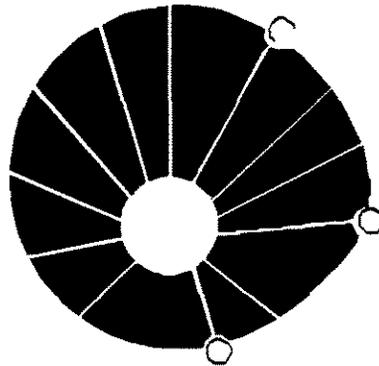


FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



UNICAMP

**JOSÉ CARLOS DE FREITAS GARCIA CALDAS
CIRURGIÃO-DENTISTA**

**DIAGNOSE ESPECÍFICA DO SANGUE DE
“HYDROCHAERIS HYDROCHAERIS”
E SUA IMPORTÂNCIA PERICIAL**

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

PIRACICABA

- 2002 -

**UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
- UNICAMP -**

**JOSÉ CARLOS DE FREITAS GARCIA CALDAS
CIRURGIÃO-DENTISTA**

**DIAGNOSE ESPECÍFICA DO SANGUE DE
“HYDROCHAERIS HYDROCHAERIS”
E SUA IMPORTÂNCIA PERICIAL**

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

Este exemplar foi devidamente corrigido,
de acordo com a Resolução CCPG 036/83

CPG, 15/04/02

Assinatura do Orientador

ORIENTADOR: PROF. DR. NELSON MASSINI
CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior
Banca Examinadora:
PROF. DR. NELSON MASSINI
PROF. DR. LUIZ FRANCESQUINI JÚNIOR
PROFA. DRA. GIÁUCIA MARIA BOVI AMBROSANO

**PIRACICABA
- 2002 -**

15/04/02

UNIDADE BP
Nº CHAMADA UNICAMP
C126d
V _____ EX _____
TOMBO BCI 49182
PROC. 16.837/02
C _____ D X _____
PREÇO R\$ 11,00
DATA _____
Nº CPD _____

CM00167680-4

BIB ID 241026

Ficha Catalográfica

C126d Caldas, José Carlos de Freitas Garcia.
Diagnose específica do sangue de "*hydrochaeris hydrochaeris*" e sua importância pericial. / José Carlos de Freitas Garcia Caldas. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2002.
xxviii, 98p. : il.

Orientadores : Prof. Dr. Nelson Massini, Prof. Dr. Eduardo Daruge Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

Piracicaba. IV. Título.



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 Fevereiro de 2002, considerou o candidato JOSÉ CARLOS DE FREITAS GARCIA CALDAS aprovado.

1. Prof. Dr. NELSON MASSINI

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Nelson Massini", written over a horizontal line.

2. Prof. Dr. LUIZ FRANCESQUINI JUNIOR

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Luiz Franceschini Junior", written over a horizontal line.

3. Profa. Dra. GLAUCIA MARIA BOVI AMBROSANO

A handwritten signature in black ink, appearing to be "Gláucia Maria Bovi Ambrosano", written over a horizontal line.



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 Fevereiro de 2002, considerou o candidato JOSÉ CARLOS DE FREITAS GARCIA CALDAS aprovado.

1. Prof. Dr. NELSON MASSINI

2. Prof. Dr. LUIZ FRANCESQUINI JUNIOR

3. Profa. Dra. GLAUCIA MARIA BOVI AMBROSANO

“A opinião de um homem pode mudar honrosamente,
desde que a sua consciência não mude.”

Victor Hugo.

AGRADEÇO

A DEUS

POIS SEM ELE NADA SERIA POSSÍVEL

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais Neiva e Antonio Carlos pela preparação e amor dispensados durante todos estes anos.

A minha esposa, pela compreensão, paciência e incentivo nos momentos difíceis.

Aos meus filhos, Fabíola e Fábio, onde além de dedicar, peço perdão pela falta da minha presença em vários momentos.

Aos meus irmãos Cláudia e Fernando.

Ao Professor

Dr. EDUARDO DARUGE Coordenador do Mestrado em Odontologia
Legal. Pelo estímulo e amizade.

Ao Professor

Dr. Nelson Massini, meu orientador,
pela dedicação, amizade e incentivo.

Ao Professor

Frederico Garavati,

pela amizade e esforço demonstrados

Ao amigo Professor

Dr. Luiz Francesquini Júnior,

Pela amizade, ajuda e cooperação, sua capacidade é ilimitada.

A Profa.

Dra. Gláucia Maria Bovi Ambrosano

pela incomensurável ajuda na estatística deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

* À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, em especial à pessoa do Dr. Antonio Wilson Sallum pelo espírito empreendedor e dinâmico sempre demonstrados.

Ao Prefeito do Campus e ao Vice-Prefeito Sr. Pedro, pelos inúmeros préstimos dispensados.

* Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Odontologia Legal e Deontologia, pelo carinho e atenção.

* Aos funcionários da Faculdade de Odontologia de Piracicaba-UNICAMP, João Batista de Leite Campos, ao Sr. Paulo do Amaral, pela contribuição direta ou indireta na realização deste trabalho.

* Aos colegas do Curso de Pós-Graduação da FOP-Unicamp pela colaboração na coleta de amostras e revisão da literatura.

* Enfim a todos os que sempre acreditaram em minha pessoa.

SUMÁRIO

Capítulos	pág
I. LISTAS	01
II. RESUMO	05
III. INTRODUÇÃO	07
III.1 CARACTERIZAÇÃO DO SANGUE	07
III.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE A HEMOGLOBINA	09
III.2.1 ESTRUTURA DO GRUPO HEME	16
III.2.2 COORDENAÇÃO DO FERRO	18
III.2.3 COOPERATIVIDADE E ALOSTERIA	22
III.2.3.1 ÍONS HIDROGÊNIO	25
III.2.4 DIOXIDO DE CARBONO	27
III.2.5 O EFEITO DOS SAIS	28
III.2.6 A HEMOGLOBINA COMO PROTEÍNA ALOSTÉRICA	28
III.2.7 AS HEMOGLOBINAS	32
III.2.8 COMPONENTES DA HEMOGLOBINA	36
III.3 VERIFICAÇÃO DO SANGUE PARA FINS PERICIAIS	38
III.4 IMPORTÂNCIA DESTE EXAME	39
IV. REVISTA DA LITERATURA	45
V. OBJETIVOS	51
VI. MATERIAIS E MÉTODOS	53
VI.1 ANÁLISE DOS RESULTADOS	59
VII. RESULTADOS	61
VIII. DISCUSSÃO	71
IX. CONCLUSÕES	75
X. SUMMARY	77
XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	79
XII. APÊNDICE	87

I. LISTAS

I.1 – Figuras

NÚMERO	ASSUNTO	PÁGINA
01	Cristais obtidos do sangue de capivara técnica 2, com luto, aumento 6,3, optovar 1,6, duplo filtro azul, sem imersão.	87
02	Cristais obtidos do sangue de capivara técnica 2, com luto, aumento 16, optovar 1,6, duplo filtro azul, com imersão.	88
03	Cristais obtidos do sangue de capivara técnica 2, com luto, aumento 100, optovar 1,6, filtro azul, com imersão.	89
04	Cristais obtidos do sangue de capivara técnica 2, sem luto, aumento 40, optovar 1,25, filtro azul, sem imersão.	90
05	Cristais obtidos do sangue de capivara técnica 2, sem luto, aumento 100, optovar 1,25, filtro azul, com imersão.	91

II – QUADROS

NÚMERO	ASSUNTO	PÁGINA
01	DISTRIBUIÇÃO DOS ELÉTRONS NOS ORBITAIS	18
02	EFEITO DO CAMPO LIGANTE	19
03	FERRO ALTO-SPIN	20
04	FERRO BAIXO-SPIN	21
05	EFEITO BOHR	26

III - FIGURAS

01	CAPIVARA MACHO (GLÂNDULA SUPRANASAL)	58
02	CAPIVARA FÊMEA.	58

IV - TABELAS

01	Dados obtidos nas lâminas de sangue colhido do animal de nº 01	92
02	Dados obtidos nas lâminas de sangue colhido do animal de nº 02	93
03	Dados obtidos nas lâminas de sangue colhido do animal de nº 03	94
04	Dados obtidos nas lâminas de sangue colhido do animal de nº 04	95
05	Dados obtidos nas lâminas de sangue colhido do animal de nº 05	96
06	Dados obtidos nas lâminas de sangue colhido do animal de nº 06	97
07	Quantidade de cristal em função do sexo	61
08	Quantidade de cristal em função do técnica	62
09	Quantidade de cristal em função do luto	62

IV - TABELAS (CONTINUAÇÃO)

10	Tamanho do cristal em função do Sexo	63
11	Tamanho do cristal em função da técnica	63
12	Tamanho do cristal em função do luto	64
13	Coloração do cristal em função do sexo	64
14	Coloração do cristal em função do técnica	65
15	Coloração do cristal em função do luto	65
16	Local do cristal em função do sexo	66
17	Local do cristal em função do técnica	66
18	Local do cristal em função do luto	66
19	Contorno do cristal em função do Sexo	67
20	Contorno do cristal em função da técnica	67
21	Contorno do cristal em função do luto	68

II. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo selecionar um método para identificação de animais, fornecendo subsídios indispensáveis para a caracterização ou descaracterização de crime, tanto na matança de animais silvestres como torturas de animais domésticos, ambos protegidos por lei, bem como verificar a cristalização da hemoglobina, mais precisamente da oxihemoglobina, em sangue "in natura", com anticoagulante e coagulado de capivaras.

Esta é a mais delicada prova das diferenças de constituição química da hemoglobina, pois se acompanha da diferença de estrutura física. Aliado a isto, esta técnica possui baixo custo de implantação, rapidez na obtenção dos resultados, por ser de fácil preparação e manejo.

No presente trabalho foram utilizadas preparações modificadas de **COSTA (1933)**.

Após a compilação e análise dos dados verificou-se que a quantidade, o tamanho, a cor, o local e o contorno do cristal não estão associados ao sexo do animal e que a quantidade de cristal depende

da técnica empregada, sendo a técnica 2 (sangue fresco oxalatado é centrifugado, o sedimento é laqueado pela saponina; junta-se sulfato de sódio, agita-se energicamente e em seguida centrifuga-se durante 10 minutos na velocidade 4) a que produz mais cristais.

Observou-se também que das técnicas empregadas, nenhuma influenciou o contorno do cristal obtido.

Das técnicas utilizadas constatou-se que a técnica de nº 02 é a que produz cristais maiores, com coloração mais intensa (rosa intenso) e com distribuição regular na lâmina.

Também observou-se que a quantidade, o tamanho e a localização do cristal não estão associados à utilização ou não do luto, somente após 48 horas com luto, houve influência na coloração e no contorno dos cristais.

III. INTRODUÇÃO

III.1 CARACTERIZAÇÃO DO SANGUE.

O estudo do sangue é realizado pela hematologia forense. Este é de grande importância para o Direito Penal e para o Direito Civil.

O sangue é constituído de uma parte líquida e uma parte sólida. Nesta última, encontram-se os elementos figurados. Sabe-se que, em dado volume de sangue, há aproximadamente 40 a 45% de hemácias. Em um milímetro de sangue periférico, existem cerca de 5.400.000 hemácias, no homem, e 4.800.000 na mulher. A hemácia é importante devido a presença de hemoglobina em seu protoplasma (**DI FIORI, 1960; COSTA, & CHAVES, 1953**).

No organismo, a sua cor varia do vermelho vivo (sangue arterial) ao vermelho escuro (sangue venoso). O ph é aproximadamente 7,54 (**DOREA 1989**).

A massa sanguínea, representa aproximadamente um terço do peso total de uma pessoa, significando que entre cinco e seis litros deste componente biológico circulam normalmente no corpo.

Já nos animais domésticos, são encontradas diferentes quantidades de hemácias por mm^3 de sangue, sendo, no **cavalo**, aproximadamente 6.940.000, variando entre 6,0 milhões e 12 milhões, por milímetro cúbico de sangue; na **vaca** 6.325.000, variando entre 5 e 10 milhões; no **carneiro** 8.120.000, variando de 8 e 10 milhões; na **cabra** 13.940.000, variando de 8 e 18 milhões; no **porco** 7.440.000, variando de 5 e 8 milhões; e no **cão** 6.160.000, variando de 5,5 e 8,5 milhões (**PIZA JR, 1949, BROWN, 1982**). Já dentro os animais silvestres, encontra-se para o **Jacaré de papo amarelo** os seguintes valores de hemácias: 94.000 para machos e 98.500 para fêmeas no inverno, e 316.700 para machos e 240.800 para fêmeas no outono. Estes valores variam muito nos jacarés jovens, apresentando para os machos 162.700 no inverno e 306.600 no outono. Já para as fêmeas jovens 341.700 no inverno e 416.700 no outono (**VERDADE, 1993**). Para as **capivaras** encontra-se para os machos 4.670.000 e para as fêmeas 4.800.700 (**JIMÉNEZ, 1995**).

