

Analiza strukturalno-spektroskopowa filmów DFO/PVA jako potencjalnych materiałów stosowanych podczas ujawniania śladów linii papilarnych na podłożach niechłonnych

Paulina Zygadło¹, Aneta Lewkowicz^{1*}

¹ Uniwersytet Gdański

* autor korespondencyjny: aneta.lewkowicz@ug.edu.pl

Streszczenie

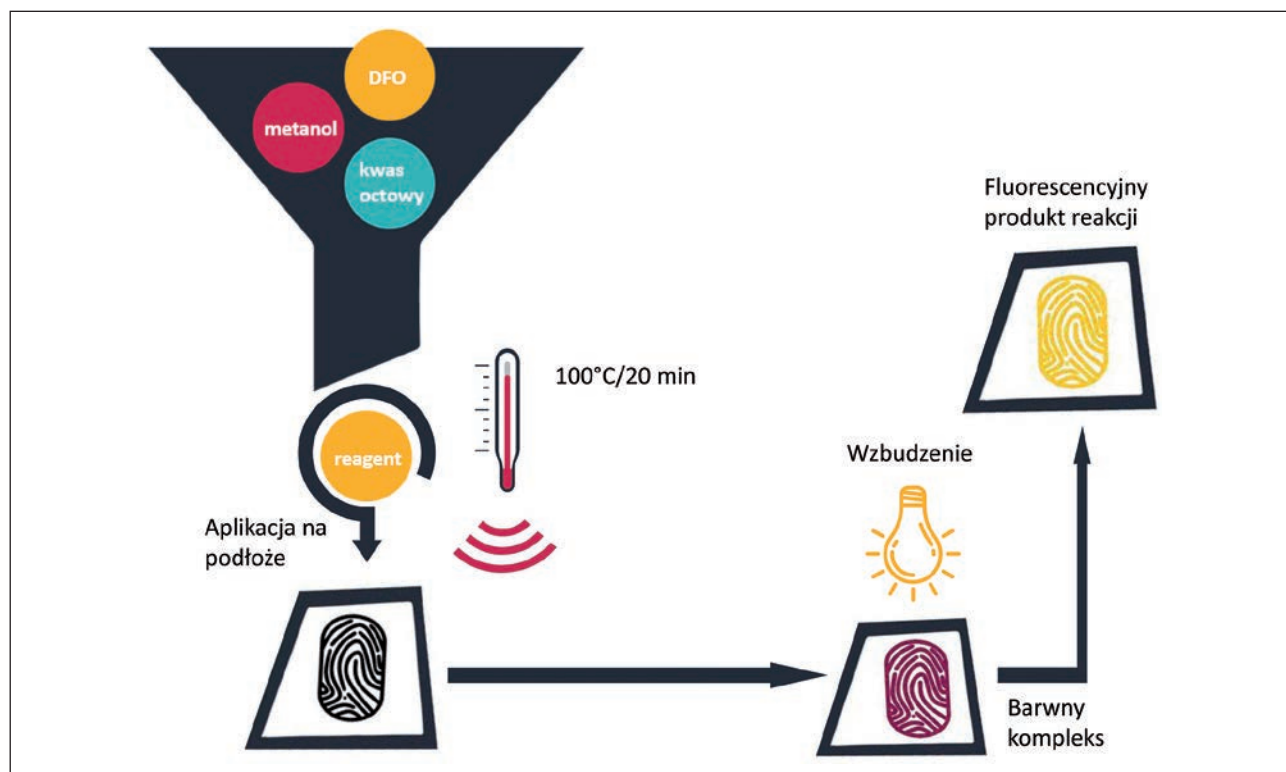
1,8-diazafluoren-9-on (DFO) to czuła sonda luminescencyjna ukierunkowana na α -aminokwasy. W badaniu wykorzystano jego właściwości fizykochemiczne do utworzenia polimerowych folii DFO/PVA. W rezultacie otrzymano materiały, w których DFO jest stabilny i reaktywny. Analiza spektroskopowa utworzonych filmów wykazała, że folie o najwyższym stężeniu DFO odznaczają się największą reaktywnością. Otrzymano nowoczesne materiały w postaci cienkich filmów DFO/PVA z potencjalnym zastosowaniem do ujawniania śladów linii papilarnych na podłożach niechłonnych.

Słowa kluczowe: folia polimerowa DFO/PVA, fluorescencja, linie papilarne

Wstęp

1,8-diazafluoren-9-on jest aromatycznym związkiem organicznym, który tworzy kompleks z α -aminokwasami, dając fluorescencyjny produkt reakcji (Petrovskaia i in., 2001). Dzięki temu od lat 90. XX wieku używany jest jako reagent do ujawniania śladów linii papilarnych,

przeznaczony na podłoża chłonne (D'Elia i in., 2015; Friesen, 2015). Roztwór DFO tworzony jest na bazie metanolu i kwasu octowego, ponieważ wzmacniają one efekt działania 1,8-diazafluoren-9-onu na ślady linii papilarnych (Costa Conn i in., 2001). Do wytworzenia roztworu DFO stosuje się bardzo wysokie stężenia



Ryc. 1. Procedura kryminalistyczna ujawniania śladów linii papilarnych za pomocą DFO.

1,8-diazafluoren-9-onu w ilości ok. 0,25g/L (tj. ok. 10^{-1} [mol/dm³]) (Bleay i in., 2018). Reagent aplikuje się, spryskując ślad lub zanurzając w nim badane podłoże (Ramotowski, 2013), a następnie ogrzewa w temperaturze ok. 100°C w czasie nieprzekraczającym 20 minut (Browarny, 2014) – rycina 1.

DFO jest cząsteczką o niskiej wydajności kwantowej fluorescencji (Lewkowicz i in., 2019). Jednocześnie molekuła ta jest wysoce reaktywna oraz selektywna dla α -aminokwasów, w rezultacie daje produkt o wysokiej wydajności kwantowej fluorescencji, co jest głównym celem obecnie stosowanej procedury kryminalistycznej służącej do ujawniania śladów linii papilarnych. Używanie bardzo wysokich stężeń głównego reagenta DFO może jednak skutkować obserwacją fluorescencji pochodzącej od asocjatów 1,8-diazafluoren-9-onu, a nie od kompleksu DFO z α -aminokwasami. Zjawisko to obserwowano już wcześniej wśród innych molekuł zdolnych do luminescencji, np. Rodaminy 6G (Lewkowicz i in., 2012; Lewkowicz i in., 2014). W przypadku ketonów aromatycznych wcześniejsze doniesienia literaturowe wskazują również na obecność dimerów tych molekuł, chociażby na skutek cykloaddycji do wiązania C=C w pierścieniu aromatycznym. Zjawisko przedstawiono jako efekt oddziaływania ketonów w stanie trypletowym, przykładowo w procesie dimeryzacji cykloheksanonu uczestniczy cząsteczka w stanie $^3(\pi, \pi^*)$ (Lam, Valentine, Hammond, 1967; Inhülsen, Kopf, Margaretha, 2008; Parthasarathy, Samanta, Ramamurthy, 2013). W niniejszym badaniu umieszczono molekułę DFO w innym nośniku niż obecnie stosowane w daktyloskopii roztwory. Materiałem, który może stanowić obiecującą matrycę dla DFO, jest alkohol poliwinylowy (PVA). PVA jest bezwonny, bezbarwny oraz nietoksycznym polimerem. Ma właściwości higroskopijne oraz jest materiałem biokompatybilnym i biodegradowalnym, dzięki czemu jest szeroko stosowany w medycynie (Yang i in., 2021; Liu i in., 2014). Dzięki zdolności do absorbowania wody utworzone z PVA filmy pęcznieją, co umożliwia uwolnienie zawartej w nich molekuły do środowiska (Yang i in., 2021); prawdopodobnie ten sam mechanizm pozwala na pochłonięcie cząsteczek ze środowiska do wnętrza polimeru.

Cel badań

Celem badań jest otrzymanie materiałów polimerowych o wysokiej trwałości i selektywności względem α -aminokwasów z możliwością potencjalnego zastosowania do podłoża zarówno chłonnych, jak i niechłonnych podczas ujawniania śladów linii papilarnych.

Materiały i metody

Sprzęt, wyposażenie i odczynniki chemiczne

Wszystkie odczynniki chemiczne użyte w badaniu były czystości analitycznej. Czysty spektroskopowo (zawartość barwnika 99%) 1,8-diazafluoren-9-on,

alkohol poliwinylowy oraz glicynę zakupiono od Aldrich (Sigma-Aldrich Monachium, Niemcy). Wodę dejonizowaną pozyskano z systemu HydroLab.

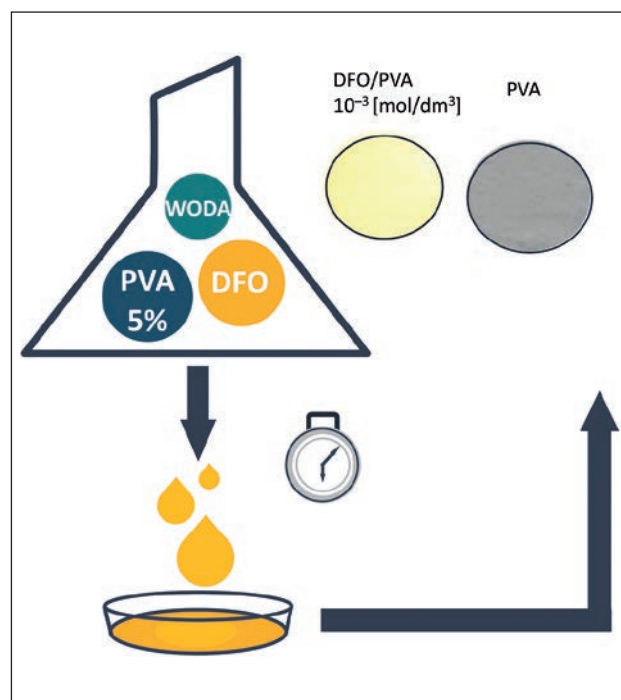
Widma Ramana uzyskano wraz ze zintegrowanym konfokalnym systemem mikro-Raman z LabRam Aramis (Horiba Jobin Yvon) Spektrometr 460 mm. Źródłem wzbudzenia jest laser HeNe półprzewodnikowy pompowany diodą (DPSS), emitujący czerwone światło przy 632 nm z mocą 50 mW. Widma absorpcji mierzono za pomocą spektrofotometru Shimadzu UVmini-1240. Fluorescencję wzbudzano za pomocą lampy UV UVITEC LF-206.LS LAMP 365/254NM 1X6W 230V EU oraz za pomocą oświetlacza, przy długości fali wzbudzenia 465 nm. Widma emisji uzyskano za pomocą spektrofluorymetru Horiba Jobin Yvon, model FluoroMax4TCSPC.

