



Luminol: Possíveis Interferentes no Estudo de Sangue Humano

Luminol: Possible Interferents in the Human Blood Study

Lúcia do Valle Fragoso¹, Alberto Gonçalves Vieira de Carvalho Neto²,
Juliana Oliveira Pelegrina³, Sandra Regina Rissato²

¹ Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus Botucatu, SP, Brasil

² Faculdade de Ciências, Departamento de Química, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus Bauru, SP, Brasil

³ Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus Botucatu, SP, Brasil

* Corresponding author. Address: *Instituto de Biociências, Departamento de Zoologia, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Campus Botucatu; Rua Clóvis Barreto Melchert, 780, Bauru, SP, Brasil. Phone: (14) 99760-2334. E-mail: luciaavfragoso@hotmail.com*

First received 5 October 2020; Accepted 16 January 2021

Resumo. O sangue é o único tecido fluido presente no corpo humano, constituído pelas hemácias, leucócitos e plaquetas, sendo responsável por 7 a 8% do peso corporal total. Este tecido conjuntivo desempenha inúmeras funções e, por ser de fácil acesso por meio de punção venosa, é utilizado para estudar os mecanismos fisiológicos do organismo. Em cenas de crimes, o sangue é considerado um dos vestígios de grande interesse pericial para a elucidação do caso. Quando não aparente, utiliza-se o luminol, substância que, quando em contato com H_2O_2 , O_2 , ClO^- , e catalisadores como, por exemplo, o sangue, propriamente dito, e o íon Fe^{+2} presente na porção heme da hemoglobina, apresenta uma reação que emite luz visível através de radiações eletromagnéticas, chamada de quimioluminescência. Porém existem muitos outros compostos que podem ativar esta reação interferindo, significativamente, na busca por informações que levem ao esclarecimento de um delito. Sendo assim, o presente estudo visa realizar uma revisão bibliográfica sobre os possíveis interferentes no estudo de sangue humano com o objetivo de auxiliar a pesquisa de sangue latente em cenas de crime.

Palavras-chave: Ciências forenses; Levantamento de local de crime; Luminol; Mancha de sangue; Sangue; Vestígio latente.

Abstract. Blood is the only fluid tissue present in the human body, consisting of red blood cells, leukocytes and platelets, being responsible for 7 to 8% of total body weight. This connective tissue performs numerous functions and, being easily accessible through venipuncture, it's used to study the physiological mechanisms of the organism. In crime scenes, blood is considered one of the vestiges of great expert interest to elucidate the case. When not apparent, luminol is used, a substance that, when in contact with H₂O₂, O₂, ClO⁻, and catalysts such as, for example, the blood itself and the Fe + 2 ion present in the heme portion of hemoglobin, presents a reaction which emits visible light through electromagnetic radiation, called chemiluminescence. However, there're many other compounds that can activate this reaction, significantly interfering in the search for information that leads to the clarification of a crime. Therefore, the present study aims to carry out a bibliographic review on the possible interferences in the study of human blood, with the objective of assisting the research of latent blood in crime scenes.

Keywords: Forensic sciences; Crime scene investigation; Luminol; Blood stain; Blood; Latent traces.

1. Introdução

O sangue é o único tecido fluido presente no corpo humano, constituído por três porções celulares: os glóbulos vermelhos (hemácias), os glóbulos brancos (leucócitos) e as plaquetas (trombócitos), que circulam no organismo em um líquido extracelular chamado plasma. O sangue é responsável por 7 a 8% do peso corporal total. Um indivíduo adulto possui cerca de 5 a 6 litros de volume total de sangue circulando no organismo¹.

Este tecido conjuntivo desempenha inúmeras funções como: defesa do organismo através dos glóbulos brancos; coagulação sanguínea envolvendo as plaquetas e proteínas presentes no plasma; distribuição de nutrientes para tecidos e órgãos, regulações térmica e hídrica do organismo; manutenção dos equilíbrios aquoso, acidobásico e iônico; e transporte de gases através da hemoglobina presente nas hemácias. Além disso, é de fácil acesso através da punção venosa, facilitando o estudo dos mecanismos fisiopatológicos do organismo¹.

As hemácias são constituídas, principalmente, pela proteína hemoglobina, que é composta basicamente por duas porções: a porção proteica, chamada de

globina, e a porção carreadora de uma estrutura pigmentar ligada ao ferro (Fe), denominada de grupo heme. A molécula de hemoglobina contém quatro unidades deste grupo que, ligadas cada qual a uma molécula de oxigênio (O_2), formam uma estrutura chamada oxi-hemoglobina².

Esta ligação ocorre no grupo prostético heme, que é o local de ligação do O_2 chamado porfirina, no qual se prende o átomo de Fe. Este se localiza no centro do grupo heme, ligando-se a quatro átomos de nitrogênio, à histidina proximal (His) e, de modo reversível, a uma molécula de O_2 , conforme mostrado na Figura 1, baseada no estudo de Marzzoco^{2,3}.

