

## Resultado falso-positivo para sangue humano pela ação de interferência química do cobre em teste imunocromatográfico

N.M. Yoshitake\*, L.B. Coelho, C.G. Resende, G.S.J. Bizo, H.S.D. Correa, J.F. Lima-Garcia, P.S.V. de Oliveira, A.C. Carneiro

*Diretoria Metropolitana de Laboratório Forense. Perícia Oficial e Identificação Técnica (POLITEC), Cuiabá (MT), Brasil*

\*Endereço de e-mail para correspondência: [nelsonyoshitake@politec.mt.gov.br](mailto:nelsonyoshitake@politec.mt.gov.br). Tel.: +55-65-92166217.

Recebido em 03/06/2015; Revisado em 02/07/2015; Aceito em 03/07/2015

---

### Resumo

O sangue humano é comumente encontrado em locais de crime e sua constatação é feita geralmente através de exames imunocromatográficos, concebidos para determinação qualitativa de hemoglobina humana em fezes, porém amplamente utilizados nos Institutos de Criminalística para amostras forenses. A salina tamponada usada para extração de supostas manchas de sangue contém azida de sódio e esta pode reagir com cobre. Com objetivo de testar a possível interferência do cobre nos testes imunocromatográficos de sangue humano, foram utilizadas moedas de R\$0,05 (M1); R\$0,10 (M2); R\$0,25 (M3); R\$0,50 (M4) e R\$1,00 (M5), pelo fato de possuírem ligas metálicas conhecidas e com diferentes composições. As moedas foram previamente lavadas e deixadas secar, a seguir utilizaram-se *swabs* umedecidos com solução extratora e esfregados em cada uma delas para obtenção de amostras para serem submetidas à pesquisa de sangue humano. Posteriormente, as cinco moedas foram imersas na solução extratora e deixadas em repouso, gerando amostras para serem testadas após 1, 2, 4 e 42 horas. As amostras obtidas com *swab* apresentaram resultado negativo para sangue humano. No entanto, a partir de uma hora de imersão na solução extratora, resultados falso-positivos foram observados em M3; duas horas de extração em M2 e M3; quatro horas de extração em M2, M3 e M5 e 42 horas de extração em M1, M2, M3 e M5. Desta forma, advertimos sobre a existência do risco de resultados falso-positivos para sangue humano em laudos periciais dos Laboratórios Forenses que utilizam testes imunocromatográficos em amostras que porventura contenham cobre em sua composição.

*Palavras-Chave:* Falso-positivo; Sangue humano; Interferência química; Cobre; Teste imunocromatográfico.

---

### Abstract

Human blood is commonly found in crime scenes and its characterization is usually done through immunochromatographic assays conceived for qualitative determination of human haemoglobin in feces, although widely used in Forensic Institutes for forensic samples. Buffered saline, used as extraction solution of supposed bloodstains, contains sodium azide which can react with copper. Aiming to test possible cross reaction of copper in immunochromatographic assays for human blood detection, we used R\$0,05 (M1); R\$0,10 (M2); R\$0,25 (M3); R\$0,50 (M4) and R\$1,00 (M5), since it has known metallic alloys with different compositions. The coins were previously washed and left to dry, afterwards we used *swabs* moistened with extraction solution and rubbed each one for sample collection in order to proceed the assay for human blood detection. Afterwards the five coins were immersed in extraction solution and left to rest, generating samples that were tested after 1, 2, 4 and 42 hours. The samples obtained with a *swab* showed a negative result for human blood. However, after 1 hour of immersion in extraction solution, false-positive results were observed for M3; 2 hour extraction in M2 and M3; 4 hour extraction in M2, M3, M5 and 42 hour extraction in M1, M2, M3 and M5. Therefore, we advert about the possibility of false-positive results for human blood in laboratory reports of Forensic Laboratories that utilize immunochromatographic tests in samples that end up having copper in its compositions.

*Keywords:* False positive; Human blood; Chemical interference; Copper; Immunochromatographic test.

---

## 1. INTRODUÇÃO

O sangue constitui cerca de 8% do peso corporal total [1], sendo um dos vestígios biológicos mais encontrados em fatos criminosos que envolvem homicídios, estupros e agressões físicas [2].