Przygotowanie folii PVA z zaincorporowanym DFO

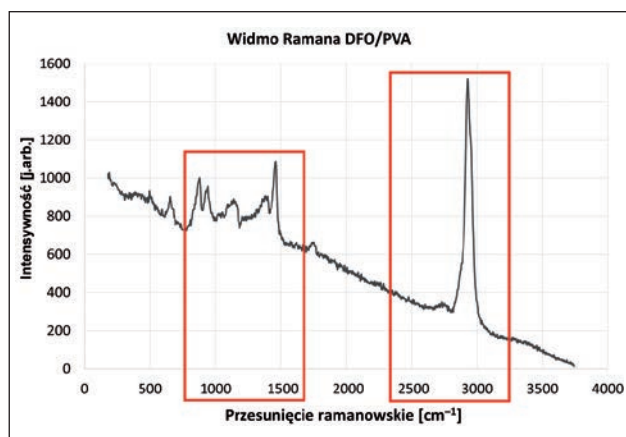
Na rycinie 2 przedstawiono schemat otrzymywania filmów polimerowych DFO/PVA. Filmy te powstały w procesie polimeryzacji w temperaturze pokojowej i ciśnieniu atmosferycznym. PVA i DFO rozpuszczono w wodzie demineralizowanej. Otrzymano następujące stężenia DFO w filmach PVA: 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³].

Analiza strukturalna

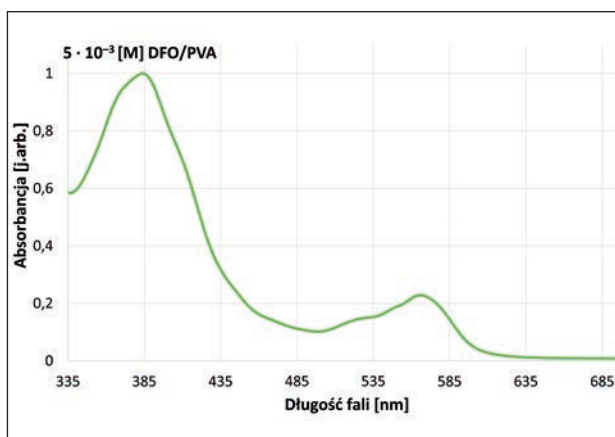
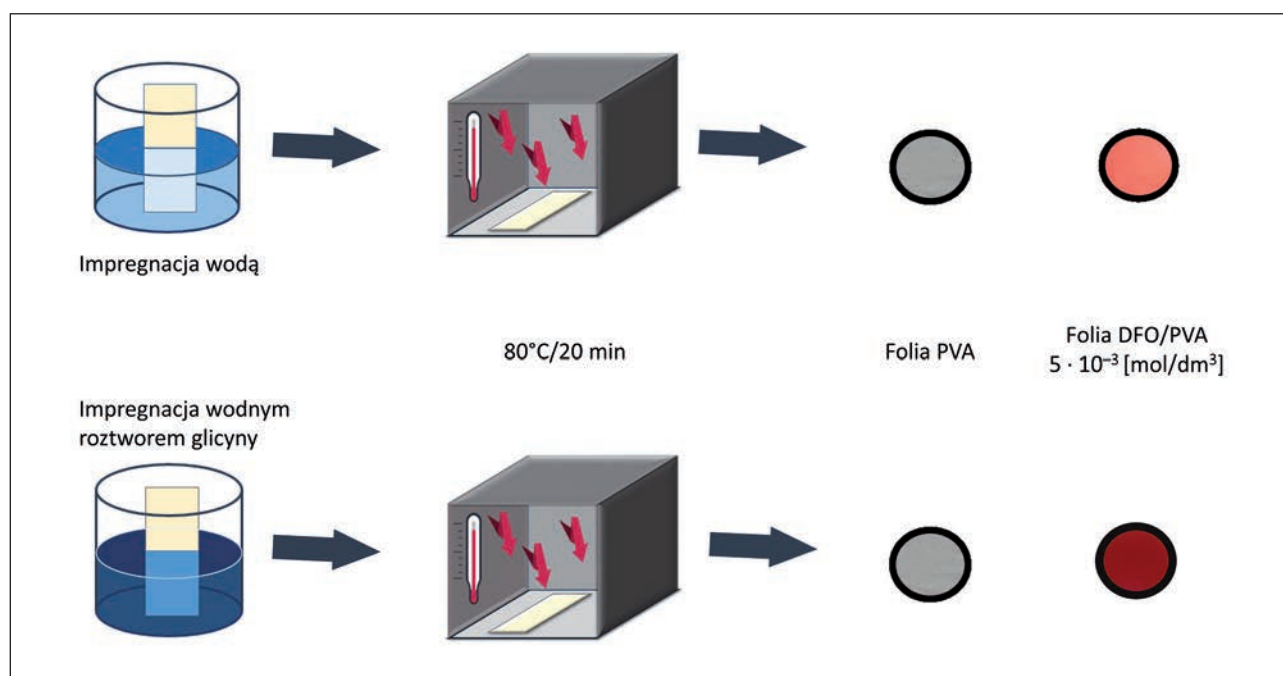
Rycina 3 pokazuje widmo Ramana dla folii PVA. Położenie pików ramanowskich na widmie jest charakterystyczne dla struktury tego polimeru, występują one pomiędzy 750–1500 cm⁻¹ oraz 2500–3500 cm⁻¹ (Publicspectra.com; Thomas, Stuart, 1997).



Ryc. 2. Schemat otrzymywania filmów polimerowych DFO/PVA.



Ryc. 3. Widmo Ramana folii DFO/PVA.

Ryc. 4. Widmo absorpcji folii DFO/PVA dla $c_{\text{DFO}} = 5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³].

Ryc. 5. Procedura impregnacji wodnym roztworem glicyny folii polimerowych DFO/PVA.

Pomiaru widm absorpcji folii DFO/PVA dokonano w temperaturze pokojowej i ciśnieniu atmosferycznym. Rycina 4 przedstawia widmo absorpcji dla najwyższego stężenia DFO w folii PVA i stanowi potwierdzenie obecności 1,8-diazafluoren-9-onu w matrycy PVA – charakterystyczne pasmo absorpcji z maksimum przy długości fali 385 nm. W przypadku najwyższych stężeń DFO (10^{-3} oraz $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³]) zaobserwowano występowanie drugiego pasma absorpcji z maksimum przy długości fali 570 nm. Pojawienie się dodatkowego pasma potwierdza powstawanie nowych struktur chemicznych, prawdopodobnie są to tzw. agregaty DFO.

Impregnacja folii DFO/PVA

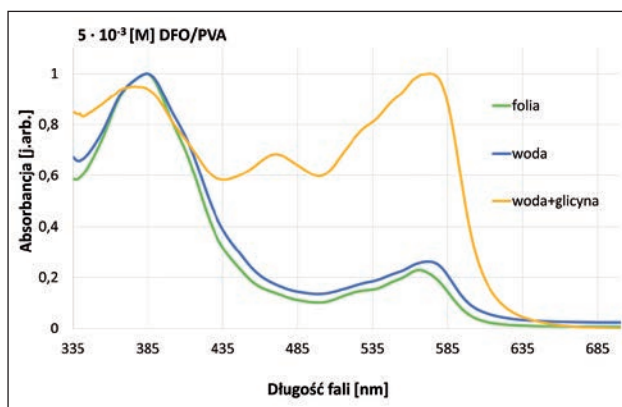
Folie DFO/PVA impregnowano w dwóch roztworach: woda (ślepa próba) oraz wodny roztwór glicyny

10^{-4} [mol/dm³]. Każdą z próbek zanurzano na 30 sekund w roztworze, a następnie wygrzewano w piecu – rycina 5. Folie DFO/PVA o wysokich stężeniach, tj. 10^{-3} oraz $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³], które zostały zaimpregnowane wodnym roztworem glicyny, zmieniły kolor na purpurowy.

Analiza spektroskopowa

Po impregnacji dokonano pomiaru widm absorpcji folii DFO/PVA w zakresie spektralnym 250–700 nm, a następnie porównania widm absorpcji folii o najwyższym stężeniu $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] impregnowanych w wodzie, w wodnym roztworze glicyny 10^{-4} [mol/dm³], a także niepoddanych impregnacji – rycina 6.

Na widmie absorpcji ponownie widoczne są dwa pasma absorpcji dla próbki niepoddanej impregnacji

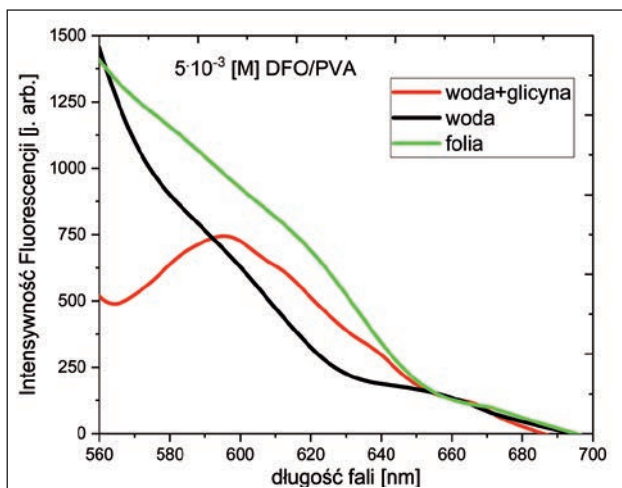


Ryc. 6. Widmo absorpcji folii DFO/PVA dla $c_{\text{DFO}} = 5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³].