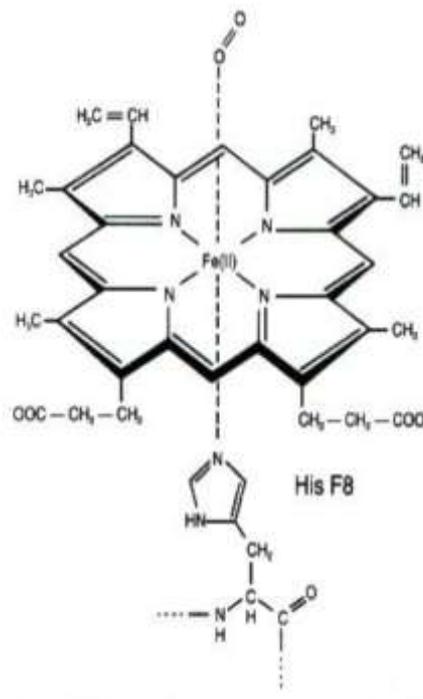


Figura 1. Demonstração da estrutura do grupo heme da hemoglobina e as ligações do átomo de ferro com oxigênio e o radical His.

Em cenas de crime, em exames de peças e de veículos, o sangue é um dos vestígios mais importantes para a elucidação do caso e, para detectá-lo, caso não esteja aparente, utiliza-se, entre outros artifícios, o luminol, o qual é habitualmente aplicado em diversos materiais, tais como paredes, tapetes, vestuários, pisos, instrumentos, entre outros. Existe também a possibilidade de o sangue se apresentar como um vestígio latente em casos onde houve a tentativa de remoção, por meio de lavagem, ou a tentativa de ocultá-lo através, por exemplo, do entintamento de paredes.

O luminol (LUM) é um sólido cristalino de cor branca-amarelada, praticamente insolúvel em água, estável em temperatura ambiente e com sensibilidade à luz e ao calor, tendo sua temperatura de fusão entre 319°C e 320°C⁴. Para obtenção deste composto, é necessária a reação de hidrazina com o ácido 3-nitroftálico, mediante aquecimento com posterior redução do grupamento nitro do 5-nitroftalhidrazina⁵, como representado na Figura 2, baseada no estudo de Vasconcellos⁶.

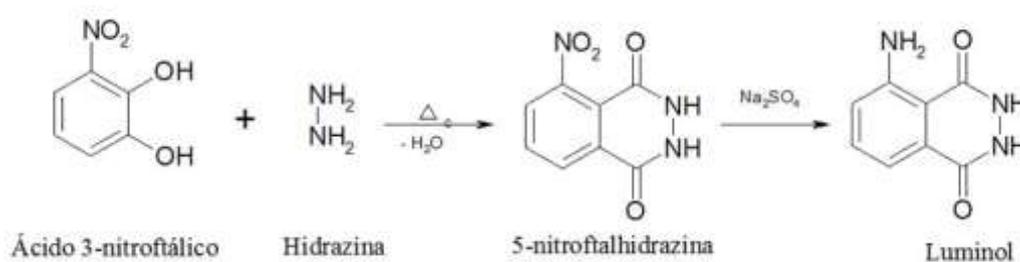


Figura 2. Síntese do luminol.

Este composto químico apresenta reação de quimioluminescência (QL), quando em contato com o sangue. Esta, definida em 1888 por Wiedemann, significa a emissão de radiação eletromagnética que ocorre junto a processos químicos, onde a luminosidade acontece pela quebra das ligações existentes nas moléculas ou através de rearranjos moleculares, emitindo radiação que é observada nas regiões visíveis ou infravermelho próximo, variando de 431 a 500nm, de acordo com o solvente utilizado⁷ (Tabela 1). Para acontecer esse fenômeno utilizando o LUM, são necessários reagentes oxidantes, como H₂O₂, O₂ e ClO⁻, e catalisadores, como os metais de transição⁸, assim como um ambiente escuro para observação de um brilho azul proveniente dessa QL, que dura cerca de 30 segundos se o sangue estiver presente⁹.

Tabela 1. Comprimento de onda máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) de emissão da oxidação do luminol em diferentes solventes.

Solventes	$\lambda_{\text{máx}}$ de emissão (nm)
Água	431
Tetra-hidrofurano	496
Dimetilformamida	499
Acetonitrila	500
Dimetilsulfóxido	502

A utilização da reação de QL do luminol para detecção de vestígios latentes é conhecida há mais de 50 anos, de acordo com Barni et al.⁴. Esta reação é baseada na emissão de luz a partir da reação química do LUM com um agente oxidante, um meio básico e um catalisador. A partir disso, as características do meio podem interferir em alguns aspectos da reação, como na cinética, no tempo, na duração e na intensidade da emissão de luz que pode variar de menos de 1 segundo até 1 dia causando, assim, resultados falsos-positivos ou negativos⁶.

Essa reação química possui vantagens analíticas que incluem sua alta sensibilidade, ampla faixa de resposta linear, instrumentação simples e baixos limites de detecção, podendo chegar a diluição de 1:1.000.000¹⁰, que se devem ao fato da não necessidade de uma fonte de radiação⁶. Porém, existem diversos compostos que podem afetar a reação de QL causada pelo uso do LUM como detergentes, desinfetantes, alvejantes, antissépticos compostos por permanganato de potássio e/ou iodo e, ainda, antioxidantes acrescentados a chás, café, vinhos, cervejas, frutas e legumes¹¹.

