

Deteccão e análise de sangue humano em cena de crimes sexuais simulados

Detection and analysis of human blood in a scene of simulated sexual crimes

DOI:10.34117/bjdv7n2-603

Recebimento dos originais: 20/01/2021

Aceitação para publicação: 20/02/2021

Aderaldo Viegas da Silva

Mestrando em Ciências da Saúde pela Universidade Federal do Amapá. Especialista em Gestão e Docência no Ensino Superior. Bacharel em Ciências Biológicas. E-mail: aderaldosilva14@gmail.com. Universidade Federal do Amapá, Endereço: Rod. Juscelino Kubitschek, km 02 - Jardim Marco Zero, Macapá - AP, 68903-419

Brenda Raiana Mecês do Rêgo

Farmacêutica. E-mail: brendaraianamerces@gmail.com. Universidade Federal do Amapá, Endereço: Rod. Juscelino Kubitschek, km 02 - Jardim Marco Zero, Macapá - AP, 68903-419

Maria Flavia de Souza Bezerra

Farmacêutica. E-mail: bsouzaflavia@gmail.com. Universidade Federal do Amapá, Endereço: Rod. Juscelino Kubitschek, km 02 - Jardim Marco Zero, Macapá - AP, 68903-419

Rafael Lima Resque

Doutor em Genética e Biologia Molecular. Mestre em Genética e Biologia Molecular. Graduação em Farmácia. Professor do Magistério Superior na Universidade Federal do Amapá. E-mail: rafaelresque@gmail.com. Universidade Federal do Amapá, Endereço: Rod. Juscelino Kubitschek, km 02 - Jardim Marco Zero, Macapá - AP, 68903-419

Madson Ralide Fonseca Gomes

Doutor em Ciências Farmacêuticas. Mestre em Química. Graduação em Farmácia-Bioquímica. Professor do Magistério Superior da Universidade Federal do Amapá. Pesquisador do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia Forense (INCT Forense), Porto Alegre, RS – Brasil. E-mail: madson@unifap.br. Universidade Federal do Amapá, Endereço: Rod. Juscelino Kubitschek, km 02 - Jardim Marco Zero, Macapá - AP, 68903-419

RESUMO

O estupro é um crime que, muitas vezes, não deixa vestígios ou estes desaparecem após um determinado período de tempo dificultando as investigações criminais. Desta forma, é necessário a utilização de técnicas forenses de detecccão que contribuam com a justiça e auxiliem na elucidação dos fatos na dinâmica do crime. O objetivo deste trabalho é, através de uma pesquisa descritiva e laboratorial, avaliar o tempo de detecccão de manchas de sangue em três tipos de tecidos utilizando os testes de *Kastle-Meyer* e *HemDirect®*, no período de 50 dias, em um intervalo de 3 dias entre cada teste e por fim realizar

extração de DNA do fluido, utilizando como métodos de extração o Clorofórmio em manchas envelhecidas de 12 dias e Chelex 100 em manchas envelhecidas de 50 dias, ao fim realizando a amplificação do DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para obtenção de perfil genético.

Palavras-chave: Ciências Forenses; Biologia Forense; Exames Forenses; Biologia Molecular; DNA.

ABSTRACT

Rape is a crime that often leaves no trace or disappears after a certain period of time, making criminal investigations difficult. Thus, it is necessary to use forensic detection techniques that contribute to justice and assist in the elucidation of the facts in the dynamics of crime. The objective of this work is, through a descriptive and laboratory research, to evaluate the time of detection of blood stains in three types of tissues using the Kastle-Meyer and HemDirect® tests, in the period of 50 days, in an interval of 3 days between each test and finally perform DNA extraction from the fluid, using as extraction methods Chloroform in aged patches of 12 days and Chelex 100 in aged patches of 50 days, at the end performing DNA amplification by PCR (Chain Reaction) Polymerase) to obtain a genetic profile.

