade de 2000 μ L, e 300 μ L de reagente de Biureto. Também foi substituído o tartarato duplo de sódio e potássio por ácido tartárico e ácido cítrico e verificado o comportamento do reagente de Biureto com o novo agente complexante. O reagente de Biureto que possuir o melhor comportamento de visualização da reação e conservação será determinado como reagente padrão para as etapas seguintes.

O Biureto será testado por métodos *in loco*, esfregação e por curva de calibração no espectrofotômetro. No método *in loco*, o reagente é aplicado na forma de spray em um tecido contaminado com as diversas soluções preparadas de sêmen simulado, como visto na figura 6.

Em conjunto com o método direto de aplicação por spray, será avaliado também a aplicação adicional de um spray exclusivo de hidróxido de sódio após a aplicação do reagente de Biureto, na intenção de intensificar a reação do Biureto.

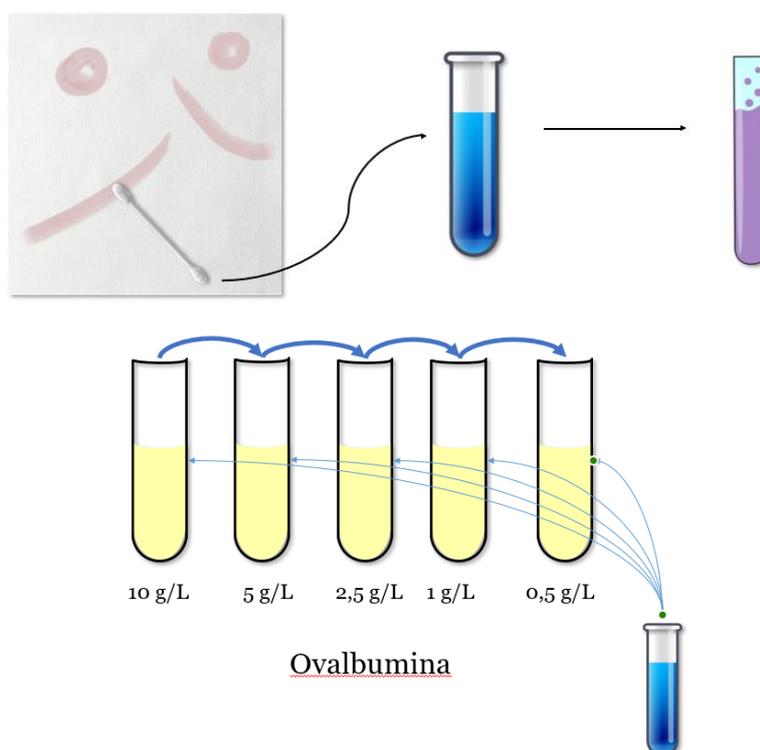
Figura 6. Aplicação por metodologia *in loco*



Fonte: Autoria própria

No método do esfregação, o tecido terá sua parte contaminada esfregada com uma haste de algodão e em seguida, esta é submersa no reagente de Biureto contido em um tubo de ensaio, como visto na figura 7. Para análise do resultado da reação do Biureto nas soluções de ovalbumina, é utilizado o espectrofotômetro UV-Vis, e realizado uma curva de calibração utilizando-se as soluções de ovalbumina com o reagente de Biureto na melhor concentração, sendo a proporção determinada na primeira etapa.