Como explanado anteriormente, um dos principais vestígios de interesse pericial, em locais de crimes, são as manchas de sangue. De acordo com Santos¹², através delas é possível relacionar uma série de dados como identificar o suspeito e a vítima, verificar se sua quantidade no local é compatível com o ferimento e auxiliar na dinâmica do acontecimento, utilizando de ferramentas, entre elas, o LUM¹². De acordo com a literatura, a primeira proposta da utilização do LUM para detecção de sangue foi realizada por Specht¹³ em 1937, quando pulverizou sangue sobre paredes de pedra, em um jardim e em cercas de ferro enferrujadas¹⁴. Passados 14 dias, Specht¹³ aplicou uma solução de luminol, e observou o fenômeno da QL por cerca de 10 a 15 minutos, tendo como conclusão uma reação positiva mais evidente nas amostras de sangue envelhecido do que nas amostras frescas analisadas 14 dias antes¹⁴.

Já Thornton e Maloney¹⁵ (1985), propuseram a utilização do LUM, juntamente com a hemina, utilizada como catalisador, para promover a oxidação do luminol através do peróxido de hidrogênio em solução alcalina. Neste estudo, os grupamentos heme com Fe^{3+} perdem um elétron formando compostos instáveis com Fe^{4+} que irão catalisar a oxidação, dando origem a QL⁴, enquanto voltam ao seu estado Fe^{3+} ¹⁵. Este processo permite que os átomos de ferro do grupamento heme participem da reação catalítica várias vezes permitindo, assim, que o LUM seja

aplicado na superfície de análise diversas vezes, ratificando o estudo realizado por Specht¹³, em 1937, que afirma que a duração e a intensidade da QL aumentam em casos de amostras secas e envelhecidas, podendo ter reações positivas por até 3 anos¹⁵.

Este estudo de Thornton¹⁵ (1985) permitiu que vários outros fossem realizados: Quickenden e Cooper¹⁶ (2001) descrevem que o aquecimento das amostras de sangue pode interferir na intensidade da QL, aumentando-a consideravelmente, através da formação de metahemoglobina, a partir da hemoglobina presente na amostra. Ainda em 2001, Quickenden e Creamer¹⁷ compararam a intensidade da QL quando oriunda da reação entre o LUM e a hemoglobina humana e o mesmo com o hipoclorito (princípio ativo de alvejantes), e chegaram aos resultados de que a reação produzida pela hemoglobina do sangue humano é mais intensa e duradoura quando comparada a reação com hipoclorito, porém não tiveram sucesso na distinção para a hemoglobina animal¹⁷.

Posteriormente, em 2003, Creamer et al. pesquisaram a interferência de diversas substâncias de origem ambiental, industrial e doméstica na detecção de amostras de sangue utilizando o LUM, resultando em diferentes intensidades de QL, como hipocloritos, polidores de móveis, cobre metálico e algumas tintas. Mais à frente, Laux¹⁹ (2005) descreveu a eficiência da aplicação do LUM relacionado com a natureza dos substratos e chegou à conclusão que superfícies porosas tendem a absorver o sangue mesmo depois de várias lavagens devido seus sulcos e fissuras, como o caso de madeiras, paredes e telhas e, também, alguns substratos absorventes como carpetes, roupas de tecido e de couro e cobertores, o que auxilia a visualização da QL mesmo após lavagem¹⁹.

Um ano depois, em 2006, Blum et al.²⁰ mostraram que o pH do meio para detectar sangue através do LUM varia entre 10 e 13, sendo 11,5 o pH ideal. Enquanto isso, Adair et al.^{21,22} (2006, 2007) estudaram a eficiência do LUM em diferentes tipos de solos, obtendo resultado positivo para detecção de sangue em até 2 anos de decomposição, mesmo com exposição a condições ambientais distintas. Porém, solos contendo metais pesados poderiam indicar resultados falso-positivos, pois estes agem como catalisadores na reação de QL^{21,22}. Após dois anos, Noedel e Jagmin²³ (2009) utilizaram solos com presença de fertilizantes compostos por sangue seco e obtiveram resultados positivos mesmo após 1 ano de exposição, corroborando com o estudo realizado por Specht¹³ (1937).

Mesmo com todos esses estudos provando a eficácia do LUM para positivar a presença de sangue no local de crime, o LUM é apenas um teste presuntivo para auxiliar no momento da coleta, sendo necessários exames complementares como extração de DNA e imunoenaios para identificação e confirmação da presença de sangue humano⁶.

Para que estes estudos sejam colocados em prática, é necessária uma boa coleta das amostras que possam conter o sangue que será analisado⁶. Sendo assim, quando se tratar de objetos imutáveis, como pisos, veículos e paredes, a coleta da amostra deve ser realizada com ajuda de *swabs* (haste flexível longa e estéril), e as manchas, em alguns casos, podem ser removidas da superfície original por meio de raspagens com um bisturi ou, ainda, recorte de parte do material onde a amostra se encontra⁶. Já para objetos móveis, como ferramentas, componentes de móveis e tapetes, a coleta da amostra consiste na coleta do próprio objeto⁶.

Estas amostras podem reagir com o LUM, porém nem sempre serão compostas por sangue, já que o luminol reage com muitas substâncias⁴. Este fato foi exposto por Creamer e seus colaboradores, Quickenden, Apanah, Kerr e Robertson¹⁸ (2003), que analisaram 250 substâncias (frutas, vegetais, cigarros, tintas, produtos de limpeza, higiene pessoal, superfícies automotivas, etc) e observaram que a grande maioria não produz QL suficientemente intensa com o LUM. Porém, algumas substâncias analisadas como o nabo, hipoclorito, cobre, lustra-móveis e tintas esmaltadas, produzem uma QL parecida com o LUM quando na presença da hemoglobina¹⁸.