Keywords: Forensic Sciences; Forensic Biology; Forensic exams; Molecular biology; DNA.

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOLOGIA FORENSE

A Biologia Forense é um ramo das Ciências Forenses que consiste na análise de vestígios biológicos. Estes vestígios incluem fluidos biológicos como sangue, sêmen, saliva, urina, vômito, entre outros, podendo ser incluído neste conceito fluídos de qualquer organismo vivo que contribua para a investigação criminal. Dentre as principais áreas da Biologia Forense estão: Hematologia Forense, Entomologia Forense, Citologia Forense, Tricologia Forense e Genética Forense. Essas vertentes da Biologia Forense são de suma importância para a elucidação de crimes, uma vez que auxiliam na obtenção de resultados na dinâmica de fatos quando ocorre um crime (DIAS-FILHO; FRANCEZ, 2016; SILVA *et al.* 2019).

Visto que em uma cena de crime o sangue é um dos vestígios mais priorizados, devido ao seu extenso tempo de detecção e à carga genética, a Hematologia Forense, dividida em Identificadora e Reconstutora, estuda as variáveis do sangue. Dentre as características deste, as mais importantes no âmbito forense são: sistema ABO e Rh, enzimas das células vermelhas, hematomas, contusões, rigor mortis, entre outros padrões sanguíneos (MACIEL, 2014).

As manchas de sangue estão inclusas primordialmente na hematologia forense em virtude da importância que representam no contexto das investigações periciais envolvendo locais de morte violenta. Sua análise na cena de um crime permite inferir desde o tipo de arma até a quantidade de golpes desferidos contra a vítima; permite elucidar sobre o ponto de convergência dos impactos e o posicionamento dos indivíduos envolvidos no evento; sobre os tipos de lesões e o tempo decorrido dos fatos; permite estabelecer a dinâmica dos acontecimentos e até mesmo a identificação da vítima e a autoria do delito, por meio de técnicas de biologia molecular (BOTTEON, 2018).

Os padrões de manchas de sangue podem fornecer informações valiosas sobre os eventos que levaram à sua criação, caso examinados por um analista qualificado. A informação obtida pode, então, ser utilizada para a reconstrução de uma cena de crime e para a avaliação de depoimentos de testemunhas e participantes do crime (PESCHEL *et al.*, 2011).

Normalmente o sangue não é detectado a olho nu devido, principalmente, a tentativa do autor de limpar a cena do crime. Nesses casos um dos testes mais utilizados é o Luminol. Neste teste podemos observar a emissão da luz (quimiluminescência) quando uma solução contendo o Luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-phthalazine-dione) e o peróxido de hidrogênio entram em contato com o sangue, utilizando o ferro presente no grupo 'heme' da hemoglobina como agente catalisador, causando uma reação de quimiluminescência, todavia o Luminol apresenta efeitos negativos na tipagem de DNA e toxicidade devido aos componentes químicos necessários para que a reação de quimiluminescência ocorra (MIRANDA *et al.*, 2016).

Após a etapa da identificação genética dos vestígios encontrados no local do crime, torna-se necessário compará-lo com possíveis suspeitos e vítimas. Nesse sentido a Genética Forense atua com seus conhecimentos e técnicas de genética e de biologia molecular, auxiliando desde a investigação e identificação de cadáveres, suspeitos, até a elucidação de casos de paternidade. As amostras de DNA para análise podem ser obtidas de sangue, sêmen, ossos, fio de cabelo, saliva, urina e dentes (ESPÍNDULA, 2006).

1.2 LOCAL DE CRIME

O crime, em termos jurídicos, é toda conduta típica, antijurídica (ou ilícita) e culpável, praticada por um ser humano. O local de crime é o foco do trabalho da perícia criminal, onde iniciam-se as investigações, sendo a representação da área onde os vestígios foram gerados. Representa também o espaço do qual podem ser extraídas várias

informações sobre o ocorrido: da conduta ao autor questionado. Tais dados podem se apresentar de maneira explícita ou não (VELHO; FACHONE, 2007).