Na parte líquida do sangue humano, há glucídios (açúcar, glicose, etc), lípides-lipóides (colesterol) e prótidos-proteínas (fibrinogênio, protrombina, albumina, globulinas, etc). Há ácidos graxos

diversos, ácidos láctico, oxálico e úrico, adrenalina, aminoácidos, amoníaco, anidrido carbônico, bilirrubina, cobre, colesterol, creatina, corpos cetônicos, euglobulina, fenóis, ferro, fosfatases, fosfolípides, lecitina, cefalina, esfingomielina, glicose, guanidina, indicana, magnésio, uréia, etc., **(DOREA, 1989)**.

Nos animais, de uma forma geral, o plasma representa mais de 60 % do volume total de sangue, possui densidade próxima a da maioria dos animais domésticos (entre 1,04 - 1,06), além de pH entre 7,2 a 7,6. Além disso, é composto de água (90%), diversos sais minerais, tais como os cloretos, carbonatos, sulfatos e fosfatos de sódio, potássio, cálcio, magnésio e ferro, além de albumina, globulina, fibrinogênio, glucose, levulose, galactose, matérias graxas, sabões, colesterol, lecitinas, uréia, gases, etc. (**PIZA JR., 1949**).

III. 2-CONSIDERAÇÕES SOBRE A HEMOGLOBINA.

É no glóbulo vermelho que também se encontram aglutinógenos **(DOREA, 1989)**.

A molécula da hemoglobina dos mamíferos é um tetrâmero de peso molecular de aproximadamente 64.500, cujas dimensões são 64x55x50 Angstrom, formada por quatro subunidades cada uma, de peso molecular de aproximadamente 16.000 cada uma, contendo um grupo heme ligado a um polipeptídeo. O grupo heme, é um anel protoporfirínico contendo radical de ferro (Fe^{++}) no seu centro. Das subunidades, duas são denominadas cadeias alfa, cada uma constituída de 141 resíduos de aminoácidos e as outras duas denominadas de cadeias beta, com 146 resíduos de aminoácidos. Uma macromolécula típica, a hemoglobina é formada por aproximadamente 12.000 átomos e tem uma forma geométrica parecida com um pequeno globo de 400nm de diâmetro (um nanômetro equivale a um milionésimo de milímetro).

Há na natureza 20 amino-ácidos que combinados de diferentes maneiras constituem os milhares de diferentes proteínas presentes em cada ser vivo.

Os amino-ácidos que constituem uma proteína, são unidos por ligações químicas fortes chamadas de ligações peptídicas

formando o que se denomina cadeia polipeptídica, (contendo em geral, centenas de amino-ácidos).

A sequência dos amino-ácidos das cadeias polipeptídicas de uma proteína é conhecida como estrutura primária da proteína.

Mas, não é apenas a estrutura primária que confere à proteína suas propriedades bioquímicas; as cadeias polipeptídicas são estruturas tridimensionais, cuja formação espacial é muito importante para o papel biológico que a proteína irá desempenhar. O arranjo espacial das cadeias polipeptídicas constituem a estrutura secundária da proteína. Exemplo, a estrutura helicoidal chamada hélice alfa.

A estrutura secundária, porém, não é completamente rígida, a hélice alfa, por exemplo, pode enovelar-se sobre si mesma de diferentes maneiras, caracterizando o que se chama de estrutura terciária da proteína. A hemoglobina, por ser formada por quatro cadeias polipeptídicas, pode se arranjar no espaço uma em relação às outras, esta disposição espacial assumida pelas diversas cadeias, é chamada de estrutura quaternária.

Como as ligações peptídicas são ligações químicas fortes, e portanto mais estáveis, a estrutura primária de uma proteína é pouco

sensível a mudanças que venham a ocorrer no meio ambiente. Já as estruturas secundárias, terciárias e quaternárias, estabilizadas por ligações químicas fracas, como as pontes de hidrogênio, são sensíveis a elevação da temperatura e a presença de certas substâncias químicas do meio.

Quando uma mudança no meio ambiente destrói gradativamente as estruturas quaternária, terciária e secundária, diz-se que a proteína se desnaturou. Se a mudança não for muito brusca e as condições iniciais forem restabelecidas, a proteína pode recuperar suas propriedades originais, pois as informações quanto a orientação espacial estão contidos na estrutura primária.

Em todos os vertebrados, a hemoglobina é responsável pelo transporte de O_2 , através da corrente sanguínea, levando-o dos pulmões ou das guelras aos diversos tecidos do organismo.

A hemoglobina contém além das cadeias polipeptídicas os chamados grupos prostéticos, que lhe conferem suas propriedades químicas especiais, o chamado heme, formado por um anel de átomos de carbono, nitrogênio, hidrogênio e oxigênio, com um átomo de ferro no centro, chamado anel porfirínico.

Deve-se ao heme a propriedade que a hemoglobina tem de se combinar com moléculas de oxigênio, possibilitando-lhes transportá-lo ou armazená-lo.

Na molécula de hemoglobina há uma interação especial entre os hemes, denominada alosteria.

Graças a alosteria um heme é capaz de saber se alguns dos outros hemes está ligada ou não a uma molécula de oxigênio.

Devido às variações das cadeias polipeptídicas, distinguem-se várias tipos de hemoglobina, dos quais três são consideradas normais: as hemoglobinas A1, A2 e F. A hemoglobina A1 (HB A1) representa 97% de seu total, no adulto, e é a combinação de duas cadeias Alfa e duas Beta; a hemoglobina A2 (HB A2) representa 2% desse total; já a F é a hemoglobina do Feto (HB F) (**JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1985; GUYTON, 1989; MARIGHETO, 1988**).

O grupo prostético heme é um tetrapirrol cíclico, que é o responsável pela sua cor vermelha e por sua capacidade de transportar oxigênio. Os tetrapirróis, consistem de quatro moléculas de pirrol unidas, em anel planar, por quatro pontes alfa-metilênicas; os beta substituintes, determinam se o tetrapirrol é o heme ou um composto

relacionado. No heme, esses grupos são os grupos metil (M), Vinil (V) e propionato (Pr), dispostos na ordem M,V,M,V,M,Pr,M. Um átomo de íon ferroso (Fe^{2+}) figura no centro desse anel planar (**RODWELL, 1990; HAYNES & HANAWALT, 1988**).

A oxidação do Fe^{2+} da hemoglobina, destrói as atividades biológicas dessas proteínas (**RODWELL, 1990**).

Desta forma, a hemoglobina é formada por uma seqüência de aminoácidos, determinada geneticamente, formando um esqueleto da mesma.

Esta constitui o pigmento colorido dos glóbulos vermelhos (cromoprotéico), sendo a substância mais abundante e importante destas células. A característica fundamental da hemoglobina, é a facilidade com que fixa e cede o oxigênio (**DI FIORI, 1960; CORMACK, 1984**). Cada molécula de hemoglobina pode carregar quatro moléculas de oxigênio, apenas por causa da avidez do oxigênio pelo ferro contido na hemoglobina. Esta avidez química, depende muito da pressão, ou seja quando o oxigênio é empurrado com força contra a hemoglobina, a combinação ocorre em número muito maior de moléculas.

Sob 80-100 mmHg de pressão nos alvéolos, o oxigênio satura quase completamente a hemoglobina do sangue. Em 100 cm³ de sangue existe umas 15 gramas de hemoglobina; cada grama pode carregar-se de 1,4 cm³ de oxigênio. Portanto em 100 cm³ de sangue poderá haver uns 20 cm³ de oxigênio combinado com hemoglobina (oxi-hemoglobina). Já nos tecidos em pressão mais baixa entre 20 - 30 mmHg e em temperatura alta, o oxigênio se desliga e o CO₂ se combina com a hemoglobina representando aproximadamente 20%, de carbamino-hemoglobina. O mecanismo de ligação do CO₂ também é determinado pela diferença de pressão, existente de CO₂.

A molécula de hemoglobina se difere das demais por conter ferro e ser facilmente cristalizável. Há diversas espécies de hemoglobina, que se cristalizam em sistemas diferentes, conforme o sangue de sua proveniência (**ZARZUELA, 1982**).

Em um dado sangue pode haver uma ou diversas variedades de hemoglobina; daí a necessidade, quando se estudar a sua cristalização, de tomar-se uma dessas variedades, pois cada uma se apresenta, na espécie, sempre com as mesmas características cristalográficas.

III.2.1 ESTRUTURA DO GRUPO HEME

A capacidade da hemoglobina de se ligar ao O_2 e a outros ligantes é devida a presença do grupo prostético HEME. O grupo prostético, ligado covalentemente à proteína envolve um átomo de ferro coordenado ao anel tetrapirrólico - a protoporfirina IX. Os nitrogênios pirrólicos constituem os quatro ligantes do átomo de ferro nas posições equatoriais (CAREY, 1982 IN MARIGHETO). Na hemoglobina a 5ª posição de coordenação é ocupada pelo nitrogênio imidazólico da histidina proximal F8. A sexta posição de coordenação pode ser ocupada por O_2 (na oxihemoglobina); H_2O , CO , CN^- ou estar vazia (na deoxihemoglobina). Deste modo o Ferro forma um complexo de coordenação com simetria octaédrica.

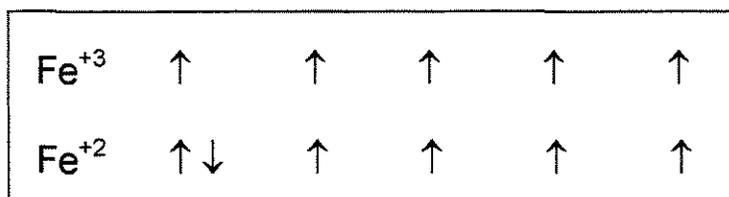
O Ferro pode ter dois estados de oxidação: estado ferroso (Fe^{+2}) e férrico (Fe^{+3}). Cabe dizer aqui que a "raison d'être" da hemoglobina é o transporte de O_2 dos pulmões para tecidos e isto requer que o O_2 se ligue reversivelmente à hemoglobina Fe^{+2} . Mas, no heme livre, em presença de O_2 o átomo de Ferro no estado ferroso é oxidado ao estado férrico,

enquanto que na hemoglobina, o átomo de Ferro se combina reversivelmente com o O_2 e permanece no estado ferroso nas formas oxigenada deoxigenada. Esta combinação reversível com oxigênio é possível na hemoglobina pelas dobras das cadeias polipeptídicas ao redor do heme proporcionando-lhe um meio hidrofóbico (**BALDWIN, 1975 IN MARIGHETO**). As dobras das cadeias polipeptídicas na hemoglobina aparecem como sendo um padrão fundamental da natureza projetado para manter o grupo heme num meio hidrofóbico e então o átomo de ferro pode combinar-se reversivelmente com oxigênio molecular (**PERUTZ, 1969 IN MARIGHETO**). Por outro lado, a oxidação irreversível do heme, quando está isolado, se processa por um complexo intermediário em que uma molécula de oxigênio forma uma ponte entre os dois átomos de Ferro de dois hemes. Na hemoglobina as dobras das cadeias polipeptídicas impedem a formação de tais pontes pelo isolamento de cada heme em lugares separados. Além do mais, na proteína, o Ferro está ligado ao nitrogênio imidazólico da histidina F8, o qual doa carga negativa possibilitando ao Ferro formar uma ligação fraca com O_2 (**PERUTZ, 1978 IN MARIGHETO**). Desta maneira, o O_2 pode

ligar-se reversivelmente ao Ferro sem mudar o estado de oxidação de Fe^{+2} para Fe^{+3} .