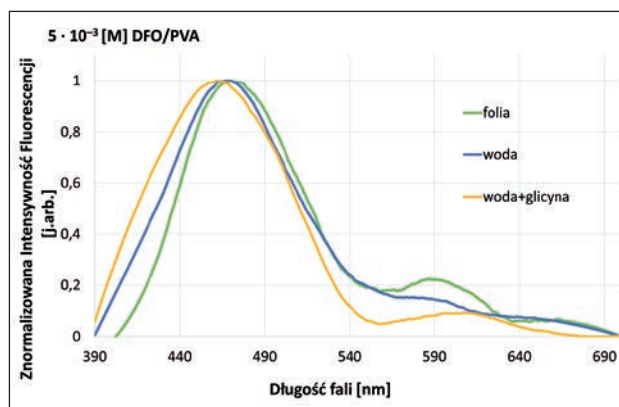
oraz impregnowanej wodą. W próbce impregnowanej glicyną widoczne są trzy pasma. Dwa skrajne pasma absorpcji są wspólne dla wszystkich folii: pierwsze z maksimum przy długości fali 385 nm oraz ostatnie z maksimum przy długości fali ok. 570 nm. Środkowe pasmo absorpcji charakterystyczne jest jedynie dla próbki impregnowanej wodnym roztworem glicyny z maksimum przy długości fali 470 nm – specyficzne dla kompleksu DFO z α -aminokwasami.

Próbki otrzymane po impregnacji oświetlono lampą UV: 365 nm oraz oświetlaczem 465 nm. Folie DFO/PVA zaimpregnowane wodnym roztworem glicyny wyświecają dla stężeń 10^{-4} , 10^{-3} oraz $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³]. Fluorescencja była widoczna również dla stężenia $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA po zaimpregnowaniu folii wodą.

W foliach DFO/PVA po impregnacji wodnym roztworem glicyny wraz ze wzrostem stężenia rośnie intensywność emisji – tabela 1 i 2. Porównując filmy dla stężenia $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA, obserwuje się zbliżoną emisję mimo różnej impregnacji. Cechą



Ryc. 8. Widmo fluorescencji folii DFO/PVA dla najwyższego stężenia $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 470 nm.



Ryc. 7. Widmo fluorescencji folii DFO/PVA dla najwyższych stężeń $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 380 nm.

nieznacznie różnicującą folie jest barwa emitowanego światła oraz intensywność emisji badanych filmów. W próbkach wzbudzanych przy 365 nm wraz ze wzrostem stężenia pojawia się barwa żółtopomarańczowa. Folia $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA impregnowana w wodzie wyświeca na żółto, podczas gdy folia impregnowana w glicynie na pomarańczowo. Natomiast dla próbek o najwyższym stężeniu przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 465 nm barwa jest bardziej intensywna niż przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 365 nm – pomarańczoworóżowa przy impregnacji wodnym roztworem glicyny.

Na rycinie 7 zestawiono widma fluorescencji filmów $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA dla poszczególnych impregnacji. Na widmie widoczne są dwa pasma fluorescencji. Maksimum pierwszego pasma fluorescencji znajduje się przy długości fali 460 nm dla impregnacji wodnym roztworem glicyny i przesunęła w stronę długofalową do 470 nm dla pozostałych folii. Nie zaobserwowano istotnych zmian w profilu widmowym fluorescencji dla pierwszego pasma. Drugie pasmo fluorescencji ma maksimum przy długości fali ok. 590–613 nm, najlepiej widoczne jest dla folii DFO/PVA niepoddanej impregnacji.

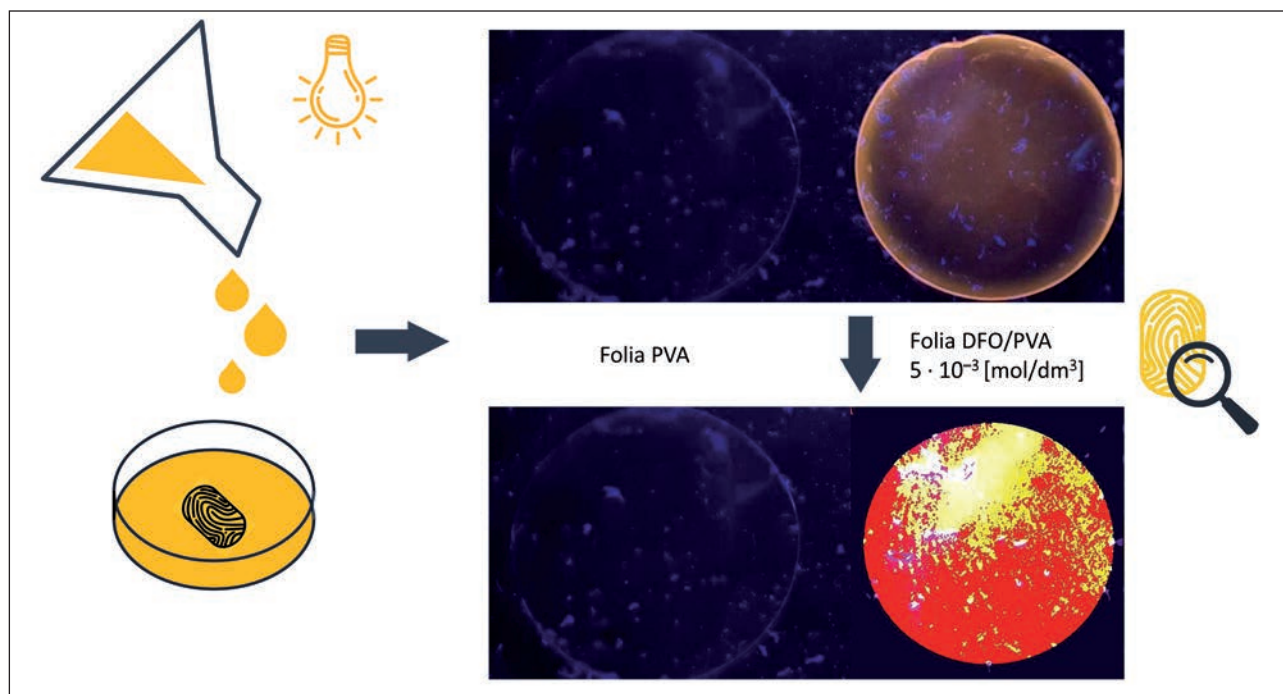
Zgodnie z otrzymanym widmem absorpcji fluorescencję folii zmierzono przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 470 nm. Pasma absorpcji o tym maksimum jest pasmem różnicującym struktury kompleksu DFO z aminokwasem i potencjalnymi agregatami. Na rycinie 8 zestawiono widma fluorescencji dla poszczególnych impregnacji. Na widmie widoczne są trzy pasma fluorescencji, z czego tylko jedno najlepiej wykształcone jest dla folii impregnowanej wodnym roztworem glicyny z maksimum fluorescencji pasma przy długości fali 606 nm. Struktura pozostałych pasm fluorescencji pochodzących od filmów bez impregnacji oraz po impregnacji wodą jest bardzo słabo zarysowana i pochodzi przede wszystkim od DFO z niewielkim wkładem po stronie długofalowej pasma fluorescencji położonego spektralnie w tym samym miejscu co kompleks DFO z glicyną.

Tab. 1. Zestawienie próbek DFO/PVA po impregnacji – wskazanie różnic w emisji przy wzbudzeniu 365 nm i 465 nm.

		Próbki			
		Impregnowane wodnym roztworem glicyny		Impregnowane wodą	
		Wzbudzenie 365 nm	Wzbudzenie 465 nm	Wzbudzenie 365 nm	Wzbudzenie 465 nm
PVA					
DFO/PVA [mol/dm³]	10^{-5}				
	10^{-4}				
	10^{-3}				
	$5 \cdot 10^{-3}$				

Tab. 2. Zestawienie histogramów próbek DFO/PVA po impregnacji – wskazanie różnic w emisji przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 365 nm i 465 nm.

		Histogram		
		Wzbudzenie 365 nm	Wzbudzenie 465 nm	
Impregnowane wodnym roztworem glicyny	PVA			
	DFO/PVA [mol/dm ³]	10 ⁻⁵		
		10 ⁻⁴		
		10 ⁻³		
		5 · 10 ⁻³		
	PVA			
Impregnowane wodą	DFO/PVA [mol/dm ³]	10 ⁻³		
		5 · 10 ⁻³		



Ryc. 9. Ślady linii papilarnych ujawnione za pomocą folii DFO/PVA, przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 365 nm.