Figura 7. Metodologia de esfregaço e espectrofotômetro



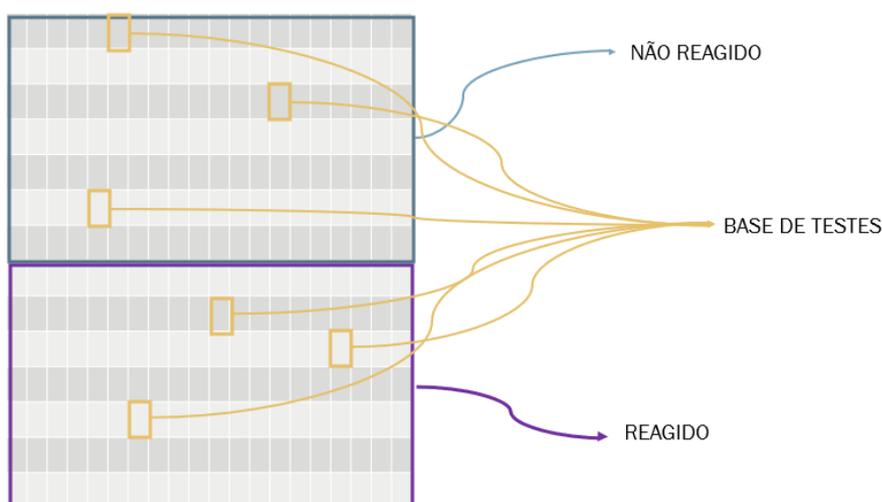
Fonte: Autoria própria

É desenvolvido também um algoritmo de Deep Learning, na biblioteca de código aberto TensorFlow, capaz de ser treinado para reconhecer padrões em imagens. Serão realizadas centenas de fotografias em diversos tecidos, de diferentes estampas e colorações, para que sendo estas fotografias separadas em duas categorias: reagido e não reagido.

A categoria 'não reagido' são fotografias de tecidos em que se aplica diretamente o reagente de Biureto na forma de spray, sem a presença anterior de proteína. A categoria 'reagido' são fotografias de tecidos que foram manchados com a solução proteica de albumina, e então aplicado o reagente. As manchas proteicas feitas foram de padrões diversos, para que não houvesse uma detecção do algoritmo para um padrão de mancha específico.

Para verificação do treino da inteligência artificial, uma base de teste feita com fotografias tiradas mas não utilizadas para treinamento, será utilizada como imagens de teste e verificar se a classificação das imagens pela inteligência artificial está sendo condizente com o dado real. A separação e obtenção da base de testes pode ser visto na figura 8.

Figura 8. Criação e separação da base de imagens



Fonte: Autoria própria

Com o treinamento da inteligência artificial utilizando o algoritmo e a base de imagens, utilizaremos futuras fotografias para verificar se um tecido pode ser classificado corretamente pela inteligência artificial. Em caso de classificação errônea, será feito treinamento com outros parâmetros de treino, como mudança de base de testes, passos de treino, e parâmetros internos do algoritmo.

A metodologia criada é feita com tecidos devido á praticidade da aplicação e análise, porém não é limitada a apenas este método. Superfícies rígidas ou quaisquer outros tipos de superfícies podem ser aplicados os métodos, observando as possíveis ocorrências, como escorrimento do reagente de Biureto em superfície não permeável, por exemplo.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DA CONCENTRAÇÃO E AGENTE COMPLEXANTE

O preparo de todos os reagentes mostrou que maiores concentrações de Biureto intensifica a coloração azul-escura do reagente, entrando em condições de coloração de opacidade devido à coloração extremamente escura da solução. A figura 9 contém 3 tubos de ensaio, que mostram o reagente, a reação do Biureto original, e a intensificação da reação pelo aumento da concentração do reagente.

Figura 9. Reagente de Biureto sem reação (à esquerda), e com soluções proteicas (ao centro e à direita)



Fonte: Autoria própria

Dentre todas as soluções e variantes de concentrações, a solução que obteve melhores resultados de contraste visual entre a coloração original do reagente de Biureto, e a coloração resultante da reação, foi a solução de concentração 10 vezes maior que o protocolo de preparo original, porém, mantendo-se a concentração de hidróxido de sódio.

As outras variações encontraram 3 problemas fundamentais: coloração azul-escura intensa; precipitação de hidróxido de cobre; reação fraca. O resultado de cada permuta de variação de concentração pode ser visto nos quadros 2, 3, 4 e 5.

