SOUTHERN BRAZILIAN JOURNAL OF CHEMISTRY 2021 VIRTUAL CONFERENCE

ANALYSIS OF FALSE-POSITIVE RESULTS AND THE REAL EFFECTIVENESS OF LUMINOL IN THE DETECTION OF BLOOD SPOTS.

ZILIOOTTO, Luis Henrique Carra^{1*}; DA SILVA, Isaac Newton Lima¹;

¹ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Faculdade de Engenharia Mecânica. Brasil.

* Autor correspondente
e-mail: luisziliootto@gmail.com

Received 20 January 2022; received in revised form 20 February 2022; accepted 23 February 2022

ABSTRACT

Forensic investigators have widely used luminol for more than 90 years in the identification of blood in life crime scenes. When mixed with an alkaline solution and sprayed on a catalyst (iron present in blood hemoglobin), it reproduces a chemiluminescent reaction with a bluish color. As it is a presumptive blood test, the present study sought to demonstrate that only the photons emission is not a prerogative to attest that the result is indeed human blood. In this perspective, 24 samples of both liquid and solid substances that can easily be found in residences and potentially used by criminals to impair the interpretation of the investigator at the crime scene were prepared. Out of the total of the analyzed samples, there was a chemical reaction with sodium hypochlorite and wood varnish, proving the known understanding that some samples may cause interference in the examination with luminol.

Keywords: *Luminol, false positive, false negative, chemiluminescence, blood.*

1. INTRODUÇÃO

A crescente onda de crimes contra a vida sempre assolou a população que vive nos maiores centros urbanos. É conhecimento comum que, muitas vezes, quem está praticando o ato delituoso possui armamento tecnológico superior ao dos próprios órgãos de segurança, não somente de poderio balístico, mas também de técnicas e métodos que dificultam a identificação da autoria do crime. Por consequência, o número de assassinatos sem solução também é crescente, segundo dados retirados do Atlas da Violência de 2018, o número de crimes violentos intencionais no ano de 2016 foi de 62.517, desses, a taxa de resolução varia de 5% a 8%.

A área das ciências forenses vem desempenhando um papel de extrema importância aumentando a taxa de crimes solucionados. Mesmo que diversas evidências físicas sejam facilmente notadas e encontradas na cena de um assassinato, muitas passam despercebidas por não serem visíveis a olho nu, como: impressões digitais, fibras, saliva, sêmen e sangue. Essa última pode ser detectada por meio

de uma reação quimioluminescente entre os íons férricos presentes na hemoglobina e a solução de luminol. Dos métodos para detecção de sangue, o exame com luminol é o que apresenta maior facilidade de uso e agilidade de detecção, sendo o mais utilizado por investigadores forenses.

A ampla utilização do luminol no meio forense se dá pela facilidade de utilização e agilidade na obtenção dos resultados, uma vez que basta borrifar o composto sobre a região em que há a suspeita de sangue. Por mais que a cena do crime tenha sido limpa e o sangue não esteja visível, o contato do composto com um catalisador faz com que as moléculas atinjam um estado eletronicamente excitado e liberem parte de sua energia por meio de fótons, para alcançarem seu estado fundamental.

Para que ocorra a reação quimioluminescente é necessário que o reagente luminol entre em contato com uma solução alcalina (geralmente utiliza-se peróxido de hidrogênio) e um catalisador suave. Ao utilizar o luminol em um ambiente com suspeita de um crime contra a vida, os investigadores forenses buscam no átomo de ferro presente na hemoglobina do sangue, já oxidado em sua forma

Fe^{+3} , o catalisador necessário para gerar a reação quimioluminescente e assim liberar a luz azulada visível, se essa se manifestar pode ser que haja sangue no local.

Pelo fato da aplicação com o Luminol ser um teste presuntivo para sangue, muitos investigadores forenses cometem o equívoco de atestar que somente a quimioluminescência é o suficiente para afirmar que a luz emitida é de fato sangue humano. Nessa perspectiva, o presente trabalho tem por finalidade demonstrar que podem haver falhas no teste com o reagente, isso é, o luminol também pode causar o efeito de emissão de fótons quando em contato com outros catalisadores suaves e não somente com o íon férrico (Fe^{+3}) presente no sangue. Essas interferências são conhecidas como falso-positivo e falso-negativo para sangue.

Os resultados denominados como falso-positivos, são aqueles em que a mistura luminol associada à solução alcalina reage com o catalisador, mas esse não é o ferro da hemoglobina do sangue. Em contra partida, podem ocorrer resultados falso-negativos, quando uma determinada substância posta sobre o sangue acaba inibindo a reação quimioluminescente com o luminol.

