

## A interferência da solução de luminol em teste imunocromatográfico para pesquisa de sangue humano

V.S. Vaz<sup>a,b,\*</sup>, L.D.G. Kobachuck<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Química Legal e Sexologia Forense, Instituto Médico Legal, Curitiba (PR), Brasil

<sup>b</sup> Faculdade Educacional de Araucária, Araucária (PR), Brasil

\*Endereço de e-mail para correspondência: [vanaelu@yahoo.com.br](mailto:vanaelu@yahoo.com.br). Tel.: +55-41-988341779.

Recebido em 13/11/2016; Revisado em 29/06/2017; Aceito em 02/07/2017

---

### Resumo

As manchas de sangue muitas vezes são limpas nas cenas de crime, e um dos métodos para identificação de sangue latente é o luminol, o qual possui alta sensibilidade, porém, pouca especificidade, e por esse motivo, deve ser acompanhado de um método de confirmação. Este estudo teve como objetivo analisar a possível interferência do teste presumitivo luminol, preparado de acordo com a formulação de Grodsky sobre o teste confirmatório imunocromatográfico (WAMA®) para pesquisa de sangue humano e verificar a sensibilidade de ambos os testes. Diferentes diluições de uma amostra de sangue humano foram depositadas sobre fragmentos de tecido de algodão branco, deixadas secar por 24 horas em temperatura ambiente e, em seguida, foram submetidas aos dois métodos. Após as amostras terem sido pulverizadas com luminol, a diluição 1:1.000 não mostrou interferência no teste feito imediatamente após a pulverização, porém após 24 horas a interferência foi observada. Na diluição 1:10.000 houve interferência imediata no teste imunocromatográfico e o resultado persistiu após 24 horas. Já as diluições de 1: 50.000 e 1:100.000 tanto o controle positivo quanto a amostra pulverizada por luminol apresentaram resultados negativos imediatamente e após 24 horas no teste imunocromatográfico. Resultado positivo para o teste de luminol com emissão de quimiluminescência foi obtido até a concentração 1:50.000 e o teste imunocromatográfico mostrou-se positivo até a diluição 1:10.000, indicando que realmente há uma diferença de sensibilidade entre os métodos.

*Palavras-Chave:* Crime; Sangue; Luminol; Imunocromatografia.

---

### Abstract

Blood stains are often cleaned the crime scene, and one of the methods for latent blood identification is luminol, which has high sensitivity, but low specificity and therefore must be accompanied by a confirmatory method. This study aimed to analyze the possible interference of the presumptive luminol test, prepared according to Grodsky formulation of the immunoassay confirmatory test (WAMA®) for human blood research and check the sensitivity of both tests. Different dilutions of a human blood sample were deposited on white cotton fabric fragments, allowed to dry for 24 hours at room temperature and then were subjected to two methods. After the samples have been sprayed with luminol, dilution 1: 1000 showed no interference with the test done immediately after the spray, but after 24 hours was observed interference. In the 1: 10,000 dilution was no immediate interference in the immunoassay test and the results persisted after 24 hours. Since dilutions of 1: 50,000 and 1: 100,000 both as positive control sample by spraying luminol showed negative results immediately and after 24 hours in the immunoassay. Positive for the luminol test with chemiluminescence emission was obtained by the concentration of 1:50,000 and the immunoassay was positive up to 1:10,000 dilution, indicating that there really is difference in sensitivity between the methods.

*Keywords:* Crime; Blood; Luminol; Immunochromatography.

---

### 1. INTRODUÇÃO

Em uma investigação criminal os vestígios de fluídos corpóreos reavidos em cenas de crimes estão entre as mais importantes evidências, pois desse material pode-se obter o DNA, capaz de proporcionar a

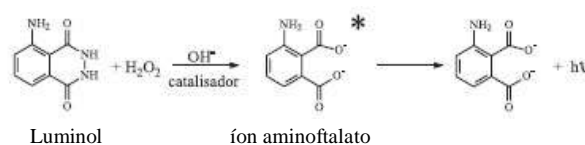
identificação de um suspeito ou vítima, determinar a presença de mais envolvidos no crime, bem como inocentar um suspeito. Atualmente, os testes realizados pelos laboratórios forenses nas manchas em questionamento permitem a identificação e confirmação

da existência ou não de determinado fluido corpóreo [1]. Diante de um crime violento o fluido mais encontrado na cena é o sangue [2,3] e os testes presuntivos utilizados para a sua identificação são caracterizados por possuírem elevada sensibilidade e pouca especificidade [4]. A reação química que ocorre nos testes preliminares se dá pela participação do grupo heme da hemoglobina. A reação é baseada na atividade catalítica desse grupamento, que atua sobre o peróxido de hidrogênio, liberando oxigênio que por sua vez oxida o indicador utilizado, formando um complexo colorido. Os principais reagentes utilizados como indicadores são a fenoltaleína, a benzidina, a tetrametilbenzidina, a verde malaquita e a ortotoluidina [5-7].

