



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Hélio Lopes Barbosa Barros

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS BENZAZÓLICOS  
FLUORESCENTES POR ESIPT E SUA APLICAÇÃO NA CIÊNCIA FORENSE COMO  
REVELADORES DE IMPRESSÕES DIGITAIS LATENTES EM DIFERENTES TIPOS DE  
FITAS ADESIVAS**

**Dissertação de Mestrado**

Porto Alegre, 09 de Fevereiro de 2015

Hélio Lopes Barbosa Barros

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS BENZAZÓLICOS  
FLUORESCENTES POR ESIPT E SUA APLICAÇÃO NA CIÊNCIA FORENSE COMO  
REVELADORES DE IMPRESSÕES DIGITAIS LATENTES EM DIFERENTES TIPOS DE  
FITAS ADESIVAS

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal  
de Rio Grande do Sul para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Valter Stefani

Porto Alegre, 09 de Fevereiro de 2015


Hélio Lopes Barbosa Barros


SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS DERIVADOS BENZAZÓLICOS  
FLUORESCENTES POR ESIPT E SUA APLICAÇÃO NA CIÊNCIA FORENSE COMO  
REVELADORES DE IMPRESSÕES DIGITAIS LATENTES EM DIFERENTES TIPOS DE  
FITAS ADESIVAS


Este trabalho foi desenvolvido entre Março de 2013 e Janeiro de 2015 no Laboratório de Novos Materiais Orgânicos (LNMO), Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IQ- UFRGS) sob orientação do professor Dr. Valter Stefani. Todo trabalho foi desenvolvido inteiramente pelo autor, salvo colaborações especificadas nos agradecimentos. Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Química”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Química.

**Banca examinadora:**

  
Prof. Dra. Dione Silva Corrêa

  
Prof. Dr. Adriano Lisboa Monteiro

  
Prof. Dr. Gustavo Pozza Silveira

  
Prof. Dr. Valter Stefani  
(Orientador)

Porto Alegre, 09 de Fevereiro de 2015

*Dedico esta Dissertação aos meus pais e irmãos, que mesmo distantes, nunca deixaram de me apoiar devido à confiança em mim depositada.*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Agílio Juvêncio Barbosa Barros e Maria Menduca Barros Lopes Barros pela educação exemplar, sempre propiciando as melhores condições para meu bem-estar e a melhor formação acadêmica possível.

Aos meus irmãos, Gilson Barros, Cleuzilena Barros e Cláudia Barros, que mesmo distantes, me apoiaram com carinho, amor e compreensão.

Aos meus tios Mateus Antunes e Isabel Antunes pelo carinho, dedicação, amizade e apoio ao longo de todo meu percurso acadêmico.

Ao meu mestre e orientador, professor Valter Stefani, um agradecimento especial, pela oportunidade de tê-lo como orientador e por ter compartilhado toda sua sabedoria e experiência de vida que, com certeza, levarei para sempre comigo.

Aos professores, Dra. Dione Silva Corrêa, Dr. Adriano Lisboa Monteiro e Dr. Gustavo Pozza Silveira, por terem aceitado participar da banca e prontificaram em ler este trabalho, discuti-lo e contribuir para sua concretização.

Aos colegas e amigos do laboratório de Novos Materiais Orgânicos e Química Forense (LNMO-QF), Diandra, Aline, Thayse, Camila e Daiane, pela amizade e excelente convívio durante esses dois anos.

Ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ), seus funcionários e professores que sempre foram muito prestativos na resolução e apoio relativo a assuntos acadêmicos.

Aos professores, Dra. Paula Branca, Dr. Abel Vieira e Dr. António Gil por toda sabedoria transmitida durante a minha graduação, e que, com certeza, foram fundamentais na minha formação acadêmica e na realização desse trabalho.

Aos Técnicos, António, Fabiana e Joyce pela disponibilidade nas análises dos espectros de massa, infravermelho e de ressonância magnética nuclear.

Aos meus amigos e conterrâneos, António Cardoso, Nilton Cardoso, Maria Filomena Semedo, Demétrio Rendall, Quirino Sanca, Ângelo Ferreira, Cristian Foguesatto, Gabriel Moresco, Guilherme Rosa e Vaughn Bonner, pela amizade, apoio e convívio nos momentos

de descontração.

Ao Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de mestrado no âmbito do Programa de Estudante Convênio de Pós-graduação - PEC-PG.

Aos órgãos de fomento, CNPq e CAPES pelo auxílio financeiro. Ao Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (IQ-UFRGS) pelo suporte de infraestrutura para realização deste trabalho.

Ao povo do Brasil pela hospitalidade durante estes anos que estive longe de casa e pela recepção calorosa que tive de todos.

*"Se tiver medo de enfrentar o desconhecido nunca verá nada de novo, e será mais um a ver apenas aquilo que todos já viram"*

*Valdeci Alves Nogueira*

*"Every human being carries with him from his cradle to his grave, certain physical marks which do not change their character, and by which he can always be identified - and that without shade of doubt or question. These marks are his signature, his physiological autograph, so to speak, and this autograph cannot be counterfeited, nor can he disguise it or hide it away, nor can it become illegible by the wear and mutations of time".*

*Mark Twain, (Pudd'nhead Wilson, 1984)*

## Resumo

Neste trabalho são apresentadas a síntese, caracterização e estudo fotofísico de cinco novos derivados benzazólicos fluorescentes por um mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT). Estes derivados possuem grupamentos sulfônicos que aumentam a sua solubilidade em meio aquoso e reatividade com biomoléculas. Além disso, apresentam uma intensa emissão de fluorescência, grande deslocamento de *Stokes*, estabilidade térmica e fotoquímica, devido ao mecanismo de ESIPT. A síntese destes derivados (HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13) foi efetuada utilizando o método de Hein, que consiste na condensação de ácido salicílico substituído com derivados de anilinas *orto*-substituídas em ácido polifosfórico. Esses derivados foram obtidos com alto grau de pureza e rendimentos baixo a moderados (16 - 71%). A caracterização dos mesmos foi feita por diversas técnicas espectroscópicas e espectrométricas (IV, RMN, absorção UV-visível, emissão de fluorescência e MS). Os novos derivados sintetizados foram utilizados com sucesso no desenvolvimento de uma nova metodologia forense com aplicação na revelação de impressões digitais latentes em diferentes tipos de fitas adesivas, inclusive as fitas adesivas de cor escura.



## Abstract

The synthesis, characterization and photophysical analysis of five new benzazole derivatives fluorescent by an intramolecular proton transfer mechanism in the excited state (ESIPT) are present in this work. These derivatives contain a sulfonic group which increase their solubility in aqueous medium and react with biomolecules. Furthermore, they present an intense fluorescence emission, with a large Stokes shift, high photochemical and thermal stability, due to ESIPT mechanism. The synthesis of these derivatives (HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 and HB-13) was carried out using the Hein's method, that consist in the condensation of salicylic acid derivatives with *ortho*-substituted anilines in polyphosphoric acid. These derivatives were obtained with high purity and low to moderate yields (16 - 71%). The characterization was made using the usual spectroscopic / spectrometric techniques (IR, NMR, UV-visible absorption, fluorescence emission, and MS). The new synthesized derivatives have been successfully used in the development of a new forensic methodology with application in the visualization of latent fingerprints deposited in the sticky side of different types of adhesives tapes, including dark tape.

Parte deste trabalho foi apresentada no âmbito de uma missão científica de curta duração realizada na Faculdade de Ciência e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa - Portugal, em 23 de outubro a 04 de novembro de 2014, na forma de seminário intitulado “**A técnica de fluorescência como ferramenta valiosa na elucidação de crimes**”, de autoria de Hélio Barros e Valter Stefani, sem a divulgação de dados conflitantes com o pedido de patente.

O conteúdo do presente trabalho se encontra protegido pela patente intitulada “**Método de obtenção de derivados benzazólicos fluorescentes e sua aplicação em ciência forense como reveladores de impressões digitais latentes**”, Brasil, registro número BR 10 2014 030942-0, depositado em 10 de dezembro de 2014, inventores: Hélio Barros e Valter Stefani.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Processos radiativos e não radiativos associados às moléculas excitadas. ....	31
Figura 2. <i>Diagrama de Jablonski</i> , também conhecido por <i>diagrama de Perrin-Jablonski</i> . ....	33
Figura 3. Frequências e comprimentos de onda do espectro eletromagnético. ....	36
Figura 4. Compostos heterocíclicos do tipo 2- (2'-hidroxifenil)benzazóis. ....	36
Figura 5. Mecanismo de transferência protônica intermolecular para compostos benzazólicos. .....	45
Figura 6. Modelo de uma molécula diatômica simples com os vários níveis de energia. ....	46
Figura 7. Comprimento de onda do máximo de absorção e de emissão. ....	48
Figura 8. Geometrias da forma enol e seus comportamentos em solventes próticos e polares. .....	52
Figura 9. Padrões básicos de impressões digitais e suas frequências de ocorrência na população. ....	54
Figura 10. Exemplos de minúcias identificadas em impressões digitais. ....	55
Figura 11. Comparação entre uma impressão digital impressa (esquerda) e latente (direita). Identificação pela correspondência de catorze pontos característicos (minúcias). ....	55
Figura 12. Estrutura dos principais aminoácidos encontrados nas impressões digitais. ....	57
Figura 13. Exame de impressões digitais latentes. ....	59
Figura 14. Sequência de métodos recomendada no processo de revelação de impressões digitais em superfícies porosas secas e molhadas (ex: papel, cartão, etc.). ....	65
Figura 15. Sequência de métodos recomendada no processo de revelação de impressões digitais latentes em superfícies não porosas, secas e molhadas (ex: plásticos, vidros, etc.). As superfícies molhadas podem ser secadas a temperatura ambiente. ....	69
Figura 16. Sequência de método recomendada no processo de revelação de impressões digitais latentes em superfícies adesivas (ex: fitas adesivas). ....	71
Figura 17. Espectro de infravermelho do composto HB-6. ....	74
Figura 18. Expansão da região aromática do espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-7. ....	76
Figura 19. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-9. ....	77

Figura 20. Expansão da região alifática do espectro de $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-13.....	78
Figura 21. Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN APT do composto HB-7.....	79
Figura 22. Espectro $^{13}\text{C}$ -RMN APT do composto HB-9.....	80
Figura 23. Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN APT do composto HB-13.....	80
Figura 24. Espectro de massa do composto HB-7. ....	81
Figura 25. Espectros normalizados de absorção e de fluorescência dos compostos HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13 em solventes de diferentes polaridades.....	84
Figura 26. Espectros normalizados de absorção e de fluorescência dos compostos HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13 no mesmo solvente.....	87
Figura 27. Imagens dos corantes HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13 no estado sólido. A - sob luz visível; B - sob luz ultravioleta - 365 nm.....	88
Figura 28. Imagens dos corantes HB-6, HB.7, HB.9, HB-11 e HB-13 em solução aquosa. A - sob luz visível; B - sob luz ultravioleta - 365 nm.....	89
Figura 29. Imagens de diferentes tipos de fitas adesivas processadas com o corante fluorescente HB-7, sob luz visível e sob luz ultravioleta - 365 nm. A - fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “ <i>Scotch tape</i> ®”); B - fita adesiva castanha (Fita para Embalagem Polisil – “ <i>Scotch tape</i> ®”); C - fita adesiva preta (Fita isolante elétrica – “ <i>Tectape</i> ®”); D - fita adesiva prateada (Fita Multi-Usos “ <i>Duct tape</i> ®”). .....	92
Figura 30. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-7 em: A - Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “ <i>Scotch tape</i> ®”); B - Fita adesiva castanha (Fita para Embalagem Polisil – “ <i>Scotch tape</i> ®”); C - Fita adesiva preta (Fita isolante elétrica – “ <i>Tectape</i> ®”); D - Fita adesiva prateada (Fita Multi-Usos “ <i>Duct tape</i> ®”)... ..	93
Figura 31. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-9 em: A - Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “ <i>Scotch tape</i> ®”); B - Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “ <i>Scotch tape</i> ®”); C - Fita adesiva preta (Fita isolante elétrica – “ <i>Tectape</i> ®”); D - Fita adesiva prateada (Fita Multi-Usos “ <i>Duct tape</i> ®”).....	94
Figura 32. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-11 em: A - Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “ <i>Scotch tape</i> ®”); B - Fita	

adesiva castanha (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); C - Fita adesiva preta (Fita isolante elétrica – “*Tectape*®”); D - Fita adesiva prateada (Fita Multi-Usa “*Duct tape*®”)... 95

Figura 33. Estrutura do composto HB-6 na forma de sal de sódio e a estrutura de ressonância do composto HB-13. .... 100

Figura 34. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-11 em: Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”)- A<sub>1</sub> (usando filtro - cor laranja) e A<sub>2</sub> (ausência de filtro); Fita adesiva castanha (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”) - B<sub>1</sub> (usando filtro - cor laranja) e B<sub>2</sub> (ausência de filtro); Fita adesiva prateada (Fita Multi-Usa “*Duct tape*®”) - C<sub>1</sub> (usando filtro - cor laranja) e C<sub>2</sub> (ausência de filtro)..... 101

Figura 35. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-7 em fita adesiva castanha com idades das impressões digitais latentes de 0, 2, 8 e 15 dias... 102

Figura 36. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-7 em fita adesiva preta com idades das impressões digitais latentes de 0, 2, 8 e 15 dias. .... 103

Figura 37. Imagens de impressões digitais latentes depositadas em sequência (1-5) e reveladas com o corante fluorescente HB-7 em: A- Fita adesiva castanha (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); B - Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”) e C - Fita adesiva preta (Fita isolante elétrica – “*Tectape*®”). .... 104

Figura 38. Imagens de diferentes tipos de fitas adesivas processadas com o corante fluorescente HB-7 e guardadas durante 1 ano. A - Fita transparente (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); B- Fita castanha (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); C- Fita preta (Fita isolante elétrica – “*Tectape*®”). .... 105

Figura 39. Processo sintético para obtenção dos derivados benzazólicos fluorescentes, HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13..... 107

Figura 40. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-7 em lata de refrigerante (esquerda) e em objeto de plástico (direita), sob luz ultravioleta - 365 nm..... 112

Figura 41. Imagens de oocistos de *Oxyuris equi* tratado com corante fluorescente HB-7, obtidos por microscopia de fluorescência. A, E - filtro UV; B - filtro vermelho; C, D - filtro azul. .... 112

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Esquema geral de síntese dos compostos benzazólicos.....	38
Esquema 2. Síntese de 2-benzoxazóis substituídos mediada por ácido polifosfórico. ....	38
Esquema 3. Síntese de 2-benzoxazóis substituídos mediada por éster polifosfórico.....	39
Esquema 4. Síntese de 2-( <i>o</i> - hidroxifenil)benzoxazol mediada por pentóxido de fósforo. ....	39
Esquema 5. Síntese de 2-benzoxazol substituído mediada por cloreto de tionila.....	40
Esquema 6. Síntese de 2-benzoxazóis substituídos mediada por Base de Schiff. ....	41
Esquema 7. Síntese de 2-fenilbenzoxazol sob óxido de alumínio ativado.....	41
Esquema 8. Síntese de 2,2'-diaquil, 2,2'-diaril-6,6'-dibenzoxazóis mediada por ésteres de imino.....	42
Esquema 9. Proposta mecanística para formação do composto benzazólico.....	43
Esquema 10. Reação química entre ninidrina e aminas primárias e secundárias, e o produto roxo resultante, conhecido como púrpura de <i>Ruhemann</i> . ....	61
Esquema 11. Tratamento da púrpura de <i>Ruhemann</i> com sais de metais e o complexo de coordenação resultante. ....	63
Esquema 12. Possível reação entre DFO e aminoácidos para a formação de um produto luminescente.....	64
Esquema 13. Reação de polimerização de cianoacrilato na formação do polímero rígido e esbranquiçado conhecido como policianoacrilato.....	67

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Diferentes tipos de luminescência.....	30
Tabela 2. Relação entre rigidez molecular e rendimento quântico .....	50
Tabela 3. Abundância relativa de aminoácidos nas impressões digitais.....	57
Tabela 4. Percentagens aproximadas de lípideos secretados pelas glândulas sebáceas.....	58
Tabela 5. Síntese de derivados benzazólicos HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13. ....	72
Tabela 6. Dados relevantes de frequências observadas para os derivados benzazólicos sintetizados. ....	73
Tabela 7. Dados relevantes do espectro de absorção UV-Visível e de emissão de fluorescência dos derivados benzazólicos HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13. ....	85

## LISTA DE ANEXOS

<b>Anexo 1. Mecanismo proposto para polimerização de cianoacrilato de etila.....</b>	<b>121</b>
<b>Anexo 2. Espectros de <sup>1</sup>H-RMN .....</b>	<b>122</b>
Figura 42. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-6.....	122
Figura 43. Expansão da região aromática do espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-6. ....	122
Figura 44. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-7.....	123
Figura 45. Expansão da região aromática do espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-7. ....	123
Figura 46. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-9.....	124
Figura 47. Expansão da região aromática do espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-9. ....	124
Figura 48. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-11.....	125
Figura 49. Expansão da região aromática do espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-11. ....	125
Figura 50. Espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-13.....	126
Figura 51. Expansão da região alifática do espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-13.....	126
Figura 52. Expansão da região aromática do espectro de <sup>1</sup> H-RMN do composto HB-13. ....	127
<b>Anexo 3. Espectros de <sup>13</sup>C-RMN.....</b>	<b>127</b>
Figura 53. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN APT do composto HB-6.....	127
Figura 54. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN APT do composto HB-7.....	128
Figura 55. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN APT do composto HB-9.....	128
Figura 56. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN APT do composto HB-11.....	129
Figura 57. Espectro de <sup>13</sup> C-RMN APT do composto HB-13.....	129
<b>Anexo 4. Espectros de infravermelho.....</b>	<b>130</b>
Figura 58. Espectro de infravermelho do composto HB-6.....	130
Figura 59. Espectro de infravermelho do composto HB-7.....	130
Figura 60. Espectro de infravermelho do composto HB-9.....	131
Figura 61. Espectro de infravermelho do composto HB-11.....	131



Figura 62. Espectro de infravermelho do composto HB-13.....	132
<b>Anexo 5. Espectros de massa.....</b>	<b>132</b>
Figura 63. Espectro de massa do composto HB-6. ....	132
Figura 64. Espectro de massa do composto HB-7. ....	133
Figura 65. Espectro de massa do composto HB-9. ....	133
Figura 66. Espectro de massa do composto HB-11. ....	134
Figura 77. Espectro de massa do composto HB-13. ....	134

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**LNMO** - Laboratório de Novos Materiais Orgânicos

**UFRGS** - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**ESIPT** - Transferência de próton intramolecular no estado excitado (*Excited State Intramolecular Proton Transfer*)

**CSI** - cruzamento entre sistemas

**CI** - conversão interna

**RV** - relaxação vibracional

**m.s** - mesmo spin

**d.s** - spin diferente

**S<sub>0</sub>** - estado fundamental

**S<sub>1</sub>** - primeiro estado excitado

**S<sub>2</sub>** - segundo estado excitado

**PPA** - ácido polifosfórico (*polyphosphoric acid*)

**Laser** - amplificação de luz por emissão estimulada de radiação (*Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*)

**DNA** - ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

**E** - forma *cis*-enol

**E\*** - forma *cis*-enol excitada

**E'** - forma *trans*-enol

**K** - forma *cis*-ceto

**K\*** - forma *cis*-ceto excitada

**K'** - forma *trans*-ceto

**I<sub>E\*</sub>** - intensidade de fluorescência da forma *cis*-enol excitada

**I<sub>K\*</sub>** - intensidade de fluorescência da forma *cis*-ceto excitada

**X** - heteroátomos (oxigênio, nitrogênio e enxofre)

**c** - velocidade da luz

**h** - constante de Planck

**UV- visível** - ultravioleta visível

**nm** - nanômetro

**I** - intensidade de fluorescência

**n<sub>em</sub>** - fótons emitidos

**n<sub>abs</sub>** - fótons absorvidos

**A** - intensidade de absorção da amostra

**A<sub>ref</sub>** - intensidade de absorção de referência

**F** - área sobre a curva de emissão de fluorescência em um determinado comprimento de onda de excitação da amostra

**F<sub>ref</sub>** - área sobre a curva de emissão de fluorescência em um determinado comprimento de onda de excitação de referência

**RI** - corresponde ao índice de refração do solvente no qual a amostra foi preparada

**RI<sub>ref</sub>** - corresponde ao índice de refração do solvente no qual a amostra de referência foi preparada

**K** - constante de proporcionalidade

**AFIS** - Automated Fingerprint Identification System

**n** - orbital molecular não- ligante

**HBT** - 2- (2'-hidroxifenil)benzotiazol

**IDs** - impressões digitais

**A.C**- antes de cristo

**m/v** - massa por volume

**Zn** - zinco

**Cd** - cádmio

**RP-Zn** - complexo de zinco com púrpura de *Ruhemann*

**RP-Cd** - complexo de cádmio com púrpura de *Ruhemann*

**DFO** - 1.8-diazafluorenona

**CA** - cianoacrilato

**PVC** - Policloreto de vinila (*polyvinyl chloride*)

**<sup>1</sup>H-RMN** - ressonância magnética nuclear de próton

**<sup>13</sup>C-RMN** - ressonância magnética nuclear de carbono

**APT** - teste de próton ligado (*attached proton test*)

**DMSO-d<sub>6</sub>** - dimetilsulfóxido hexa-deuterado

**Hz** - hertz

**TMS** - tetrametilsilano

**J** - constante de acoplamento ou Joule

**ppm** - parte por milhão

**s** - singleto

**d** - duplete

**dd** - duplo duplete

**t** - tripleto

**m** - multiplete

**sl** - sinal largo

**μl** - microlitro

**eV** - elétron volt

**KBr** - brometo de potássio

**HB-6** - ácido 4- hidroxí- 3-(benzo [*d*] oxazol-2-il)benzenossulfônico

**HB-7** - ácido 4-hidroxí- 3-(benzo [*d*] tiazol-2-il)benzenossulfônico

**HB-9** - ácido 4-hidroxí-3- (6-metilbenzo [*d*] oxazol-2-il)benzenossulfônico

**HB-11** - ácido 2-(5-amino-2-hidroxifenil) benzo [*d*] oxazol-5-sulfônico

**HB-13** - ácido 2-(4 (dietilamino) -2-hidroxifenil) benzo [*d*] oxazol-5-sulfônico

**MHz** - megahertz

**m.p** - ponto de fusão (*melting point*)

**mL** - mililitro

**UV** - ultravioleta

**M<sup>+</sup>** - íon molecular

**ESI** - ionização por eletrospray (*Electrospray Ionization*)

**m/z** - razão massa/carga

**MS** - espectrometria de massa (*mass spectrometry*)

**CCD** - cromatografia de camada delgada

**h** - hora

**IV** - infravermelho

**IUPAC** - União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

**cm** - centímetro

**L** - litro

**g** - grama

**mg** - miligrama

**t** - tempo

**$\alpha$**  - alfa

**$\beta$**  - beta

**$\gamma$**  - gama

**$\tau$**  - tempo no estado excitado

**$\Delta E$**  - variação de energia

**$\nu$**  - frequência

**$\Phi_F$**  - rendimento quântico de fluorescência da amostra

**$\Phi_{ref}$**  - rendimento quântico de fluorescência de referência

**$\pi$**  - orbital molecular pi ligante

$\pi^*$  - orbital molecular pi anti-ligante

$^{\circ}\text{C}$  - grau Celcius

$\epsilon$  - coeficiente de absorvidade molar

$\lambda_{\text{max}}$  - comprimento de onda do máxima de absorção

$\epsilon_{\text{max}}$  - coeficiente de absorvidade molar do máximo de absorção

$\Delta\lambda_{\text{ST}}$  - deslocamento de *Stokes*

## SUMÁRIO

<b>1 . INTRODUÇÃO .....</b>	<b>27</b>
Motivação .....	27
Objetivo Geral .....	28
Objetivos Específicos .....	28
<b>2 . FUNDAMENTOS TEÓRICOS .....</b>	<b>30</b>
2.1. Luminescência .....	30
2.1.1. Fotoluminescência: Fluorescência e Fosforescência.....	30
2.2. Processos de Desativação Radiativos, Não Radiativos e de Supressão de Fluorescência entre Estados Eletrônicos .....	31
2.2.1. Processos de Desativação Radiativos.....	31
2.2.2. Processos de Desativação Não Radiativos .....	32
2.2.3. Processos de Supressão de Fluorescência .....	32
2.3. Diagrama de Energia de Jablonski .....	33
2.4. Fluoróforo .....	35
2.5. Compostos Fluorescentes Benzazólicos .....	36
2.6. Síntese de Compostos Benzazólicos.....	37
2.6.1. Ciclização Térmica .....	38
2.6.1.2. Por Ácido Polifosfórico (PPA) .....	38
2.6.1.3. Por Éster Polifosfórico (PPE) .....	38
2.6.1.4. Por Pentóxido de Fósforo .....	39
2.6.1.5. Por Cloreto de Tionila.....	39
2.6.2. Ciclização Oxidativa por Bases de Schiff.....	40
2.6.3. Por Óxido de Alumínio Ativado .....	41
2.6.4. Por Ésteres de Imino .....	42
2.7. Mecanismo de Atuação de Ácido Polifosfórico na Síntese de Compostos Benzazólicos .....	42

2.8. Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado .....	44
2.9. Propriedades dos Espectros de Absorção Óptica .....	46
2.10. Propriedades dos Espectros de Fluorescência .....	47
2.10.1. Deslocamento de <i>Stokes</i> .....	48
2.10.2. Rendimento Quântico de Fluorescência .....	49
2.10.3. Fatores que afetam a Emissão de Fluorescência.....	51
2.10.3.1. Efeito da Natureza do Solvente .....	51
2.10.3.2. Efeito da Temperatura e do pH.....	52
<b>3. APLICAÇÃO.....</b>	<b>53</b>
3.1. Introdução.....	53
3.2. História das Impressões Digitais .....	53
3.3. Princípios Fundamentais da Papiloscopia .....	55
3.3.1. Primeiro princípio: Perenidade .....	55
3.3.2. Segundo princípio: Imutabilidade.....	56
3.3.3. Terceiro princípio: Variabilidade.....	56
3.4. Composição dos Resíduos de Impressões Digitais.....	56
3.5. Revelação de Impressões Digitais Latentes.....	58
3.6. Métodos de Revelação de Impressões Digitais.....	59
3.6.1. Métodos de Revelação de Impressões Digitais em Superfícies Porosas .....	60
3.6.1.1. NINIDRINA .....	60
3.6.1.1.1 Tratamento Secundário com Sais de Metais .....	62
3.6.1.2. DIAZAFLUORENONA (DFO) .....	63
Sequência de Métodos Recomendada no Processo de Revelação de Impressões Digitais Latentes em Superfícies Porosas.....	64
3.6.2. Métodos para Revelação de Impressões Digitais em Superfícies Não Porosas.....	65
3.6.2.1. TÉCNICA DO PÓ .....	65
3.6.2.2. MÉTODO DE CIANOACRILATO (VAPORIZAÇÃO).....	66



3.6.2.2.1. Aprimoramento do Contraste das Impressões Digitais Latentes Processadas com Cianoacrilato .....	68
Sequência de Métodos Recomendada no Processo de Revelação de Impressões Digitais em Superfícies Não Porosas.....	69
3.6.3. Métodos de Revelação de Impressões Digitais Latentes em Superfícies Adesivas	69
3.6.3.1. VIOLETA GENCIANA .....	70
Sequência de Métodos Recomendada no Processo de Revelação de Impressões Digitais em Superfícies Adesivas .....	71
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>72</b>
4.1. Caracterização Espectroscópica dos Derivados Benzazólicos Fluorescentes Sintetizados.....	73
4.1.1. Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho .....	73
4.1.2. Caracterização por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear .....	75
4.1.3. Caracterização por Espectrometria de Massa .....	81
4.1.4. Caracterização por Absorção UV-Visível e Emissão de Fluorescência .....	82
4.2. Amostras de Impressões Digitais Latentes .....	89
4.3. Performance dos Diferentes Tipos de Fitas Adesivas .....	90
4.4. Formulação das Soluções de Corantes de Impressões Digitais Latentes .....	90
4.5. Metodologia Sequencial e o Processamento da Técnica de Revelação de Impressões Digitais Latentes .....	90
4.6. Imagens de Impressões Digitais Latentes Reveladas em Fitas Adesivas.....	91
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>106</b>
Materiais e Instrumentação.....	106
5.1. Procedimentos Gerais de Síntese dos Derivados Benzazólicos Fluorescentes (HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13).....	106
➤ Síntese de derivado 2- (2'-hidroxifenil) benzoxazol substituído (HB-6).....	107
➤ Síntese de derivado 2- (2'-hidroxifenil) benzotiazol substituído (HB-7).....	108
➤ Síntese de derivado 2- (2'-hidroxifenil) benzoxazol substituído (HB-9).....	108

➤ Síntese de derivado 2- (2'-hidroxifenil) benzoxazol substituído (HB-11).....	109
➤ Síntese de derivado 2- (2'-hidroxifenil) benzoxazol substituído (HB-13).....	109
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>111</b>
<b>PERSPETIVAS FUTURAS .....</b>	<b>112</b>
<b>7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>113</b>

# 1 . INTRODUÇÃO

## Motivação

A Ciência Forense, área científica que trata da aplicação de técnicas e metodologias especiais, a fim de atender aspectos de interesse jurídico, continua em expansão, tornando-se cada vez mais necessária diante da criminalidade que ao longo dos anos tem evidenciado uma face sofisticada e procedimentos complexos de atuação dos criminosos. Desta forma, o desenvolvimento de ferramentas forenses que possam ser aplicadas na elucidação de crimes de diversas naturezas é de extrema importância. Um dos motivos que nos levou a desenvolver novos reveladores de impressões digitais em fitas adesivas deve-se ao fato de que a maioria dos reveladores atualmente comercializados fazem o uso de solventes orgânicos, o que inviabiliza a aplicação em fitas adesivas, uma vez que, os solventes orgânicos dissolvem a parte adesiva da fita ou podendo atacar por completo a fita adesiva. O único solvente comercializado para revelação de impressões digitais em fitas adesivas é a violeta genciana, no entanto ela possui algumas limitações, tais como a baixa seletividade para impressões digitais, que faz com que ela reaja com toda a superfície da fita adesiva dificultando a visualização das Impressões digitais. Além disso, ela não é comumente aplicada em superfícies escuras devido a sua cor escura que dificulta o contraste com essas superfícies. Para resolver este problema desenvolvemos novos reveladores de impressões digitais fluorescentes, solúveis em água e altamente sensíveis a impressões digitais, e que podem ser aplicados em diferentes tipos de fitas adesivas, inclusive as fitas adesivas de cor escura, que até então não havia nenhum revelador comercial que pudesse ser aplicado nessas superfícies.

As fitas adesivas têm constituído evidências importantes na elucidação de crimes de diversas naturezas. Elas são frequentemente usadas pelos criminosos para imobilizar vítimas (por exemplo, em sequestro, estupros, roubos, etc.) e na fabricação de dispositivos eletrônicos explosivos. As superfícies adesivas, tais como fitas adesivas, possuem características relevantes para revelação de impressões digitais latentes. Uma delas é a natureza receptiva que permite que os resíduos de IDs sejam retidos quando estas superfícies são tocadas pelas cristas papilares. Além disso, é difícil manipular fitas adesivas quando se usa luvas, levando com que o manuseio das mesmas, por exemplo durante um crime, seja geralmente efetuado com as mãos desprotegidas, fazendo com que o criminoso acabe deixando suas impressões digitais. Esta característica das superfícies adesivas faz com que as fitas adesivas se tornem evidências importantes para elucidação de um crime.

Este trabalho surge como uma ponte entre a Síntese Orgânica e a Ciência Forense. O Laboratório de Novos Materiais Orgânicos (LNMO) da UFRGS tem investido, nos últimos anos, em síntese, purificação e caracterização de compostos fluorescentes para estudos e desenvolvimento de novas metodologias de aplicação. O custo de síntese de novos reagentes em relação a sua potencialidade de aplicação na Ciência Forense, a atualidade e a interdisciplinaridade do tema, bem como a parceria com o Instituto Geral de Perícia do estado do Rio Grande do Sul, fizeram com que este trabalho se tornasse altamente atrativo do ponto de vista de aplicação científica e tecnológica.

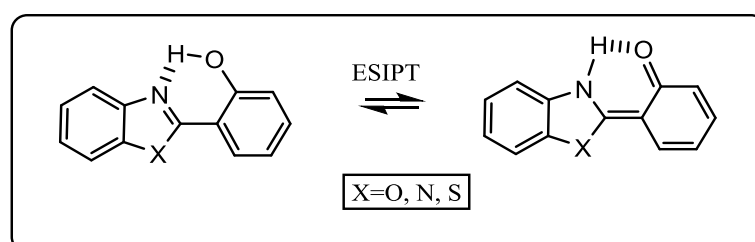
## Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho foi sintetizar compostos benzazólicos fluorescentes por ESIPT, com grupamentos que aumentam a sua solubilidade em água, e que possam interagir com moléculas específicas, sem interferir na sua emissão de fluorescência, sensibilidade, estabilidade térmica e fotoquímica, e estudar sua aplicação na revelação de impressões digitais latentes em diferentes tipos de fitas adesivas.

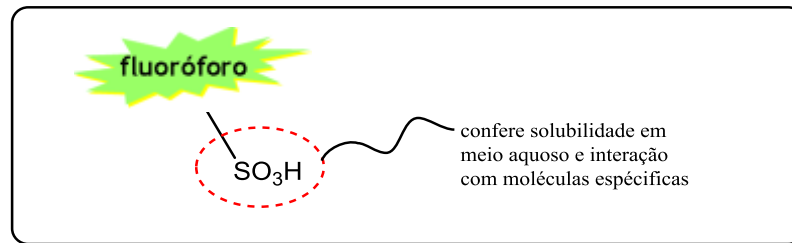
## Objetivos Específicos

As estratégias específicas utilizadas para alcançar o objetivo geral deste trabalho estão subdivididas em:

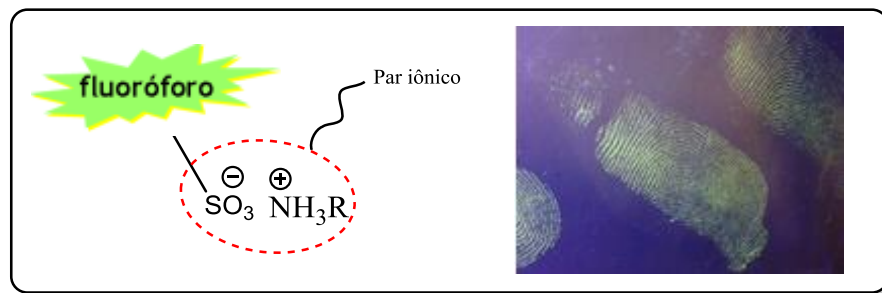
- Sintetizar compostos do tipo 2- (2'-hidroxifenil)benzazóis substituídos que permitam mecanismo de ESIPT.



- b) Sintetizar derivados benzazólicos com grupamentos que permitam aumentar a solubilidade em água.



- c) Realizar estudos fotofísicos dos compostos de interesse.
- d) Aplicar esses compostos sintetizados na revelação de impressões digitais latentes em diferentes tipos de fitas adesivas.



- e) Estudar a influência da concentração e temperatura no processo de revelação de impressões digitais latentes.

## 2 . FUNDAMENTOS TEÓRICOS

### 2.1. Luminescência

A luminescência é um fenômeno de emissão de luz ultravioleta, visível ou infravermelho de uma espécie eletronicamente excitada. Os diferentes tipos de luminescência são classificados de acordo com o modo de excitação, Tabela 1. <sup>[1]</sup>

Tabela 1. Diferentes tipos de luminescência.

Fenômeno	Modo de excitação
Fotoluminescência	Absorção de luz (fóton)
Catodoluminescência	Raios catódicos (feixe de elétron)
Termoluminescência	Calor (irradiação radioativa)
Quimiluminescência	Processos químicos (Ex: oxidação, redução, etc.)
Triboluminescência	Fricção e forças eletrostáticas
Eletroluminescência	Campo elétrico
Bioluminescência	Processos bioquímicos
Radioluminescência	Radiação ionizante (raio-X, $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ )
Sonoluminescência	Onda de som

Os compostos luminescentes podem ser orgânicos (hidrocarbonetos aromáticos, aminoácidos, etc.), inorgânicos (íon uranila, íon lantanídeos, etc.) e organometálicos (complexos de coordenação, etc.)

#### 2.1.1. Fotoluminescência: Fluorescência e Fosforescência

A Fotoluminescência é dividida em duas categorias (fluorescência e fosforescência) dependendo da natureza do estado excitado. <sup>[1]</sup> Se a emissão da luz é originada de um estado excitado singlete, em que prevalece a orientação do spin do elétron excitado, na forma desemparelhada, o fenômeno é designado por fluorescência. Portanto, neste caso, o retorno ao estado fundamental é permitido, ocorrendo de forma rápida via emissão de fóton na ordem de  $10^8 \text{ s}^{-1}$ , com tempo de vida típico de  $10^{-9} \text{ s}$ . O tempo de vida do fluoróforo é definido como a média de tempo ( $\tau$ ) que ele passa no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. <sup>[2]</sup> A fosforescência é, por sua vez, a emissão da luz a partir de um estado excitado tripleto, com mudança na orientação do spin do elétron excitado, emparelhando com o elétron do estado fundamental. Desta forma, sendo proibidas as transições para o estado fundamental, as taxas de emissão são muito mais lentas, aparecendo na ordem de  $10^3\text{-}10^{-2} \text{ s}^{-1}$ .

Consequentemente, o tempo de vida é superior, na ordem de milissegundos ou segundos. Entretanto, a emissão de fosforescência nem sempre é observada em soluções à temperatura ambiente devido a muitos processos de desativação que competem com a emissão, tais como decaimento radiativo, não radiativo e processos de supressão de fluorescência, Figura 1. <sup>[1]</sup>

A fluorescência, para além de competir com a fosforescência, também compete com um conjunto de processos que diminuem a sua intensidade. Dentre esses processos, têm-se os processos intramoleculares, também conhecidos como processos não radiativos (CSI - cruzamento entre sistemas, CI- conversão interna e RV- relaxação vibracional) e processos intermoleculares resultantes da interação da molécula excitada com o meio (transferência de próton, mudança conformacional, etc.),

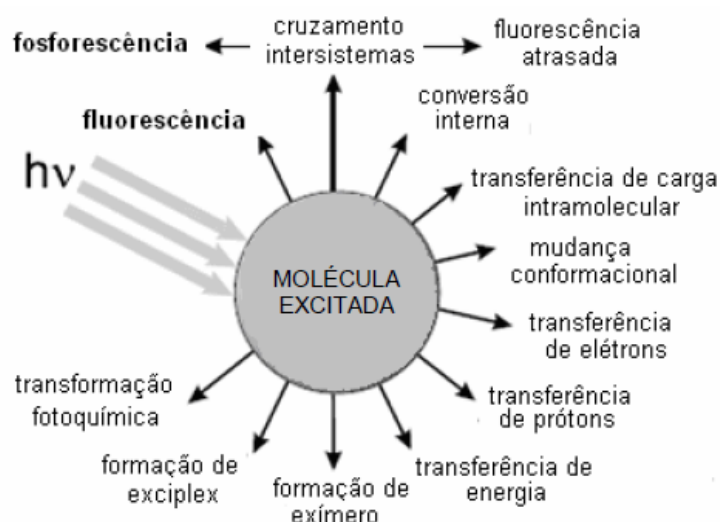


Figura 1. Processos radiativos e não radiativos associados às moléculas excitadas.

## 2.2. Processos de Desativação Radiativos, Não Radiativos e de Supressão de Fluorescência entre Estados Eletrônicos

### 2.2.1. Processos de Desativação Radiativos

O processo de desativação radiativo pode ser dividido em duas categorias: fluorescência e fosforescência. A fluorescência é um processo de emissão que ocorre a partir do estado excitado singlete, ao passo que a fosforescência a emissão ocorre a partir do estado excitado tripleto. <sup>[1]</sup> Mais detalhes serão abordados e visualizados no diagrama de Jablonski, Figura 2.

[3]

### **2.2.2. Processos de Desativação Não Radiativos**

Os três principais processos de desativação não radiativos são: conversão interna (CI), relaxação vibracional (RV) e cruzamento entre sistemas (CSI). Estes processos requerem uma prévia conversão de um estado quântico molecular em outro sem que haja emissão de radiação, Figura 2. <sup>[3]</sup>

### **2.2.3. Processos de Supressão de Fluorescência**

A intensidade de fluorescência é condicionada por diversos processos. A redução da intensidade de fluorescência é designada de supressão, e é descrita pelo método de Stern-Volmer. <sup>[4]</sup> A supressão resulta do encontro difusivo entre o fluoróforo e o supressor durante o tempo de vida do estado excitado do fluoróforo. Geralmente, esse processo é desencadeado por uma variedade de interações intermoleculares, tais como reações de estado excitado, transferência de energia, rearranjos intermoleculares, formação de complexos no estado excitado, supressão estática e supressão colisional ou dinâmica. <sup>[1]</sup>

Outra possibilidade, porém, menos provável, é a supressão aparente, devido à elevada densidade ótica na excitação e emissão da amostra. No caso da supressão colisional, o supressor se difunde no fluoróforo durante o tempo de vida do seu estado excitado, fazendo com que o fluoróforo retorne ao estado fundamental sem emissão de luz. Neste caso, não ocorre qualquer mudança permanente na molécula no estado fundamental, ou seja, ausência de reação fotoquímica. Ao contrário, na supressão estática, um complexo fluorescente resultante da reação entre o supressor e o fluoróforo se forma no estado fundamental. O fato de ocorrer diversas interações intermoleculares no estado excitado faz com que o processo de supressão seja de grande utilidade como fonte de informação sobre os sistemas biológicos. Uma das informações que se pode aferir sobre os estudos de supressão é a localização de fluoróforos em proteínas e membranas, a acessibilidade e a permeabilidade dos fluoróforos aos supressores. Se considerarmos um fluoróforo ligado a uma proteína ou lipídeos de membrana, e se a proteína ou membrana for impermeável ao supressor, e o fluoróforo se localizar no interior de uma macromolécula, nenhuma supressão estática poderá ocorrer.

Uma das moléculas mais conhecida que age como supressor colisional, dentre uma variedade de substâncias que podem desempenhar a função de supressor, é o oxigênio.



Dependendo do tipo da amostra em investigação é frequentemente necessário remover o oxigênio dissolvido de modo a obter resultados confiáveis nas medidas de fluorescência. Outras moléculas, tais como aromáticas, acrilamida, halogênios, aminas alifática, purinas, pirimidinas, entre outras, são consideradas supressores bastante eficientes. [1,4]

### 2.3. Diagrama de Energia de Jablonski

Os processos que ocorrem entre a absorção e a emissão da luz são classicamente ilustrados pelo *diagrama de Jablonski*, também conhecido por *diagrama de Perrin-Jablonski*, Figura 2. [3] Tal diagrama consiste em ilustrar os diversos estados eletrônicos de uma molécula e os possíveis processos de transições entre estes estados. Foi nomeado em homenagem ao professor e físico Polonês Alexandre Jablonski devido a inúmeras contribuições que deu a espectroscopia de fluorescência, tendo sido considerado Pai dessa técnica espectroscópica.

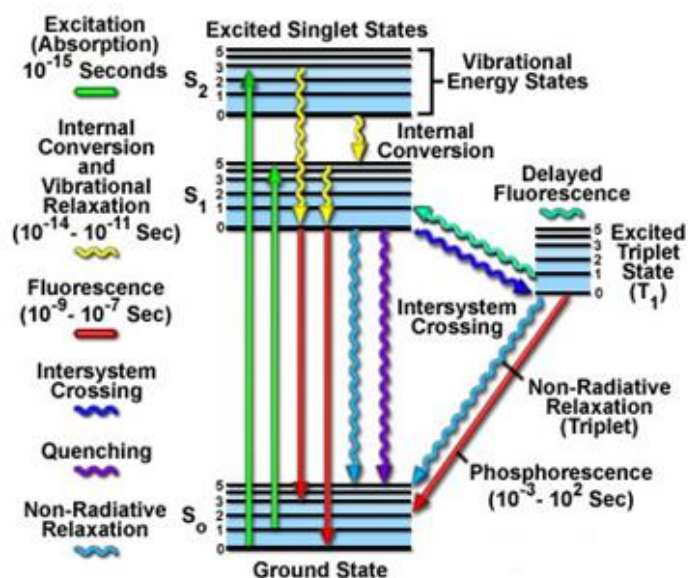


Figura 2. *Diagrama de Jablonski*, também conhecido por *diagrama de Perrin-Jablonski*.

Dentre os processos quânticos que ocorrem entre a absorção e emissão de luz, destaca-se a absorção de fótons (mesmo spin - m.s), conversão interna (m.s), relaxação vibracional (m.s), cruzamento entre sistemas (spin diferente - s.d), fosforescência (s.d), fluorescência (m.s) e transição tripleto-tripletto. Os estados eletrônicos singletos, fundamentais, o primeiro e

o segundo, são designados por  $S_0$ ,  $S_1$  e  $S_2$ , respetivamente. Para cada um desses estados eletrônicos existem diferentes níveis energéticos vibracionais de energias próximas, descritos por 0, 1, 2...n.

Com a luz ultravioleta ou visível, a **absorção de fótons** ocorre com as moléculas de energia vibracional mais baixa. O fluoróforo no estado fundamental ( $S_0=0$ ,  $S_0=1$ ) é então excitado para um nível de energia mais alto dos seus estados singletos ( $S_1=4$ ) e ( $S_2=3$ ). Estas transições ocorrem em um tempo da ordem de  $10^{-15}$ s. Imediatamente a seguir à absorção de um fóton, vários processos ocorrerão com probabilidades diferentes, mas o mais provável será o relaxamento para o menor nível de energia vibracional do primeiro estado eletrônico singlete ( $S_1=0$ ). Este processo é caracterizado como não radiativo e é conhecido como **conversão interna** e **relaxamento vibracional** (perda de energia na ausência de emissão de luz). Geralmente, este tipo de processo ocorre em picosegundos ou menos ( $10^{-14}$  -  $10^{-11}$ s). O excesso de energia vibracional é convertido em calor, que é absorvido por moléculas de solvente vizinhas, mediante a colisão com o fluoróforo no estado eletrônico singlete  $S_1$ .