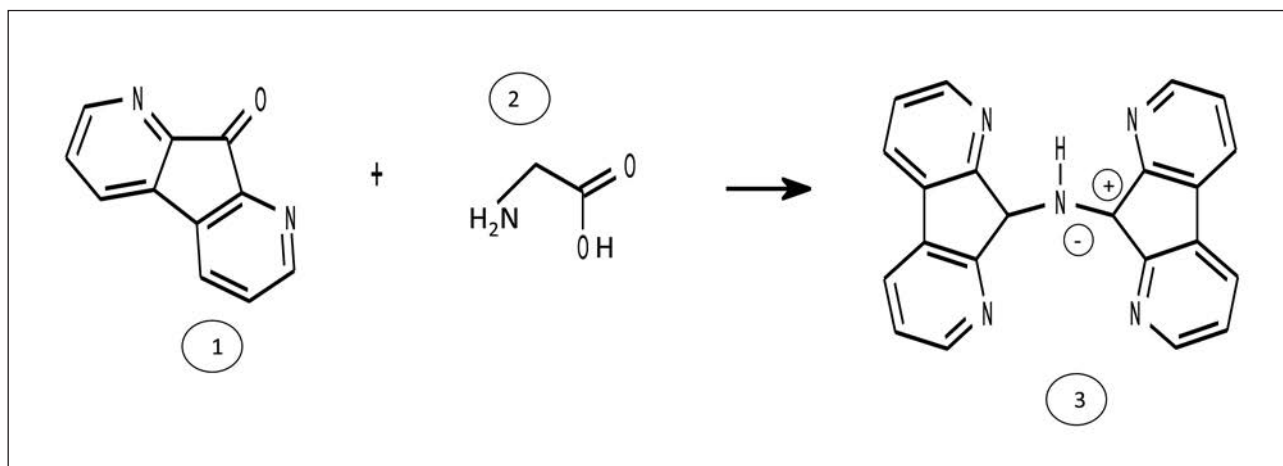
Podsumowanie i wnioski

Zmiana barwy oraz fluorescencja folii DFO/PVA po impregnacji wodnym roztworem glicyny wskazuje na utworzenie kompleksu DFO z aminokwasem. Zmiany te nastąpiły jedynie w trzech próbkach, a stężeniem granicznym DFO/PVA, dla którego zachodzi reakcja, jest 10^{-4} [mol/dm³]. Brak reakcji w próbce o najniższym stężeniu 10^{-5} [mol/dm³] DFO/PVA. Ma to teoretyczne odwzorowanie w zaleceniach procedury kryminalistycznej, która operuje na wysokich stężeniach 1,8-diazafluoren-9-onu w roztworze. Najwyższe stężenie DFO wykorzystane w badaniu wynosiło 0,09 g/L ($5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA). Procedury kryminalistyczne podają ilość DFO >0,2 g/L (10^{-1} [mol/dm³]) jako niezbędną do zajścia reakcji między DFO a aminokwasem. To prawie dwukrotnie większa ilość 1,8-diazafluoren-9-onu niż użyta w niniejszym badaniu. Najniższe stężenie, w którym zaobserwowano fluorescencyjny kompleks, wynosi ok. 0,0018 g/L (10^{-4} [mol/dm³] DFO/PVA). Oznacza to, że stężenie potrzebne do utworzenia kompleksu z α -aminokwasami jest dużo niższe niż obecnie proponowane.

Podczas przygotowywania folii roztwór DFO/PVA o stężeniu 10^{-3} [mol/dm³] wylano na ślady linii papilarnych odcisnięte na plastikowej powierzchni szalki Petriego. W procesie polimeryzacji uzyskano film trwale związany z czytelny luminescencyjny ślad daktyloskopijny znajdujący się na niechłonnym podłożu. Folia DFO/PVA (ryc. 9) potwierdza zajście reakcji DFO z α -aminokwasami. Fluorescencję próbek zmierzono przy wzbudzeniu promieniowaniem

o długości fali 365 nm oraz 380 nm; te długości fali powinny doprowadzić jedynie do obserwacji fluorescencji DFO. Wedle założeń teoretycznych mają więc wyświetlać wszystkie próbki zawierające 1,8-diazafluoren-9-on niezależnie od sposobu impregnacji. Po użyciu oświetlacza 365 nm nie wszystkie folie DFO/PVA wykazały zdolność do luminescencji. Jednak ta długość fali okazała się wystarczająca do zaobserwowania emisji w przypadku próbek zawierających kompleks DFO z α -aminokwasami (tabela 1 i 2; rycina 9) oraz próbek $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA impregnowanych wodą. Natomiast po użyciu spektrofluorymetru i przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 380 nm zarejestrowano widma fluorescencji dla wszystkich próbek zawierających 1,8-diazafluoren-9-on bez względu na rodzaj impregnacji.

Badane folie różnicuje widmo absorpcji ukazane na rycinie 6, gdzie charakterystyczne pasmo absorpcji z maksimum przy długości fali 470 nm w próbkach impregnowanych wodnym roztworem glicyny wskazuje na utworzenie kompleksu DFO- α -aminokwas, który nie występuje w pozostałych filmach DFO/PVA. Dodatkowo wszystkie folie niezależnie od sposobu impregnacji cechuje zbliżona struktura widm fluorescencji przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 380 nm (ryc. 6), natomiast dla wzbudzenia promieniowaniem o długości fali 470 nm zaobserwowano dobrze wykształcone pasmo fluorescencji jedynie w odniesieniu do próbki impregnowanej wodnym roztworem glicyny – rycina 8. Wzbudzenie folii oświetlaczem 465 nm skutkuje emisją dla DFO/PVA od 10^{-4} [mol/dm³] do $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] po impregnacji wodnym roztworem



Ryc. 10. Reakcja DFO (1) z α -aminokwasem (2).

glicyny. Fluorescencyjna odpowiedź dla powyższego wzbudzenia widoczna jest również dla $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA impregnowanej wodą – tabela 1. Wyświetlanie filmów, na których brak jest kompleksu DFO– α -aminokwas, $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA impregnowanych wodą przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 465 nm (tabela 1 i 2), a także powstawanie dodatkowych pasm przesuniętych w stronę długofalową na widmie absorpcji (rycina 6), sugeruje występowanie asocjatów 1,8-diazafluoren-9-onu w foliach o wysokich stężeniach. Dodatkowo tworzenie się agregatów DFO w matrycy PVA potwierdza intensywna fluorescencja oraz zbliżona barwa emitowanego światła z całej powierzchni próbek o najwyższym stężeniu $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA wzbudzanych promieniowaniem o długości fali 365 nm. Zjawisko to potwierdzają również tożsame widma fluorescencji $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 380 nm bez względu na impregnację.

1,8-diazafluoren-9-on zawarty w matrycach utworzonych z PVA jest stabilny i pełni funkcję sondy luminescencyjnej dla α -aminokwasów. Impregnacja folii DFO/PVA w wodnym roztworze glicyny umożliwia utworzenie kompleksu DFO–glicyna (Lewkowicz i in., 2020; Wilkinson, 2000; Kołek-Kaczanowska, Kreczko, Maćkiewicz, 2014) – rycina 10. Należy jednak podkreślić, że jedynie folie PVA o najwyższych stężeniach DFO wykazują odpowiednio wysoką reaktywność oraz pozwalają zaobserwować okiem nieuzbrojonym utworzenie się kompleksu DFO– α -aminokwas. Otrzymane polimery DFO/PVA są sondami α -aminokwasów, a badania przedstawione w ramach niniejszej pracy mają charakter wstępny z wskazaniem na potencjalne zastosowanie podczas ujawniania śladów linii papilarnych.

Źródło rycin i tabel: autorzy

Bibliografia

1. Bleay, S.M., Croxton, R.S., de Puit, M. (2018). *Fingerprint Development Techniques. Theory and Application*. Hoboken NJ: Wiley.
2. Browarny, K. (2014). Metody i środki wykorzystywane przez specjalistów w praktyce dochodzeniowo-śledczej. W: M. Szostak, I. Dembowska (red.), *Innowacyjne metody wykrywania sprawców przestępstw. Materiały z konferencji*. Wrocław: Prawnicza i Ekonomiczna Biblioteka Cyfrowa, Wydział Prawa, Administracji i Ekonomii Uniwersytetu Wrocławskiego
3. Costa Conn, C., Ramsay, G., Roux, C., Lennard, C. (2001). The effect of metal salt treatment on the photoluminescence of DFO-treated fingerprints. *Forensic Science International*, 116.
4. D'Elia, V., Materazzi, S., Iuliano, G., Niola, L. (2015). Evaluation and comparison of 1,2-indanedione and 1,8-diazafluoren-9-one solutions for the enhancement of latent fingerprints on porous surfaces. *Forensic Science International*, 254.
5. Friesen, J.B. (2015). Forensic chemistry: The revelation of latent fingerprints. *Journal of Chemical Education*, 92.
6. Inhülsen, I., Kopf, J., Margaretha, P. (2008). Photocycloaddition reactions of 5,5-Dimethyl-3-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)cyclohex-2-en-1-one. *Helvetica Chimica Acta*, 91.
7. Kołek-Kaczanowska, E.K., Kreczko, J., Maćkiewicz, Z. (2014). Metody wykorzystywane do wizualizacji śladów linii papilarnych. *Wiadomości Chemiczne*, 68.
8. Lam, E., Valentine, D., Hammond, G. (1967). Mechanisms of photochemical reactions in solution. XLIV. Photodimerization of cyclohexenone. *Journal of the American Chemical Society*, 89.
9. Lewkowicz, A. i in. (2012). Concentration-dependent fluorescence properties of Rhodamine 6G in titanium dioxide and silicon dioxide nanolayers. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116.

10. Lewkowicz, A. i in. (2014). Aggregation of Rhodamine 6G in titanium dioxide nanolayers and bulk xerogels. *Optical Materials*, 36(10).
11. Lewkowicz, A., Baranowska, K., Bojarski, P., Józefowicz, M. (2019). Solvent dependent spectroscopic properties of fingerprint reagent – 1,8-diazafluoren-9-one. *Journal of Molecular Liquids*, 285.
12. Lewkowicz, A. i in. (2020). The luminescence of 1,8-diazafluoren-9-one/titanium dioxide composite thin films for optical application. *Materials*, 13.
13. Liu, P., Chen, W., Liu, Y., Bai, S., Wang, Q. (2014). Thermal melt processing to prepare halogen-free flame retardant poly(vinyl alcohol). *Polymer Degradation and Stability*, 109.
14. Parthasarathy, A., Samanta, S., Ramamurthy, V. (2013). Photodimerization of hydrophobic guests within a water-soluble nanocapsule. *Research on Chemical Intermediates*, 39.
15. Petrovskaia, O. i in. (2001). Investigations of the reaction mechanisms of 1,2-indanediones with amino acids. *The Journal of Organic Chemistry*, 66.
16. Ramotowski, R. (red.). (2013). *Lee and Gaensslen's Advances in Fingerprint Technology*, wyd. 3. Boca Raton FL: CRC Press.
17. Thomas, P.S., Stuart, B.H. (1997). A Fourier transform Raman spectroscopy study of water sorption by poly (vinyl alcohol). *Spectrochimica Acta Part A*, 53.
18. Wilkinson, D. (2000). Study of the reaction mechanism of 1,8-diazafluoren-9-one with the amino acid, L-alanine. *Forensic Science International*, 109.
19. Yang, W. i in. (2021). Highly transparent PVA/nanolignin composite films with excellent UV shielding, antibacterial and antioxidant performance. *Reactive and Functional Polymers*, 162.
20. <https://publicspectra.com/Raman/Polyvinyl%20alcohol> (dostęp: 22.06.2021).