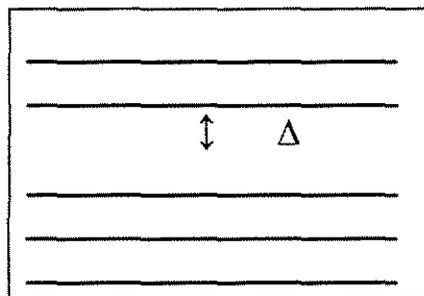
III.2.2 COORDENAÇÃO DO FERRO

Um átomo de Ferro neutro tem 26 elétrons e pode apresentar 2 estados de oxidação: estado férrico (Fe^{+3}) ou ferroso (Fe^{+2}), sendo a configuração orbital $3d^5$ e $3d^6$ respectivamente. Existem cinco orbitais 3d, e em um meio não perturbado, isto é, no átomo de Ferro livre, eles tem a mesma energia e são, portanto, degenerados. A distribuição dos elétrons nos orbitais é determinada principalmente pela energia de repulsão dos elétrons dos orbitais será:



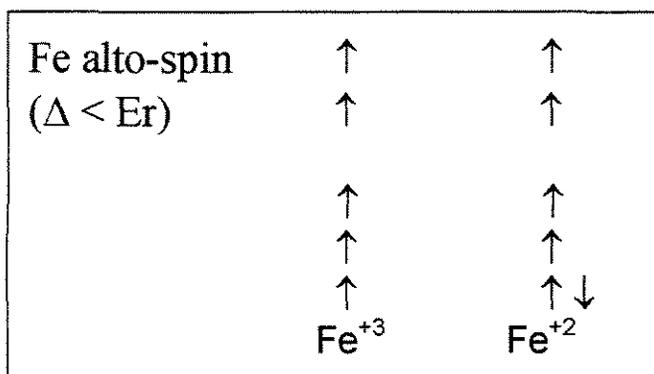
Quadro 01 – Distribuição dos elétrons nos orbitais.

No caso da hemoglobina e de outros compostos no contexto biológico, o átomo de Ferro está envolvido por ligantes e estes removem a degenerescência dos orbitais 3d. O modelo mais simples que descreve este efeito é o seguinte: cada ligante pode ser representado por uma carga puntiforme negativa. O conjunto de cargas puntiforme originam um campo de potencial-campo ligante-. Tem-se, que os elétrons d estão sujeitos a duas perturbações: o efeito da repulsão eletrônica e o efeito do campo ligante (**MURRELL, et al., 1978 IN MARIGHETO**). O efeito do campo ligante com simetria octaédrica do tipo encontrado em hemes no conjunto dos orbitais d é dividi-los em dois grupos discretos de 3 orbitais com menor energia e 2 orbitais com maior energia, separados pela energia do campo ligante, convencionalmente simbolizada por Δ . Ver figura abaixo:



Quadro 02 – Efeito do campo ligante

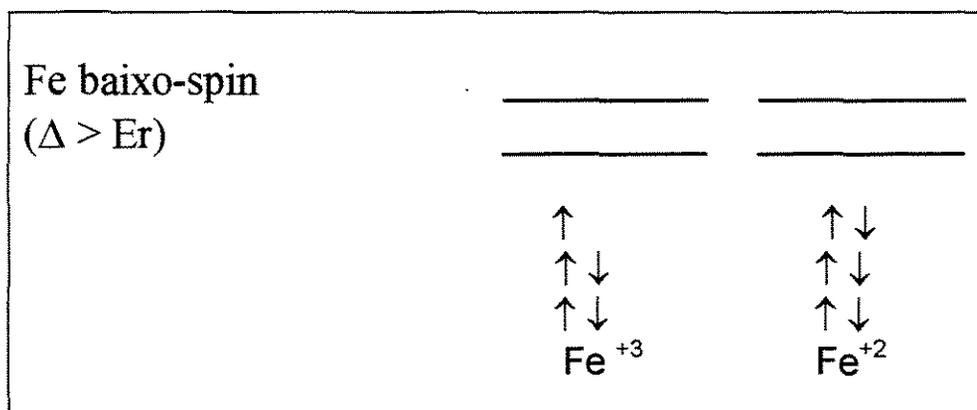
A ocupação dos orbitais 3d pelos elétrons das magnitudes relativas da energia de separação do campo ligante e da energia de repulsão eletrônica (E_r). Quando Δ é relativamente menor que E_r , todos os cinco orbitais 3d serão preenchidos, dando origem ao Ferro alto-spin.



Quadro 03 – Ferro Alto Spin

No caso de Fe^{+3} alto spin, o spin total $S = 5/2$ e para Fe^{+2} alto spin, $S=2$.

Quando a magnitude de Δ é significativamente maior que a E_r . Os elétrons 3d ocuparão os 3 orbitais de menor energia, originando Ferro baixo-spin.



Quadro 04 – Ferro baixo - spin

De modo análogo para Fe⁺³ baixo-spin $S = 1/2$ e para Fe⁺² baixo-spin $S = 0$.

Os orbitais de maior energia estão vazios no Fe baixo-spin e então o Ferro baixo-spin tem um raio atômico menor que Ferro alto-spin. Esta mudança no tamanho do raio com mudança no estado de spin desempenha um papel importante na geometria ferro-macroциclo-tetra pirrólico. A cavidade central do macroциclo tem um diâmetro de 2,02 Å; então Fe⁺³ ou Fe⁺² baixo-spin com aproximadamente 1,91 Å de diâmetro pode acomodar-se dentro da cavidade e ficar no plano do macroциclo. Em contraste, Fe alto-spin com um diâmetro aproximadamente 2,06 Å situa-se acima da cavidade central. Fe⁺³ e Fe⁺² alto spin, situam-se 0,3 Å e 0,75 Å acima do plano

macrociclo respectivamente (**CAREY, 1982 IN MARIGHETO; BALDWIN, 1975 IN MARIGHETO**).

A hemoglobina desempenha seu papel fisiológico com o átomo de Ferro no estado ferroso (Fe^{2+}). Medidas de susceptibilidade magnética (**PAULING & CORYELL, 1936 IN MARIGHETO**) demonstraram que a deoxihemoglobina ou hemoglobina não ligada tem alto-spin ($S = 2$) e que a oxi-hemoglobina tem baixo-spin ($S = 0$). Durante a oxigenação e deoxigenação ocorrem mudanças no estado de spin do Ferro e isto faz com que ele se mova para dentro e para fora do plano do anel tetra pirrólico. Este movimento é transladado para a histidina F8, que se apresenta ligada ao Ferro, e é acompanhado por mudanças conformacionais na estrutura terciária e quaternária da molécula, mudanças estas importantes para a cooperatividade.

III .2.3 COOPERATIVIDADE E ALOSTERIA

A hemoglobina reage reversivelmente com oxigênio nos quatro grupos heme. Ela capta oxigênio nos pulmões, onde a tensão (P_{O_2}) é alta e o libera nos tecidos onde a tensão é baixa. Nos músculos

o oxigênio se liga à mioglobina: uma proteína respiratória com apenas uma subunidade contendo um grupo heme. A mioglobina e a cadeia β da hemoglobina tem estrutura terciária semelhantes.

Se for feito um gráfico da fração de hemoglobina oxigenada (\bar{Y}) ou seja, a fração de grupos heme com oxigênio ligado como função da pressão parcial de O_2 (P_{O_2}) obter-se-à a curva equilíbrio da hemoglobina com oxigênio (figura 4a). O gráfico obtido tem a forma sigmoide. A vantagem fisiológica da curva de equilíbrio da hemoglobina ter a forma sigmóide é percebida quando comparada com a curva correspondente para a mioglobina (figura 4b), que tem uma forma hiperbólica.

A forma hiperbólica da curva da mioglobina é aquela esperada para a combinação de uma molécula de mioglobina com uma molécula de oxigênio. A mesma forma de curva seria esperada para a hemoglobina se os quatro estágios da oxigenação ocorressem independentemente. Mas, a forma sigmóide para a curva de mioglobina mostra que a ligação do oxigênio a um grupo heme facilita a ligação do oxigênio nos outros grupamentos heme. Em outros termos a união do oxigênio à hemoglobina é cooperativa.

Este fenômeno de interação cooperativa na ligação oxigênio é conhecido como interação heme-heme. Este fenômeno não pode ser devido à interação direta entre os sítios de ligação pois os grupamentos heme estão distantes na estrutura da hemoglobina. A interação origina-se indiretamente de mudanças conformacionais induzidas pela ligação com oxigênio que estão associadas com mudanças na estrutura quaternária entre oxi- e deóxi-hemoglobina (**BALDWIN, 1975 IN MARIGHETO**). Vê-se portanto, que a função da globina vai além de propiciar ao heme um ambiente hidrofóbico que torna possível a ligação reversível íon ferroso-oxigênio; ela capacita os quatro átomos de ferro, dentro de cada molécula, a interagir de maneira fisiologicamente vantajosa. A combinação de 3 átomos de ferro com oxigênio acelera a combinação de oxigênio com o quarto e, de modo análogo, a liberação de oxigênio por 3 átomos de ferro faz com que o quarto liberte-se seu oxigênio mais depressa. Isso tende a fazer com que cada molécula de hemoglobina transporte quatro moléculas de oxigênio ou nenhuma, assegurando um transporte de O₂ eficiente (**PERUTZ, 1964 IN MARIGHETO**).

O equilíbrio da hemoglobina com oxigênio é afetado pela presença de determinados íons e moléculas: íons hidrogênio, CO₂, sais.

III.2.3.1. ÍONS HIDROGÊNIO

Os íons hidrogênio se ligam tanto à oxi- quanto à deoxihemoglobina. Mas, em pH fisiológico, a deoxihemoglobina tem uma maior afinidade por estes íons do que a oxihemoglobina.

Os prótons se ligam à molécula quando a oxihemoglobina perde oxigênio e são liberados quando a deoxi-hemoglobina liga-se ao oxigênio. O efeito disso é o equilíbrio entre oxigênio e hemoglobina depende da concentração de íons hidrogênio em solução, o pH. Em condições fisiológicas, uma queda do pH, reduz a afinidade pelo Oxigênio e um aumento no pH, aumenta a afinidade pelo oxigênio. Mas a interação cooperativa é fracamente alterada pela variação do pH., isto é, a forma sigmóide da curva de equilíbrio se mantém pouco inalterada. (**BALDWIN, 1975 IN MARIGHETO**). Esta interação entre a ligação com o oxigênio e os prótons, isto é, o efeito do pH do meio sobre a afinidade da

hemoglobina pelo oxigênio é chamado de Efeito Bohr. Isto significa que a ligação do oxigênio sítios específicos (heme) é afetada pela ligação de prótons outros sítios na cadeia de amino-ácidos, (LIMA, 1979 IN MARIGHETO).

O Efeito Bohr é a chave para o transporte do dióxido de carbono. A maior parte do dióxido de carbono expelido pelos tecidos é levado aos pulmões dissolvido no sangue como ácido carbônico, que se dissocia com a formação de prótons:



Quadro nº 05 – Efeito Bohr.

Nos tecidos a concentração de oxigênio dissolvido é baixa e a de dióxido de carbono é alta. Ocorre uma queda no pH; o aumento de prótons acompanhado do dióxido de carbono dissolvido; há então uma diminuição da afinidade da hemoglobina oxigênio. Como a oxihemoglobina libera oxigênio, sua afinidade por prótons aumenta, removendo-os da solução e permitindo que mais dióxido de carbono se dissolva no sangue. Nos pulmões onde a concentração de oxigênio é alta

e a de dióxido de carbono baixa, o processo é invertido, como o oxigênio se liga à hemoglobina, os prótons são eliminados, tirando assim o dióxido de carbono da solução que é então expelido.

III.2.4 DIÓXIDO DE CARBONO

O dióxido de carbono se liga diretamente à molécula em sítios específicos na cadeia proteica. Pode se ligar tanto à oxi- quanto à deoxi-hemoglobina, mas a deoxi-hemoglobina tem uma afinidade maior por este composto. De modo análogo à ligação de prótons, o dióxido de carbono se liga à deoxi-hemoglobina nos tecidos e é liberado quando a deoxi-hemoglobina se torna oxigenada nos pulmões. Analogamente, a afinidade pelo oxigênio é diminuída pela presença de dióxido de carbono. Esta interação direta entre hemoglobina e dióxido de carbono é responsável por 10% do transporte de dióxido de carbono.

III.2.5 O EFEITO DOS SAIS

Deoxihemoglobina tem uma maior afinidade por determinados sais do que oxihemoglobina. A afinidade pelo oxigênio é diminuída pelo aumento na concentração de sais. O equilíbrio com oxigênio é particularmente afetado por fosfatos orgânicos como 2,3-disfosfoglicerato, que está presente nos eritrócitos de mamíferos e inositol hexafosfato. (BALDWIN, 1975 IN MARIGHETO).

III.2.6. A HEMOGLOBINA COMO PROTEÍNA ALOSTÉRICA

A interação heme-heme, e as interações entre oxigênio e os quatro ligantes acima citados são conhecidos como Efeitos Cooperativos da hemoglobina. (PERUTZ, 1978 IN MARIGHETO).

A ligação do oxigênio a um grupo heme é afetada pela presença de outros ligantes em outros sítios de molécula. Em outras palavras existe uma interação entre sítios espacialmente distintos, e estas interações são chamadas interações alostéricas (do grego, allos = outro,

stereo = sólido) (**STRYER, 1979 IN MARIGHETO**). Pode-se ter duas classes de interações alostéricas (**WYMAN, 1963 IN MARIGHETO**): interações homotrópicas: se os sítios são da mesma natureza e ligam o mesmo tipo de ligante e interações heterotrópicas se os sítios ligam diferentes tipos de ligantes. A molécula de hemoglobina apresenta os dois tipos de interação - as interações homotrópicas representadas pelas interações heme-heme e as interações heterotrópicas pelo efeito Bohr e fosfatos orgânicos.