Quadro 2. Comportamento das soluções com $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6 mM

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6mM	Agente complexante 21mM	Agente complexante 0,105 M	Agente complexante 0,21 M	Agente complexante 1,05 M
NaOH 0,75 M	Original	Precipitação	Precipitação	Precipitação
NaOH 3,75 M	Coloração forte	Precipitação	Precipitação	Precipitação
NaOH 7,5M	Precipitação	Precipitação	Precipitação	Precipitação
NaOH 37,5 M	Precipitação	Precipitação	Precipitação	Precipitação

Fonte: Autoria própria

Quadro 3. Comportamento das soluções com $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 30mM

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 30mM	Agente complexante 21mM	Agente complexante 0,105 M	Agente complexante 0,21 M	Agente complexante 1,05 M
NaOH 0,75 M	Precipitação	Reação fraca	Reação fraca	Precipitação
NaOH 3,75 M	Coloração forte	Funcional	Precipitação	Precipitação
NaOH 7,5 M	Precipitação	Coloração forte	Coloração forte	Precipitação
NaOH 37,5 M	Precipitação	Precipitação	Precipitação	Precipitação

Fonte: Autoria própria

Quadro 4. Comportamento das soluções com $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 60mM

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 60mM	Agente complexante 21mM	Agente complexante 0,105 M	Agente complexante 0,21 M	Agente complexante 1,05 M
NaOH 0,75 M	Precipitação	Reação fraca	Funcional	Precipitação
NaOH 3,75 M	Coloração forte	Funcional	Funcional	Precipitação
NaOH 7,5 M	Precipitação	Precipitação	Coloração forte	Precipitação
NaOH 37,5 M	Precipitação	Precipitação	Precipitação	Precipitação

Fonte: Autoria própria

Quadro 5. Comportamento das soluções com $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,3 M

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,3M	Agente complexante 21mM	Agente complexante 0,105 M	Agente complexante 0,21 M	Agente complexante 1,05 M
NaOH 0,75 M	Precipitação	Reação fraca	Reação fraca	Precipitação
NaOH 3,75 M	Precipitação	Precipitação	Precipitação	Precipitação
NaOH 7,5 M	Precipitação	Precipitação	Coloração forte	Precipitação
NaOH 37,5 M	Precipitação	Precipitação	Coloração forte	Coloração forte

Fonte: A autoria própria

A variação de concentração mostrou uma característica fundamental a ser explorada com o reagente de Biureto, que é a intensificação da reação do Biureto ao se adicionar hidróxido de sódio ao reagente. Outro ponto encontrado é que a falta de hidróxido de sódio pode ocasionar precipitação de hidróxido de cobre no reagente, sendo facilmente corrigido pela adição do hidróxido.

O agente complexante utilizado nos testes foi o ácido tartárico, preservando-se a devida molaridade, possuindo comportamento similar ao tartarato duplo de sódio e potássio utilizado no protocolo original.

O ácido cítrico também foi utilizado nos testes, adaptando-se ao número de grupos funcionais ácidos presentes, porém o reagente preparado utilizando-se esse agente complexante acabou adquirindo característica de gel após um período armazenado, como visto na figura 10.

Figura 10. Reagente de biureto preparado com ácido cítrico



Fonte: A autoria própria

Dadas as características do reagente e os testes realizados, o reagente de Biureto final, adaptado para uso forense, tem o seguinte protocolo de preparo:

- Sulfato de Cobre II penta hidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 60 mmol/L;
- Ácido tartárico 0,21 mol/L;
- Hidróxido de Sódio (NaOH) 0,75 mol/L.

A coloração do reagente definido não é intensa, como podemos ver na figura 11, e pode ser facilmente distinguida de uma coloração violeta.

Figura 11. Reagente de Biureto



Fonte: Autoria própria

4.2. METODOLOGIA *IN LOCO*

O reagente de Biureto pelo método *in loco* mostrou resultados satisfatórios ao destacar as manchas proteicas presente nos tecidos utilizados nos testes. A figura 12 mostra a forma de aplicação, através da disposição do tecido em uma câmara.

