

# **AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE ENTRE DOIS TESTES PARA DETECÇÃO DE SANGUE EM DIFERENTES TIPOS DE SUPORTES POROSOS E NÃO POROSOS**

1. Luiz Airton Saavedra de Paiva

2. Paula Garcia Ramalho

3. Deborah Pereira de Souza Domingos

4. Karina Bellinghausen Merseguel

1. Mestre e Doutor pela FMUSP; Professor Titular de Medicina Legal do Curso de Medicina do Centro Universitário São Camilo e do Curso de Direito da UNICASTELO; Presidente do Instituto de Ensino e Pesquisa em Ciências Forenses - IEPCF; Membro da Academia Nacional de Medicina Legal.

2. Bióloga; Pesquisadora Voluntária do Instituto de Ensino e Pesquisa em Ciências Forenses - IEPCF.

3. Bióloga; Pesquisadora Voluntária do Instituto de Ensino e Pesquisa em Ciências Forenses - IEPCF.

4. Biomédica; Pesquisadora Voluntária do Instituto de Ensino e Pesquisa em Ciências Forenses - IEPCF.

Endereço para correspondência: Luiz Airton Saavedra de Paiva, Rua Cap. Manuel Rudge, 707 - Jd. Monte Líbano, Mogi das Cruzes - SP - CEP: 08780-290

Tel/fax 55 - 011 - 4799-9626

E-mail: luizairtonsaavedra@ig.com.br

## **RESUMO**

A confirmação da presença de sangue sobre algum tipo de suporte, relacionada como possível evidência criminal, pode representar importante informação em uma perícia forense. Métodos químicos há muito são utilizados como testes presuntivos da existência de sangue. O objetivo desta pesquisa foi avaliar a sensibilidade do Teste da Fenolftaleína (Kastle Meyer) e do Teste da

Benzidina, na detecção de sangue humano. O sangue, sem diluição e em diluições de 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000 e 1:10000, foi instilado sobre cinco tipos de suportes, de materiais porosos e não- porosos. Os resultados positivos na terra, assim como em alguns suportes em elevadas diluições do sangue, demonstraram que, em razão da praticidade e baixo custo, esses dois testes podem ainda estar presentes nos protocolos da rotina pericial criminalística.

**Palavra chave:** Criminalística. Sangue. Fenolftaleína. Benzidina.

### **ABSTRACT**

Confirming the presence of blood on a given substrate as possible criminal evidence may present important information in forensic analysis. Chemical methods have long been used as presumptive tests for the existence of blood. The aim of this study was to evaluate the sensitivity of the phenolphthalein (Kastle-Meyer) and benzidine tests for detection of human blood. Blood, undiluted and in dilutions of 1:10, 1:50, 1:100, 1:500, 1:1000, 1:5000 and 1:10000, was instilled on five types of substrate, from porous and non-porous materials. The positive results on soil, as well as some substrates at high dilutions of blood, showed that, because of the convenience and low cost, these two tests can still be present in the forensic expert routine protocols.

**Keywords:** Criminalistics. Blood. Phenolphthalein. Benzidine.

### **INTRODUÇÃO**

A identificação de sangue há muito representa um importante objetivo para a perícia criminalística. Presente em locais de crime, pode ser encontrado em armas, pisos, paredes, vestes, corpos de vítimas, ou outros tipos de suporte, sendo mais comumente observado sob a forma de manchas (DOREA et al; 2006).

Existem várias técnicas periciais para identificação de sangue, como o Teste do Luminol, o Teste da Fenolftaleína (Kastle-Meyer) e o Teste da Benzidina, todos descritos na literatura como testes presuntivos (HIGAKI et al; 1976; CULLIFORD et al; 1964), ou seja, indicam a possibilidade de que o material examinado seja sangue (COX, 1990, 1991; VIRKLER et al; 2009).

O Teste da Fenolftaleína foi desenvolvido por volta de 1900 pelo Dr. Kastle Meyer, que desenvolveu técnica para a hemoglobina utilizando esta substância como indicador de coloração. Aperfeiçoada a técnica de identificação de sangue por este reagente, ficou conhecido como Teste de Kastle-Meyer (RUDIN et al; 2009).