A interação heme-heme, que se traduz no traçado sigmóide da curva de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio; a elucidação da estrutura da hemoglobina, mostrando que a molécula apresenta estruturas quaternárias diferentes para oxi e deoxi-hemoglobina e que os sítios de ligação com oxigênio (grupos heme) estão distantes na molécula levaram **MONOD et al em 1965 IN MARIGHETO** a propor um modelo para explicar a reação da molécula com o ligante. Este modelo foi chamado de modelo Alostérico.

As subunidades da molécula de hemoglobina podem se associar originando duas estruturas quaternárias diferentes que mantêm em equilíbrio durante todos os estágios de ligação. Estas estruturas

diferem na maneira de como uma subunidade se liga à outra e isto altera a conformação das subunidades que uma estrutura quaternária tem maior afinidade pelo ligante do que a outra.

Estas duas formas de estrutura quaternária são chamadas de forma T (tensa) e forma R (relaxada). A forma T, a estrutura de baixa afinidade pelo ligante, é a mais estável na ausência do ligante. A forma R, a estrutura de alta afinidade pelo ligante é a mais estável para as moléculas ligadas (na presença do ligante). A união do ligante com a proteína desvia o equilíbrio em direção a estrutura R, resultando em um aumento da afinidade pelo ligante à medida que a ligação acontece. Em ambas as estruturas a afinidade pelo oxigênio de todas as subunidades em uma molécula se mantém igual.

Uma propriedade do Modelo Alostérico é que a existência dessas duas estruturas e o deslocamento do equilíbrio entre elas na presença do ligante é que favorecem a cooperatividade (interação heme-heme). O máximo de cooperatividade é atingido quando a maioria das moléculas na estrutura T é convertida à maioria das moléculas na estrutura R, na presença do ligante (**RUBIN e CHANGEUX, 1966 IN MARIGHETO**).

O modelo alostérico proposto por **MONOD et al IN MARIGHETO** explica o traçado sigmóide da curva de equilíbrio da hemoglobina com oxigênio e também explica a ausência de cooperatividade quando não ocorre mudança na estrutura quaternária. A necessidade de mudança na estrutura quaternária para a cooperatividade foi demonstrada por **PERUTZ em 1970 IN MARIGHETO**. Mas, recentemente, foi demonstrado que a presença de dois tipos diferentes de estrutura quaternária não é um pré-requisito absoluto para a cooperatividade na hemoglobina (**ANTONINI, 1984 IN MARIGHETO**).

As bases moleculares e estruturas do modelo alostérico para a hemoglobina foram estabelecidas por **PERUTZ em 1970 IN MARIGHETO**.

A forma T e, caracterizada pela baixa afinidade pelo ligante e isto pode ser devida à posição do átomo de ferro no grupo heme. Como já foi dito anteriormente, o átomo de ferro na deoxi-hemoglobina é alto - spin e se situa fora do plano do anel tetrapirrólico. A baixa afinidade também é devida ao reduzido tamanho da cavidade que aloja o grupo heme, o que dificulta a entrada do ligante. A passagem da forma T para R se dá quando a molécula recebe o ligante. A presença do ligante faz com que o

ferro se mova para dentro do plano do anel, em outros termos, faz com que o ferro passe de um estado de alto-spin para baixo-spin. O movimento do ferro, provoca uma atração na histidina proximal, ao qual ele está coordenado, produzindo um movimento na subunidade. Com isso ocorre uma alteração na estrutura terciária e uma modificação nos contatos entre as cadeias induzindo uma nova estrutura quaternária. Há então uma diminuição na rigidez da molécula, ela passa da forma T para a forma R. Do ponto de vista geométrico, a transição entre as duas estruturas é um movimento de rotação do dímero $\alpha_2\beta_2$ relativo ao dímero $\alpha_1\beta_1$, **BALDWIN, 1980; BALDWIN & CHOTHIA, 1979 IN MARIGHETO.**

III .2 .7 AS HEMOGLOBINAS

A estrutura primária de todas as proteínas, entre elas a hemoglobina, é determinada geneticamente sendo a informação transmitida de geração a geração. Mas, os genes podem sofrer mutações e como consequência podemos ter pequenas alterações (substituições de amino-ácidos) na estrutura primária que se refletirá nas estruturas

secundária, terciária e quaternária e, conseqüentemente problemas relacionados com a função da proteína no organismo como um todo podem surgir. Muitas vezes, a alteração é de tal importância que uma doença pode se manifestar.

Estas são as chamadas "patologias ou doenças moleculares": uma alteração a nível molecular se manifesta no organismo como doença. Dentre as patologias moleculares relacionadas com a hemoglobina. As hemoglobinopatias, a mais dramática de todas é a "anemia da célula falciforme" (sickle cell anemia) em que os indivíduos apresentam não só a molécula de HbA (normal) mas também a hemoglobina S (do inglês Sickle) no caso heterozigotos e somente a hemoglobina S no caso dos homozigotos, sendo que neste último as conseqüências podem ser fatais.

A patologia, que mais tarde foi chamada de anemia da célula falciforme, tem afetado africanos por séculos. As referências mais antigas datam de 1670. No começo do século um cardiologista de Chicago, James Herrick, publicou a primeira nota de "um grande número de células finas e alongadas na forma de foice ou crescente" no esfregaço de sangue de um estudante das antilhas, notou que este problema podia

estar relacionado com os corpúsculos do sangue (**HERRICK, 1910 IN MARIGHETO**). Muitos outros pesquisadores observaram que a doença era transmitida de geração a geração; que o fato de as hemácias assumirem a forma de foice ou crescente estava relacionada com a presença ou ausência de oxigênio, com a temperatura alta e baixo pH (**WINSLOW & ANDERSON, 1978 IN MARIGHETO**). Mas, foi em 1949 que **PAULING** mostrou que a hemoglobina de indivíduos afetados com a anemia da célula falciforme era eletroforeticamente alterada, e que as hemácias dos indivíduos com a anemia continham ambas, a hemoglobina normal e a alterada (**PAULING, et al, 1949 IN MARIGHETO**). Em 1959, Ingram localizou a diferença eletroforética e concluiu que " o amino-ácido valina substituiu o amino-ácido glutâmico na posição 6 da cadeia β desta hemoglobina"(notação $A_6 \text{ glu} \rightarrow \text{val}$). ^{$\alpha_2\beta_2$}

Esta substituição produz diferenças significativas entre a Hb A e a Hb S levando a uma série de conseqüências clínicas nos portadores de tal hemoglobina. Ao ser deoxigenada a Hb S se polimeriza formando fibras, estruturas longas e tubulares (**NOGUCHI & SCHECHTER, 1981 IN MARIGHETO**) que levam à distorção das células (hemácias). Porque esta substituição leva à formação de fibras

ainda é objeto de estudos (**FUNG et al, 1975 IN MARIGHETO**) mas, como esta posição está na superfície da molécula e é acessível para contatos intermoleculares, as mudanças associadas com a transição R → T podem permitir interações específicas entre moléculas e levar à formação de fibras.

Pode-se resumir o quadro da anemia falciforme como segue:

- nos capilares (tecidos) a hemoglobina S passa da forma oxida para deoxi- com consequente liberação do O₂

- polimerização da Hb S e formação de fibras.

- a hemácia assume a forma de foice ou crescente, às vezes de modo reversível, outras não.

- as células falciformes são retiradas da circulação pelo baço e fígado e isto a longo prazo causa anemia.

- as células falciformes são mais frágeis que as hemácia normais e se rompem mais facilmente podendo obstruir capilares levando à isquemias e infartos e consequente necrose de tecidos e órgãos e também processos inflamatórios nas articulações.

O gene S - assim chamado o gene mutante que codifica hemoglobina S - ocorre entre africanos e negros de outros países para

onde os africanos foram exportados durante a escravidão. Em alguns pontos da África até 45% da população possuem o gene S e, entre os negros americanos cerca de 8% o possuem (**WINSLOW e ANDERSON, 1978 IN MARIGHETO**).

Quanto à hemoglobina S, ainda podemos dizer que a curva de equilíbrio de oxigênio em pH 7,14 é idêntica à curva da hemoglobina A. (**ANTONINI e BRUNORI, 1971 IN MARIGHETO**).

III.2.8. COMPONENTES DA HEMOGLOBINA

A hemoglobina ocorre nos eritrócitos anucleados na maioria das espécies de mamíferos e ocorre em eritrócitos nucleados nos outros vertebrados. Todos os anfíbios possuem eritrócitos nucleados. Eritrócitos anucleados consomem menos oxigênio que os nucleados e são, por esta razão, carreadores de oxigênio mais eficientes, mas eles precisam ser repostos com mais frequência, isto é, sua vida útil é menor do que os eritrócitos nucleados.

Como já dissemos no início deste capítulo, a hemoglobina de mamíferos é um tetramero composto por 2 subunidades α e 2

subunidades β . Está é a chamada a componente majoritária da hemoglobina. Hemolisados humanos podem conter outra componente - "a componente minoritária"- também um tetrâmero composto por duas subunidades α e duas subunidades δ . A cadeia δ é muito similar à cadeia β na sequência de amino-ácidos, diferindo apenas em dez posições. **(ANTONINI & BRUORI, 1971 IN MARIGHETO).**

Em outras espécies de vertebrados, anfíbios por exemplo, os hemolisados apresentam componentes múltiplos da hemoglobina e estas são encontradas em todos os indivíduos normais.

Outra informação importante que gostaríamos de enfatizar é que a hemoglobina da fase adulta do indivíduo é diferente da hemoglobina da fase larval ou fetal. No caso da espécie humana, a hemoglobina fetal apresenta uma componente majoritária que é um tetrâmero com peso molecular de 64.500 e contém 2 cadeias α e duas cadeias γ .

A cadeia γ , como as cadeias β e δ contém 146 resíduos de amino-ácidos.

III. 3 – VERIFICAÇÃO DO SANGUE PARA FINS PERICIAIS

Quando depara-se com uma mancha de sangue, utilizamos a diagnose sanguínea específica, para a verificação desta mancha. Para este fim, utilizamos as “provas de certeza”. Estas fornecem, ao perito, elementos de grande valia para o êxito das investigações (**DARUGE, MASSINI & GALDINO, 1975; DOREA, 1989, ALCÂNTARA, 1982**).

Dentre as provas de certeza, há a reação cristalográfica. Esta nos fornece sistemas diferentes de cristalização, permitindo com isso a identificação da espécie de onde proveio tal sangue (**MARTINS, 1929; COSTA, 1933; FERREIRA, 1962**).

Inúmeras pesquisas e trabalhos já foram elaborados sobre esta importante “prova de certeza”, demonstrando a grande valia desta para a solução de crimes hediondos e furtos, entre outros, tendo em vista que, em muitos crimes, as manchas de sangue estão presentes (**ARBENZ, 1988; ALMEIDA JR.,1957**).

A cristalização da hemoglobina permite a diagnose específica do sangue (**COSTA, 1933**).

É indispensável o estudo das qualidades ópticas dos cristais, as suas características cristalográficas e o seu arranjo nas preparações, com o objetivo de individualizar a amostra o mais exatamente possível. (FERREIRA, 1962, FÁVERO, 1980).

Mas por se tratar de um trabalho minucioso, muito ainda há por se fazer, para se viabilizar a sua utilização em todo o território nacional.

III.4 IMPORTÂNCIA DESTE EXAME

Como é de conhecimento geral, atualmente os peritos podem contar com duas outras provas de certeza para a identificação do sangue de animais, trata-se do teste de soro-precipitação ou UHLENHUTH e do teste de D.N.A.. Ambos produzem resultados seguros, mas ambos demandam pessoal especializado, maquinário e equipamentos de custo relativamente alto e são métodos cujos resultados não são obtidos de imediato. Por outro lado, embora a técnica de UHLENHUTH (soro precipitação) seja bastante utilizada, no campo Médico-Forense, existem muitas dificuldades na praticidade da

aplicação desta técnica, uma vez que os laboratórios periciais necessitam de soros específicos de determinados animais com titulação elevada para testarem as amostras que se pretendem ampliar identificando a que tipo de animal pertencem a mesma. Além disso, embora o DNA represente a impressão digital genética de uma determinada pessoa ou de um determinado animal, a de se ressaltar que a individualidade de suas características nos permitem apenas estabelecer uma análise comparativa com padrões pré-existentes. Como se sabe, em nosso país, não existe ainda nenhum padrão de DNA para as espécies ora estudadas. Devido a estes fatos, estes testes tornam-se inviáveis e em muitos casos impraticáveis.

