

## APLICAÇÃO FORENSE DO LUMINOL – UMA REVISÃO

**Flávia Armani de Vasconcellos**

Instituto de Criminalística de Minas Gerais

**Washington Xavier de Paula\***

Instituto de Criminalística de Minas Gerais

### *FORENSIC APPLICATION OF LUMINOL – A REVIEW*

#### **RESUMO**

O luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) e a sua propriedade quimioluminescente são conhecidos há muitos anos, porém apenas em 1937 foi aplicada na ciência forense para a identificação de sangue. Esse mecanismo é complexo e baseia-se na emissão de luz através do processo de quimioluminescência, onde ocorre uma reação de oxirredução na presença do ferro da hemoglobina e de peróxido de hidrogênio. Vários agentes podem interferir na eficiência desta reação, seja de natureza ambiental, industrial ou doméstica. Apesar da elevada sensibilidade desse reagente, não apresenta especificidade para sangue humano. A manipulação das soluções utilizadas nos testes deve ser realizada sempre com a utilização de equipamentos de segurança individual. O luminol não apresenta interferência nos exames de ADN, entretanto pode interferir na eficiência dos testes presuntivos para identificação de sangue humano.

**PALAVRAS-CHAVE:** Luminol. Quimioluminescência. Sangue. ADN.

#### **ABSTRACT**

*Luminol (5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione) and its chemiluminescent property have been known for many years, but only in 1937 it was applied in forensic science to identify blood. This mechanism is complex and based on the emission of light through the process of chemiluminescence, in which an oxidation-reduction reaction occurs due to hydrogen peroxide and the presence of iron hemoglobin. Several agents may interfere with the efficiency of this reaction, whether environmental, industrial or domestic ones. Despite the high sensibility of this reagent, it does not show specificity for human blood. The manipulation of the solutions used in the tests must always be carried out with the use of individual protection equipment. Luminol does not interfere with DNA testing, however it may interfere with the efficiency of presumptive tests for human blood.*

**KEYWORDS:** Luminol. Chemiluminescence. Blood. DNA.

## 1. INTRODUÇÃO

As ciências forenses desempenham a cada dia mais um papel de relevância nas investigações criminais, tornando-se necessário o aprimoramento e o desenvolvimento de técnicas para materialização de vestígios e elucidação de um crime <sup>1</sup>. Moreira <sup>2</sup> refere-se à tecnologia como parte integrante da vida do ser humano e como tal influencia e modifica seu modo de viver ao mesmo tempo em que é modificada por ele. Assim, é necessário que as técnicas para a comprovação do delito sejam analisadas utilizando o caminho da ciência e da tecnologia, através de métodos que forneçam resultados tão precisos quanto possíveis <sup>3</sup>.

A evidência física de delitos violentos é constituída por vestígios deixados na cena do crime tais como armas ou fragmentos de explosivos, mas também e mais frequentemente é constituída apenas por vestígios não facilmente visíveis, como impressões digitais, pegadas, marcas de ferramentas, fragmentos de tinta, sangue, sêmen, saliva ou fibras, que o criminoso deixa ou com ele transporta. Testes preliminares para detecção de manchas em locais de crimes têm sido eficientes no auxílio à perícia criminal, fornecendo informações que buscam o direcionamento da investigação criminal.

Um dos principais vestígios em locais de crimes são as manchas de sangue, pois através delas é possível identificar vítimas e suspeitos, averiguar se o volume de sangue encontrado é compatível com o ferimento e principalmente auxiliar na dinâmica dos fatos. Todavia, para que isso seja possível, faz-se necessário primeiramente certificar-se de que tais manchas encontradas se trata realmente de sangue <sup>3</sup>, visto os fatores que podem prejudicar as análises, como os de natureza ambiental e aqueles provenientes da ação humana, estes últimos visando ocultar o vestígio.

Desde as mais antigas civilizações, cientistas e pesquisadores descreviam fenômenos de emissão de radiação na for-

ma de luz. Um desses fenômenos é a luminescência, que é um termo empregado para descrever a emissão de radiação quando uma molécula ou átomo sofre uma transição de um estado eletronicamente excitado para um estado de energia mais baixa. Os vários tipos de luminescência existentes são classificados de acordo com a fonte de energia que causa a excitação.

O primeiro composto orgânico sintético luminescente descrito foi a lofina (2,4,5-trifenilimidazol) (figura 1), obtida em 1887, por Radziszewski.

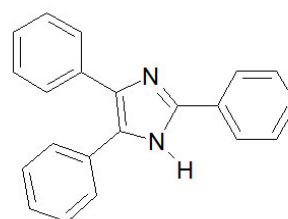


Figura 1: Estrutura química da lofina. (Arquivo pessoal)

A partir deste experimento, em 1888, Wiedemann conseguiu distinguir a quimioluminescência da incandescência, definindo-a como a “emissão de radiação eletromagnética que ocorre junto a processos químicos” <sup>4</sup>, em que a luminosidade ocorre devido a quebras de ligações já existentes nas moléculas ou através de rearranjos moleculares, sendo a radiação emitida geralmente observada nas regiões do visível ou infravermelho próximo. Desde então, as reações quimioluminescentes têm sido objeto de estudos para o esclarecimento dos mecanismos envolvidos na emissão de radiação e do efeito de outras espécies na quimioluminescência <sup>4</sup>, a qual pode ocorrer na fase sólida, líquida ou gasosa, sendo mais comum na fase líquida.

Outras substâncias além da lofina participam como substrato em reações quimioluminescentes, como o luminol (LUM), o pirogalol, a luciferina e a lucigenina (figura 2).