Com base nestes estudos, o objetivo do presente trabalho é investigar os possíveis interferentes quando se trata do estudo do sangue humano em cenas de crime.

2. Material e métodos

Para realização desta revisão bibliográfica, foram utilizados artigos científicos publicados em várias bases de dados, entre os anos de 2005 a 2019, todos encontrados com textos completo para acesso na íntegra.

Foram incluídos estudos na língua portuguesa e inglesa que tinham relação direta com o tema e objetivo propostos.

3. Resultados

Para construção do presente trabalho foram utilizados onze artigos científicos, dispostos de acordo com o ano em que foram publicados como apresentado na Tabela 2.

Tabela 2. Apresentação dos artigos usados para construção do estudo, em ordem de publicação.

Artigo e ano de publicação	Título	Objetivo	Conclusão
Adair & Shaw ²⁴ 2005	Aprimoramento de manchas de sangue em roupas lavadas usando reagentes de luminol e Leuco-crystal Violet (LCV)	Realizar testes de visualização de sangue, utilizando LUM e LCV, em três tipos diferentes de padrões de manchas de sangue, mesmo após vários tipos de lavagens em camisetas brancas 100% algodão	A pesquisa apoia o uso do luminol como reagente eficaz para visualizar os padrões latentes de manchas de sangue em roupas lavadas e que o uso da fenolftaleína produzirá resultados presumivelmente positivos, mesmo após a utilização do LUM
Nilsson ²⁵ 2006	O teste forense de luminol para sangue: interferência indesejada e o efeito na análise subsequente	Realizar um apanhado de estudos sobre testes de pré-aquecimento e limpeza de manchas de sangue e sua interferência na reação de quimioluminescência emitida pelas preparações de luminol	O estudo conclui que muitos fatores influenciam o potencial de detectar sangue e que a mancha de sangue envelhecida ou pré-aquecida produz uma reação de QL mais forte e duradoura. O autor acredita que para diminuir o problema dos interferentes no teste do LUM a cena de crime pode ser deixada ventilando por um a dois dias
Silva et al. ²⁶ 2012	Luminol na ciência forense	Realizar um estudo de artigos científicos sobre o uso do ensaio do LUM e seus possíveis interferentes	A pesquisa revela que o luminol possui grande relevância para os especialistas forenses devido sua alta sensibilidade, fácil manuseio e maior

			sensibilidade, porém sem especificidade para o sangue humano
Patel & Hopwood ²⁷ 2012	Avaliação de fórmulas de LUM e seus efeitos no perfil de DNA	Comparar as novas formulações de luminol disponíveis comercialmente com as formulações originais e examinar seu efeito nos métodos de perfil de DNA, com o intuito de avaliar a adequação do uso do luminol em procedimentos laboratoriais para pesquisa e recuperação de manchas de sangue latentes	Foram testadas várias formulações de LUM e notou-se que o luminol produzido pela BlueStar Magnum produziu a QL mais intensa em uma série de diluições em azulejos e tecidos. As manchas no azulejo apresentaram aumento da luminescência quando comparadas ao tecido. Todas as formulações detectaram manchas de sangue com pico de intensidade para diluições entre 1/100 e 1/1.000. A maioria delas mostrou reação até 24 horas após a preparação da solução com redução da intensidade devido o tempo. O impacto do luminol no perfil de DNA não foi totalmente conclusivo
Cavalcanti & Barros ²⁸ 2016	Escondendo manchas de sangue em locais de crime: Análise da ação antioxidante dos chás verde e preto sobre o luminol	Realizar uma análise sobre a ação antioxidante de chás verde e preto em relação a reação de quimioluminescência do ensaio do LUM	A análise feita pelos autores revelou que bebidas e alimentos que sejam fontes naturais de antioxidantes, quando despejados sobre manchas de sangue, podem interferir nos resultados da reação do luminol devido sua capacidade de minimizar a reação de

			QL, podendo gerar resultados falso-negativos
Miranda et al. ²⁹ 2016	Detecção de manchas de sangue pelo luminol onde houve entintamento das paredes – estudo de caso	Realizar um estudo de caso onde houve entintamento das paredes e como isso afetou o ensaio do LUM	Os autores concluíram que o luminol não é capaz de detectar o sangue que está sob a tinta da parede e que a detecção do sangue latente ocorre, somente, quando a camada de tinta, que recobre a mancha, é retirada
Valconcellos & Paula ⁶ 2017	Aplicação forense do luminol – uma revisão	Realizar uma revisão bibliográfica sobre a aplicação forense do luminol	Os autores concluíram que a utilização do LUM é amplamente empregada nos levantamentos periciais e, por este motivo, é necessário conhecimento geral sobre o reagente e modos de registrar a reação de quimioluminescência emitida pelo mesmo
Oldfield et al. ³⁰ 2017	A eficácia do luminol na detecção de manchas de sangue que foram lavadas com percarbonato de sódio e expostas a condições ambientais	Realizar um conjunto de experimentos para fornecer informações sobre os efeitos do percarbonato de sódio na capacidade de detectar manchas de sangue	Após a realização dos experimentos, os autores indicam que o percarbonato de sódio é mais eficaz na remoção dos vestígios de sangue, quando comparado ao uso solo do detergente, e que pode ser aprimorado quando outras condições são incorporadas aos procedimentos de limpeza utilizados
Nagesh & Ghosh ³¹ 2017	Estudo periódico sobre a eficiência do	Estudar a eficácia do teste do luminol levando em	O LUM pode detectar com eficácia manchas de sangue ocultas por