Para identificar e comprovar a existência dessas interferências, foram testadas 24 amostras de diversos produtos líquidos e sólidos. A escolha das amostras foi embasada na facilidade de encontrar os respectivos produtos no dia a dia e, conseqüentemente, na predisposição de serem utilizadas propositalmente (ou não) para prejudicarem a investigação de uma cena de crime.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

O luminol (5-amino-2,3-dihidroftalazina-1,4-diona) é um sólido cristalino de coloração branco-amarelada, composto por átomos de carbono, hidrogênio, oxigênio e nitrogênio ($\text{C}_8\text{H}_7\text{O}_2\text{N}_3$). Pode ser considerado insolúvel em água ($<0,1\text{g}/100\text{mL}$), possui temperatura de fusão entre 319°C e 320°C e massa molar de $177,16\text{ g/mol}$. Suas propriedades gerais são: estável a temperatura ambiente, sensível à luz e combustível. Apresenta incompatibilidade com fortes agentes oxidantes, ácidos, básicos e redutores (Barni, Lewis, Berti, Miskelly, and Lago, 2007).

O exame para a obtenção da quimioluminescência consiste na preparação das amostras e do local em que o composto químico luminol será aplicado. Os testes visam a

identificação e confirmação da manifestação de resultados falso-positivos de amostras previamente investigadas por outros pesquisadores e de outras sem registros de análises prévios.

As amostras utilizadas seguem representadas na Tabela 1:

Tabela 1. Amostras utilizadas

Nº	Amostra
1	Hipoclorito de sódio
2	Limpador Multiuso
3	Sabão em pó
4	Diluyente Aguarrás
5	Vinagre branco de álcool
6	Detergente para uso geral
7	Saponáceo Líquido
8	Cera incolor antiderrapante
9	Detergente Automotivo com cera
10	Desengraxante extraforte
11	Tinta automotiva oxidada
12	Verniz
13	Limão
14	Laranja
15	Bergamota
16	Maracujá
17	Aveia
18	Semente de moranga
19	Brócolis
20	Beterraba
21	Espinafre
22	Leite de coco
23	Suplemento Alimentar Infantil (diluído em água)
24	Suplemento Alimentar Infantil (em pó)

Todas as amostras selecionadas foram armazenadas separadamente em recipientes próprios de 70 mililitros, fabricados em polímero termoplástico politereftalato de etileno (Figura 1). As amostras líquidas e sólidas foram aplicadas e sobrepostas em discos de algodão hidrófilo, posicionados sobre 6 blocos de uma chapa de madeira de MDP (Medium Density Particleboard), com largura de 8 cm, comprimento de 30 cm e espessura de 0,9 cm.

Figura 1. Recipientes e blocos utilizados nos exames

As amostras preestabelecidas para o teste são substâncias que podem ser facilmente encontradas no dia a dia, usualmente empregadas para limpeza, alimentação e serviços gerais (Tabela 1). Por serem fáceis de obter, podem ser utilizadas para mascarar a cena do delito, seja de maneira proposital ou não.

O kit de luminol utilizado nos testes foi fornecido e preparado pela Divisão de Genética Forense/DPL/IGP-RS. Sua formulação é bastante similar a aquela pesquisada por Weber (1996).

O conjunto é composto pelos seguintes itens: um frasco com 50 mL de NaOH (hidróxido de sódio), um frasco com 50 mL de solução estoque de luminol, um frasco com 50 mL de H_2O_2 (peróxido de hidrogênio), um frasco borrifador com 350 mL de água ultrapura.

A preparação do reagente consiste em misturar o luminol, o hidróxido de sódio e o peróxido de hidrogênio dentro do borrifador com água ultrapura. É recomendado que após o composto estar formado não se agite severamente o borrifador e que o líquido seja utilizado em no máximo 24 horas. As soluções antes e após serem misturadas devem ser mantidas refrigeradas.

Os registros fotográficos foram realizados antes e após a aplicação do reagente luminol nas amostras, primeiramente com as luzes acesas e na sequência com o ambiente escurecido, o mesmo procedimento foi repetido para todas as amostras utilizadas. Para melhorar a visualização dos resultados, os exames foram realizados à noite.

Os registros foram captados com uma câmera fotográfica digital, da marca Nikon, modelo D5300. Com o ambiente iluminado, fixou-se a câmera no tripé, direcionando-a para a cena a ser fotografada, selecionou-se o modo automático de foco para enquadramento, após modificou-se o foco para manual para evitar reajuste intuitivo do mesmo no escuro. Os

parâmetros de configuração utilizados foram: flash inicial fraco e sem retorno estroboscópico, tempo de exposição 1/60 segundos, diafragma com abertura máxima, distância focal de 48 mm e velocidade ISO 1600.

A fim de melhorar a visualização e identificação das amostras após a aplicação do luminol, aumentou-se o contraste da imagem em 100% e reduziu-se o brilho em 100%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Esse projeto propôs analisar a efetividade do reagente luminol, frente a diversas substâncias líquidas e sólidas que possam interferir no exame de detecção de sangue em locais de crimes contra a vida. As amostras testadas foram divididas em 4 grupos, sendo eles: produtos de limpeza, materiais de pintura, alimentação e suplemento alimentar infantil. No total foram analisadas 24 amostras.