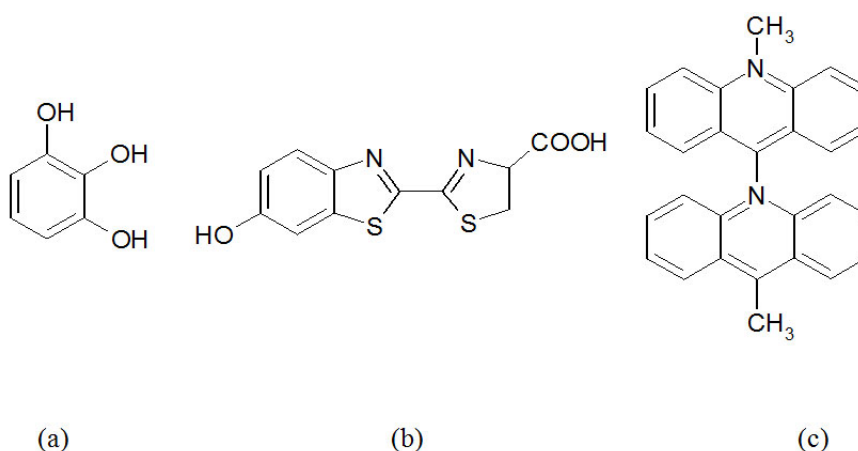


Figura 2: Estruturas químicas do pirogalol (a), luciferina (b) e lucigenina (c). (Arquivo pessoal)

Para que ocorra a quimioluminescência são necessários três requisitos energéticos <sup>4</sup>: em primeiro lugar, deve haver energia suficiente para que um número de moléculas possa atingir o estado eletronicamente excitado. Em segundo lugar, a reação deve ser exotérmica, com liberação de energia na faixa de 170-300kJ/mol. Por fim, a transição do estado excitado para o estado de mais baixa energia com emissão de fóton deve ser energeticamente favorável, em competição com outros processos de radiação <sup>4</sup>.

As vantagens analíticas da quimioluminescência incluem alta sensibilidade, baixos limites de detecção, ampla faixa de resposta linear e instrumentação relativamente simples. Os baixos limites de detecção resultam de uma série de fatores, sendo que o principal se deve ao fato de não necessitar de fonte de radiação. Assim, limites de detecção da ordem de femtomol ( $10^{-15}$ ) são alcançados.

A aplicação da reação quimioluminescente do luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona ou 3-aminofthalhidrazida) em testes presuntivos para detecção de manchas de sangue latente é conhecida há mais de 50 anos na ciência forense <sup>5</sup>. Essa reação baseia-se na emissão de luz através da reação química entre o LUM, um agente oxidante, meio básico e catalisador (metal). Desta forma, as características do meio reacional podem interferir na cinética da reação, com o tempo de reação e a duração e intensidade da emissão podendo variar de períodos muito curtos (menores que 1s) até muito longos (cerca de 1 dia), o que pode causar resultados falso-positivos ou falso-negativos.

Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo

apresentar uma revisão sobre a aplicação do LUM em testes presuntivos para detecção de sangue humano, destacando-se os aspectos químicos, biológicos e toxicológicos do mesmo.

## 2- A REAÇÃO QUIMIOLUMINESCENTE DO LUMINOL

Luminol (figura 3) é um sólido cristalino branco-amarelado, com temperatura de fusão entre 319-320°C, praticamente insolúvel em água (<0,1g/100mL), estável à temperatura ambiente e sensível à luz e ao calor <sup>5</sup>. Possui  $pK_{a1}$  de 6,74 e  $pK_{a2}$  de 15,1. É um composto lábil, o que faz com que o preparo da solução deva ser feito no momento do uso.

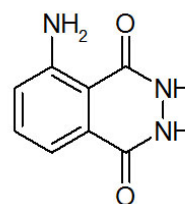


Figura 3: Estrutura química do luminol. (Arquivo pessoal)

Um dos principais métodos para a obtenção do LUM é por meio da reação da hidrazina com o ácido 3-nitroftálico, mediante aquecimento com a posterior redução do grupamento nitro do 5-nitroftalhidrazina para a formação do produto final, conforme demonstrado na figura 4 <sup>6</sup>.

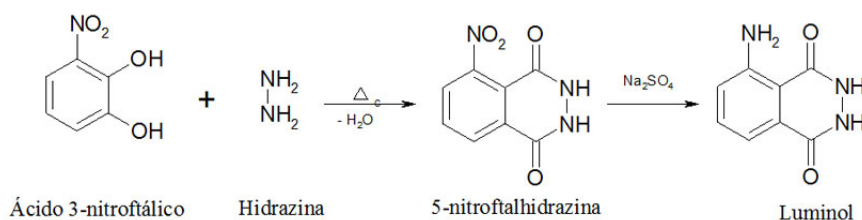


Figura 4: Síntese do luminol. (Arquivo pessoal)

Outra rota sintética foi proposta por Wang e colaboradores <sup>7</sup> em 2007, em que a primeira etapa da síntese do LUM consiste na nitração do anidrido ftálico. Essa reação é realizada com a mistura de ácido sulfúrico e ácido nítrico que formam o eletrófilo dióxido de nitrogênio. O anel aromático reage com o eletrófilo resultando na mistura dos isômeros, como mostra a figura 5. O

produto ácido 3-nitroftálico (produto A) é o minoritário e menos solúvel em água do que o isômero (produto B). A separação dos isômeros é realizada com a adição da água no meio reacional devido à diferença de solubilidade dos produtos, porém essa separação não é satisfatória, mantendo uma mistura reacional que resulta em um produto impuro.

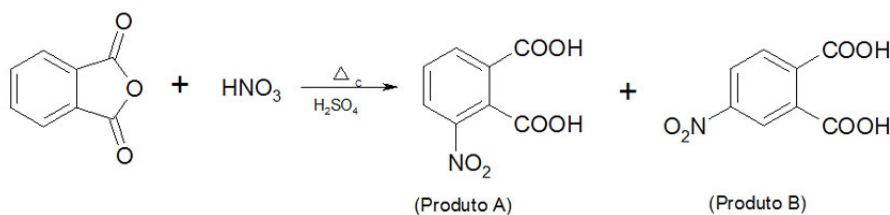


Figura 5: Reação de nitração do anidrido ftálico. (Arquivo pessoal)

A segunda etapa da síntese é a formação do 3-nitroftalhidrazina a partir da reação do ácido 3-nitroftálico com a hidrazina, conforme apresentando anteriormente na figura 4.