O Teste da Benzidina foi desenvolvido em 1904, não sendo específico para sangue e sim para peroxidase. Em 1964, Culliford et al. publicaram um artigo com a revisão desse teste. Depois deles, em 1975, a Forensic Science Foundation fez um estudo revelando que, 51% de 215 laboratórios forenses, utilizavam Benzidina para identificação de sangue (GARNER et al., 1976). Todos estes testes podem ser realizados em sangue líquido, sangue coagulado em forma de “crosta”, ou até mesmo onde não haja a visualização de sangue. Com base na literatura revisada os Testes da Benzidina e da Fenolftaleína, detectam a presença de sangue através de oxidações pela peroxidase, que é ativada pelo peróxido de hidrogênio. Esses testes vão agir na hemoglobina que é composta por quatro moléculas protéicas de estrutura terciária e quatro grupamentos *heme* que contém íons de ferro, que podem se ligar frouxamente a átomos de oxigênio. A peroxidase libera o oxigênio e assim ocorre a oxidação, se observando a mudança de coloração do reagente. Sendo utilizada a Benzidina, a positividade será indicado por uma coloração azul-esverdeado. Com a utilização de Fenolftaleína (Kastle-Meyer), a positividade será indicada pela coloração rósea (COX, 1991).

A Fenolftaleína é muito utilizada como indicador de pH. Ao entrar em contato com uma solução básica de pH entre 8,2 e 9,8 ocorre uma mudança na sua coloração, passando a apresentar a cor rósea (RODRIGUES, 2009; ANTUNES, 2009).

A Benzidina é reconhecida como carcinogênica e mutagênica, sendo muito utilizada em produção têxtil, indústria de papel e na produção de tintas (ARRUDA, 2008; WEBB et al; 2006).

Podem ocorrer alterações desses resultados, pela presença de sais de ferro, cobre e suco gástrico ou qualquer substância capaz de decompor a molécula de peróxido de hidrogênio (CHEMELLO, 2007).

O objetivo deste trabalho é avaliar a sensibilidade desses dois testes na identificação da presença de sangue em diferentes diluições, em materiais porosos e não porosos.

## **MATERIAIS E MÉTODO**

O presente trabalho foi realizado pelo Grupo de Estudo e Pesquisa em Ciências Forenses, no Instituto Médico Legal de Guarulhos – São Paulo. Foi utilizado o sangue humano escoado das mesas de autópsia. Esse sangue, após coletado, foi acondicionado em frascos plásticos normalmente utilizados para este objetivo.

O reagente para o Teste da Fenolftaleína (Kastle Meyer) obedeceu a seguinte formulação:

- ✓ Fenolftaleína 1g;
- ✓ Hidróxido de Potássio 25g;
- ✓ Água Destilada 100 ml

Depois, sob aquecimento, foi adicionado 20g de Pó de Zinco. Em seguida acondicionado em frasco de vidro âmbar e identificado.

O reagente para o Teste da Benzidina, foi preparado em capela de fluxo laminar, sendo utilizado agitador, espátula e balança, obedecendo à seguinte formulação:

- ✓ Benzidina 1g;
- ✓ Acido Acético Glacial 30 ml

O sangue coletado foi distribuído em béqueres de diferentes graduações. Foi utilizada a pipeta de Pasteur de 3ml e a pipeta graduada de 0,5ml, para completar as diluições utilizando água destilada.

Os materiais de suporte foram classificados entre porosos e não porosos. Segundo a definição de Ferreira (1999), um suporte é poroso quando possui poros, ou seja, permite ocorrer penetração do líquido gotejado. Já o não poroso é aquele suporte que não contém poros, ou seja, o líquido acumula-se na sua

superfície. Foram utilizados cinco tipos de suporte: tecido de algodão, solo (terra adubada), placa de madeira, plástico (“*Tupperware*”) e placa de vidro.

Foram instiladas duas gotas de sangue sem diluição, como referência de positividade para as diluições crescentes, nos diversos suportes.

Instilado o sangue, os diversos suportes foram deixados para secagem à temperatura ambiente. Após sete dias foi utilizada a técnica de esfregaço, utilizando *Swab* umidificado com água destilada, onde foram aplicados os reagentes. Para leitura dos resultados foram utilizados como referência de máxima positividade os seguintes critérios:

- Teste da Fenolftaleína (Kastle Meyer) – cor rósea evidenciada na amostra de sangue sem diluição (controle), como mostrado na Fig. 1a.
- Teste da Benzidina - cor azul-esverdeado evidenciada na amostra de sangue sem diluição (controle), como mostrado na Fig. 1b.

Para o resultado negativo foi considerada a ausência de coloração.