Dentre os componentes presentes no sangue destacam-se os glóbulos vermelhos, também conhecidos como hemácias, dentro dos quais se encontra a hemoglobina, uma proteína conjugada que confere a cor vermelha ao sangue e é responsável pelo transporte de oxigênio.

A pesquisa por sangue em amostras forenses pode ser feita através de testes de orientação que indicam a possibilidade de o material conter sangue (testes de cor e testes de luminescência), e testes de certeza que confirmam a presença de sangue genérico (cristais de Teichmann e de Takayama) ou de sangue humano (imunocromatográfico) nas amostras [2].

A benzidina ou reagente de Adler-Ascarelli é um teste de orientação (teste de cor) que foi utilizado durante a maior parte do século XX, para a detecção de sangue em cenas de crime, devido a sua alta sensibilidade [3]. A reação da benzidina baseia-se na catálise da decomposição do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio, pela hemoglobina presente no sangue. O oxigênio formado oxida a benzidina, alterando a estrutura, perceptível por meio do aparecimento de uma coloração azulada [3]. No entanto pode reagir com sais de ferro II e III e oxidases de cereais [4], por outro lado uma reação negativa indica ausência ou quantidades não detectáveis do grupo prostético *heme* [2].

O teste de certeza mais comumente utilizado para a identificação de sangue humano em amostras forenses é o imunocromatográfico e este geralmente utiliza anticorpos monoclonais (AbM) móveis conjugados a ouro coloidal na região de aplicação da amostra (região absorvente), anticorpos policlonais (AbP) imobilizados na região teste e anticorpos anti-imunoglobulina (anti-Ig) na região controle, sendo os dois primeiros, específicos para o antígeno de interesse e o último específico para imunoglobulinas, conforme Fig. 1.

Caso seja dispensada, amostra contendo sangue humano na região de aplicação (região absorvente), a hemoglobina humana se liga ao anticorpo monoclonal anti-hemoglobina humana conjugada a ouro coloidal. No decorrer da corrida da amostra, o complexo hemoglobina humana-anticorpo monoclonal-ouro coloidal, migra pela região teste, devido afinidade com o anticorpo policlonal anti-hemoglobina humana, formando assim uma faixa de coloração avermelhada, própria do ouro coloidal. Anticorpos monoclonais conjugados a ouro coloidal, mas não complexados com hemoglobina humana, continuam a corrida até atingir a região controle, formando assim, outra banda de coloração avermelhada.

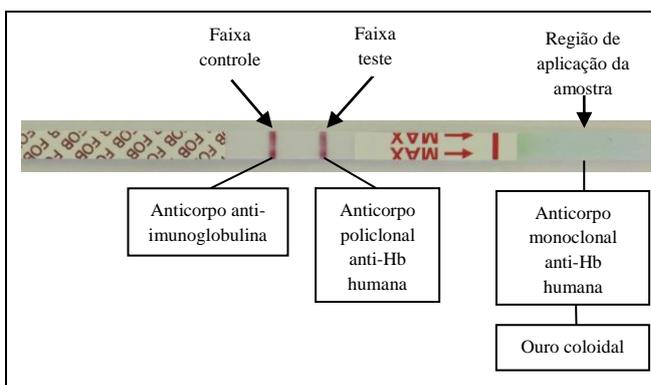


Figura 1. Esquema do teste imunocromatográfico de sangue humano.

Este método permite detectar sangue humano, mesmo em amostras antigas, contaminadas ou em estado de putrefação [5], apresentando sensibilidade dez mil vezes maior que os testes de cristais de Teichmann e de Takayama [2].

O FECA-CULT ONE STEP TESTE é um exame imunocromatográfico rápido para a determinação qualitativa de hemoglobina humana em fezes, a fim de detectar distúrbios gastrintestinais inferiores, como câncer colo retal e adenomas, por meio da interpretação visual do desenvolvimento de cor no teste, sendo positivo (duas faixas) e negativo (uma faixa) [6]. Diante da sensibilidade e especificidade, os testes imunocromatográficos são amplamente utilizados nos Institutos de Criminalística para detecção de sangue humano em amostras forenses.

A salina tamponada, que compõe o kit imunocromatográfico, contém azida de sódio ( $\text{NaN}_3$ ), que conforme instruções do fabricante [6], pode reagir com encanamentos de chumbo ou cobre no momento do descarte.