Para a ocorrência da quimioluminescência utilizando LUM são necessários um reagente oxidante ( $H_2O_2$ ,  $O_2$ ,  $ClO^-$ ) e um catalisador (metais de transição por exemplo), sendo mais eficiente em meio básico, utilizando solventes próticos ou dipolares apróticos (como, por exemplo, dimetilsulfóxido) <sup>8</sup>. O comprimento de onda máximo da reação quimioluminescente depende do solvente utilizado, com 431nm para água, 502nm para dimetilsulfóxido, 499nm para dimetilformamida e 500nm para acetonitrila <sup>4</sup>.

Em 1928 foi realizado por Albrecht o primeiro trabalho sobre a reação do LUM, em que era oxidado por peróxido de hidrogênio, em meio alcalino, na presença de um catalisador, gerando uma quimioluminescência azul com comprimento de onda em torno de 425nm. O mecanismo da reação continua sendo estudado até os dias de hoje, existindo diversas propostas mecanísticas para a reação de oxidação do LUM. Porém, as propriedades termodinâmicas e cinéticas envolvendo a formação de estados eletronicamente excitados ainda não estão totalmente elucidadas <sup>9</sup>.

Dados da literatura <sup>10</sup> relatam que a primeira proposta da utilização do LUM na detecção preliminar de sangue foi proposta por Specht <sup>11</sup> em 1937, o qual pulverizou sangue sobre paredes de pedra, cercas de ferro enferrujado e um jardim. Após 14 dias, aplicou solução de LUM, observando quimioluminescência de 10 a 15 minutos, concluindo que a reação positiva foi mais evidente

em amostra de sangue envelhecido.

Uma das propriedades do LUM refere-se a sua capacidade de ser protonado em solução ácida e dissociado em solução básica, devido aos valores dos pKas citados, o que possibilita a tautomerização ceto-enólica em solução ou no estado sólido. Esta propriedade foi utilizada por Proesher e Moody <sup>12</sup>, os quais concluíram que a intensidade e duração da emissão de quimioluminescência foram aumentadas com sangue seco e envelhecido, em relação ao sangue fresco, confirmando a observação de Specht <sup>11</sup>. Eles <sup>12</sup> também observaram que a solução de LUM poderia ser aplicada repetidas vezes sobre manchas de sangue, permitindo uma repetição da quimioluminescência.

Um dos possíveis mecanismos da reação do LUM, apresentado na figura 6, foi proposto por Albertine e colaboradores <sup>8</sup>. Nessa proposta, um metal de transição que age como catalisador realiza a conversão do LUM em diazoquinona, que é então atacada pelo ânion proveniente do peróxido de hidrogênio hidrolisado, formando um endoperóxido, perdendo uma molécula de nitrogênio ( $N_2$ ) e formando então o diânion do ácido 3-aminofáltico, que já é produzido no estado excitado. Essa é a espécie que sofrerá liberação de fótons, gerando a quimioluminescência por meio da emissão de luz em 425-430nm, quando o elétron excitado pela reação retorna ao seu estado fundamental, que é dependente das condições reacionais, como pH, concentração dos reagentes e catalisador.

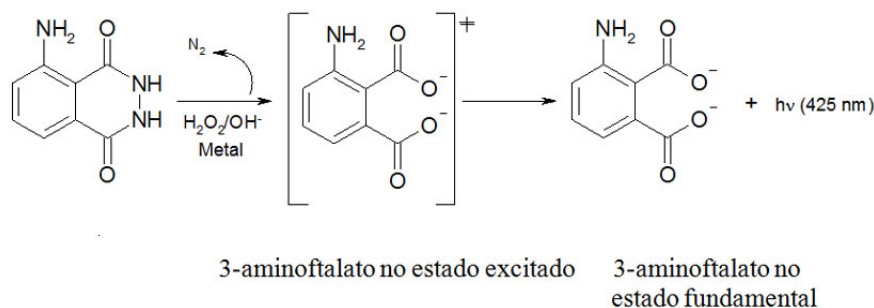


Figura 6: Esquema geral da reação do luminol. (Arquivo pessoal)

Nos últimos anos, várias preparações de LUM foram descritas buscando melhorar a sensibilidade, especificidade e duração da emissão. Entretanto ainda são utilizadas as formulações descritas por Grodsky e colaboradores <sup>13</sup>, em que são utilizados perborato de sódio e carbonato de sódio, e por Weber <sup>14</sup>, utilizando hidróxido de sódio e peróxido de hidrogênio, sendo esta última a mais utilizada devido ao seu bom desempenho e simplicidade de preparação.

Existem diversos produtos que podem afetar a reação quimioluminescente do LUM, tais como detergentes, alvejantes, antioxidantes comuns em bebidas e alimentos, como chá, vinho, cerveja, café, legumes e frutas, desinfetantes ou antissépticos contendo permanganato de potássio ou iodo <sup>15</sup>.

### 3- APLICAÇÃO DO LUMINOL NA DETECÇÃO DE SANGUE

Algumas proteínas possuem uma porção não peptídica, denominada de grupo prostético, a qual está envolvida em funções biológicas das mesmas, como é caso da hemoglobina, que corresponde a um complexo hexacoordenado responsável pela condução de oxigênio aos tecidos do organismo. É composta por uma porção proteica, chamada globina, e quatro cadeias polipeptídicas ligadas a um grupamento prostético heme, contendo o átomo de ferro ligado ao sistema pirrólico, chamado de porfirina (figura 7).

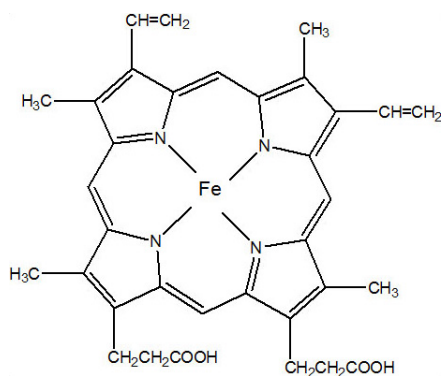


Figura 7: Estrutura química da porção heme da hemoglobina. (Arquivo pessoal)

O ferro apresenta estado de oxidação +2 (ferrohemoglobina, coloração vermelha), que sofre oxidação após estar exposto a uma série de processos degradativos, passando por hemólises e reações de oxirredução, catalisadas em um primeiro momento por enzimas de sua própria estrutura celular e, também, por aquelas presentes em microrganismos que se encontram no ambiente, passando para o estado de oxidação +3 (ferrihemoglobina, coloração marrom), ocorrendo a mudança de heme para hemina ou hematina.