O **cruzamento entre sistemas** é descrito como uma transição não radiativa entre dois níveis de energias eletrônicas vibracionais isoenergéticos de diferentes multiplicidades ( $S_1=0$  para  $T_1=0$ ). A baixa probabilidade desse processo deve-se, sobretudo, ao fato de que as moléculas devem primeiro passar por uma conversão rotacional de modo a produzir elétrons desemparelhados, o que constitui um processo desfavorável. A transição inversa ( $T_1=0$  para  $S_1=0$ ), conhecida por cruzamento entre sistemas reverso é susceptível de ocorrer somente quando a diferença de energia entre  $T_1$  e  $S_1$  for pequena e quando o tempo de vida  $T_1$  for suficientemente grande. Este processo é responsável pela **fluorescência atrasada**, onde o espectro é o mesmo da fluorescência comum, no entanto o tempo de vida de decaimento da fluorescência é maior devido à permanência do elétron no estado  $T_1$  antes da emissão a partir do estado  $S_1$ .

A transição ( $T_1$  para  $S_0$ ) é atribuída a emissão de **fosforescência** e aparece sempre a maiores comprimentos de ondas comparativamente a fluorescência. Por se tratar de uma transição entre estados eletrônicos de multiplicidades de spins diferentes, a taxa de emissão é de várias ordens de magnitude menor que a fluorescência. Entretanto, o rendimento quântico de fosforescência é aumentado quando a molécula possui um átomo metálico ou haleto (brometo, iodeto, etc.) devido à facilidade de ocorrer o cruzamento entre sistemas. Por este

motivo, as moléculas que possuem tais átomos são frequentemente fosforescentes. O processo de emissão de fosforescência ocorre na ordem de  $10^3$ - $10^2$  s<sup>-1</sup>.

A emissão de **fluorescência** resulta de um equilíbrio térmico dos estados excitados, mais concretamente, do nível vibracional de menor energia ( $S_1= 0$ ). Após absorção o fluoróforo transita para o nível vibracional de energia mais alto do estado excitado ( $S_1= 3$  ou  $S_2= 4$ ). O excesso de energia é rapidamente dissipado pelo processo de relaxação vibracional, passando o fluoróforo a situar no nível vibracional de mais baixa energia do estado excitado ( $S_1= 0$ ). Esta rápida relaxação vibracional é o fator preponderante na independência do espectro de emissão face ao comprimento de onda de excitação. Entretanto, os fluoróforos que apresentam dois estados de ionização podem ser exceções a essa independência, apresentando espectros de absorção e de emissão distintos. Um resultado interessante da emissão dos níveis vibracionais excitados de mais alta energia é que o espectro de emissão é tipicamente sobreponível ao espectro de absorção da transição  $S_0$  para  $S_1$ . Esta analogia ocorre devido ao fato de que a excitação eletrônica não altera significativamente a geometria do núcleo. Assim sendo, o espaçamento entre os níveis vibracionais excitados são iguais ao espaçamento entre os níveis vibracionais fundamentais, como consequência, a estrutura vibracional observada no espectro de absorção e de emissão é análoga. <sup>[3]</sup>

## 2.4. Fluoróforo

Um fluoróforo é um componente de uma molécula que faz com que ela seja fluorescente. A sua função é absorver uma determinada energia de comprimento de onda específica e posteriormente emitir em outro comprimento de onda. Entretanto, a quantidade de energia e o comprimento de onda emitido dependem de alguns fatores como veremos mais à frente. Os fluoróforos se dividem em duas categorias, os intrínsecos e os extrínsecos. Os fluoróforos intrínsecos são aqueles que emitem luz naturalmente (as proteínas, tais como triptofano, tirosina, fenilalanina, algumas enzimas encontradas dentro da célula, etc.), podendo ser usados para estudo da autofluorescência e estruturas dinâmicas das células e das proteínas. Já os extrínsecos são aqueles adicionados à amostra com o propósito de desempenhar a função de sonda (ex: sondas cianinas). Esses fluoróforos geralmente apresentam alta sensibilidade e estabilidade no processo de sondagem. <sup>[2]</sup> A Figura 3 apresenta um espectro ilustrando as diferentes zonas eletromagnéticas. <sup>[5]</sup>

O espectro eletromagnético é o conjunto das várias radiações eletromagnéticas, tais como ondas de rádio, microondas, infravermelhos, luz visível, ultravioletas, raios-x, e raios-gama. A energia das radiações se encontra por ordem crescente, isto é, quanto maior for a frequência da radiação, maior é a energia que lhe está associada, e conseqüentemente menor é o comprimento de onda.

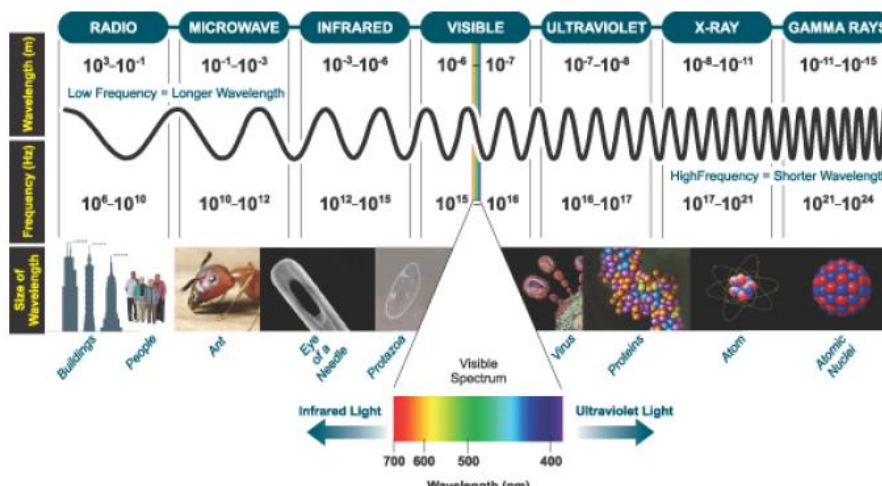


Figura 3. Frequências e comprimentos de onda do espectro eletromagnético.

## 2.5. Compostos Fluorescentes Benzazólicos

Este trabalho teve como foco o estudo de compostos heterocíclicos fluorescentes da família dos benzazóis que propiciem mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT), como mostra a Figura 4.

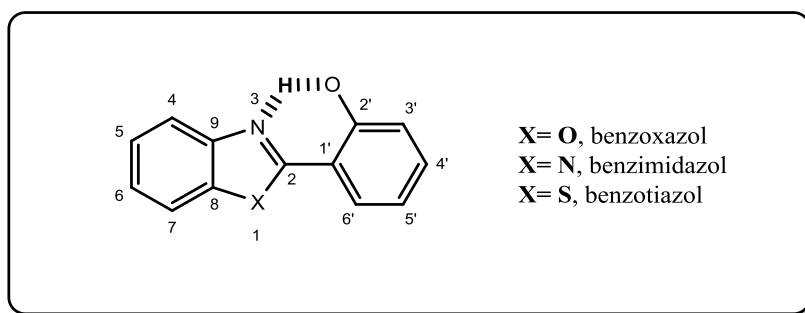


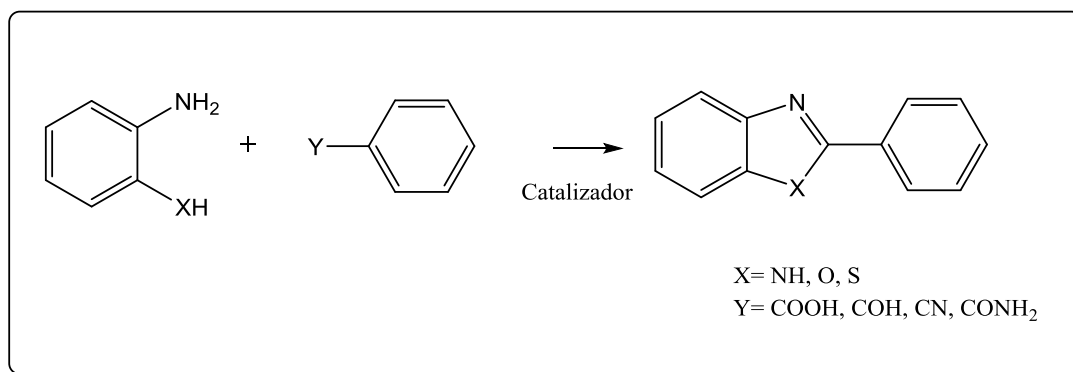
Figura 4. Compostos heterocíclicos do tipo 2- (2'-hidroxifenil)benzazóis.

Os compostos heterocíclicos benzazólicos do tipo 2- (2'-hidroxifenil)benzazóis ou simplesmente conhecidos como benzazóis são caracterizados por apresentar um anel azólico condensado a um anel benzênico. Um anel azólico caracteriza-se por possuir dois heteroátomos nas posições 1,3 em um anel de 5 membros, sendo que um deles é sempre o átomo de nitrogênio. A existência de um grupo hidroxila na posição *orto* do anel benzênico atribui uma característica importante a esses compostos, isto é, a possibilidade do mecanismo de ESIPT, tornando-os altamente atrativos do ponto de vista de aplicações. As moléculas que contém grupos doadores e aceitadores de hidrogênio próximos são susceptíveis a migração de próton de um grupo para outro, dando origem a formas tautoméricas que emitem fluorescência com substancial deslocamento para comprimentos de ondas maiores.

Para aplicações sensoriais, essas moléculas que exibem ESIPT são especialmente atraentes devido ao deslocamento entre a emissão de luz da forma normal excitada e a forma tautomérica que propicie ESIPT, podendo ser modulada pela molécula alvo. Entretanto, sem a compreensão dos mecanismos de reações ESIPT torna-se complicado estudar seus comportamentos. Além disso, os compostos benzazólicos são conhecidos por possuir importantes atividades biológicas, tais como anticâncer, antibactéria, anti-inflamatória, antimicrobiana, antiparasitária, entre outras.<sup>[6]</sup> Essa vasta gama de aplicação tem destacado muito interesse dos pesquisadores à volta do mundo, em desenvolver novas abordagens sintéticas para obtenção de novos derivados benzazólicos e explorar novas aplicações.

## 2.6. Síntese de Compostos Benzazólicos

Vários métodos são descritos na literatura para síntese de benzazóis, tais como ciclização oxidativa catalisada por Pd,<sup>[7]</sup> síntese mediada por líquido-iônico,<sup>[8]</sup> ácido polifosfórico,<sup>[9]</sup> pentóxido de fosfórico,<sup>[6]</sup> cloreto de tionila,<sup>[6]</sup> ésteres de imino,<sup>[6]</sup> ciclização oxidativa por Bases de Schiff,<sup>[6]</sup> catalisadores mediados por polietileno glicol,<sup>[10]</sup> diferentes catalisadores heteropoliácido,<sup>[11]</sup>. Estes métodos incluem condensação de ácidos carboxílicos,<sup>[12]</sup> aldeídos,<sup>[13,14]</sup> nitrilas,<sup>[9]</sup> amidas, com anilinas *orto*-substituídas. Esquema 1.

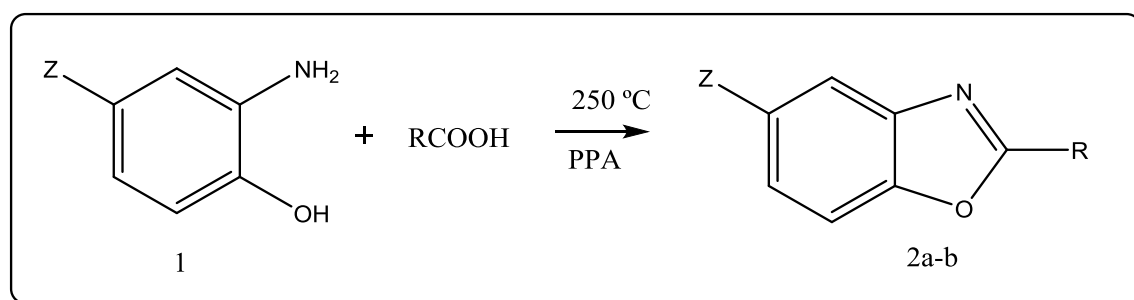


Esquema 1. Esquema geral de síntese dos compostos benzazólicos.

## 2.6.1. Ciclização Térmica

### 2.6.1.2. Por Ácido Polifosfórico (PPA)

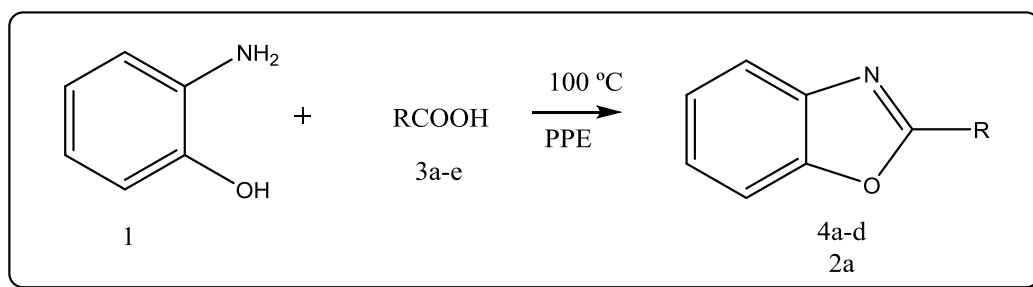
A condensação de *o*-aminofenóis (**1**, Z=H ou Cl) com um ácido carboxílico na presença de ácido polifosfórico a 250 °C foi relatada por Hein et al. <sup>[9]</sup> Essa reação leva a formação de 2-benzoxazóis substituídos (Z=H (**2a**) ou Cl (**2b**); R = Ph), Esquema 2.



Esquema 2. Síntese de 2-benzoxazóis substituídos mediada por ácido polifosfórico.

### 2.6.1.3. Por Éster Polifosfórico (PPE)

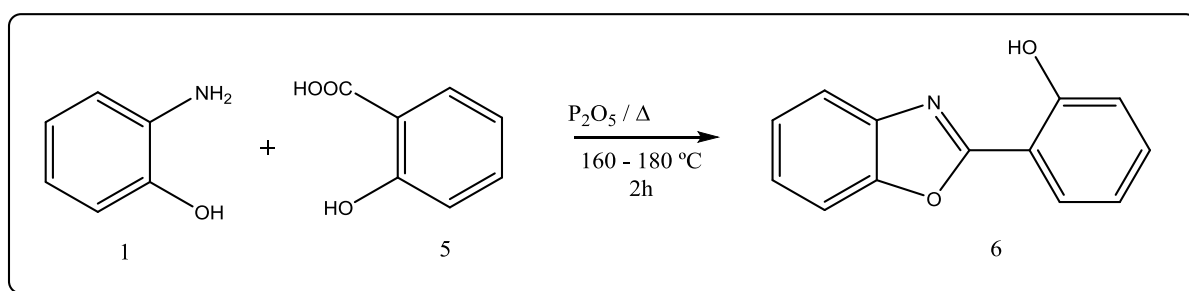
A síntese de 2-benzoxazóis (**4a-d** e **2a**) substituídos mediada por éster polifosfórico foi relatada por Kanoaka et al. <sup>[15]</sup> A reação consiste em aquecer uma mistura de *o*-aminofenóis (**1**) com ácido carboxílico livre (R= Me (**3a**), Cl (**3b**), NO<sub>3</sub> (**3c**), 4-(NHCOCH<sub>3</sub>)-Ph (**3d**), Ph (**3e**) a 100 °C, Esquema 3.



Esquema 3. Síntese de 2-benzoxazóis substituídos mediada por éster polifosfórico.

#### 2.6.1.4. Por Pentóxido de Fosfóro

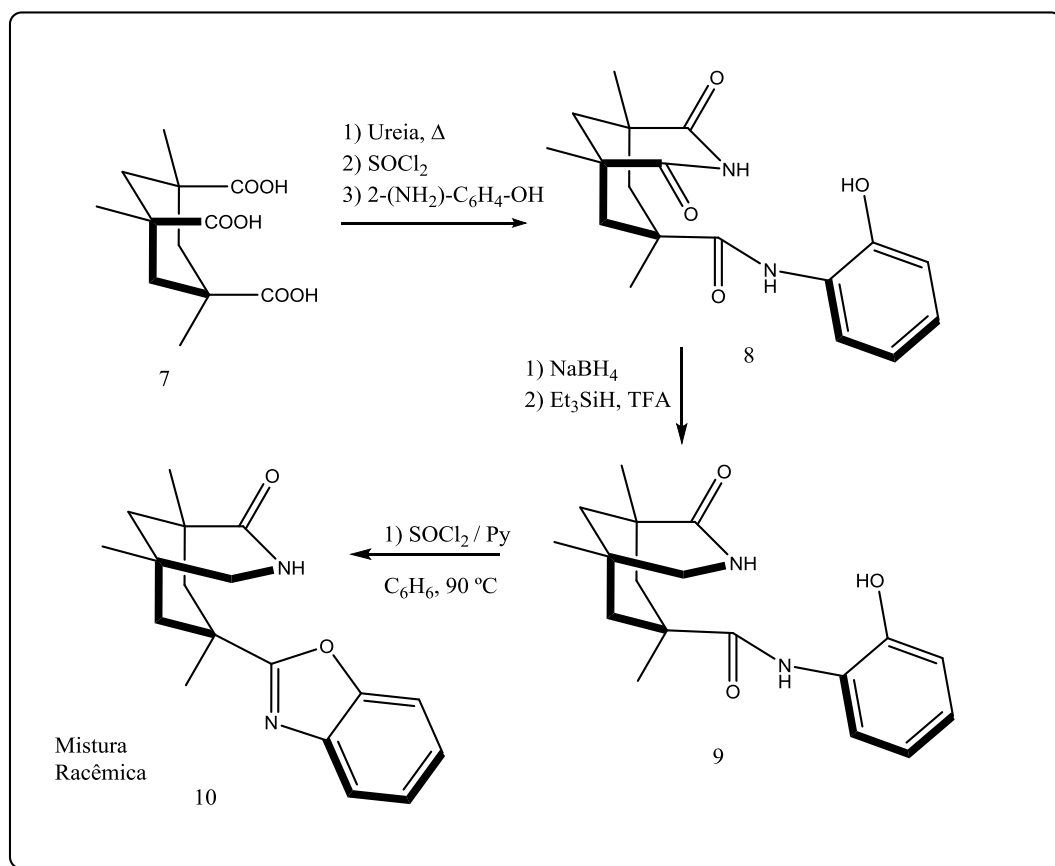
A síntese de 2-(*o*-hidroxifenil)benzoxazol (**6**) foi relatada por Wronski <sup>[16]</sup> e consiste em aquecer uma mistura de *o*-aminofenol (**1**) com ácido salicílico (**6**) na presença de pentóxido de fósforo a 160 - 180 °C por 2 horas, Esquema 4.



Esquema 4. Síntese de 2-(*o*-hidroxifenil)benzoxazol mediada por pentóxido de fósforo.

#### 2.6.1.5. Por Cloreto de Tionila

A ciclização térmica mediada por cloreto de tionila para a formação do produto racêmico (**10**) foi relatada por Stack *et al.* <sup>[17]</sup> Primeiramente o triácido de Kemp (**7**) foi aquecido com ureia em triglime a 200 °C, seguido de tratamento com cloreto de tionila, levando a formação do intermediário (**8**). A redução de um dos grupos carbonilos da imida com borohidreto de sódio e trietilsilano em ácido trifluoroacético leva a formação da amida lactâmica (**9**). Aquecimento desse segundo intermediário com cloreto de tionila e piridina em benzeno a 90 °C leva a formação do produto racêmico (**10**) Esquema 5.

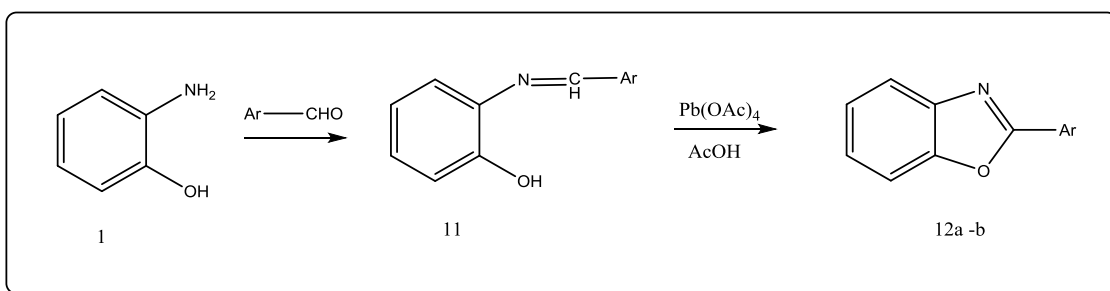


Esquema 5. Síntese de 2-benzoxazol substituído mediada por cloreto de tionila.

### 2.6.2. Ciclização Oxidativa por Bases de Schiff

A preparação de alguns benzoxazóis nitro-substituídos do tipo **12a-b** (\*Ar = 4-NO<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>- (**12a**) NO<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>- (**12b**), foi relatada por Stephens.<sup>[18]</sup> Essa reação consiste na condensação de *o*-aminofenol (**1**) com aldeídos aromáticos, passando pela formação da base de schiff (**11**). A ciclização oxidativa da base de schiff na presença de Pb(OAc)<sub>4</sub> em ácido acético glacial leva a formação dos benzoxazóis (**12a-b**). Em uma patente,<sup>[19]</sup> Dyson e Stephens relatam que PbO<sub>2</sub> em ácido acético glacial com ou sem adição de anidrido acético pode ser um substituto de Pb(OAc)<sub>4</sub> no processo de ciclização oxidativa mediada por Base de Schiff na formação de benzoxazóis, Esquema 6.

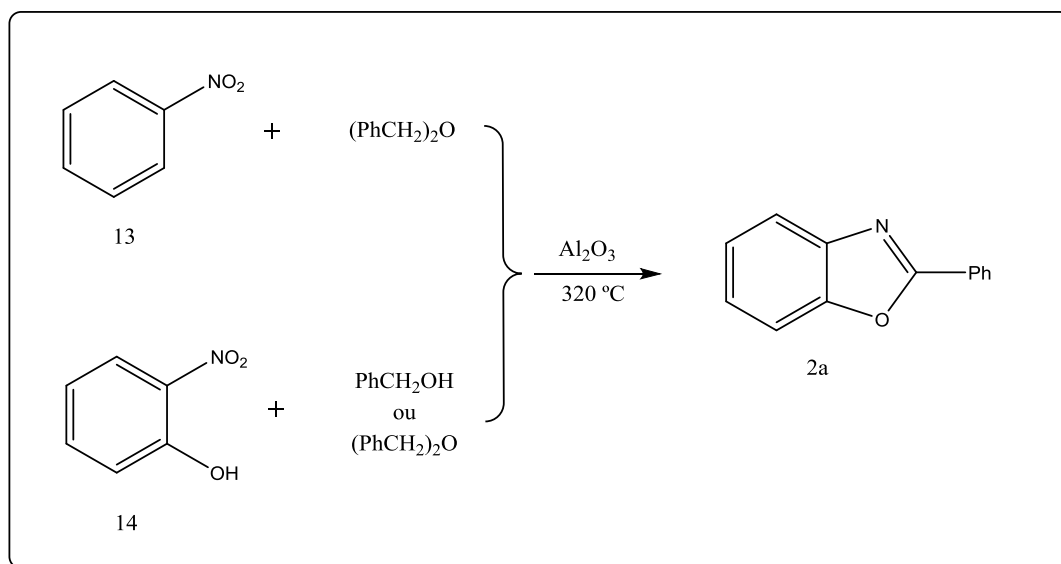




Esquema 6. Síntese de 2-benzoxazóis substituídos mediada por Base de Schiff.

### 2.6.3. Por Óxido de Alumínio Ativado

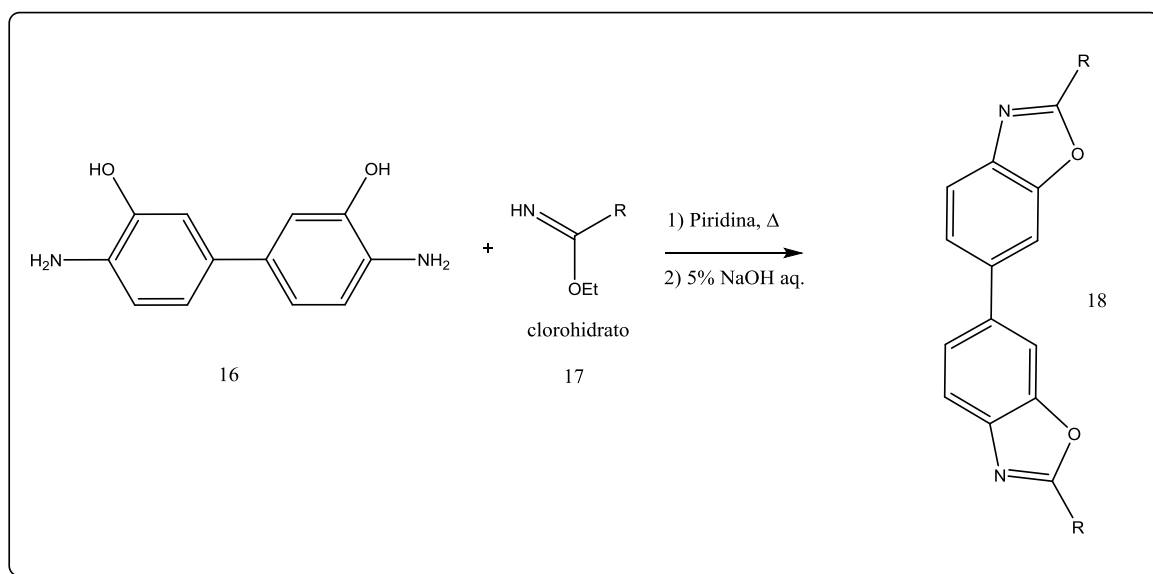
A síntese de 2-fenilbenzoxazol (**2a**) foi relatada por Kozlov e colaboradores,<sup>[20]</sup> e consiste na mistura de nitrobenzeno (**13**) e éter benzílico sob óxido de alumínio ativado a 320 °C e na velocidade de 0.2 g/min com 10 % de rendimento. O mesmo produto foi também relatado em outro procedimento em que *o*-nitrofenol (**14**) com álcool benzílico ou éter benzílico foi tratado nas mesmas condições mencionadas acima, neste caso, com rendimentos entre 30-34 %, Esquema 7.



Esquema 7. Síntese de 2-fenilbenzoxazol sob óxido de alumínio ativado.

#### 2.6.4. Por Ésteres de Imino

Um método de preparação de 2,2'-diaquil, 2,2'-diaril-6,6'-dibenzoxazóis foi relatado por Gitina e colaboradores,<sup>[21]</sup> que consiste na adição de cloridrato de éster etílico de ácidos iminoacéticos (**17**) em uma solução em agitação de 3,3'-dihidroxibenzidina (**16**) em piridina a quente. O tratamento posterior com 5 % de NaOH aquoso leva a formação do produto (**18**), Esquema 8.



Esquema 8. Síntese de 2,2'-diaquil, 2,2'-diaril-6,6'-dibenzoxazóis mediada por ésteres de imino.

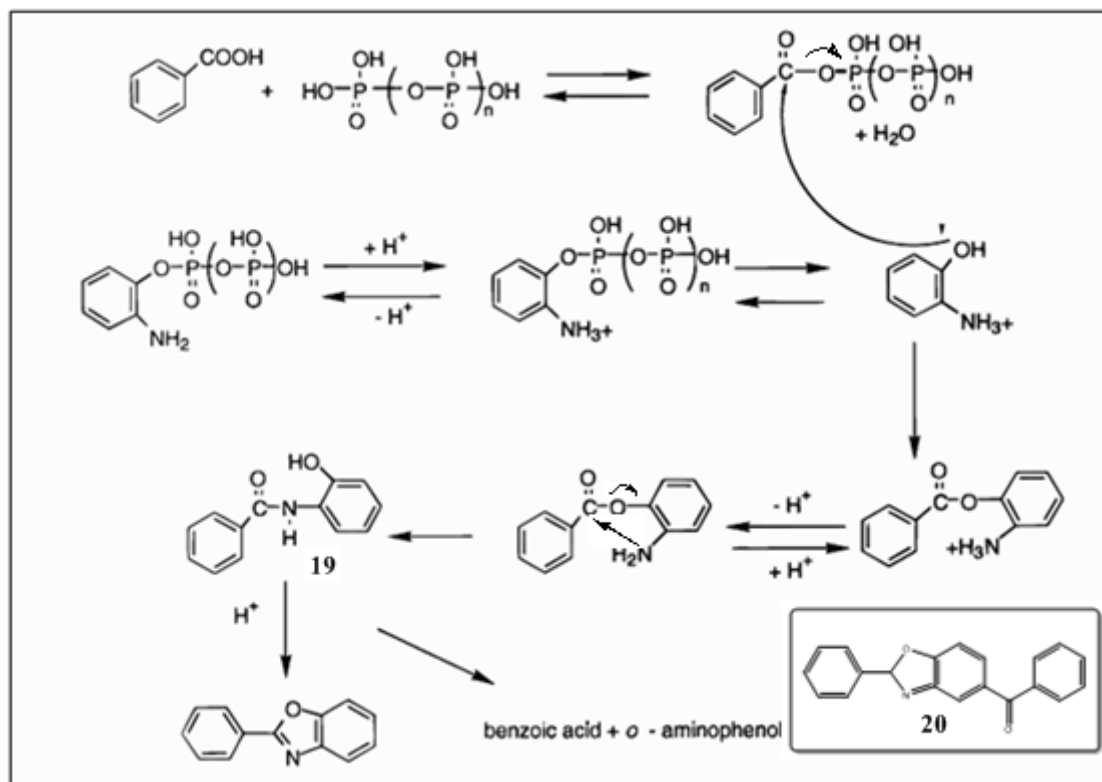
#### 2.7. Mecanismo de Atuação de Ácido Polifosfórico na Síntese de Compostos Benzazólicos

O ácido polifosfórico (PPA) tem ganhado destaque como catalisador em muitas reações químicas por ser de baixo custo e fácil aquisição comercial. Além disso, é um bom solvente para muitos compostos orgânicos e tem sido usado extensivamente em síntese orgânica, nomeadamente em reações de acetilação, alquilação, ciclização e reações catalisados por ácidos.<sup>[22]</sup>

Um estudo conduzido por Ying-Hung So e Heeschen,<sup>[22]</sup> sobre a formação de compostos benzazólicos a partir de ácido benzóico e *o*-aminofenol em PPA demonstra por

espectroscopia de RMN resultados valiosos que permitam compreender outras reações promovidas por PPA e fornecer orientações para a utilização de PPA como reagente em síntese orgânica.

O mecanismo de reação de ácido benzóico e *o*-aminofenol em PPA para formação de 2-fenilbenzoxazol é altamente complexo. A proposta mecanística que foi consistente com os resultados experimentais está apresentada no Esquema 9. O ácido benzóico é ativado através da formação do ácido benzóico-anidrido fosfórico. A mistura de ácido benzóico, anidrido e PPA estão em equilíbrio dinâmico. O grupo amino do 2-aminofenol é protonado, e acima de 90 % do grupo hidroxila existe como éster de fosfato. Todos os derivados de 2-aminofenol e PPA estão também em equilíbrio dinâmico. O benzoato de 2-aminofenila é proposto como a primeira reação intermediária. Um rápido equilíbrio é esperado entre a amina protonada e a amina livre. A rápida migração da acila do éster gera o 2- hidroxibenzanilida (19) que sofre o fechamento do anel por catálise ácida para gerar então o 2-fenilbenzoxazol.<sup>[23,24,25]</sup> O estudo não descarta a possibilidade de ciclização do benzoato de 2-aminofenila para formar o 2-fenilbenzoxazol. A formação do 2-fenil- 5-benzoilbenzoxazol (20) sugere que o cátion benzoíla pode se desenvolver na reação.



Esquema 9. Proposta mecanística para formação do composto benzazólico.

## 2.8. Transferência Protônica Intramolecular no Estado Excitado

Os compostos que propiciem mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT) têm se tornado um campo muito atrativo para pesquisa devido a ampla aplicação desses compostos. Dentre as inúmeras aplicações possíveis destaca-se a possibilidade de serem usados como marcadores para segurança militar, <sup>[26]</sup> na química forense, <sup>[26]</sup> sondas biológicas <sup>[27]</sup>, corantes para laser, <sup>[28,29]</sup> na marcação de DNA, <sup>[30]</sup> proteínas, <sup>[31]</sup> etc. Todas estas importantes e promissoras áreas de aplicação deve-se, sobretudo, ao fato de que esses compostos apresentam uma elevada sensibilidade, estabilidade térmica e fotofísica, e por apresentar uma intensa emissão de fluorescência. <sup>[32,33,34]</sup> Os sistemas de ESIPT têm sido largamente estudados em inúmeras estruturas moleculares. <sup>[35,36,37,38]</sup>

A Figura 5 representa de um modo geral os mecanismos envolvidos na ESIPT para os compostos benzazólicos. A forma *cis*-enol (E) representa a espécie predominante no estado fundamental, devido a uma forte ligação por ponte de hidrogênio intramolecular entre os átomos de nitrogênio e do oxigênio fenólico. <sup>[39]</sup> A excitação dessa espécie gera a forma *cis*-enol excitada (E\*), na qual é rapidamente convertida na forma *cis*-ceto excitada (K\*) através da transferência protônica intramolecular ( $10^{12} \text{ s}^{-1}$  para o 2-(2' hidroxifenil)benzotiazol). <sup>[40]</sup>

Estudos teóricos mostraram que a forma *cis*-ceto excitada (K\*) é mais estável do que a forma *cis*-enol excitada (E\*) por 1,5 Kcal/mol no estado excitado. <sup>[41]</sup> A forma *cis*-ceto (K\*) emite luz quando do retorno para estado fundamental. A forma *cis*-ceto (K), no estado fundamental, através da transferência protônica regenera na forma *cis*-enol (E) mantendo as mesmas propriedades fotoquímicas. <sup>[42]</sup> Como mostra a Figura 5, existem duas formas enol e duas formas ceto nas geometrias *cis* e *trans*. A designação *cis* e *trans* se refere à posição relativa do átomo de nitrogênio em relação ao átomo de oxigênio fenólico. Apesar do fato de existir duas formas conformacionais, *cis* e *trans*, apenas a forma *cis*-enol excitada (E\*) propicie o mecanismo de ESIPT para formar o confômero *cis*-ceto excitado (K\*). Isto deve-se ao fato do confômero *cis*-enol (E) ser mais estável que o confômero *trans*-enol (E').

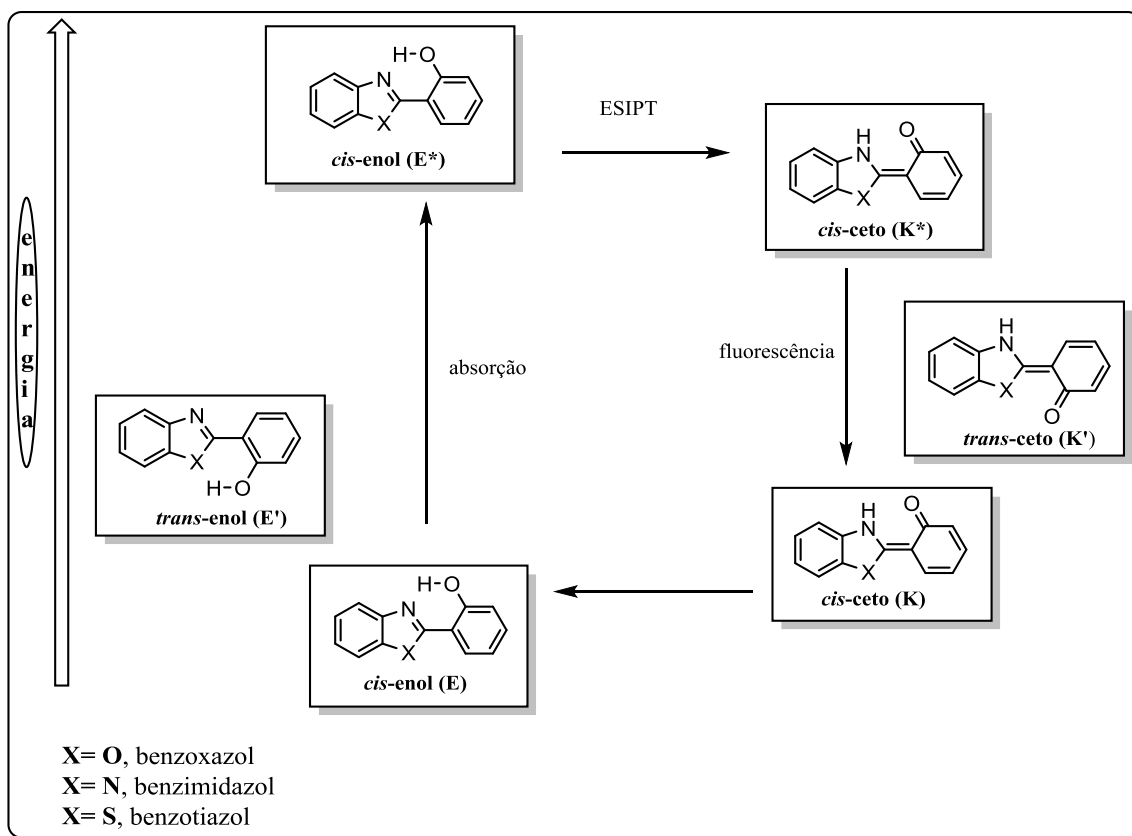


Figura 5. Mecanismo de transferência protônica intermolecular para compostos benzazólicos.

Essas reações de ESIPT são muito rápidas (sub-picosegundos) e a presença simultânea de bandas de emissão referentes às formas excitadas *cis-enol* ( $E^*$ ) e *cis-ceto* ( $K^*$ ) pode ser devida aos fatores cinéticos e termodinâmicos.

Na cinética, pode-se observar o equilíbrio da reação de ESIPT deslocado no sentido da forma *cis-ceto* ( $K^*$ ). Entretanto, as formas excitadas *cis-ceto* ( $K^*$ ) e *cis-enol* ( $E^*$ ) são separadas por uma barreira de energia que faz com que a reação seja lenta e comparável com a taxa de emissão. Essa barreira de emissão aparece devido à presença de conformeros desfavoráveis para a transferência protônica (forma *trans-enol* e *trans-ceto*). Em ambientes próticos, a troca de hidrogênio intermolecular pode competir com a troca de hidrogênio com o meio. Isso retarda a reação de ESIPT e a emissão a partir da forma *cis-enol* ( $E^*$ ) ocorre no decurso da sua transição para a forma *cis-ceto* ( $K^*$ ).

Na termodinâmica, a reação de ESIPT pode ser muito rápida, mas a reação reversa se dá numa escala de tempo mais rápida do que a emissão, permitindo assim estabelecer um equilíbrio entre as formas *cis-ceto* ( $K^*$ ) e *cis-enol* ( $E^*$ ), de modo que duas bandas de emissão com intensidades semelhantes podem ser observadas. Um aumento do momento dipolar da

forma *cis*-enol ( $E^*$ ) pela substituição adequada no cromóforo permite não só alterar a posição da banda, mas também a razão das intensidades ( $I_{E^*}/I_{K^*}$ ), tornando-a altamente sensível para interação com o ambiente.

## 2.9. Propriedades dos Espectros de Absorção Óptica

Uma determinada molécula quando submetida a radiação eletromagnética dois processos podem ocorrer. A radiação pode ser espalhada e a direção de propagação ser modificada. Por outro lado, ela pode ser absorvida, ocorrendo transferência de energia da radiação para a molécula. Essa energia transferida à molécula pelo processo de absorção é diretamente proporcional à frequência de radiação e inversamente proporcional ao comprimento de onda, segundo equações:

$$\Delta E = h\nu \quad \text{Equação 1}$$

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda} \quad \text{Equação 2}$$

E: energia (J)

$\nu$ : frequência (Hz)

c: velocidade da luz ( $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ )

$\lambda$ : comprimento de onda (nm)

h: constante de Planck ( $6.626 \times 10^{-34} \text{J}\cdot\text{s}$ )

Num modelo diatômico simples, como mostra a Figura 6, a energia potencial de um dado estado dependerá da distância entre os núcleos dos átomos. Em cada estado eletrônico da molécula existe um conjunto de níveis de energia rotacional e vibracional permitidos. <sup>[44]</sup>

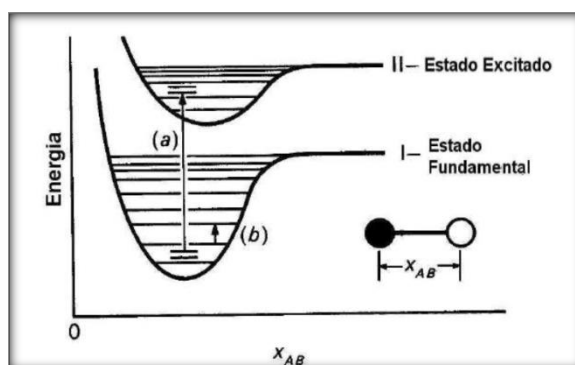


Figura 6. Modelo de uma molécula diatômica simples com os vários níveis de energia.

O tipo de espectro está relacionado com os níveis de energia envolvidos nas transições. O espectro de UV-Visível está relacionado com transições eletrônicas e constitui o fundamento do estudo das técnicas espectroscópicas de absorção e fluorescência. Já o espectro de infravermelho envolve transições de níveis vibracionais, enquanto, a faixa de micro-ondas está relacionada com transições que envolvem apenas níveis rotacionais.<sup>[43]</sup>

Em virtude das transições eletrônicas, a densidade de elétrons aumenta em uma determinada região da molécula e diminui em outras. Como consequência, os núcleos inicialmente em estado estacionário sofrem ação de um novo campo de força, respondendo esta ação com vibração e oscilação. Segundo o princípio de Franck-Condon,<sup>[44]</sup> uma transição eletrônica ocorre a uma velocidade muito mais rápida do que a do núcleo pelo fato da estrutura do núcleo ser muito maior do que a dos elétrons, e estas ocorrem sem qualquer mudança na posição dos núcleos. Estas transições são sempre desenhadas como linhas verticais e indicam passagem de elétrons entre níveis de um estado fundamental para níveis de um estado excitado, como representada nas curvas de potenciais, Figura 6.

A molécula pode ser excitada em muitos níveis de energia vibracional ou rotacional do primeiro estado excitado, resultando num espectro de absorção com muitas riscas espectrais bastante próximas, sendo que, na prática o que se vê é uma banda resultante das várias transições vibracionais e rotacionais.

## 2.10. Propriedades dos Espectros de Fluorescência

Os espectros de fluorescência são habitualmente apresentados como espectro de emissão. Um espectro de emissão é uma curva de intensidade de fluorescência ( $I$ ) *versus* comprimento de onda ( $\lambda$ ) em nanômetros (nm) ou número de ondas ( $\text{cm}^{-1}$ ). As características do meio no qual uma molécula fluorescente se encontra dissolvido, a natureza dos grupos constituintes da molécula e a estrutura química são três parâmetros preponderantes no comportamento do espectro de emissão da mesma. Uma condição fundamental para que ocorra a fluorescência é a existência de estrutura rígida capaz de minimizar a perda de energia absorvida sob a forma de processos não radiativos, aumentando a probabilidade de transições radiativas, isto é, a fluorescência. A existência de uma ponte de hidrogênio propicia uma rigidez considerável para as moléculas.

A natureza dos grupos constituintes da molécula por sua vez influencia no comportamento de espectro de fluorescência, por exemplo, se o grupo for um doador de elétron pode ocorrer um deslocamento do espectro de emissão para o vermelho (efeito batocrômico). Por outro lado, o espectro de emissão pode também ser deslocado para o azul (efeito hipsocrômico) se um determinado grupo for um receptor de elétron. [45]

### 2.10.1. Deslocamento de Stokes

O deslocamento de Stokes é conhecido como a diferença entre os comprimentos de onda do máximo de absorção e o máximo de emissão, [46] Figura 7. Este fenômeno foi observado pela primeira vez pelo físico George Gabriel Stokes, o qual ficou conhecido como deslocamento de Stokes em sua homenagem. Uma causa comum para o deslocamento de Stokes é a rápida relaxação da estrutura para níveis vibracionais mais baixos a partir de  $S_1$ , como apresentado anteriormente no *diagrama de Jablonski*.

A maioria dos compostos orgânicos apresenta um deslocamento de Stokes na faixa de 50 a 70 nm. Entretanto, quando da existência de uma espécie de menor energia no estado excitado, geralmente resultante de processos de fototautomerismo, como é o caso dos compostos 2- (2'-hidroxifenil)benzazólicos, o deslocamento de Stokes pode atingir valores na ordem dos 200 nm. [47]

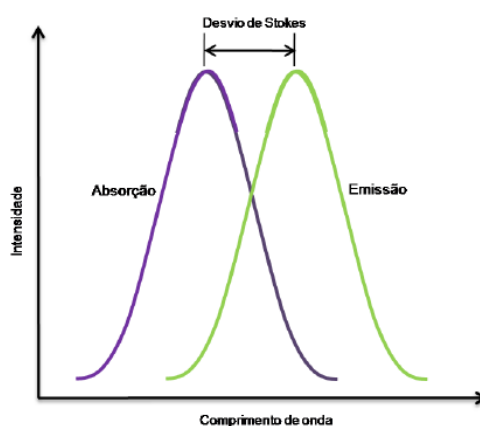


Figura 7. Comprimento de onda do máximo de absorção e de emissão.



## 2.10.2. Rendimento Quântico de Fluorescência

O rendimento quântico do fluoróforo representa uma medida quantitativa da eficiência de emissão de fluorescência e é expresso como a razão entre o número de fótons emitidos ( $n_{em}$ ) e o número de fótons absorvidos ( $n_{abs}$ ) pela amostra, Equação 3. Em outras palavras, o rendimento quântico representa a probabilidade de um dado fluoróforo excitado produzir emissão de fótons (fluorescência). Os valores típicos de rendimento quântico estão entre 0 e 1. Entretanto, os fluoróforos comumente empregados como sondas em microscopia possuem rendimento quântico muito baixo (0.05 ou menor).<sup>[48]</sup>

$$\Phi_F = \frac{n_{em}}{n_{abs}} \quad \text{Equação 3}$$

Em geral, um elevado rendimento quântico é desejável na maioria das aplicações de imagens. Fatores como pH, o meio onde se encontra o fluoróforo, a temperatura e a natureza do solvente, influenciam fortemente o rendimento quântico, como mostra a secção 2.10.3. (Fatores que afetam a emissão de fluorescência na reação de ESIPT)

Outro método comumente usado no cálculo de rendimento quântico é o de William e colaboradores.<sup>[49,50]</sup> Este método envolve o uso de um padrão bem caracterizado, cujo valor de rendimento quântico é conhecido e adotado como referência ( $\Phi_{ref}$ ). A razão da intensidade de fluorescência integrada das soluções do padrão e da amostra sob condições idênticas resulta na razão dos valores de rendimento quântico. Os valores de rendimento quântico de fluorescência ( $\Phi_F$ ) podem ser obtidos pela Equação 4.

$$\Phi_F = \Phi_{ref} \times \frac{A_{ref}}{A_{F_{ref}}} \times \frac{RI^2}{RI_{ref}^2} \quad \text{Equação 4}$$

$\Phi_F$ : rendimento quântico de fluorescência da amostra

$\Phi_{ref}$ : rendimento quântico de fluorescência de referência

A: intensidade de absorção da amostra

$A_{ref}$ : intensidade de absorção de referência

$F_{ref}$ : área sobre a curva de emissão de fluorescência em um determinado comprimento de onda de excitação de referência

RI: corresponde ao índice de refração do solvente no qual a amostra foi preparada

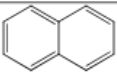
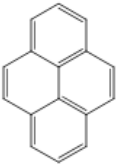
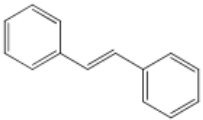

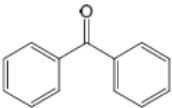
$RI_{ref}$ : corresponde ao índice de refração do solvente no qual a amostra de referência foi preparada.