Dentre a variedade de materiais encaminhados ao Laboratório de Exames Biológicos da Diretoria Metropolitana de Laboratório Forense da POLITEC/MT para pesquisa de sangue humano, alguns apresentam cobre em sua composição, como projéteis de arma de fogo (PAF) com camisas de latão (liga metálica de cobre e zinco), moedas, utensílios, cadeados, bijuterias, entre outros. Desta forma, o presente estudo tem o objetivo de testar se o produto da reação química da azida de sódio com o cobre pode causar uma possível interferência nos testes imunocromatográficos para sangue humano, resultando em falso-positivos (duas faixas) em amostras sabidamente sem sangue humano.

## 2. MATERIAL E MÉTODO

A possível interferência do cobre nos testes foi avaliada com a utilização de moedas de R\$0,05 (cinco centavos de Real), nomeada como M1; R\$0,10 (M2);

R\$0,25 (M3); R\$0,50 (M4) e R\$1,00 (M5), pelo fato de possuírem ligas metálicas conhecidas e com diferentes composições.

A Tabela 1 fornece as ligas metálicas de cada moeda de Real e está disponível no sítio do Banco Central do Brasil [7].

**Tabela 1.** Composição química das ligas metálicas de moedas de Real (2ª família).

Moeda	Material	Observação
R\$ 0,05	Aço * revestido com cobre	-
R\$ 0,10	Aço * revestido com bronze **	-
R\$ 0,25	Aço * revestido com bronze **	-
R\$ 0,50	Cobre e níquel	(1998 a 2001)
R\$ 0,50	Aço inoxidável	(2002 em diante)
R\$ 1,00	Cobre e níquel (núcleo) e Alpaca *** (anel)	(1998 a 2001)
R\$ 1,00	Aço inoxidável (núcleo) e Aço revestido de bronze ** (anel)	(2002 em diante)

\* Aço: liga de ferro e carbono

\*\* Bronze: liga de cobre e estanho

\*\*\* Alpaca: liga de cobre, níquel, estanho e prata

As moedas foram previamente lavadas com detergente neutro para eliminação de possível impregnação de sangue e deixadas para secar. A seguir utilizaram-se *swabs* estéreis umedecidos com solução extratora para coleta de amostras por meio de movimentos rotatórios (esfregaços), por dez segundos nas duas faces, em cada moeda de 5, 10, 25 e 50 centavos de Real. Já a moeda de 1 Real, por apresentar ligas diferentes na borda e no centro, gerou duas amostras.

Posteriormente, as cinco moedas foram imersas separadamente na solução extratora e deixadas em repouso, gerando amostras para serem testadas após 1, 2, 4 e 42 horas.

As amostras dos *swabs* e dos líquidos de imersão (LI) foram submetidos ao exame imunocromatográfico FECA-CULT ONE STEP TESTE (marca INLAB Confiança) para pesquisa de sangue humano.

Realizaram-se dois testes adicionais, sendo o primeiro (TA1) para verificar se materiais contendo metal cobre, imersos em meio aquoso não favorável à ocorrência de reação química, gerariam resultados falso-positivos para sangue humano nos testes imunocromatográficos. Neste teste, utilizaram-se duas moedas M2, sendo uma imersa em água ultrapura e a outra moeda M2 envolta em papel alumínio (metal de sacrifício) e imersa na solução extratora com azida de sódio.

Em contrapartida, o segundo teste adicional (TA2) foi elaborado para testar se os íons de cobre respondem pela interferência química, resultando em falso-positivos. Este teste gerou seis amostras, utilizando dois diluentes (água ultrapura e solução extratora) e três sais de cobre, sendo: sulfato de cobre II, cloreto de cobre I e cloreto de cobre II, ou seja, sais constituídos pelo cátion cobre nos dois estados de oxidação:  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ , porém com ânions diferentes (sulfato e cloreto). Dissolveram-se 3,0 mg (três miligramas) de cada um dos sais separadamente em 2,0 ml (dois mililitros) de cada diluente. As amostras foram agitadas e testadas após dez minutos.

Por fim, utilizou-se o reagente de Adler-Ascarelli (benzidina), pelo fato deste reagir com sangue, mas não reagir com sais de cobre [4]. Neste sentido verificou-se a possível eficácia da benzidina como controle negativo, ou seja, um resultado positivo para sangue humano no teste imunocromatográfico e não reagente para benzidina descartaria a presença de sangue, apontando para possível interferência do cobre. Para tanto, o líquido de imersão da moeda M2 foi coletado com *swab* estéril e deixado secar por 24 horas, sendo testado a seguir com benzidina.