Levando-se em conta também as desigualdades existentes entre as várias regiões, principalmente a desigualdade econômica de muitas delas, esta impraticabilidade torna-se mais acentuada, chegando ao ponto de muitos afirmarem serem impossíveis as identificações de animais pelo sangue. Este fator é de grande relevância pois estes testes são partes integrantes e muitas vezes são fatores incriminatórios, sem os quais os delitos ou barbáries praticados,

deixam de existir por faltas de provas, ficando o Juiz ou autoridade competente impossibilitado de cumprir a Lei.

O teste para obtenção de cristais de hemoglobina se justifica, pelo fato de nele serem empregados apenas quatro drogas, de fácil obtenção, fácil manipulação e baixo custo, além de um microscópio óptico simples, uma centrífuga e algumas lâminas.

Uma vez obtida a lâmina do sangue encontrado no local do crime, ou barbárie, pode-se através do padrão óptico do arranjo estrutural dos cristais de hemoglobina, que segundo vários autores são específicos para cada espécie animal, estabelecer-se por comparação de qual animal proveio tal sangue caracterizando ou descaracterizando um possível crime.

Desta forma, o Cirurgião-Dentista investido nas funções periciais ou o Perito técnico existente nos diversos IMLs ou mesmo delegacias do interior, em sua prática diária, ao receberem, ou ao serem chamados para o local do crime, a fim de remover sangue para exame, quer "in natura", em manchas ou sob a forma de crostas, suspeito de pertencerem a um determinado animal silvestre, bem como, a um animal doméstico submetido a morte ou tortura, poderá

satisfazer as autoridades competentes, ao utilizar este teste, fornecendo subsídios indispensáveis para a caracterização ou descaracterização do crime. Tanto nos casos de torturas de animais domésticos, como nos de matança de animais silvestres, ambos, estão protegidos pela Lei, através do artigo 225 inciso VII e parágrafo 3º da Constituição da República Federativa do Brasil , promulgada em 05 de Outubro de 1988, sendo também garantida esta proteção pelos artigos 193 em seu inciso X e artigo 195 da constituição do Estado de São Paulo⁶, promulgada em 05 de Outubro de 1989 e pela Lei de proteção à fauna nº 5197 de 03 de janeiro de 1967 em seus artigos 1º, 3º, 10º, 27º , no caput e parágrafos 1º, 5º, deste mesmo artigo, além dos artigos 31 e 34. Estes últimos, estabelecem, como penalidade, dependendo da forma como foi praticado o ato (caça, transportes, etc.), reclusão de 1 a 3 anos e de 2 a 5 anos, independentemente de queixa; por serem estes crimes caracterizados como inafiançáveis. A verificação das espécies através dos cristais de hemoglobina, pelo fato de ser esta de fácil manipulação, baixo custo, de resultados de rápida obtenção poderá viabilizar a aplicação da Lei na sua integridade e aumentar a esperança na perpetuação e aumento dos animais

ameaçados de extinção e que são caçados indiscriminadamente pela sua pele, pena ou carne.

Segundo os autores, que se dedicaram ao estudo da cristalografia, esta é a mais delicada prova das diferenças de constituição química, pois se acompanha da diferença de estrutura física (**COSTA, 1933; FERREIRA, 1962; FÁVERO, 1980**).

IV - REVISTA DA LITERATURA

MARTINS (1929), estudou os cristais de oxihemoglobina utilizando sangue humano, de cachorro, cavalo, gato e cobaya, utilizando-se para a obtenção dos mesmos várias técnicas e concluiu que o método de Reichert, após modificação realizada por ele favorecia o aparecimento dos cristais, finaliza ainda aconselhando o emprego na prática Médico-Legal.

COSTA (1933), estudou os cristais de hemoglobina, utilizando sangue humano, cachorro do mato, ouriço, anta, cabra, carneiro, gato, jumento, macaco coatá, rato dos banhados, cavalo, cateto, pato, pombo, porco, burro, rato branco, coelho, capivara, cobaia, cotia e cachorro, através de três métodos elaborados por ele, determinando qual o melhor método para obtenção dos cristais, bem como o tempo necessário para a sua obtenção e o ângulo. E conclui afirmando “ consideramos fundamental no estudo da cristalografia da hemoglobina

a uniformização e simplificação dos métodos e processos de obtenção dos cristais...”; os caracteres cristalográficos e óticos individualizam indiscutivelmente os cristais na espécie; o prático tem, na observação do arranjo dos cristais nas preparações de sangue de cada espécie animal, meio para um diagnóstico de probabilidade; a perfeita caracterização dos cristais de hemoglobina só se obtém quando o exame é praticado logo após a sua obtenção, porque a luz, o ar, a temperatura, modificam-lhes a cor, a forma, e os caracteres cristalográficos e óticos, a cristalização da hemoglobina resolve em Medicina Legal o problema da diagnose do sangue, porque conduz a determinação da espécie. Evidentemente não é um processo acessível a qualquer técnico, fazendo-se mister um especialista no assunto.

SARDÁ (1949), no capítulo dedicado ao estudo das hemácias, discutindo as propriedades da hemoglobina e de seus derivados, afirma que os cristais se formam em forma característica e variável, segundo a espécie animal de procedência, afirmando que predomina nos mamíferos o sistema rômico (prismas tetraedros, lâminas) e no cavalo também em hexagonal.

DUKES (1962), em seu capítulo destinado ao estudo do sangue, ao discutir a hemoglobina e os seus compostos e derivados, afirma que segundo Reichert Y Brown, de todas as espécies estudadas por estes autores, puderam ser obtidos cristais, afirmando ainda que variou amplamente a facilidade de cristalização, a forma e tamanho dos cristais, entre outros fatores.

FERREIRA (1962), no capítulo dedicado ao estudo da Perícia do sangue, recomenda como: “processos excelentes para obtenção de cristais de hemoglobina”os de autoria de Carlos Costa”. E continua afirmando, que o perito utilizando destes métodos obterá com facilidade cristais de hemoglobina, recomendando o estudo dos caracteres ópticos e cristalográficos dos cristais de hemoglobina.

FÁVERO (1980), no capítulo dedicado à hemoglobina Médico-Legal. - Doutrina e Perícia, afirma que para a diagnose específica pode ser empregada a cristalização da hemoglobina, desde que sejam empregados processos uniformes e simplificados para a

obtenção dos cristais. E continua afirmando que os métodos propostos por Carlos Costa, proporcionavam melhores resultados.

ARBENZ (1988), no capítulo em que trata da Hematologia Médico-Legal, ao comentar a cristalização da Hemoglobina, afirma que Arnaldo Amado Ferreira recomendava a técnica de Carlos Costa.

COSTA et al. (1953), descrevem que a hemoglobina pode decompor-se em globina e hematina. Os cristais de hematina e hemina têm forma variável segundo a espécie animal, propriedade utilizada em Medicina Legal para o diagnóstico das manchas de sangue.

DI FIORI (1960), ao explicar a composição da hemoglobina, define a mesma como uma proteína conjugada ou seja um cromoprotéide em cuja constituição entram a globina (proteína) e uma porfirina (que contém ferro) denominada heme. Afirma ainda que este grupo heme cristaliza facilmente originando cristais retangulares ou rômnicos.

DOURIS (1925), descreve que ao contato com o ar a hemoglobina se cristaliza diferentemente para cada espécie animal o que permite distinguir os diferentes sangues em Medicina Legal.

V - OBJETIVOS

O presente trabalho pretende verificar a cristalização da hemoglobina do sangue de capivara, utilizando-se as preparações propostas por Costa⁸ em 1933 e as preparações modificadas na presente pesquisa, apontando dentre estas qual ou quais as melhores técnicas, para identificação de animais, fornecendo subsídios indispensáveis para a caracterização ou descaracterização de crime, tanto na matança de animais silvestres como torturas de animais domésticos, ambos protegidos por lei, viabilizando a aplicação da Lei na sua integridade e aumentar a perpetuação e aumento dos animais ameaçados de extinção e que são caçados indiscriminadamente pela sua pele, pena ou carne.

VI – MATERIAL E MÉTODOS

Para a análise dos cristais de hemoglobina, primeiramente padronizou-se a forma associada da hemoglobina a ser estudada como sendo a oxihemoglobina, por ser a mais estável.

Esta análise foi efetuada em sangue de capivaras provenientes do setor de Zootecnia da Esalq/USP.

Para verificar a formação ou não dos cristais de hemoglobina, utilizou-se as três preparações propostas e idealizadas por Carlos Costa⁸, em 1935 e as modificadas neste trabalho.

Na primeira, o sangue fresco é tratado com oxalato de amônio triturado, na proporção mínima de 5%; junta-se saponina e agita-se o sangue com bastão de vidro. As preparações são feitas e conservadas à temperatura ambiente.

Na segunda, o sangue fresco oxalatado é centrifugado, o sedimento é laqueado pela saponina; junta-se sulfato de sódio, agita-se energicamente e em seguida centrifuga-se (10 minutos velocidade 4),

fazendo-se as preparações que deverão ser conservadas em temperatura baixa.

Na terceira preparação, ao coágulo junta-se saponina e oxalato. Tritura-se, cuidadosamente num gral, durante o tempo necessário à transformação do coágulo em líquido, o qual deve ser tratado por sulfato de sódio e em seguida centrifugado durante uma hora, modificado para dez minutos na velocidade 04 da Centrífuga Excelsa Baby 1, modelo 206 Fanem. As preparações foram conservadas em temperatura baixa ou mesmo na temperatura ambiente.

Na Quarta preparação o sangue oxalatado foi preparado como na segunda técnica, modificando-se apenas a droga ao invés de saponina, utilizou-se o éter.

Uma vez estabelecidos as formas de preparações a serem utilizadas, tornou-se necessário estabelecer qual animal seria pesquisado. O critério para esta seleção foi o de se estudar animais silvestres que podem ser utilizados como alimentação, e/ou animais cuja, pele, etc., possuam algum valor comercial, sempre levando em consideração a disponibilidade de tais animais, bem como o seu

perfeito manejo, pois não se justificaria o sacrifício de um animal silvestre, para se obter somente alguns milímetros de sangue, não estando desta forma, lutando por sua preservação. Todos os procedimentos de coleta do sangue destes animais foram realizados pelos Técnicos ou Veterinários responsáveis pelos mesmos. Também priorizou-se aqueles animais que estão em maior contato com o homem, e que, devido a esta proximidade, venham de alguma forma serem maltratados, caracterizando novamente crime segundo as Leis anteriormente citadas.

Com vista nestes critérios elegeu-se a capivara (macho e fêmea) (figuras nº 01 e 02) como o animal a ser analisado, sendo analisado 18 lâminas de sangue machos e fêmeas, sendo utilizado as três preparações propostas por Carlos Costa, sendo uma amostra lutada com luto de Look e a outra não, num total de 36 (trinta e seis) amostras.

Uma vez obtida as lâminas, estas foram observada nos intervalos de doze, vinte e quatro, quarenta e oito horas, utilizando-se de fichas de coleta (vide apêndice) confeccionadas para tal objetivo. Esta observação foi necessária para se verificar o tempo para a

formação (cor, definição de contorno, tamanho, quantidade, localização) e completa dissolução ou desintegração do cristal. Neste intervalo de tempo, quando houve cristalização esta foi devidamente registrada por fotomicrografias obtidas da observação de um determinado quadrante da lâmina. inicialmente em um pequeno aumento (6,3), para se observar o padrão de distribuição dos cristais na lâmina, numa segunda tomada utilizou-se aumentos maiores (10, 16, 40 e 100), com ou sem imersão, objetivando visualizar o arranjo cristalográfico assumido pelo cristal, uma terceira tomada em imersão com aumento de 40 e 100 objetivando observar a forma assumida nas terminações de cada cristal isoladamente.

Uma vez finalizado os trabalhos verificou-se por microfotografias se houve um padrão de distribuição ou de formação estrutural constante. Destas cristalizações, devidamente registradas em microfotografias, foram obtidos esboços do cristal.

Para realizar microfotografia é necessário uma máquina fotográfica com regulagem de exposição automática e um tubo adaptador para ligá-lo ao microscópio que amplie a imagem entre 40 a 150 vezes. Aliás o conceito de microfotografia só pode ser aplicado

quando se registram imagens que foram ampliadas no mínimo, 40 vezes. Quanto maior a ampliação, maior a necessidade de luz para distinguir cores e formas.

A análise dos resultados foi realizada com o intuito de se averiguar qual das três técnicas empregadas nos exames forneceria um resultado cristalográfico (cor, tamanho, localização, definição de contorno) mais indicado para cada uma das condições do sangue examinado, observou-se, também, em quais casos o resultado seria mais seguro (formou ou não cristais).