Figura 12. Modo de aplicação por spray, in loco



Fonte: Autoria própria

A aplicação do reagente no tecido na forma de spray destacou as manchas proteicas presentes, evidenciando o padrão composto pela fluido presente no tecido. A figura 13 apresenta dois tecidos que, respectivamente, possuem e não possuem manchas de sêmen simulado, após a aplicação por spray do reagente.

Figura 13. Tecidos com e sem sêmen simulado, respectivamente, após aplicação do reagente



Fonte: Autoria própria

O estudo da aplicação do spray de hidróxido mostrou resultados mistos. O spray de hidróxido intensificou a reação do Biureto no tecido, como também intensificou a coloração do reagente onde não houve reação, e também contribuiu para a lavagem da proteína, deixando o tecido encharcado, devido ao excesso de liquido presente. A reação padrão e intensificada pode ser vista

na figura 14, que mostra respectivamente, antes e após aplicação do spray de hidróxido.

Figura 14. Reação do Biureto sob aplicação de spray de hidróxido, antes e depois, respectivamente



Fonte: Autoria própria

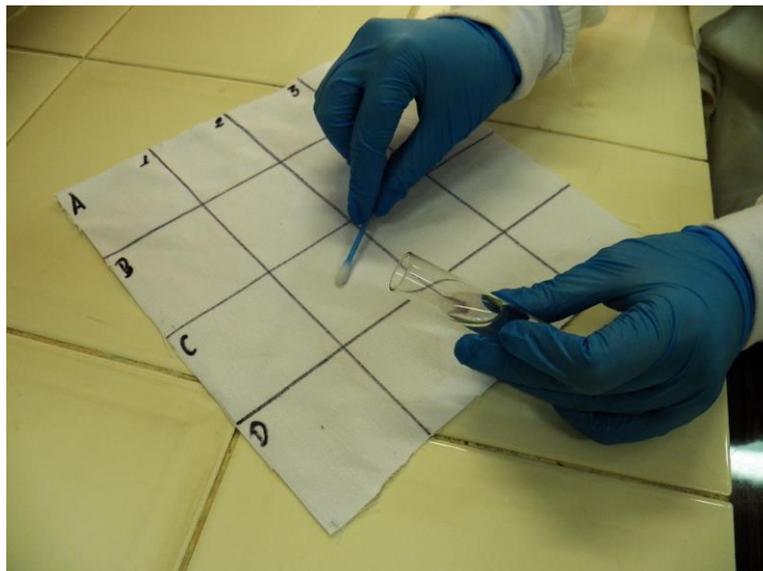
Isso mostra que a aplicação do spray de hidróxido pode ser útil em circunstâncias que a reação do Biureto esteja pouco visível, ou o tecido não aparente possuir a reação após aplicação do reagente, porém, deve se observar os possíveis empecilhos que podem surgir.

Também é importante se observar as condições alcalinas da névoa gerada pelo spray. A operação do spray deve ser em local ventilado, em câmara adaptada para aplicação, e com o operador utilizando máscara semifacial para evitar respiração completa da névoa, dentro das especificações da Norma Regulamentadora 6 (NR-6), que aborda a utilização de Equipamentos de Proteção Individual (EPIs).

4.3. MÉTODO DO ESFREGAÇO E ESPECTROFOTOMÉTRICO

O método do esfregaço obteve também resultados satisfatórios. A coleta com a haste de algodão embebido em solução salina resultou em uma reação evidente ao dispor a haste em um tubo de ensaio contido reagente de Biureto. A figura 15 mostra o método de coleta do sêmen simulado no tecido.