Em 1985, Thornton e Maloney<sup>16</sup> propuseram um mecanismo de reação do LUM, no qual a hemina atua como catalisador, promovendo a oxidação do LUM pelo peróxido de hidrogênio em solução alcalina. Nesse processo, os grupamentos heme contendo  $Fe^{3+}$  perdem mais um elétron e vão para um novo estado de oxidação, formando intermediários instáveis contendo  $Fe^{4+}$ , que então catalisam sua oxidação, produzindo assim a quimioluminescência<sup>5</sup>, enquanto são reduzidos novamente a  $Fe^{3+}$ . Esse ciclo catalítico permite que o átomo de ferro da porção heme participe do processo por diversas vezes, possibilitando assim que o LUM seja adicionado, repetidas vezes, sobre a superfície a ser analisada. Dessa maneira, a intensidade e a duração da quimioluminescência são aumentadas para amostras secas e envelhecidas, chegando a reações positivas por até três anos, conforme relatado na literatura<sup>16</sup>. O mecanismo proposto por Thornton e Maloney<sup>16</sup> foi observado por outros pesquisadores<sup>17</sup>.

Quickenden e colaboradores<sup>18</sup> descreveram a interferência do pré-aquecimento das amostras de sangue no resultado da reação com LUM. Esse estudo objetivou verificar os ciclos de temperatura aos quais o sangue possa estar exposto, entre eles o aquecimento de motores de veículos. Os resultados obtidos demonstraram que a quimioluminescência aumentou consideravelmente com o aumento da temperatura. Segundo os pesquisadores esse fato ocorreu devido à formação de metahemoglobina a partir da hemoglobina, produzida pelo calor fornecido.

Creamer e colaboradores<sup>19</sup> pesquisaram a interferência de 250 substâncias na detecção de sangue utilizando LUM, principalmente as de natureza ambiental, industrial e doméstica. Cerca de 240 não produziram resultado positivo, e o restante apresen-

taram resultados positivos, com diferentes intensidades de reação quimioluminescente, dentre as últimas hipocloritos, cobre metálico, polidores de móveis e algumas tintas.

Quickenden e colaboradores<sup>20</sup> estudaram uma maneira de distinguir a intensidade da emissão da quimioluminescência catalisada pela hemoglobina humana daquela produzida por hipoclorito. A abordagem utilizada foi procurar por mudanças espectrais ocorridas quando o íon hipoclorito foi substituído pela hemoglobina. Os resultados obtidos demonstraram maior intensidade e tempo de duração na quimioluminescência produzida pela hemoglobina humana, demonstrando diferentes cinéticas de reação. Entretanto os resultados não apresentaram distinção entre as hemoglobinas humana e animal.

Outro fator determinante na eficiência dos resultados da aplicação do LUM refere-se à natureza dos substratos. Os materiais absorventes englobam substratos com superfícies porosas, como madeira, paredes e telhas que, devido a sulcos ou fissuras na superfície, são capazes de manter o sangue durante muito tempo, mesmo após lavagens<sup>17</sup>. Podem ser incluídos também substratos com maior capacidade de absorção tais como carpetes, roupas em couro, roupas em tecido e cobertores. Dentre os substratos não absorventes tem-se vinil, azulejo, vidro e metal, os quais apresentam dificuldades tanto na aplicação do reagente quanto na qualidade da quimioluminescência. Essas superfícies são incapazes de efetivamente reter e armazenar o sangue, como demonstrado por Laux e colaboradores<sup>17</sup>, apresentando facilidade de limpeza, sendo que uma tentativa de lavagem suave por água e sabão leva à remoção das manchas de sangue produzindo reação quase inexistente com LUM.

Outro substrato que apresenta dificuldade na interpretação da reação refere-se aos solos, principalmente devido às diferentes composições dos mesmos, em especial os metais pesados, que, conforme já relatado, podem agir como catalisadores. Adair e colaboradores<sup>21,22</sup> estudaram a estabilidade do LUM em diferentes tipos de solos. Os resultados obtidos demonstraram a detecção de sangue por até dois anos de deposição, através de testes em áreas contaminadas com sangue humano e exposta a diferentes condições ambientais. Por outro lado, Noedel e Jagmin<sup>23</sup> utilizaram fertilizantes contendo sangue seco e foram capazes de detectar o sangue com LUM após um ano de exposição. Vale a pena destacar que o pH do meio interfere na eficiência da reação, com condições ideais entre 10 e 13. Experimentos realizados por Blum e colaboradores<sup>24</sup> demonstraram que o pH ideal para identificar manchas de sangue é em torno de 11,5.

A aplicação de LUM em superfícies entintadas também tem sido estudada, visto a utilização de tintas em locais de crime objetivando dificultar a visualização das manchas de sangue. Adair<sup>25</sup> demonstrou esse fato através do estudo de diversos interferentes, como tipo de tinta, número de camadas de tinta, eficiência da limpeza, tipos de padrão de mancha de sangue e textura de parede. Os resultados obtidos apontaram a necessi-



dade de utilização de fontes de luz com comprimento de onda de 445nm e filtro de cor amarela, além de espátulas ou estiletes para a remoção das diferentes camadas. Miranda e colaboradores<sup>26</sup> também analisaram a interferência de superfícies entintadas na aplicação do LUM, sendo também observada a necessidade da remoção da camada de tinta.

Recentemente Cavalcanti e Barros<sup>27</sup> estudaram a ação antioxidante de chá verde e chá preto, os quais podem impedir ou bloquear a produção das espécies reativas de oxigênio no sangue, gerando resultados falso-negativos. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade dos chás verde e preto em diminuir a intensidade da luz da reação de LUM após a adição das formulações de Grodsky<sup>13</sup> e Weber<sup>1,4</sup>, sendo mais nítido com o chá verde. Esse fato também foi observado por Bancirova<sup>28</sup>, avaliando as capacidades antioxidantes dos chás preto, verde e do vinho branco sobre as manchas de sangue.