Em espectrofotometria de UV-visível assim como em fluorescência existe um limite de valor e de intensidade que corresponde à linearidade da intensidade de luz em função da concentração. Essa linearidade é expressa segundo a Equação 5, onde I é a intensidade de fluorescência, c é a concentração e K é uma constante de proporcionalidade. Para que se verifique esta linearidade o valor da concentração deve ser baixo.

$$I = Kc \quad \text{Equação 5}$$

Em altas concentrações o efeito de auto-absorção e autosupressão pode desencadear a não linearidade da intensidade em função da concentração.<sup>[50]</sup> Em determinadas situações em que um processo fotoquímico de interesse compete com outros processos de desativação ou reações fotoquímicas, o rendimento quântico geralmente é menor que uma unidade ( $\Phi_F < 1$ ). Outro fator a ter em consideração é o tipo de estrutura molecular, onde moléculas flexíveis têm um rendimento quântico pequeno, como ilustrado na Tabela 2.<sup>[48]</sup>

Tabela 2. Relação entre rigidez molecular e rendimento quântico

Estrutura	$\Phi$	Descrição
	0,2	Molécula rígida. Transição $\pi \rightarrow \pi^*$ .
	0,7	Molécula rígida. Transição $\pi \rightarrow \pi^*$ .
	0,05	Molécula flexível. Transição $\pi \rightarrow \pi^*$ .
	0,001	Molécula flexível. Transição $n \rightarrow \pi^*$ .
	<0,0001	Pequeno GAP no estado de transição. Molécula flexível. Transição $n \rightarrow \pi^*$ . Pequeno GAP no estado de transição.

### 2.10.3. Fatores que afetam a Emissão de Fluorescência

#### 2.10.3.1. Efeito da Natureza do Solvente

O mecanismo de ESIPT é extremamente dependente da natureza do solvente. <sup>[51,52,53]</sup> Inúmeros estudos têm sido realizados com o propósito de melhor compreender a influência da natureza do solvente na estabilização das várias espécies em solução. <sup>[54,55,56,57,58,59]</sup> Em solvente prótico e /ou polar existe uma forte competição entre a transferência de próton intramolecular e intermolecular com o solvente, enfraquecendo a ligação de hidrogênio intramolecular. <sup>[60,61]</sup> Esse enfraquecimento da ligação de hidrogênio intramolecular pode levar a estabilização do confômero *cis*-enol aberto, que se forma a partir da ruptura da ligação de hidrogênio intramolecular entre o grupo hidroxilo fenólico e o átomo de nitrogênio seguido de rotação de 180 °C do grupo 2'-hidrofenil sob a ligação C<sub>2</sub>-C<sub>1</sub>'. Uma das consequências inerentes a ruptura da ponte de hidrogênio intramolecular pelo solvente prótico é a deslocalização do máximo de absorção para o azul, devido, sobretudo, a destabilização da estrutura. <sup>[62,63,64]</sup> Em solvente apolar ou fracamente polar, confômero do tipo *trans*-enol e *trans*-enol aberto pode ser estabilizado.

Todos os confômeros susceptíveis de relaxação normal podem competir com a espécie *cis*-enol, responsável pelo mecanismo de ESIPT, apresentando normalmente uma dupla emissão de fluorescência em um mesmo solvente. Além disso, alguns solventes podem provocar a desprotonação da forma *cis*-enol levando-a a forma aniônica como é o caso do corante 2- (2'-hidroxifenil) benzotiazol (HBT), Figura 8. <sup>[65]</sup>

O aumento da viscosidade da solução onde se encontra o fluoróforo, por sua vez, leva a diminuição da taxa de colisões moleculares levando a uma diminuição da difusão dos fótons de fluorescência. <sup>[66]</sup>

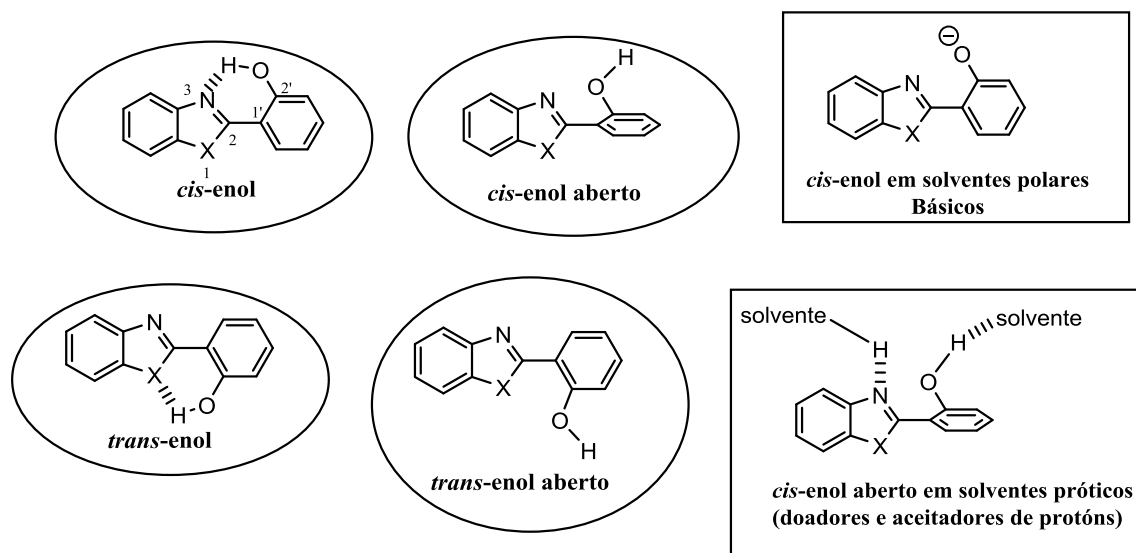


Figura 8. Geometrias da forma enol e seus comportamentos em solventes próticos e polares.

### 2.10.3.2. Efeito da Temperatura e do pH

O aumento da temperatura tem como consequência um aumento na eficiência de desativação do estado excitado pelos processos de conversão interna (CI). No entanto, por ser um fenômeno de tempo de vida relativamente curto, esse fator é menos crítico no caso da fluorescência, o que permite fácil observação do fenômeno na temperatura ambiente.<sup>[67]</sup>

No caso do pH do meio, a fluorescência de compostos com funcionalidades ácidas ou básicas apresentam forte dependência com o mesmo, desta forma, é importante manter o pH do meio sempre constante. Dependendo do meio onde se encontra o composto benzazólico pode ocorrer a desprotonação da forma *cis-enol* levando-a a forma aniônica como é o caso do corante 2- (2'-hidroxifenil) benzotiazol (HBT).<sup>[65]</sup>

### **3. APLICAÇÃO**

#### **3.1. Introdução**

A identificação de indícios de impressões digitais (IDs) latentes é frequentemente chave na resolução de um crime. As IDs resultam do contato das cristas papilares encontradas nos dedos, mãos e nos pés, com determinadas superfícies (porosas, não porosas, ou semi-porosas). Estas impressões digitais consistem numa mistura de diferentes componentes químicos secretados pelas glândulas sudoríparas (écrinas e apócrinas) e as glândulas sebáceas. <sup>[68]</sup> Entretanto, outros componentes podem ser encontrados, resultantes da contaminação com o próprio ambiente onde essas impressões digitais se encontram. O conhecimento da composição dos resíduos de IDs e a compreensão da natureza e das características das superfícies onde elas se encontram são fatores determinantes no processo de revelação de impressões digitais latentes.

#### **3.2. História das Impressões Digitais**

Por milhares de anos, os seres humanos têm sido fascinados pelos padrões encontrados na pele dos seus dedos. Ainda não se sabe exatamente a quanto tempo atrás os nossos ancestrais se aperceberam que esses padrões poderiam ser utilizados para identificação individual. Arqueólogos descobriram impressões digitais marcadas em objetos de argila que remonta 1792-1750 A.C na Babilônia. <sup>[69]</sup> Segundo os historiadores chineses, <sup>[69]</sup> na china antiga, nomeadamente a partir do terceiro século A.C. pensava-se que era uma prática comum o uso de impressões digitais como forma de autenticar documentos oficiais. Na cultura ocidental, o registro mais antigo de estudos referentes aos padrões de impressões digitais em mãos humanas é de 1684. <sup>[70]</sup> Dr. Nehemiah <sup>[71]</sup> escreveu um artigo descrevendo os padrões de IDs que ele viu em mãos humanas sob microscópio, incluindo as cristas papilares. Em 1788, Johann Christoph Andreas Mayer <sup>[72]</sup> continuou este trabalho, descrevendo que os padrões dos arranjos das cristas papilares e dos sulcos são únicos para cada pessoa. Ele foi provavelmente o primeiro cientista a reconhecer este fato. Em 1823, Jan Evangelista Purkynje <sup>[71,73]</sup> descreveu nove padrões de IDs distintas, incluindo presilhas, espirais, círculos e espirais duplas. William Herschel <sup>[74]</sup> começou a coleta de IDs em 1856. Ele observou o que Johann Mayer já tinha relatado, isto é, que os padrões eram únicos para cada pessoa, e concluiu que os mesmos não se alteravam com o tempo. Em 1879, Alphonse Bertillon, <sup>[75]</sup> um funcionário

assistente no escritório de registros da Delegacia de Polícia em Paris criou uma maneira de identificar os criminosos. O sistema, muitas vezes chamado de Bertillonage, foi usado pela primeira vez em 1883 como método de identificação. Em 1888, Francis Galton juntamente com Edward Henry <sup>[76]</sup> desenvolveram o primeiro sistema de classificação de impressões digitais que é até hoje usado nos Estados Unidos de América e na Europa. O mesmo foi creditado em 1902 com a resolução do primeiro caso de assassinato usando IDs.

Iván Vucetich, <sup>[71]</sup> em 1891, desenvolveu seu próprio sistema de classificação e inventou a melhor forma de coletar as impressões digitais. Edward Henry, <sup>[76]</sup> com ajuda de dois colegas, criou um sistema que divide as impressões digitais coletadas em três grupos designados de arco, verticilo e presilhas. Estas designações se baseiam nos padrões de desenho das cristas papilares, <sup>[77,78]</sup> Figura 9.

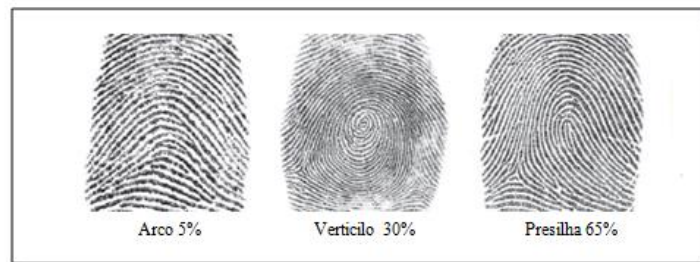


Figura 9. Padrões básicos de impressões digitais e suas frequências de ocorrência na população.

Cerca de 60 % da população possui presilhas, 30 % verticilo e 5 % arco. Estes três padrões formam a base para o sistema de classificação de impressões digitais.

A identificação de um indivíduo no entanto se dá mediante a comparação com minúcias e elementos que possam contribuir na individualização, Figura 11. Algumas dessas minúcias estão representadas na Figura 10. <sup>[72]</sup>

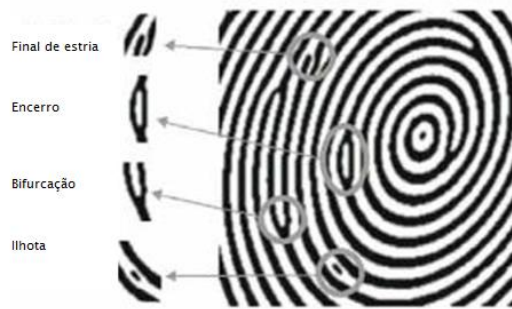


Figura 10. Exemplos de minúcias identificadas em impressões digitais.

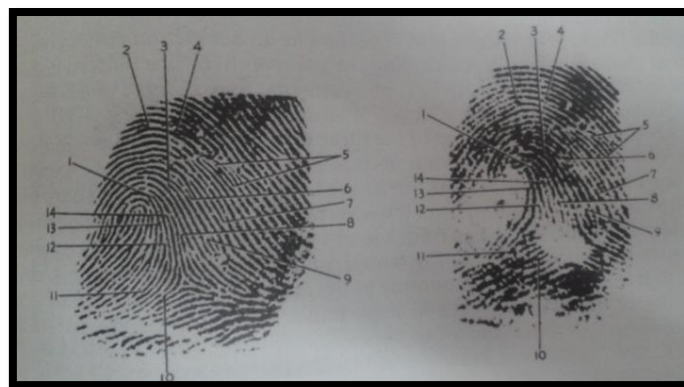


Figura 11. Comparação entre uma impressão digital impressa (esquerda) e latente (direita). Identificação pela correspondência de catorze pontos característicos (minúcias).

### 3.3. Princípios Fundamentais da Papiloscopia

As impressões digitais constituem um meio único e imutável na identificação humana. Estas características fizeram com que as IDs se tornassem uma parte integral da ciência forense. A Papiloscopia é a ciência que trata de identificação humana por meio de impressões digitais, palmares e plantares. Ela se baseia em alguns princípios fundamentais:

#### 3.3.1. Primeiro princípio: **Perenidade**

Descoberto em 1883 pelo anatomista holandês Arthur Kollman, <sup>[77]</sup> diz que os desenhos das impressões digitais em cada ser humano já estão definitivamente formados ainda dentro da barriga da mãe, a partir do sexto mês de gestação. Esses desenhos papilares

observados em um recém-nascido permanecem até sua velhice com a única diferença do aumento do tamanho.

### 3.3.2. Segundo princípio: **Imutabilidade**

O princípio da imutabilidade, por sua vez, diz que estes desenhos formados não se alteram com o tempo, exceto algumas alterações que podem ocorrer devido a agentes externos, como queimaduras, cortes ou doenças de pele. Mesmo em alguns casos extremos, os desenhos regeneram e mantêm as mesmas características que permitem identificá-los.

### 3.3.3. Terceiro princípio: **Variabilidade**

O princípio da variabilidade garante que os desenhos das impressões digitais são diferentes de pessoa para pessoa e entre os dedos do mesmo indivíduo. Ou seja, não há possibilidade de encontrar dois desenhos de impressões digitais idênticos, nem mesmo em uma mesma pessoa, ou em gêmeos univitelínicos.

## 3.4. Composição dos Resíduos de Impressões Digitais

A composição do suor que é depositado quando as cristas papilares entram em contato com uma determinada superfície é uma mistura complexa. <sup>[79]</sup> Estudos recentes têm identificado centenas de compostos presentes nos resíduos das impressões digitais. <sup>[80]</sup> Em particular, se tem investigado como a composição química destes resíduos altera com o tempo, pois constitui um importante problema para um examinador de IDs. Estudos têm demonstrado que alterações significativas na composição dos resíduos de IDs começam a ocorrer logo após a sua deposição.

Três glândulas primárias são responsáveis pela produção do suor. Estas são as glândulas sudoríparas (écrinas e apócrinas) e as glândulas sebáceas. Cada glândula produz uma mistura única de compostos químicos. Vários milhões de glândulas, principalmente as écrinas, estão distribuídas por todo corpo, maioria comumente nas papilas (elevações da pele presentes nas polpas dos dedos das mãos e dos pés). Estas glândulas produzem uma secreção que é composta principalmente por água (99%) e outros compostos em pequenas quantidades, dentre eles compostos orgânicos. <sup>[81,82,83,84]</sup> Estes compostos orgânicos, principalmente



aminoácidos (Figura 12) e proteínas, são de importância primordial para a revelação de impressões digitais. A Tabela 3 mostra valores normalizados de abundância de aminoácidos listados, em relação ao aminoácido mais abundante (serina) encontrado nas IDs. <sup>[85,86]</sup>

Tabela 3. Abundância relativa de aminoácidos nas impressões digitais.

Aminoácidos	Abundância relativa (%)
Serina	100
Glicina	60
Lisina- Ornitina	45
Ornitina	41
Alanina	30
Ácido Aspártico	18
Treonina	15
Histina	15
Valina	10
Leucina	9
Ácido glutâmico	8
Isoleucina	7
Fenilalanina	6
Lisina	7.5
Terosina	5

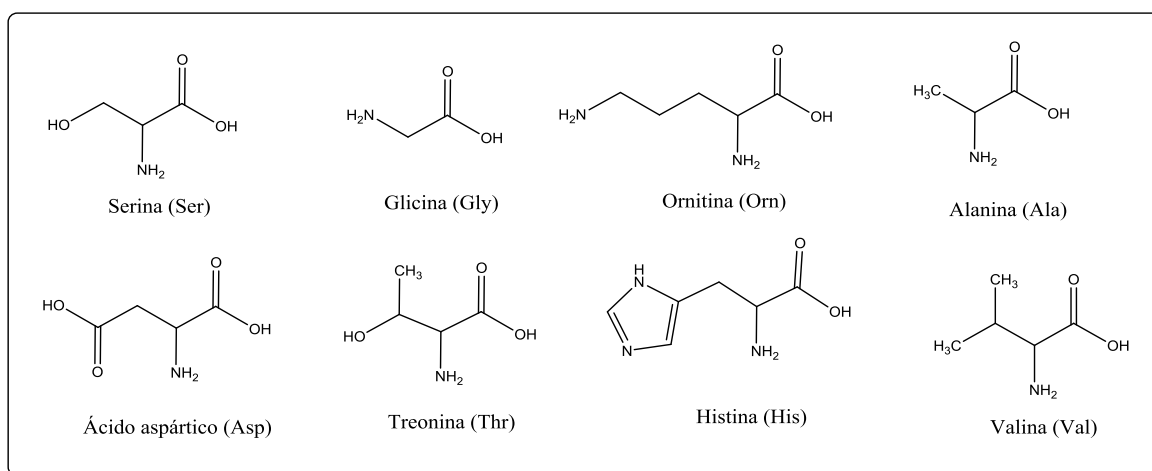


Figura 12. Estrutura dos principais aminoácidos encontrados nas impressões digitais.

As glândulas sebáceas são relativamente pequenas e podem ser encontradas em todo o corpo, principalmente nos locais associados aos pêlos (ex: couro cabeludo, face, nariz, axilas e ouvidos), exceto nas papilas. No entanto, os compostos secretados por estas glândulas podem ser transferidos para as cristas papilares através do contato com áreas que possuem estas glândulas. Os principais compostos presentes nas secreções sebáceas são lipídeos. A

Tabela 4 lista os valores percentuais aproximados para as várias classes de lipídeos presentes nas secreções sebáceas, como relatado por Goode e Morris.<sup>[87]</sup>

Tabela 4. Percentagens aproximadas de lipídeos secretados pelas glândulas sebáceas.

<b>Lipídeos</b>	<b>Percentagens</b>
Glicerídeos	33
Ácidos graxos	30
Ésteres de cera	22
Ésteres de colesterol	2
Colesterol	2
Esqualeno	10

### **3.5. Revelação de Impressões Digitais Latentes**

O grande desafio de um examinador de impressões digitais latentes passa pela revelação e identificação de IDs. Para isso é importante reconhecer potenciais áreas que podem conter impressões digitais latentes (aquelas que não visíveis) e fazer o uso de técnicas adequadas para o seu reconhecimento e revelação, fazendo com que se tornam visíveis. O processo de examinação de impressões digitais latentes é o mesmo de qualquer outro tipo de exame forense. Este processo envolve reconhecimento, identificação, individualização e reconstrução, Figura 13.

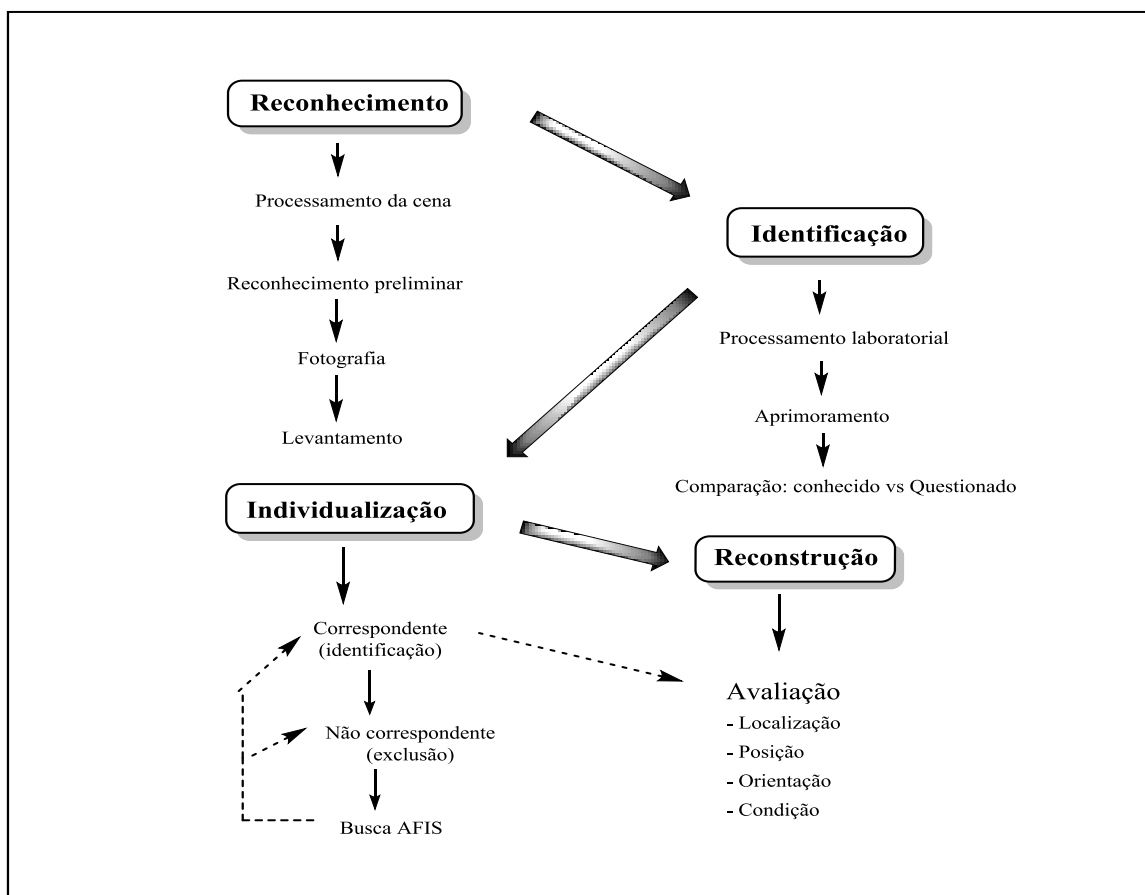


Figura 13. Exame de impressões digitais latentes.

### 3.6. Métodos de Revelação de Impressões Digitais

Existe uma variedade de métodos de revelação de impressões digitais latentes, tais como físicos e químicos. No entanto, a escolha de um desses métodos ou a combinação de métodos depende exclusivamente da natureza da superfície a ser processada, do tipo de matriz e do estado das IDs. Atualmente diversos métodos têm sido aplicados na revelação das mesmas, porém existem algumas limitações que ainda precisam ser superadas. Uma das grandes limitações, principalmente no uso de reagentes químicos, é a capacidade de diferenciar as impressões digitais quando o fundo da superfície a ser analisado é colorido. Superfícies coloridas tendem a dificultar a identificação e captura fotográfica de impressões digitais. <sup>[88,89]</sup>

O contraste de IDs latentes na superfície do material a ser analisado pode ser melhorado usando corantes fluorescentes e uma fonte de excitação que pode ser uma lâmpada de luz ultravioleta. No entanto, para revelar IDs latentes com sucesso é preciso que o corante

fluorescente reaja com algum componente ou combinações de componentes constituintes das mesmas, mas nunca com a superfície onde as impressões se encontram.

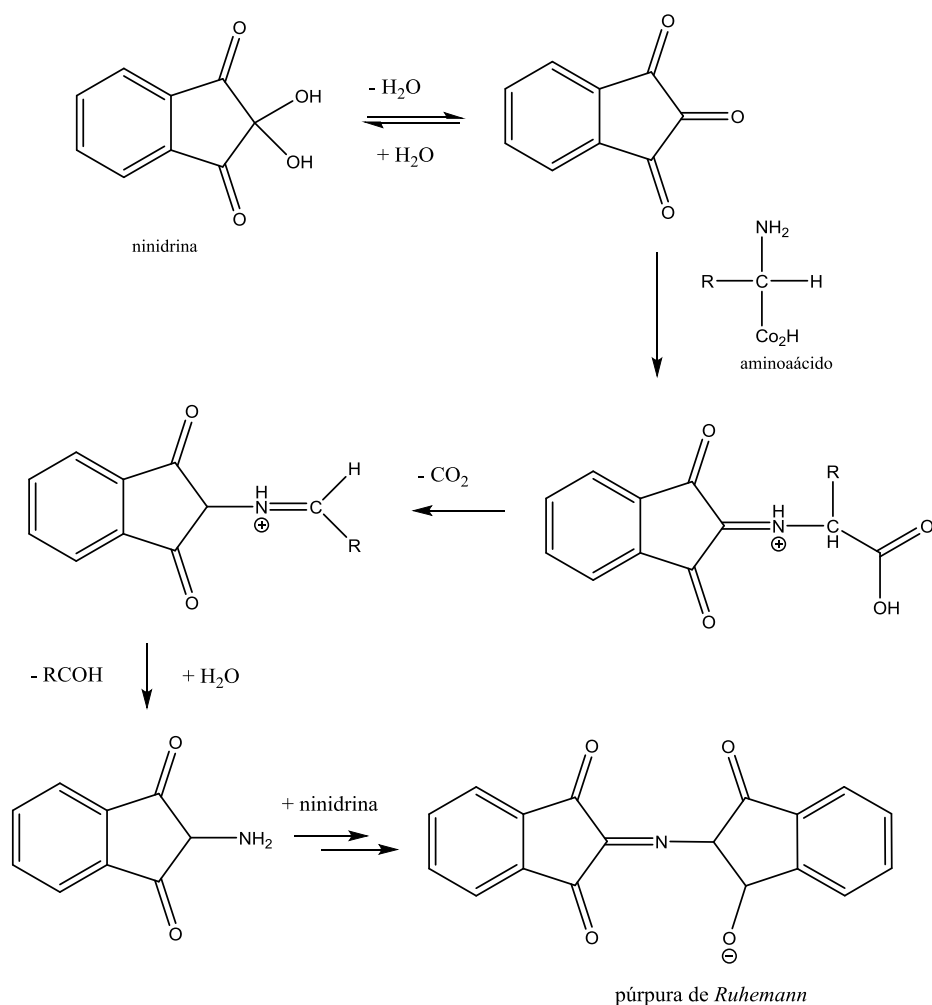
É importante realçar que fatores como idade, exposição ao meio ambiente e a superfície na qual as IDs se encontram têm grandes efeitos na revelação das mesmas. Água e álcoois são os primeiros componentes constituintes de impressões digitais a ser perdidos com o passar do tempo. Conseqüentemente, marcadores que reagem ou aderem a esses componentes apresentarão menor êxito com o decorrer do tempo, enquanto os marcadores que reagem com os componentes oleosos podem apresentar melhores resultados. A superfície sobre a qual as IDs latentes se encontram, por sua vez, pode também comprometer o resultado, diluindo ou absorvendo componentes oleosos, não deixando nenhum sinal discernível das cristas papilares. Sendo assim, pode fazer-se necessário que o examinador tenha que usar um número de reveladores sequenciais. Entretanto, muitos reveladores são destrutivos, podendo alterar a composição química de IDs com a qual eles reagem. É extremamente importante que o examinador compreenda a sequência correta do uso dos reveladores de IDs de modo a evitar a destruição da prova criminal.<sup>[90]</sup>

### **3.6.1. Métodos de Revelação de Impressões Digitais em Superfícies Porosas**

#### **3.6.1.1. NINIDRINA**

A ninidrina reage com aminas primárias e secundárias (incluindo aminoácidos, proteínas e péptidos) para formar um produto de cor roxo escuro, conhecido como púrpura de *Ruhemann*, de acordo com a reação descrita no Esquema 10.<sup>[91]</sup> O uso de ninidrina na revelação de impressões digitais latentes foi primeiramente proposto em 1954 por Odén e Von Hoftén.<sup>[92]</sup> Desde então, tem-se tornado um método popular para revelação de IDs latentes em superfícies porosas. A ninidrina não é um reagente específico para detecção de um determinado aminoácido. Ela reage da mesma forma com todos os aminoácidos encontrados nas IDs (Tabela 3), de modo que, cada aminoácido presente nas IDs contribuirá para a revelação das mesmas. Os aminoácidos são moléculas estáveis e aderem facilmente a superfície de papel devido a sua alta afinidade com a celulose. Como resultado, impressões digitais antigas que se encontram nestes tipos de superfícies podem ser perfeitamente reveladas com ninidrina. Além disso, a composição de aminoácidos secretados pelas

glândulas écrinas parecem se manter constante. Estas características fazem da ninidrina um método efetivo para revelação de IDs em superfícies porosas (papel, cartão, etc.)



Esquema 10. Reação química entre ninidrina e amins primárias e secundárias, e o produto roxo resultante, conhecido como púrpura de *Ruhemann*.

A reação passa pela formação de um intermediário imina resultante da reação da ninidrina com uma tri-cetona, que subsequentemente é descarboxilado dando origem a uma amina que reage com a segunda molécula de ninidrina para formar o produto roxo conhecido como púrpura de *Ruhemann*. Tendo em conta a complexidade desta reação, as condições reacionais devem ser rigidamente controladas de modo a obter ótimo rendimento do produto. A velocidade da reação é fortemente depende da temperatura, umidade relativa, e do pH. Tem sido relatado que uma ótima velocidade de reação é alcançada a condições ligeiramente ácidas, em torno de pH 5. <sup>[93]</sup>

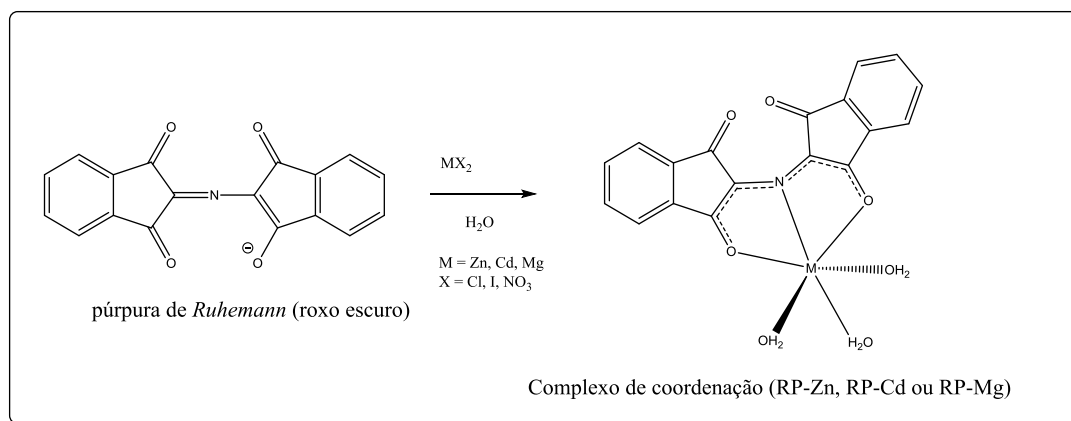
As superfícies como papel são geralmente tratadas em solução de ninidrina por imersão (concentração típico 0.5 % m/v num solvente orgânico) ou, como alternativa, com aplicação na forma de *spray*. Os objetos são então deixados a temperatura ambiente até revelação completa. É possível acelerar a reação por aquecimento, no entanto, nem sempre é recomendada, uma vez que pode levar a coloração do fundo da superfície pela reação da ninidrina com a própria superfície do objeto a ser revelada. A reação é mais eficiente quando a umidade relativa se situa entre 50 a 80 %.

### 3.6.1.1.1 Tratamento Secundário com Sais de Metais

As imagens de impressões digitais reveladas com ninidrina podem ser melhoradas com um processo adicional que consiste em colocar estas impressões em contato com uma solução de sais de metais como zinco (Zn), magnésio (Mg) ou cádmio (Cd). Este processo resulta na mudança de cor (laranja para Zn e vermelho para Cd) devido a formação de um complexo de coordenação entre a púrpura de *Ruhemann* e o sal de metal,<sup>[94,95]</sup> Esquema 11.

Estes complexos formados apresentam uma forte absorção em relação a púrpura de *Ruhemann*. Como resultado, estes complexos se tornam úteis quando se trata de superfícies escuras onde existe pouco contraste entre o fundo da superfície do objeto e as impressões digitais latentes reveladas com ninidrina inicial. Um melhor contraste (aprimoramento da fotografia) pode ser alcançado com modos de absorção específicos, usando barreiras de filtros à frente da câmera com comprimentos de onda característicos àqueles absorvidos pelos complexos formados (RP- Zn a 490 nm e RP-Cd a 505 nm) ou pelo uso de fontes de luz forense de iluminação equivalente.

Mais importante que as mudanças de coloração é a fluorescência que é produzida após tratamento com zinco e cádmio. A emissão de fluorescência, que é muito fraca sob condições normais, é significativamente aumentada à baixa temperatura por resfriamento de IDs reveladas com nitrogênio líquido (-196 °C, 77 K). A emissão de fluorescência ocorre nas regiões verde-amarelo e laranja para os complexos RP-Zn ( $\lambda=550$  nm) e RP-Cd ( $\lambda=590$  nm), respetivamente.

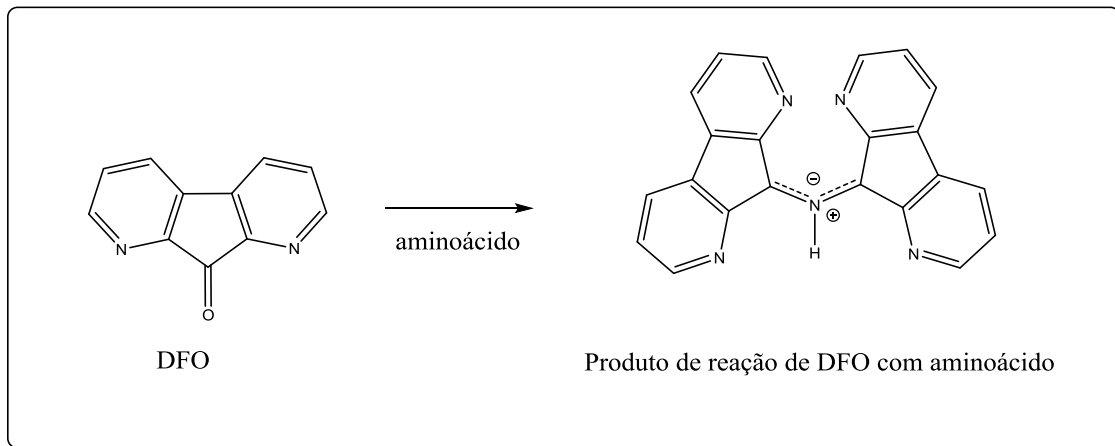


Esquema 11. Tratamento da púrpura de *Ruhemann* com sais de metais e o complexo de coordenação resultante.

### 3.6.1.2. DIAZAFLUORENONA (DFO)

O composto 1,8-diazafluorenona (DFO) é um reagente sensível ao aminoácido e ao reagir com ele produz um composto de cor roxo pálido. A vantagem desse reagente é que, sem qualquer tratamento adicional, as impressões digitais latentes reveladas apresentam uma forte fluorescência à temperatura ambiente quando iluminadas com uma fonte de excitação (Laser).<sup>[96]</sup> Pensa-se que a reação envolvida neste processo é similar à reação entre a ninidrina e os aminoácidos presentes nas IDs. Grigg e colaboradores<sup>[97]</sup> caracterizaram um conjunto de intermediários e foram capazes de detalhar uma possível reação entre DFO e os aminoácidos, Esquema 12. O produto final da reação proposta por este grupo tem sido identificado por cristalografia de raio-x.<sup>[98]</sup> O processo de revelação é simples e rápido. O objeto (ex: papel) é imergido numa solução de DFO, depois é secado, e posteriormente aquecido a 100 °C por 20 minutos. Como alternativa, Stoilovic<sup>[99]</sup> mostrou que 20 a 30 segundos a 160 °C ou 10 segundos a 180 °C (usando ferro de passar) produz um resultado mais eficiente, isto é, maior luminescência e menor coloração do fundo da superfície. O espectro de excitação é muito largo e cobre a região de 430 a 580 nm, com máximo de excitação a 460, 530, e 560 nm. Uma maior luminescência pode ser obtida com excitação entre 540 a 570 nm, no entanto se a excitação nestas regiões produzir uma forte luminescência de fundo, então as outras duas bandas de excitação podem ser usadas para excitação do produto da reação. Foi constatado que a luminescência é máxima logo após o processo de aquecimento e que ela decai lentamente com o tempo devido a absorção da umidade do ambiente. No entanto, a

intensidade da luminescência pode ser recuperada por aquecimento do objeto processado. Experiências tem mostrado que o DFO apresenta uma eficiência duas ou três vezes superior a ninidrina. <sup>[100,101]</sup> Entretanto, ela requer fonte de luz forense (Laser) com filtros apropriados para a visualização de IDs processadas.



Esquema 12. Possível reação entre DFO e aminoácidos para a formação de um produto luminescente.

### **Sequência de Métodos Recomendada no Processo de Revelação de Impressões Digitais Latentes em Superfícies Porosas**

A aplicação de mais do que um método ou reagente para revelação de impressões digitais latentes pode ser uma forma eficiente de melhorar a qualidade de IDs latentes reveladas. No entanto, é muito importante que se conheça a sequência correta de aplicação desses métodos. <sup>[102]</sup> A escolha ou aplicação da sequência incorreta pode impedir o uso posterior de uma outra técnica ou diminuir sua eficácia. Atualmente inúmeras sequências têm sido adotadas na revelação de IDs latentes de acordo com a natureza das superfícies envolvidas. <sup>[87,103,90]</sup> A Figura 14 ilustra uma sequência de métodos recomendada no processo de revelação de IDs latentes em superfícies porosas.



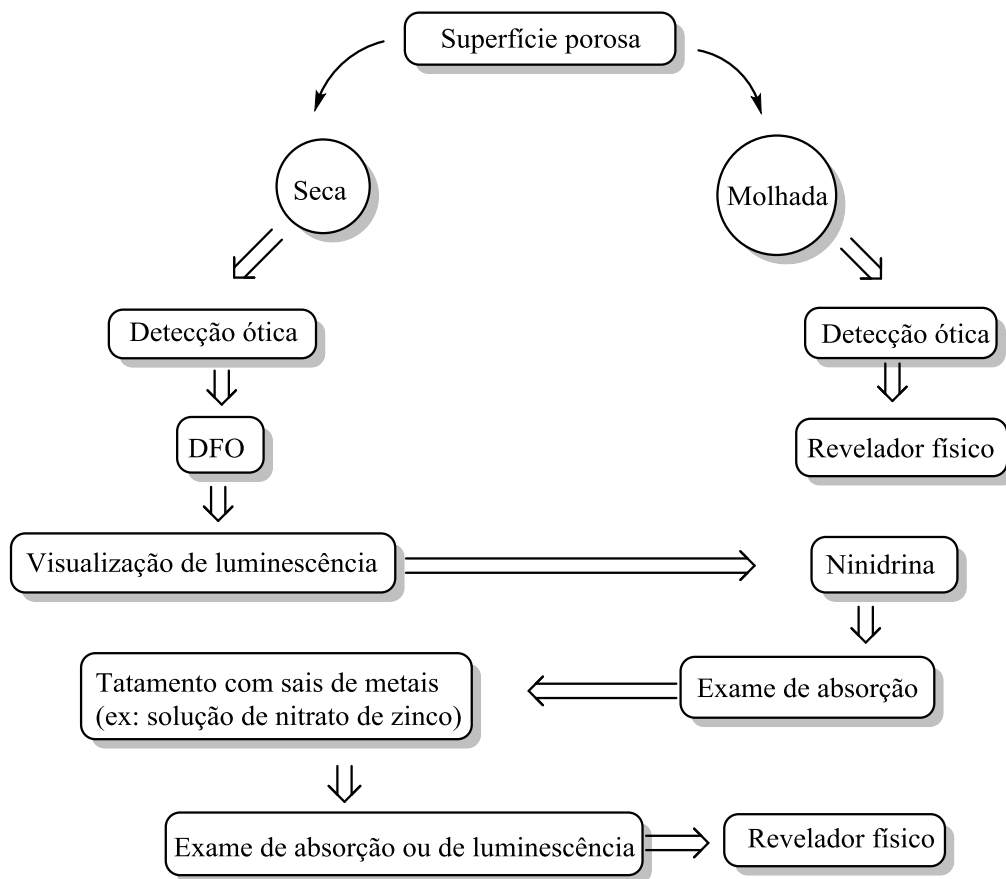


Figura 14. Sequência de métodos recomendada no processo de revelação de impressões digitais em superfícies porosas secas e molhadas (ex: papel, cartão, etc.).

### 3.6.2. Métodos para Revelação de Impressões Digitais em Superfícies Não Porosas

#### 3.6.2.1. TÉCNICA DO PÓ

A técnica do pó é uma ferramenta tradicionalmente usada na revelação de impressões digitais em superfícies não porosas. Ela é usada geralmente na cena do crime para revelação de IDs em superfícies fixas ou objetos que não podem ser facilmente transportados para laboratórios. Trata-se de um processo físico em que as partículas do pó aderem à umidade, substâncias pegajosas ou gordurosas constituintes de IDs. O processo de aplicação do pó é relativamente simples e de baixo custo, contudo, requer alguma experiência prática para se obter resultados satisfatórios. As impressões digitais latentes reveladas com pó podem ser retiradas usando fitas adesivas ou géis. Apesar dessas vantagens, a técnica de pó só pode ser aplicada em IDs relativamente novas. Isto deve-se ao fato de que com o tempo, as IDs secam ou perdem substâncias pegajosas. Além disso, as superfícies que apresentam elevada

aderência a pós ou que absorvem rapidamente os resíduos de IDs não são adequadas. Esta técnica tem sido usada desde início de 1900 e, desde então, muitas formulações têm sido desenvolvidas para superfícies específicas e com coloração que permite alto contraste com as superfícies. <sup>[78]</sup> Dentre os corantes mais usados, tem-se os óxidos metálicos, sulfitos e os carbonatos, oferecendo uma larga faixa de cores possíveis para diferentes aplicações.

O uso de pós fluorescentes, caracterizados por apresentar luminescência sob luz UV, tem a vantagem de revelar superfícies refletivas ou multicolor onde o contraste pode ser um problema para aplicação com pós convencionais. No entanto a escolha dos pós fluorescentes adequados para uma determinada superfície vai depender da própria natureza da superfície do objeto a ser revelado e da experiência e conhecimento do profissional.

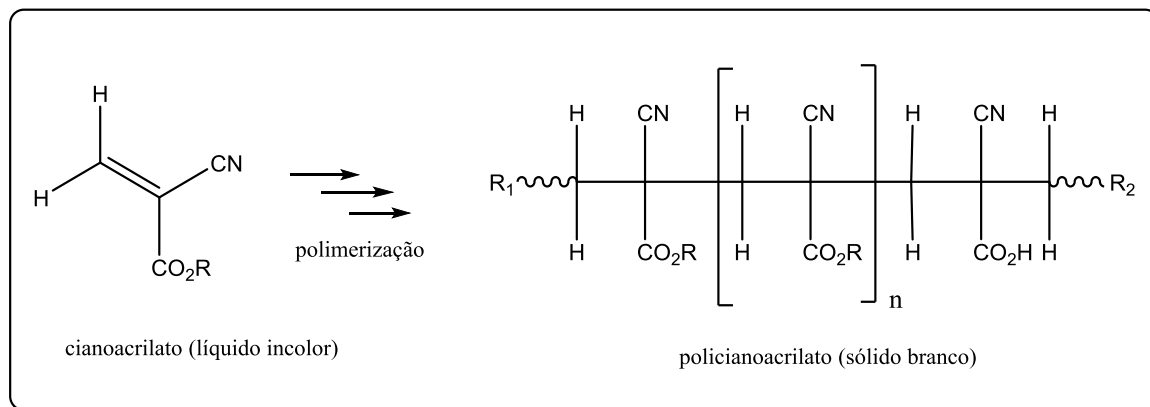
Os pós magnéticos são as últimas apostas feitas neste campo, com potencial para ser uma técnica eficiente na revelação de impressões digitais latentes frágeis, onde a aplicação de pós convencionais poderiam destruir as impressões digitais. <sup>[104]</sup> No entanto, a técnica é de difícil aplicação em superfícies verticais. Estes pós geralmente são obtidos pela mistura de partículas de ferro com alumínio ou cobre em pó, e são aplicados com auxílio de uma varinha magnética. Atualmente existem inúmeras formulações desenvolvidas e comercialmente disponíveis. <sup>[105]</sup> Mais recentemente, foi relatado um novo método em uma patente, <sup>[106]</sup> em que se utiliza nanopartículas de sílica para detecção e visualização de impressões digitais latentes.

### **3.6.2.2. MÉTODO DE CIANOACRILATO (VAPORIZAÇÃO)**

Os ésteres de cianoacrilatos são monômeros incolores que se apresentam na forma líquida, comercialmente vendidos como “supercola”. Estes monômeros quando aquecidos formam vapores que reagem com certos componentes écrinos e sebáceos de impressões digitais latentes. Os vapores são seletivamente polimerizados nas cristas papilares para formar um polímero rígido e branco, conhecido como policianoacrilato, Esquema 13. <sup>[91]</sup> O mecanismo envolvido na formação desse polímero é bastante complexo e se encontra descrito em Anexo 1 ( página 121).