Os resultados foram classificados quanto à intensidade da coloração apresentada em:

- ✓ Fortemente Positivo: +++
- ✓ Positivo: ++
- ✓ Fracamente Positivo: +
- Negativo: -

A aferição dos resultados foi realizada de forma independente por dois entre três pesquisadores (D. P. S. D., K. B. M. e P.G. R.). Os casos duvidosos foram definidos por um quarto pesquisador (L. A. S. P.).

## RESULTADOS

Os resultados observados estão apresentados nas Tabela 1 e 2.

**Tabela 1 – Resultados do Teste da Benzidina**

SUPORTES	BENZIDINA							
	Controle	1:10	1:50	1:100	1:500	1:1.000	1: 5.000	1: 10.000
POROSOS								
TECIDO	+++	+	-	-	-	-	-	-

SOLO (TERRA)	+++	++	+	-	-	-	-	-
MADEIRA	+++	+++	+	+	-	-	-	-
<b>NÃO POROSOS</b>								
PLÁSTICO	+++	+++	++	++	++	++	+	-
VIDRO	+++	+++	+++	++	++	++	+	-

LEGENDA: FORTEMENTE POSITIVO: +++ // POSITIVO: ++ // FRACAMENTE POSITIVO:+ //NEGATIVO: -.

**Tabela 2 – Resultados do Teste da Fenolftaleína**

SUPORTES	FENOLFTALEÍNA							
	Controle	DILUIÇÕES						
<b>POROSOS</b>		1:10	1:50	1:100	1: 500	1:1.000	1: 5.000	1: 10.000
TECIDO	+++	++	-	-	-	-	-	-
SOLO (TERRA)	+++	++	+	-	-	-	-	-
MADEIRA	+++	+++	++	++	-	-	-	-
<b>NÃO POROSOS</b>								
PLÁSTICO	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+
VIDRO	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-

LEGENDA: FORTEMENTE POSITIVO: +++ // POSITIVO: ++ // FRACAMENTE POSITIVO:+ //NEGATIVO: -.

## DISCUSSÃO

De acordo com Arbenz, (1988) o sangue sendo um fluido líquido quando instilado em superfície porosa pode se infiltrar nos suportes dificultando sua identificação.

Segundo Cox (1990; 1991) a identificação do sangue no tecido depende da composição de sua fibra, que o torna mais ou menos poroso variando assim sua absorção. Em seu experimento ele encontrou resultado positivo até 1:10.000 com a Benzidina. Já no presente trabalho em que foi utilizado o tecido de algodão (100%), cuja porosidade é muito grande, a positividade observada foi até 1:10 com ambos os reagentes, sendo que para a Benzidina o resultado foi FRACAMENTE POSITIVO e para Fenolftaleína foi POSITIVO.

Castro et al; (2005) afirmam que no solo a porosidade varia de acordo com sua estrutura, dependendo do arranjo das partículas, formando os poros que vão reter água ou ar. A porosidade do solo interfere na sua permeabilidade e absorção. Assim se explica o resultado do trabalho neste suporte, em que foi encontrada positividade até 1:50 (Fig. 2), sendo o resultado apresentando FRACAMENTE POSITIVO em ambos os testes.

Gloria et al; (2006) consideram a madeira um suporte poroso, pois contém elementos crivados, que são células lignificadas, constituindo os poros da madeira, onde o sangue será absorvido. A partir dos resultados presentes nesse trabalho, segundo o critério utilizado, pôde-se observar a ocorrência de positividade na madeira, com ambos os reagentes, até a diluição 1:100. No Teste da Fenolftaleína o resultado obtido foi POSITIVO e no Teste da Benzidina, FRACAMENTE POSITIVO.

Em suportes não porosos (impermeáveis), o sangue permanecerá na superfície em forma de “crosta” aderido à mesma, como no plástico e no vidro. Superfícies sem porosidade facilitam uma maior quantidade de sangue retido no esfregaço, facilitando sua identificação. Por isso o trabalho apresentou maior sensibilidade nesses suportes, identificando a presença de sangue em elevadas diluições. No Teste da Fenolftaleína, o vidro apresentou resultado FRACAMENTE POSITIVO até 1:1 000 e no plástico FRACAMENTE POSITIVO até 1:10.000. Já no Teste da Benzidina, ambos os suportes mostraram resultados fracamente positivo até 1:5 000.