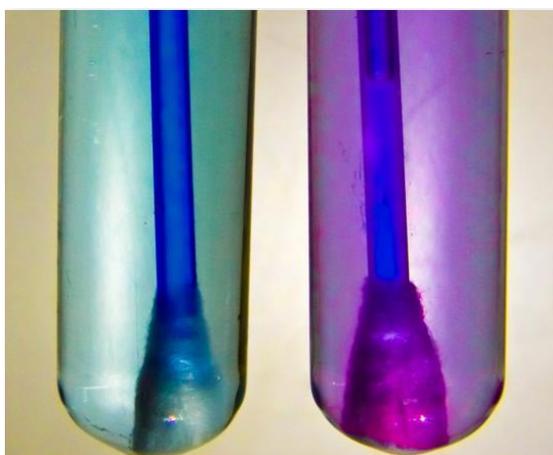
Figura 15. Método de coleta por esfregaço



Fonte: Autoria própria

A figura 16 contém dois tubos, sendo que à esquerda, é uma coleta de uma solução salina, e à direita, uma coleta de sêmen simulado, ambas no mesmo tecido.

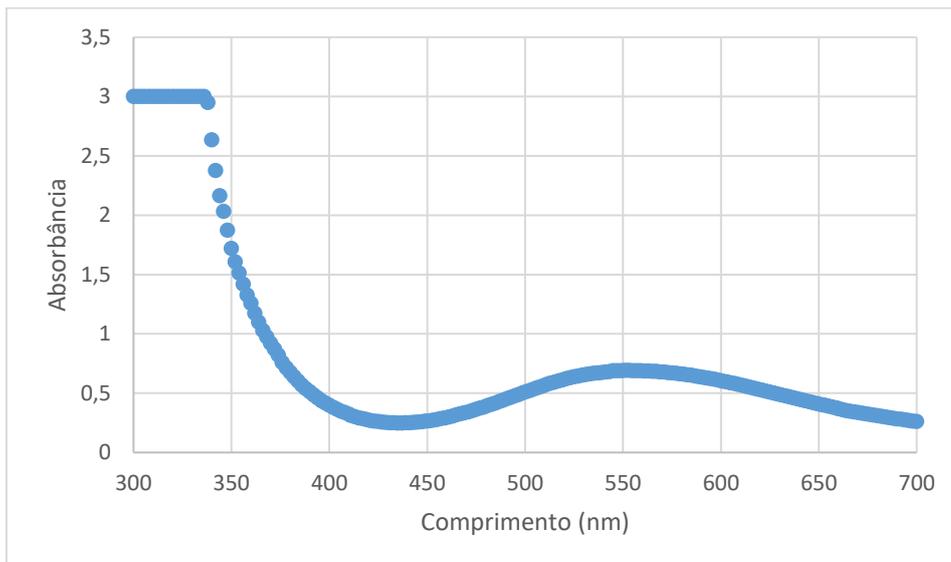
Figura 16. Coleta de solução salina e sêmen simulado, respectivamente



Fonte: Autoria própria

A curva de calibração para a utilização da amostra coleta foi feita com as soluções de ovalbumina preparadas anteriormente, pela utilização de um espectrofotômetro UV-Vis. A varredura utilizando uma solução 5g/L de ovalbumina forneceu a o gráfico visto na figura 17.