As impressões digitais ricas em componentes sebáceos são geralmente muito sensíveis ao vapor de cianoacrilato, embora o vapor também reaja com misturas e alguns componentes solúveis em água (écrinas) presentes nas IDs latentes. Este método foi desenvolvido pela

Divisão de Identificação Criminal da Agência de Polícia Nacional Japonesa em 1978. [78] Desde então o cianoacrilato (CA) tem se tornado uma ferramenta largamente usada em laboratórios na revelação de impressões digitais em superfícies não porosas.



Esquema 13. Reação de polimerização de cianoacrilato na formação do polímero rígido e esbranquiçado conhecido como policianoacrilato.

Atualmente vários métodos de tratamento de IDs latentes com CA têm sido propostos e comercializados. [107,108,109] O sistema de processamento do método pode ser facilmente construído e de baixo custo. Este geralmente consiste numa câmara (ex: aquário de vidro) que deve ser selado de modo a reter todo o vapor de cianoacrilato produzido pelo aquecimento. A fonte de aquecimento pode ser um ferro de solda modificado, uma chapa elétrica, ou uma lâmpada. É importante que a umidade do meio seja suficiente de modo a garantir uma boa eficiência na revelação de IDs. Neste caso, um recipiente de água pode ser colocado no interior da câmara de modo a fornecer umidade necessária. O objeto a ser processado pode ser suspenso ou colocado dentro da câmara, e uma pequena quantidade de cianoacrilato (*Super-Bonder*<sup>®</sup> ou de outra marca) é aquecida em torno de 80 a 100 °C de modo a produzir a quantidade de vapores necessária.

As câmaras comerciais apresentam vantagem em relação aos sistemas caseiros, tais como melhor controle da temperatura e melhor eficiência na circulação dos vapores, levando a uma melhor revelação. Também, o fato de facilitar a retirada de todos vapores da câmara quando terminado o processo de revelação, minimiza a exposição do profissional aos vapores de cianoacrilato. Os vapores de cianoacrilato são classificados como irritantes aos olhos e aos sistemas respiratórios, além de altamente alergênicos, de modo que a exposição deve ser

minimizada. Além disso, o cianoacrilato quando aquecido a temperaturas elevadas (acima de 205 °C) leva a formação do gás cianeto de hidrogênio que é extremamente tóxico. <sup>[110]</sup>

#### **3.6.2.2.1. Aprimoramento do Contraste das Impressões Digitais Latentes Processadas com Cianoacrilato**

O contraste produzido pelas impressões digitais processadas com cianoacrilato (CA) pode ser aprimorado com aplicação de um composto colorido ou luminescente, geralmente designado de corante. Para se obter bons resultados com estes corantes é necessário que o processamento com CA seja rigorosamente controlado de modo a evitar a exposição excessiva do objeto com os vapores de cianoacrilato. Além disso, as impressões digitais latentes processadas com CA devem ser deixadas 24 horas antes da aplicação da solução de corante de modo a garantir a rigidez do polímero produzido nas cristas de IDs e, assim, evitar que ele seja retirado no processo de lavagem (remoção do excesso do corante na superfície do objeto). A escolha do corante dependerá da cor e das propriedades luminescentes das superfícies a ser processadas. É sempre aconselhável testar um determinado corante numa superfície similar a da evidência antes de prosseguir com o processo de revelação.

Compostos coloridos, tais como violeta genciana, podem ser usados no aprimoramento de impressões digitais processadas com CA, entretanto, o seu uso é geralmente restrito a superfícies ligeiramente coloridas. O uso de corantes luminescentes é o mais indicado para superfícies não luminescentes. Além disso, o processo é mais sensível e pode produzir resultados em superfícies escuras e multicoloridas. No entanto, o uso de corantes luminescentes requer o uso de fonte de luz apropriada para visualizar a luminescência. Os corantes luminescentes mais comumente aplicados no aprimoramento de impressões digitais processadas com CA incluem a Rodamina 6G, <sup>[111,112]</sup> Ardrex 970-P10, <sup>[102,113,114]</sup> e o Amarelo 40 básico. <sup>[103,115]</sup>

O processamento para revelação de impressões digitais em superfícies não-porosas usando cianoacrilato e pó pode se dar como ilustrado na Figura 15. <sup>[91]</sup>

### Sequência de Métodos Recomendada no Processo de Revelação de Impressões Digitais em Superfícies Não Porosas

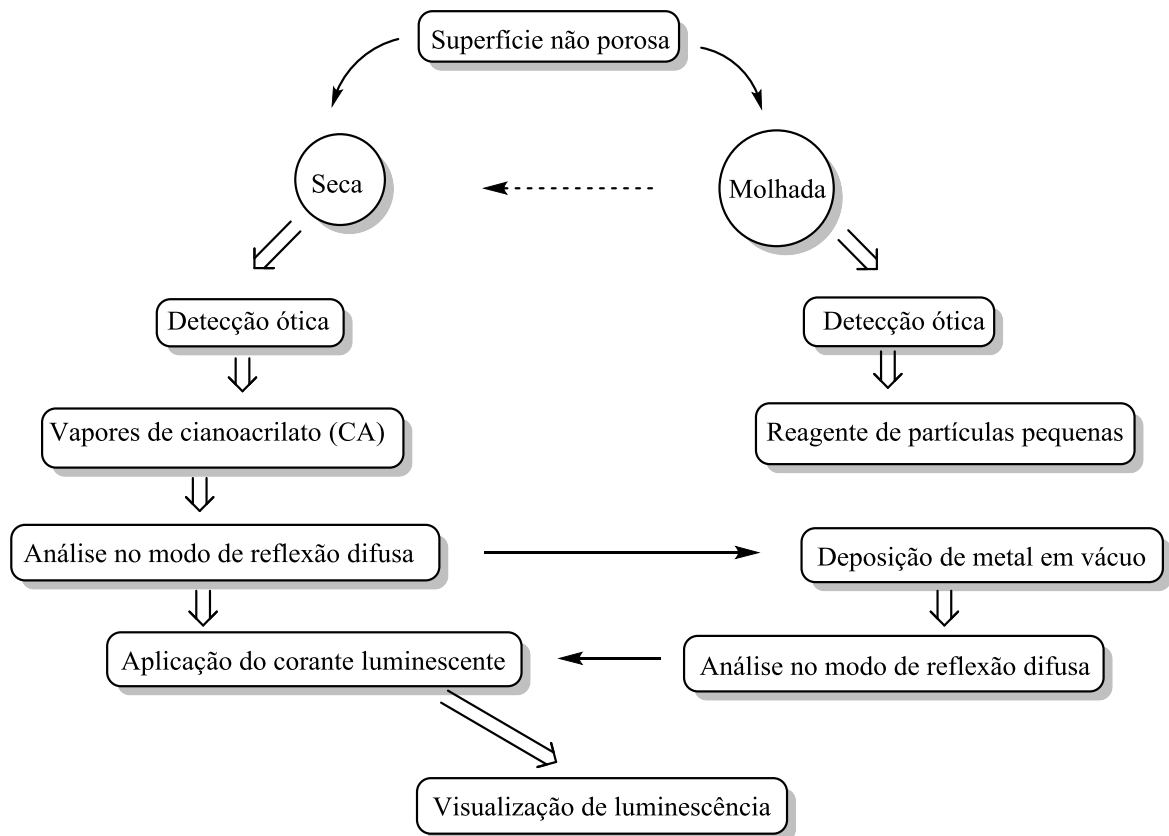


Figura 15. Sequência de métodos recomendada no processo de revelação de impressões digitais latentes em superfícies não porosas, secas e molhadas (ex: plásticos, vidros, etc.). As superfícies molhadas podem ser secadas a temperatura ambiente.

#### 3.6.3. Métodos de Revelação de Impressões Digitais Latentes em Superfícies Adesivas

As superfícies adesivas, tais como fitas adesivas, possuem características relevantes para revelação de impressões digitais latentes. Uma delas é a natureza receptiva que permite que os resíduos de IDs sejam retidos quando estas superfícies são tocadas pelas cristas papilares. Além disso, é difícil manipular fitas adesivas quando se usa luvas, levando com que o manuseio das mesmas, por exemplo durante um crime, seja geralmente efetuado com as mãos desprotegidas, fazendo com que o criminoso acabe deixando suas impressões digitais. Esta característica das superfícies adesivas faz com que as fitas adesivas se tornem evidências importantes para elucidação de um crime.

Atualmente um número elevado de métodos têm sido proposto para revelação de IDs em superfícies adesivas,<sup>[116,117,118]</sup> sendo que a mais eficiente até agora é a violeta de cristal, também conhecida por violeta genciana, contudo ela possui algumas limitações, tais como baixa seletividade e não é comumente aplicada em superfícies escuras devido a sua cor escura.

Uma das grandes dificuldades de revelação de IDs em superfícies adesivas deve-se ao fato de que tais superfícies, muitas vezes, se encontram aderidas a outras superfícies ou a si mesma e precisam ser separadas, o que acaba muitas vezes por destruir as IDs latentes.

### **3.6.3.1. VIOLETA GENCIANA**

A violeta genciana, também conhecida por violeta de cristal é um corante que interage com a parte gordurosa das impressões digitais. É comumente usada na revelação de impressões digitais latentes em superfícies adesivas, tais como *Sellotape*, fita adesiva de papel, e fita isolante de PVC. O método consiste em processar a fita adesiva com a solução de corante (violeta genciana), contendo fenol que facilita a absorção do corante pelas substâncias sebáceas constituintes das IDs. O tratamento pode ser efetuado por imersão ou flutuação da fita adesiva em solução de corante, ou ainda por aplicação da solução de corante sobre a fita com auxílio de pipeta. O excesso de corante é removido da superfície da fita por lavagem com água. O resultado é um produto de cor púrpura que permite o contraste e a visualização de IDs. O grau de coloração do fundo da superfície é dependente da natureza da fita adesiva e dos contaminantes presentes.

A solução de corante deve ser manipulada usando luvas adequadas e o processo conduzido dentro de um exaustor pelo fato do fenol ser considerado altamente carcinogénico e tóxico. Outras formulações do corante sem o uso do fenol têm sido propostas, mas com resultados menos eficientes.<sup>[119,120]</sup> A Figura 16 ilustra uma sequência de métodos recomendada no processo de revelação de IDs latentes em superfícies adesivas.<sup>[91]</sup>

## Sequência de Métodos Recomendada no Processo de Revelação de Impressões Digitais em Superfícies Adesivas

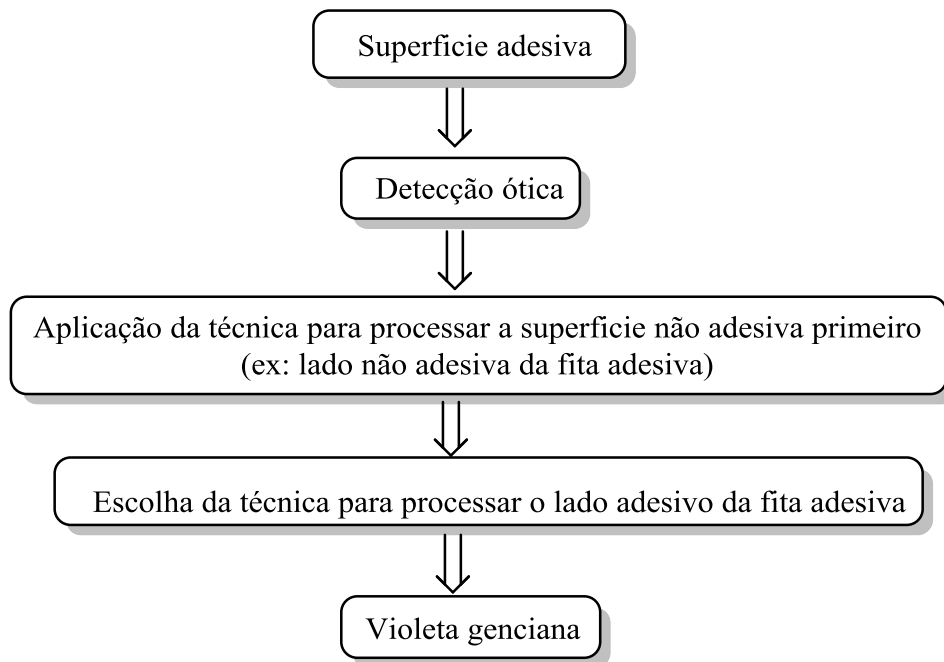
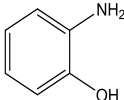
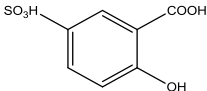
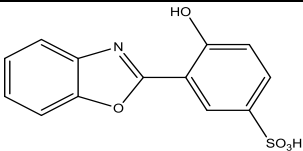
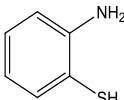
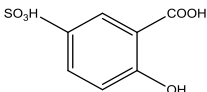
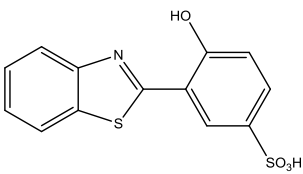
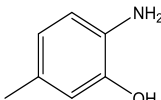
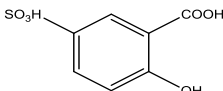
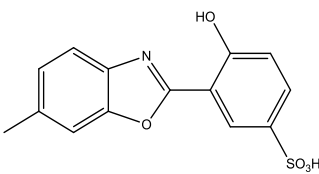
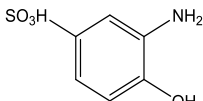
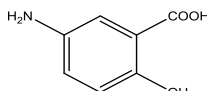
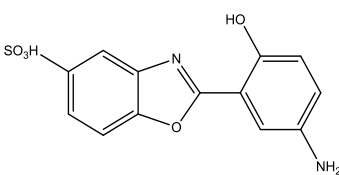
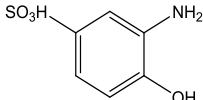
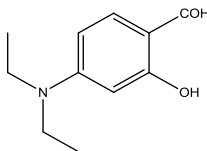
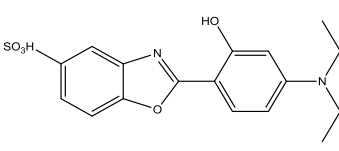


Figura 16. Sequência de método recomendada no processo de revelação de impressões digitais latentes em superfícies adesivas (ex: fitas adesivas).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A síntese dos novos derivados benzazólicos fluorescentes do presente trabalho foi efetuada aplicando o método de Hein.<sup>[9]</sup> O método consiste na condensação de derivados de anilinas *orto*-substituídas com ácido salicílico substituído. Os dados relevantes das condições sintéticas se encontram sumarizados na Tabela 5. Os detalhes das reações se encontram na parte experimental.

Tabela 5. Síntese de derivados benzazólicos HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13.

Designação	Derivados anilinas substituídas	Ácidos salicílicos substituídos	Produto	Tempo (Horas) <sup>a</sup>	Rendimento (%) <sup>b</sup>	mp (°C) <sup>c</sup>
<b>HB-6</b>				4	54	> 300
<b>HB-7</b>				1.5	71	157- 160
<b>HB-9</b>				4	16	136- 137
<b>HB-11</b>				5	54	> 300
<b>HB-13</b>				6	65	248 (dec) <sup>d</sup>

Condições reacionais: reação na presença de ácido polifosfórico, <sup>a</sup> tempo de reação, <sup>b</sup> rendimento do produto isolado, <sup>c</sup> todos os produtos são sólidos.



## 4.1. Caracterização Espectroscópica dos Derivados Benzazólicos Fluorescentes Sintetizados

### 4.1.1. Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros de absorção na região do infravermelho serviram para investigar a presença de vibrações de ligações específicas das moléculas, isto é, identificar determinados grupos funcionais da molécula.

A Tabela 6 mostra os dados relevantes de frequências observadas para os principais grupos funcionais encontrados nos derivados benzazólicos sintetizados.

Tabela 6. Dados relevantes de frequências observadas para os derivados benzazólicos sintetizados.

Produto	OH, OH*, NH (cm <sup>-1</sup> )	C=C (cm <sup>-1</sup> )	C-N (cm <sup>-1</sup> )	C-O-C (cm <sup>-1</sup> )	S=O (cm <sup>-1</sup> )
<b>HB-6</b>	3000-3500	1650	-	1250	1040
<b>HB-7</b>	3500	1625	1300	1250	1040
<b>HB-9</b>	3330, 3000	1550	1300	1250	1040
<b>HB-11</b>	3400	1625	1300	1250	1040
<b>HB-13</b>	3400	1600	1350	1250	1040

\* Proveniente do grupo sulfônico.

Como era de se esperar, os espectros dos derivados benzazólicos são bastante parecidos ( Anexo 2, página 122). As regiões abaixo de 1750 cm<sup>-1</sup> mostram picos afilados, característicos de moléculas insaturadas.

Tomando como exemplo o composto HB-6 (Figura 17), o perfil esperado para a região em torno de 3000 cm<sup>-1</sup> seria uma banda característica do estiramento O-H de moléculas que apresentam ligações intramoleculares como o caso dos derivados benzazólicos que propiciam mecanismo de ESIPT. Em função da ligação intramolecular, a banda correspondente ao estiramento O-H se desloca para frequências menores àqueles em que geralmente aparecem, 3500 - 3700 cm<sup>-1</sup>. Entretanto, A presença de grupo hidroxilo do agrupamento sulfônico faz com que o perfil da banda que se observa seja largo, em torno de 3000 - 3500 cm<sup>-1</sup>. Além disso, esta banda larga abrange os sinais referentes ao estiramento da ligação C-H simétrico de carbonos sp<sup>2</sup>.

O sinal em 1550 - 1650  $\text{cm}^{-1}$  representa o estiramento das ligações C=C do anel aromático, que aparecem em frequências inferiores às frequências normais quando a conjugação é aumentada ( $1600 \text{ cm}^{-1}$ ).

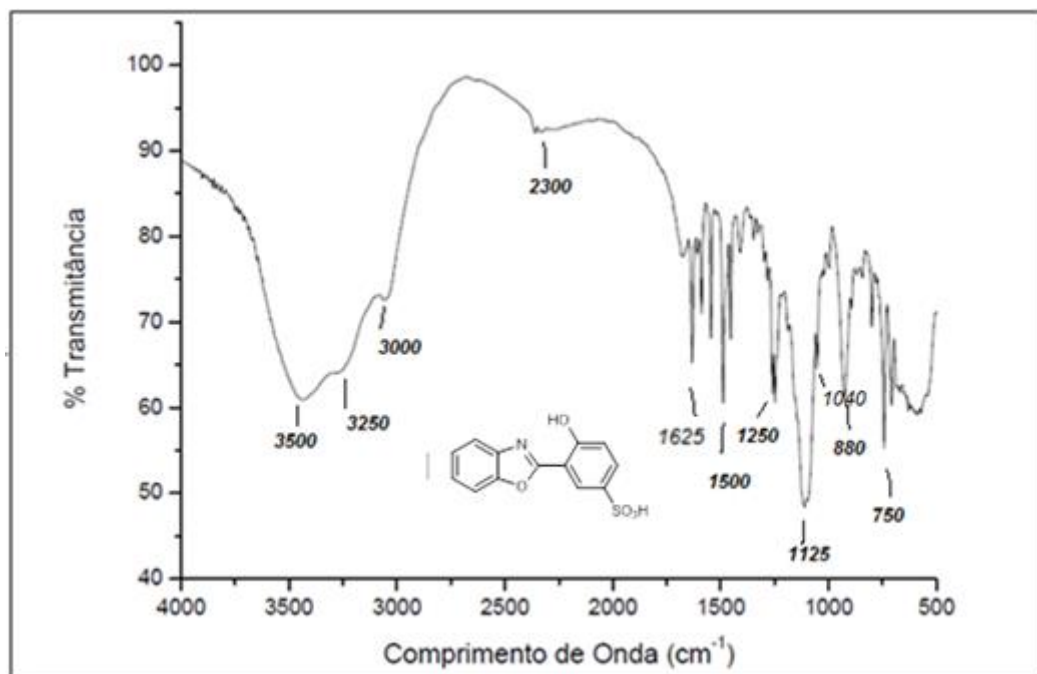


Figura 17. Espectro de infravermelho do composto HB-6.

Os sinais ligeiramente abaixo de  $3000 \text{ cm}^{-1}$  nos espectros de HB-9 e HB-13 representam o estiramento simétrico e assimétrico da ligação C-H do carbono  $\text{sp}^3$ .

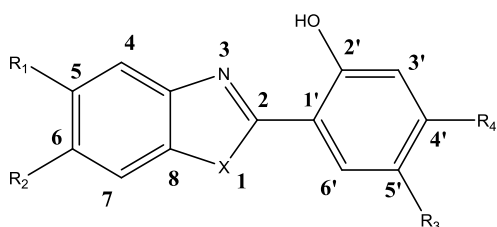
O sinal intenso que aparece a  $1040 \text{ cm}^{-1}$  em todos os espectros representa a vibração da ligação S=O do grupo sulfônico.

No espectro de HB-11 como era de se esperar, o estiramento  $\text{NH}_2$  primário é observado a  $1625 \text{ cm}^{-1}$  e a banda de Fermi de deformação de  $\text{NH}_2$  se encontra sobreposta com as demais na banda larga em  $3400 \text{ cm}^{-1}$ .

As bandas harmônicas dos aromáticos são observadas na região entre  $2000\text{-}1700 \text{ cm}^{-1}$ , sendo que a sua ocorrência nas moléculas é confirmada pelos sinais de intensidade média na região entre  $900 \text{ e } 650 \text{ cm}^{-1}$ .

#### 4.1.2. Caracterização por Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

Os dados referentes aos espectros de ressonância magnética nuclear estão representados na parte experimental e nos anexos 4 - 5.



**HB-6**, X= O, R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= SO<sub>3</sub>H, R<sub>4</sub>= H

**HB-7**, X= S, R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= SO<sub>3</sub>H, R<sub>4</sub>= H

**HB-9**, X= O, R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= CH<sub>3</sub>, R<sub>3</sub>= SO<sub>3</sub>H, R<sub>4</sub>= H

**HB-11**, X= O, R<sub>1</sub>= SO<sub>3</sub>H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= NH<sub>2</sub>, R<sub>4</sub>= H

**HB-13**, X= O, R<sub>1</sub>= SO<sub>3</sub>H, R<sub>2</sub>= H, R<sub>3</sub>= H, R<sub>4</sub>= N(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)

Para todos os produtos sintetizados não foi possível observar nos espectros de <sup>1</sup>H-RMN o singlete correspondente ao hidrogênio da hidroxila fenólica devido, provavelmente a troca do próton com o solvente.

Os deslocamentos químicos dos hidrogênios aromáticos são semelhantes para os derivados HB-6 e HB-7. Ambos apresentam o sistema ABCD, correspondente aos hidrogênios H<sub>4</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6</sub> e H<sub>7</sub>, e o sistema ABX correspondente aos hidrogênios H<sub>3'</sub>, H<sub>4'</sub> e H<sub>6'</sub>. Tomando o derivado HB-7 como exemplo (Figura 18), pode-se observar claramente os dois sistemas, ABCD e ABX.

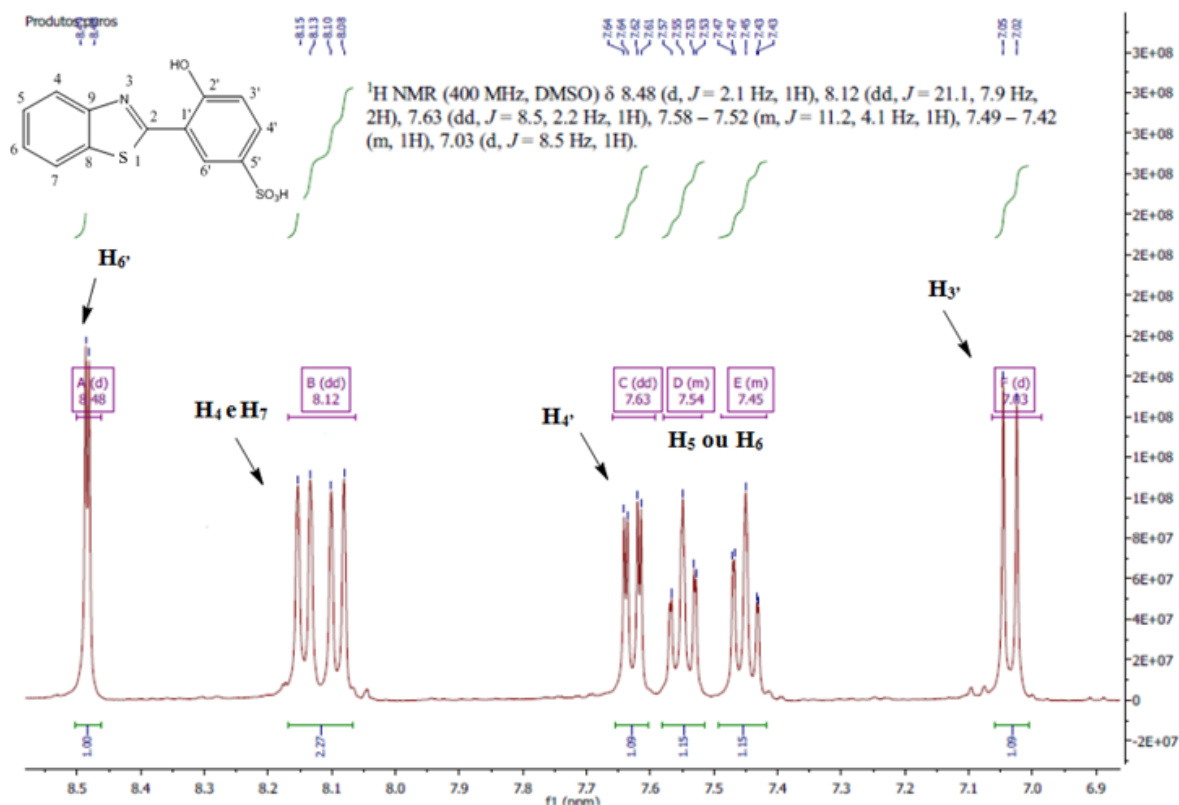


Figura 18. Expansão da região aromática do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-7.

Os sinais referentes aos hidrogênios  $\text{H}_4$  e  $\text{H}_7$  saem muito próximos em 8.12 ppm como dois dubletes devido ao acoplamento com os hidrogênios  $\text{H}_5$  e  $\text{H}_6$ , respetivamente. Os sinais referentes aos hidrogênios  $\text{H}_5$  e  $\text{H}_6$  já saem mais afastados e numa zona mais blindada, entre 7.54 - 7.45 ppm como multiplete. Em 8.48 ppm sai o duplete correspondente ao hidrogênio  $\text{H}_6'$  com uma constante de acoplamento *meta* de 2.1 Hz devido ao acoplamento com o hidrogênio  $\text{H}_4'$ . O hidrogênio  $\text{H}_4'$  por sua vez aparece como um duplo duplete devido ao acoplamento com o hidrogênio  $\text{H}_6'$ , com uma constante de acoplamento *meta* de 2.2 Hz, e com o hidrogênio  $\text{H}_3'$  com *Jorto* de 8.5 Hz. O hidrogênio  $\text{H}_3'$  sai como um duplete com uma constante de deslocamento grande devido ao acoplamento *orto* de 8.5 Hz com o hidrogênio  $\text{H}_4'$ . A integração dos sinais coincide com o número de hidrogênios aromáticos da molécula como era de se esperar.

Nos espectros de  $^1\text{H}$ -RMN dos compostos HB-9 e HB-13, para além dos sinais referentes ao sistema ABX dos hidrogênios aromáticos, também se observa os sinais dos hidrogênios alifáticos ligados aos anéis aromáticos. No espectro do composto HB-9 sai um singlete a 2.5 ppm referente ao hidrogênio do grupo metila ligado ao anel aromático. Já no

espectro do composto HB-13 sai sinais referentes aos hidrogênios dos carbonos primários e secundários dos grupos etilas a 1.5 ppm (triplete) e 2.5 ppm (quarteto), respectivamente.

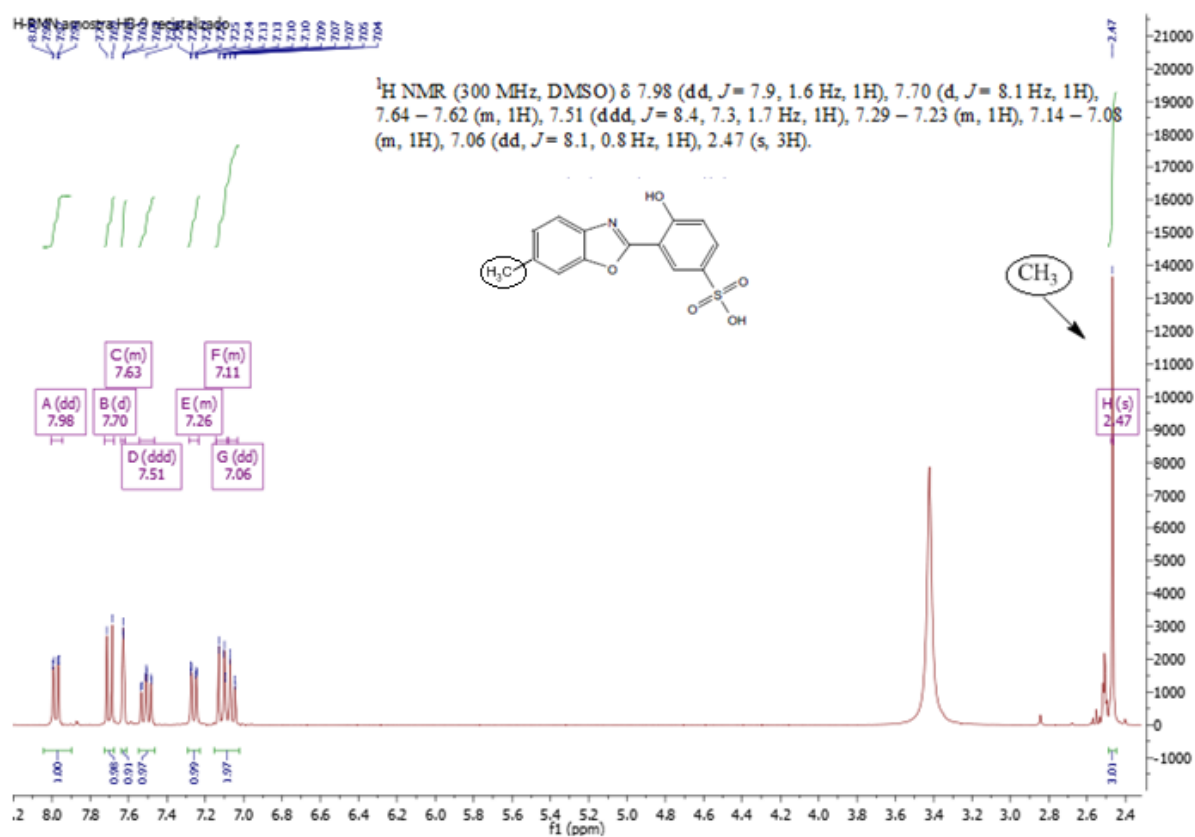


Figura 19. Espectro de <sup>1</sup>H-RMN do composto HB-9.

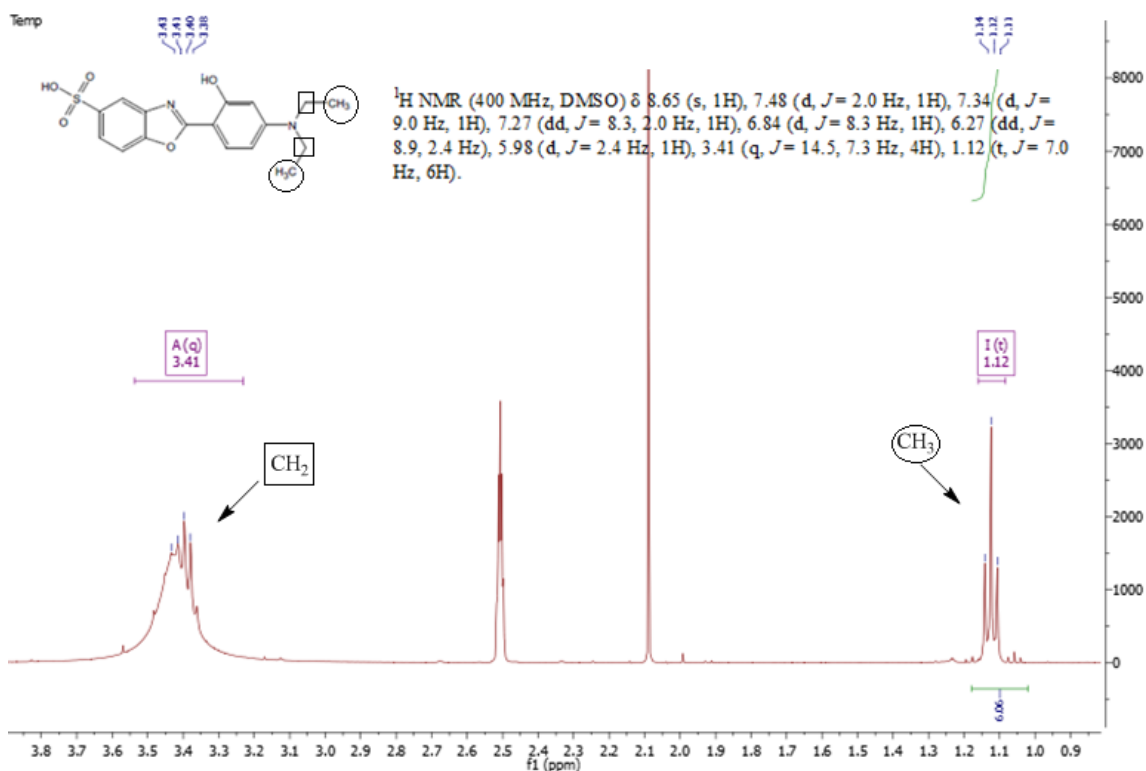


Figura 20. Expansão da região alifática do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-13.

Quanto aos espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN APT foi possível atribuir a identidade dos carbonos com base em estudo bidimensional (HECTOR) descrito na literatura <sup>[121]</sup> e com auxílio de *software* de simulação de espectros (*ChemBioDraw Ultra*). Um espectro de HECTOR baseia-se na correlação heteronuclear, isto é, correlação dos sinais de  $^1\text{H}$  com os sinais de  $^{13}\text{C}$ .

Tomando novamente o derivado HB-7 como exemplo (Figura 21), o primeiro sinal voltado para baixo é atribuído ao carbono  $\text{C}_3'$  em 116 ppm. Os carbonos  $\text{C}_4$  e  $\text{C}_7$  saem próximos em 122 ppm, do mesmo modo que os hidrogênios  $\text{H}_4$  e  $\text{H}_7$  saem próximos no espectro de  $^1\text{H}$ -RMN. Os carbonos  $\text{C}_5$  e  $\text{C}_6$  assemelham-se quimicamente e saem próximos em 125 e 126 ppm, respectivamente. O carbono  $\text{C}_6'$  sai a 126 ppm e o carbono  $\text{C}_4'$  sai numa zona mais desblindada devido ao efeito de ressonância e efeito indutivo do grupo eletroatrator (grupo sulfônico), saindo a 130 ppm.

No mesmo espectro sai voltado para cima os sinais referentes aos carbonos que não se encontram ligados a nenhum hidrogênio. O primeiro sinal a 117 ppm é referente ao carbono  $\text{C}1'$ , e deslocado para a zona mais desblindada sai os sinais a 134, 140 e 142 correspondentes aos carbonos  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_5'$  e  $\text{C}_9'$ , respectivamente. Os carbonos  $\text{C}_2'$  e  $\text{C}_2$  sai muito desblindados pelo fato de estarem ligados diretamente a átomos eletronegativos. O átomo de  $\text{C}_2'$  se encontra

ligado diretamente ao átomo de oxigênio e sai com um deslocamento químico de 152 ppm e o átomo C<sub>2</sub> se encontra ligado diretamente a dois átomos eletronegativos, nitrogênio e enxofre, aparecendo a 164 ppm.

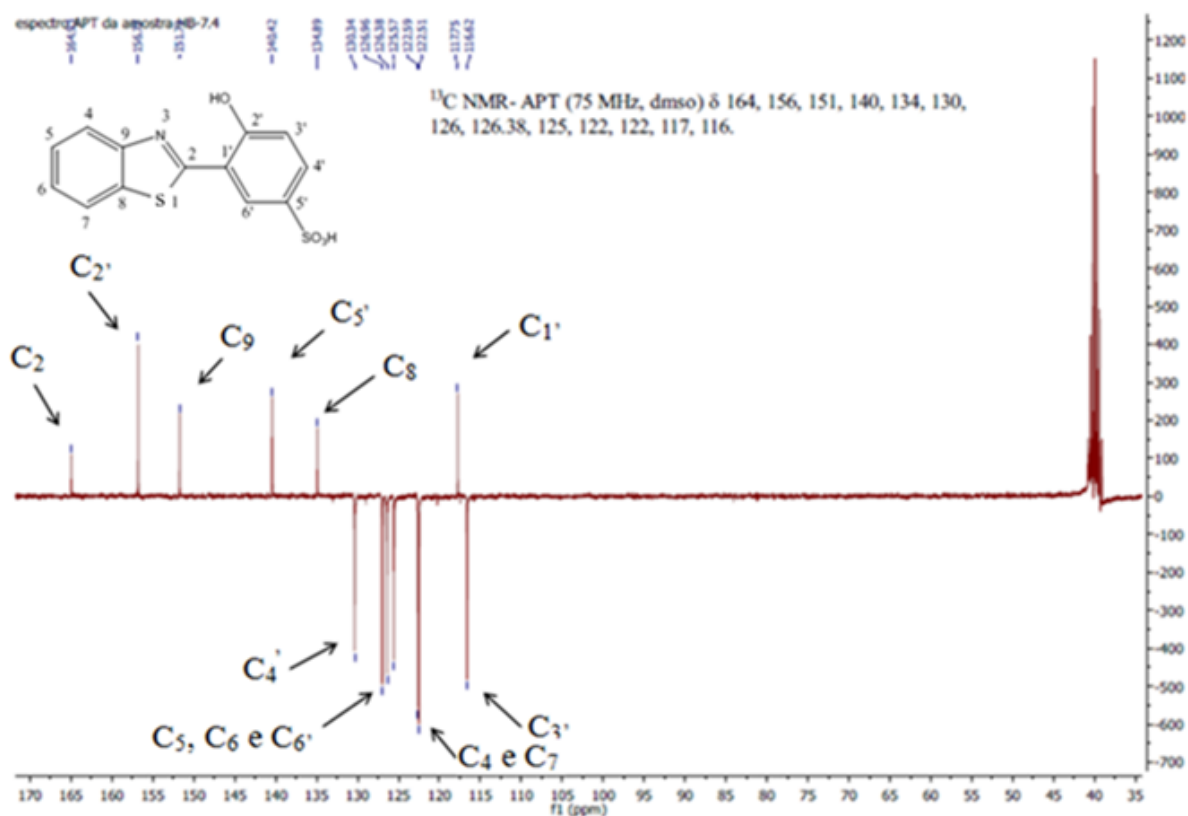


Figura 21. Espectro de <sup>13</sup>C-RMN APT do composto HB-7.

Nos espectros de <sup>13</sup>C-RMN APT dos compostos HB-9 (Figura 22) e HB-13 (Figura 23) para além dos sinais referentes aos carbonos dos anéis aromáticos, também se observa os sinais dos grupos alifáticos ligados aos anéis aromáticos. No espectro do composto HB-9 sai um sinal a 21 ppm referente ao grupo metila ligado ao anel aromático. Já no espectro do composto HB-13 sai sinais referentes aos carbonos primários e secundários dos grupos etilas a 13 e 44 ppm, respetivamente.

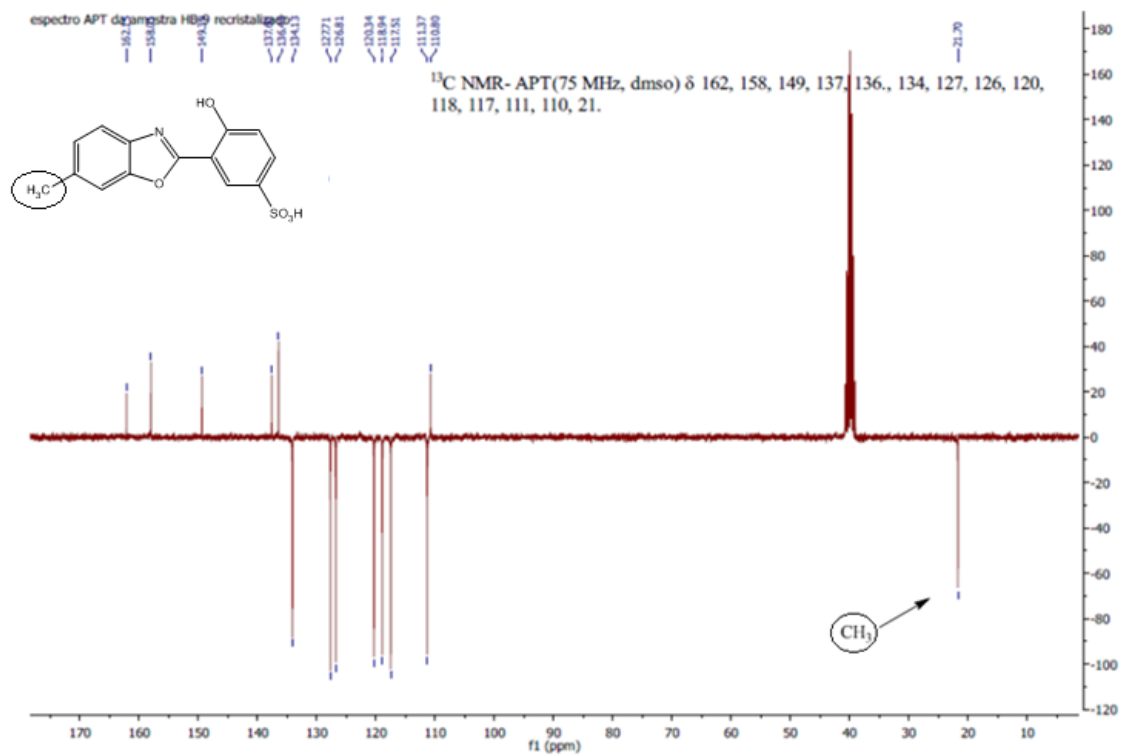


Figura 22. Espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN APT do composto HB-9.

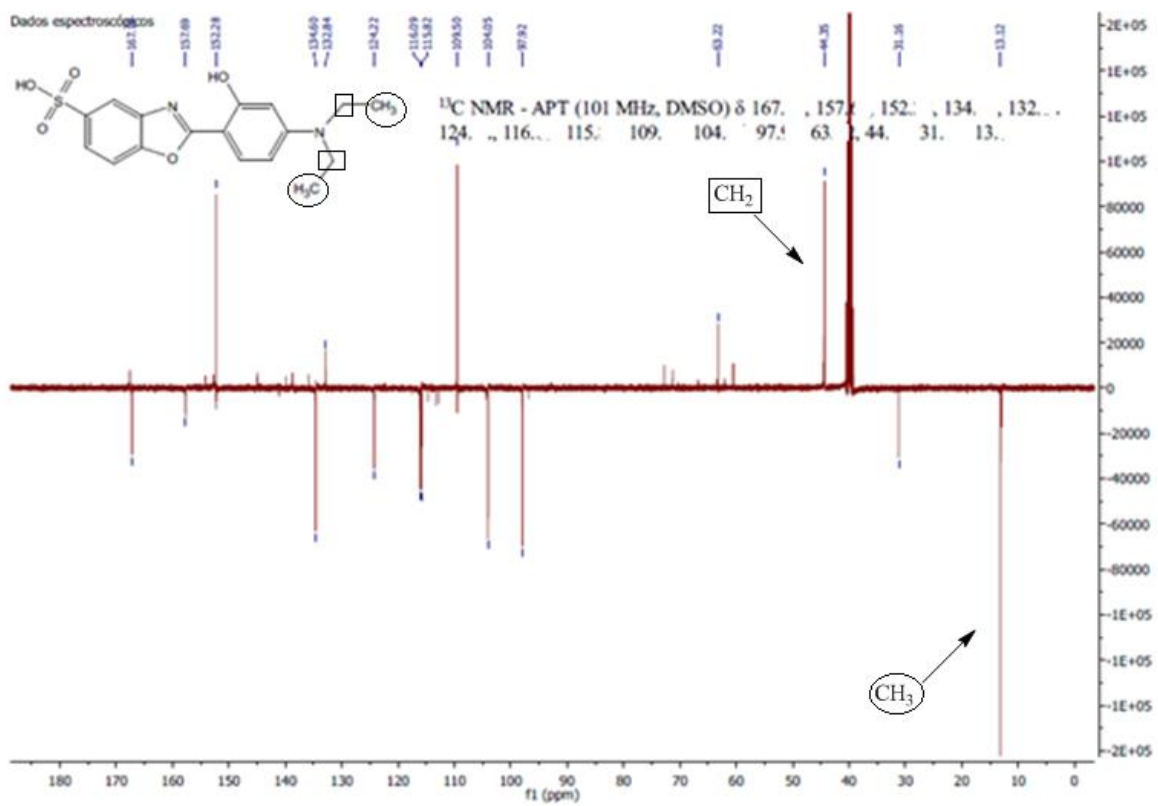


Figura 23. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN APT do composto HB-13.



### 4.1.3. Caracterização por Espectrometria de Massa

Nos espectros de massa foi possível identificar alguns picos resultantes da fragmentação das moléculas (Anexo 5, página 121). Tomando como exemplo o espectro de massa do composto HB-7 foi possível identificar o pico intenso de  $m/z$  227 correspondente a perda do íon sulfônico (perda de  $\text{SO}_3^-$ ). O pico de  $m/z$  199 (-  $\text{CO}_2$ ) e  $m/z$  173 (-  $\text{CH}_2=\text{CH}_2$  ou fragmento positivo de  $\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_4\text{S}$ ). Neste caso não aparece o pico referente ao íon molecular.



Figura 24. Espectro de massa do composto HB-7.

Já o espectro de massa do composto HB-11 apresenta o pico base referente ao íon molecular protonado ( $\text{MH}^+$ ) de  $m/z$  307, bem como os picos correspondentes a perda de fragmentos, tais como o pico de  $m/z$  290 resultante da perda do grupo hidroxilo (- OH),  $m/z$  279 (- C=O),  $m/z$  227 (-  $\text{SO}_3^-$ ) e  $m/z$  198 (-  $\text{C}_7\text{H}_3\text{O}_4\text{NS}$ ).