Devido à multicausalidade e complexidade dos processos de produção e reprodução da violência na sociedade brasileira é importante padronizar a análise do local do crime, e uma forma de executar tal padronização é classificar as cenas pelo tipo de crime que ocorreu: "cena de assassinato", "cena de estupro" e assim por diante. Uma única "cena de violência sexual" pode abranger diversas situações, de violências únicas a múltiplas, cobrindo mais de uma área. (HOUCK, 2006).

A preservação do local de crime é de suma importância para a realização dos exames periciais e, principalmente, para assegurar a cadeia de custódia e confiabilidade das provas produzidas. Porém, mesmo no local do caso em que a preservação se encontra prejudicada, é possível avaliar a dinâmica do fato e distinguir vestígios de sangue acidentais que não foram relacionados com a ocorrência, em virtude dos distintos padrões de formação das manchas (BOTTEON, 2018).

Em casos de crimes sexuais, quando a ejaculação não ocorreu no corpo da vítima, as manchas seminais deixadas na cena do crime, como em lençóis da cama, vestimentas, roupas íntimas, toalhas, piso, vegetação e demais substratos, podem ser essenciais na busca de evidências. Tais manchas se mostram úteis na prática forense, confirmando que os métodos de análise hoje empregados podem ser usados para detecção e levantamento do perfil genético do acusado (NAKANISHI *et al.*, 2014).

Em crimes graves, na maioria das vezes, o primeiro passo é avaliar a cena do crime com o intuito de proteger itens e possíveis evidências que servirão como prova. Por isso é importante que esta investigação seja feita da forma precisa, dando ao investigador uma ideia aproximada do que ocorreu. A partir desta reconstrução obtêm-se evidências e é possível elucidar quais os traços são relevantes e os materiais que devem ser protegidos como, por exemplo, amostras de sangue que são tiradas para teste de DNA (VAN EDEN *et al.*, 2016). A Ciência Forense na atuação do processamento de cenas de crime tem seu foco em prevenir contaminação da cena e buscar maneiras apropriadas para proteger os diferentes tipos de evidências físicas (SAFERSTEIN, 2007).

De acordo com Resnikoff *et al.* (2015) uma investigação de cena de crime pode ser expressa ao longo de três processos que exigem muitas decisões de natureza diferente a serem feitas, a saber: a intervenção, desde a constatação de que um crime ocorreu até a chegada ao local (se a cena deve ser assistida por examinadores de cena de crime); a

investigação da cena do crime em si, levando à detecção, observação e coleta de material; e a exploração do material coletado.

1.3 CRIMES SEXUAIS

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2013) a violência e/ou abuso sexual compreende diversos tipos de atos, incluindo tentar ou forçar relações sexuais, contato sexual indesejado, forçar menor de 18 anos ou adultos a participar de um ato sexual sem seu consentimento, comentários sexuais indesejados, mutilação genital, abuso sexual de menores, iniciação de sexo forçado, prostituição forçada e tráfico de relações sexuais.

Krug *et al.* (2002) definem violência sexual como atos, tentativas ou investidas sexuais indesejadas, com uso de coação e praticados por qualquer pessoa, independentemente de sua relação com a vítima e em qualquer contexto, seja doméstico ou não. Incluindo atos como estupros (penetração forçada) dentro do casamento, namoro ou cometida por estranhos (HEISE; ELLSBERG, 1999).

De acordo com o Art. 213 do Código Penal Brasileiro, estupro é considerado o ato de causar qualquer tipo de constrangimento, mediante violência ou ameaça, obrigando a vítima a ter conjunção carnal ou ato libidinoso, sujeito a pena de reclusão de seis a dez anos.