Os testes preliminares também podem ter como indicador uma substância quimiluminescente, em que, por meio de reação de oxidação mediada pelo grupo heme, ocorre liberação de energia na forma de luz pelo indicador. Dessa forma, as manchas contendo sangue emitem quimiluminescência por provocarem excitação das moléculas dos indicadores. Dentre os indicadores quimiluminescentes, o luminol é o mais empregado [4,7,8].

O luminol (5-amino-2,3-diidroftalazina-1,4-diona) é um reagente quimiluminescente geralmente utilizado para identificação de manchas de sangue latente, em especial quando o autor do crime procura eliminar os vestígios ao limpar o local, tornando assim as manchas invisíveis ao olho nu [9,10]. Trata-se de um reativo muito utilizado pelos peritos criminais devido a sua capacidade de detectar, mesmo que em baixa concentração, a presença de sangue em diversos tipos de superfícies [5], até 1:10.000.000 de diluição [11]. Além disso, segundo estudos realizados, a reação decorrida do teste não interfere na capacidade de obtenção do DNA, permitindo dessa forma a identificação com segurança da vítima ou criminoso [8,11-14].

O teste utilizado para identificação de sangue por meio do reagente luminol caracteriza-se pela emissão de luz decorrente de uma reação química. Esse processo envolve a absorção de energia suficiente pelo reagente para gerar um complexo ativado. O ferro presente na hemoglobina tem atividade de pseudoperoxidase, podendo atuar sobre o peróxido de hidrogênio, contido na solução de luminol, permitindo a oxidação de sua molécula. Nesta reação de oxidação, o luminol perde átomos de nitrogênio e hidrogênio e adquire átomos de oxigênio, ocorrendo a formação de um composto denominado 3-aminoftalato. A reação deixa o 3-aminoftalato em um estado de energia mais elevado, pois os elétrons dos átomos de oxigênio são excitados para orbitais superiores e quando os elétrons retornam para o estado eletrônico fundamental há a emissão de quimiluminescência com comprimento de onda de aproximadamente 431 nm (Fig.1) [5].



**Figura 1.** Quimiluminescência do luminol na presença de peróxido de hidrogênio em meio básico [15].

Os ensaios preliminares para pesquisa de sangue, por não se tratarem de técnicas conclusivas, ao apresentarem resultado positivo direcionam o perito para testes que confirmem se a mancha em análise trata-se realmente de sangue humano [4]. Para tal, são realizados testes de maior especificidade, como a imunocromatografia, método esse realizado em uma membrana cromatográfica que contém anticorpos imobilizados e móveis dotados de capacidade de identificação da hemoglobina humana [16,17].

A literatura demonstra contradições entre a interferência do luminol no teste imunocromatográfico confirmatório para sangue humano. Referência [18] mostra que os testes de certeza podem ter a intensidade de seus resultados diminuída pelo luminol. Um estudo também demonstrou que uma das preparações de luminol prejudicou o teste imunocromatográfico Hexagon OBTI® [16]. Já outro experimento comprovou que o pH da amostra alterado pelo uso do luminol interfere no teste imunocromatográfico OC-Hemocard (Alfa Wassermann) [13]. Entretanto, estudos mais recentes não observaram interferência no método imunocromatográfico quando luminol foi previamente pulverizado sobre a amostra [12]. Os objetivos do presente estudo consistem em avaliar a interferência da solução de luminol no teste confirmatório imunocromatográfico para pesquisa de sangue humano e verificar se a discordância, apresentada na literatura, se deve a diferença de sensibilidade entre a reação do luminol e o teste imunocromatográfico para pesquisa de sangue humano.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Amostras