No espectro de massa do composto HB-13 é possível identificar o pico de  $m/z$  198 correspondente a perda do grupo (-  $\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_4\text{NS}$ ),  $m/z$  169 resultante da perda do grupo anterior seguido da perda do grupo (- $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), e  $m/z$  155 resultante da perda do átomo de nitrogênio a partir da última fragmentação.

#### 4.1.4. Caracterização por Absorção UV-Visível e Emissão de Fluorescência

Os espectros de absorção UV-Visível e de emissão dos derivados HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13 foram efetuados em solventes de diferentes polaridades e estão representados na Figura 25. Os dados relevantes se encontram sumarizados na Tabela 7. O comprimento de onda do máximo de absorção desses corantes apresenta pouca dependência da polaridade do solvente, isto é, o efeito solvatocrômico quase não se verifica, exceto para o corante HB-13. Este mostra um comportamento fotofísico com maior dependência da polaridade do solvente, com os máximos de absorção em variando entre 313 a 423 nm para diferentes solventes, respectivamente, devido ao efeito indutivo e de ressonância do grupo substituinte dietilmina ser maior na posição 4 em relação aos outros substituintes em outras posições. Os valores de coeficiente de absorvidade molar ( $\epsilon$ ) estão de acordo com a transição  $\pi$ - $\pi^*$ .

Os espectros de emissão de fluorescência foram obtidos usando o comprimento de onda do máximo de absorção para excitação. Os dados relevantes estão sumarizados na Tabela 7. Como era de se esperar, os compostos que exibem ESIPT, como é o caso desses derivados sintetizados, podem apresentar dupla emissão de fluorescência dependendo do solvente, uma vez que o mecanismo de ESIPT é bastante dependente da polaridade do solvente.<sup>[51]</sup> Geralmente, a dupla emissão apresenta uma banda de maior comprimento de onda atribuída à emissão por parte da forma *cis*-ceto excitada ( $K^*$ ) (banda ESIPT), resultante da transferência protônica intramolecular da forma *cis*-enol no estado excitado ( $E^*$ ). Uma banda mais deslocada para o azul (hipsocrômica) é devido a emissão por parte da forma *cis*-enol excitada ( $E^*$ ) (banda normal) ou de outras formas conformacionais que são estabilizadas em solução.

O derivado **HB-6** apresenta em água uma banda principal a 470 nm atribuída à forma ceto (banda ESIPT) com maior intensidade e uma banda adicional (banda normal) de menor intensidade, atribuída à forma enol, mais deslocada para o azul, localizada a 365 nm. É importante salientar que as intensidades dessas bandas de emissão são alteradas em metanol, etanol e acetato de etila, tendo a banda ESIPT (421, 526 e 510 nm, respectivamente) aparecido com menor intensidade em relação a banda normal (365, 429 e 426 nm, respectivamente) devido ao fato de ocorrer menor conversão da forma enol na forma ceto nesses solventes.

O derivado **HB-7** apresenta comportamento fotofísico parecido com HB-6 em água e metanol. No entanto, a intensidade da banda ESIPT é mais intensa que a banda normal em

etanol e localiza-se em 503 e 424 nm, respectivamente. Em acetato de etila aparece uma única banda a 464 nm atribuída à banda ESIPT.

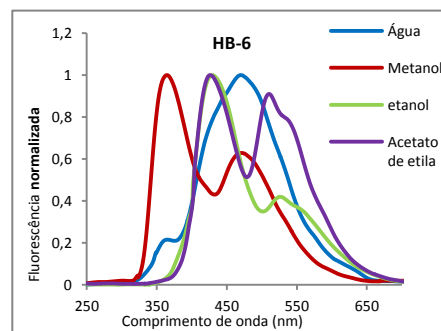
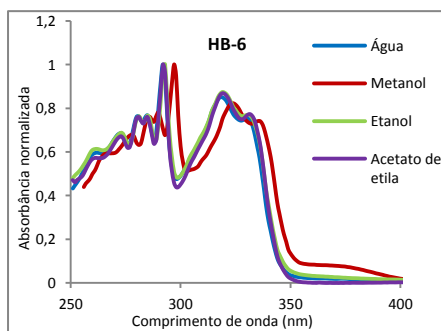
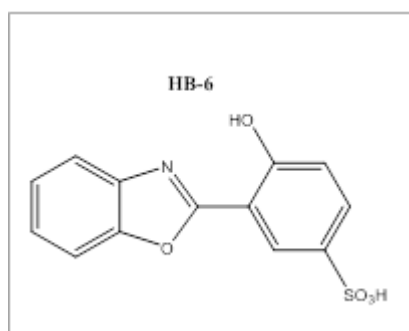
O derivado **HB-9** apresenta a banda principal (a mais intensa) atribuída à banda ESIPT a 499, 473, e 508 nm para água, metanol e acetato de etila, respectivamente, e a banda mais deslocada para a azul (menos intensa) atribuída a banda normal a 423, 366 e 425 nm, respectivamente. Em etanol a intensidade da banda ESIPT (495 nm) e a banda normal (430 nm) alteram-se de intensidade, passando a banda normal a apresentar maior intensidade que a banda ESIPT.

O derivado **HB-11** apresenta a banda de maior intensidade atribuída a banda ESIPT a 447, 511 e 489 nm e as bandas normais, mais deslocadas para o azul, a 360, 420 e 372 nm em água, metanol e etanol, respectivamente. Em acetato de etila a banda ESIPT localizada a 508 nm apresenta menor intensidade que a banda normal a 449 nm.

O derivado **HB-13** apresenta a banda ESIPT a 468 e 506 nm e a banda normal a 365 e 420 nm em água e acetato de etila, respectivamente. Em metanol e etanol aparece uma única banda atribuída à banda ESIPT a 550 e 488 nm, respectivamente.

Estes comportamentos fotofísicos confirmam o equilíbrio tautomérico em solução no estado excitado. [51]

Os deslocamentos de *Stokes* para os derivados benzazólicos descritos aqui estão na faixa de 31-116 nm e 67-207 nm para forma enol e ceto, respectivamente (Tabela 7). Estes valores estão de acordo com os compostos que propiciam mecanismo de ESIPT.



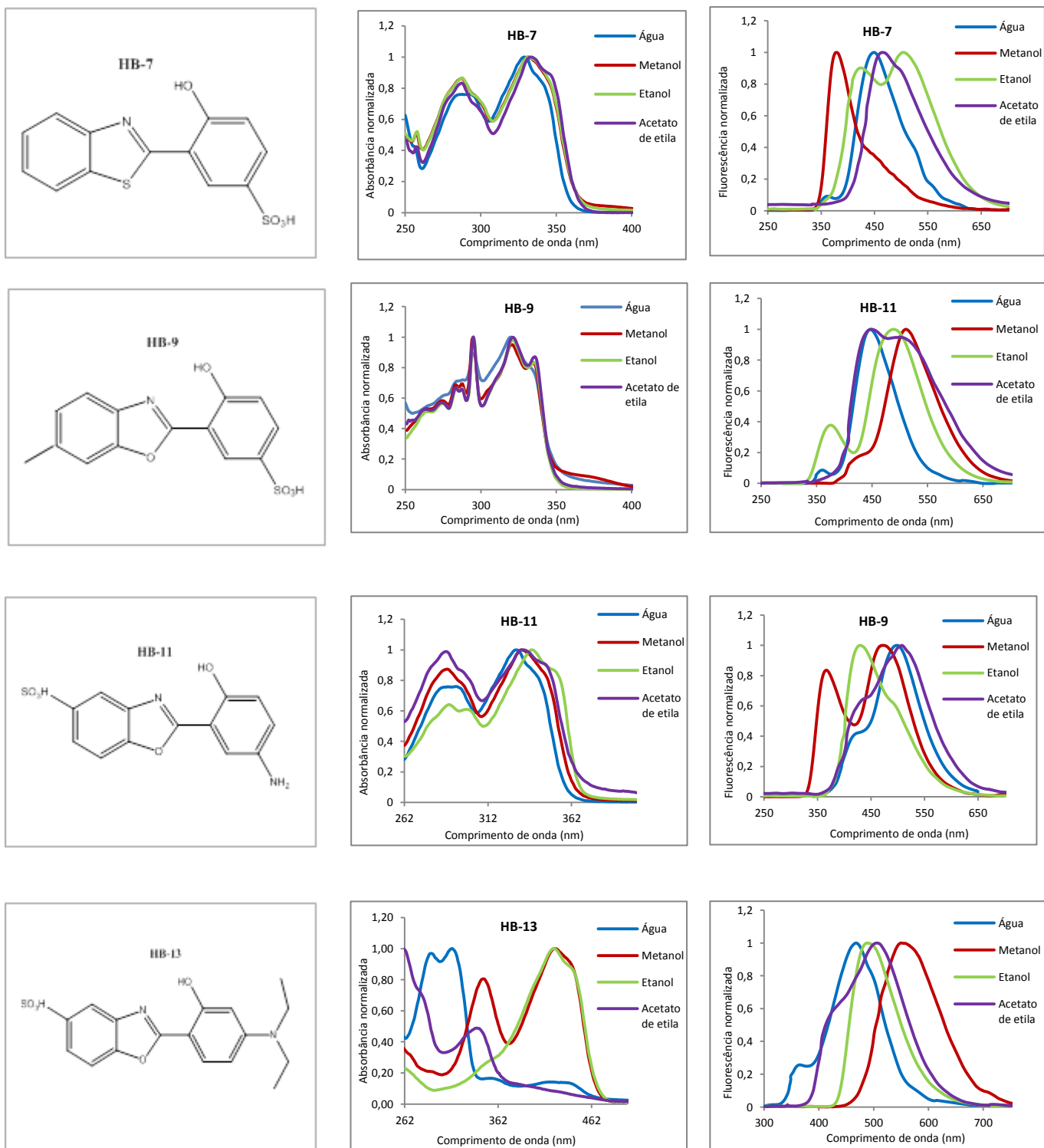


Figura 25. Espectros normalizados de absorção e de fluorescência dos compostos HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13 em solventes de diferentes polaridades.

Tabela 7. Dados relevantes do espectro de absorção UV-Visível e de emissão de fluorescência dos derivados benzazólicos HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13.

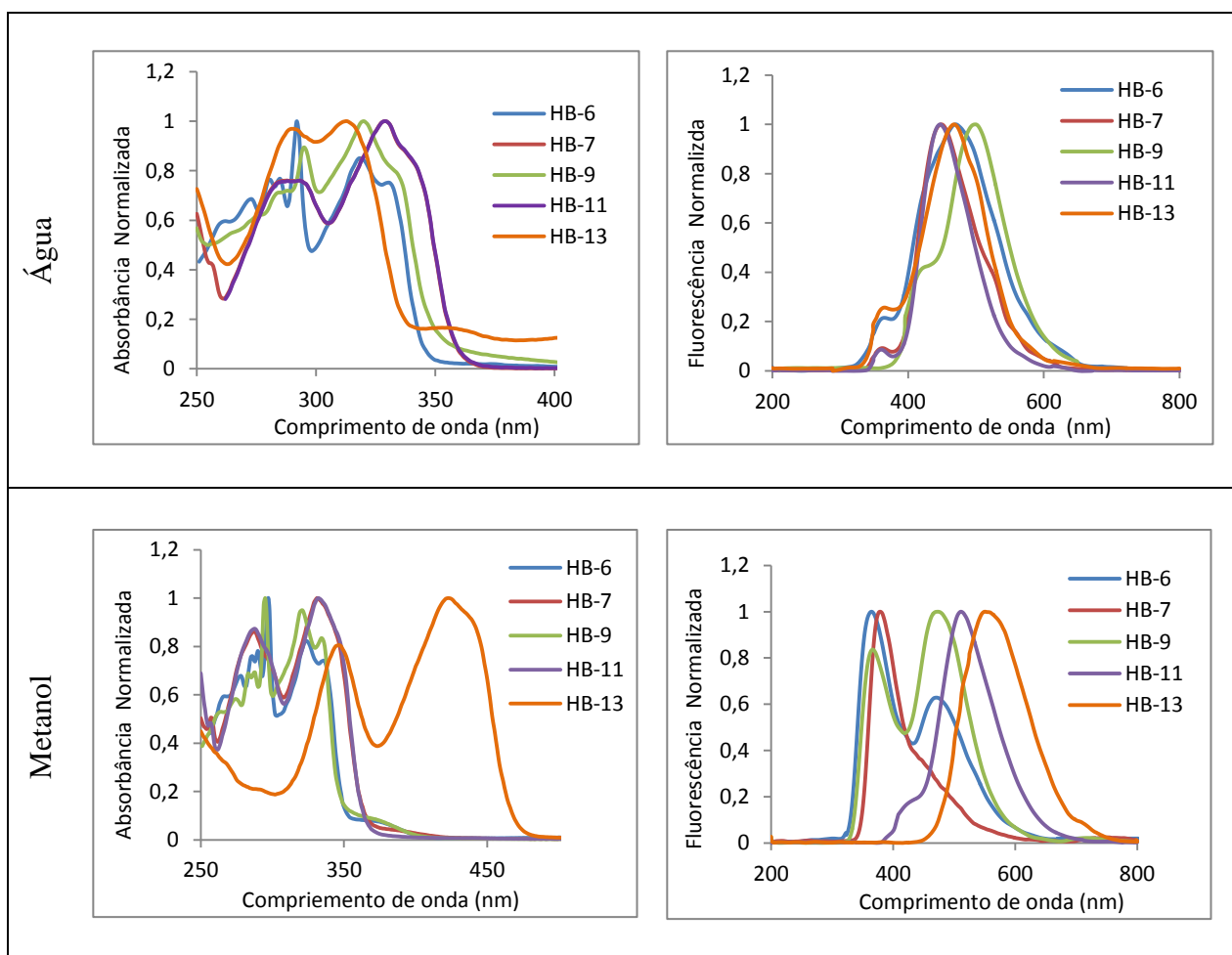
Corante	Solvente	Absorção UV-Visível		Fluorescência			
		$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$ ( $\times 10^6$ L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )	Forma enol		Forma ceto	
				$\lambda_{\max}$ (nm)	$\Delta\lambda_{ST}$ (nm)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\Delta\lambda_{ST}$ (nm)
<b>HB-6</b>	Água	292	0.359	365	48	470	153
	Metanol	297	0.341	364	40	471	147
	Etanol	293	0.467	429	110	526	207
	Acetato de etila	292	0.690	426	108	510	192
<b>HB-7</b>	Água	329	0.587	369	40	449	120
	Metanol	331	0.420	379	48	–	–
	Etanol	332	0.518	424	92	503	171
	Acetato de etila	333	0.450	–	–	464	131
<b>HB-9</b>	Água	320	0.359	423	103	499	179
	Metanol	295	0.500	366	45	473	152
	Etanol	295	0.718	430	109	495	174
	Acetato de etila	295	0.560	425	104	508	187
<b>HB-11</b>	Água	329	0.381	360	31	447	118
	Metanol	332	0.425	420	88	511	179
	Etanol	338	0.454	372	34	489	151
	Acetato de etila	333	0.565	449	116	508	170
<b>HB-13</b>	Água	313	0.402	365	52	468	155
	Metanol	423	0.399	–	–	550	127
	Etanol	420	0.421	–	–	488	67
	Acetato de etila	261	0.488	420	81	506	167

A Figura 26 mostra os espectros normalizados de absorção e de fluorescência dos compostos em água, metanol, etanol e acetato de etila. Como era de esperar, a presença de grupo doador, tal como o grupo metila (HB-9), teve influência no deslocamento do comprimento de onda do máximo de emissão de fluorescência comparativamente com o composto não substituído (HB-6). Quanto aos outros compostos nada se pode concluir devido a ausência de dados de fluorescência dos compostos não substituídos nos solventes estudados. Esta ausência de dados deve-se ao fato de que os compostos não substituídos (ausência do

grupo sulfônicos) não são solúveis nos solventes em que se fez os estudos fotofísicos desses novos reveladores sintetizados.

O composto HB-13 mostrou um comportamento fotofísico (absorção e fluorescência) bastante diferente dos outros compostos. Isto pode ser explicado pelo fato desse composto ter um grupo doador de elétrons por efeito indutivo e de ressonância (grupo dietilammina) na posição *para* em relação ao anel azólico. Isto faz com que os elétrons sejam deslocados ao longo de toda a estrutura benzazólica.

A influência dos grupos doadores e atratores nas bandas de absorção e de emissão de fluorescência foi explicado com base em resultados de cálculos de orbitais moleculares, dos níveis de energia eletrônicos e das transições eletrônicas que ocorrem entre eles.<sup>[122]</sup>



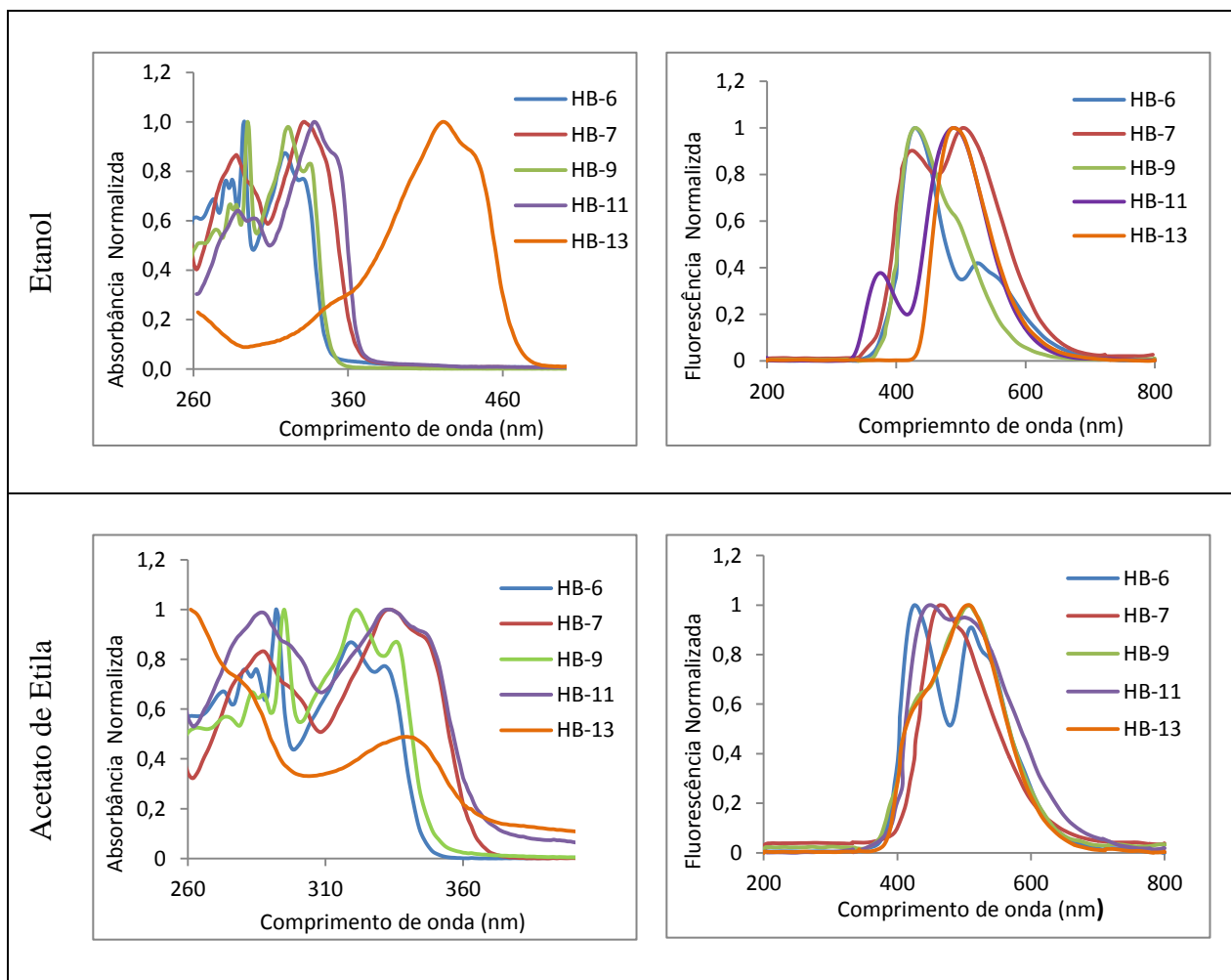


Figura 26. Espectros normalizados de absorção e de fluorescência dos compostos HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13 no mesmo solvente.

Na Figura 27 estão representadas imagens dos compostos sintetizados no estado sólido, sob luz visível (A) e sob luz ultravioleta - 365 nm (B), onde se pode observar uma intensa emissão de fluorescência, principalmente dos compostos HB-7, HB-9 e HB-13.

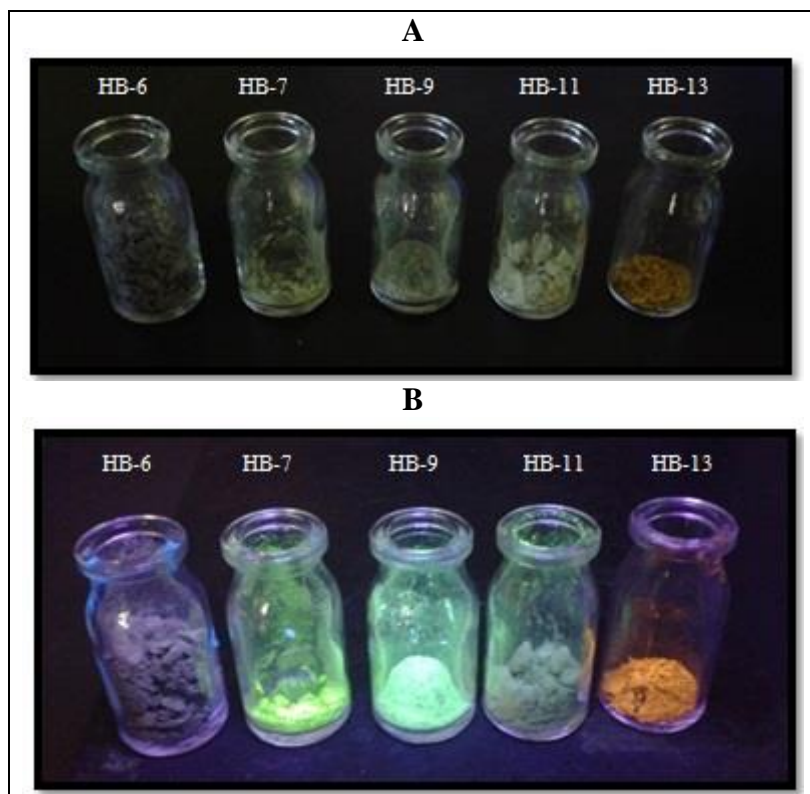


Figura 27. Imagens dos corantes HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13 no estado sólido. A - sob luz visível; B - sob luz ultravioleta - 365 nm.



Na Figura 28 estão representadas imagens dos compostos sintetizados em solução aquosa, sob luz visível (A) e sob luz ultravioleta - 365 nm (B), onde se pode observar uma intensa emissão de fluorescência em quase toda a faixa do espectro visível (azul - laranja).

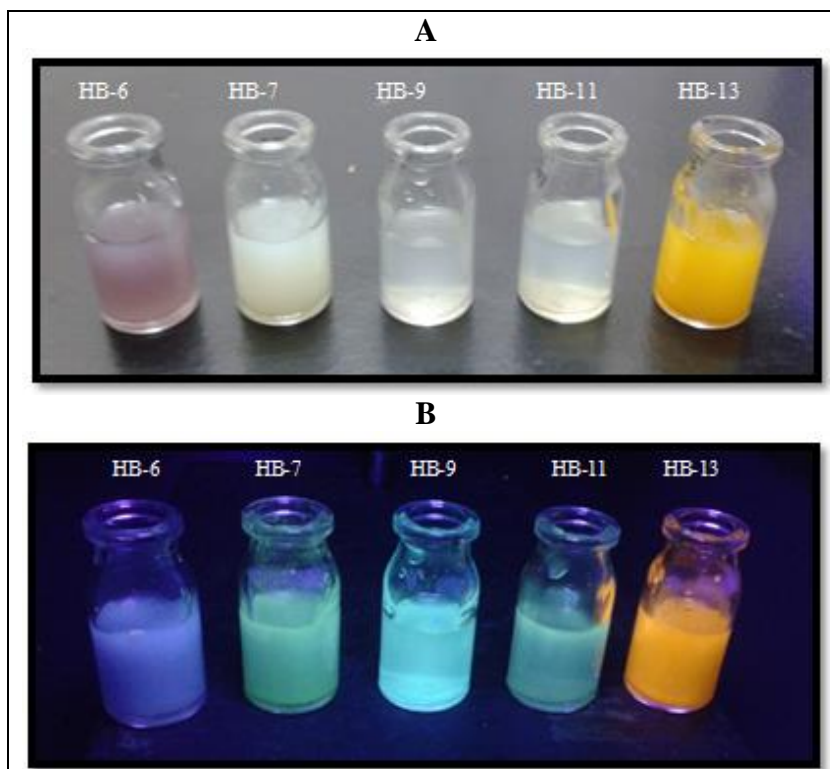


Figura 28. Imagens dos corantes HB-6, HB.7, HB.9, HB-11 e HB-13 em solução aquosa. A - sob luz visível; B - sob luz ultravioleta - 365 nm.

#### 4.2. Amostras de Impressões Digitais Latentes

Diferentes doadores depositaram as impressões digitais (IDs) latentes em diferentes tipos de fitas adesivas e de coloração variadas. Em alguns casos as IDs foram depositadas esfregando um dos dedos numa parte oleosa do rosto e, em seguida, cinco séries consecutivas de impressões digitais foram depositadas sem necessidade de recarga do dedo (estudo sequencial). Outras amostras de IDs foram tomadas de doadores sem a prévia recarga dos dedos nas partes oleosas do rosto. Isto serviu para produzir impressões digitais de quantidades de secreção variadas. As amostras de IDs foram tratadas com diferentes corantes fluorescentes e fotografadas usando uma câmera Canon EOS 1100D (abertura 3 e velocidade ISO-1200).

### 4.3. Performance dos Diferentes Tipos de Fitas Adesivas

Diferentes tipos de fitas adesivas de uso comum e de investigação forense foram usados para estudo da potencialidade de revelação de IDs nos mesmos, e para demonstrar que esses novos derivados benzazólicos fluorescentes podem ser usados como reveladores de impressões digitais latentes em fitas adesivas de diferentes naturezas.

- (A) *Scotch tape*® (fita transparente)
- (B) *Scotch tape*® (fita castanha)
- (C) *Tactape*® ou *Black electrical tape* (fita isolante elétrica preta)
- (D) *Duct tape*® (fita cinzenta ou prateada)

### 4.4. Formulação das Soluções de Corantes de Impressões Digitais Latentes

Solução *stock*: preparou-se uma solução 1 % (m/v) do corante em água destilada.

Solução de trabalho: a partir da solução *stock* prepararam-se quatro soluções aquosas nas seguintes concentrações: 0.5 %, 0.25 %, 0.1 % e 0.01 % (m/v).

Cada solução do corante foi preparada colocando o corante num *erlenmeyer* e adicionando o volume adequado de água destilada para atingir a concentração pretendida. A mistura foi deixada sob agitação até o corante dissolver totalmente, aquecendo-a quando se fez necessário. No caso de existência de partículas não dissolvidas, estas foram retiradas da solução por filtração.

### 4.5. Metodologia Sequencial e o Processamento da Técnica de Revelação de Impressões Digitais Latentes

a) As impressões digitais são colocadas na fita adesiva pressionando levemente os dedos sobre a fita adesiva.

b) Para a revelação de impressões digitais latentes em fita adesiva, coloca-se a solução do corante (solução de trabalho) num *becker* ou recipiente adequado para conter a fita adesiva a ser analisada. A quantidade de solução deve ser suficiente para imergir a fita adesiva.

c) A fita adesiva permanece imersa na solução entre 0.5 - 2 minutos.

d) Após o término do tempo de imersão, pode ser necessário lavar a fita adesiva com água corrente para remover todo excesso do corante do fundo da superfície da fita adesiva.

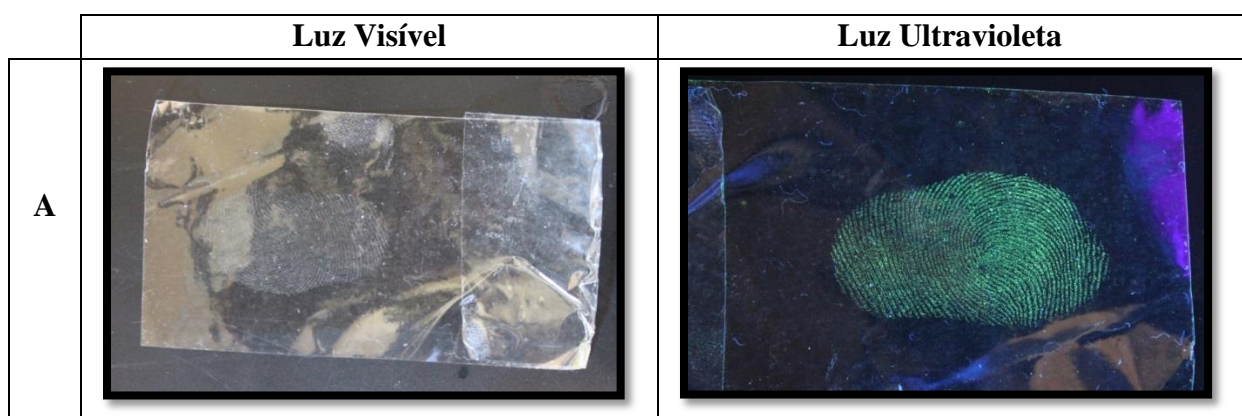
e) A fita adesiva é secada à temperatura ambiente ou com auxílio de um secador.

f) A fita adesiva é exposta a uma fonte de luz ultravioleta com comprimento de onda de 365 nm ( ex: uma lâmpada de luz negra comercialmente disponível) a fim de observar as impressões digitais latentes reveladas. Quando a revelação se mostrar insuficiente repete-se o tratamento com a solução do corante, seguindo os mesmos passos anteriores.

g) As impressões digitais reveladas são fotografadas para comparação, documentação, e propósito de arquivamento, utilizando uma câmera digital.

#### 4.6. Imagens de Impressões Digitais Latentes Reveladas em Fitas Adesivas

A Figura 29 mostra diferentes tipos de fitas adesivas processadas com o corante HB-7 e fotografadas sob luz visível e ultravioleta. Como se pode observar as impressões digitais latentes nas fitas adesivas sob luz visível não são perceptíveis. No entanto, quando as fitas adesivas são vistas sob luz ultravioleta elas se tornam visíveis devido a fluorescência emitida pelo corante. A alta seletividade do corante em relação aos resíduos das impressões digitais faz com que o corante reaja apenas com as IDs e não com toda a superfície da fita adesiva processada, tornando a técnica de revelação de IDs com o corante fluorescente potencialmente importante.



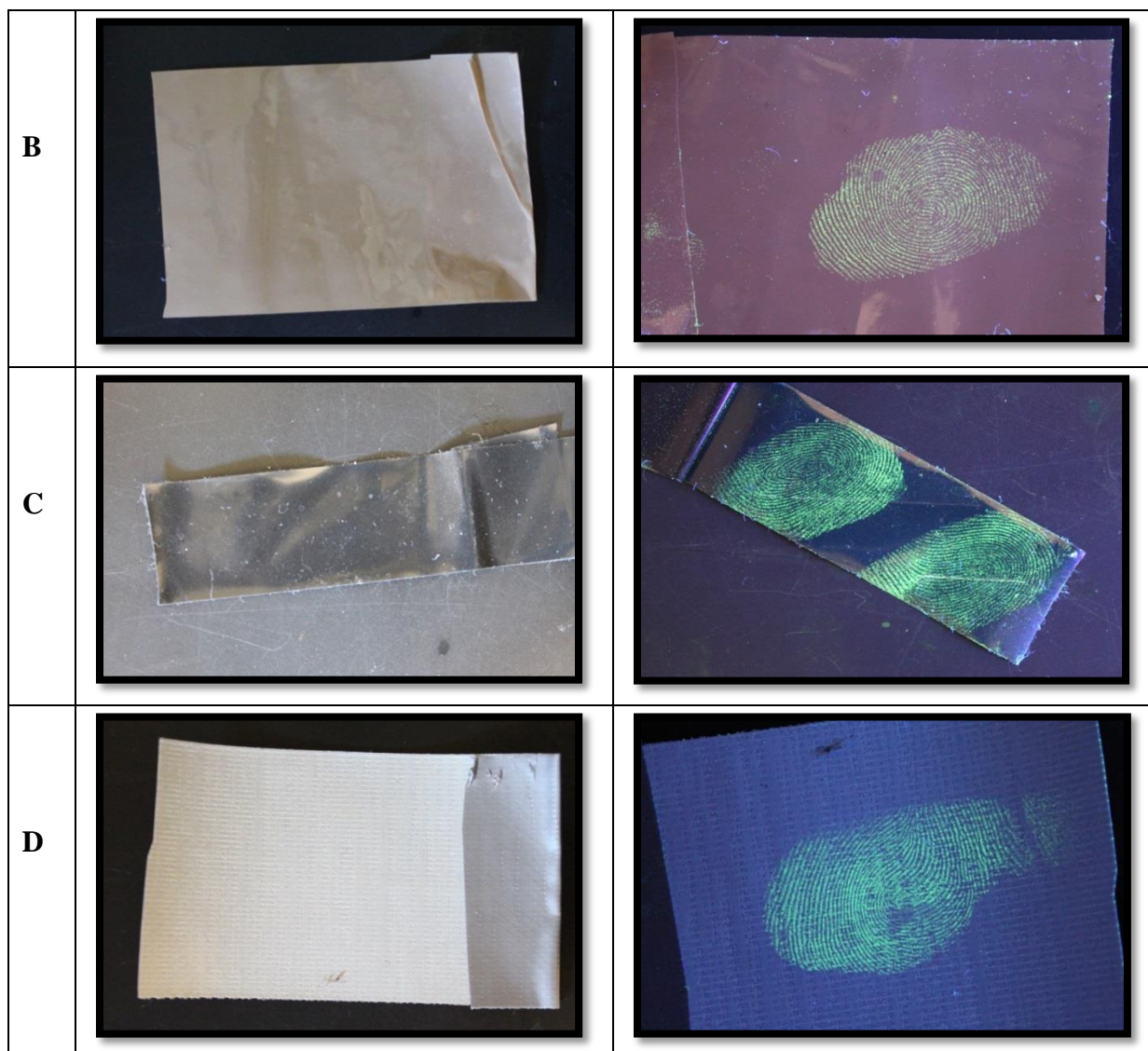


Figura 29. Imagens de diferentes tipos de fitas adesivas processadas com o corante fluorescente HB-7, sob luz visível e sob luz ultravioleta - 365 nm. A - fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); B - fita adesiva castanha (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); C - fita adesiva preta (Fita isolante elétrica – “*Tectape*®”); D - fita adesiva prateada (Fita Multi-Usos “*Duct tape*®”).

Nas imagens de impressões digitais latentes processadas com os corantes sintetizados neste trabalho, conforme apresentadas nas Figuras (30 - 33), foi possível observar a revelação das cristas papilares correspondentes às IDs em todos os tipos de fitas adesivas analisadas (“*Scotch tape*®”, “*Tectape*®” e “*Duct tape*®”), inclusive as de cor escura que até então não havia nenhum revelador eficiente que pudesse ser aplicado nessa superfície. Isto demonstra o potencial de aplicação desses corantes na revelação de IDs em superfícies de cor clara, bem como as de cor escura, com elevada sensibilidade, fazendo com que eles reajam apenas com os resíduos das IDs e não com toda superfície da fita adesiva.



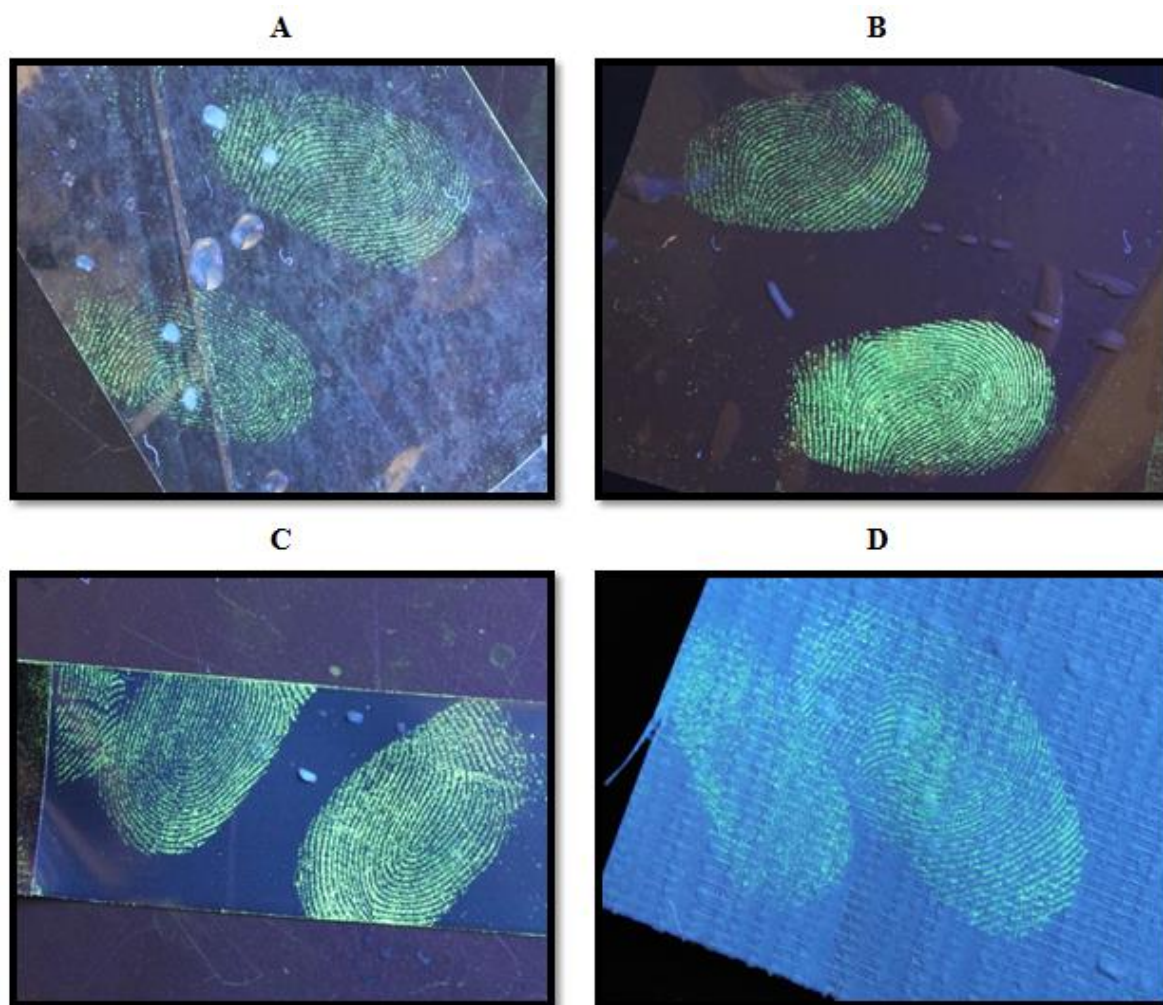


Figura 30. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-7 em: A - Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); B - Fita adesiva castanha (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); C - Fita adesiva preta (Fita isolante elétrica – “*Tectape*®”); D - Fita adesiva prateada (Fita Multi-Usos “*Duct tape*®”).

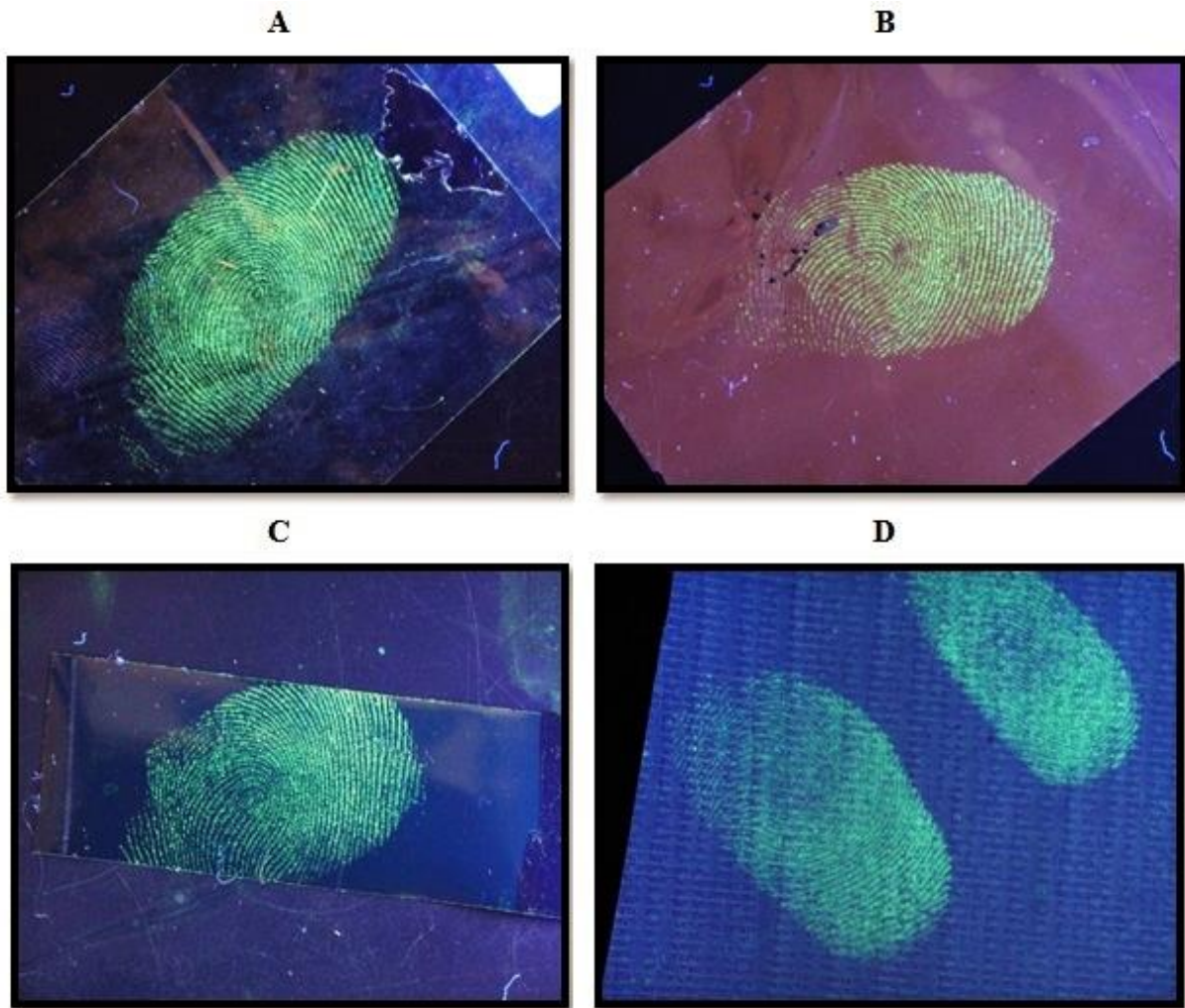


Figura 31. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-9 em: A - Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); B - Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); C - Fita adesiva preta (Fita isolante elétrica – “*Tectape*®”); D - Fita adesiva prateada (Fita Multi-Uso “*Duct tape*®”).

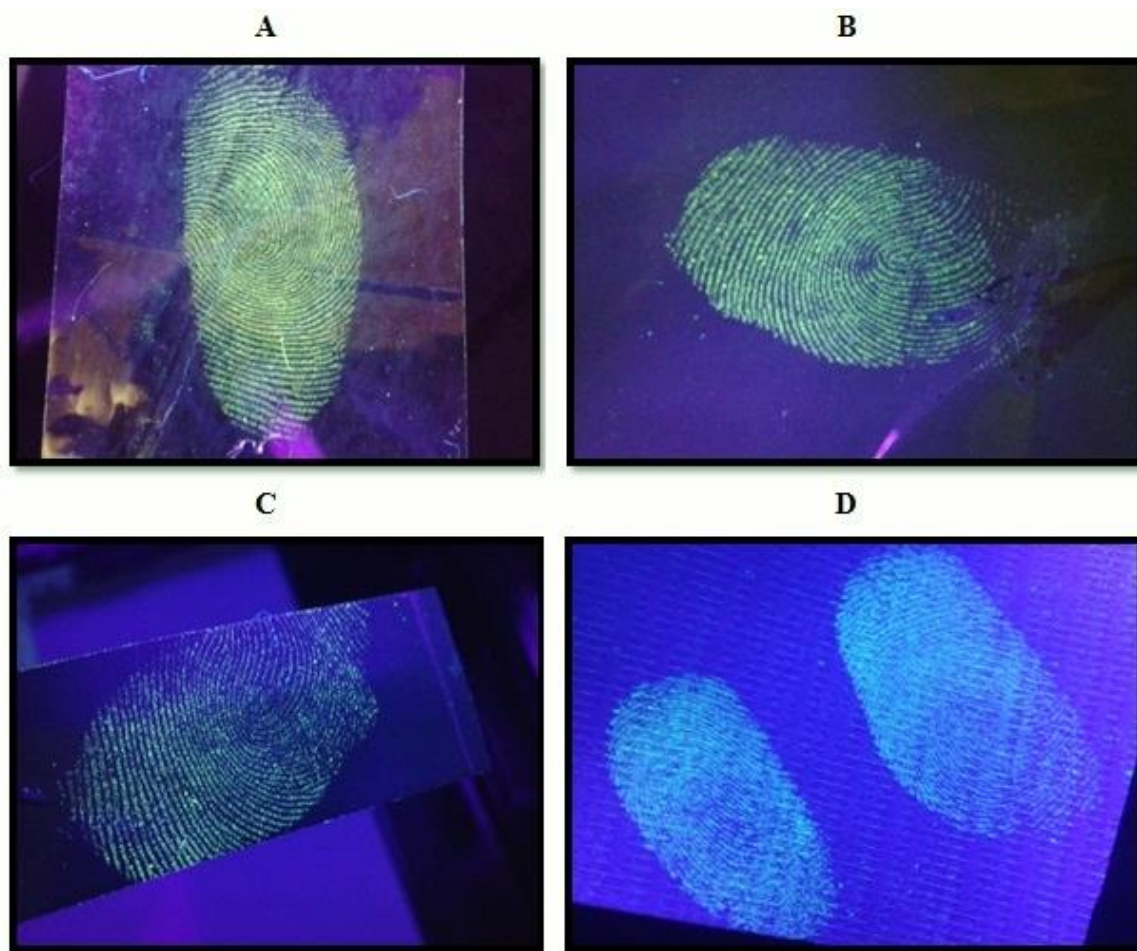


Figura 32. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-11 em: A - Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); B - Fita adesiva castanha (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); C - Fita adesiva preta (Fita isolante elétrica – “*Tectape*®”); D - Fita adesiva prateada (Fita Multi-Usos “*Duct tape*®”).