Structural-spectroscopic analysis of DFO/PVA films as potential materials used in revealing fingerprints on non-porous surfaces

Paulina Zygadło¹, Aneta Lewkowicz^{1*}

¹ University of Gdańsk

* Corresponding author: aneta.lewkowicz@ug.edu.pl

Summary

1,8-diazafluoren-9-one (DFO) is a sensitive luminescent probe targeting α -amino acids. The study described herein exploited its physicochemical properties to form DFO/PVA polymer films. As a result, materials with stable and reactive DFO were obtained. Spectroscopic analysis of the formed films showed that the films with the highest concentration of DFO exhibited the highest reactivity. Novel materials in the form of thin DFO/PVA films with potential applications for revealing fingerprints on non-porous surfaces were obtained.

Key words: DFO/PVA polymer film, fluorescence, fingerprints

Introduction

1,8-diazafluoren-9-one is an aromatic organic compound that forms a complex with α -amino acids to yield a fluorescent reaction product (Petrovskaia et al., 2001). Owing to its properties, it has been used since the 1990s as a fingerprint-revealing reagent for porous surfaces (D'Elia et al., 2015; Friesen, 2015). The DFO solution is prepared based on methanol and acetic acid because they enhance the effect of 1,8-diazafluoren-9-one

on the fingerprints (Costa Conn et al., 2001). Very high concentrations of 1,8-diazafluoren-9-one at about 0.25 g/L (i.e., about 10^{-1} [mol/dcm³]) are used to make the DFO solution (Bleay et al., 2018). The reagent is applied by spraying the trace or immersing the test surface in it (Ramotowski, 2013), and then heated to approximately 100°C for no more than 20 minutes (Browarny, 2014) – Figure 1.

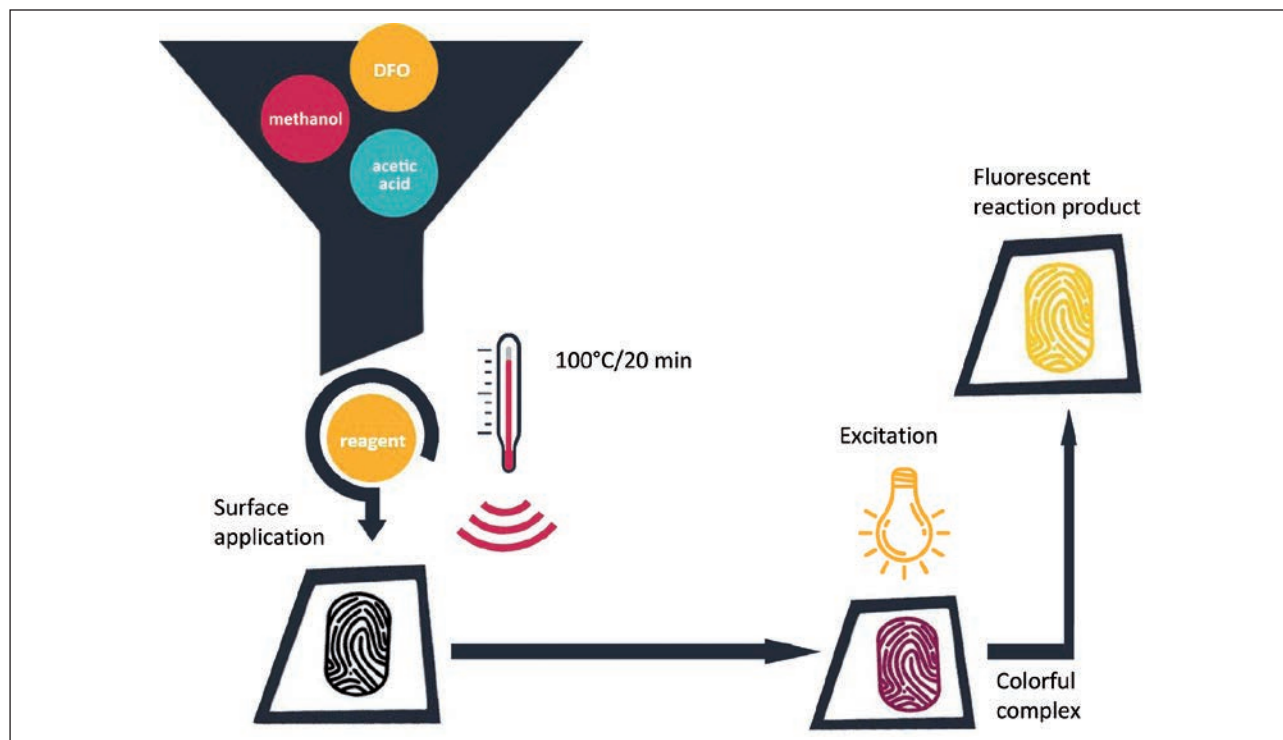


Fig. 1. Forensic procedure for revealing fingerprints using DFO.

DFO is a molecule with low fluorescence quantum yield (Lewkowicz et al., 2019). At the same time, this molecule is highly reactive and selective for α -amino acids, resulting in a product with high fluorescence quantum yield, which is the main pursuit of the current forensic procedure used to reveal fingerprints. Using very high concentrations of the main DFO reagent, however, may result in the generation of fluorescence by 1,8-diazafluoren-9-one associations rather than by the DFO-amino acid complexes. This phenomenon has been previously observed for other luminescent molecules, such as Rhodamine 6G (Lewkowicz et al., 2012; Lewkowicz et al., 2014). In the case of aromatic ketones, previous literature findings also indicate the presence of dimers of these molecules, formed as a result of cycloaddition to the C=C bond in the aromatic ring. This phenomenon is considered to be the effect of ketones interacting in the triplet state, for example, the dimerization of cyclohexanone involves a molecule in the $^3(\pi, \pi^*)$ state (Lam, Valentine, Hammond, 1967; Inhülsen, Kopf, Margaretha, 2008; Parthasarathy, Samanta, Ramamurthy, 2013). In this study, the DFO molecule was placed in a different carrier than the standard dactyloscopic solutions. A material that may be a promising matrix for DFO is polyvinyl alcohol (PVA). PVA is an odorless, colorless and non-toxic polymer. This biocompatible and biodegradable material with hygroscopic properties is widely used in medicine (Yang et al., 2021; Liu et al., 2014). Due to their ability to absorb water, PVA-formed films swell, allowing the molecule they contain to be released into the environment (Yang et al., 2021); presumably the same mechanism facilitates the absorption of molecules from the environment into the interior of the polymer.

Aim of the study

The aim of this study was to obtain polymeric materials with high durability and selectivity towards α -amino acids and with potential application to both porous and non-porous substrates to reveal latent fingerprints.

Materials and methods

Equipment, supplies and chemical reagents

All chemical reagents used in the study were of analytical grade purity. Spectroscopically pure (99% dye content) 1,8-diazafluoren-9-one, polyvinyl alcohol, and glycine were purchased from Aldrich (Sigma-Aldrich Munich, Germany). Deionized water was obtained from HydroLab system.

Raman spectra were obtained with the integrated confocal micro-Raman system from a LabRam Aramis (Horiba Jobin Yvon) 460 mm spectrometer. The excitation source was a diode-pumped semiconductor laser (DPSS) HeNe, emitting red light at 632 nm with a power of 50 mW. Absorption spectra were measured using a Shimadzu UVmini-1240 spectrophotometer. Fluorescence was excited using a UVITEC LF-206. LS LAMP 365/254NM 1X6W 230V EU UV lamp and

an illuminator at an excitation wavelength of 465 nm. Emission spectra were obtained using a Horiba Jobin Yvon spectrofluorimeter, model FluoroMax4TCSPC.

Preparation of PVA film with incorporated DFO

Figure 2 shows a scheme for obtaining DFO/PVA polymer films. These films were formed by polymerization at room temperature and atmospheric pressure. PVA and DFO were dissolved in demineralized water. The following DFO concentrations in PVA films were obtained: 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³].

Structural analysis

Figure 3 shows the Raman spectrum for PVA film. The position of the Raman peaks on the spectrum are characteristic of the structure of this polymer, i.e. occurring between 750–1500 cm⁻¹ and 2500–3500 cm⁻¹ (Publicspectra.com; Thomas, Stuart, 1997).

The absorption spectra of the DFO/PVA films were measured at room temperature and atmospheric pressure. Figure 4 shows the absorption spectrum for the highest concentration of DFO in the PVA film and provides confirmation of the presence of 1,8-diazafluoren-9-one in the PVA matrix – a characteristic absorption band with a maximum at 385 nm. For the highest DFO concentrations (10^{-3} and $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³]), a second absorption band was observed with a maximum at 570 nm. The appearance of an additional band confirms the formation of new chemical structures, probably the so-called DFO aggregates.