Vários estudos visando minimizar as interferências na reação do LUM têm sido realizados. Entre eles o uso de derivados de análogos de LUM, a variação na ordem de mistura dos reagentes, o pré-tratamento do substrato a ser testado com substâncias químicas e a adição de aditivos químicos ao LUM<sup>5</sup>. Destaca-se<sup>29</sup> que o LUM é altamente sensível e que o sangue pode ser detectado mesmo em uma diluição de 1:1.000.000.

#### 4- TOXICIDADE DO LUMINOL

Poucos relatos são encontrados na literatura sobre a toxicidade do LUM. Estudos com animais<sup>30</sup> demonstraram uma DL<sub>50</sub> oral para ratos de 500mg/kg, causando o aumento da excreção de sódio e diminuição da pressão arterial após uma única dose intravenosa. Sanders e colaboradores<sup>31</sup> sugerem pouco potencial de toxicidade crônica em seres humanos, devido principalmente à rápida metabolização e excreção do LUM. Mostraram também que o LUM é fracamente absorvido pela pele e facilmente absorvido no epitélio dos alvéolos pulmonares.

Um dos reagentes utilizados é o hidróxido de sódio, aplicado na formulação descrita por Weber<sup>14</sup>, que é corrosivo, irritante do trato respiratório e mutagênico. Já o carbonato de sódio, utilizado na formulação descrita por Grodsky e colaboradores<sup>13</sup>, é irritante para os olhos e as mucosas. O peróxido de hidrogênio é corrosivo, prejudicial por inalação e em caso de ingestão é mutagênico e teratogênico. O perborato de sódio irrita os olhos e a pele e é também mutagênico e teratogênico<sup>32</sup>.

Como o LUM é aplicado na forma de aerossol, outro aspecto a ser considerado é o tempo de permanência da solução de LUM no ar, em um ambiente fechado. Estudos realizados pela Academia de Polícia de Zutphe<sup>32</sup> demonstraram que um minuto após a pulverização da solução sobre uma seção de parede, do teto ao chão, em uma sala de 20m<sup>2</sup>, as gotículas da solução foram distribuídas uniformemente ao longo do quarto. Isso demonstra que os equipamentos de proteção individual (EPIs) devem ser utilizados durante um período significativo de tempo após a aplicação do

LUM (provavelmente até 30 minutos após o tratamento)<sup>32</sup>, considerando-se principalmente a utilização de equipamentos de proteção adequados como óculos, máscaras (respiradores) contra névoas e poeiras, luvas descartáveis e jaleco.

A falta de uso ou acessibilidade de EPIs, bem como a ausência ou ineficiência de treinamentos podem colocar em risco a saúde do profissional forense, uma vez que são pouco conhecidos seus efeitos toxicológicos agudos e/ou crônicos<sup>33</sup>.

#### 5- COLETA E ANÁLISE DE MATERIAL APÓS APLICAÇÃO DE LUMINOL

Como o LUM trata-se de um teste presuntivo para sangue, é necessária a utilização de exames complementares, como imunoensaio e extração de ácido desoxirribonucleico (ADN), objetivando a identificação de sangue humano.

O método de coleta a ser utilizado depende da natureza do substrato em que a mancha está localizada, conforme já relatado. Para objetos imutáveis, como piso, paredes e veículos o melhor procedimento consiste na utilização de cotonete (*swab*) ou outro suporte altamente absorvente. Em alguns casos, as manchas podem ser removidas da superfície por raspagem com um bisturi ou recorte de parte do material. Por outro lado, objetos móveis, como componentes de móveis, tapetes e ferramentas, o melhor procedimento consiste na coleta do objeto. Vale a pena destacar que a qualidade, exatidão e confiabilidade dos resultados obtidos na análise de ADN em vestígios coletados e/ou relacionados a ocorrências criminais, dependem dos procedimentos utilizados no levantamento das amostras, buscando garantir a preservação da cadeia de custódia.

Para a identificação de sangue humano são comumente utilizados testes imunológicos, os quais empregam ensaios imunocromatográficos através da formação de um complexo entre um anticorpo monoclonal (anti-hemoglobina humana), a amostra (antígeno) e um segundo anticorpo policlonal<sup>34</sup>.

Um dos testes utilizados é o *Hexagon OBTI (Bluestar Forensic, Monaco)*, o qual é adequado para material envelhecido e degradado. O antígeno é insensível a uma variedade de interferentes ambientais, com exceção da exposição a determinados detergentes e alvejantes domésticos e exposição prolongada a certas preparações de LUM. Embora esse ensaio seja específico para hemoglobina humana, não é específico unicamente para o sangue. Os fluidos corporais, que não o sangue, podem conter traços de hemoglobina e produzir um resultado falso positivo<sup>35</sup>. Outro teste utilizado é o anticorpo anti-hemoglobina humana, *Feca-Cult One Step Test (Alamar Tecnocientífica, Brasil)*, originalmente desenvolvido para detectar sangue oculto em fezes.

Dados recentes demonstram que o LUM pode interferir nos ensaios imunocromatográficos<sup>36</sup>, utilizando o teste *WAMA® (Wama Diagnóstica, Brasil)*, o qual é aplicado na determinação qualitativa de sangue oculto nas fezes. Os resultados mostraram que a aplicação de LUM promove a diluição da amostra de sangue, interferindo assim na eficiência do teste. Por esse motivo,

os autores sugerem que, nos casos em que a amostra for previamente pulverizada pela solução de LUM, o mais seguro seria submeter a amostra diretamente à extração de ADN, sem realização prévia do teste presuntivo.

Após a confirmação da origem humana do sangue na amostra, é importante a obtenção do perfil genético, para que, através de comparação com materiais de referência (sangue, *swab* oral, dentes ou ossos, dentre outros), seja possível a identificação do indivíduo doador do material.