Foi utilizada uma amostra de 3 mL de sangue humano coletada em frasco com anticoagulante EDTA. Foram utilizados tecidos de algodão branco medindo 5x5cm. A amostra de sangue foi diluída nas seguintes concentrações: 1:1.000, 1:10.000, 1:50.000 e 1:100.000, sendo que cada diluição foi depositada em três fragmentos de tecido. Os tecidos ficaram secando por 24 horas, em repouso, à temperatura ambiente. Posteriormente, um fragmento de tecido (controle positivo) foi pulverizado com água destilada para simular a aplicação do luminol e então foi submetido ao método imunocromatográfico (WAMA®) para pesquisa de sangue humano. Outro fragmento de tecido foi

pulverizado com luminol e imediatamente submetido ao método imunocromatográfico. O último fragmento foi pulverizado com luminol e deixado secar por 24 horas à temperatura ambiente e posteriormente submetido ao teste imunocromatográfico. Assim foi feito para cada uma das diluições de sangue. Um fragmento de tecido sem a adição da amostra foi pulverizado pela solução de luminol e posteriormente submetido a imunocromatografia como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata e em dias diferentes.

## 2.2. Preparação do reagente luminol

Para a preparação de luminol primeiramente foi dissolvido 0,07 g de perborato de sódio em 10 mL de água, na sequência foi adicionado 0,01g de luminol e 0,5 g de carbonato de sódio [20].

Utilizando um frasco com spray, o reagente foi aplicado sobre o fragmento de tecido de algodão branco, controle negativo, e sobre um fragmento de tecido de algodão, controle positivo, contendo sangue puro. Posteriormente, o reagente foi aplicado sobre os fragmentos de tecido contendo as amostras nas respectivas diluições. A aplicação do produto foi realizada em ambiente escuro para a visualização da quimioluminescência. Foram padronizadas cinco pulverizações da solução de luminol sobre cada fragmento de tecido de algodão contendo as diluições, o suficiente para cobrir todo o fragmento. O tempo de quimioluminescência emitida foi anotado, bem como até que diluição o luminol apresentou reação quimioluminescente, detectando a sua sensibilidade com relação à diluição.

## 2.3. Método imunocromatográfico para pesquisa da hemoglobina humana

A sensibilidade do método imunocromatográfico WAMA® utilizado no experimento é de 1:1.000.000 conforme descrito pelo fabricante.

Cada fragmento de tecido foi cortado em pedaços menores e macerado com 2 mL de soro fisiológico (NaCl 0,9%). Após quinze minutos de maceração, quatro gotas da amostra foram aplicadas na membrana imunocromatográfica. O teste foi lido após quinze minutos, conforme indicação do fabricante. A presença de duas linhas no teste indica a existência de sangue humano e a presença de apenas a linha controle demonstra que o teste não detectou sangue na amostra. O fabricante informa que qualquer intensidade de cor na linha teste é indicativo de resultado positivo. Dessa forma, foi verificada a sensibilidade do teste frente à diluição na presença e ausência da solução de luminol.

## 2.4. Aprovação da pesquisa

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade Educacional de Araucária sob o parecer de número 1.212.853.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 3.1. Sensibilidade dos métodos

A solução de luminol pulverizada sobre os controles positivos apresentou quimioluminescência. Não foi observada quimioluminescência nos fragmentos de tecido controles negativos. O luminol reagiu instantaneamente nas diluições: 1:1.000, 1:10.000 e 1:50.000. A quimioluminescência emitida persistiu por mais de 5 minutos. A diluição 1:50.000 apresentou uma quimioluminescência mais fraca se comparada com as outras diluições mais concentradas. Não houve reação com a diluição 1:100.000 até os cinco minutos cronometrados.

Somente a linha controle foi observada após submissão dos controles negativos no teste imunocromatográfico. Já nas concentrações de sangue utilizadas no experimento que serviram como controle positivos a imunocromatografia detectou a hemoglobina humana nas diluições 1:1.000 e 1:10.000 (Fig. 2). As diluições 1:50.000 e 1:100.000 não foram detectadas no período de 15 minutos estipulados pelo fabricante (Fig. 3). Os resultados estão demonstrados na Tab. 1, sendo que as triplicatas não apresentaram discordância entre si.

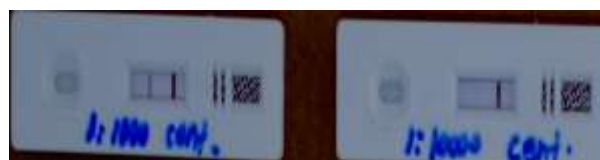


Figura 2. Resultado positivo do teste de sensibilidade da imunocromatografia realizado nos controles positivos nas diluições 1:1.000 e 1:10.000, respectivamente.