Impregnation of DFO/PVA film

DFO/PVA films were impregnated with two solutions: water (blank) and 10^{-4} [mol/dm³] aqueous glycine solution. Each sample was immersed in the solution

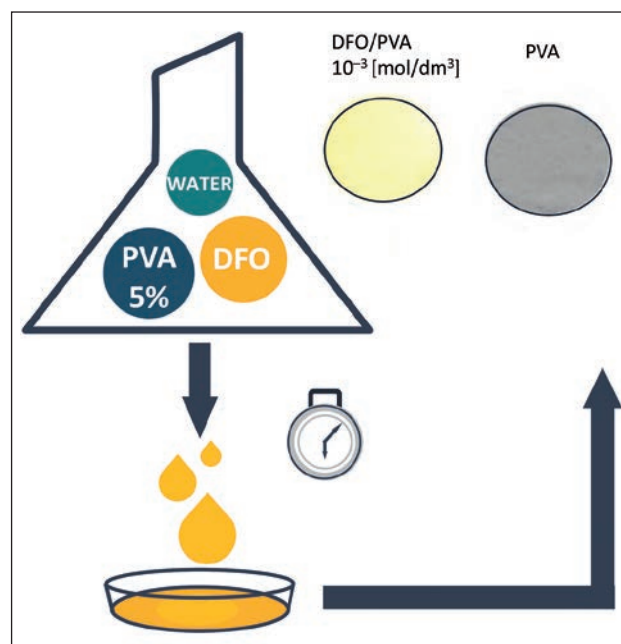


Fig. 2. Scheme for obtaining DFO/PVA polymer films.

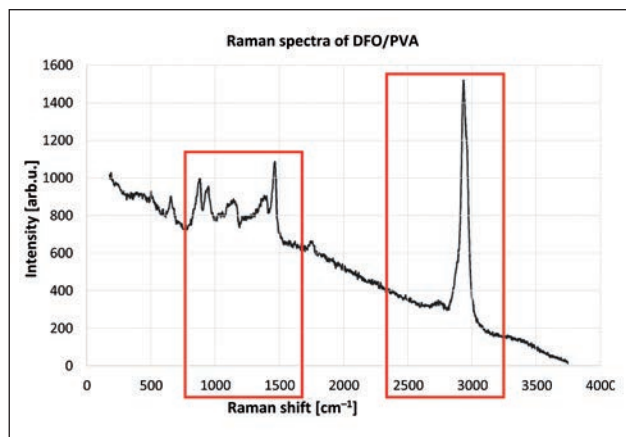


Fig. 3. Raman spectrum of DFO/PVA film.

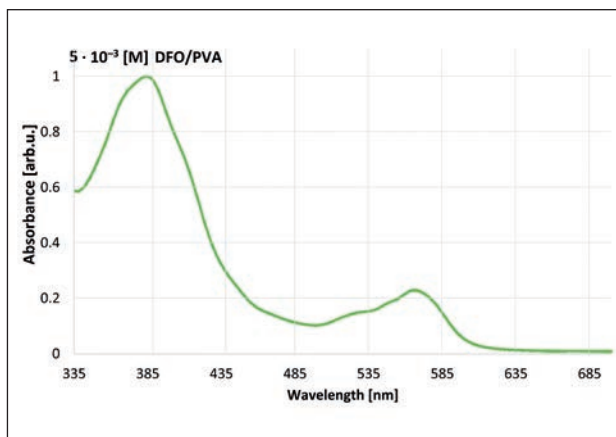


Fig. 4. Absorption spectrum of DFO/PVA film for $c_{DFO} = 5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³].

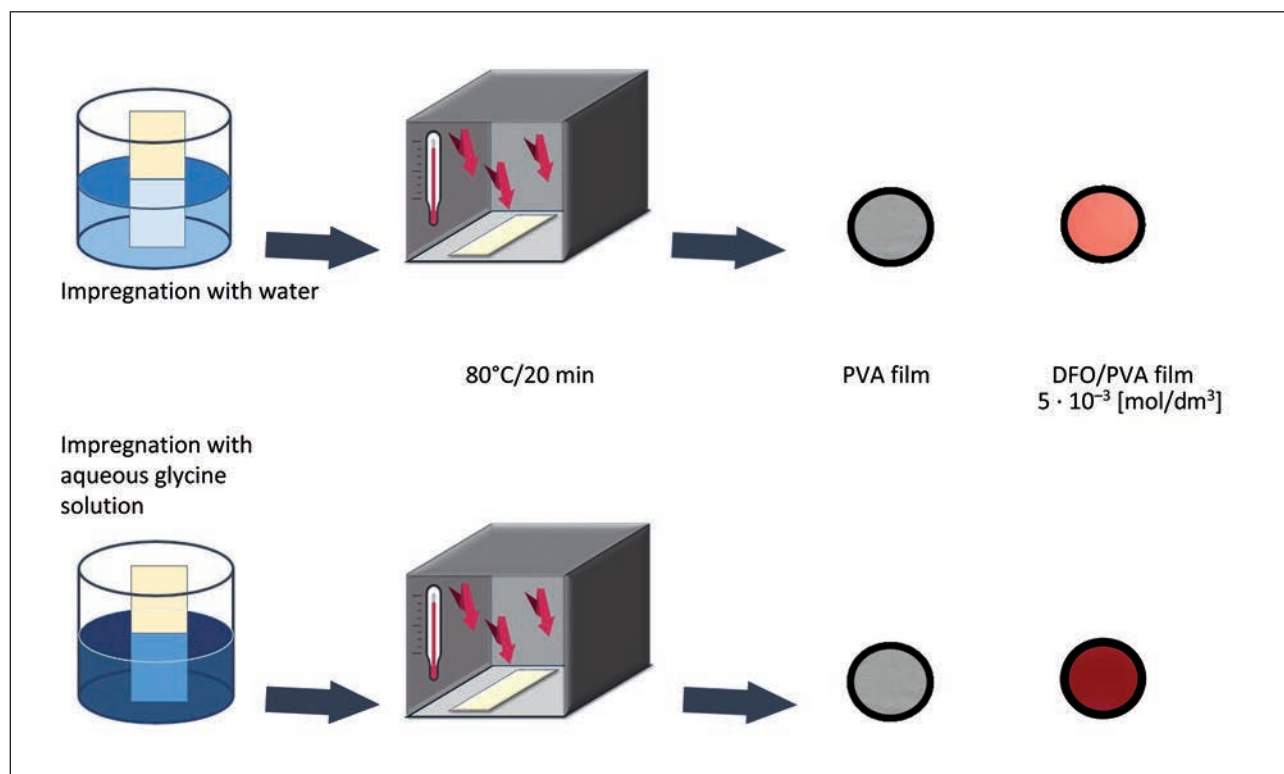


Fig. 5. Procedure for impregnation of DFO/PVA polymer films with an aqueous glycine solution.

for 30 seconds and then heated in an oven – Figure 5. DFO/PVA films with high concentrations, i.e. 10^{-3} and $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³], impregnated with aqueous glycine solution, changed their color to purple.

Spectroscopic analysis

After impregnation, the absorption spectra of the DFO/PVA films were measured in the spectral range of 250–700 nm, and next the absorption spectra of the films with the highest concentration of $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] impregnated with water, with 10^{-4} [mol/dm³] aqueous glycine solution, and unimpregnated, were compared – Figure 6.

The absorption spectrum again shows two absorption bands for unimpregnated and water-impregnated sample. Three bands are visible in the glycine-impregnated sample. The two extreme absorption bands are common to all films: the first with a maximum at 385 nm and the last with a maximum at about 570 nm. The middle absorption band is characteristic only for the sample impregnated with aqueous glycine solution with a maximum at 470 nm – specific for the DFO- α -amino acids complex.

The samples obtained after impregnation were illuminated by a UV lamp at 365 nm and an illuminator at 465 nm. DFO/PVA films impregnated with aqueous

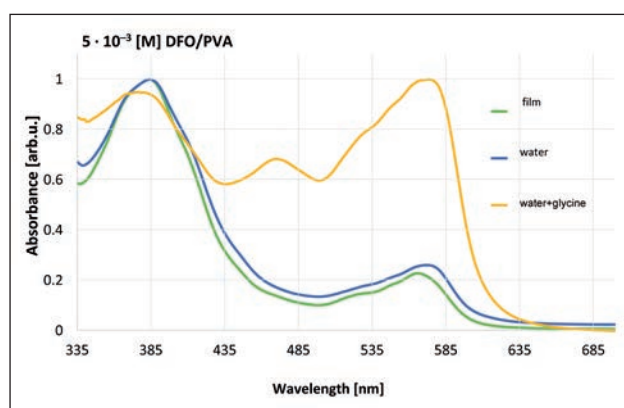


Fig. 6. Absorption spectrum of DFO/PVA film for $c_{\text{DFO}} = 5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³].

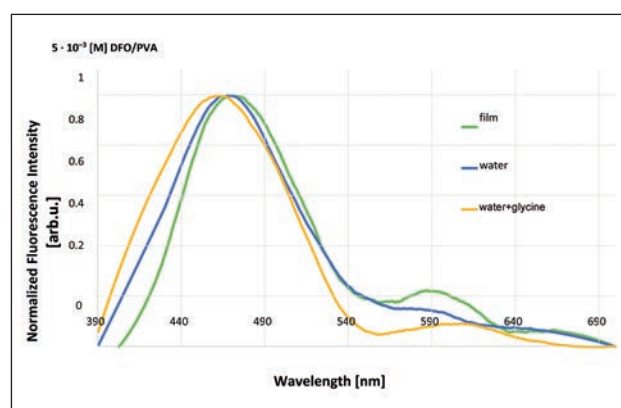


Fig. 7. Fluorescence spectrum of DFO/PVA films for the highest concentration of $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] – excitation at 380 nm.

glycine solution showed fluorescence for concentrations of 10^{-4} , 10^{-3} and $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³]. Fluorescence was also visible for the concentration of $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA after impregnating the film with water.

DFO/PVA films impregnated with aqueous glycine solution show an increase in emission intensity with increasing concentration – Tables 1 and 2. At a concentration of $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³], all the films exhibit similar emission, regardless of the method of impregnation. The feature that slightly differentiates the films is the color of the emitted light and the emission intensity. A yellow-orange color appears in samples excited at 365 nm as the concentration increases. The $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA film impregnated with water illuminates yellow while the film impregnated with glycine illuminates orange. Samples with the highest concentration, impregnated with aqueous glycine solution, exhibit more intense color – orange-pink – when excited at 465 nm than when excited at 365 nm.