Com o intuito de verificar a interferência dos testes de presunção na extração de ADN, alguns estudos foram realizados utilizando vários tipos de reagentes. Um desses experimentos foi publicado por Ponce e colaboradores<sup>37</sup> em 2002, visando verificar a interferência do LUM em posteriores extrações e ampliações de ADN. Os resultados demonstraram que não existem diferenças entre os resultados de amplificação de amostras sem o tratamento prévio com o LUM e aquelas que foram testadas com o reagente, o que demonstra que o LUM não interfere na análise de ADN por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Outro estudo foi realizado utilizando soluções de LUM contendo hidróxido de sódio, as quais interferiram na realização do teste imunocromatográfico para hemoglobina humana após 72 horas de contato com o reagente e de métodos sorológicos tradicionais para tipagem sanguínea<sup>38, 39</sup>. Foi demonstrado, através da análise de RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), que o LUM não tem efeito deletério sobre o exame de ADN. Com o desenvolvimento de novas técnicas, como a PCR, que permite a obtenção de perfis genéticos em quantidades mínimas de material biológico, também foram obtidos resultados satisfatórios na genotipagem, mesmo após a aplicação do LUM<sup>40</sup>. A extração do ADN, nesses estudos, foi feita logo após a aplicação do LUM e a genotipagem foi realizada utilizando *loci* de STRs (*Short Tandem Repeat*). Complementado esse estudo, Almeida e colaboradores<sup>41</sup> sugeriram que

os testes sorológicos devem ser realizados em até 7 dias, e a genotipagem um ou dois dias depois da aplicação de reagentes.

Estudos realizados por Santos e colaboradores<sup>42</sup> mostraram que a presença de LUM não impediu a detecção de sangue presente nas amostras analisadas através da pesquisa de gamaglobulinas humanas. As quantidades de ADN obtidas nas extrações das amostras foram suficientes para tipagem de microssatélites de ADN autossômico nuclear. Em vários estudos científicos foi mostrado que o uso de preparações de LUM não parece ter efeito inibitório sobre PCR e digestão STR fluorescente<sup>43</sup>. No entanto, existe o risco de degradação do ADN com exposição prolongada ao LUM.

## 6- ASPECTOS FOTOGRÁFICOS DA REAÇÃO DO LUMINOL

Nesta seção serão apresentados aspectos da experiência pessoal dos autores quanto ao registro fotográfico da reação quimioluminescente do LUM.

Inicialmente eram utilizadas câmeras fotográficas analógicas, com filmes de maior sensibilidade, otimizando a abertura do diafragma e a velocidade do obturador, chegando a capturar a quimioluminescência por até dez minutos de exposição. As desvantagens eram a utilização de grande quantidade do reagente, bem como maior tempo de permanência no ambiente, além da possibilidade de perda da fotografia após a revelação do filme.

Atualmente são utilizadas câmeras fotográficas digitais, em que se busca a otimização dos parâmetros fotográficos de maneira manual, principalmente devido ao baixo tempo de exposição disponível nesses tipos de câmeras. Para isso são otimizados o tempo de exposição, sensibilidade (ISO), velocidade do obturador, abertura do diafragma (profundidade de campo) e incidência de luz (*flash*), buscando destacar não apenas a reação quimioluminescente, mas também os suportes (figura 8).

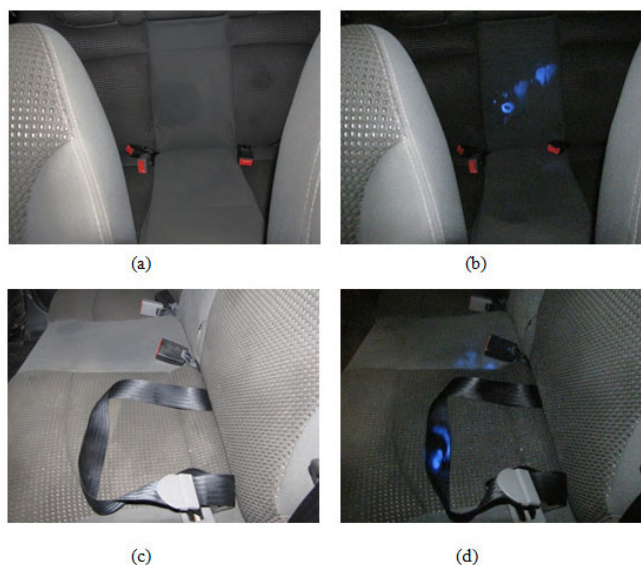


Figura 8: Fotografias antes (a) e (c) e após a aplicação do luminol (b) e (d). Utilização da câmera fotográfica CANON IX10 em modo automático (a) e (c), e modo manual (b) e (d) com ISO 1600, velocidade do obturador 15", abertura do diafragma 2,8, *flash* -2 e temporizador 2". (Arquivo pessoal)

Um fator que interfere diretamente na qualidade da fotografia refere-se ao volume do reagente aplicado bem como a forma e velocidade do aerossol (*spray*), ocasionando destruição do padrão da mancha de sangue. Em superfícies verticais, a gravidade faz com que as gotículas maiores “corram” juntamente com a luz, fazendo com que o padrão da mancha de sangue fique abaixo da superfície vertical (figura 9). Em superfícies horizontais, as gotículas tendem a se espalhar,

resultando no deslocamento do padrão da mancha. Além disso, o *spray* não é uniforme, o que significa que algumas áreas da mancha de sangue receberão mais LUM do que outras áreas. Desse modo, a análise morfológica das manchas de sangue após o tratamento com LUM é limitada, devido à solubilidade de produtos oxidativos produzidos pela reação, principalmente manchas de sangue com alto detalhe, como impressões digitais e salpicos de impacto.

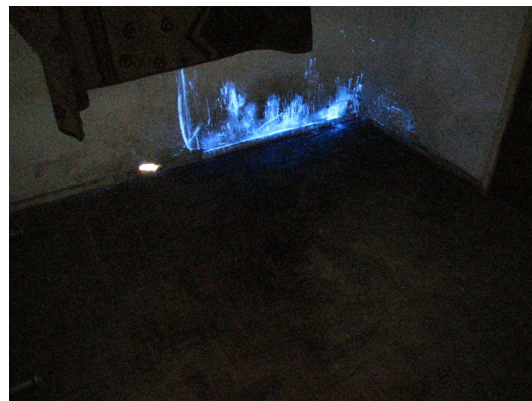


Figura 9: Fotografias mostrando antes (a) e após aplicação do luminol (b) em superfície vertical. Utilização de câmera fotográfica CANON IX10 em modo automático (a) e modo manual (b) com ISO 1600, velocidade do obturador 15”, abertura do diafragma 2,8, flash -2 e temporizador 2”. (Arquivo pessoal)

Ensaio por nós realizados mostraram ser possível, inclusive, em situações de baixa luminosidade (penumbra), obter resultados satisfatórios utilizando-se a máquina fotográfica no modo automático (disparo instantâneo), desde que seja utilizado um equipamento de alta qualidade e sem acionamento do *flash*.