Tendo em vista os resultados obtidos do sangue dos animais, verificou-se se o padrão cristalográfico permanecia constante, bem como estabeleceu o tempo necessário para obtenção dos mesmos, e verificou-se se havia diferenças cristalográficas quanto ao sexo.

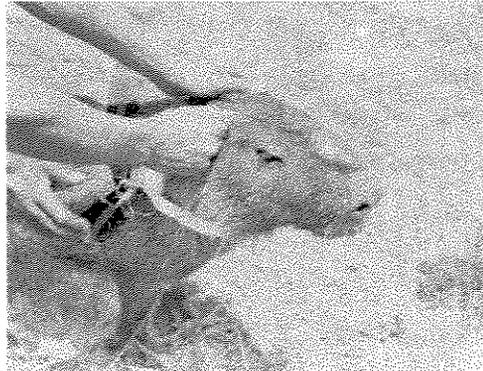


Figura nº 01 – Capivara macho glândulas supranasal

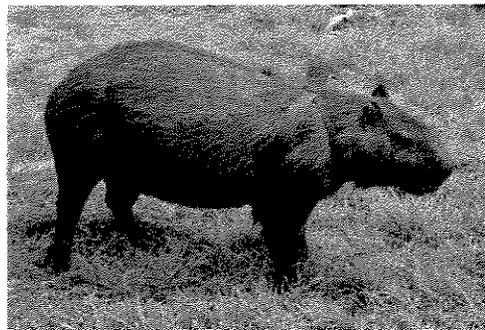


Figura nº 02 – Capivara Fêmea.

VI.1 – ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise dos resultados foi realizada com o intuito de se averiguar qual das quatro técnicas empregadas nos exames fornecerá um resultado cristalográfico (cor, tamanho, localização, definição de contorno) mais indicado para cada uma das condições do sangue examinado, verificando-se, também, em quais casos o resultado será mais seguro (formará ou não cristais). Para tanto utilizar-se-à o **teste exato de Fisher**.

VII - RESULTADOS

Após a realização da coleta, manipulação e obtenção das lâminas, obtive-se os seguintes resultados, que foram submetidos a análise estatística, conforme as tabelas e fotografias listadas no apêndice.

VII.1 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Tabela 7. Quantidade de cristal em função do sexo.

quantidade	Sexo	
	Feminino	masculino
nenhum	18	17
poucos	21	19
muitos	33	34

Tabela 8. Quantidade de cristal em função da técnica

12 horas				
	Técnica			
Quantidade	1	2	3	4
muitos	7	12	0	0
Poucos	5	0	0	11
Nenhum	0	0	12	1
24 horas				
	Técnica			
Quantidade	1	2	3	4
muitos	12	12	0	0
poucos	0	0	0	12
nenhum	0	0	12	0
48 horas				
	Técnica			
Quantidade	1	2	3	4
muitos	12	12	0	0
poucos	0	0	0	12
nenhum	0	0	12	0

Tabela 9. Quantidade de cristal em função do luto

12 horas		
	luto	
quantidade	sim	não
muitos	7	12
poucos	10	6
nenhum	7	6
24 horas		
	luto	
quantidade	sim	não
muitos	12	12
poucos	6	6
nenhum	5	5
48 horas		
	luto	
quantidade	sim	não
muitos	12	12
poucos	6	6
nenhum	6	6

Tabela 10. Tamanho do cristal em função do sexo

tamanho	Sexo	
	Feminino	masculino
pequeno	18	14
médio	18	21
grande	18	18

Tabela 11. Tamanho do cristal em função da técnica

12 horas

tamanho	Técnica			
	1	2	3	4
pequeno	0	0	0	10
médio	12	0	0	1
grande	0	12	0	0

24 horas

tamanho	Técnica			
	1	2	3	4
pequeno	0	0	0	11
médio	12	0	0	1
grande	0	12	0	0

48 horas

tamanho	Técnica			
	1	2	3	4
pequeno	0	0	0	11
médio	12	0	0	1
grande	0	12	0	0

Tabela 12. Tamanho do cristal em função do luto

12 horas		luto	
tamanho	sim	não	
medio	6	7	
grande	6	6	
peq	5	5	
24 horas		luto	
tamanho	sim	não	
medio	6	7	
grande	6	6	
peq	6	5	
48 horas		luto	
tamanho	sim	não	
medio	6	7	
grande	6	6	
peq	6	5	

Tabela 13. Coloração do cristal em função do sexo.

coloração	Sexo	
	Feminino	masculino
rosa medio	21	16
intenso	6	8
fraco	27	29

Tabela 14. Coloração do cristal em função da técnica.

12 horas				
	técnica			
coloracao	1	2	3	4
rosa medio	9	0	0	4
intenso	0	12	0	0
fraco	3	0	0	7

24 horas				
	técnica			
Coloracao	1	2	3	4
rosa medio	9	10	0	6
Intenso	0	2	0	0
Fraco	3	0	0	6

48 horas				
	técnica			
coloracao	1	2	3	4
rosa medio	3	12	0	3
intenso	0	0	0	0
fraco	9	0	0	9

Tabela 15. Coloração do cristal em função do luto.

12 horas	luto	
	sim	não
coloração		
rosa medio	4	6
intenso	6	6
fraco	7	6

24 horas	luto	
	sim	não
coloração		
rosa medio	4	5
intenso	1	1
fraco	13	12

48 horas	luto	
	sim	não
coloração		
rosa medio	6	12
intenso	0	0
fraco	12	6

Tabela 16. Local do cristal em função do sexo

Local	Sexo	
	Feminino	masculino
Irregular	21	19
Regular	33	34

Tabela17. Local do cristal em função da técnica

12 horas		técnica		
local	1	2	3	4
irregular	5	0	0	11
regular	7	12	0	0
24 horas		técnica		
local	1	2	3	4
irregular	0	0	0	12
regular	12	12	0	0
48 horas		técnica		
local	1	2	3	4
irregular	0	0	0	12
regular	12	12	0	0

Tabela 18. Local do cristal em função do luto

12 horas		luto	
local		sim	não
irregular	7	7	12
regular	10	10	6
24 horas		luto	
local		sim	não
irregular	12	12	12
regular	6	6	6
48 horas		luto	
local		sim	não
irregular	12	12	12
regular	6	6	6

Tabela 19. Contorno em função do sexo.

contorno	Feminino	masculino
irregular	9	9
regular	45	44

Tabela 20. Contorno do cristal em função da técnica

12 horas	técnica			
Contorno	1	2	3	4
Irregular	0	0	0	0
Regular	12	12	0	11

24 horas	técnica			
Contorno	1	2	3	4
Irregular	0	0	0	0
Regular	12	12	0	12

48 horas	técnica			
Contorno	1	2	3	4
Irregular	6	6	0	6
Regular	6	6	0	6

Tabela 21. Contorno do cristal em função do luto

12 horas		luto	
contorno	sim	não	
irregular	0	0	
regular	17	18	
24 horas		luto	
contorno	Sim	não	
irregular	0	0	
regular	18	18	
48 horas		luto	
Contorno	sim	não	
Irregular	0	18	
Regular	18	0	

Observou-se pelo teste exato de Fisher que a quantidade, o tamanho a cor, o local e o contorno do cristal não estão associados ao sexo do animal ($P > 0,05$) (tabelas 7, 10, 13, 16, 19).

Mas a quantidade de cristal depende da técnica empregada (tabela 8). Assim, nas primeiras 12 horas, na técnica 1, em 58% dos casos haviam muitos cristais e em 42% dos casos haviam poucos, na técnica 2 haviam muitos cristais em todas as repetições, já na técnica 3, não havia nenhum cristal. Na técnica 4, em 92% dos casos haviam poucos cristais e 8% não havia cristais.

Com 24 e 48 horas, haviam muitos cristais em todas as repetições das técnicas 1 e 2, poucos cristais em todas as repetições da técnica 4 e nenhum cristal na técnica 3.

A técnica utilizada influenciou no tamanho do cristal ($P < 0,05$), como se pode observar na tabela 11. Tanto as 12 horas, como as 24 e 48 horas, 100% dos cristais da técnica 1 tinham tamanho médio, 100% dos cristais da técnica 2 tinham tamanho grande. Na técnica 4, 91% tinham tamanho pequeno e 9 % tamanho médio.

A técnica influenciou, também a cor do cristal ($P < 0,05$). Com 12 horas, 75% dos cristais da técnica 1 tinham cor rosa médio e 25% rosa fraco. Na técnica 2, 100% dos cristais tinham cor rosa intenso e na técnica 4, 64% tinham coloração rosa fraco e 36% rosa médio (tabela 14).

O local do cristal também tem associação com a técnica empregada ($P < 0,05$). Assim, as 12 horas, 58% dos cristais da técnica 1 se encontravam de maneira regular e 42% irregular. Na técnica 2, 100% se encontravam de forma regular e na técnica 4, 100% de forma irregular (tabela 17).

A técnica empregada não influenciou o contorno do cristal ($P>0,05$), tabela 20.

A quantidade, o tamanho e o local do cristal não estão associados a utilização ou não do luto ($P>0,05$), tabelas 9, 12, 18.

Já a coloração do cristal foi influenciada pelo luto somente após 48 horas. Nesse horário, 67% dos cristais que receberam luto tinham coloração rosa fraco e 33% rosa médio, já os cristais que não receberam luto, 67% tinham coloração rosa médio e 33% rosa fraco (tabela 15).

Também só houve diferença no contorno em função do luto, no tempo de 48 horas ($P<0,05$). Nesse horário, 100% dos cristais que receberam luto tinham contorno regular e 100% dos que não receberam tinham contorno irregular.

VIII DISCUSSÃO

Observou-se que a quantidade, o tamanho a cor, o local e o contorno do cristal não estão associados ao sexo do animal ($P>0,05$). Mas a quantidade de cristal depende da técnica empregada. Assim, nas primeiras 12 horas, na técnica 1, em 58% dos casos haviam muitos cristais e em 42% dos casos haviam poucos, na técnica 2 haviam muitos cristais em todas as repetições, já na técnica 3, não havia nenhum cristal. Na técnica 4, em 92% dos casos haviam poucos cristais e 8% não havia cristais.

Com 24 e 48 horas, haviam muitos cristais em todas as repetições das técnicas 1 e 2, poucos cristais em todas as repetições da técnica 4 e nenhum cristal na técnica 3.

A técnica utilizada influenciou no tamanho do cristal ($P<0,05$), tanto as 12 horas, como as 24 e 48 horas, 100% dos cristais da técnica 1 tinham tamanho médio, 100% dos cristais da técnica 2 tinham tamanho grande. Na técnica 4, 91% tinham tamanho pequeno e 9 % tamanho médio.

A técnica influenciou, também a cor do cristal ($P < 0,05$). Com 12 horas, 75% dos cristais da técnica 1 tinham cor rosa médio e 25% rosa fraco. Na técnica 2, 100% dos cristais tinham cor rosa intenso e na técnica 4, 64% tinham coloração rosa fraco e 36% rosa médio.

O local do cristal também tem associação com a técnica empregada ($P < 0,05$). Assim, as 12 horas, 58% dos cristais da técnica 1 se encontravam de maneira regular e 42% irregular. Na técnica 2, 100% se encontravam de forma regular e na técnica 4, 100% de forma irregular

A técnica empregada não influenciou o contorno do cristal ($P > 0,05$).

A quantidade, o tamanho e o local do cristal não estão associados a utilização ou não do luto ($P > 0,05$).

Já a coloração do cristal foi influenciada pelo luto somente após 48 horas. Nesse horário, 67% dos cristais que receberam luto tinham coloração rosa fraco e 33% rosa médio, já os cristais que não receberam luto, 67% tinham coloração rosa médio e 33% rosa fraco.

Também só houve diferença no contorno em função do luto, no tempo de 48 horas ($P < 0,05$). Nesse horário, 100% dos cristais que

receberam luto tinham contorno regular e 100% dos que não receberam tinham contorno irregular.

Os resultados obtidos neste estudo revelam que a técnica de **COSTA, 1933** é de grande valia, de fácil execução, mas depende de drogas de boa procedência e da manutenção das condições externas (temperatura, luminosidade, umidade, contaminação) aos preparados (lâminas).

Concorda-se também com **DUKES**, pois este afirma que em seus experimentos estes variavam amplamente a facilidade de cristalização, a forma e tamanho dos cristais, entre outros.

A escolha dos métodos desenvolvidos por **COSTA, 1933**, vem a concordar com as escolhas de **FERREIRA, 1962; FÁVERO, 1980; ARBENZ, 1988**.