Os reveladores de impressões digitais latentes atualmente comercializados não são satisfatórios, e possuem algumas limitações. Uma das limitações é a ineficiência dos corantes em corar apenas as impressões digitais, sendo que, muitas vezes, acaba por corar todo fundo da superfície do objeto a ser analisado, impossibilitando a identificação das IDs. Outra limitação deve-se ao fato de que a maioria dos corantes fluorescentes comercializados fazer o uso de solventes orgânicos, o que inviabiliza sua aplicação em fitas adesivas uma vez que o solvente orgânico dissolve a parte adesiva e/ou ataca por completo a fita adesiva fazendo perder as impressões digitais. Além disso, o uso de solventes orgânicos constitui um risco à saúde de quem os manuseia. O preço é certamente um fator importante, pois os outros métodos destinados a revelação de IDs em fitas adesivas, tais como microscopia de infravermelho e de elétrons, são geralmente muito dispendiosos, com exceção do corante



violeta genciana. Este além de ser barato tem mostrado também potencialidades na revelação de IDs latentes em fitas adesivas, embora possui algumas limitações, tais como a baixa seletividade que faz com que, muitas vezes, toda a superfície da fita fique tingida com o corante, o que dificulta a visualização de IDs. Isso leva a uma metodologia de trabalho que exige muito cuidado para não corar intensamente o fundo que não contém as impressões digitais e corar de maneira adequada as impressões digitais, de modo a permitir sua perfeita visualização. Além disso, a violeta genciana é pouco usual para revelação de impressões digitais em superfícies escuras (ex: fita isolante elétrica preta) devido a dificuldade em fotografar as IDs. Ele também pode ser utilizado em superfícies escuras. Nesse caso, após a revelação das impressões digitais latentes, elas precisam ser transferidas da superfície original para uma nova superfície, geralmente de cor clara, através de um processo chamado de sublimação térmica. Esse processo pode afetar a qualidade e os detalhes das cristas e vales das impressões digitais (minúcias), comprometendo a análise papiloscópica posterior.

Os corantes sintetizados neste trabalho permitem corar superfícies adesivas de qualquer cor, desde as usuais transparentes até as fitas isolantes de cor preta (usadas na fabricação de dispositivos eletrônicos explosivos), passando pelas de cor acinzentada (usualmente usadas para imobilizar vítimas em caso de sequestros, estupros, roubos, etc). Não há a necessidade de cuidar da saturação da superfície adesiva contendo as impressões digitais, pois os corantes não aderem às outras superfícies, ficando restritos às IDs. A visualização é muito fácil, bastando iluminar as fitas adesivas com uma luz UV de onda longa (luz negra) e fotografar as impressões digitais reveladas.

A alta estabilidade fotoquímica e fotofísica dos corantes é mais uma característica importante desses corantes, permitindo armazenar a evidência por longos períodos sem qualquer tipo de degradação (cadeia de custódia). Esse é um dado importante, pois no campo da ciência forense é importante conservar as evidências para eventuais necessidades de serem analisadas novamente, como por exemplo, na abertura de um processo judicial.

A cor dos fluoróforos (corantes usados na revelação) sob luz visível é outra vantagem destes corantes e da técnica descrita. Eles não possuem cor o que facilita ler, visualizar ou fotografar o resto da evidência sem o comprometimento de uma coloração adicional resultante do uso do corante.

Esses corantes são de fácil utilização, atendem às necessidades de superfícies adesivas escuras permitindo uma fácil e perfeita visualização das impressões digitais latentes e seu uso



pode ser ampliado para o emprego em diversas outras superfícies de interesse forense, tais como plásticos, vidros, metais, cerâmica, madeira, entre outras. Possuem como vantagem adicional o emprego da água como solvente e a concentração extremamente baixa ( $10^{-4}\text{M}$ ), podendo ser reutilizada a solução de corante, tornando-os ecologicamente muito mais corretos (química verde).

Outras vantagens desses corantes em relação aos corantes atualmente comercializados são a alta eficiência na revelação de IDs latentes num curto intervalo de tempo e a alta estabilidade química e fotofísica devido ao mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT).

Esses corantes apresentam uma excelente relação custo-benefício, pois são obtidos a partir de materiais de baixo custo e aplicando métodos de síntese usualmente empregados em laboratórios de síntese orgânica.

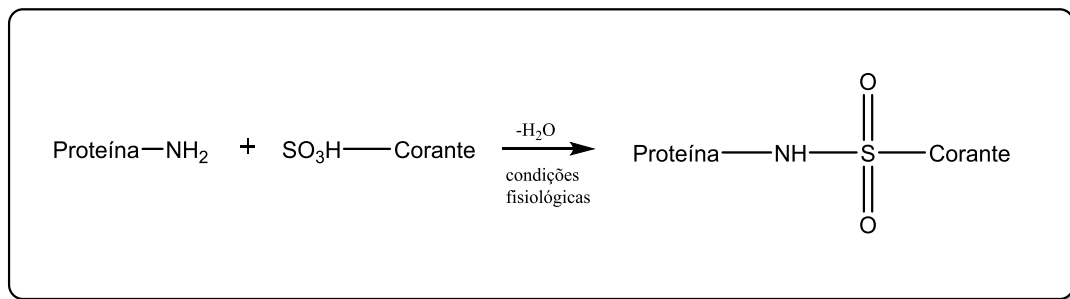
Quanto às concentrações dos corantes testadas na revelação das impressões digitais, foi possível constatar que mesmo em concentrações baixas do corante, 0.1 (m/v), as IDs foram perfeitamente reveladas. No entanto, as soluções com concentrações abaixo deste valor não tiveram o mesmo êxito.

O tempo de processamento da técnica de revelação de IDs mostrou pouca influência na eficiência de revelação das mesmas, tendo conseguido excelentes resultados com tempos variando entre 0.5 segundos e 5 minutos.

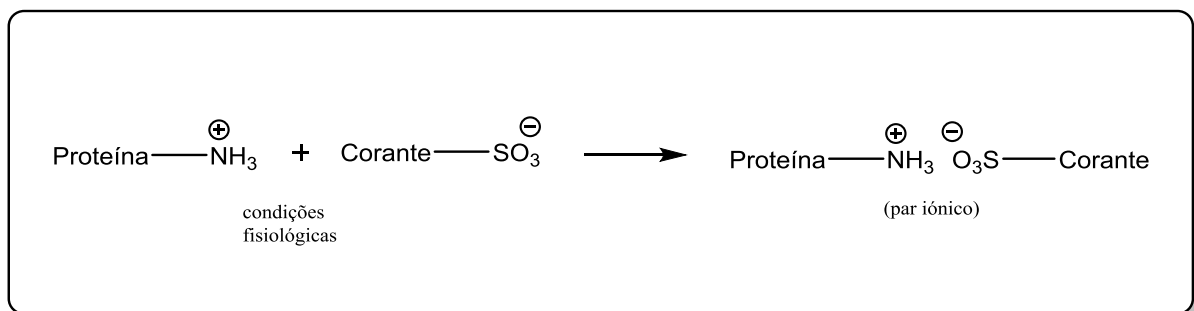
Todos os objetos revelados com esses derivados benzazólicos fluorescentes foram guardados durante 1 ano e analisados novamente sob lâmpada de UV - 365 nm, apresentando os mesmos resultados, o que demonstra a importância dessa técnica na conservação das evidências (cadeia de custódia).

A existência de grupamentos sulfônicos atribui a esses derivados benzazólicos uma boa solubilidade em água, eliminando o uso de qualquer solvente orgânico. Além disso, pensa-se que os grupos sulfônicos são responsáveis pela marcação das impressões digitais pela ligação aos aminoácidos e/ou proteínas constituintes das impressões digitais.<sup>[123,124,125]</sup> Testes de revelação de impressões digitais em fitas adesivas usando compostos similares, sem a presença de grupo sulfônico, não tiveram sucesso. Tsopelas e Sutton<sup>[123]</sup> propuseram uma reação química do grupo sulfônico dos corantes com o grupo amina livre das proteínas, tais como grupos aminas de lisinas ou argininas, ou até mesmo com grupos hidroxilas dos

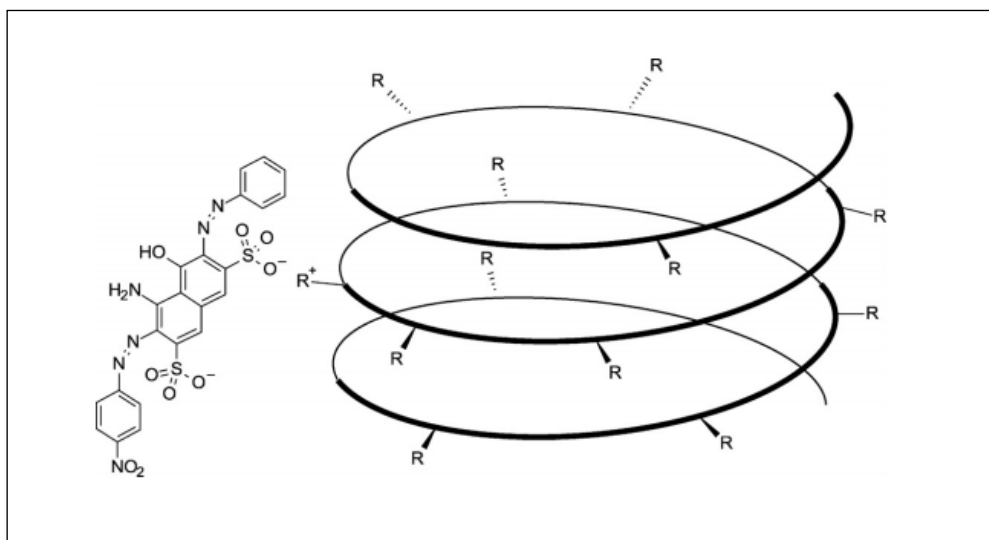
aminoácidos. A reação consiste na perda da água quando o grupo sulfônico do corante reage com a amina livre das proteínas para formação da sulfonamida, ou éster no caso da reação com grupo hidroxila (Proposta 1). Essa proposta de reação foi contestada por Wilbur<sup>[125]</sup> que propôs que os componentes da reação são descritos como íons em condições fisiológicas, e que a reação não se dá por ligação covalente mais sim por interação iônica (Proposta 2). Bossers e seus colaboradores<sup>[126]</sup> ilustraram essa interação iônica entre o grupo sulfônico ionizado de um corante com uma proteína (Proposta 3).



Proposta 1. Complexo proteína-corante formado por reação química do grupo amina da proteína com o grupo sulfônico do corante (ligação covalente).



Proposta 2. Formação do par iônico resultante da interação dos íons da proteína e do corante (ligação não covalente).



Proposta 3. Ilustração mostrando uma interação entre o amido *Black* e uma proteína. A estrutura em hélice representa uma configuração possível de proteína com grupos R = laterais. Os grupos laterais catiónicos ( $R^+$ ) podem ser, por exemplo, histidina protonada, lisina, arginina ou cadeias laterais que podem atrair os grupos sulfônicos ionizados do amido *Black*.

Todos os compostos sintetizados mostraram eficazes na revelação de impressões digitais latentes, com exceção para os compostos HB-6 e HB-13. O composto HB-6 não teve sucesso na revelação de impressões digitais latentes, muito provavelmente pelo fato do grupo sulfônico estar na forma de sal de sódio, originado quando a mistura reacional foi tratada com bicarbonato de sódio. Considerando que a interação do átomo de sódio carregado positivamente ( $Na^+$ ) com o grupo sulfônico carregado negativamente é mais forte que a interação iônica proposta anteriormente entre o corante e proteína, então o composto HB-6 não interage ou interage muito pouco com a proteína constituinte dos resíduos das IDs. O composto HB-13 também não mostrou eficaz na revelação de impressões digitais latentes, provavelmente devido ao grupo dietilamina substituinte na posição *para*, que consegue colocar uma carga negativa do outro lado do anel aromático, dificultando a perda do próton para formação do grupo sulfônico carregado negativamente, Figura 33.

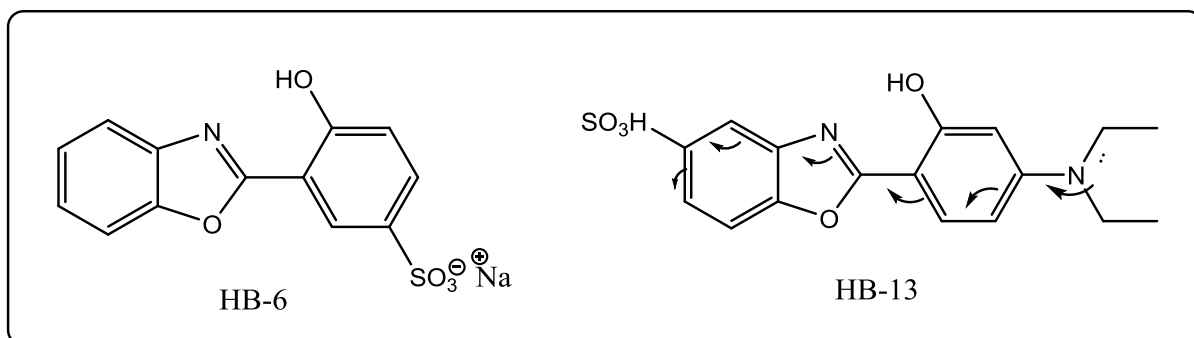


Figura 33. Estrutura do composto HB-6 na forma de sal de sódio e a estrutura de ressonância do composto HB-13.

### Estudo Comparativo de Fotos de Impressões Digitais Tiradas Com e Sem Filtro

A Figura 34 faz uma comparação entre fitas adesivas processadas com corante e observadas sob luz ultravioleta na presença e ausência de filtro. Os filtros são ferramentas importantes quando se pretende melhorar a visualização de impressões digitais reveladas, principalmente quando a superfície a ser revelada possui autofluorescência, como é o caso da fita adesiva prateada (C<sub>2</sub>). Usando um filtro adequado é possível eliminar a fluorescência do fundo e observar apenas a luz emitida pelo corante.

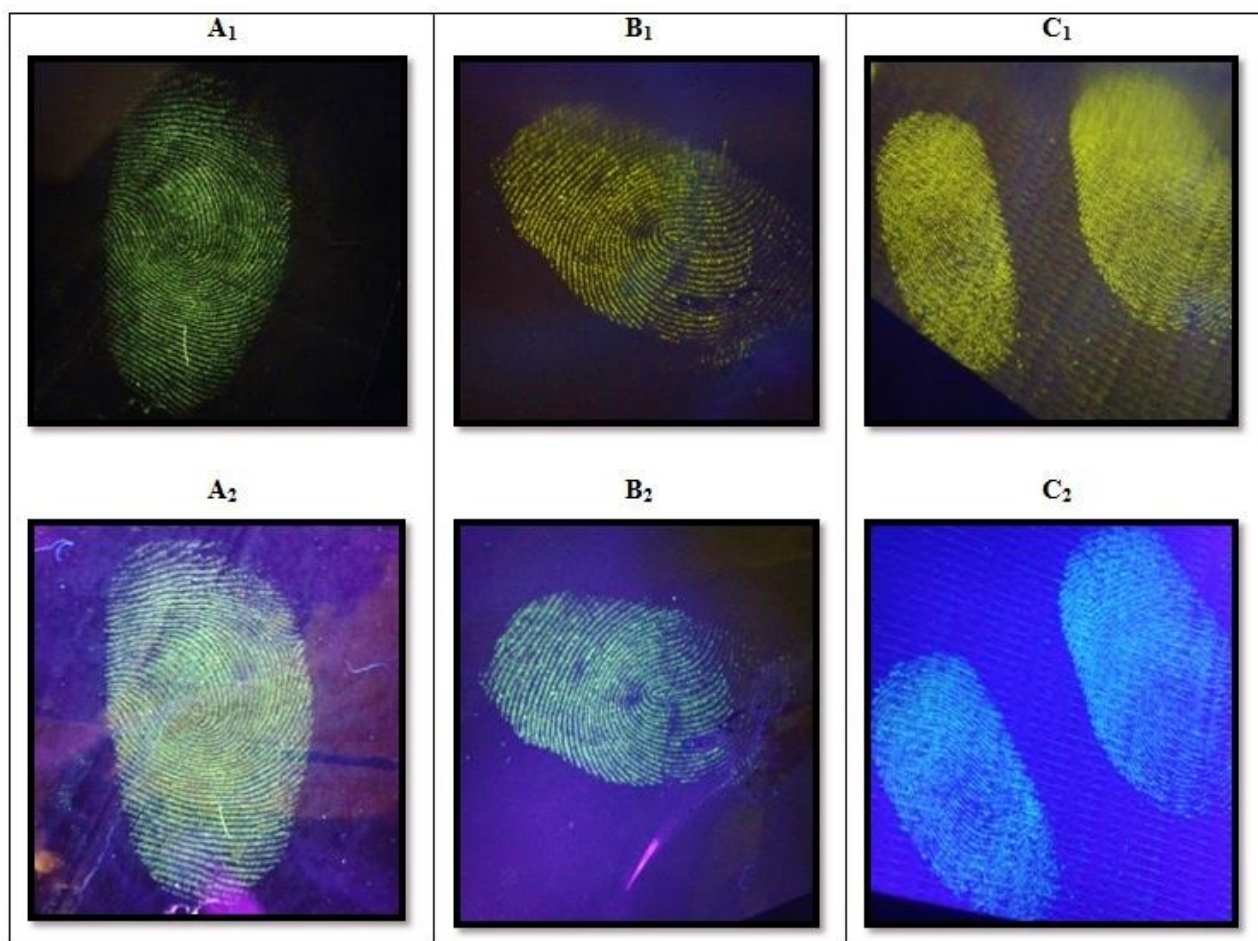


Figura 34. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-11 em: Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “Scotch tape®”)- A<sub>1</sub> (usando filtro - cor laranja) e A<sub>2</sub> (ausência de filtro); Fita adesiva castanha (Fita para Embalagem Polisil – “Scotch tape®”) - B<sub>1</sub> (usando filtro - cor laranja) e B<sub>2</sub> (ausência de filtro); Fita adesiva prateada (Fita Multi-Usos “Duct tape®”) - C<sub>1</sub> (usando filtro - cor laranja) e C<sub>2</sub> (ausência de filtro).

### **Estudo da Influência do Envelhecimento e da Quantidade de Resíduos Depositados no Resultado da Revelação de Impressões Digitais Latentes com os Novos derivados Benzazólicos Fluorescentes**

Um primeiro estudo foi feito com o intuito de avaliar a capacidade do corante revelar impressões digitais latentes deixadas por um determinado tempo antes de serem reveladas. Para isto, as IDs foram depositadas e deixadas para serem processadas em diferentes tempos. O que se obteve foi um conjunto de IDs com diferentes idades, sendo que a idade das IDs é definida como o tempo decorrido do momento da deposição das mesmas até o momento que elas foram reveladas.

No primeiro caso (tempo= 0 dia) as impressões digitais foram depositadas e reveladas no mesmo instante. Em outros casos elas foram depositadas e deixadas durante 2, 8 e 15 dias antes de serem processadas com o corante. Esse estudo foi feito em fitas adesivas castanha e pretas e as imagens das IDs estão apresentadas nas Figura 35 e Figura 36, respectivamente.

O resultado demonstra que o corante usado na revelação de IDs possui excelente capacidade de revelar impressões digitais, mesmo que elas tenham sido deixadas vários dias antes de serem processadas. Este é um dado importante pois muitas evidências deixadas nos locais de crime são encontradas depois de passado algum tempo da ocorrência do crime ou somente podem ser processadas pelo laboratório muito tempo depois do ocorrido.

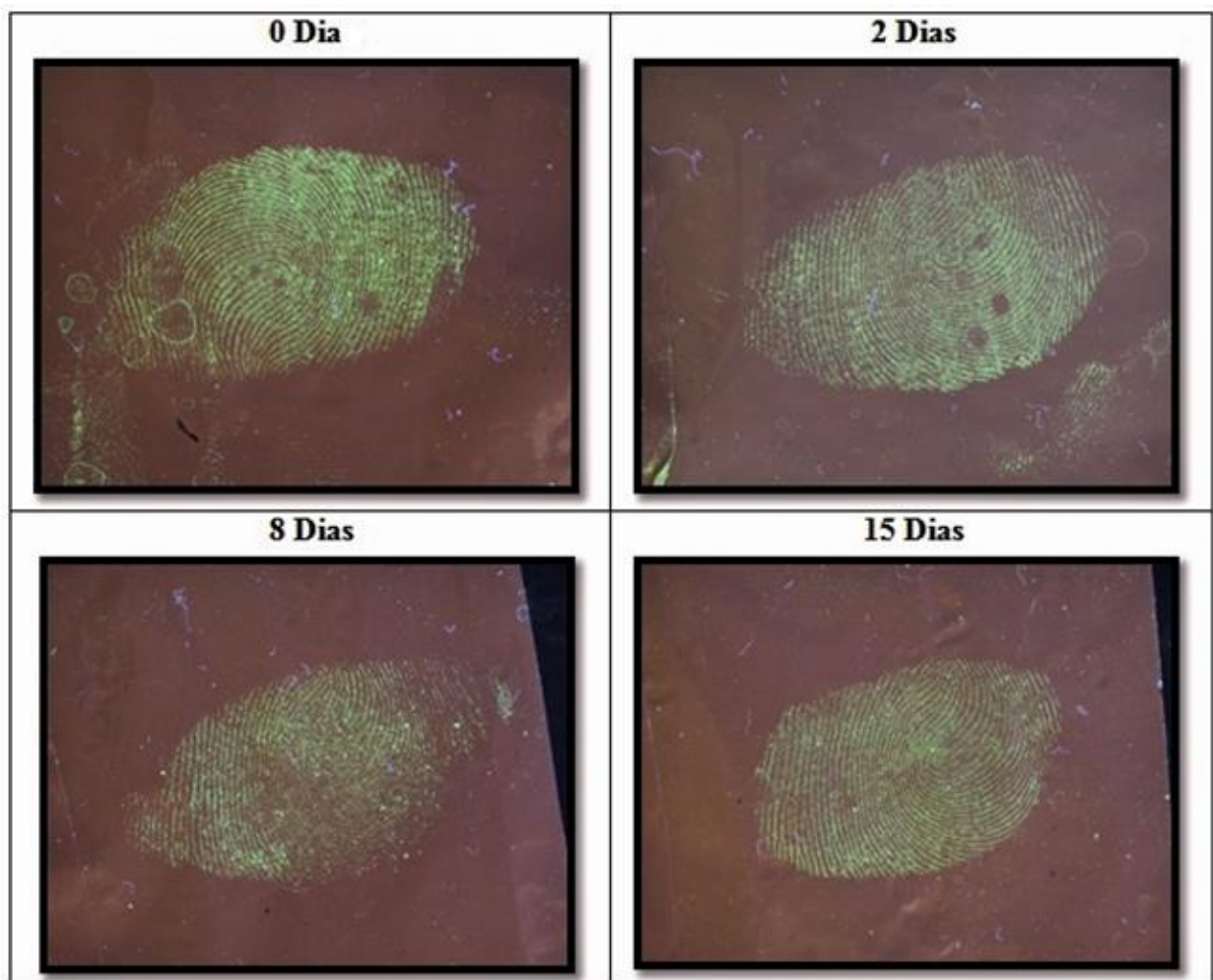


Figura 35. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-7 em fita adesiva castanha com idades das impressões digitais latentes de 0, 2, 8 e 15 dias.

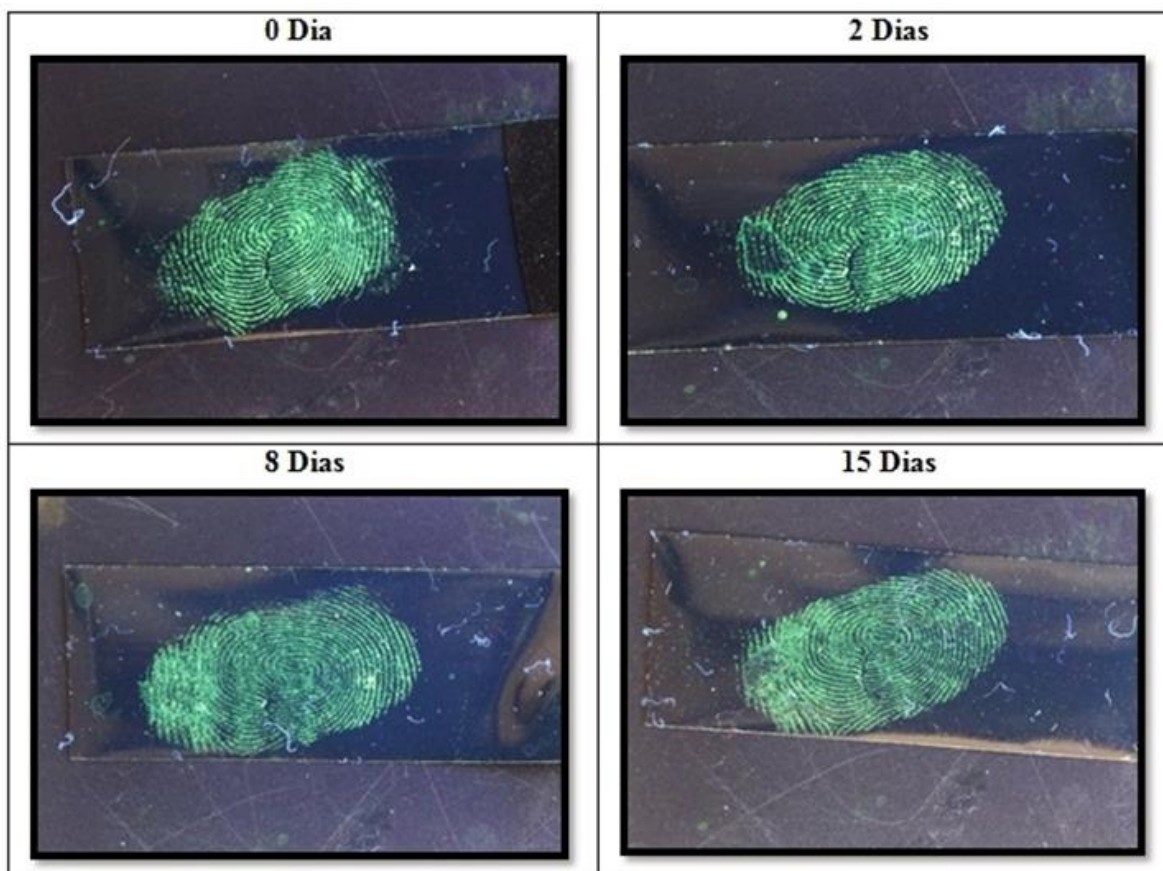


Figura 36. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-7 em fita adesiva preta com idades das impressões digitais latentes de 0, 2, 8 e 15 dias.

No segundo estudo avaliou-se a sensibilidade do corante em revelar impressões digitais latentes. Para isto, IDs com diferentes quantidades de resíduos foram depositadas de forma sequencial e reveladas com o corante fluorescente HB-7. As IDs foram depositadas por uma única pessoa. Após a primeira deposição, várias outras foram feitas de forma sucessivas com o mesmo dedo de modo a avaliar se a diminuição de resíduos depositados influenciaria na eficiência de revelação de impressões digitais. Foi usado para esse propósito fita castanha, transparente e preta. Os resultados do processamento dessas fitas com o corante HB-7 estão apresentados na Figura 37, onde se pode observar uma ligeira diminuição na eficiência de revelação em todas as fitas adesivas à medida que diminui a quantidade de resíduos com o depósito sequencial das mesmas (1-5).



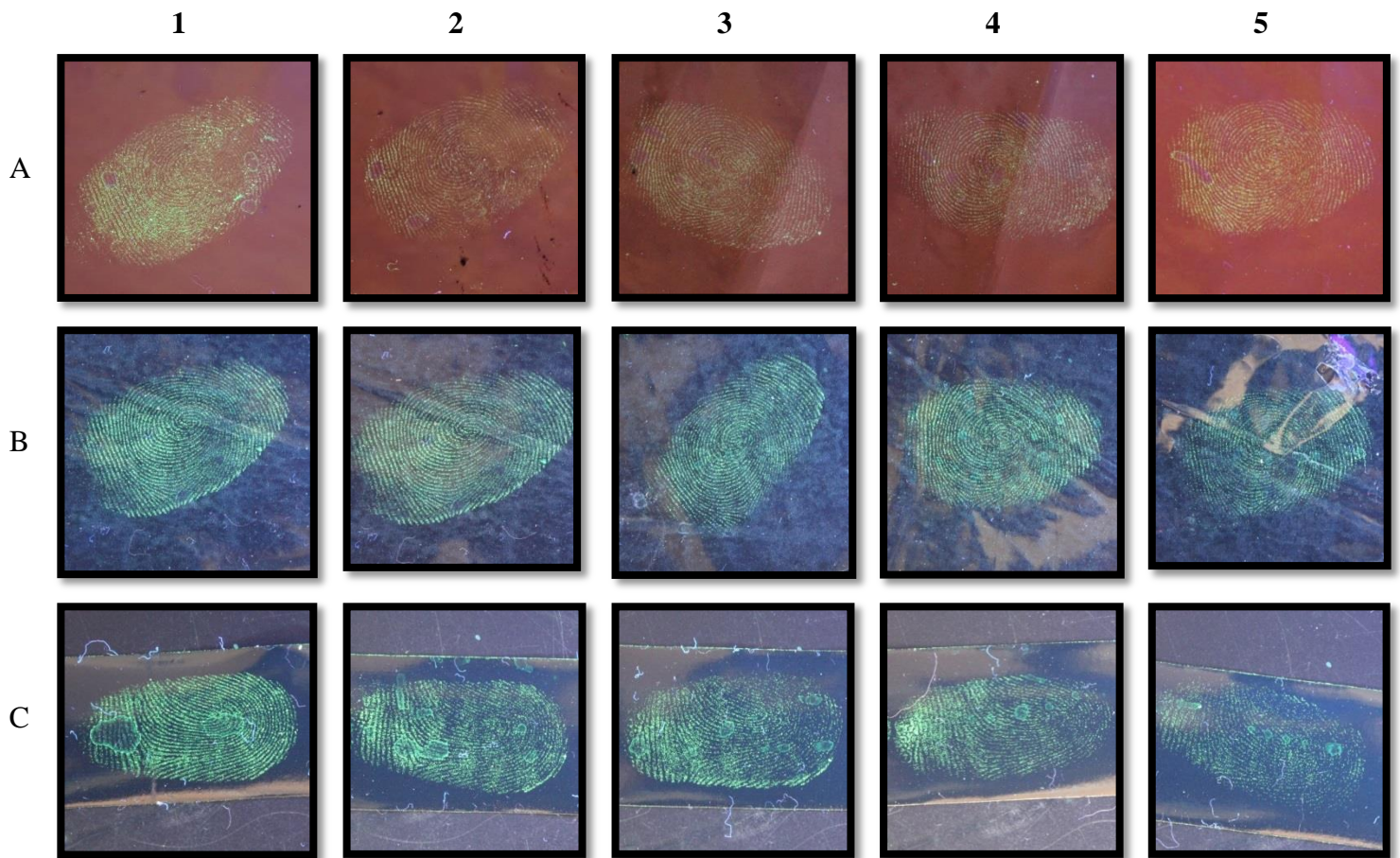


Figura 37. Imagens de impressões digitais latentes depositadas em sequência (1-5) e reveladas com o corante fluorescente HB-7 em: A- Fita adesiva castanha (Fita para Embalagem Polisil – “Scotch tape®”); B - Fita adesiva transparente (Fita para Embalagem Polisil – “Scotch tape®”) e C - Fita adesiva preta (Fita isolante elétrica – “Tectape®”).

As fitas adesivas processadas com os corantes fluorescentes sintetizados neste trabalho foram guardadas durante 1 ano e observadas novamente sob luz ultravioleta. Como se pode ver na Figura 38, os resultados mantiveram inalterado mesmo passado um tempo longo de armazenamento. Isso demonstra que esses novos reveladores para além de serem muito sensíveis e seletivos, como visto anteriormente, também são extremamente estáveis. Esta última é uma característica extremamente importante no campo da ciência forense uma vez que as evidências muitas vezes precisam ser guardadas para eventual necessidade de serem analisadas novamente (cadeia de custódia).



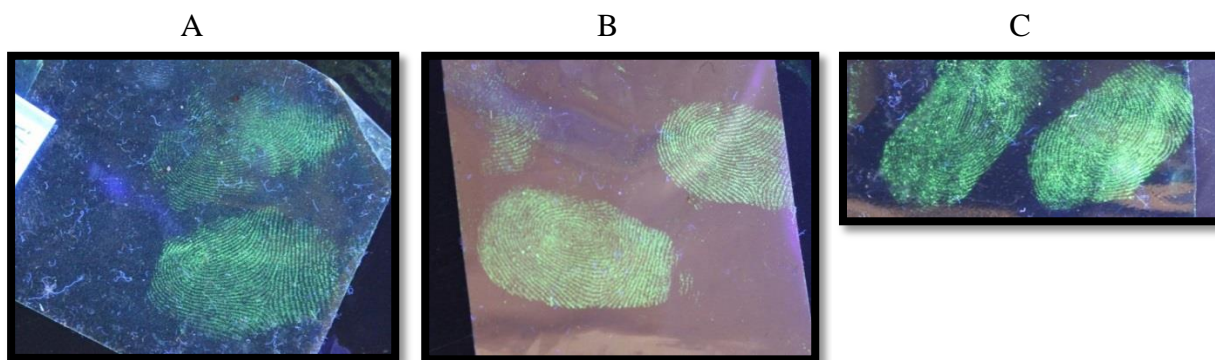


Figura 38. Imagens de diferentes tipos de fitas adesivas processadas com o corante fluorescente HB-7 e guardadas durante 1 ano. A - Fita transparente (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); B- Fita castanha (Fita para Embalagem Polisil – “*Scotch tape*®”); C- Fita preta (Fita isolante elétrica – “*Tectape*®”).

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### Materiais e Instrumentação

Todos os reagentes e solventes utilizados na síntese foram adquiridos na Sigma-Aldrich e Merck, respectivamente. Ambos foram utilizados sem purificação adicional. Solventes espectroscópicos (Merck) foram usados nas medidas de absorção UV-visível e emissão de fluorescência. Espectros de emissão de fluorescência e de excitação foram medidos num espectrofluorímetro Hitachi modelo F-4500. A Absorção UV-Visível foi registrado num espectrómetro Varian Cary 50. Todos os experimentos fotofísicos foram efetuados a temperatura ambiente em cubetas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e concentrações na faixa de  $10^{-6}$  M. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN e  $^{13}\text{C}$ -RMN foram efetuados em DMSO- $d_6$  (*Cambridge Isotope Laboratories, Inc.*) num espectrómetro Varian INOVA-300, operando a frequências de 300 MHz, e num Bruker Avance - 400, operando a frequência de 400 MHz, para hidrogênio e de 75 MHz para carbono. Os deslocamentos químicos foram expressos em parte por milhão (ppm), tendo tetrametilsilano (TMS) como padrão interno de referência para  $^1\text{H}$ -RMN. As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram medidas em Hertz (Hz) e as multiplicidades de spin expressas em: singlete - s, duplete - d, duplo duplete - dd, tripleto - t, multiplete - m, sinal largo - sl. Os espectros de massa foram obtidos num espectrômetro Shimadzu acoplado a cromatografia gasosa - GCMS, modelo QP20105 com analisador quadrupolo, via inserção direta de soluções de amostras diluídas (1  $\mu\text{l}$ ) em metanol e fragmentação por impacto eletrônico de 70 eV (espectro de HB-7, HB-11 e HB-13) e em um espectrômetro com fragmentação por eletrospray (espectro de HB-6 e HB-9). Os espectros de absorção na região de Infravermelho foram efetuados num espectrómetro Mattson Galaxy Series 3000 FT-IR em KBr.

### 5.1. Procedimentos Gerais de Síntese dos Derivados Benzazólicos Fluorescentes (HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13)

A síntese dos novos derivados benzazólicos fluorescentes do presente trabalho é efetuada aplicando métodos de síntese usualmente empregados em laboratórios de síntese orgânica.<sup>[9]</sup> Essas reações consistem na condensação de ácido salicílico substituído com derivados de anilinas *orto*-substituídas em ácido polifosfórico a temperaturas variando entre 140 a 180 °C por aproximadamente 5 horas.

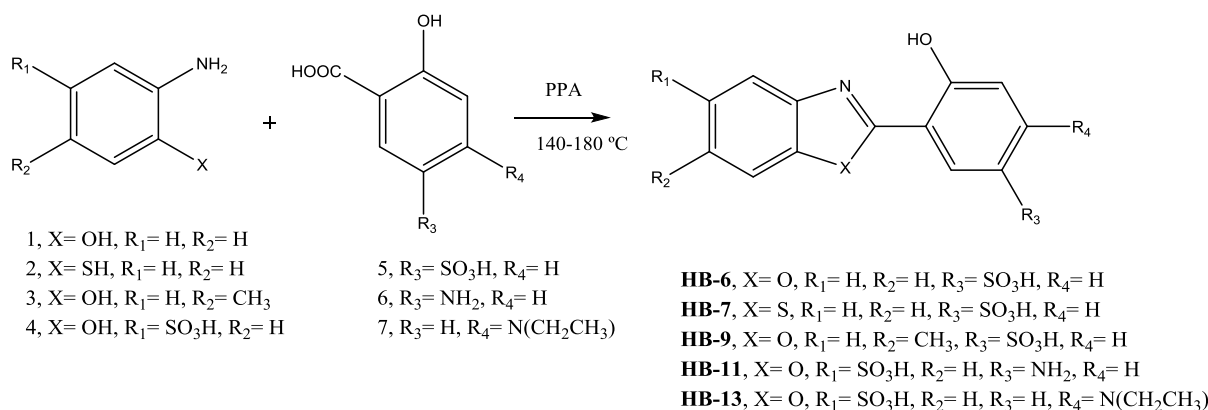
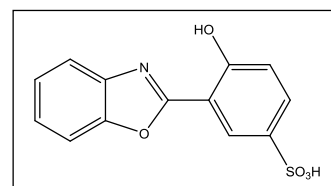


Figura 39. Processo sintético para obtenção dos derivados benzazólicos fluorescentes, HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13.

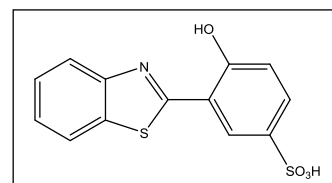
- Síntese de derivado 2- (2'-hidroxifenil) benzoxazol substituído (HB-6)  
 Nome IUPAC: ácido 4- hidroxi- 3-(benzo [d] oxazol-2-il)benzenossulfônico

Em um balão de 50 mL foram adicionados 10.01 g de ácido 5-sulfosalicílico **5** (0.0458 moles) e 5.02 g de 2-aminofenol **1** (0.0458 moles) em 10 mL de ácido polifosfórico (PPA) e aqueceu-se a mistura a 170 °C sob agitação durante 4 horas. Em seguida a mistura reacional foi vertida em 200 mL de gelo e o precipitado foi filtrado sob vácuo. O sólido obtido (cor roxa) foi dissolvido em 20 mL de uma solução 10 % de carbonato de sódio e ajustou-se o pH até a formação do precipitado, aproximadamente pH= 7. Filtrou-se o precipitado sob vácuo, deixando-o secar a temperatura ambiente e procedeu-se a recristalização do mesmo em água/acetona. O rendimento bruto foi de 54 % (3.15 g, 0.0245 moles). O produto apresentou fluorescência azul sob exposição à luz UV 365 nm; Ponto de fusão (mp) > 300 °C; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO) δ 8.00 (dd, *J* = 7.9, 1.7 Hz, 1H), 7.87 – 7.78 (m, *J* = 9.3, 4.9, 1.8 Hz, 2H), 7.49 – 7.42 (m, *J* = 7.4, 3.7, 1.5 Hz, 2H), 7.07 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H), 7.02 – 6.95 (m, 1H); <sup>13</sup>C-RMN - APT (75 MHz, DMSO) δ 163, 159, 149, 140, 134, 128, 126, 125, 119, 119, 118, 111.4, 111; IR (KBr): 3500, 3250, 3000, 2325, 1650, 1500, 1250, 1120, 880, 750 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI): *m/z*: 289, 291 [M<sup>+</sup>], 302, 304, 316, 321 325.



- Síntese de derivado 2- (2'-hidroxifenil) benzotiazol substituído (HB-7)  
Nome IUPAC: ácido 4-hidroxi- 3-(benzo [d] tiazol-2-il)benzenossulfônico

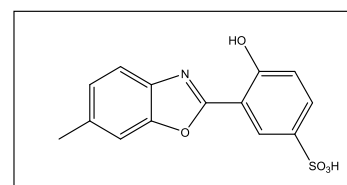
Em um balão de 50 mL foram adicionados 1.74 g de ácido 5-sulfosalicílico **5** (0.0069 moles) e 0.86 g de 2-aminotiofenol **2** (0.0069 moles) em 3 mL de ácido polifosfórico (PPA). A mistura foi aquecida lentamente até 160 °C sob



agitação durante 1h30, tempo em que se formou um precipitado verde na mistura reacional. O material foi vertido sobre 200 mL de gelo e deixado em repouso até formação completa do precipitado. O precipitado (cor amarelo) foi filtrado sob vácuo e lavado com água destilada, deixando-o secar à temperatura ambiente seguido de recristalização em água/acetona. O rendimento bruto foi de 71 % (1.77 g, 0.0049 moles). O produto apresentou fluorescência verde sob exposição à luz UV 365 nm; Ponto de fusão (mp): 157-160 °C; <sup>1</sup>H-RMN (400 MHz, DMSO) δ 8.48 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H), 8.12 (dd, *J* = 21.1, 7.9 Hz, 2H), 7.63 (dd, *J* = 8.5, 2.2 Hz, 1H), 7.58 – 7.52 (m, *J* = 11.2, 4.1 Hz, 1H), 7.49 – 7.42 (m, 1H), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H); <sup>13</sup>C-RMN- APT (75 MHz, DMSO) δ 164, 156, 151, 140, 134, 130, 126, 126.4, 125, 122, 122, 117, 116; IR (KBr): 3500, 1625, 1500, 1250, 1040, 750 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z*: 227, 199, 173, 167.

- Síntese de derivado 2- (2'-hidroxifenil) benzoxazol substituído (HB-9)  
Nome IUPAC: ácido 4-hidroxi-3- (6-metilbenzo [d] oxazol-2-il)benzenossulfônico

Em um balão de 100 mL foram adicionados 2.64 g de ácido 5-sulfosalicílico **5** (0.0104 moles) e 1.28 g de 6-amino-*m*-cresol **3** (0.0104 moles) em 6 mL de ácido polifosfórico (PPA) e aqueceu-se a mistura a 180 °C sob agitação durante 4 horas. Em



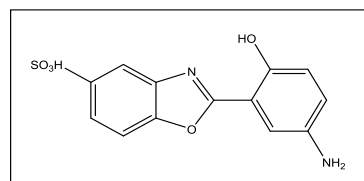
seguida a mistura reacional foi vertida em 200 mL de gelo e deixada em repouso até formação completa do precipitado. O precipitado (cor verde acinzentada) foi filtrado sob vácuo e lavado com água destilada, deixando-o secar a temperatura ambiente seguido de recristalização em água/acetona. O rendimento do produto puro foi de 16 % (0.51 g, 0.0017 moles). O produto apresentou fluorescência verde sob exposição à luz UV 365 nm; Ponto de fusão (mp): 136 - 137 °C; <sup>1</sup>H-RMN (300 MHz, DMSO) δ 7.98 (dd, *J* = 7.9, 1.6 Hz, 1H), 7.70 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.64 – 7.61 (m, 1H), 7.55 – 7.46 (m, *J* = 8.4, 7.3, 1.7 Hz, 1H), 7.26 (dd, *J* = 8.8, 0.7 Hz,

1H), 7.14 – 7.02 (m,  $J = 16.9, 8.3, 0.9$  Hz, 2H);  $^{13}\text{C}$ -RMN- APT (75 MHz, DMSO)  $\delta$  162, 158, 149, 137, 136., 134, 127, 126, 120, 118, 117, 111, 110, 21; IR (KBr): 3300, 3000, 2900, 1725, 1500, 1250, 1040, 850, 750  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$ : 302, 303, 304, 305 [ $\text{M}^+$ ], 307, 308, 309.

➤ Síntese de derivado 2- (2'-hidroxifenil) benzoxazol substituído (HB-11)

Nome IUPAC: ácido 2-(5-amino-2-hidroxifenil) benzo [*d*] oxazol-5-sulfônico

Em um balão de 100 mL foram adicionados 1 g de ácido 3-amino-4-hidroxibenzenosulfônico **4** (0.0065 moles) e 1.23 g de ácido 5-aminosalicílico **6** (0.0065 moles) em 4 mL de ácido polifosfórico (PPA). A mistura foi aquecida a 150 °C

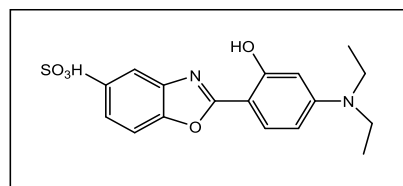


sob agitação durante 5 horas. O controle da reação foi feito por CCD extraíndo o produto da mistura reaccional com acetil acetato e usando como eluente diclorometano/metanol (1:1). À mistura reaccional adicionou-se acetona e ajustou-se o pH com carbonato de sódio até a formação de um precipitado cinzento. O precipitado foi filtrado sob vácuo e lavado com acetona, deixando-o secar a temperatura ambiente, seguido de recristalização em acetona. O rendimento do produto puro foi de 54 % (1.07 g, 0.0035 moles). O produto apresentou fluorescência verde sob exposição à luz UV 365 nm; Ponto de fusão (mp) > 300 °C;  $^1\text{H}$ -RMN (300 MHz, DMSO)  $\delta$  7.86 (t,  $J = 1.0$  Hz, 1H), 7.81 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H), 7.72 (d,  $J = 1.1$  Hz, 2H), 7.41 (dd,  $J = 8.9, 2.7$  Hz, 1H), 7.19 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H);  $^{13}\text{C}$ -RMN- APT (101 MHz, DMSO)  $\delta$  164, 156, 151, 140.04, 140.01, 134, 130, 127, 126, 125, 122, 117, 116; IR (KBr): 3400, 3050, 2600, 1625, 1400, 1250, 1100, 1040, 775, 700, 600  $\text{cm}^{-1}$ ; MS ( $m/z$ ): 307 ( $\text{MH}^+$ ), 279, 241, 227, 214, 198.