Com a disseminação do uso dos aparelhos *smartphones*

e a constante atualização de parâmetros de captura de imagem desses equipamentos, também é possível obter fotografias com qualidade aceitável em situações de baixa luminosidade e disparo instantâneo (figura 10). Entretanto, em situações de escuro absoluto, esses autores não obtiveram êxito na captura de imagens com uso de *smartphone*, mesmo com a utilização de *flash*.



Figura 10: Fotografia após a aplicação do luminol, obtida com a câmera instantânea do Iphone6 (Resolução de 3264x2448 *pixels*), em local com baixa luminosidade. (Arquivo pessoal)

## 7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

A utilização do LUM em aplicações forenses é amplamente empregada nos levantamentos periciais, buscando auxiliar na identificação dos envolvidos em um determinado delito. Dessa maneira, torna-se necessário o conhecimento das propriedades desse reagente, desde aspectos químicos e toxicológicos a limitações de uso do mesmo, principalmente em relação a sua alta sensibilidade e baixa especificidade. Outro aspecto de extrema importância refere-se ao registro fotográfico da reação quimioluminescente do LUM, utilizando os mais modernos equipamentos fotográficos, desde processos analógicos até processos digitais, incluindo câmeras de *smartphones*.

## 8- REFERÊNCIAS

1- VIDOTTO, A.; QUEIROZ, P.R.O. *Técnica de quimioluminescência em manchas de sangue: O uso de luminol para a sua identificação*. Disponível em: <<http://www.cpgls.ucg.br/6a-mostra/artigos/saude/ananza%20vidotto%20e%20%20paulo%20>



roberto%20queiroz.pdf.> Acesso em: 11 de julho de 2013.

- 2- MOREIRA, L. *Informática e educação: A (re)estruturação da prática educativano contato com os computadores*. 2002. Dissertação (mestrado em Educação) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Educação, Campinas.
- 3- SANTOS, L.M.E. *Análise do perfil molecular de vestígios sanguíneos provenientes de locais de crimes após aplicação de reagente quimioluminescente*. 2013. Dissertação (mestrado em Genética) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia.
- 4- FERREIRA, E.C.; ROSSI, A.V. A quimiluminescência como-ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. *Química Nova*, v.25, p.1003-1001, 2002.
- 5- BARNI, F.; LEWIS, S.W.; BERTI, A.; MISKELLY, G.M.; LAGO, G. Forensic applications of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*, v.72, p.896-913, 2007.
- 6- CHEMELLO, E. *Ciência forense: Manchas de sangue*. Disponível em: <[http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2007jan\\_forense2.pdf](http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2007jan_forense2.pdf)>. Acesso em 05 outubro. 2017.
- 7- WANG, S.; LI, Q.; LIN, X.Z.; WANG, H.R.; LIU, L. Solubility of 3-Nitrophthalic Acid in different solvents between 278 K and 353 K. *Journal of Chemical & Engineering Data*, v.52, p.876-877, 2007.
- 8- ALBERTIN, R.; ARRIBAS, M.A.G.; BASTOS, E.L.; RÖPKE, S.; SAKAI, P.N.; SANCHES, A.M.M.; STEVANI, C.V.; UMEZU, I.S.; YU, J.; BAADER, W.J. Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. *Química Nova*, v.21, p.772-779, 1998.
- 9- SANCHES, M.A. *Desenvolvimento de procedimentos analíticos em sistemas de análises em fluxo empregando quimiluminescência em guia de ondas*. 2007. Dissertação (mestrado em Química Analítica) - Universidade de São Paulo. São Paulo.
- 10- GRISPINO, R.R.J. Luminol and the crime scene. *Prosecutor*, v.25, p.28-32, 1991.
- 11- SPECHT, W. Die Chemiluminescenz des Hamins, ein Hilfsmittel zur auffindung und erkennung forensisch wichtiger blutspuren. *Chemie*, v.50, p.155-157, 1937.
- 12- PROESCHER, F.; MOODY, A.M. Detection of blood by means of chemiluminescence. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, v.24, p.1183-1189, 1939.
- 13- GRODSKY, M.; WRIGHT, K.; KIRK, P.L. Simplified preliminary blood testing-an improved technique and a comparative study of methods. *Journal of Criminal Law, Criminology and Police Science*, v.42, p.95-104, 1951.
- 14- WEBER, K. The use of chemiluminescence of Luminol in forensic medicine and toxicology. I. Identification of blood stains. *Deutsch Zeitschrift fur die Gesamte Gerichtliche Medizin*, v.57, p.410-423, 1966.
- 15- FERNANDEZ-GUTIERREZ A.; DE LA PENA, A.M. Inorganic substances by luminescence methods. *Molecular Luminescence Spectroscopy*, v.77, p.463-475, 1985.
- 16- THORNTON, J.; MALONEY, R. The chemistry of the luminol reaction – where to from here? *CAC Newsletter*, v.12, p.9-17, 1985.
- 17- LAUX, D.L. Principles of bloodstain pattern analysis: Theory and practice. In: JAMES, S.H.; KISH, P.E.; SUTTON, T.P. (Org.) *The detection of blood using luminol*. Boca Raton: CRC Press, p. 369-389, 2005, cap.15.
- 18- QUICKENDEN, T.I.; ENNIS, C.P.; CREAMER, J.I. The forensic use of luminol chemiluminescence to detect traces of blood inside motor vehicles. *Luminescence*, v.19, p.271-277, 2001.
- 19- CREAMER, J.; QUICKENDEN, T.I.; APANAH, M.V.; KERR, K.A.; ROBERTSON, P. A. comprehensive experimental study of industrial, domestic and environmental interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence*, v.18, p.193-198, 2003.
- 20- QUICKENDEN, T.I.; COOPER, P.D. Increasing the specificity of the forensic luminol test for blood. *Luminescence*, v.16, p.251-253, 2001.
- 21- ADAIR, T.W.; SHIMAMOTO, S.; TEWES, R.; GABEL, R. The Use of Luminol to detect blood in soil one year after deposition. *IABPA News*, v.22, p.47, 2006.
- 22- ADAIR, T.W.; SHIMAMOTO, S.; TEWES, R.; GABEL, R. Detecting blood patterns in soil with luminol two years after deposition. *IABPA News*, v.23, p.1419, 2007.
- 23- NOEDEL, M.; JAGMIN, A. The forensic examination of commercially available dried blood products. *Journal of the Association for Crime Scene Reconstruction*, v.15, p.23-28, 2009.
- 24- BLUM, L.J.; ESPERANÇA, P.; ROCQUEFELTE, S. A new high-performance reagent and procedure for latent blood stain detection based on luminol chemiluminescence. *Canadian Society of Forensic Science*, v.39, p.81-110, 2006.
- 25- ADAIR, T.W. The experimental detection of blood under painted surfaces. *IABPA News*, v.21, p.12-19, 2006.
- 26- MIRANDA, G.E.; PAULA W.X.; ROMANO, A.; SANTOS, V.R.D.E.; MELANI, R.F. H. Detecção de manchas de sangue pelo luminol onde houve entintamento das paredes – estudo de caso. *Revista Brasileira de Criminalística*, v.5, p.14-17, 2016.
- 27- CAVALCANTI, D.R.; BARROS, R.M. Escondendo manchas de sangue em locais de crime: Análise da ação antioxidante dos chás verde e preto sobre o Luminol. *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics*, v.6, p.47-60, 2016.
- 28- BANCIROVA, M.; BANCIROVA M. Black and green tea – How to make a perfect crime. *Journal of Forensic and Legal Medicine*, v.20, p.635-639, 2013.
- 29- NAGESHA, D.; GHOSH, S.A. time period study on the efficiency of luminol in the detection of blood stains concealed by paint on different surfaces. *Forensic Science International*, v.275, p.1-7, 2017.
- 30- TICE, R. *Review of toxicological literature, Report prepared by 'Integrated Laboratory Systems' for National Institute of Environmental Health Sciences*, 1997. Disponível em: <[https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem\\_background/exsumpdf/chaconinesolanine\\_508.pdf](https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/chem_background/exsumpdf/chaconinesolanine_508.pdf)>. Acesso em: 20 de novembro de 2014.