	<p>luminol na detecção de manchas de sangue escondidas por tinta em diferentes superfícies</p>	<p>consideração a natureza do substrato, a extensão e o envelhecimento da ocultação e as manchas de sangue</p>	<p>três camadas de tinta nas superfícies estudadas: bloco de cimento, pranchas de madeira e folhas de metal.</p> <p>A natureza da superfície na qual as manchas foram localizadas teve grande impacto na persistência da quimioluminescência produzida, mas não na intensidade. As superfícies porosas retiveram a mancha de sangue e, portanto, deram melhores resultados por um período de tempo mais longo do que as não porosas.</p> <p>Observou-se que a pintura automotiva influencia a intensidade da QL sobre as chapas de metal.</p>
<p>Brenzini & Pathak³² 2018</p>	<p>Estudo comparativo da detecção de manchas de sangue em superfícies pintadas e limpas com luminol</p>	<p>Tentar dominar as incertezas de trabalhos de pesquisa anteriores, tentando entender como diferentes métodos de ocultação podem eliminar a detecção de vestígios de manchas de sangue em cenas de crime</p>	<p>Foi concluído que a tinta à base de água tem um poder de ocultação menor do que a tinta à base de solvente. As diferenças nas reações podem acontecer, primeiramente, porque a tinta à base de solvente é mais espessa do que a tinta à base de água.</p> <p>Já o estudo microscópico mostrou que a tinta à base de água formou bolhas</p>

			ao longo da superfície, enquanto a tinta à base de solvente formou estrias quando o sangue foi aplicado
Hayashi et al. ³³ 2019	Efeito de aceleração da reação forense de LUM induzida pela irradiação de luz visível de soluções aquosas de sangue humano total	Examinar o efeito da luz visível no luminol por irradiação de soluções aquosas de sangue total humano sob uma atmosfera de ar na ausência ou presença de azida sódica, ou sob uma atmosfera de argônio que purga o oxigênio molecular (O ₂), a fim de elucidar a função do O ₂ na aceleração da reação do LUM, seguida pela medição da intensidade de QL da reação do luminol usando o protocolo de Weber	A irradiação de luz visível (≥ 400 nm; 14 mW cm^{-2}) de soluções aquosas de sangue humano total acelera a taxa de reação do luminol. A intensidade da QL do sangue total irradiado foi máxima a 9 segundos após a adição do LUM, enquanto a do sangue total não irradiado levou 17 segundos para atingir o ponto máximo, indicando que a taxa de reação do luminol foi cerca de 1,9 vezes mais rápida devido a irradiação. Isto sugere que a sensibilidade da quimioluminescência, usada em estudos forenses, pode ser melhorada pela irradiação de luz visível em soluções ou manchas de sangue.

4. Discussão

O presente estudo buscou na literatura o tema “Luminol: possíveis interferentes no estudo de sangue humano”. A partir disto, muitos artigos foram encontrados.

Um deles, registrado Fernandez-Gutierrez e De la Pena¹¹, mostra que existem diversos produtos que podem afetar a reação de quimioluminescência (QL) do luminol (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 iodo¹¹.

Ratificando este, Creamer et al.³⁴, Barni et al.⁴ e Castelló et al.³⁵ observaram que o resultado do ensaio de LUM pode ser alterado por uma ampla gama de compostos interferentes, comumente encontrados no ambiente doméstico, como sais de ferro, cobre, iodo, permanganato de potássio, hemoglobina animal, peroxidases vegetais e íons hipoclorito^{4,34,35}.

Este último representa a principal causa de um resultado falso positivo, já que quando há depuração de uma mancha de sangue após a lavagem com solução de hipoclorito, este remove mais hemoglobina em comparação à água isolada^{4,34,35}. É ressaltado também que medida que a concentração de hemoglobina diminui, a emissão de luz pelo LUM é reduzida. No entanto, uma lavagem sucessiva com solução de hipoclorito promove o acúmulo desse íon, o que aumenta a intensidade da emissão de luz pelo LUM. Em resumo, a hemoglobina é substituída pelo íon hipoclorito, levando a uma emissão de luz equivalente à emitida por uma mancha de sangue que foi lavada apenas com água^{4,34,35}.

Para diminuir o problema encontrado por Creamer et al.³⁴, Barni et al.⁴ e Castelló et al.³⁵, o pesquisador Nilsson²⁵ (2006) sugeriu que uma cena de crime pode ser deixada ventilando por um a dois dias. Outra opção é deixar a cena sob irradiação de luz visível, como mostrado por Hayashi e seus colaboradores³³.

O estudo realizado por Hayashi et al.³³ mostrou que a irradiação de luz visível (≥ 400 nm; 14 mW cm^{-2}) de soluções aquosas de sangue humano total acelera a taxa de reação do luminol. E que a intensidade da QL do sangue total irradiado foi máxima após 9 segundos da adição do LUM, enquanto que a do sangue total não irradiado levou 17 segundos para atingir o ponto máximo³³. Isso indica que a taxa de reação do LUM foi cerca de 1,9 vezes mais rápida devido a irradiação. É sugerido, então, que a sensibilidade da quimioluminescência pode ser melhorada pela irradiação de luz visível de soluções ou manchas de sangue³³.