No intuito de entender o mecanismo de ação do cobre nos testes imunocromatográficos, resultando em falso-positivos, foram realizados ensaios envolvendo secção de diferentes regiões do teste imunocromatográfico: S1) subtração da região absorvente; S2) subtração da região teste; S3) subtração da região absorvente e da região teste. O ensaio S1 foi testado com LI de M1 e sangue humano, já S2 e S3 apenas com LI de M1. Como a bula do teste utilizado no presente estudo não apresenta informações específicas quanto aos tipos de anticorpos utilizados (monoclonal e/ou policlonal), considerou-se a presença de anticorpos monoclonais anti-hemoglobina humana conjugados a ouro coloidal na região de aplicação da amostra, anticorpos policlonais anti-hemoglobina humana na região teste e anticorpos anti-immunoglobulina na região controle.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras das moedas M1, M2, M3, M4 e M5 obtidas com *swab* apresentaram resultado negativo para sangue humano no teste imunocromatográfico.

Observou-se que materiais contendo o metal cobre, imersos na solução extratora contendo azida de sódio, sofreram reação química, conferindo ao líquido de imersão (LI), coloração de tonalidade azul, cuja intensidade aumentava em função do tempo.

A partir de uma hora de imersão na solução extratora, resultados falso-positivos no teste imunocromatográfico para sangue humano foram observados nos LI, conforme Tab. 2. Verificou-se que uma hora de extração de M3; duas horas de extração de M2 e M3; quatro horas de

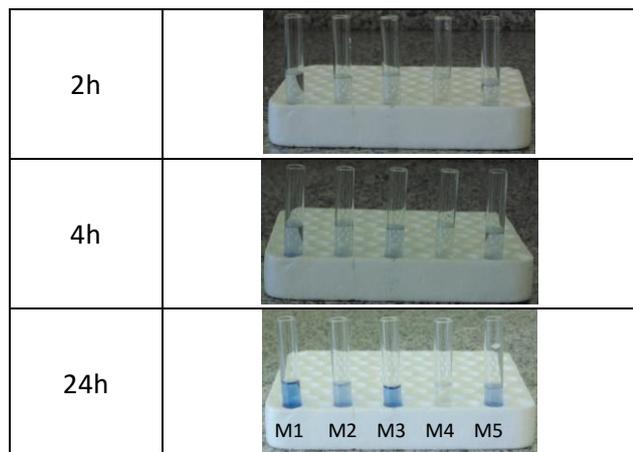
extração de M2, M3 e M5 e 42 horas de extração de M1, M2, M3 e M5 apresentaram resultados falso-positivos.

Estes resultados variaram conforme o tipo de moeda (liga metálica) e o tempo de exposição à azida de sódio. Apenas a moeda M4 (50 centavos), confeccionada em aço inoxidável e livre de cobre (fabricada em 2003), não adquiriu coloração azul e apresentou resultado negativo.

**Tabela 2.** Resultado dos testes imunocromatográficos para sangue humano em moedas.

Amostras utilizadas para os testes	Moedas				
	M1	M2	M3	M4	M5
Swab	-	-	-	-	-
LI - 1 hora	-	-	+	-	-
LI - 2 horas	-	+	+	-	-
LI - 4 horas	-	+	+	-	+
LI - 42 horas	+	+	+	-	+

A Figura 2 evidencia as mudanças de intensidade de cor dos LI das moedas M1, M2, M3 e M5 em função do tempo.



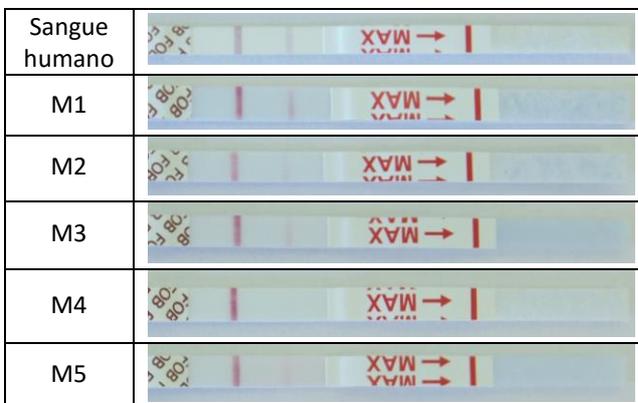
**Figura 2.** Mudança de intensidade da coloração azul dos líquidos de imersão das moedas M1, M2, M3 e M5 em função do tempo.