Alguns trabalhos pesquisados utilizaram diversas técnicas, em variados suportes obtendo resultados superiores aos encontrados no presente trabalho, como no artigo descrito por Webb et al; (2006) e por Johnston et al; (2008), observando sensibilidade na Fenolftaleína até 1:10.000.

Chemello (2007), descreve que a Fenolftaleína alcança até 1:1.000.000 e a Benzidina até 1: 2.000.000. Virkler et al; (2009), citam que a Fenolftaleína atinge até 1:10.000.

Em nossa pesquisa não foram encontrados artigos referentes à identificação de sangue em suportes como terra e madeira, com a utilização destes reagentes (Fenolftaleína e Benzidina).

## **CONCLUSÕES**

- 1\_ Ambos os reagentes mostraram forte positividade no teste de controle (sangue sem diluição) em todos os materiais de suporte testados.
- 2\_ Para os materiais não porosos, plástico e vidro, ambos os reagentes apresentaram sensibilidade satisfatória (fenolftaleína mostrou positividade no plástico até a diluição 1:10.000).

- 3\_ Ambos os reagentes mostraram razoável sensibilidade na madeira.
- 4\_ Resultados menos expressivos se revelaram para o solo e tecido de algodão.
- 5\_ Considerando o baixo custo e a praticidade de ambos os Testes (Fenolftaleína e Benzidina) consideramos que eles ainda tenham importante aplicação nos protocolos de rotina pericial forense.

## REFERÊNCIAS

Antunes, M. et al. pH do Solo: Determinação com indicadores Ácido-Base no Ensino Médio. Química Nova na Escola. 2009 Jul, 10(10):1-5.

Arbenz, G.O. Medicina legal e antropologia forense. Rio de Janeiro: Atheneu; 1988.

Arruda, F.R. Determinação de benzidina nos rios que recebem a carga de efluentes das indústrias têxteis da cidade de São Carlos. São Paulo: Universidade de São Paulo – Instituto de Química de São Carlos – Programa de Pós-Graduação em Química Analítica. 2008.

Castro, P.R.C; Kluge, R.A; Peres, L.E.P. Manual de Fisiologia Vegetal: Teoria e Prática. Piracicaba: Agronômica Ceres; 2005.

Chemello, E. Química Virtual [Internet]. 2007. [citado 20 jul 2008]. Disponível em: [http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2007jan\\_forense2.pdf](http://www.quimica.net/emiliano/artigos/2007jan_forense2.pdf).

Cox, M. A Study of the Sensitivity and Specificity of Four Presumptive Tests for Blood. Journal Forensic Sciences. 1991 Sept, 36(5):1503-11.

Cox, M. Effect of Fabric Washing on the Presumptive Identification of Bloodstains. Journal Forensic Science. 1990 Nov, 35(6): 1335-41.

Culliford, B.J; Nikolls, L.C. The benzidine test. Journal of Forensic Sciences. 1964, 9(1):175-91.

Dorea, L.E.C; Stumovoll, V.P; Quintela, V. Criminalística. 3ª. ed. Campinas: Millenium; 2006.



Ferreira, A.B.H. Novo Aurélio Século XXI - O Dicionário da Língua Portuguesa. 3ª. ed. São Paulo: Nova Fronteira; 1999.

Garner, D.D et al. An Evaluation of Tetramethylbenzidine as a Presumptive Test for Blood. Journal Forensic Science. 1976 Jan, 21(4):816-21.

Glória, B.A; Guerreiro, S.M.C. Anatomia Vegetal. 2ª. ed. Viçosa: UFV; 2006.

Higaki, R.S; Philip, W.M.S. A study of the sensitivity, stability and specificity of phenolphthalein as an indicator test of blood. Canadian Society of forensic Medicine Journal. 1976, 9(3): 97-102.

Rodrigues, F.P.M. Fenolftaleína [Internet]. 2009. [citado 20 set 2009]. Disponível em: <http://www.peritos.eng.br/ferramentas/fenolftaleina>.

Rudin, N; Inman, K. The Kastle-Meyer Test [Internet]. 2003. [16 jan 2009]. Disponível em: <http://www.forensicdna.com>.

Virkler, K; Lednev, K. Analysis of body fluids for forensic purposes: From laboratory testing to non-destructive rapid confirmatory identification at a crime scene. Forensic Science International. 2009 Mar, 188:1-17.

Webb, J.L; Creamer, J.I; Quickender, T.I. A comparison of the presumptive luminal test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. Luminescence Journal. 2006 Apr, 21:214 -20.