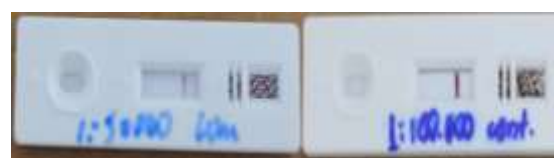
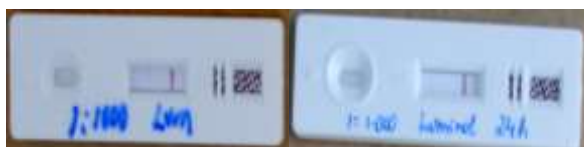


Figura 3. Resultado negativo do teste de sensibilidade da imunocromatografia realizado nos controles positivos nas diluições 1:50.000 e 1:100.000, respectivamente.

### 3.2. Interferência da solução de luminol no teste imunocromatográfico

Na concentração 1:1.000 não houve interferência de imediato da solução de luminol no método imunocromatográfico, porém após as 24 horas o teste apresentou resultado negativo (Fig. 4).



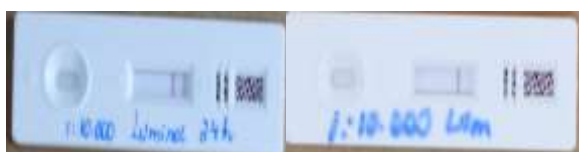
**Figura 4.** Resultado da interferência do luminol no método imunocromatográfico após 24 horas na diluição 1:1.000. A imagem do teste, à esquerda, mostra que não houve interferência imediatamente após a pulverização do luminol.

**Tabela 1.** Sensibilidade do teste imunocromatográfico e reação do luminol para diferentes diluições de amostras de sangue humano, controles positivo e negativo.

Diluições	Luminol	Imunocromatografia
1: 1.000	R	R
1: 10.000	R	R
1: 50.000	R	NR
1: 100.000	NR	NR
Controle negativo	NR	NR
Controle positivo	R	-

Um resultado positivo foi demonstrado pela sigla R (reagente) e um resultado negativo foi demonstrado pela sigla NR (não reagente) dentro dos 5 minutos cronometrados para o luminol e 15 minutos para a imunocromatografia. Os testes foram realizados em triplicatas e em dias diferentes.

A concentração 1:10.000 apresentou resultado negativo no teste feito imediatamente e após 24 horas da pulverização do luminol (Fig. 5). Nas concentrações 1:50.000 e 1:100.000 o resultado imunocromatográfico foi negativo, inclusive nas manchas controle, o que indica que a interferência do luminol não é significativa nesse caso, pois o teste não foi sensível frente a essas diluições. Os resultados estão representados na Tab. 2, sendo que as triplicatas não apresentaram discordância entre si.



**Figura 5.** Interferência do luminol na imunocromatografia na diluição 1:10.000 de forma imediata e após 24 horas.

**Tabela 2.** Resultados da interferência da solução de luminol sobre o método imunocromatográfico.

Resultado Imunocromatográfico	Diluições de sangue submetidas ao Luminol			
	1: 1.000	1: 10.000	1: 50.000	1: 100.000
Imediatamente após pulverização	R	NR	NR	NR
24 horas após pulverização	NR	NR	NR	NR

Um resultado positivo foi demonstrado pela sigla R (reagente) e um resultado negativo foi demonstrado pela sigla NR (não reagente) dentro de 15 minutos cronometrados na imunocromatografia. Os testes foram realizados em triplicatas e em dias diferentes.

#### 4. DISCUSSÃO

A preparação de luminol utilizado nos experimentos interferiu no teste imunocromatográfico WAMA® e essa interferência parece ter maior influência sobre as amostras mais diluídas e que permaneceram maior tempo expostas ao reagente.

O fato da solução de luminol não interferir no teste imunocromatográfico imediatamente após a pulverização, quando a amostra de sangue depositada sobre o tecido de algodão se tratava de uma amostra mais concentrada (1:1.000), e esse resultado não persistir após o período de 24 horas, é um indicativo de que a concentração de sangue e o tempo decorrido após a pulverização do reagente sobre a amostra influenciam na interferência. Isso demonstra que havia hemoglobinas que ainda não foram desnaturadas e passíveis de serem detectadas pelo teste imunocromatográfico logo após a pulverização da solução de luminol, porém, com o tempo de exposição ao reagente, elas foram sendo degradadas até o ponto de não serem mais detectadas pelo teste.