No Brasil, em 2019, foi registrado um total de 66.123 casos de estupros e estupros de vulnerável, isso resulta em 1 estupro a cada 8 minutos. O estado que contou com maiores taxas por 100.000 habitantes de casos confirmados foi Mato Grosso do Sul, com 65,4%, dados esses mostrados pelo 14º Anuário de Segurança Pública, publicado em 2020.

Portanto, o presente trabalho objetiva-se análise e a influência do tempo na detecção de sangue em vestígios de crimes sexuais simulados.

2 METODOLOGIA

O presente trabalho trata-se de um estudo descritivo e laboratorial, visando obtenção dos resultados através de experimentos laboratoriais controlados. O trabalho foi submetido ao comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Amapá sendo aprovado sob nº CAAE 18342619.3.0000.0003.

Os 3 materiais utilizados neste estudo foram: toalha de rosto 100% algodão, cueca 90% poliéster/10% elastano e calcinha de renda (FIGURA 1). Os testes foram realizados nos seguintes intervalos de tempo: 1 dia, 3 dias, 6 dias, 9 dias, 12 dias, 15 dias, 18 dias,

21 dias, 24 dias, 27 dias, 30 dias, 33 dias, 36 dias, 39 dias, 42 dias, 45 dias e 50 dias, sendo o *Kastle-Mayer* realizado em todos os dias de testes e o *HemDirect*[®] no período de 1 dia, 3 dias, 12 dias, 18 dias, 27 dias, 36 dias, 45 dias e 50 dias.

Foi recrutado um voluntário para a doação da amostra de sangue, através da coleta por punção venosa. Sendo coletados 40mL do indivíduo após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os tipos de peças de tecidos foram escolhidos por serem os mais comumente encontrados em uma possível cena de crime sexual. As manchas nos tecidos não seguiram um padrão, sendo feitas de forma aleatória, buscando simular a realidade de uma cena de crime sexual.

O teste *SARATEC HemDirect*[®] foi aplicado conforme o protocolo operacional do fabricante. *Kastle-Mayer* foi aplicado conforme protocolos periciais.

A extração de DNA das manchas de sangue fora feita utilizando Clorofórmio em manchas envelhecidas de 12 dias (SAMBROOK; 1989). Chelex 100 em manchas envelhecidas de 50 dias (DIAS-FILHO; FRANCEZ, 2016).

Depois de preparadas, as amostras foram armazenadas em ambiente laboratorial (17°C-24°C), sendo que em todos os dias de realização dos testes a temperatura e umidade do local foram controladas.



Figura 1: Representação das manchas de sangue (a) Calcinha de renda, (b) cueca 90%poliéster e 10%elastano; (c) toalha de algodão.



Figura 2: Teste SERATEC *HemDirect*[®]

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 HEMDIRECT[®]

Quadro 1: Resultado do teste *HemDirect*[®]

| Dia de teste | Resultado |
|--------------|-----------|
| 1° | + |
| 3° | + |
| 12° | + |
| 18° | + |
| 27° | + |
| 36° | + |
| 45° | + |
| 50° | + |

Legenda: + resultado positivo; - resultado negativo

De acordo com o quadro acima. O *HemDirect*[®] se mostrou positivo em todos os dias de testes.

Foi realizado um imunoenensaio com três testes imunocromatográficos disponíveis no mercado para identificação de sangue humano, sendo eles: Seratec *HemDirect*[®] *Hemoglobin*, *ABAcad*[®] *HemaTrace*[®] e *RSID*[™]-*Blood*. O imunoenensaio mostrou que todos os testes possuem seus lados positivos e negativos, mas, de forma geral, o estudo mostrou que o teste *HemDirect*[®] *Hemoglobin* e o *ABAcad*[®] *HemaTrace*[®], são os mais sensíveis para detecção de manchas de sangue, mostrando resultado positivo para sangue envelhecidas de 19 a 28 anos, armazenadas à temperatura ambiente. Os testes também mostraram possuir especificidade necessária para aplicação forense, mostrando resultados negativos quando utilizado com amostras de saliva excluindo, assim, o risco de falsos positivos por contaminação cruzada (HORJAN *et al.*, 2016).