➤ Síntese de derivado 2- (2'-hidroxifenil) benzoxazol substituído (HB-13)

Nome IUPAC: ácido 2-(4-(dietilamino)-2-hidroxifenil) benzo [*d*] oxazol-5-sulfônico

Em um balão de 50 mL foram adicionados 1.2 g de ácido 3-amino-4-hidroxibenzenosulfônico **4** (0.00635 moles) e 1.22 g de 4-(dietilamino)salicilaldeído **7** (0.00635 moles) em 5 mL de ácido polifosfórico (PPA). A mistura



reaccional foi aquecida a 170 °C sob agitação durante 6 horas. Em seguida adicionou-se uma

mistura de dioxano/acetona (1:1) à mistura reacional. O precipitado formado (cor amarelo) foi filtrado sob vácuo e deixado secar à temperatura ambiente, seguido de recristalização em uma mistura de dioxano/acetona (1:1). O rendimento do produto bruto foi de 65 % (1.50 g, 0.0042 moles). O produto apresentou fluorescência laranja sob exposição à luz UV 365 nm; Ponto de fusão (mp): 248 (dec);  $^1\text{H-RMN}$  (400 MHz, DMSO)  $\delta$  8.67 (s, 1H), 8.50 (s, 1H), 7.48 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H), 7.30 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.23 (dd,  $J = 8.3, 2.1$  Hz, 1H), 6.80 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H), 6.24 (dd,  $J = 8.9, 2.4$  Hz, 1H), 5.93 (d,  $J = 2.3$  Hz, 1H), 3.42 – 3.33 (m, 4H), 2.51 (q,  $J = 3.6, 1.8$  Hz, 2H), 2.09 (s, 1H), 1.21 – 1.00 (m, 3H);  $^{13}\text{C-RMN - APT}$  (101 MHz, DMSO)  $\delta$  167, 157, 152, 134, 132, 124, 116, 115, 109, 104, 97, 63, 44, 31, 13; IR (KBr): 3450, 2900, 1600, 1500, 1350, 1250, 1040, 750  $\text{cm}^{-1}$ . MS (m/z): 307, 227, 198, 169.

## 6. CONCLUSÕES

Neste trabalho foram sintetizados cinco novos derivados benzazólicos fluorescentes (HB-6, HB-7, HB-9, HB-11 e HB-13) que propiciam mecanismo de transferência protônica intramolecular no estado excitado (ESIPT). Esses derivados apresentam intensa emissão de fluorescência em quase toda a faixa de luz visível (azul - laranja). Estudos fotofísicos foram efetuados em solventes de diferentes polaridades, tendo mostrado pequeno efeito solvatocrômico. Alguma variação na localização e na intensidade do máximo de absorção e de emissão de fluorescência foi verificada em função da polaridade do solvente, com deslocamento de *Stokes* variando de 31 a 116 nm e 67 a 207 nm para forma enol e ceto, respectivamente. Na ocorrência da dupla emissão de fluorescência, a banda localizada em maiores comprimentos de onda (para o vermelho) se refere à forma *cis*-ceto e a banda localizada em menores comprimentos de onda (para o azul) se refere à forma *cis*-enol e os demais confôrmeros estabilizados pelo solvente e que relaxam competindo com o mecanismo de ESIPT.

A confirmação da formação dos derivados benzazólicos fluorescentes foi feita por espectroscopia de ressonância magnética de próton e de carbono, espectroscopia na região de infravermelho e espectrometria de massa.

Os novos derivados benzazólicos fluorescentes sintetizados podem ser aplicados com sucesso para revelação de impressões digitais latentes em diferentes tipos de fitas adesivas. Além disso, o método desenvolvido para revelação de impressões digitais latentes mostrou-se ser muito sensível e seletivo, tendo corado apenas impressões digitais e não toda a superfície das fitas adesivas. O método mostrou-se muito eficiente mesmo quando se utilizou solução de corante numa concentração muito diluída. Todos os compostos sintetizados com exceção dos corantes HB-6 e HB-13 mostraram eficazes na revelação de impressões digitais latentes em todos os tipos de fitas adesivas processadas. O método desenvolvido não requer instrumentos complexos, nem requer pré ou pós-tratamento. Uma outra vantagem é o fato de esses reagentes serem solúveis em água, o que evita a utilização de solventes orgânicos, muitas vezes tóxicos, e que coloca em risco a saúde de quem os manuseia. A elevada estabilidade química e fotofísica, bem como o baixo custo associado a obtenção desses reveladores fazem com que o método seja muito versátil do ponto de vista de aplicação.

## Perspetivas Futuras

O estudo de aplicação desses novos derivados como reveladores de impressões digitais latentes em outras superfícies de interesse forense, tais como metal, plástico e vidro, também mostrou potencialidades, existindo assim, a possibilidades de dar continuidade a essa pesquisa.



Figura 40. Imagens de impressões digitais latentes reveladas com o corante fluorescente HB-7 em lata de refrigerante (esquerda) e em objeto de plástico (direita), sob luz ultravioleta - 365 nm.

Aplicação desses novos derivados como sondas biológicas parece ser mais uma área promissora para desenvolvimento futuro. Excelentes resultados de teste de diagnóstico de doenças em cavalo provocados por verminoses eqüinos foram obtidos com o uso dos corantes sintetizados neste trabalho.

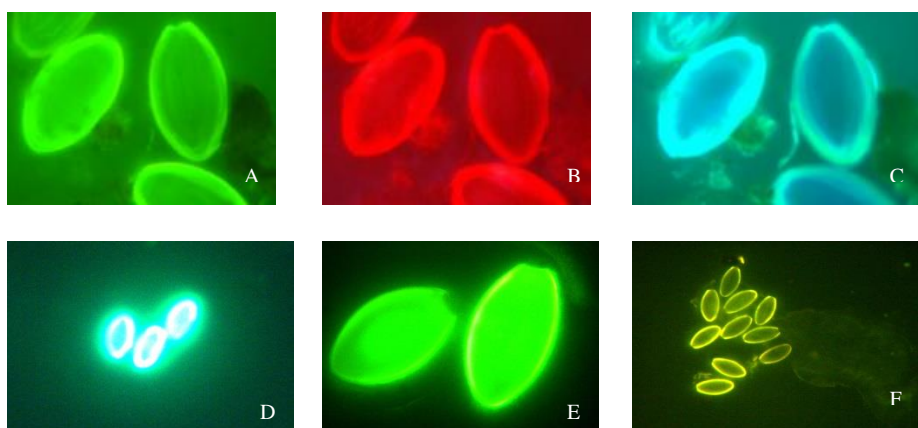


Figura 41. Imagens de oocistos de *Oxyuris equi* tratado com corante fluorescente HB-7, obtidos por microscopia de fluorescência. A, E - filtro UV; B - filtro vermelho; C, D - filtro azul.



## 7. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

1. VALEUR, B. **Molecular Fluorescence Principles and Application**. New York, Wiley VCH, 2001.
2. LAKOWICS, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 2<sup>a</sup> ed. New York, Kluwer academic, 1999.
3. Disponível em:  
<<http://www.olympusmicro.com/primer/java/jablonski/jabintro/index.html>>. Acesso em: 10 ago. 2013.
4. LUIZ, F. C. L. **Estudos de Fluorescência Estacionária e Resposta no Tempo de Anestésicos Locais e de Antibióticos da Classe Das Fluoroquinonas**. Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro - PUC - RIO, 2010.
5. Disponível em: <<http://andre-godinho-cfq-8a.blogspot.com.br/2013/06/espectro-eletromagnetico.html>>. Acesso em: 15 ago. 2013.
6. KUMAR, R. V. **Asian J. Chem.**, 16, 1241, 2004.
7. CHEN, W. H.; PANG, Y. **Tetrahedron Lett.**, 50, 6680, 2009.
8. YADAV, A. K.; KUMAR, M.; YADAV, T.; JAIN, R. **Tetrahedron Lett.**, 50, 5031, 2009.
9. HEIN, D. W.; ALHEIM, R. K.; LEAVITT, J. **J. Am. Chem. Soc.**, 79, 427, 1957.
10. MUKHOPADHYAY, C.; TAPASWI, P. K. **Tetrahedron Lett.**, 49, 6237, 2008.
11. HERAVI, M. M.; SADJADI, S.; OSKOOIE, H. A.; SHOAR, R. H.; BAMOHARRAM, F. F. **Catal. Commun.**, 9, 504, 2007.
12. NADAF, R.N.; SIDDIQUI, S. A.; DANIEL, T.; LAHOTI, R. J.; SRINIVASAN, K. V. **J. Mol. Catal.**, 214, 155, 2004.
13. SALEHI, P.; DABIRI, M.; ZOLFIGOL, M. A.; OTOKESH, S.; BAGHBANZADEH, M. **Tetrahedron Lett.**, 47, 2557, 2006.
14. SADEGHI, B.; NEJAD, M. G. **J. Chem.**, 1, 2013.

15. KANOKA, Y.; HAMADA, T.; YONEMITSU, O. **Chem. Pharm. Bull.**, 18, 1970. 587.
16. WRONSKI, M. **Roczniki Chemii**, 33, 1959. 809.
17. ACHESON, R. M. **An Introduction to the Chemistry of Heterocyclic Compounds**. 3 ed. ed. New York: John Wiley & Sons, 1977. 353 p.
18. STEPHENS, F. F. **Nature**, 164, 243, 1949.
19. DYSON, M. G.; STEPHENS, F. F. **Patent** CAN 47:12382; AN 1953: 12382 CAPLUS, 1952.
20. N. S. KOZLOV, V. S. P.; KISELEV, B. I. **Khimiya i Khimicheskaya Tekhnologiya**, 7, 610, 1964.
21. GITINA, R. M.; G. I. BRAZ, V. P. B.; YAKUBOVICH, A. Y. **Vysokomolekulyarnye Soedineniya**, 1535, 1966.
22. SO, Y.H.; HEESCHEN, J. P. **J. Org. Chem.**, 62, 3552, 1997.
23. HODD, K. A. **Thermal Analysis**, ICTA: Budapest, 2, 91, 1974.
24. GHAFFARI, F.; HODD, K. A. **Thermochim. Acta**, 41, 1980.
25. SO, Y. H., HEESCHEN, J. P.; MURLICK, C. L. **Macromolecules**, 28, 1995.
26. HOLLER, M.G., CAMPO, L.F., BRANDELLI, A.; STEFANI, V. **Photochem. Photobiol. Sci**, 149, 2002.
27. MASON, W. T. **In fluorescent and luminescent probes for biological activity. A practical guide to technology for quantitative real-time analyses**. 2ed. London, Academic Press, 1999.
28. ACUÑA, A.U.; AMAT-GUERRI, F.; COSTELA, A.; DOUHAL, A.; FIGUERA, J. M.; FLORIDO F., SASTRE, R. **Chem. Phys. Lett**, 89, 187, 1991.
29. UZHINOV, B. M.; DRUZHININ, S. I. **Russ. Chem. Rev.**, 67, 123, 1998.
30. HAUGLAND, R. P. **Handbook of fluorescent probes and research products**. 9ed. Eugene, Molecular Probes., 2002.
31. RODEMBUSCH, F. S., MEDINA, L. F., BRANDELLI, A.; STEFANI, V. **Photoch.**

- Photobio. Sc**, 254-259, 2005.
32. RETTING, W.; SHRADER, S.; SEIFERT, H. **Applied fluorescence in chemistry, biology and medicine**. Berlin, Springer-Verlag, 1999.
  33. LINS, G. O. W.; CAMPO, L. F.; RODEMBUSCH, F. S.; STEFANI, V. **Dyes Pigments**, 84, 2010.
  34. GRANDO, S. R.; PESSOA, C. M.; GALLAS, M. R.; COSTA, T. M. H.; RODEMBUSCH, F. S.; BENVENUTTI, E. V. **Langmuir**, 25, 13219, 2009.
  35. BOUNTIS, T. **Proton transfer in hydrogen-bonded systems**. New York, Plenum press, 1992.
  36. MIYAZAKI, T. **Atom tunneling and molecular structure**’, in **Atom tunneling phenomena in physics, chemistry and biology**. Berlin, Springer, 2004.
  37. FORMOSINHO, S. J.; ARNAUT, L. G. **Photochem. Photobio. A.**, 75, 21, 1993.
  38. CUKIER, R. I.; NOCERA, D. G. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, 49, 337, 1998.
  39. FREY, W.; LAEMER, F.; ELSAESSER, T. **Phys. Chem.**, 95, 10391, 1991.
  40. ARTHEN-ENGELAND, T.; BULTMANN, T.; ERNSTING, N.P. **Phys. Chem.**, 163, 43, 1992.
  41. RÍOS, M. A.; RÍO, M. C. **Phys. Chem. A**, 102, 1560, 1998.
  42. DOMINGUES, N. S.; KRUG, C.; LIVOTTO, P. R.; STEFANI, V. **Chem. Soc.**, 9, 1997.
  43. TAKARA, M. **Propriedade Óticas de Absorção e Emissão Fluorescente do Ácido Orto-Aminobenzóico e Derivados em Meio de Solvente**, Tese de doutorado, Univeridade Federal de São Paulo. Ribeirão Preto. 2006.
  44. BERARDI, M. **Análogos Fluorescentes de Agentes Anti-parasitários: Intenção com Agregados anfílicos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de São Paulo. Ribeirão Preto. 2010.
  45. ALBANI, J. R. **Principles and Applications of Fluorescence Spectroscopy**. New York, Blackwell, 2007.

46. MENZEL, E. R. **Fingerprint Detection with Lasers**. 1<sup>a</sup> ed. New York, Marcel Dekker, 1980.
47. KRASOVITSKII, B. M.; BOLOTIN, B. M. **Organic Luminescent Materials**, Weinheim, Wiley-VCH, 1988.
48. WIETHAUS, G. **Síntese e Caracterização de Novas Iminas com Aplicação em Óptica Não-Linear**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2010.
49. WILLIAMS, A. T. R.; WINFELD, S. S.; MILLER, J. N. **Analyst**, 108, 1067, 1983.
50. DHAMIL, S.; DE MELLO, A. J.; RUMBLES, G.; BISHOP, S. M.; PHILLIPS, D.; BEEBY, A. **Photochem. Photobiol.**, 61, 341, 1995.
51. RODEMBUSCH, F. S.; LEUSIN, F. P.; CAMPO, L. F.; STEFANI, V. **J. Lumin**, 126, 728, 2007.
52. NAGAOKA, S.; ITOH, A.; MUKAI, K. **Phys. Chem**, 97, 11385, 1993.
53. DAS, K.; SARKAR, S.; GHOSH, A. K.; MAJUMDAR, D.; NATH, D. N.; BHANACHARYA, K. J. **Phys. Chem.**, 98, 9126, 1994.
54. KLYMCHENKO, A. S.; PIVOVARENKO, V. G.; DEMCHENKO, A. P. **Phys. Chem. A**, 107, 4211, 2003.
55. SANTRA, S.; KRISHANAMOORTHY, G.; DOGRA, S. K. **Chem. Phys. Lett.**, 55, 311, 1999.
56. FORÉS, M.; DURAN, M.; SOLÀ M. **phys. Chem. A**, 103, 4525, 1999.
57. SANTRA, S.; DOGRA, S. K. **Chem. Phys**, 226, 285, 1998.
58. PURKAYASTHA, P.; CHATTAPADHYAY, N. **Mol. Sci.**, 4, 335, 2003.
59. PURKAYASTHA, P.; CHATTODHYAY, N. **Phys. Chem. Chem. Phys**, 3, 203, 2000.
60. NATH, D. N.; BHATTACHARYYA, K. **Phys. Chem.**, 98, 9126, 1994.
61. ARNAUT, L. **Photochem. Photobiol.** 75, 21, 1993.
62. LEWIS, L. W.; SANDORFY, C. **Chem.**, 60, 1727, 1982.

63. DOUHAL, A.; AMAT-GUERRI, F.; LILLO, M. P.; Acuna, A. U. **Photochem. Photobiol. A**, 78, 127, 1994.
64. ROBERTS, E. L.; WARNER, J. D. M. **Phys. Chem. A**, 101, 5296, 1997.
65. POTTER, C. A. S.; BROW, R. G. **Chem. Phys. Lett.**, 153, 7, 1988.
66. ARAÚJO, L. M. P. **Análise de Detecção de Fluorescência para Aplicação em Sistemas de Diagnóstico em Saúde**. Dissertação de Mestrado, Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Curitiba. 2010.
67. BASSI, A. B. M. S. Conceitos Fundamentais em Espectroscopia. **chemkeys**, 2001. Disponível em: <<http://chemkeys.com/br/2001/09/18/conceitos-fundamentais-em-espectroscopia/>>. Acesso em: 09 fev. 2014.
68. LEIGHTON, L. D.; SCHEHL, S. A.; TROZZI, Y. E.; WADE, C. **Processing Guide For Developing Latent Prints**. Laboratory Division Latent Print Unit 2501. Virginia, 2000.
69. XIANG-XIN, Z.; CHUN-GE, L. **J. Forensic Ident.**, 38, 277, 1988.
70. ASHBAUGH, D. R. **Quantitative-Qualitative Friction Ridge Analysis: An Introduction to Basic and Advanced Ridgeology**. Boca Raton, CRC Press, 1999.
71. LAMBOURNE, G. **The Fingerprint Story**. London, Harrap, 1984.
72. CUMMINS, H.; MIDLO, C. **Finger Prints, Palms and Soles: An Introduction to Dermatoglyphics**. New York, Dover Publications, 1961.
73. GALTON, F. **Finger Prints**. New York, MacMillan, 1892.
74. HERSCHEL, W. J. **The Origin of Finger-Printing**. Oxford, Oxford University press, 1916.
75. RHODES, H.; BERTILLON, A. **Father of Scientific Detection**. London, Abelard-Schuman, 1956.
76. HENRY, E. R. **Classification and Uses of Fingerprints**. 7 ed. London, H. M. Stationery Office, 1934.
77. HOLDER; H., E.; LAUB, J. H.; ROBINSON, L. O. **The Fingerprint Sourcebook**. U.S. Department of Justice Office of Justice Programs, [s.n.], 2002.

78. LEE, H. C.; GAENSSLEN, R. E. **Advanges in Fingerprint Technology**. 2<sup>a</sup> ed. Boca Raton, CRC Press LLC, 2001.
79. BRAMBLE, S. K.; BRENNAN, J. S.; SIEGEL, J.; P., SAUKKO; KNUPFER, G. Fingerprints (Dactyloscopy):Chemistry of Print Residue. **Encyclopedia of Forensic Science**, 862–869, 2000.
80. BERNIER, U. R.; KLINE, D. L.; BARNARD, D. R.; SCHRECK, C. E. **Anal. Chem.**, 72, 747, 2000.
81. BRUSILOW, S. W.; GORDES, E. H. **American J. Physiol.**, 214, 513, 1968.
82. MITCHELL, H. H.; HAMILTON, T. S. **Biol. Chem.**, 178, 345, 1949.
83. BAYFORD, F. **Fingerprint Whorld**, 1, 42, 1976.
84. SATO, K. **Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol**, 79, 51, 1979.
85. HADORN, B.; HANIMANN, F.; ANDERS, P.; CURTIUS, H.; HALVERSON, R. **Nature**, 215, 416, 1967.
86. ORO, J.; SKEWES, H. B. **Nature**, 207, 1042, 1965.
87. GOODE, G. C.; MORRIS, J. R. **Latente Fingerprints: A Review of Their Origin, Composition and Methods for Detection**. United Kingdom Atomic Weapons Reaserch Establishment, Aldermaston, [s.n.], 1983.
88. ROBINSOM, E. M. **Crime Scene Photography**. New York, Hardcover, 2007.
89. MILLER, L. S. **Police Photography**. 5<sup>a</sup> ed., Cincinnati, Anderson Publishing Company, 2006.
90. KENT, T. **Manual of Fingerprint Development Techniques**. 2<sup>a</sup>. ed. [S.l.]: Brightman & Stratton Ltd, 1998.
91. CHAMPOD, C. **Fingerprints and Other Ridge Skin Impressions**. New York: CRC Press LLC, 2004.
92. ODEN, S.; VON HOFSTEN, B. **Detection of fingerprints by the ninhydrin reaction**. **Nature**, 173.
93. LAMOTHE, P. J.; MCCORMICK, P. G. **Anal. Chem.** , 44, 821, 1972.

94. LENNARD, C. J. **New Amino Acid Specific Fingerprint Reagents**, Ph. D. thesis. Australia National University, Department of Chemistry. 1986.
95. LENNARD, C. J.; MARGOT, P.A; STOILOVIC, M.; WARRENER, R. N. **Forensic Sci.**, 32, 597, 1987.
96. POUNDS, C. A.; GRIGGS, R.; MONGKOLAUSSAVARATANA, T. **Forensic Sci.**, 35, 169, 1990.
97. GRIGG, R; MONGKOLAUSSAVARATANA, T.; POUNDS, C. A.; SIVAGNANAM, S. **Tetrahedron Lett.**, 31, 7215, 1990.
98. WILKINSON, D. **Forensic Sci. Int.**, 109, 87, 2000.
99. STOILOVIC, M. **Forensic Sci. Int.**, 60, 141, 1993.
100. MCCOMISKEY, P. **Fingerprint Whorld**, 16, 64, 1990.
101. POUNDS, C. A.; ALLMAN, D. S. The Use of 1,8-Diazafluoren-9-one for the Fluorescent Detection of Latent Fingerprint on Paper: Results of Laboratory and Operational Trials. Central Research and Support Establishment. Aldermaston, [s.n.], 1992.
102. LENNARD, C. J.; MARGOT, P. A. **Forensic Identification**, 38, 197, 1988.
103. KENT, T. **Manual of Fingerprint Development Techniques**. 1<sup>a</sup>. ed. London, Brightman & Stratton Ltd, 1986.
104. KENT, T. **Manual of Fingerprint Development Techniques**. 2<sup>a</sup>. ed. London, Brightman & Stratton Ltd, 1998.
105. JAMES, J. D. . P. C. A.; WILSHIRE, B. **Forensic Sci. int.**, 36, 1376, 1991.
106. JAMES, J. D. P. C. A.; WILSHIRE, B. **Forensic Identification**, 42, 531, 1992
107. WEAVER, D. E.; CLARY, E. J. A. **Forensic Identification**, 43, 481, 1993.
108. GELLER, B.; SPRINGER, E.; ALMOG, L. **Forensic Identification**, 48, 442, 1998.
109. JIAN, Z.; DAO-AN, G. **Forensic Sci.**, 52, 3, 1991.

110. MASTER, N. E. **Safety for the Forensic Identification Specialist**. 2<sup>a</sup> ed. Astoria, Lightning Powder Co, 2002.
111. MASTERS, N. E. **Forensic Identification**, 40, 265, 1990.
112. MASTERS, N. E. **Fingerprint Whorld**, 18, 62, 1992.
113. MCCARTHY, M. M. **Forensic Identification**, 40, 75-80, 1990.
114. OLENIK, J. H. Ardrex: an alternate solvent system. **Forensic Identification**, 42, 513, 1992.
115. HARDWICH, S. A.; KENT, T.; SEARS, V. G. **Fingerprint Detection by Fluorescence Examination: A guide to Operational Implementation**. Sandridge, U.K.: Home Office Police Scientific Development Branch, 1990.
116. MIDKIFF, C. R. **Developmen of prints on tape**. **Fingerprint Whorld**, 5, 20 1994.
117. MIDKIFF, C. R.; CODELL, D. E. **Fingerprint Whorld**, 21, 21 1995.
118. MIDKIFF, C. R.; CODELL, D.; CHAPMAN, J. **Fingerprint Whorld**, 23, 83, 1997.
119. TUTHILL, H. **Forensic Identification**, 47, 4, 1997.
120. GRAY, M. L. **Forensic Identification**, 46, 268, 1996.
121. CAMPOS, L. F. **Síntese, caracterização e aplicações de 2-[5'-(N-vinileno)-2'-hidroxifenil]benzazolas: compostos fluorescentes via transferência protônica induzida**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 1999.
122. SEO, J.; KIM, S.; PARK, S.; PARK, S. Y. **Bull. Korean Chem. Soc.**, 26, 1706, 2005.
123. TSOPELAS, C.; SUTTON, R. **J. Nucl. Med.**, 43, 2002. 1377.
124. BELITZ, H. D.; GROSCH, W.; SCHIEBERLE, P. **Food Chemistry**. 4 ed. Berlin, Springer, 2009.
125. WILBUR, D. S. **J. Nucl. Med.**, 44, 1540, 2003.
126. BOSSERS, L. C. A. M; ROUX, C.; BELL, M.; MCDONAGH, A. M. **Forensic Sci. Int.**, 220, 1, 2011.





Anexo 2. Espectros de  $^1\text{H}$ -RMN.

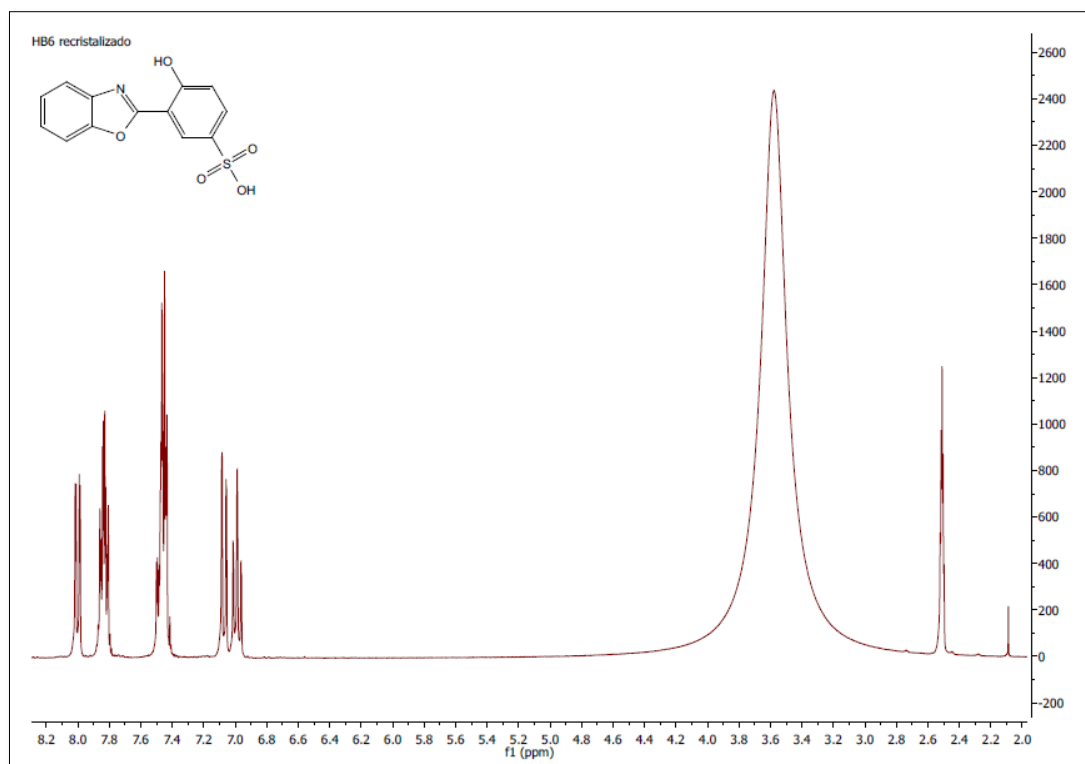


Figura 42. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-6.

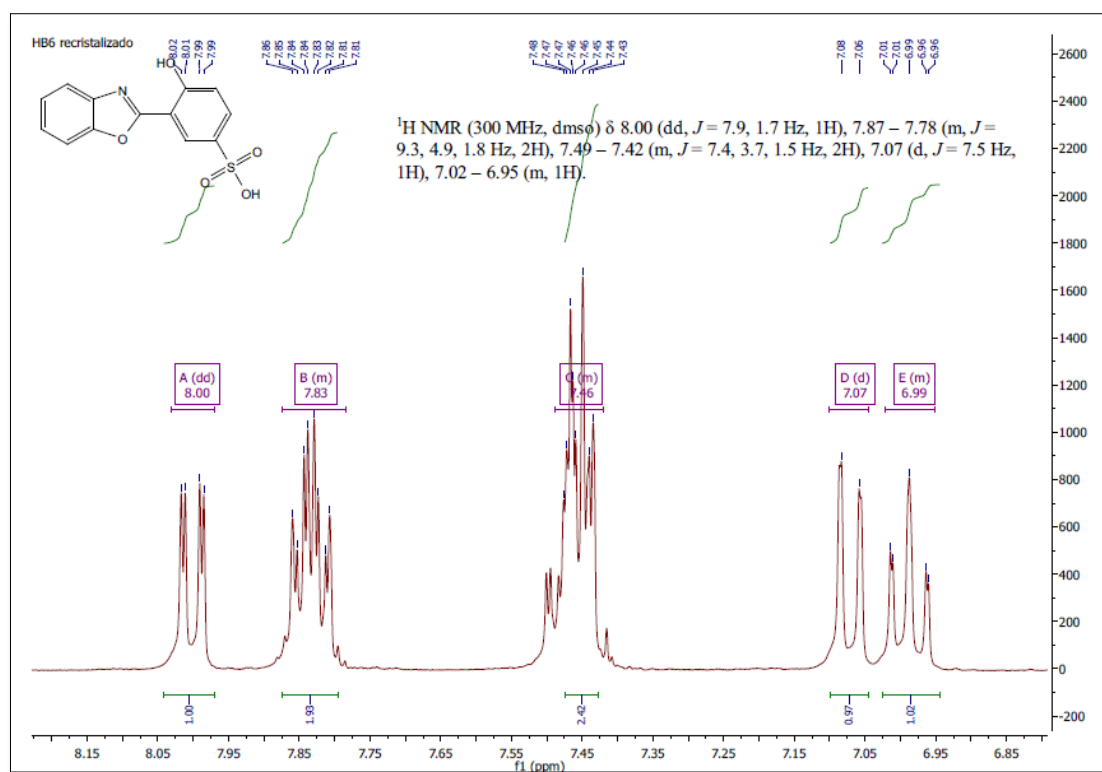


Figura 43. Expansão da região aromática do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-6.

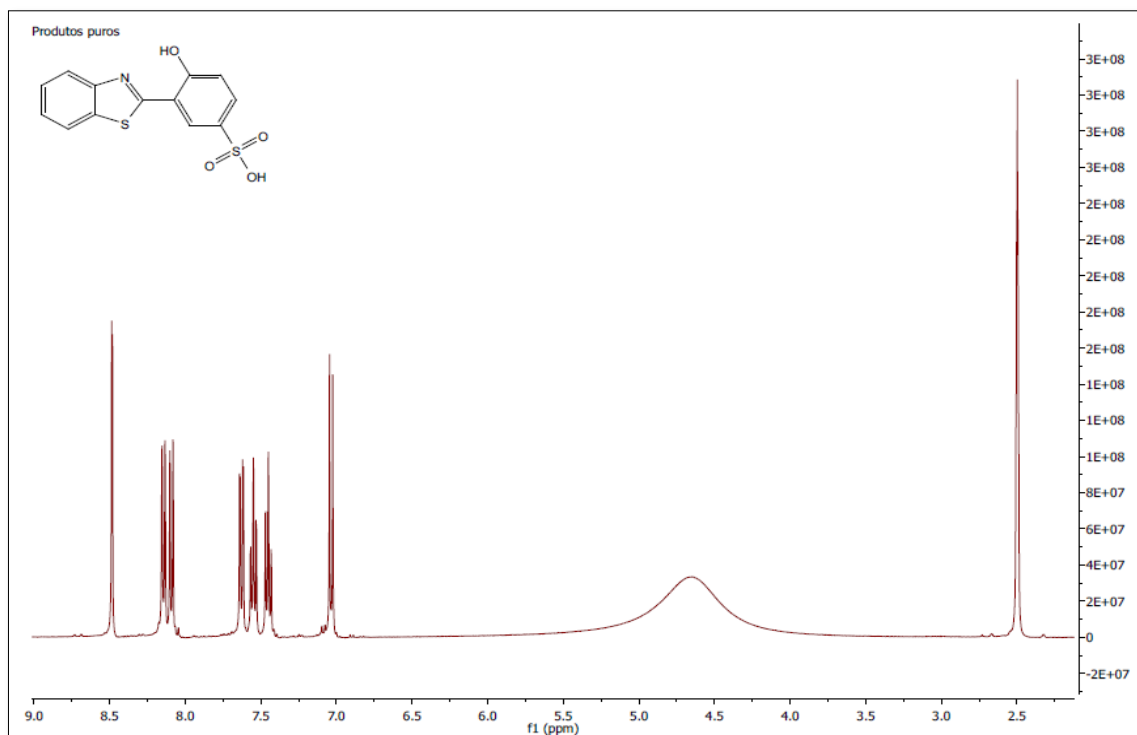


Figura 44. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-7.

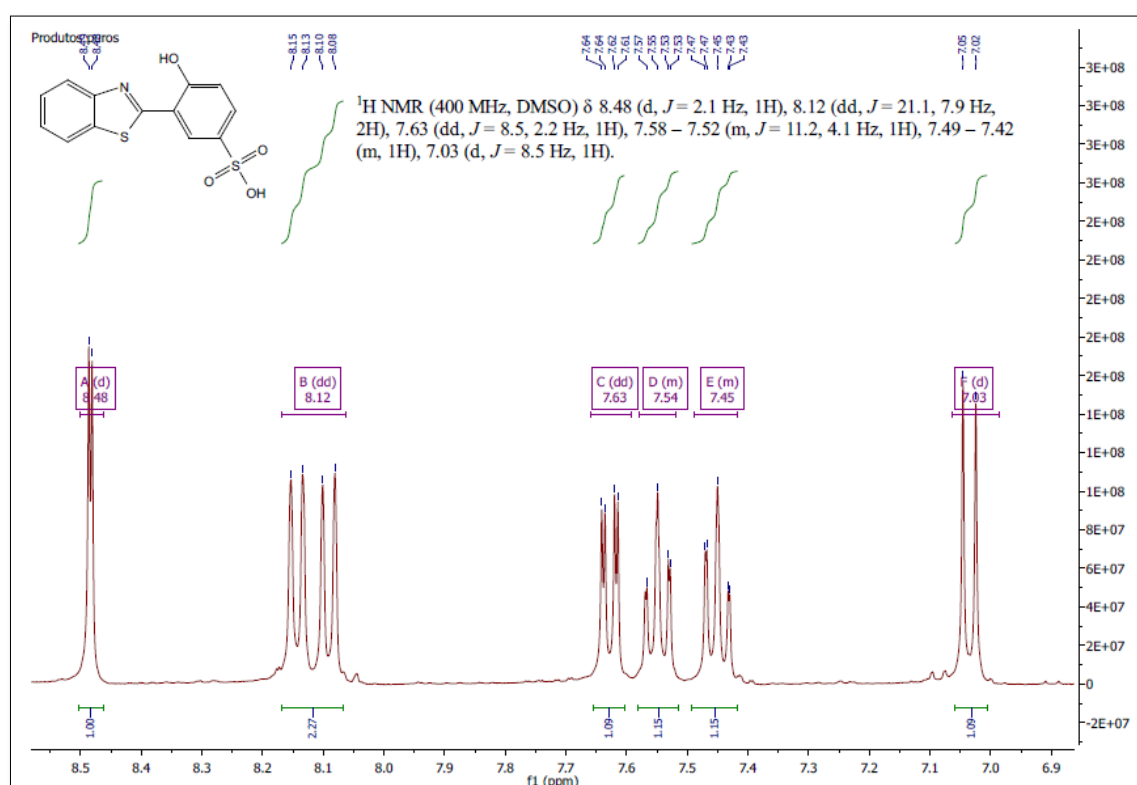


Figura 45. Expansão da região aromática do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-7.

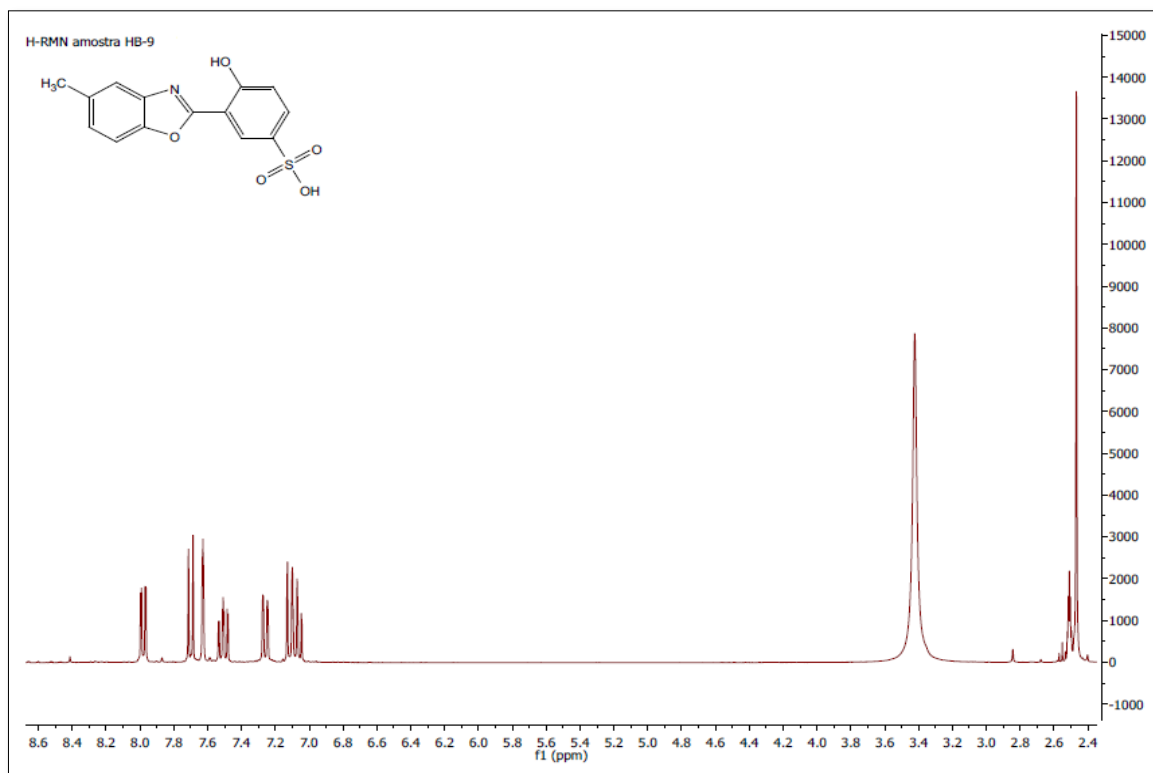


Figura 46. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-9.

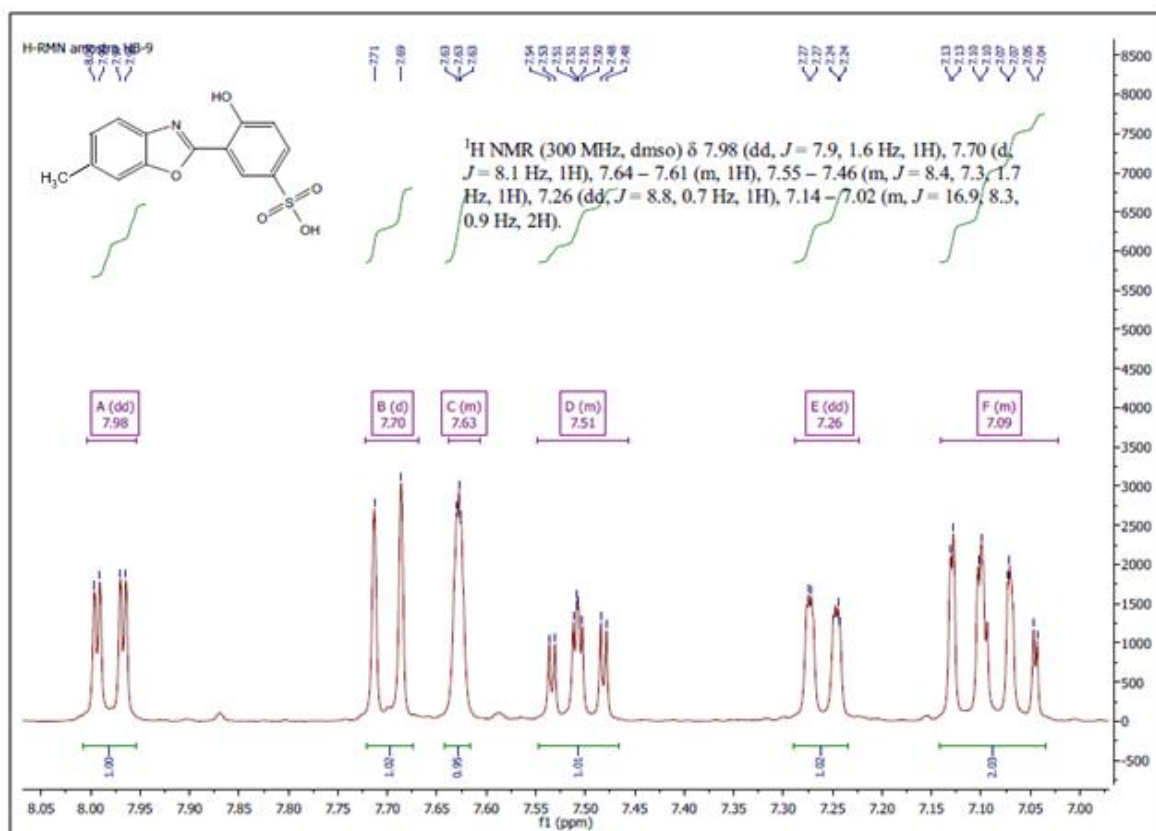


Figura 47. Expansão da região aromática do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-9.

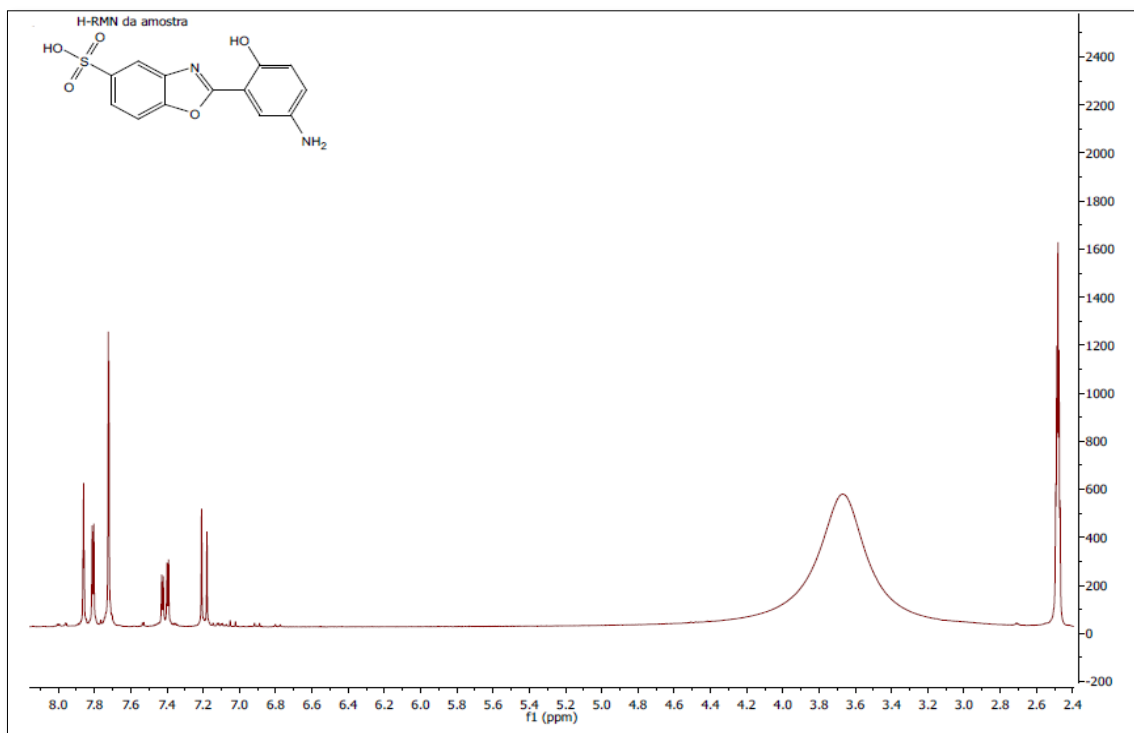


Figura 48. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-11.

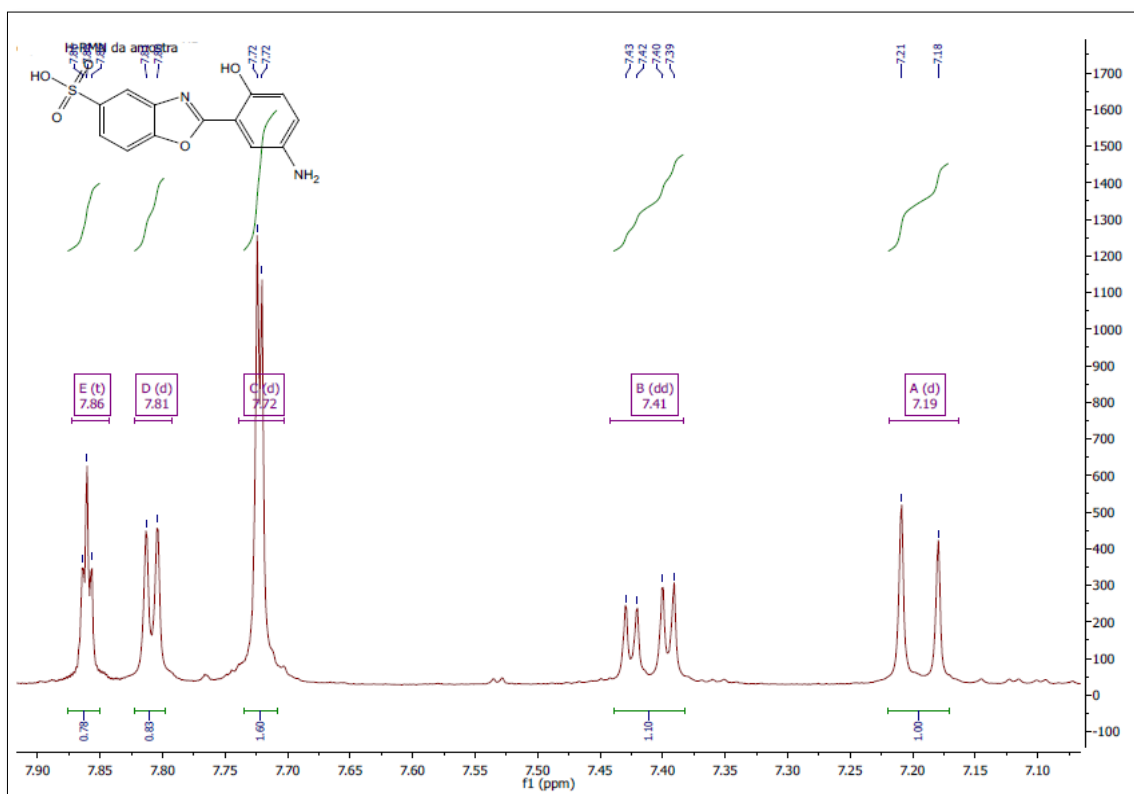


Figura 49. Expansão da região aromática do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-11.