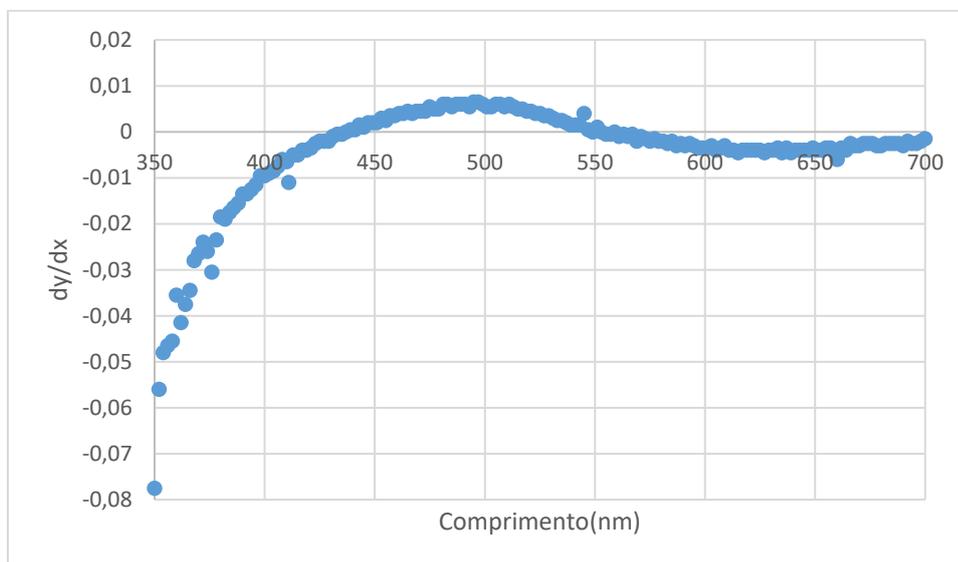
Figura 17. Varredura do reagente de Biureto



Fonte: Autoria própria

Aplicando a primeira derivada na varredura, obtemos o comportamento presente na figura 18, no qual verificamos a intersecção do eixo das abcissas em 550 nm.

Figura 18. Gráfico da primeira derivada da varredura



Fonte: Autoria própria

Com as soluções de ovalbumina, foi obtida a absorvância em 550 nm para todas as concentrações, obtendo os resultados visto no quadro 6.

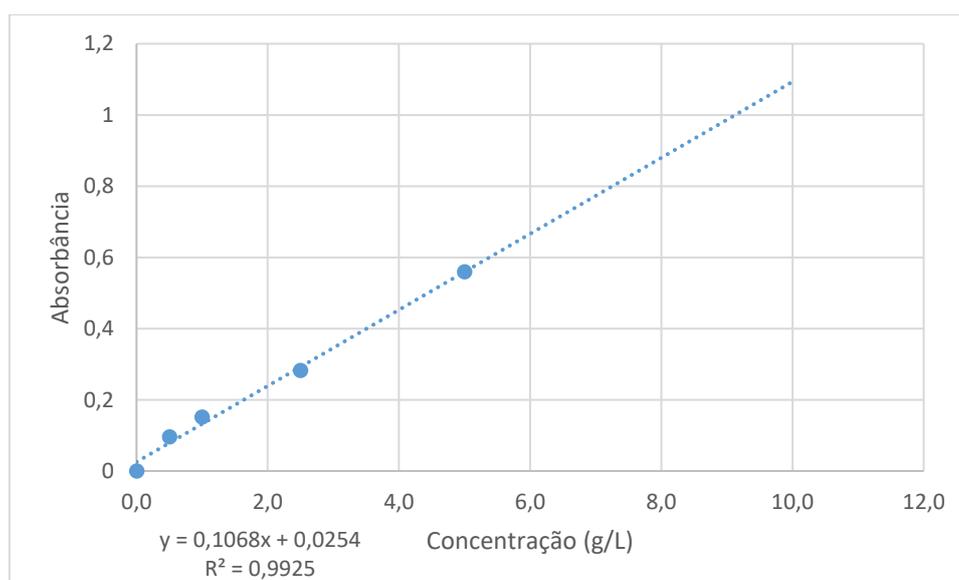
Quadro 6. Absorbância x Concentração (g/L)

C (g/L)	Absorbância
10,0	1,703
5,0	0,559
2,5	0,282
1,0	0,151
0,5	0,096
0	0

Fonte: Autoria própria

O valor obtido na concentração de 10 g/L foi descartado para se realizar a curva de calibração, devido ao valor ser um *outlier* devida a coloração mais escura decorrente de maior concentração de proteínas, e conseqüentemente, maior reação do Biureto. Com os outros valores, obtemos a curva presente na figura 19.