The fluorescence spectra of $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA films for each type of impregnation are summarized

in Fig. 7. Two bands of fluorescence are visible on the spectrum. The maximum of the first fluorescence band is at 460 nm for impregnation with aqueous glycine solution and it shifts in the long-wave direction to 470 nm for the other types of impregnation. No significant changes were observed in the fluorescence spectral profile of the first band. The second fluorescence band has a maximum at about 590 – 613 nm and it is best visible for unimpregnated DFO/PVA film.

According to the obtained absorption spectrum, the fluorescence of the films was measured at 470 nm excitation. The absorption band with this maximum differentiates the DFO-amino acid complexes and potential aggregates. The fluorescence spectra for each type of impregnation are summarized in Fig. 8. Three fluorescence bands are visible, of which one is best developed for the film impregnated with aqueous glycine solution with the fluorescence maximum at 606 nm. The structure of the remaining fluorescence bands originating from unimpregnated and water-impregnated films is very poorly delineated and comes primarily from DFO with a small contribution on the long-wave side of the fluorescence band coinciding spectrally with the DFO-glycine complex.

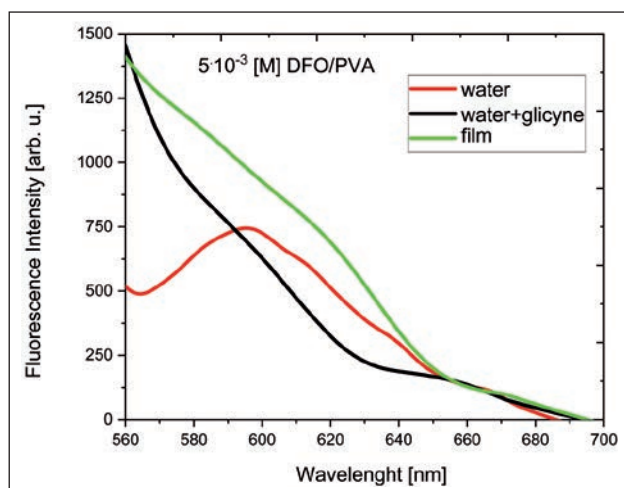


Fig. 8. Fluorescence spectrum of DFO/PVA films for the highest concentration of $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] – excitation at 470 nm.

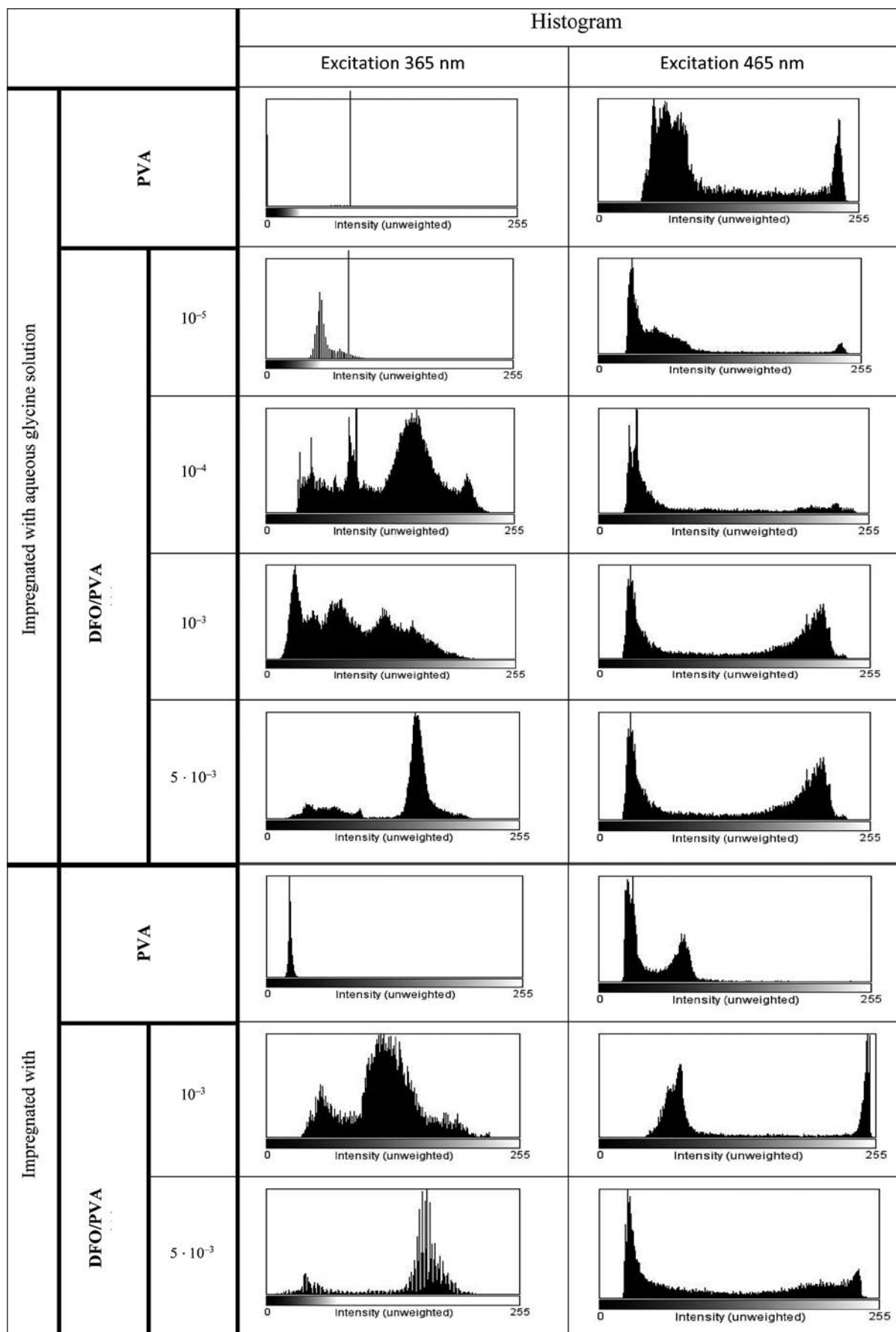
Summary and conclusions

The color change and fluorescence of DFO/PVA films after impregnation with aqueous glycine solution indicate the formation of DFO-amino acid complexes. These changes were observed in only three samples, and the limiting concentration of DFO/PVA for which the reaction occurred was 10^{-4} [mol/dm³]. No reaction was observed in the sample with the lowest concentration of 10^{-5} [mol/dm³] DFO/PVA. This has a theoretical representation in the recommendations of forensic procedures that provide for high concentrations of 1,8-diazafluoren-9-one in solution. The highest concentration of DFO used in the study was 0.09 g/L ($5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA). Forensic procedures report an amount of DFO >0.2 g/L (10^{-1} [mol/dm³]) as necessary for the reaction between DFO and amino

Tab. 1. A comparison of DFO/PVA samples after impregnation – indicated emission differences for 365 nm and 465 nm excitations.

		Samples			
		Impregnated with aqueous glycine solution		Impregnated with water	
		Excitation 365 nm	Excitation 465 nm	Excitation 365 nm	Excitation 465 nm
PVA					
DFO/PVA [mol/dm ³]	10 ⁻⁵				
	10 ⁻⁴				
	10 ⁻³				
	5 · 10 ⁻³				

Tab. 2. Histograms of DFO/PVA samples after impregnation – indicated emission differences for 365 nm and 465 nm excitations.



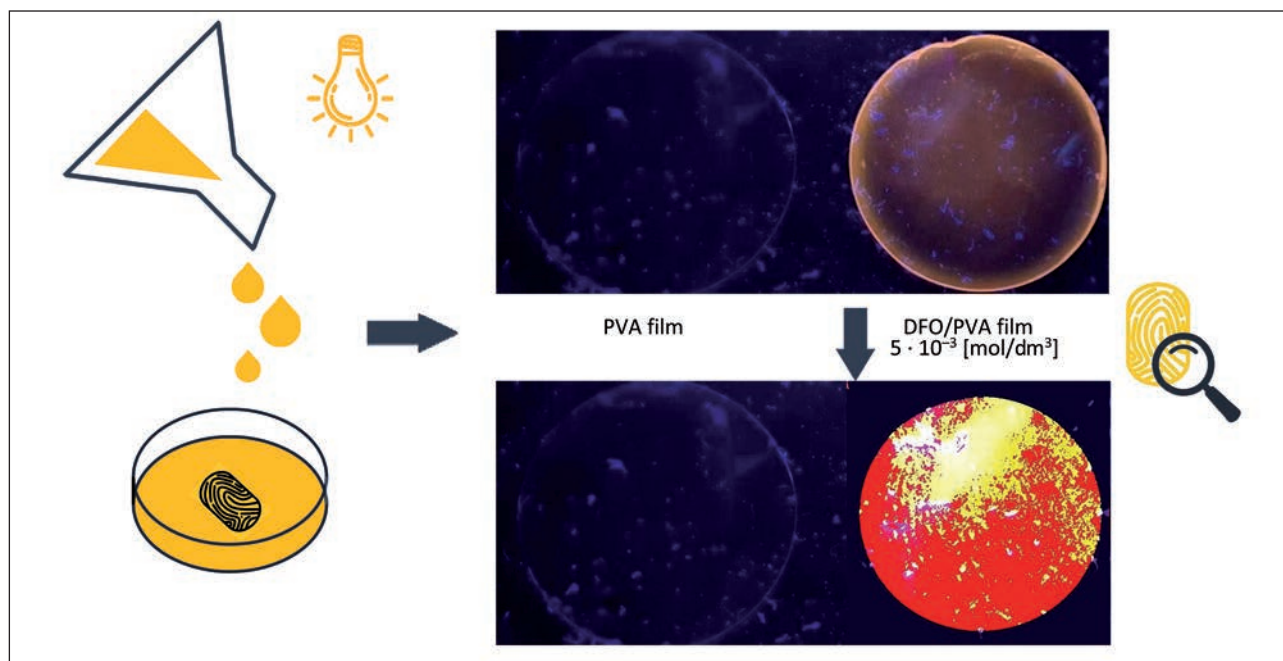


Fig. 9. Fingerprints revealed using DFO/PVA film – excitation at 365 nm.

acids to occur. This is almost twice the amount of 1,8-diazafluoren-9-one used in the present study. The lowest concentration at which a fluorescent complexes were observed was approximately 0.0018 g/L (10^{-4} [mol/dm³] DFO/PVA). This means that the concentration needed to form complexes with α -amino acids is much lower than that currently proposed.