Contudo, as amostras menos concentradas como a diluição 1:10.000, sofrem interferência do reagente num período bem mais curto, tornando inviável a utilização do teste imunocromatográfico para confirmação da presença de sangue humano, após aplicação do luminol na mancha.

Um estudo realizado sugere que a solução de luminol composta por fortes oxidantes parece ter efeito sobre as proteínas, e que o pH altamente alcalino da solução de luminol pode levar a hidrólise alcalina as ligações peptídicas das proteínas [9], levando em conta o fato da hemoglobina ser uma proteína, pode ser uma das causas do método imunocromatográfico sofrer interferência, uma vez que esse método não consegue detectar uma hemoglobina degradada. Essas hipóteses de fortes oxidantes e do pH elevado da solução de luminol interferirem no teste imunocromatográfico poderão ser analisadas e confirmadas em futuros estudos.

O luminol mostrou realmente ser um método de detecção de sangue mais sensível que o método imunocromatográfico, embora o resultado observado da sua sensibilidade nesse experimento não tenha atingido os valores encontrados em outros artigos que observaram uma sensibilidade de 1:100.000 [21,22], e de até 1:10.000.000 [11]. O resultado da sensibilidade do teste imunocromatográfico obtido nesse experimento demonstrou também ser menor do que o do descrito pelo fabricante que é de 1:1.000.000, e isso se deve provavelmente a dificuldade de extração da amostra depositada sobre os tecidos de algodão. Certamente não foi possível extrair toda a hemoglobina do fragmento de tecido de algodão e, além disso, houve a adição de soro fisiológico para a maceração da amostra, o que acaba

diluindo ainda mais o sangue depositado no tecido, e provavelmente se deve a isso, a diferença de sensibilidade encontrada nos resultados desse experimento e o descrito pelo fabricante.

O teste imunocromatográfico WAMA® é um kit para determinação qualitativa de sangue oculto nas fezes e sua produção não é direcionada para uso forense. Porém, os resultados apresentados nesse experimento demonstraram sua capacidade de identificação de sangue em outros materiais além daquele para o qual foi fabricado, desta forma validando a sensibilidade desse teste para a metodologia laboratorial forense proposta.

Este estudo teve como único interesse o esclarecimento referente à interferência entre os métodos utilizados na rotina dos laboratórios forenses para identificação de sangue, sem qualquer conflito de interesse com a marca dos métodos utilizados. Não houve nenhum benefício financeiro ou vantagem secundária ao objetivo básico da pesquisa.

## 5. CONCLUSÕES

O uso do reagente luminol é muito importante para as investigações criminais, pois auxilia na identificação de sangue latente, quando outros métodos não se mostram tão eficientes. A interferência do luminol sobre o teste de certeza imunocromatográfico WAMA® nos resultados apresentados nesse estudo sugerem que nos casos em que a amostra for previamente pulverizada pela solução de luminol, o mais seguro seria submeter a amostra diretamente à extração de DNA, sem realização prévia do teste confirmatório imunocromatográfico para presença de sangue humano.

Conclui-se que foi observada interferência entre as metodologias utilizadas nesse experimento, mostrando que não se trata apenas de diferença entre a sensibilidade dos testes.

Outra questão identificada nesse estudo está relacionada com a concentração da amostra e o tempo de exposição à solução de luminol que parecem estar intimamente ligados à interferência no método imunocromatográfico para pesquisa da hemoglobina humana.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos o Laboratório de Bioquímica Forense da Polícia Científica do Paraná pela doação dos Kits imunocromatográficos WAMA® e do reagente luminol, bem como pela permissão da utilização dos materiais necessários para a realização dos experimentos dentro das suas instalações.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] K. Virkler, I.K. Lednev. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-

destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. *Forensic Sci Int.* **88(1-3)**, 1-17, 2009.

[2] E.A.A. Bittencourt, J.A.S. Vieira, N.G. Angeramis, C.E. Silva, R.C.R. Hirschfeld, E.S.M. Iwamura. The analysis of biological samples from crime scene for a future human DNA profile confrontation. Effects of presumptive test reagents on the ability to obtain STR profiles for human identification. *Forensic Sci Int: Genet Supplement Series* **2(1)**, 194-195, 2009.