Figura 19. Curva de calibração Concentração (g/L) x Absorbância



Fonte: Autoria própria

Com a construção da curva de calibração, podemos concluir que a utilização do sêmen real ou simulado é de viável identificação e quantificação através do reagente de Biureto em conjunto com o método do esfregaço e espectrofotométrico.

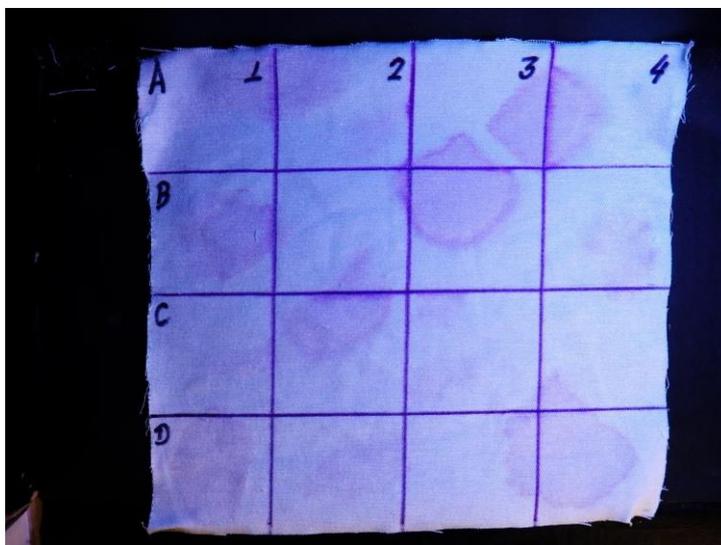
4.4. METODOLOGIA DE INTELIGÊNCIA ARTIFICIAL

O algoritmo desenvolvido foi adaptado da biblioteca *opensource* disponibilizado pela desenvolvedora do TensorFlow, sob a licença Apache v2.0., que permite livre uso, redistribuição e alteração. Na mesma intenção, o algoritmo para este trabalho se encontra na ferramenta de repositório e versionamento GitHub do usuário TensorFlow, no repositório *hub*, diretório/*examples/image_retraining/retrain.py*.

O algoritmo foi treinado com um total de 431 fotografias realizadas, resultando em um modelo de treinamento que pode ser utilizado para classificação. Porém, o número de fotografias é insuficiente para obter resultados satisfatórios.

Duas fotografias, vistas na figura 20 e 21, foram fornecidas à inteligência artificial e verificado a classificação dada. A fotografia da figura 20 é uma fotografia de um tecido com reação do Biureto, sendo esta classificada com 94% de certeza como 'Reagido', logo, sendo uma classificação correta com alta certeza.

Figura 20. Tecido com reação do Biureto



Fonte: Autoria própria

Porém, a fotografia na figura 21 é uma fotografia de um tecido sem reação do Biureto, classificado como 'Reagido' com 83% de certeza pela inteligência artificial, sendo uma classificação incorreta com alta certeza.

Figura 21. Tecido sem reação do Biureto



Fonte: Autoria própria

O resultado da classificação errônea provavelmente se deve ao número de fotografias, pois como confirmado pela literatura, o número de fotografias necessárias é acima dos milhares (Xia et al., 2017). Outras prováveis causas são os parâmetros utilizados para treinamento, inadequados para o objetivo da inteligência artificial. Porém, uma vez obtido o número mínimo necessário de fotografias para se obter resultados satisfatórios, a inteligência artificial opera sob alta confiança e em estado estacionário, com mínima oscilação da certeza em uma classificação.

5. CONCLUSÃO

Atualmente o conjunto de ferramentas forenses disponível não inclui uma totalmente confiável para detecção de sêmen, tornando o spray de biureto um novo aliado na identificação de fluidos corporais. Através dos resultados obtidos, é possível notar uma nova aplicação para um reagente conhecido há décadas.