Para aplicação forense, o produto apresenta vantagens como: facilidade de uso, podendo ser utilizado diretamente na cena ou no laboratório; alta sensibilidade, sendo capaz de reagir positivamente a amostras contendo 20ng/mL; resultados rápidos em cerca de 5 a 10 minutos; específico para D-dímero e hemoglobina humana. O dímero D é um produto de degradação da fibrina que resulta da fibrinólise, formado no sangue. Durante a menstruação ocorre maior degradação fibrinolítica, sendo o dímero D um marcador para sangue menstrual, que permite sua distinção. Sendo assim, é de suma importância em casos de estupro, já que uma mulher pode estar no período menstrual durante a realização dos testes, ajudando a diminuir as chances de um falso-positivo, conforme especifica o fabricante.

De acordo com MISENCHIK *et al.* (2007), o teste SERATEC *HemDirect*[®] é eficaz para a detecção de sangue humano no campo forense. Foram realizados ensaios clínicos com amostras de sangue obtidas em lâminas de 28 animais, entre eles os das seguintes espécies: Chimpanzé (*Pan troglodytes*); Gorila (*Gorila gorila*); Orangotango (*Pongo pygmaeus*); Macaco-Uivador-Preto (*Alouattacaraya*); Babuíno (*Papio hamadryas*); Furão (*Mustela putorius*). O teste é específico para hemoglobina humana, mas mostrou reatividade por sangue de primatas e furões, que apresentam uma sequência de aminoácidos em comum na cadeia alfa globina, sendo que esta sequência pode ser responsável pela produção de anticorpos monoclonais, que são os principais componentes de testes Imunocromatográfico.

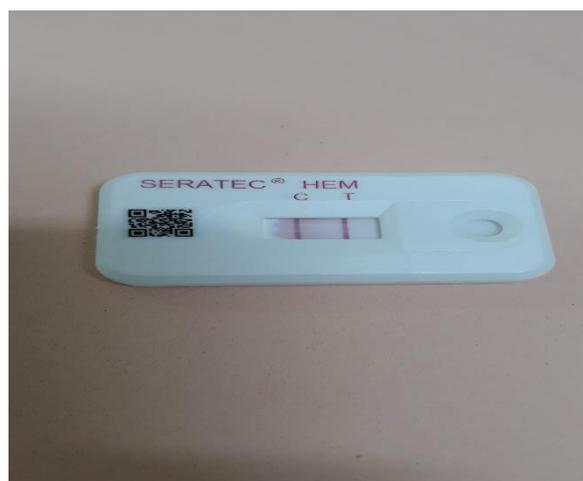


Figura 3: Teste positivo do SERATEC *HemDirect*[®]

3.2 KASTLE-MEYER

Quadro 2: Resultado do teste *Kastle-Meyer*

| | 100% Algodão (Toalha de rosto) | Renda (Calcinha) | 90% Poliéster/10% Elastano (Cueca) |
|------|-----------------------------------|---------------------|---------------------------------------|
| Dias | Resultado | Resultado | Resultado |
| 1° | + | + | + |
| 3° | + | + | + |
| 6° | + | + | + |
| 9° | + | + | + |
| 12° | + | + | + |
| 15° | + | + | + |
| 18° | + | + | + |
| 21° | + | + | + |
| 24° | + | + | + |
| 27° | + | + | + |
| 30° | + | + | + |
| 33° | + | + | + |
| 36° | + | + | + |
| 39° | + | + | + |
| 42° | + | + | + |
| 45° | + | + | + |
| 50° | + | + | + |

Legenda: + resultado positivo; - resultado negativo

De acordo com o quadro acima, todas as amostras foram positivas para o *Kastle-Meyer* (KM).