IX CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados concluímos que:

- Este método para identificação de animais permite a obtenção de resultados rápidos, seguros, de Baixo custo e de fácil manejo associado ao fato de dispensar pessoal, drogas, máquinas e equipamentos sofisticados e de custo elevado;
- a quantidade, o tamanho, a cor, o local e o contorno do cristal não estão associados ao sexo do animal e que a quantidade de cristal depende da técnica empregada;
- a técnica 2 (sangue fresco oxalatado é centrifugado, o sedimento é laqueado pela saponina; junta-se sulfato de sódio, agita-se energicamente e em seguida centrifuga-se durante 10 minutos na velocidade 4) é a que produz mais cristais.

X - SUMMARY

The present work had as objective to select a method for identification of animals, supplying indispensable subsidies the characterization or descaracterização of crime, as much in the slaughter of wild animals as tortures of domestic animals, both proteges for law, as well as verifying the crystallization of the hemoglobina, more necessarily of the oxihemoglobina, in blood " in natura ", with anticoagulant and coagulado of capivaras.

This verification of the crystallization, aimed at to supply to the professionals, invested in the skillful function, daily pay-establishing the probable limits of this important test-of-certainty, consisting in a great ally of Justice, it wants Civilian, or Criminal.

This is the most delicate test of the differences of chemical constitution of the hemoglobina, therefore it is accompanied by of the difference of physical structure. Ally to this, this technique possesss low cost of implantation, rapidity in the attainment of the results, for being of easy red tape and handling. In the present work modified red tapes of

Coast had been used. After the compilation and analysis of the data were verified that the amount, the size, the color, the place and the contour of the crystal are not associates to the sex of the animal and that the amount of crystal depends on the used technique, being technique 2 (blood cool oxalatado are centrifugado, the sediment are laqueado by the saponina; sodium sulphate is joined, is agitated energicamente and after that centrifuga during 10 minutes in 4 speed) the one that produced more crystals.

It was also observed that of the used techniques, none influenced the contour of the gotten crystal. Of the used techniques one evidenced that the technique of nº 02 is the one that obtia bigger crystals, with more intense coloration (pink intense) and with regular distribution in the blade. Also one observed that the amount, the size and the location of the crystal are not associates to the use or of I do not fight it, after 48 hours with I only fight, had influence in the coloration and the contour of crystals.

XI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1- ALCÂNTARA, H. R. de, Perícia Médica Judicial- sangue-, Aparecida-
SP, Guanabara Dois, p. 297 a 301. 1982.

- 2-ALMEIDA JÚNIOR, A. Lições de Medicina Legal. Rio de Janeiro.
Editora Nacional de Direito, 1957. p. 82 - 84.

- 3-ARBENZ, G. O. Medicina Legal e Antropologia Forense. Rio de
Janeiro. Atheneu, 1988. p. 75 - 87.

- 4-BROWN, E. M. & DELLMANN Histologia Veterinária. Rio de
Janeiro-R.J., Editora Guanabara Koogan, 1982 p. 66 a 87.

- 5-Constituição da República Federativa do Brasil, promulgada em 05
de outubro de 1988.

6-Constituição do Estado de São Paulo, promulgada em 05 de outubro de 1989.

7-CORMACK, D.H. Histologia. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 1984. p. 103 - 106.

8-COSTA, C. Crystaes de hemoglobina em Medicina Legal. Tese (Doutoramento em Medicina Legal) São Paulo, Faculdade de Medicina de São Paulo, Universidade de São Paulo, 1933.

9-COSTA, A.C. & CHAVES, P.R. Tratado elemental de histologia y anatomia microscópica - Tomo I. Buenos Aires, Editorial Científico - Médica, 1953. p. 260 - 269.

* De acordo com a NBR-6023 de 1989, da Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT).
Abreviaturas de periódicos de conformidade com a "World List of Scientific Periodicals"

10-DARUGE, E. & MASSINI, N., GALDINO, A. M. Ensaio de sistematização sobre o ensino de Odontologia Legal e Deontologia Odontológica. Piracicaba, Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual de Campinas, 1975. p. 311 - 319.

11-DI FIORI, M. S. H. Diagnóstico Histológico. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1960. p. 401 - 431.

12-DÓREA, L. E. C. As manchas de sangue como indício em local de crime. Salvador-BA, Franco Produções Editora, 1989.

13-DOURIS, R. Guide Pratique pour l'analyse Du Sang Aux points de vue Biologique, Chimique, Toxicologique et Médico-Légal. Principes-Techniques-Etude Critique et interpretation des Résultats Vogot Frères, Editeurs - Paris, 1925, p. 409.

- 14- DUKES, H.H. Fisiologia de los animales domésticos, Aguilar-Madrid, 1962, p. 33
- 15-FAVERO, F. Medicina Legal: Introdução ao estudo da Medicina Legal. Identidade. Traumatologia, Infortunística e Tanalogia.
Belo Horizonte, Itatiaia, 1980. p. 183 - 205.
- 16-FERREIRA, A. A. Da técnica Médico - Legal na Investigação Forense. São Paulo, Editora dos Tribunais, 1962. p. 321 - 398.
- 17-GUYTON, A. C. Tratado de Fisiologia Médica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1989. p. 35 - 41.
- 18-HAYNES, R.H. & HANAWALT, P.C. A base molecular da vida - Uma introdução à Biologia Molecular. São Paulo-SP, Editora Polígono/Edusp, 1988 p. 9, 37 a 50, 204 a 213, 231, 264 a 274, 318 a 319, 344 a 352

19-JIMÉNEZ, E. G. El capibara (Hydrochoerus Hydrochaerus) Estado actual de su producción FAO, 1995.

20-JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J. Histologia Básica. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1985. p. 235 - 239.

21-Lei de Proteção à Fauna, Lei nº 5.197 de 03 de Janeiro de 1967 D. da União - nº04, de 05.01.1967.

22-MARCELO GHETO, N.A. Estudos de Espectroscopia de absorção óptica e fotoacústica aplicados à molécula de Hemoglobina. Campinas-SP, Tese para obtenção do título de Mestre em Ciências - Instituto de Física/Unicamp, 1988.

- 23-MARTINS, S. V. Contribuição para o estudo dos Crystaes de hemoglobina em Medicina Legal. Tese (Inaugural) São Paulo, Faculdade de Medicina de São Paulo da Universidade de São Paulo, 1929.
- 24- Medicina e Saúde, Editora Abril Cultural, São Paulo, nº 08, p.129-131, 1967.
- 25- Moléculas inteligentes, Ciência hoje-Revista de divulgação Científica da Sociedade Brasileira de Ciência. São Paulo-SP, nº 4, ano 1, p. 62-6, jan/fev./83.
- 26-PIZA JR., T. Esboco de uma pequena fisiologia dos animais domésticos. Piracicaba-SP, ESALQ/USP, 1949 p. 68 a 94.
- 27-RODWELL, V. W. in HARPER Bioquímica, 6ª ed., São Paulo, Atheneu Editora São Paulo, 1990 p. 40 a 49.

28- SARDÁ, J.M. Elementos de Fisiologia, Editorial Científico Médica, 5ª ed., Barcelona-Madrid, 1949, p.335.

29- Super interessante, Editora Abril, nº 84, p. 46-53, setembro/94.

30-VERDADE, L. M.; PACKER, I. U.; ROCHA, M. B.; MOLINA, F. B.; DUARTE, P. G. & LULA, L. A. B. M. Anais do 3º Workshop sobre Conservação e Manejo do Jacaré-de-papo-amarelo, Esalq/USP, Piracicaba-SP, p. 51-60, out/1993.

31-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.

XII - APÊNDICE



Figura 01. Cristais obtidos do sangue de capivara técnica 2, com luto, aumento 6,3, optovar 1,6, duplo filtro azul, sem imersão.

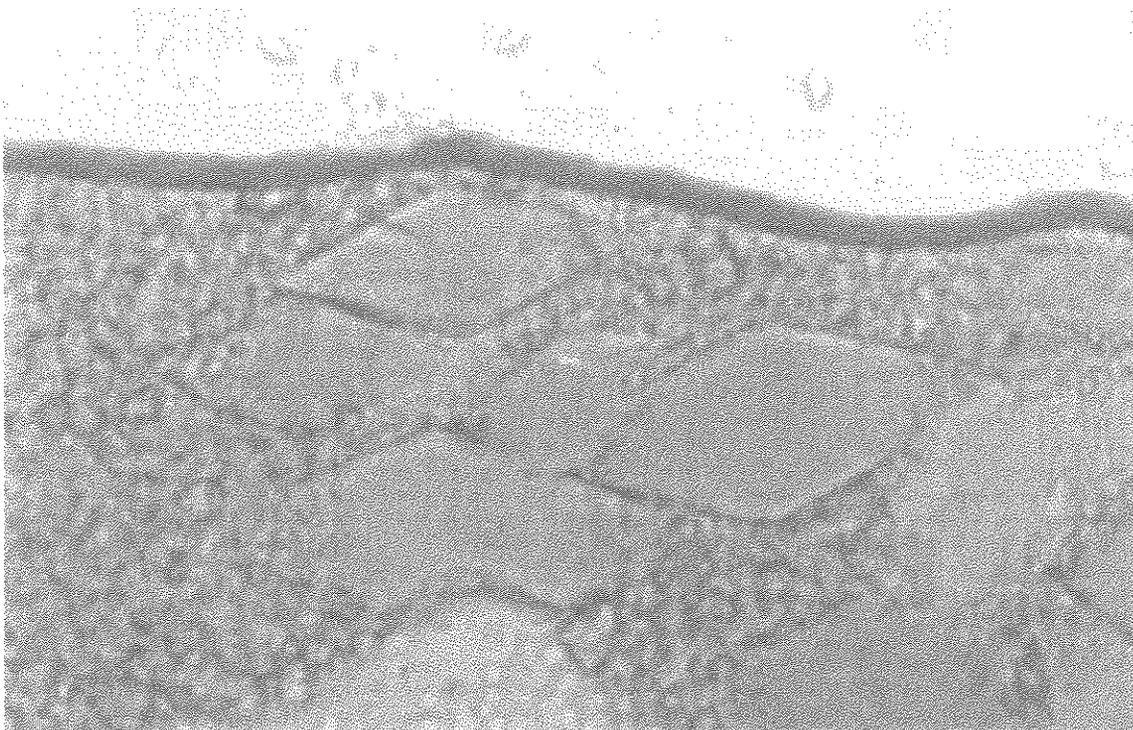


Figura 02. Cristais obtidos do sangue de capivara técnica 2, com luto, aumento 16, optovar 1,6, duplo filtro azul, com imersão.



Figura 03. Cristais obtidos do sangue de capivara técnica 2, com luto, aumento 100, optovar 1,6, filtro azul, com imersão.

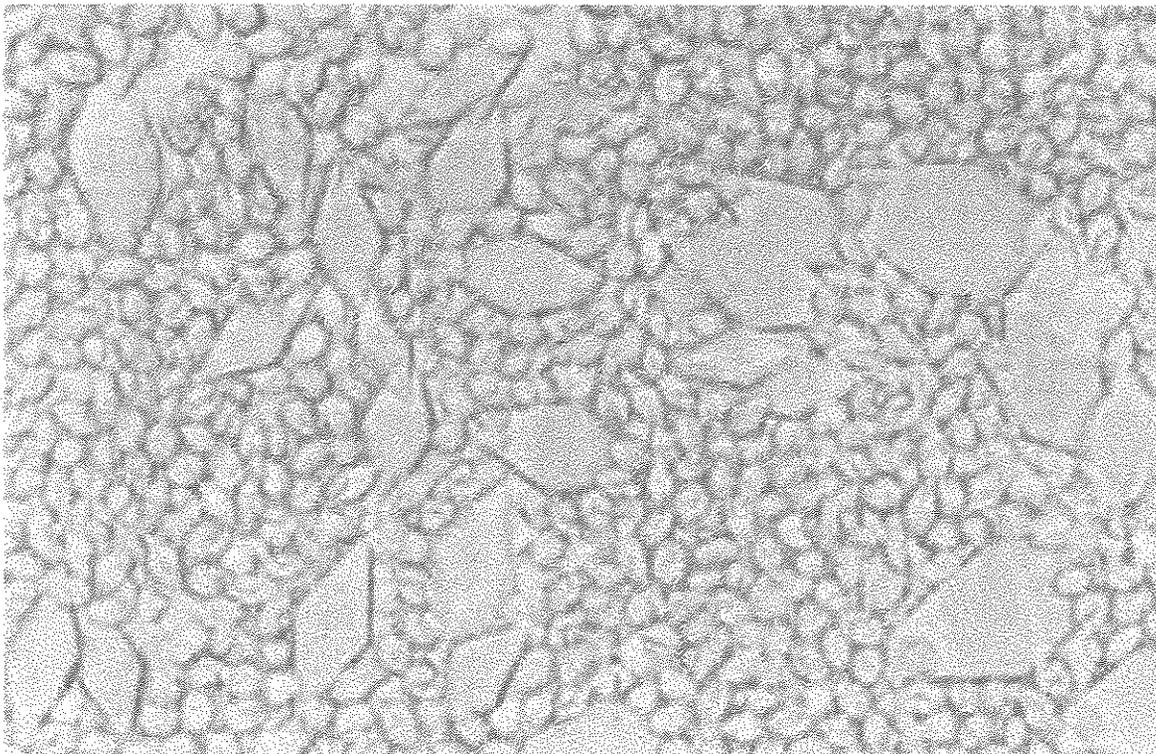


Figura 04. Cristais obtidos do sangue de capivara técnica 2, sem luto, aumento 100, optovar 1,25, filtro azul, com imersão.