O preço do reagente, em conjunto com sua gama de possibilidades de uso, o encaixa como possível complementar para uso em situações periciais. Diante de um ramo dominado por pesquisas e produtos estrangeiros, uma pesquisa nacional com o objetivo de auxiliar em investigações criminais é um avanço na ciência forense brasileira. As fotos experimentais iniciais mostraram que o uso do Biureto pode ser ainda potencializado pelo uso de luz de diversas cores, obtida através de lanternas monocromáticas, frequentemente encontradas entre as ferramentas do perito forense.

O uso de tecnologia como a inteligência artificial em ciências forenses é um ramo ainda a ser explorado, dado o tempo necessário para alimentar um banco de informações robusto, mas que pode ser a solução para uso do reagente de Biureto em tecidos de cores altamente interferentes.

Finalmente, conclui-se que o reagente de Biureto, por seu baixo custo e alta aplicabilidade, pode tornar-se uma robusta ferramenta para preencher a lacuna dos testes de detecção de sêmen.

6. REFERÊNCIAS

- ABADI, M.; BARHAM, P.; CHEN, J.; et al. TensorFlow: A system for large-scale machine learning. **Methods in Enzymology**, v. 101, n. C, p. 582–598, 2016.
- DE ALMEIDA, V. V.; CANESIN, E. A.; PALIOTO, R. M. S.; PALIOTO, G. F. Análise Qualitativa de Proteínas em Alimentos Por Meio de Reação de Complexação do íon Cúprico. **Química Nova Na Escola**, v. 35, n. 1, p. 34–40, 2013. Disponível em: <http://qnesc.sbq.org.br/online/qnesc35_1/06-EEQ-79-11.pdf>. .
- BELL, S. **Drugs, Poisons, and Chemistry**. Facts on File, 2009.
- CAMARGO, R. M. M.; PECCI, L.; POSTIGO, M. P. Reagente de Biureto como detector de proteínas in loco. **Anais Semana de Engenharia Química**, v. 5, p. 34–37, 2017.
- KOBILINSKY, L. **Handbook Forensic Chemistry**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2012.
- MACHADO, F. F.; COIMBRA, J. S. R.; GARCIA ROJAS, E. E.; et al. Solubility and density of egg white proteins: Effect of pH and saline concentration. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, n. 7, p. 1304–1307, 2007.
- NEWTON, D. E. **Forensic Chemistry**. Checkmark Books, 2007.
- PONTI, M. A.; DA COSTA, G. B. P. Como funciona o Deep Learning. **Tópicos em Gerenciamento de Dados e Informações**. p.63–93, 2017. Disponível em: <<http://arxiv.org/abs/1806.07908>>. .
- RODRIGUES, C. V.; SILVA, M. T. DA; TRUZZI, O. M. S. Perícia criminal: uma abordagem de serviços. **Gestão & Produção**, v. 17, n. 4, p. 843–857, 2012.
- SANTUCCI, K. A.; NELSON, D. G.; MCQUILLEN, K. K.; DUFFY, S. J.; LINAKIS, J. G. Wood's Lamp Utility in the Identification of Semen. **Pediatrics**, v. 104, n. 6, p. 1342–1344, 2004.
- DA SILVA, A. A. G. A Perícia Forense no Brasil. **Universidade de São Paulo**, 2010.
- DE VASCONCELLOS, F. A.; DE PAULA, W. X. Aplicação Forense Do Luminol - Uma Revisão. **Revista Criminalística E Medicina Legal**, v. 1, n. 2, p. 28–36, 2017. Disponível em: <<http://revistacml.com.br/wp-content/uploads/2018/04/RCML-2-04.pdf>>. .
- WALES, R.; SCOTT, T.; WHITE, I. Biuret Reactive Materials in Semen.

Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science, v. 39, n. 5, p. 455–462, 1961.

XIA, X.; XU, C.; NAN, B. Inception-v3 for flower classification. **2nd International Conference on Image, Vision and Computing**, v. 2, p. 783–787, 2017.

ZAIA, D. A. M.; ZAIA, C. T. B. V.; LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Quimica Nova**, v. 21, n. 6, p. 787–793, 1998.