Um experimento teve o objetivo de determinar a especificidade da reação da fenolftaleína em relação à benzidina e a substâncias das quais se espera possuírem atividade peroxidase oxidativa, que podem produzir algum tipo de reação com benzidina. No método foram utilizados quatorze tipos de vegetais, leite, produtos de limpeza domésticos e vários tipos de papéis também foram testados. Essas substâncias foram testadas diretamente em manchas de 1 dia e manchas de 4 dias e em extratos de manchas envelhecidas durante 9 semanas. Um fato importante ocorreu: nas manchas não foram obtidos falsos positivos com a fenolftaleína isso pode ser devido a um maior grau de especificidade quando comparado à benzidina. Além disso, os três estágios do teste de perborato de sódio foram cerca de dez vezes mais sensíveis ao sangue em solução do que a benzidina. Portanto, espera-se um resultado positivo do reagente fenolftaleína nos testes de extração de substâncias que deram positivo com a benzidina se a especificidade aumentada foi devido a sensibilidade. Isso pode ser devido à forte alcalinidade da fenolftaleína que serve para reduzir ou eliminar a interferência de plantas peroxidases,

por preferir um substrato ácido. Para o teste direto realizado nas manchas secas, os testes com fenolftaleína foram menos sensíveis que a benzidina, porém, suficientemente sensíveis para fins de triagem quando não é requerido detecção de sangue além de diluições de 10⁻³ (CULLIFORD, 1971).

O teste de KM pode ser um pouco mais sensível que o teste leucomalaquita verde (LMG). O teste de manchas úmidas ou secas não revelou diferenças de sensibilidade na primeira vez em que foi empiricamente testado. Isso demonstra que, em situações de caso esperadas, a análise de uma mancha úmida ou seca não deve ter impacto na sensibilidade do KM. Teorizaram que o teste realizado em manchas secas pode afetar significativamente a sensibilidade observada de um teste com diluição dos reagentes, como ocorreria em uma amostra molhada. Isso pode ser verdadeiro se o teste se der em um grande volume de líquido (como uma cubeta), mas, em termos práticos, como demonstrado neste estudo, não terá impacto nos resultados obtidos (GRODSKY *et al.* 1951). Webb, Creamer e Quickenden (2006) evidenciaram esta maior sensibilidade do KN em comparação ao LMG ao descrever a diluição máxima detectável de hemoglobina, com as diluições relativas à concentração de 150g/L, de 1: 100.000 para o KN quando comparado a 1:1.000 para o reagente LMG. Além de um tempo de detecção para manchas de sangue envelhecidas superiores a 7 semanas para estes reagentes.

Os resultados dos testes podem ser facilmente mal interpretados devido à presença de substâncias muito comuns, itens como agentes de limpeza, alimentos ou chá. Embora técnicas inovadoras como o perfil de RNA e a análise de metilação do DNA possam superar algumas das limitações do produto químico convencional, os autores estão convencidos de que tais novos testes não podem substituir completamente os testes presuntivos convencionais no futuro próximo. Isso se deve aos altos custos das técnicas e falta de kits comercialmente disponíveis, bem como orientações sobre qualidade e interpretação de problemas. Diferenças nas sensibilidades provavelmente são causadas por diferenças nas concentrações de reagentes, métodos de preparação de amostras, reagentes e resultados e no tipo de material que contém o sangue (KIND, 1956). Além disto, em cenas de crimes sexuais o sêmen é outro fluido de notável importância para os fatos, onde testes de orientação semelhante aos de sangue são aplicados e pode haver ocorrência de resultados negativos, principalmente ao considerar a possibilidade de uma lavagem no substrato ao qual a mancha seminal foi encontrada, assim podendo haver resultado negativo para um teste presuntivo de sêmen, mas em testes mais específicos e

na obtenção do perfil genético obtêm-se resultado positivo (CROWE; MOSS; ELLIOT, 2000).