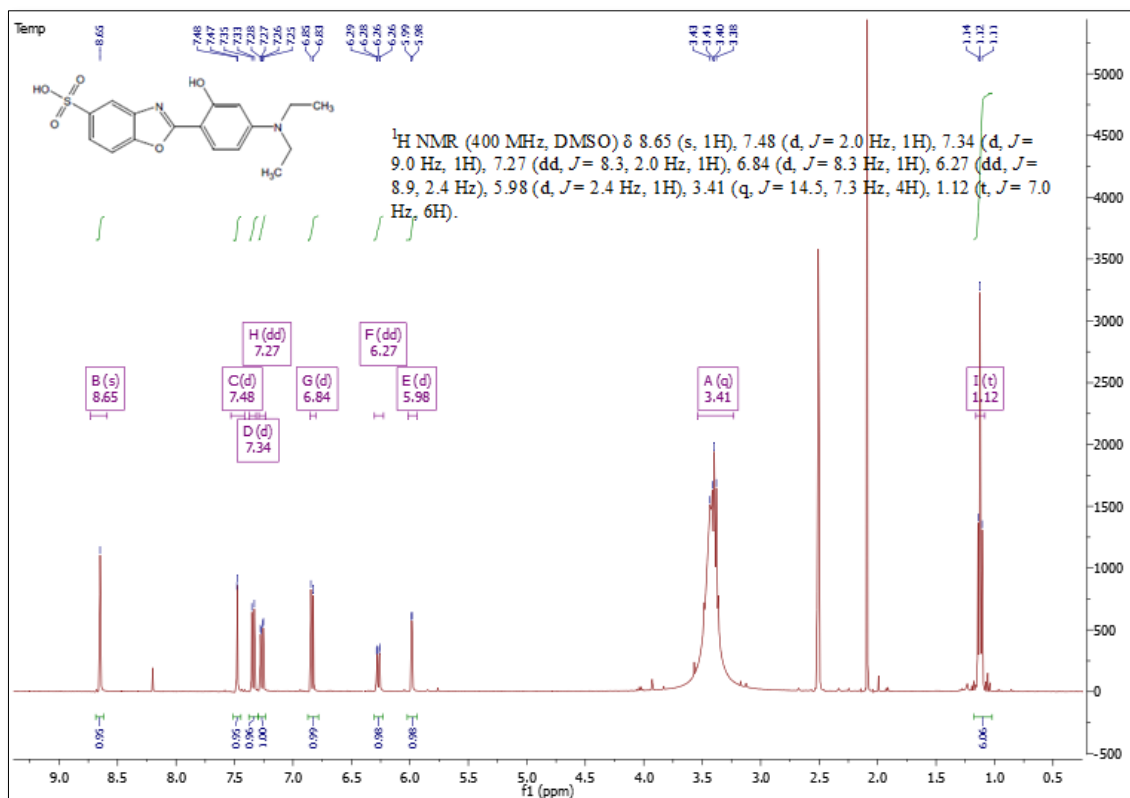


Figura 50. Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-13.

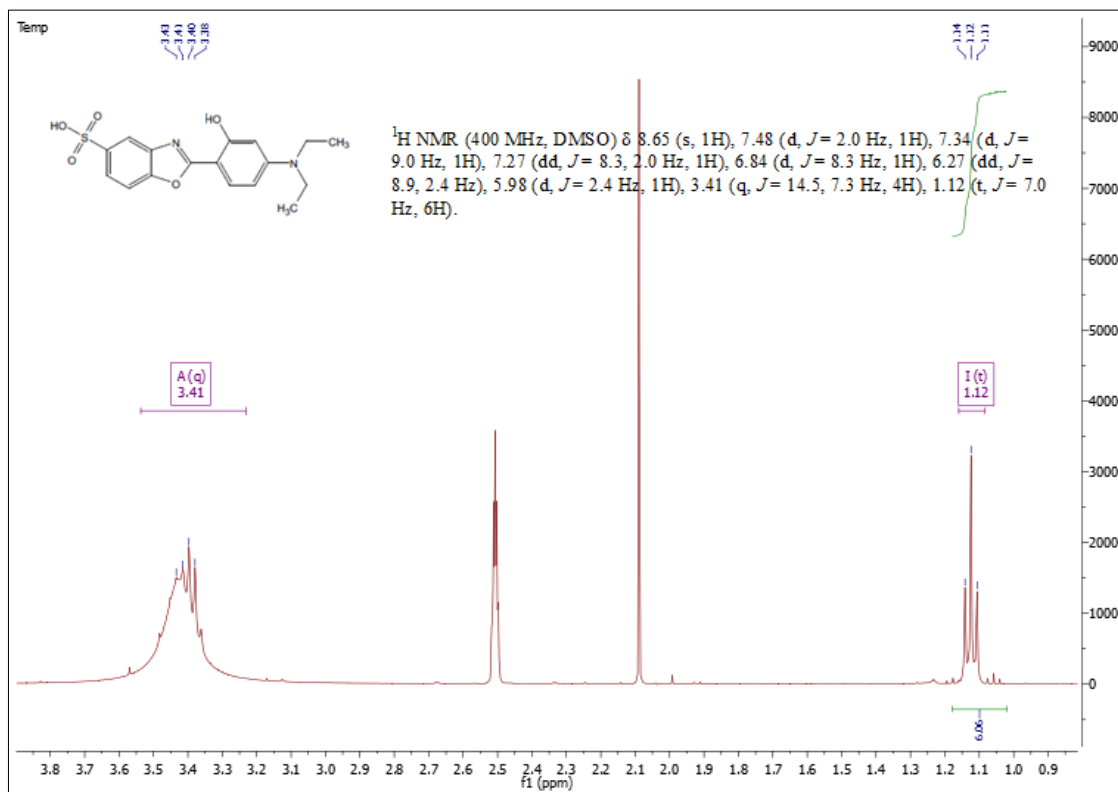


Figura 51. Expansão da região alifática do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-13.

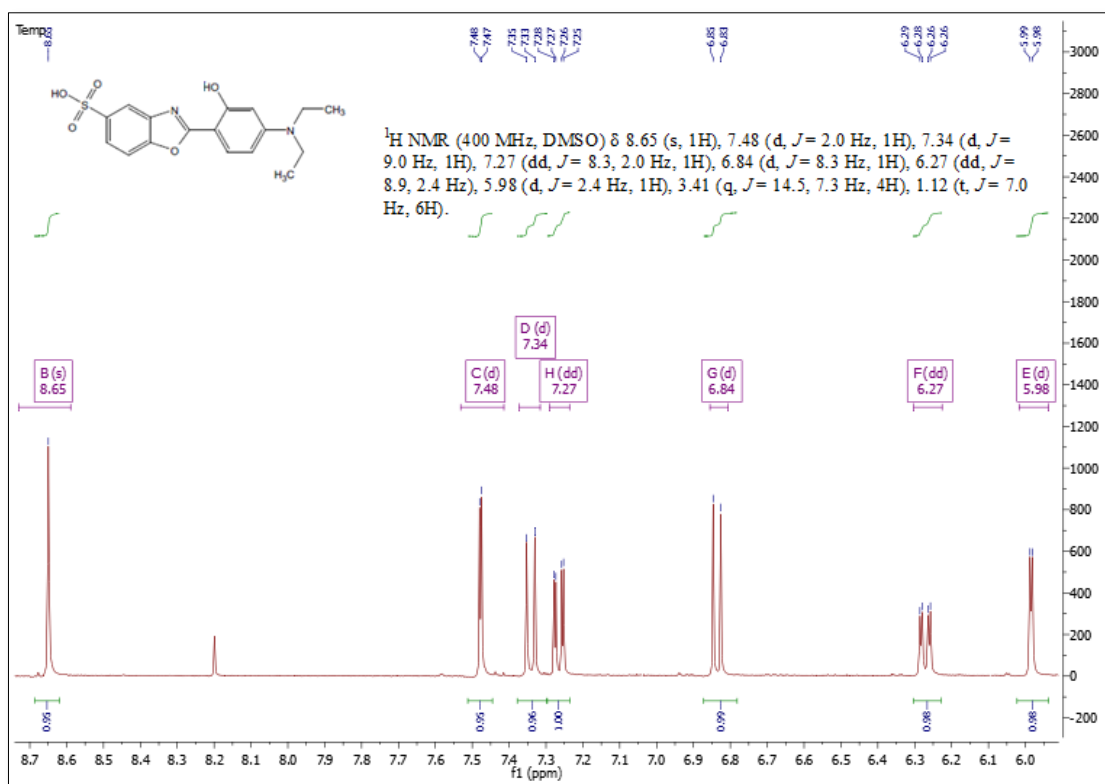


Figura 52. Expansão da região aromática do espectro de  $^1\text{H}$ -RMN do composto HB-13.

Anexo 3. Espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN APT.

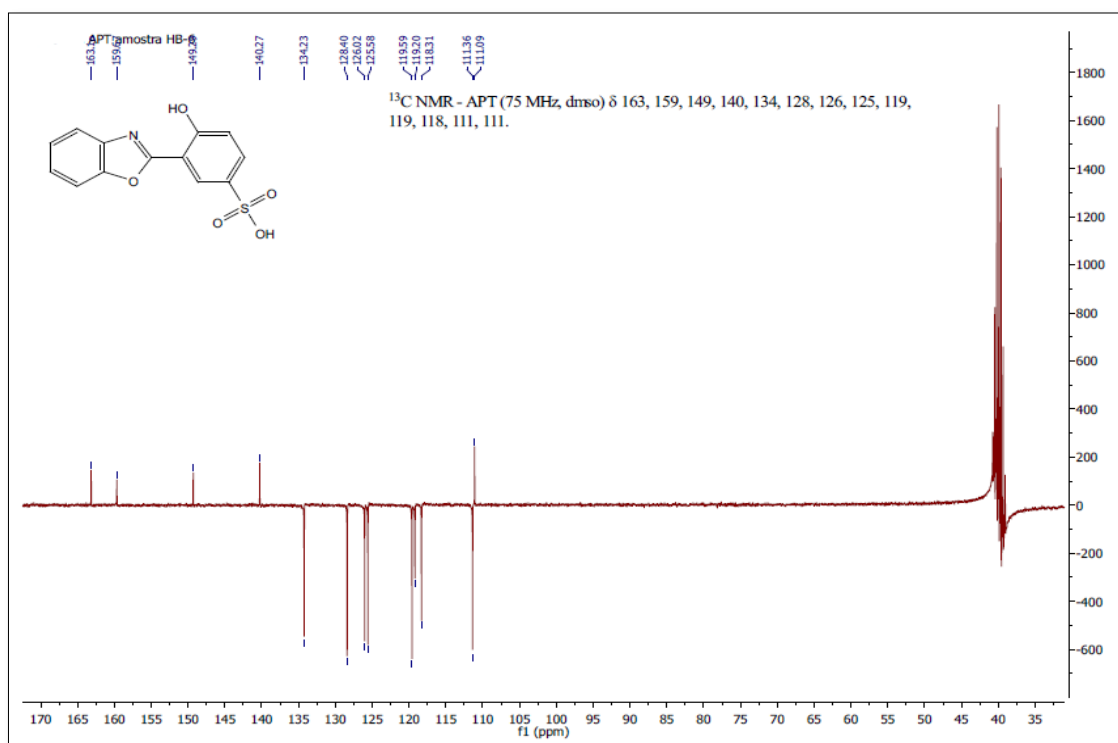


Figura 53. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN APT do composto HB-6.

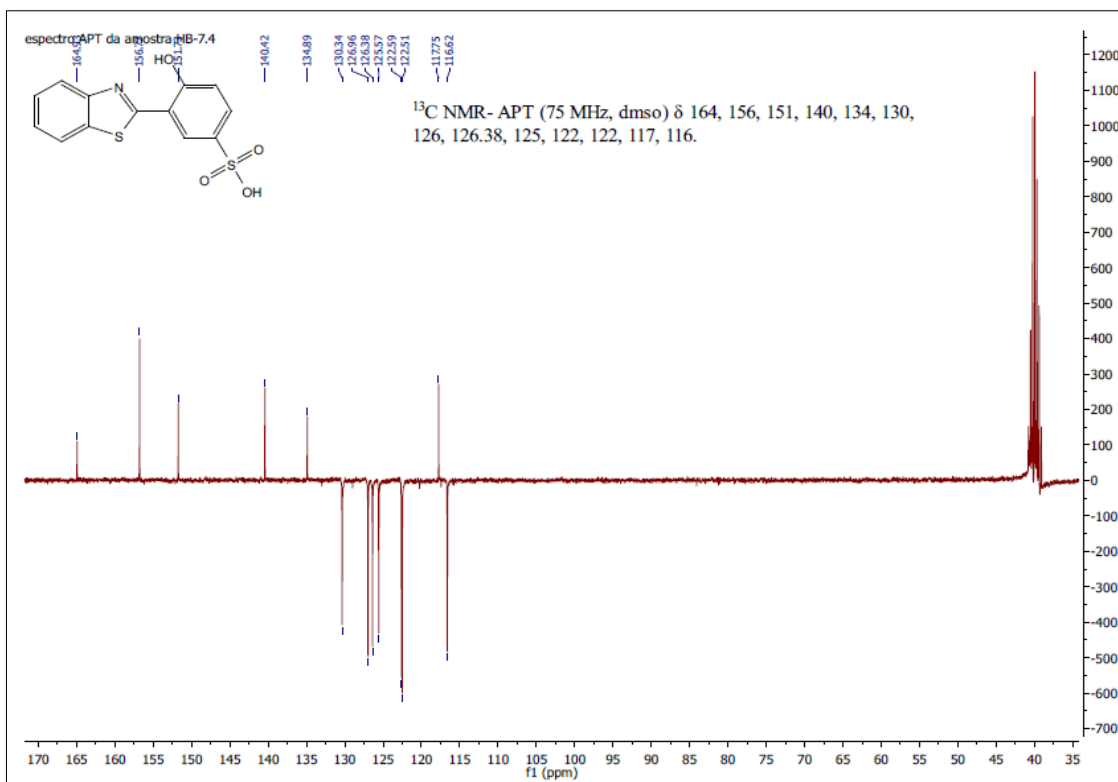


Figura 54. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN APT do composto HB-7

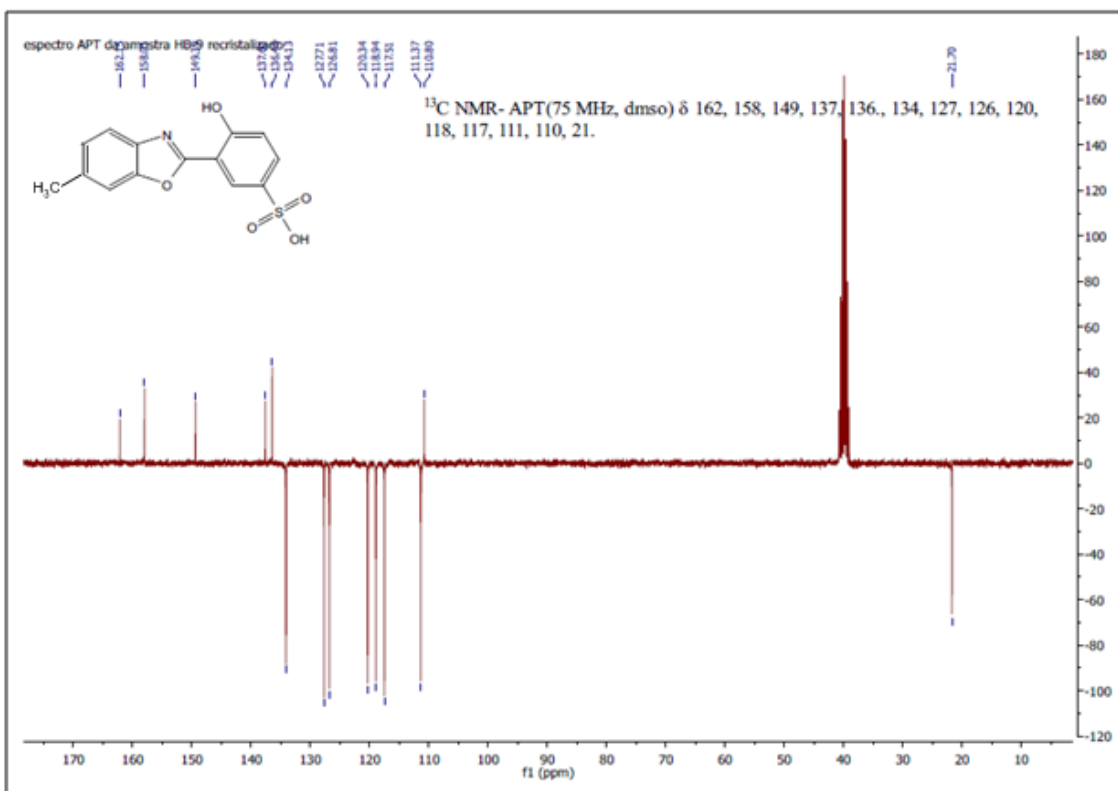


Figura 55. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN APT do composto HB-9.



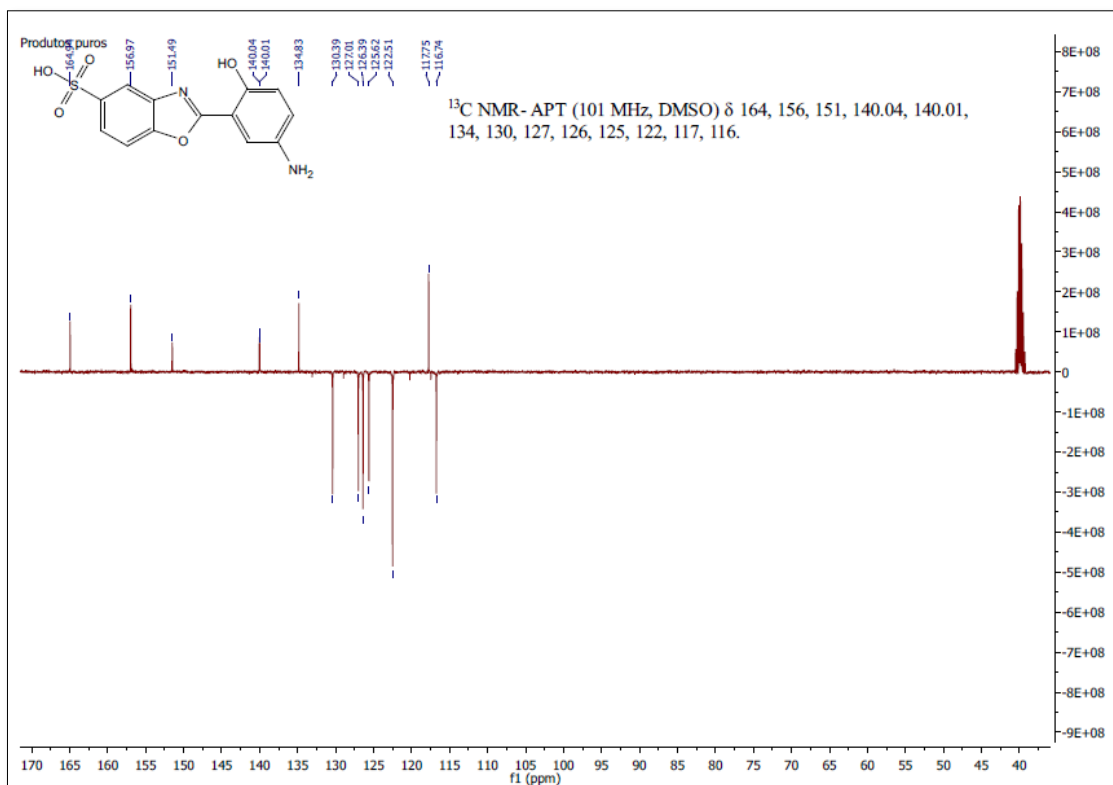


Figura 56. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN APT do composto HB-11.

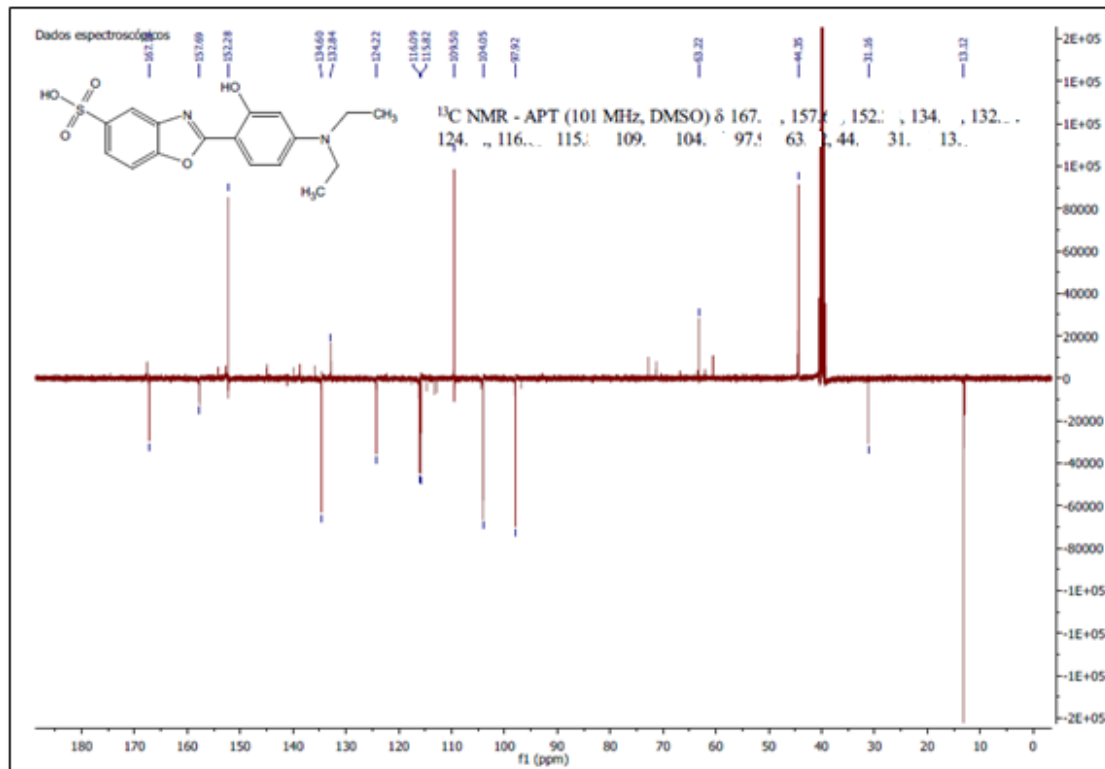


Figura 57. Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN APT do composto HB-13.

Anexo 4. Espectros de infravermelho.

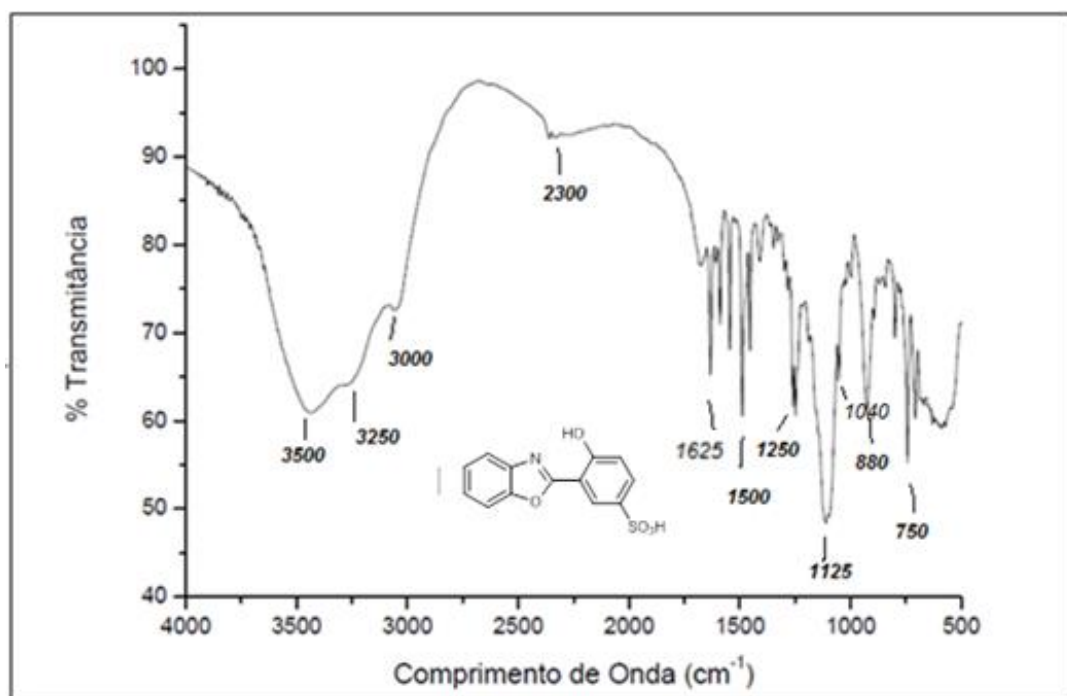


Figura 58. Espectro de infravermelho do composto HB-6.

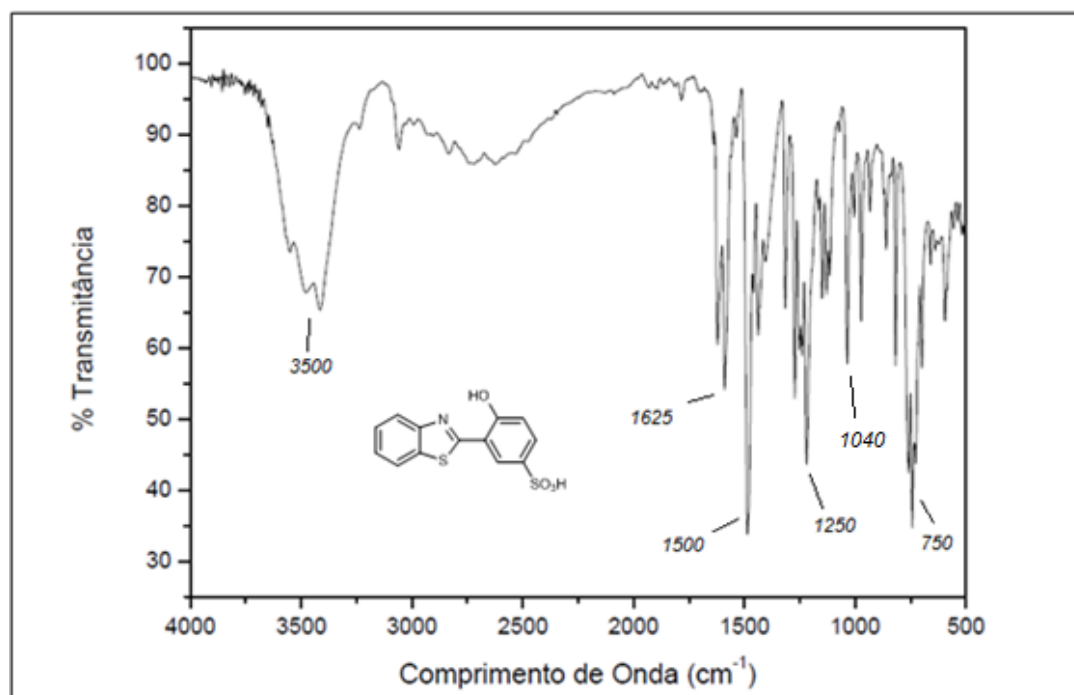


Figura 59. Espectro de infravermelho do composto HB-7.

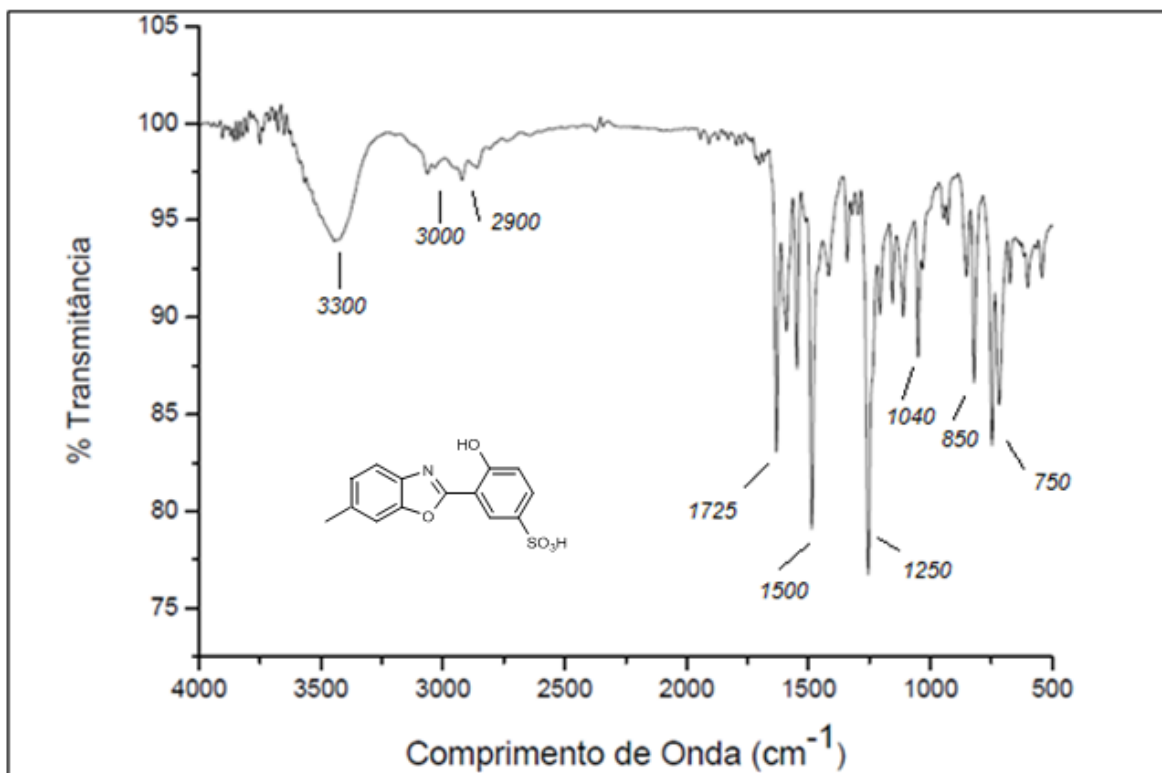


Figura 60. Espectro de infravermelho do composto HB-9.

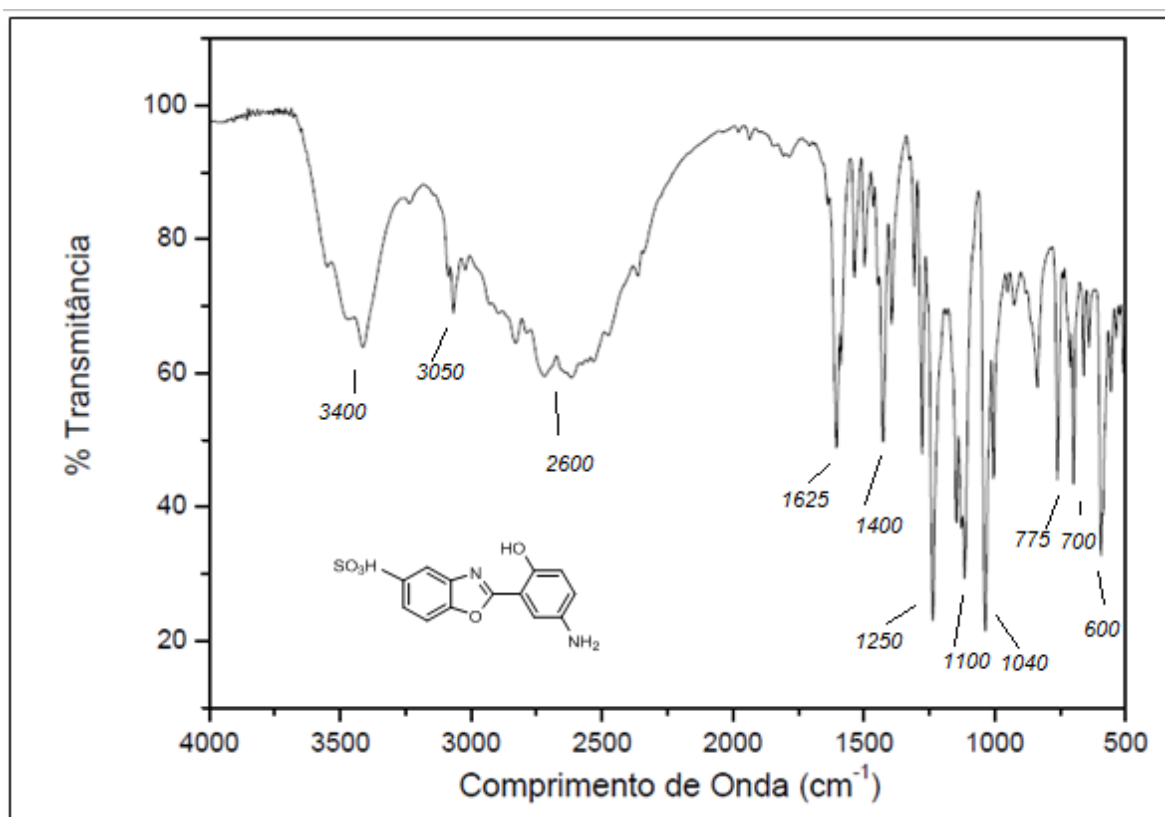


Figura 61. Espectro de infravermelho do composto HB-11.

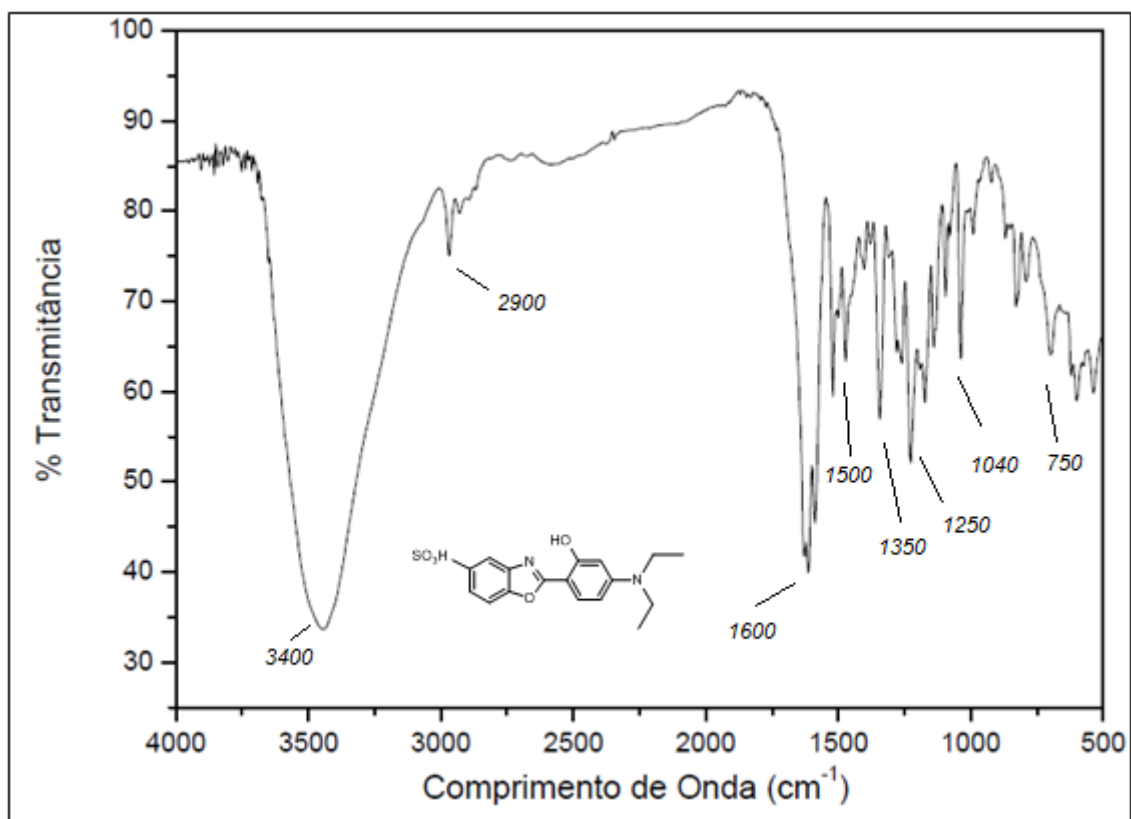


Figura 62. Espectro de infravermelho do composto HB-13.

#### Anexo 5. Espectros de massa

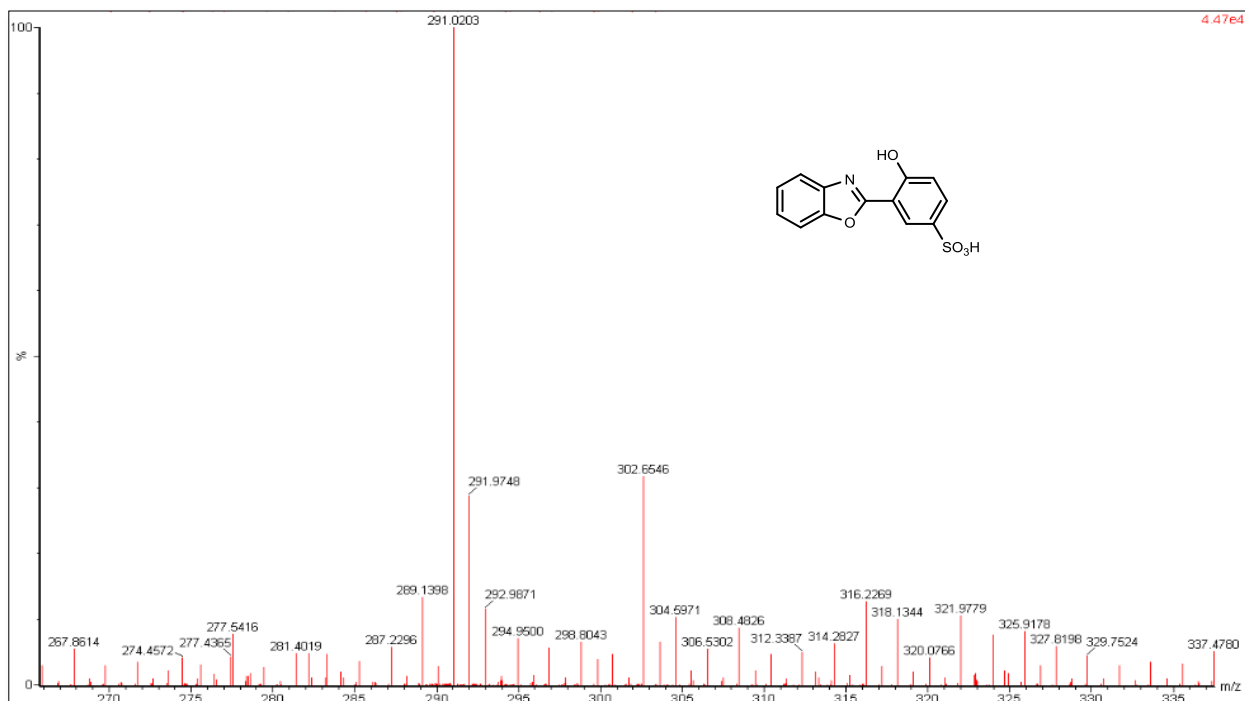


Figura 63. Espectro de massa do composto HB-6.

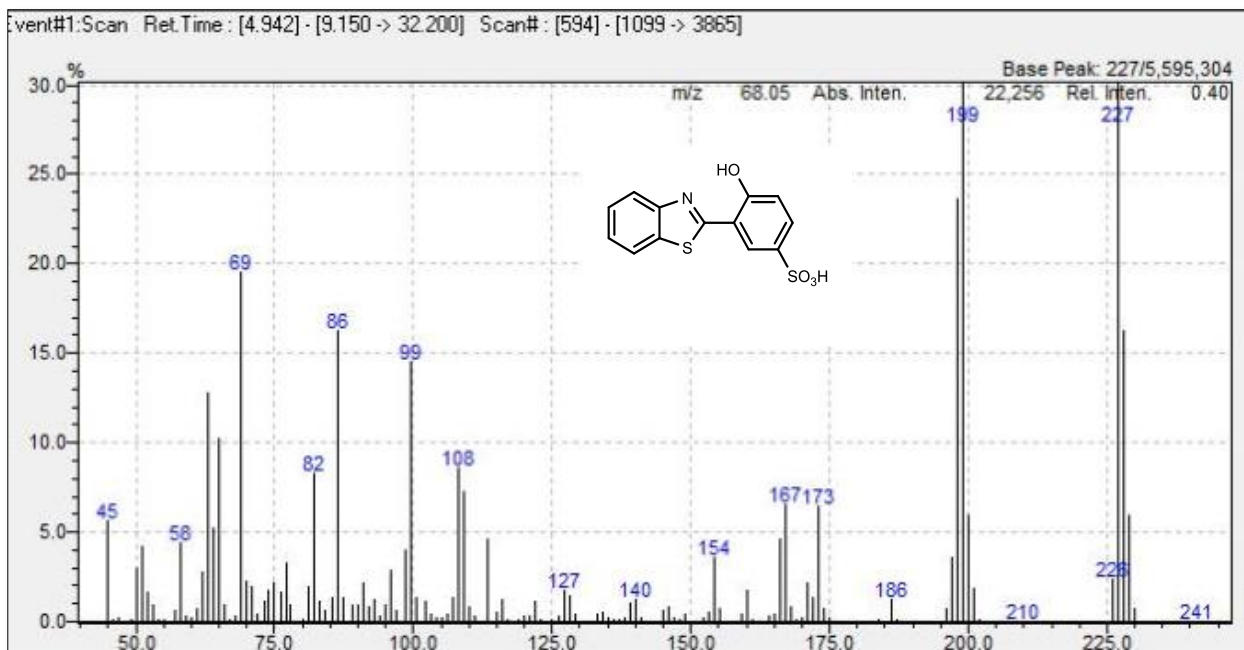


Figura 64. Espectro de massa do composto HB-7.



Figura 65. Espectro de massa do composto HB-9.

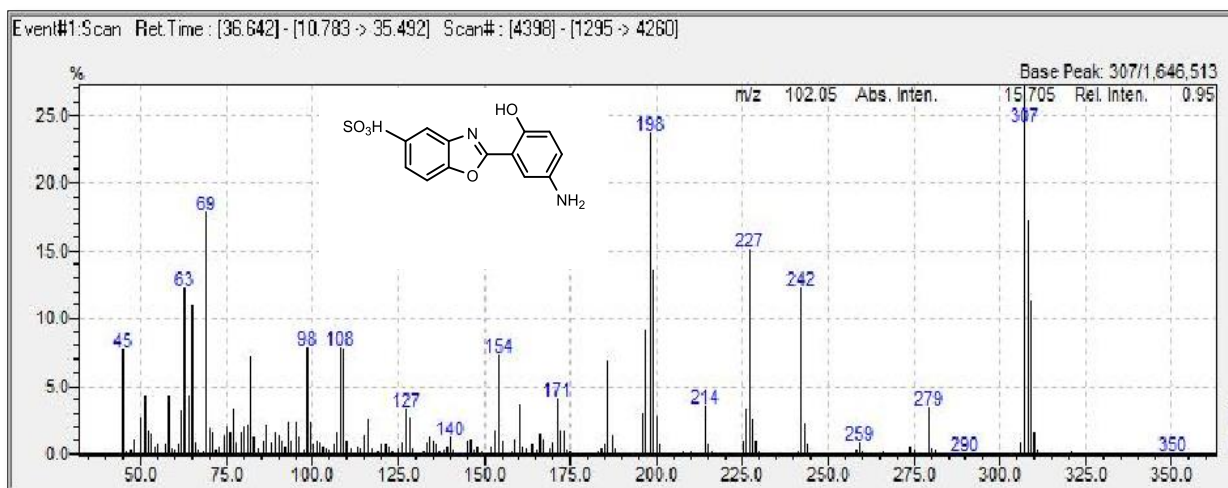


Figura 66. Espectro de massa do composto HB-11.

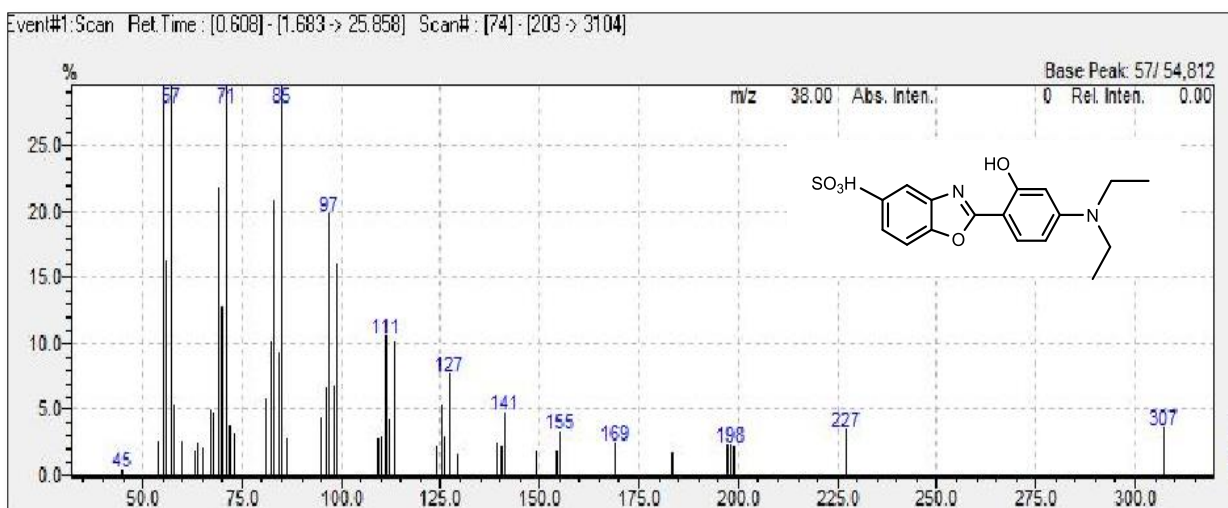


Figura 67. Espectro de massa do composto HB-13.