During film preparation, a 10^{-3} [mol/dm³] DFO/PVA solution was poured over the fingerprints imprinted on the plastic surface of the Petri dish. The polymerization process yielded a film permanently bonded to a legible luminescent fingerprint deposited on a non-absorbent surface. The DFO/PVA film (Fig. 9) confirms the occurrence of reaction between DFO and α -amino acids. The sample fluorescence was measured at 365 nm and 380 nm excitations; these wavelengths should specifically identify DFO fluorescence. Thus, according to theoretical assumptions, all samples containing 1,8-diazafluoren-9-one should illuminate, regardless of the type of impregnation. Under an illuminator with 365 nm excitation wavelength, not all DFO/PVA films showed luminescence. However, this wavelength was sufficient to observe emission for samples containing a DFO- α -amino acid complex (Tables 1 and 2; Figure 9) and for $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA water-impregnated samples. When using a spectrofluorimeter and 380 nm excitation, fluorescence spectra were recorded for all samples containing 1,8-diazafluoren-9-one, regardless of the type of impregnation.

The films tested in this study were differentiated by the absorption spectrum shown in Fig. 6, in which the characteristic absorption band with a maximum at 470 nm in samples impregnated with aqueous glycine solution indicated the formation of a DFO- α -amino

acid complex that was not present in other DFO/PVA films. In addition, all films, regardless of the type of impregnation were characterized by a similar structure of fluorescence spectra when excited at 380 nm (Fig. 6), while at 470 nm excitation a well-developed fluorescence band was observed only for the sample impregnated with aqueous glycine solution – Figure 8. Excitation of the film with a 465 nm illuminator resulted in emissions for DFO/PVA concentrations ranging from 10^{-4} [mol/dm³] to $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] and impregnation with aqueous glycine solution. The fluorescent response for the above wavelength was also seen in $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA film impregnated with water – Table 1. The illumination of films lacking the DFO- α -amino acid complex, $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA films impregnated with water, upon excitation at 465 nm (Tables 1 and 2), as well as the formation of additional bands shifted to the long-wave side of the absorption spectrum (Figure 6), suggest the presence of 1,8-diazafluoren-9-one associations in films with high DFO/PVA concentrations. In addition, the formation of DFO aggregates in the PVA matrix was confirmed by the intense fluorescence and similar color of the emitted light in samples with the highest concentration of $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA, excited at 365 nm. This phenomenon was also confirmed by the identical fluorescence spectra of $5 \cdot 10^{-3}$ [mol/dm³] DFO/PVA films excited at 380 nm, regardless of impregnation type.

1,8-diazafluoren-9-one contained within the matrices formed from PVA is stable and acts as a luminescent probe for α -amino acids. Impregnation of DFO/PVA films with aqueous glycine solution enables the formation of a DFO-glycine complex (Lewkowicz et al., 2020; Wilkinson, 2000; Kołek-Kaczanowska,

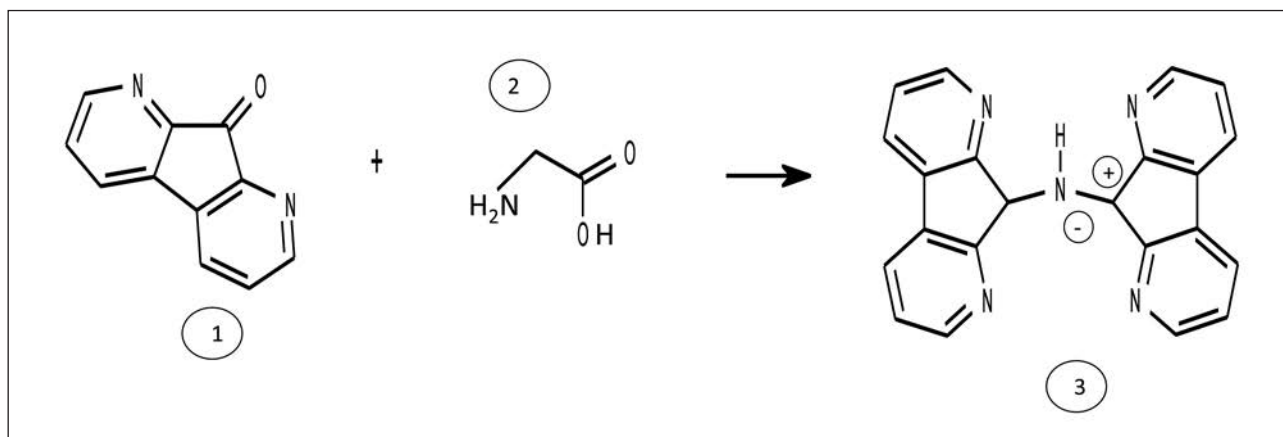


Fig. 10. Reaction of DFO (1) with α -amino acid (2).

Kreczko, Maćkiewicz, 2014) – Figure 10. It should be emphasized, however, that only PVA films with the highest DFO concentrations exhibit sufficiently high reactivity and support the formation of DFO- α -amino acid complexes to be observed with the unaided eye. The obtained DFO/PVA polymers are α -amino acid probes, and the research findings presented in this article are preliminary with an indication of their potential application in revealing fingerprints.

Source of Figures and Tables: authors

Bibliography

- Bleay, S.M., Croxton, R.S., de Puit, M. (2018). *Fingerprint Development Techniques. Theory and Application*. Hoboken NJ: Wiley.
- Browarny, K. (2014). Metody i środki wykorzystywane przez specjalistów w praktyce dochodzeniowo-śledczej. In: M. Szostak, I. Dembowska (ed.), *Innowacyjne metody wykrywania sprawców przestępstw. Materiały z konferencji*. Wrocław: Legal and Economic Digital Library, University of Wrocław, Faculty of Law, Administration and Economics.
- Costa Conn, C., Ramsay, G., Roux, C., Lennard, C. (2001). The effect of metal salt treatment on the photoluminescence of DFO-treated fingerprints. *Forensic Science International*, 116.
- D'Elia, V., Materazzi, S., Iuliano, G., Niola, L. (2015). Evaluation and comparison of 1,2-indanedione and 1,8-diazafluoren-9-one solutions for the enhancement of latent fingerprints on porous surfaces. *Forensic Science International*, 254.
- Friesen, J.B. (2015). Forensic chemistry: The revelation of latent fingerprints. *Journal of Chemical Education*, 92.
- Inhülsen, I., Kopf, J., Margaretha, P. (2008). Photocycloaddition reactions of 5,5-Dimethyl-3-(3-methylbut-3-en-1-ynyl)cyclohex-2-en-1-one. *Helvetica Chimica Acta*, 91.
- Końek-Kaczanowska, E.K., Kreczko, J., Maćkiewicz, Z. (2014). Metody wykorzystywane do wizualizacji śladów linii papilarnych. *Wiadomości Chemiczne*, 68.
- Lam, E., Valentine, D., Hammond, G. (1967). Mechanisms of photochemical reactions in solution. XLIV. Photodimerization of cyclohexenone. *Journal of the American Chemical Society*, 89.
- Lewkowicz, A. et al. (2012). Concentration-dependent fluorescence properties of Rhodamine 6G in titanium dioxide and silicon dioxide nanolayers. *The Journal of Physical Chemistry C*, 116.
- Lewkowicz, A. et al. (2014). Aggregation of Rhodamine 6G in titanium dioxide nanolayers and bulk xerogels. *Optical Materials*, 36(10).
- Lewkowicz, A., Baranowska, K., Bojarski, P., Józefowicz, M. (2019). Solvent dependent spectroscopic properties of fingerprint reagent – 1,8-diazafluoren-9-one. *Journal of Molecular Liquids*, 285.
- Lewkowicz, A. et al. (2020). The luminescence of 1,8-diazafluoren-9-one/titanium dioxide composite thin films for optical application. *Materials*, 13.
- Liu, P., Chen, W., Liu, Y., Bai, S., Wang, Q. (2014). Thermal melt processing to prepare halogen-free flame retardant poly(vinyl alcohol). *Polymer Degradation and Stability*, 109.
- Parthasarathy, A., Samanta, S., Ramamurthy, V. (2013). Photodimerization of hydrophobic guests within a water-soluble nanocapsule. *Research on Chemical Intermediates*, 39.
- Petrovskaia, O. et al. (2001). Investigations of the reaction mechanisms of 1,2-indanediones with amino acids. *The Journal of Organic Chemistry*, 66.
- Ramotowski, R. (ed.). (2013). *Lee and Gaensslen's Advances in Fingerprint Technology*, ed. 3. Boca Raton FL: CRC Press.
- Thomas, P.S., Stuart, B.H. (1997). A Fourier transform Raman spectroscopy study of water sorption by poly(vinyl alcohol). *Spectrochimica Acta Part A*, 53.

18. Wilkinson, D. (2000). Study of the reaction mechanism of 1,8-diazafluoren-9-one with the amino acid, L-alanine. *Forensic Science International*, 109.
19. Yang, W. et al. (2021). Highly transparent PVA/nanolignin composite films with excellent UV shielding, antibacterial and antioxidant performance. *Reactive and Functional Polymers*, 162.
20. <https://publicspectra.com/Raman/Polyvinyl%20alcohol> (accessed on: 22/06/2021).

Translation Hanna Wierzchostawska