A Figura 3 apresenta os resultados dos testes imunocromatográficos, realizados em amostra de sangue e amostras dos líquidos de imersão de moedas M1, M2, M3, M4 e M5.

O TA1 apresentou resultado negativo para sangue humano mesmo após 30 horas de imersão das moedas, conforme Tab.3, bem como cor inalterada (solução transparente), sugerindo a não ocorrência de reação química entre a moeda M2 e a água ultrapura e entre a moeda M2 envolta em papel alumínio e a solução extratora com azida de sódio. Tal procedimento fora adotado para que o alumínio pudesse atuar como metal de

sacrifício (maior potencial de oxidação que o cobre), evitando assim, a reação química do metal cobre.

O TA1 permite inferir que a não ocorrência da reação química do cobre nos meios aquosos impede resultados falso-positivos.



**Figura 3.** Resultado positivo (sangue humano) e falso-positivos pela interferência do cobre nos testes imunocromatográficos para sangue humano em M1, M2, M3 e M5 e negativo para M4.

**Tabela 3.** Resultado dos testes imunocromatográficos para sangue humano em moeda M2 imersa em água ultrapura e outra envolta em papel alumínio e imersa em solução extratora.

Tempo de imersão	Teste empregado	
	M2 + Água ultra-pura	M2 + Al + NaN <sub>3</sub>
4 horas	-	-
30 horas	-	-

Em contrapartida, o TA2 resultou em falso-positivos para sangue humano nas seis diluições dos sais de cobre, tanto na água ultrapura quanto na solução extratora com azida de sódio, conforme Tab.4.

**Tabela 4.** Resultado dos testes imunocromatográficos para sangue humano em diluições de sais de cobre com água ultrapura e solução extratora.

Sais	Água ultrapura	Solução extratora com azida de sódio
CuSO <sub>4</sub>	+	+
CuCl	+	+
CuCl <sub>2</sub>	+	+

Isto demonstra que apesar de não ter havido reação química entre os sais de cobre e os diluentes, sua forma iônica, consequência da dissociação dos sais em meio aquoso, foi suficiente para que ocorresse interferência química no teste imunocromatográfico, resultando em falso-positivos (Fig. 4).

Conforme esperado, o líquido de imersão da moeda M2 não reagiu com a benzidina, ou seja, não adquiriu a coloração azulada característica do reagente, evidenciando a ausência de grupo prostético *heme*. Desta forma, sua utilização como controle negativo pode denunciar resultados falso-positivos para sangue humano pela interferência do cobre.



**Figura 4.** Resultados falso-positivos pela interferência do cobre nos testes imunocromatográficos para sangue humano.

Com o intuito de se entender ainda que de forma exploratória, a ação do cobre nos testes imunocromatográficos, seccionou-se as tiras de teste em três porções específicas. A primeira nomeada S1, apresentou subtração da região absorvente, a segunda nomeada S2, sofreu subtração da região teste, já a terceira nomeada S3, teve a região absorvente e a teste subtraídas.

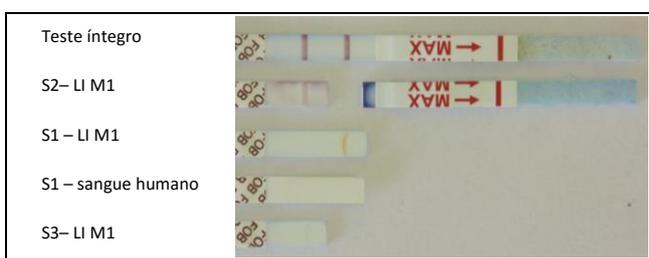
O grupo S1 foi exposto ao LI da moeda M1 e a sangue humano. Ao se aplicar a amostra do LI diretamente na porção anterior à região teste, observou-se o aparecimento de uma coloração levemente alaranjada, o que sugere uma possível interação do cobre com o AbP visto que a banda visualizada encontra-se na mesma posição de um resultado positivo. Ressalta-se ainda que essa coloração observada (alaranjada) se deve exclusivamente à ação do cobre sem a participação do AbM conjugado ao ouro coloidal uma vez que a região absorvente que contém tais anticorpos fora suprimida. No entanto, ao se analisar a região controle, não foi observada qualquer coloração aparente, uma vez que o anticorpo imobilizado nesta região é específico para imunoglobulinas, as quais foram suprimidas neste protocolo experimental (Figura 5).