Outros dois estudos realizados nos anos 2000 e 2005 por Della Manna e Montpetit³⁶ e James, Kish e Sutton³⁷, respectivamente, observaram que manchas de sangue antigas produzem QL mais intensa e duradoura do que manchas frescas, o que corrobora com o estudo feito por Specht¹³ em 1937. Já Quickenden e Creamer¹⁷, em 2001, descreveram como o teste de LUM é afetado pelo pré-aquecimento do sangue testado, através de uma série de ensaios para imitar os

ciclos de temperatura aos quais o sangue é exposto em, por exemplo, veículos motorizados¹⁷. Ainda neste mesmo estudo, Quickenden e Creamer¹⁷ (2001) perceberam que quando a solução de hemoglobina foi pré-aquecida no intervalo determinado, a QL medida aumentou consideravelmente com o aumento da temperatura.

Anos depois, em 2006, Nilsson²⁵ corroborou com a pesquisa de Quickenden e Creamer¹⁷ (2001), onde relatou que muitos fatores influenciam o potencial de detectar sangue e que dentro de limitações razoáveis, a mancha de sangue envelhece e o pré-aquecimento produz QL mais forte e duradoura²⁵.

Ainda relacionado a veículos a motor, Quickenden e Cooper¹⁶ (2001) analisaram que há uma variedade de materiais e superfícies diferentes onde as tentativas de limpar áreas manchadas de sangue dão resultados distintos. Quickenden e Cooper¹⁶ (2001) mostraram, então, que em muitas superfícies a QL do teste de LUM, após tentativas de lavagem, depende da capacidade de absorção do material e da solvabilidade da hemoglobina na solução de limpeza utilizada. Observaram, também, que a QL resultante após limpeza variou entre diferentes tipos de carros e que dependia muito de como a lavagem era feita¹⁶.

Outro estudo relacionando o LUM com o meio automotivo foi realizado por Nagesh e Ghosh³¹, em 2017, indicando que a pintura utilizada nos carros influencia na intensidade da QL sobre as chapas de metal. Nagesh e Ghosh³¹ (2017) chegaram a esta conclusão já que obtiveram resultados a partir de experimentos com folhas de metal. As que foram submetidas a uma única camada de ocultação de tinta apresentaram quimioluminescência menos intensa em comparação com o controle positivo, mas extremamente intensa na área contendo a mancha de sangue³¹. Já as folhas com duas camadas de cobertura de tinta apresentaram QL menos intensa do que a com somente uma camada. Apesar disso, o padrão da mancha de sangue foi facilmente identificado. Posteriormente Nagesh e Ghosh³¹ (2017), observaram o resultado obtido através das folhas com três camadas de tinta e viram que estas apresentavam quimioluminescência muito baixa e que a visibilidade do padrão de mancha de sangue era menor comparativamente³¹.

Outros estudos com o objetivo de ocultar vestígios e dificultar a aplicação do LUM em cenas de crime relacionaram a reação de QL com alimentos. O primeiro a se discutir foi feito por Bancirova³⁸, no de 2012. Neste estudo, Bancirova usou produtos alimentares que continham antioxidantes (como o chá verde e o chá preto)

e observou que estes podem atuar inibindo a detecção do sangue a partir da reação QL do LUM, já que impedem e/ou bloqueiam a produção das espécies reativas de oxigênio no sangue, gerando resultados falso-negativos³⁸.

Já Cavalcanti e Barros²⁸ (2016) descreveram que bebidas e alimentos que são fontes naturais de antioxidantes, quando despejados sobre manchas de sangue, podem atuar como interferentes, alterando a análise dos resultados com LUM²⁸. No caso de chás, a totalidade dos estudos encontrados na literatura concluiu que a alta capacidade antioxidante dos chás verde e preto pode minimizar a emissão de luz quimioluminescente do LUM, quando analisado sobre manchas de sangue, podendo gerar resultados falso negativos²⁸. Isso se explica devido os polifenóis serem, provavelmente, os mais importantes antioxidantes extraídos do processo de fermentação do chá verde³⁹.

A maioria dos polifenóis do chá verde se apresenta como flavonóis, e dentre estes, predominam as catequinas⁴⁰. De acordo com Lamarão e Fialho⁴⁰ (2009), a propriedade antioxidante das catequinas está relacionada com sua estrutura química, sendo potencializada pela presença de radicais ligados aos anéis e à presença de grupos hidroxila em sua estrutura⁴⁰. As catequinas, por sua vez, podem capturar as espécies reativas de oxigênio, como o radical superóxido (O₂⁻), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e o radical hidroxila (OH⁻)⁴¹, alterando a reação química do LUM⁴⁰.

Ainda em 2016, Miranda et al.²⁹ realizaram um relato de caso sobre um crime onde houve o entintamento de uma parede e concluíram que a tinta esmaltada e a tinta spray podem dar resultado falso-positivo¹⁸, e que o LUM não é capaz de penetrar a tinta e detectar o sangue que está sob a mesma, sugerindo, assim, que a detecção do vestígio latente pelo LUM ocorre somente quando a camada de tinta que recobre a mancha de sangue é retirada, o que também foi observado por Bily e Maldonado⁴² (2006)²⁹.