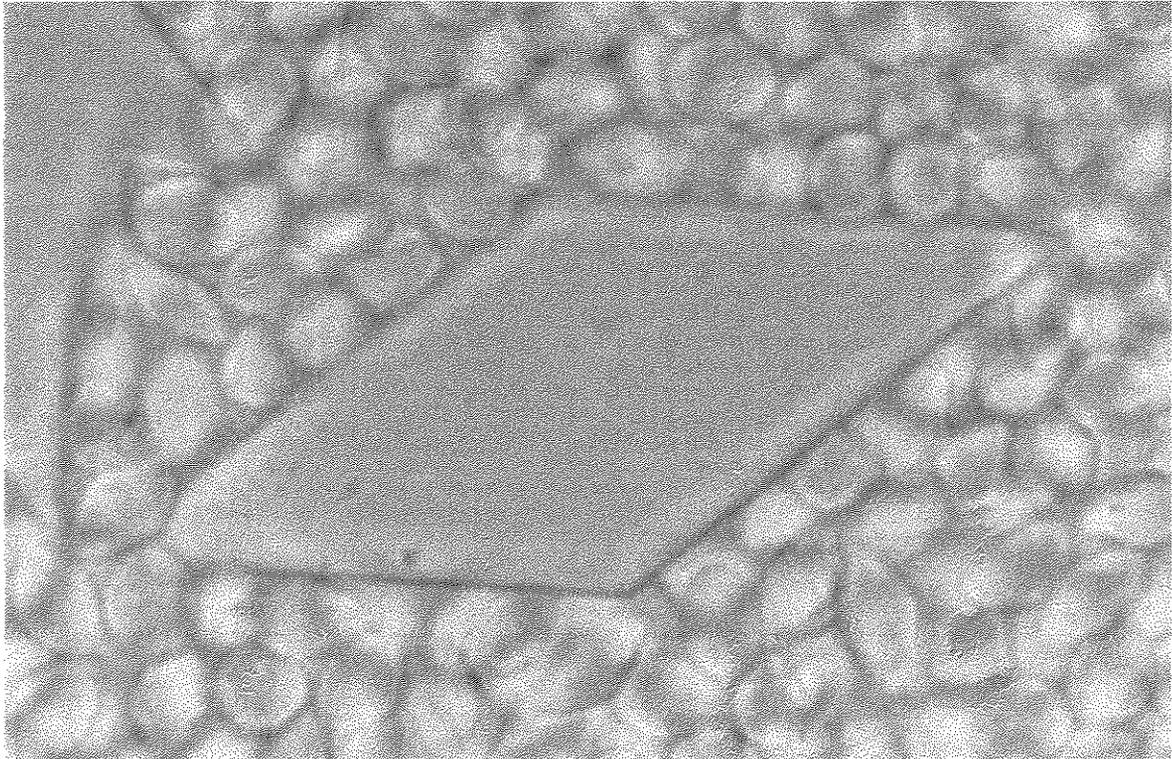


Figura 05. Cristais obtidos do sangue de capivara técnica 2, sem luto, aumento 100, optovar 1,25, filtro azul, com imersão.

TABELA 1 - DADOS OBTIDOS NAS LÂMINAS DE SANGUE COLHIDOS DO ANIMAL 01.

animal	tempo	Técnica	luto	Sexo	contorno	Coloração	tamanho	quantidade	local
1	12	1	s	f	r	zm	m	p	i
1	12	1	n	f	r	zm	m	m	r
1	12	2	s	f	r	zi	g	m	r
1	12	2	n	f	r	zi	g	m	r
1	12	3	s	f				n	
1	12	3	n	f				n	
1	12	4	s	f	r	zf	p	p	i
1	12	4	n	f	r	zf	p	p	i
1	24	1	s	f	r	zm	m	m	r
1	24	1	n	f	r	zm	m	m	r
1	24	2	s	f	r	zm	g	m	r
1	24	2	n	f	r	zm	g	m	r
1	24	3	s	f				n	
1	24	3	n	f				n	
1	24	4	s	f	r	zf	p	p	i
1	24	4	n	f	r	zf	p	p	i
1	48	1	s	f	r	zm	m	m	r
1	48	1	n	f	i	zf	m	m	r
1	48	2	s	f	r	zm	g	m	r
1	48	2	n	f	i	zm	g	m	r
1	48	3	s	f				n	
1	48	3	n	f				n	
1	48	4	s	f	r	zf	p	p	i
1	48	4	n	f	i	zf	p	p	i

TABELA 2 - DADOS OBTIDOS NAS LÂMINAS DE SANGUE COLHIDOS DO ANIMAL 02.

animal	tempo	Técnica	luto	sexo	contorno	coloração	tamanho	quantidade	local
2	12	1	s	f	r	Zm	m	p	i
2	12	1	n	f	r	Zm	m	m	r
2	12	2	s	f	r	Zi	g	m	r
2	12	2	n	f	r	Zi	g	m	r
2	12	3	s	f				n	
2	12	3	n	f				n	
2	12	4	s	f	r	Zf	p	p	i
2	12	4	n	f	r	zf	p	p	i
2	24	1	s	f	r	zm	m	m	r
2	24	1	n	f	r	zm	m	m	r
2	24	2	s	f	r	zm	g	m	r
2	24	2	n	f	r	zm	g	m	r
2	24	3	s	f				n	
2	24	3	n	f				n	
2	24	4	s	f	r	zf	p	p	i
2	24	4	n	f	r	zf	p	p	i
2	48	1	s	f	r	zm	m	m	r
2	48	1	n	f	i	zf	m	m	r
2	48	2	s	f	r	zm	g	m	r
2	48	2	n	f	i	zm	g	m	r
2	48	3	s	f				n	
2	48	3	n	f				n	
2	48	4	s	f	r	zf	p	p	i
2	48	4	n	f	i	zf	p	p	i

TABELA 3 - DADOS OBTIDOS NAS LÂMINAS DE SANGUE COLHIDOS DO ANIMAL 03.

animal	tempo	Técnica	luto	sexo	contorno	coloração	tamanho	quantidade	local
3	12	1	s	f	r	zm	m	p	i
3	12	1	n	f	r	zm	m	m	r
3	12	2	s	f	r	zi	g	m	r
3	12	2	n	f	r	zi	g	m	r
3	12	3	s	f				n	
3	12	3	n	f				n	
3	12	4	s	f	r	zf	p	p	i
3	12	4	n	f	r	zf	p	p	i
3	24	1	s	f	r	zm	m	m	r
3	24	1	n	f	r	zm	m	m	r
3	24	2	s	f	r	zm	g	m	r
3	24	2	n	f	r	zm	g	m	r
3	24	3	s	f				n	
3	24	3	n	f				n	
3	24	4	s	f	r	zf	p	p	i
3	24	4	n	f	r	zf	p	p	i
3	48	1	s	f	r	zm	m	m	r
3	48	1	n	f	i	zf	m	m	r
3	48	2	s	f	r	zm	g	m	r
3	48	2	n	f	i	zm	g	m	r
3	48	3	s	f				n	
3	48	3	n	f				n	
3	48	4	s	f	r	zf	p	p	i
3	48	4	n	f	i	zf	p	p	i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

TABELA 4 - DADOS OBTIDOS NAS LÂMINAS DE SANGUE COLHIDOS DO ANIMAL 04.

animal	tempo	Técnica	luto	sexo	contorno	coloração	tamanho	quantidade	local
4	12	1	s	m	r	zf	m	p	i
4	12	1	n	m	r	zm	m	m	r
4	12	2	s	m	r	zi	g	m	r
4	12	2	n	m	r	zi	g	m	r
4	12	3	s	m				n	
4	12	3	n	m				n	
4	12	4	s	m	r	zm	p	p	i
4	12	4	n	m	r	zm	p	p	i
4	24	1	s	m	r	zf	m	m	r
4	24	1	n	m	r	zm	m	m	r
4	24	2	s	m	r	zm	g	m	r
4	24	2	n	m	r	zm	g	m	r
4	24	3	s	m					
4	24	3	n	m					
4	24	4	s	m	r	zm	p	p	i
4	24	4	n	m	r	zm	p	p	i
4	48	1	s	m	r	zf	m	m	r
4	48	1	n	m	i	zf	m	m	r
4	48	2	s	m	r	zm	g	m	r
4	48	2	n	m	i	zm	g	m	r
4	48	3	s	m				n	
4	48	3	n	m				n	
4	48	4	s	m	r	zm	p	p	i
4	48	4	n	m	i	zf	p	p	i

TABELA 5 - DADOS OBTIDOS NAS LÂMINAS DE SANGUE COLHIDOS DO ANIMAL 05.

animal	tempo	Técnica	luto	sexo	contorno	coloração	tamanho	quantidade	local
5	12	1	s	m	r	zm	m	p	i
5	12	1	n	m	r	zf	m	m	r
5	12	2	s	m	r	zi	g	m	r
5	12	2	n	m	r	zi	g	m	r
5	12	3	s	m				n	
5	12	3	n	m				n	
5	12	4	s	m				n	
5	12	4	n	m	r	zm	p	p	i
5	24	1	s	m	r	zm	m	m	r
5	24	1	n	m	r	zf	m	m	r
5	24	2	s	m	r	zm	g	m	r
5	24	2	n	m	r	zm	g	m	r
5	24	3	s	m				n	
5	24	3	n	m				n	
5	24	4	s	m	r	zm	p	p	i
5	24	4	n	m	r	zm	p	p	i
5	48	1	s	m	r	zf	m	m	r
5	48	1	n	m	i	zf	m	m	r
5	48	2	s	m	r	zm	g	m	r
5	48	2	n	m	i	zm	g	m	r
5	48	3	s	m				n	
5	48	3	n	m				n	
5	48	4	s	m	r	zm	p	p	i
5	48	4	n	m	i	zf	p	p	i

TABELA 6 - DADOS OBTIDOS NAS LÂMINAS DE SANGUE COLHIDOS DO ANIMAL 06.

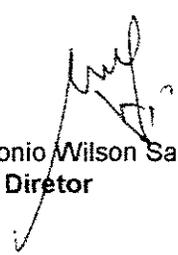
animal	tempo	Técnica	luto	sexo	contorno	coloração	tamanho	quantidade	local
6	12	1	s	m	r	zm	m	m	r
6	12	1	n	m	r	zf	m	m	r
6	12	2	s	m	r	zi	g	m	r
6	12	2	n	m	r	zi	g	m	r
6	12	3	s	m				n	
6	12	3	n	m				n	
6	12	4	s	m	r	zm	p	p	i
6	12	4	n	m	r	zf	m	p	i
6	24	1	s	m	r	zm	m	m	r
6	24	1	n	m	r	zf	m	m	r
6	24	2	s	m	r	zi	g	m	r
6	24	2	n	m	r	zi	g	m	r
6	24	3	s	m				n	
6	24	3	n	m				n	
6	24	4	s	m	r	zm	p	p	i
6	24	4	n	m	r	zm	m	p	i
6	48	1	s	m	r	zf	m	m	r
6	48	1	n	m	i	zf	m	m	r
6	48	2	s	m	r	zm	g	m	r
6	48	2	n	m	i	zm	g	m	r
6	48	3	s	m				n	
6	48	3	n	m				n	
6	48	4	s	m	r	zm	p	p	i
6	48	4	n	m	i	zf	m	p	i



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o Projeto : Diagnose específica do sangue de "*Hydrochaeris Hydrochaeris*" e sua importância pericial, do Pesquisador José Carlos de Freitas Garcia Caldas, tendo como orientador o Prof. Nelson Massini, teve seu início em 01/05/1995 e seu término em 30/09/1997, antes da instalação do Comitê de Ética em Pesquisa, 19/09/97, Portaria do Diretor 09/97, razão pela qual não foi submetido ao referido comitê.

Piracicaba-SP, 14 de outubro de 1999.


Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum
Diretor