Em um teste de sensibilidade, garrafas autoclavadas (125°C por 20 min) e água destilada foram utilizadas. A água foi medida usando um cilindro graduado e sangue foi adicionado usando uma pipeta. Diferentes concentrações baixas de sangue foram obtidas fazendo uma solução estoque de sangue e água destilada. Soluções de 1: 10.000; 1: 100.000; 1: 1.000.000; 1: 5.000.000; e 1: 10.000.000 foram preparadas. Cada uma das soluções de sangue diluído para cada um dos reagentes presuntivos testados fora colocada em um conjunto de 25 pedaços de papel de filtro e 1 cm. Os pedaços de papel de filtro foram então removidos e secados por 72 h. Cada um dos pedaços de papel de filtro foi, então, testado com o reagente correspondente para verificar se o sangue presente foi detectável. Os reagentes foram adicionados diretamente em dois pedaços de papel filtro em 1 cm. O tempo necessário para o reagente registrar um resultado positivo foi determinado e registrado. Os testes foram considerados negativos se os reagentes não reagirem dentro de 4 minutos após a exposição ao papel de filtro manchado de sangue. O controle positivo da fenolftaleína (KM) reagiu dentro de alguns segundos de aplicação da água, com uma cor rosa aparecendo em local da deposição de sangue. O controle negativo não reagiu em adição da água; no entanto, houve uma reação após vários minutos (mais do que os 4 minutos cronometrados) com uma cor rosa se desenvolvendo nas bordas da área de deposição do reagente. O reagente fenolftaleína registrou reação positiva para todas as amostras com um fator de diluição de 1: 10.000. As amostras viraram rosa após 45s da introdução do reagente e da água. Em um fator de diluição de 1: 100.000, três das 25 amostras apresentaram uma reação: dois deles em 1m e 30s e o terceiro em 2m e 30s. O reagente fenolftaleína não mostrou reação com fatores de diluição de 1: 1.000.000, 1: 5.000.000 ou 1: 10.000.000 dentro dos 4m da experimentação cronometrada demonstrando, assim, alta sensibilidade (TOBE; WATSON; DAEID, 2007).



Figura 4: Teste *Kastle-Meyer* representando resultado positivo em todos os tecidos.

3.3 EXTRAÇÃO DE DNA COM CLOROFÓRMIO E CHELEX 100

De acordo com a Figura 5, pode-se observar que foi possível obter DNA das amostras 4, 5 e 6 utilizando o Fenol Clorofórmio como método de extração em amostras de 12 dias, sendo este resultado negativo quando utilizado o Chelex 100, (amostras 2 e 3), em amostras de 50 dias.

Com esta técnica é possível extrair uma quantidade razoável de DNA de boa qualidade para ser usado em procedimentos como a PCR. Com a luminosidade apresentada pelas bandas de DNA, foi possível mostrar que uma pequena quantidade de DNA da amostra foi extraída (Fig 5). Porém essa técnica apresenta algumas desvantagens, como os múltiplos passos a serem seguidos e a demora no tempo de procedimento, além da utilização de substâncias potencialmente prejudiciais à saúde, pelo fato de serem extremamente voláteis e irritantes para as mucosas (OLIVEIRA et al., 2007)

Aparentemente, o método de purificação com fenol clorofórmio tem resultado na recuperação e purificação satisfatórias em comparação com outras técnicas (CAO, 2003). No estudo de Mesquita *et al.* (2001), foi feita uma comparação de três métodos de purificação utilizando-se fenol-clorofórmio com proteinase K, sílica sem proteinase K e sílica com proteinase K. Fenol-clorofórmio mostrou ser eficiente na purificação, resultando em um material de ótima qualidade para PCR. Evidencia-se em seu trabalho que a metodologia de fenol-clorofórmio é um excelente método para extração de DNA de tecidos emblocados em parafina, assim como o melhor método avaliado para extração de espécimes de células bucais.