Já quando o assunto é lavar roupas a fim de eliminar vestígios de sangue, Adair e Shaw²⁴ (2005) apoiam o uso do LUM como um reagente eficaz para visualizar padrões latentes de manchas de sangue após a lavagem. Eles também chegaram à conclusão que o Leuco-crystal Violet (LCV), embora seja um reagente eficaz no sangue em muitas superfícies lavadas e não lavadas, não produziu resultados aceitáveis²⁴. Além disso, a mesma pesquisa indicou que a fenoltaleína produziu resultados presumivelmente positivos em roupas lavadas, mesmo após a

aplicação do LUM e do LCV²⁴. A partir desses resultados, os pesquisadores Adair e Shaw²⁴ (2005) foram incentivados a relatar resultados de testes semelhantes para ajudar na definição da sensibilidade e dos parâmetros de uso adequados de LCV e LUM em superfícies porosas e não porosas²⁴.

Posteriormente a estes estudos, Oldfield e seus colaboradores, Morgan et al.³⁰ (2017) indicaram que o percarbonato de sódio é mais eficaz na remoção de vestígios significativos de sangue quando comparado à lavagem de manchas de sangue apenas com detergente, que se mostrou ineficaz na remoção de sangue detectável, e que esta eficácia pode ser aprimorada quando outras condições, como temperaturas de lavagem, tempo de secagem e elementos ambientais, são incorporadas aos procedimentos de limpeza utilizados³⁰.

5. Conclusão

O luminol é muito utilizado pelos especialistas forenses devido a seu fácil manuseio e alta sensibilidade na busca de manchas de sangue latente em locais e peças de crime, permitindo ao perito criminal inferir quanto a inidoneidade e dinâmica da cena crime em análise.

Logo, este trabalho mostra de forma copilada e resumida as propriedades do LUM, desde seus aspectos químicos, até as limitações deste de forma a facilitar o levantamento de local de crime, no que tange a busca de sangue latente, a fim de apontar a autoria e materialidade do delito.

Referências

1. Pugliese L. O sangue. Hematologia. São Paulo: DCL: 2014;7-31.
2. Galante F, Araújo MCF. Hemoglobina e transporte de oxigênio. Fundamentos de Bioquímica: para universitários, técnicos e demais profissionais da área da saúde. São Paulo: Rideel: 2014;2:110-30.
3. Marzzoco A, Torres BB. Hemoglobina – Transporte de oxigênio e tamponamento do plasma. Bioquímica Básica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 1999;3:41-52.
4. Barni F, Lewis SW, Berti A, Miskelly GM, Lago G. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. Talanta: 2007;72(3):896-913. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2006.12.045>
5. Chemello E. Ciência forense: Manchas de sangue. Química Virtual: 2007:1-11.
6. Vasconcellos FA, Paula, WX. Aplicação forense do luminol – Uma revisão. Revista Criminalística e Medicina Legal: 2017;1(2):28-36.

7. Ferreira EC, Rossi AV. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo a aplicações da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. *Química Nova*: 2002;25(6a):1003-1. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000600018>
8. Albertin R, Arribas MAG, Bastos EL, Röpke S, Sakai PN, Sanches AMM, *et al.* Quimiluminescência orgânica: alguns experimentos de demonstração para a sala de aula. *Química Nova*: 1998;21(6):772-9. <https://doi.org/10.1590/S0100-40421998000600018>
9. Welsh E. O que é a quimiluminescência? 2011. Disponível em: <https://www.scienceinschool.org/pt/2011/issue19/chemiluminescence>;
10. Nagesha D, Ghosh SA. Time period study on the efficiency of luminol in the detection of blood stains concealed by paint on different surfaces. *Forensic Science International*: 2017;275:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.01.028>
11. Fernandez-Gutierrez A, De la Pena AM. Inorganic substances by luminescence methods. *Molecular Luminescence Spectroscopy*: 1985;77:463–75.
12. Santos LME. Análise do perfil molecular de vestígios sanguíneos provenientes de locais de crimes após aplicação de reagente quimiluminescente. Dissertação (mestrado em Genética) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia: 2013.
13. Specht W. Die Chemiluminescenz des Hämins, ein Hilfsmittel zur Auffindung und Erkennung forensisch wichtiger Blutspuren. *Chemie*: 1937;50(8):155-7. <https://doi.org/10.1002/ange.19370500803>
14. Grispino RRJ. Luminol and the crime scene. *Prosecutor*: 1991;25:28-32.
15. Thornton J, Maloney R. The chemistry of the luminol reaction – where to from here? *CAC Newsletter*: 1985;12:9–17.
16. Quickenden TI, Ennis CP, Creamer JI. The forensic use of luminol chemiluminescence to detect traces of blood inside motor vehicles. *Luminescence*: 2001;19(5):271-7. <https://doi.org/10.1002/bio.780>
17. Quickenden TI, Cooper PD. Increasing the specificity of the forensic luminol test for blood. *Luminescence*: 2001;16(3):251-3. <https://doi.org/10.1002/bio.635>
18. Creamer J, Quickenden TI, Apanah MV, Kerr KA, Robertson PA. Comprehensive experimental study of industrial, domestic and environmental interferences with the forensic luminol test for blood. *Luminescence*: 2003;18:193–8. <https://doi.org/10.1002/bio.723>
19. Laux DL. Principles of bloodstain pattern analysis: Theory and practice. In: James SH, Kish PE, Sutton TP (Org.) *The detection of blood using luminol*. Boca Raton: CRC Press: 2005;369-89.