O mesmo protocolo de subtração da região absorvente foi adotado para amostras contendo sangue humano, no entanto não foi constatada a formação de bandas características nem na região teste e nem na região controle. De fato, em decorrência da especificidade antígeno-anticorpo, infere-se que a hemoglobina depositada se ligou ao AbP, no entanto, não foi possível visualizar a formação da faixa avermelhada na região teste devido a ausência do AbM conjugado. Do mesmo modo, a supressão da região absorvente inviabilizou a visualização de banda característica na região controle devido a ausência da interação AbM-Anti-Ig (Figura 5).

No segundo protocolo experimental, S2, a região teste foi suprimida, e posteriormente a região absorvente e a controle foram aproximadas, a fim de possibilitar a

migração da amostra diretamente da região absorvente até a controle. Ao aplicarmos o LI da moeda M1 na região absorvente, observou-se uma banda característica de coloração avermelhada na região controle, devido provavelmente à interação do AbM conjugado ao ouro coloidal com o anticorpo anti-Ig imobilizado nessa região (Figura 5).

A fim de verificar a possível interação do cobre com o anticorpo anti-Ig realizou-se o terceiro protocolo, S3, que consiste na subtração da região absorvente e da região teste. Ao aplicarmos o LI da moeda M1 na região imediatamente anterior à região controle, observou-se uma banda de coloração levemente azulada na região correspondente a região controle (Figura 5).



**Figura 5.** Ensaio envolvendo subtração de diferentes regiões do teste imunocromatográfico.

Por fim, com base nos resultados obtidos com os testes imunocromatográficos íntegros e seccionados nas diferentes regiões, pode-se inferir que o cobre de alguma forma interage com os anticorpos monoclonais anti-hemoglobina humana conjugados com ouro coloidal, anticorpos policlonais anti-hemoglobina humana e anticorpos anti-imunoglobulina, culminando assim, com os resultados falso-positivos observados.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido à interferência do cobre nos testes imunocromatográficos para pesquisa de sangue humano, recomendamos que as amostras sejam coletadas com *swab*. Caso seja necessário manter em imersão materiais contendo cobre, fazê-lo preferencialmente com água ultrapura ou antes que a reação química ocorra, caso utilize solução extratora a base de azida de sódio. Nos casos de suspeita de resultados falso-positivos devido à interferência do cobre, é importante a utilização de um controle negativo como a benzidina. Sendo assim, advertimos sobre a existência do risco de resultados falso-positivos para sangue humano em laudos periciais dos Laboratórios Forenses que utilizam testes imunocromatográficos em amostras que porventura contenham cobre em sua composição.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] G.J. Tortora; S.R. Grabowski. *Corpo humano: fundamentos de anatomia e fisiologia*. Artmed. Brasil. 350-352, 2006.
- [2] M.C.T. Sawaya; M.R.S. Rolim. *Manual prático de medicina legal no laboratório*. Juruá. Brasil, 19-25, 2009.
- [3] I.V. de P. Monteiro. Vestígios hemáticos no local de crime sua importância médico-legal. *Dissertação de Mestrado*, Instituto de ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, 2010.
- [4] J.L. Zarzuela; R.F. Aragão. *Química legal e incêndios*. Sagra Luzzatto. Brasil. 213-225, 1999.
- [5] P. Longo; C.R. Dias Filho; M.P.O. Valadares ; E.C. Alonso; S.P.S. Gonçalves; E. Auler-Bittencourt. Avaliação comparativa de teste imunocromatográfico para identificação forense de sangue humano. *Rev. Bras. Crimin.*, **1(1)**, 16-21, 2011.
- [6] Bula INLAB Confiança. FECA-CULT ONE STEP TESTE, 2008.
- [7] Banco Central do Brasil. Moedas do Real. Retirado em 24/04/2015. <http://www.bcb.gov.br/?MOEDAFAM2>.