- 31- SANDERS, J.M.; CHEN, L.J.; BURKA, L.T.; MATTHEWS, H.M. Metabolism and disposition of luminol in the rat. *Xenobiotica*, v.30, p.263–272, 2000.
- 32- LARKIN, T.; GANNICLIFFE, C. Illuminating the health and safety of luminol. *Science and Justice*, v.48, p.71–75, 2008.
- 33- YAMADA, D.S.; SCHLICHTING, C.L.R. A utilização do luminol em locais de crimes contra a vida: aspectos toxicológicos e a importância da utilização dos equipamentos de proteção individual pelos profissionais da área forense. *Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research*, v.4, p.50-56, 2013.
- 34- FRANCK, M.C.; ALBUQUERQUE, T.C.K. Identificação e tipagem de sangue humano em amostras forenses por enzima I. *Revista Liberato*, v.13, p.01-09, 2012.
- 35- HOCHMEISTER, M.N.; BUDOWLE, B.; SPARKES, R.; RUDIN, O.; GEHRIG, C.; THALI, M.; SCHMIDT, L.; CORDIER, A.; DIRNHOFER, R. Validation studies of an immunochromatographic 1-step test for the forensic identification of human blood. *Journal of Forensic Science*, v.44, p.597–602, 1999.
- 36- VAZ, V.S.; KOBACHUCK, L.D.G. A interferência da solução de luminol em teste imunocromatográfico para pesquisa de sangue humano. *Revista Brasileira de Criminalística*, v.6, p.17-22, 2017.
- 37- PONCE, A.C.; PASCUAL, F.A.V. *Critical revision of presumptive tests for bloodstains*. Disponível em: <<http://projects.nfstc.org/workshops/resources/articles/Critical%20Revision%20of%20Presumptive%20Tests%20for%20Bloodstains.pdf>>. Acesso em 18 outubro de 2017.
- 38- GROSS, A.M.; HARRIS, K.A.; KALDUN, G.L. The effect of luminol on presumptive tests and DNA analysis using the polymerase chain reaction. *Journal of Forensic Science*, v.44, p.837-840, 1999.
- 39- ALMEIDA, J.P. *Influência dos testes de triagem para detecção de sangue nos exames imunológicos e de genética forense*. 2009. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.
- 40- BUDOWLE, B.; LEGGITT, J.L.; DEFENBAUGH, D.A.; KEYS, K.M.; MALKIEWICZ, S.F. The presumptive reagent fluorescein for detection of dilute bloodstains and subsequent STR typing of recovered DNA. *Journal of Forensic Science*, v.45, p.1090-1092, 2000.
- 41- ALMEIDA, J.P.; GLESSE, N.; BONORINO, C. Effect of presumptive tests reagents on human blood confirmatory tests and DNA analysis using real time polymerase chain reaction. *Forensic Science International*, v.206, p.58-61, 2011.
- 42- SANTOS, V.R.D.; PAULA, W.X.; KALAPOTHAKIS, E. Influence of the luminal chemiluminescence reaction on the confirmatory tests for the detection and characterization of bloodstains in forensic analysis. *Forensic Science International: Genetics Supplement Series 2*, v.2, p.196–197, 2009.
- 43- NILSSON, A. *The forensic luminol test for blood: unwanted interference and the effect on subsequent analysis*. The Swedish National Laboratory of Forensic Science (SKL), Linköping University, 2006. Disponível em: <<http://www.imprimus.net/pdf%20files/downloadable%20files%20page/luminol%20test%20for%20blood%20-%20interference%20and%20effect%20on%20analysis.pdf>> Acesso em: 11 de outubro de 2013.