[3] L.J. Blum, P. Esperança, S. Rocquefelte. New high-performance reagent and procedure for latent bloodstain detection based on luminol chemiluminescence. *Can. Soc. Forensic Sci. J.* **39(3)**, 81-100, 2006.

[4] M.C.T. Sawaya, M.R.S. Rolim. *Manual Prático de Medicina Legal no Laboratório*, Juruá, Brasil, 2009.

[5] E. Chemello. *Ciência Forense: Manchas de sangue*. Química Virtual, 2007.

[6] M. Cox. A Study of the Sensitivity and Specificity of Four Presumptive Tests for Blood. *J Forensic Sci.* **36(5)**, 1503-1511, 1991.

[7] H.C. Lee. *Identification and Grouping of Bloodstains*. Forensic Science Laboratory Connecticut State Police, 1980.

[8] A.M. Gross, K.A. Harris, G.L. Kaldun. The Effect of Luminol on Presumptive Tests and DNA Analysis using the Polymerase Chain Reaction. *J Forensic Sci.* **44(4)**, 837-840, 1999.

[9] F. Barni, S.W. Lewis, A. Berti, G.M. Miskelly, G. Lago. Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta* **72(3)**, 896-913, 2007.

[10] K. Weber. The use of chemiluminescence of Luminol in forensic medicine and toxicology. I. Identification of blood stains. *Dtsch Z Gesamte Gerichtl Med.* **57(3)**, 410-423, 1966.

[11] F. Proescher, A.M. Moody. Detection of blood by means of chemiluminescence. *J Lab Clin Med.* **24**, 1183-1189, 1939.

[12] J.P. Almeida, N. Glesse, C. Bonorino. Effect of presumptive tests reagents on human blood confirmatory tests and DNA analysis using real time polymerase chain reaction. *Forensic Sci Int.* **206**, 58-61, 2011.

[13] A. Barbaro, P. Cormaci, A. Teatino, A. Barbaro. Validation of forensic DNA analysis from bloodstains treated by presumptive test reagents. *International Congress Series* **1261**, 631-633, 2004.

[14] A.C. Ponce, M.A. Segui, M.M. Feucht, V. Pascual. Revelado de manchas latentes: efectividad del luminol y evaluación de su efecto sobre el estudio del DNA. *Cuad. Med. Forense* **28**, 33-36, 2002.

[15] M.D.P.T. Sotomayor, I.L.T. Dias, M.R.V. Lanza, A.B. Moreira, L.T. Kubota. Aplicação e avanços da espectroscopia de luminescência em análises farmacêuticas. *Quím. Nova* **31(7)**, 1755-1774, 2008.

- [16] M.N. Hochmeister, B. Budowle, R. Sparkes, O. Rudin, C. Gehrig, M. Thali, L. Schmidt, A. Cordier, R. Dirnhofer. Validation Studies of an Immunochromatographic 1-Step test for the forensic identification of human blood. *J Forensic Sci.* **44(3)**, 597-602, 1999.
- [17] C.J. Swander, J.G. Stiles. *Evaluation of the ABACard HemaTrace for the Forensic Identification of Human Blood*. Paper submitted to the Michigan Association of Forensic Science Annual Meeting, Michigan USA, 1998.
- [18] D.L. Laux. Effects of Luminol on the Subsequent Analysis of Bloodstains. *J Forensic Sci.* **36(5)**, 1512-1520, 1991.
- [19] WAMA Diagnóstica. Sangue Oculto imuno-rápido. São Paulo. 1f. Bula
- [20] M. Grodsky, K. Wright, P.L. Kirk. Simplified Preliminary Blood Testing-An Improved Technique and a Comparative Study of Methods. *J Crim Law Criminol.* **42(1)**, 95-104, 1951.
- [21] B. Budowle, J.L. Leggitt, D.A. Defenbaugh, K.M. Keys, S.F. Malkiewicz. The Presumptive Reagent Fluorescein for Detection of Dilute Bloodstains and Subsequent STR Typing of Recovered DNA. *J Forensic Sci.* **45(5)**, 1090-1092, 2000.
- [22] S.S. Tobe, N. Watson, N.N. Daéid. Evaluation of Six Presumptive Tests for Blood, Their Specificity, Sensitivity, and Effect on High Molecular-Weight DNA. *J Forensic Sci.* **52(1)**, 102-109, 2007.