20. Blum LJ, Esperança P, Rocquefelte S. A new high -performance reagent and procedure for latent blood stain detection based on luminal chemiluminescence. *Canadian Society of Forensic Science*: 2006;39(3):81-110. <https://doi.org/10.1080/00085030.2006.10757139>
21. Adair TW, Shimamoto S, Tewes R, Gabel R. The Use of Luminol to detect blood in soil one year after deposition. *IABPA News*: 2006;22(3):4-7.
22. Adair TW, Shimamoto S, Tewes R, Gabel R. Detecting blood patterns in soil with luminol two years after deposition. *IABPA News*: 2007;23(1):14-9.
23. Noedel M, Jagmin A. The forensic examination of commercially available dried blood products. *Journal of the Association for Crime Scene Reconstruction*: 2009;15(2):23-8.
24. Adair TW, Shaw RL. Enhancement of Bloodstains on Washed Clothing Using Luminol and LCV Reagents. *IABPA News*: 2005;21(4):5-9.
25. Nilsson A. The forensic luminol test for blood: unwanted interference and the effect on subsequent analysis. Linköping University, the Swedish National Laboratory of Forensic Science (SKL): 2006.
26. Silva RR, Agustini BC, Silva ALL, Frigeri HR. Luminol in forensic science. *J. Biotec. Biodivers.:* 2012;3(4):172-7. <https://doi.org/10.20873/jbb.uft.cemaf.v3n4.rogiskisilva>
27. Patel G, Hopwood A. An evaluation of luminol formulations and their effect on DNA profiling. *International Journal of Legal Medicine*: 2012;127(4):723-9. <https://doi.org/10.1007/s00414-012-0800-9>
28. Cavalcanti DR, Barros RM. 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*: 2016;6(1):47-60. [https://doi.org/10.17063/bjfs6\(1\)y201647](https://doi.org/10.17063/bjfs6(1)y201647)
29. Miranda GE, Paula WX, Romano A, Santos VRDE, Melani FRH. Detecção de manchas de sangue pelo luminol onde houve entintamento das paredes – estudo de caso. *Rev. Bras. Crimin.:* 2016;5(1):14-7. <https://doi.org/10.15260/rbc.v5i1.119>
30. Oldfield C, Morgan RM, Miles HF, French JC. The efficacy of luminol in detecting bloodstains that have been washed with sodium percarbonate and exposed to environmental conditions. *Australian Journal of Forensic Sciences*: 2017;50(3):1-10. <https://doi.org/10.1080/00450618.2016.1264478>
31. Nagesh D, Ghosh, S. A time period study on the efficiency of luminol in the detection of bloodstains concealed by paint on different surfaces. *Forensic Science International*: 2017;275:1-7. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.01.028>
32. Brenzini V, Pathak, R. A comparison study of the detection of bloodstains on painted and cleaned surfaces with luminol. *Forensic Science International*: 2018;289:75-82. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2018.04.043>

33. Hayashi S, Kakizaki E, Sonoda A, Shinkawa N, Shiragami T, Yukawa N. Acceleration effect of the forensic luminol reaction induced by visible light irradiation of whole human blood aqueous solutions. *Forensic Science International*: 2019;299:208-14. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2019.04.007>
34. Creamer JI, Quickenden TI, Crichton LB, Robertson P, Ruhayel R. Attempted cleaning of bloodstains and its effect on the forensic test. *Luminescence*: 2005;20(6):411-3. <https://doi.org/10.1002/bio.865>
35. Castelló A, Francés F, Verdú F. Bleach interference in forensic luminol test on porous surfaces: More about the drying time effect. *Talanta*: 2009;77(4):1555-7. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.09.008>
36. Della Manna A, Montpetit S. A novel approach to obtaining reliable PCR results from luminol treated bloodstains. *J Forensic Sci.*: 2000;45(4):886-90. <https://doi.org/10.1520/JFS14790J>
37. James SH, Kish PE, Sutton TP. Principle of bloodstain pattern analysis: theory and practice. CRC press Taylor & Francis Group: 2005. <https://doi.org/10.1201/9781420039467>
38. Bancirova M. Black and green tea - Luminol false-negative bloodstains detection. *Science and Justice*: 2012;52(2):102-5. <https://doi.org/10.1016/j.scijus.2011.07.006>
39. Gutman RL, Ryu B. Rediscovering tea: an exploration of the scientific literature. *Herbal Grams*: 1996;37:34-49.
40. Lamarão RC, Fialho E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. *Revista de Nutrição*, Campinas: 2009;22(2):257-69. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732009000200008>
41. Senger AEV, Schwanke CHA, Gottlieb MG. Chá verde (*Camellia sinensis*) e suas propriedades funcionais nas doenças crônicas não transmissíveis. *Scientia Medica*, Porto Alegre: 2010;20(4):292-300.
42. Bily C, Maldonado H. The application of luminol to bloodstains concealed by multiple layers of paint. *J. Forensic Identification*: 2006;56(6):896-905.