A reação quimioluminescente ocorreu nitidamente nas amostras de hipoclorito de sódio e verniz para madeira. A amostra de número 1 apresentou brilho bastante característico, que se manteve por um longo período. Já na amostra de número 12, a reação ocorreu em locais pontuais do disco de algodão, sendo mais fácil de ser observada *in loco* que por meio dos registros fotográficos. Restou comprovado que os compostos hipoclorito de sódio e verniz para madeira, apresentam resultados falsos positivos para o reagente luminol.

A amostra de sabão em pó apresentou indicativo de reação, todavia, pelo produto ser de coloração azulada pode ter ocorrido interferência na análise visual e fotográfica, sendo o resultado considerado inconclusivo, neste trabalho.

As amostras de números 23 e 24 (suplemento alimentar) foram escolhidas porque o composto apresenta em sua composição sulfato ferroso ($FeSO_4$), que possui o íon Fe^{+2} . Em ambos os casos a reação com luminol não foi evidenciada, o que pode ser explicado pela ausência de oxidação do íon ferro para Fe^{+3} . Os estudos realizados apontam que se essa oxidação tivesse ocorrido, o suplemento alimentar poderia ter reagido positivamente com o luminol, gerando mais um resultado falso positivo.

Na Figura 2 constam os resultados falsos positivos das amostras de hipoclorito de sódio e verniz para madeira e a amostra suspeita de sabão em pó. As imagens da linha superior foram obtidas com ambiente iluminado e as da linha inferior após aplicação do luminol, em ambiente

escurecido.

Figura 2. Da esquerda para a direita: hipoclorito de sódio, verniz para madeira e sabão em pó.

Os demais elementos testados não apresentaram reação química evidente com o luminol. É interessante destacar que, ao contrário dos estudos realizados por Creamer *et al.* (2003) e Nilsson (2006), no exame realizado o limpador multiúso, o removedor de manchas (diluente aguarrás) e a ferrugem (tinta automotiva oxidada) apresentaram resultados negativos. Também, investigadores forenses experientes alertaram sobre a possível reação falso positiva com a amostra de beterraba, embora neste estudo não tenha manifestado quimioluminescência.

4. CONCLUSÃO:

O sítio de um acidente deve ser investigado cuidadosamente, principalmente quando se trata de um crime contra a vida, em que resoluções inadequadas podem atribuir a responsabilidade do ato delituoso a quem não cometeu a ação, incorrendo em injustiças que podem devastar vidas.

O principal objetivo do trabalho foi munir o investigador forense com o conhecimento de quais elementos encontrados no local do crime podem ter sido utilizados pelo criminoso para mascarar a real cronologia dos eventos. Também, para demonstrar que somente o fato de ocorrer a reação quimioluminescente não é prerrogativa para atestar que se trata de sangue humano.

Foram analisadas 24 amostras, divididas em 4 grupos, sendo eles: produtos de limpeza, materiais de pintura, alimentação e suplemento alimentar infantil. Desse montante de amostras, 2 apresentaram resultado falso positivo (hipoclorito

de sódio e verniz para madeira) e 1 teve resultado inconclusivo (sabão em pó), conforme já exposto. Isso é, a mistura luminol associada à solução alcalina reagiu com um catalisador, que não foi o ferro da hemoglobina do sangue, ou seja, o teste foi positivo para a quimioluminescência, mas negativo para a presença de sangue humano.

Além dessas amostras, os estudos realizados por Nilsson (2006) apontaram que os seguintes produtos geraram resultados falsos positivos com o luminol, sendo eles: salsinha, nabo, rabanete, agente de limpeza com hipoclorito de sódio (NaClO), ferrugem da placa de ferro, verniz para parquet e dáfia. Já Cavalcanti e Barros (2016) relataram que chá-verde, chá-preto e vinho branco podem inibir a reação quimioluminescente, causando interferência com o reagente luminol.

Os resultados obtidos dos testes experimentais foram de acordo com o embasamento teórico estudado, que seja: o exame com luminol é apenas um teste presuntivo para sangue, sendo necessária a coleta da amostra suspeita e sua análise em laboratório para concluir que se trata de sangue humano.

5. REFERÊNCIAS:

1. Barni, F., Lewis, S. W., Berti, A., Miskelly, G. M., and Lago, G. (15 de Maio de 2007). Forensic application of the luminol reaction as a presumptive test for latent blood detection. *Talanta*, 896-913.
2. Cavalcanti, D. R., and Barros, R. M. (2016). Escondendo Manchas de Sangue em Locais de Crime. *Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics*, 1-14.
3. Creamer, J., Quickenden, T., Apanah, M., Kerr, K., and Robertson, P. (2003). A comprehensive experimental study of industrial, domestic, and environmental interferences with the forensic luminol test for blood. *Wiley InterScience*, 193-198.
4. Nilsson, A. (2006). *The forensic luminol test for blood: unwanted interference and the effect on subsequent analysis*. Linköping.