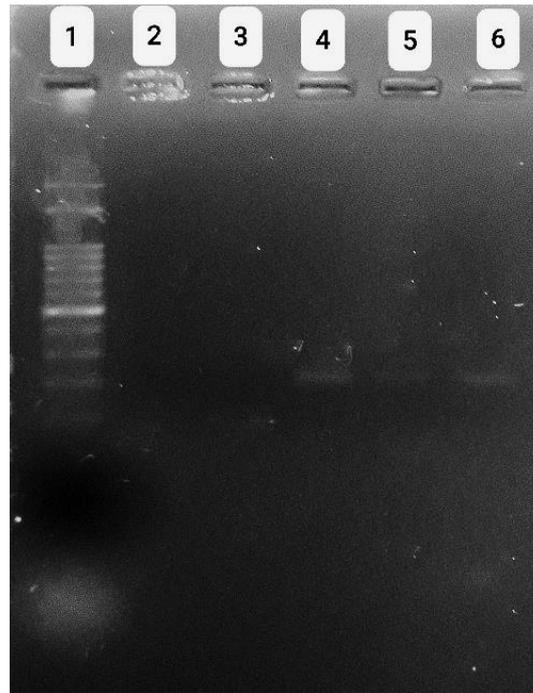


Figura 5: Eletroforese em gel de agarose 3% mostrando fragmentos de 107 pb amplificado pela PCR em amostras de mancha de sangue. Onde: 1) Ladder; 2) Chelex; 3) Chelex; 4) Clorofórmio; 5) Clorofórmio; 6) Clorofórmio

O Chelex 100 é um método barato e simples e bastante eficiente na extração de DNA, o DNA extraído por esse método contém menos inibidores de PCR comparado a outros métodos de extração. Por ser um método bastante simples, com o número reduzido de passos na preparação da amostra em relação a outros testes, a chance de contaminação por DNA induzida pela mistura das amostras ou pelo operador é pequena (WALSH; METZGER; HIGUCHI, 1991).

Em um estudo realizado por Kobilinsky (1992) foram avaliadas as condições de armazenamento em longo período de amostras de evidências de DNA e, embora esta seja uma das biomoléculas mais estáveis, percebeu-se que amostras biológicas a diferentes temperaturas e por quantidades de tempo podem ser afetadas de forma significativa quanto a sua capacidade de isolar DNA (BUDOWLE, 1990). O DNA em testes realizados com papel filtro pode ser extraído e amplificado dentro um período de 8 meses em condições de umidade relativa variando de 50% à 100% em uma temperatura de 45°C, entretanto, há a possibilidade do crescimento microbiano em uma umidade relativa de 100% além de uma queda na estabilidade de detecção de pares de base do DNA nas temperaturas de 55°C e 65°C e até na impossibilidade de obtenção de pares de base a um período superior de um mês nestas temperaturas (DISSING; SØNDERVANG; LUND, 2010).

Várias técnicas de extração de DNA foram avaliadas com base em sua capacidade de produzir DNA a partir de manchas de sangue testados em vários substratos diferentes. Foram utilizados no estudo dois métodos de extração comumente usados na ciência forense: Chelex 100 e o método orgânico (COMEY, 1991).

Em outro estudo o DNA foi extraído de amostras de tecidos expostos a condições ambientais diversas. Por exemplo, amostras recuperadas de acidentes de aeronave. Foram 24 amostras de tecido e 20 cartões de referência para manchas de sangue, a fim de confirmar identificações usando análise de DNA. Utilizando o Chelex 100, a extração foi realizada em todas as amostras, sendo que 60% renderam DNA suficiente para obter resultados. Os 40% restantes exigiram uma extração orgânica para obtenção de resultados. A recuperação do DNA foi mínima. Mais de 50% dos extratos continha <100ng de DNA. Isso pode ser explicado pela natureza degradada do DNA. Uma das desvantagens do método Chelex 100 é o tamanho limitado da amostra. Se a amostra contiver inibidores contaminantes, aumentar o tamanho da amostra aumenta a concentração de inibidores e contaminantes. Uma alternativa seria adicionar o Chelex 100 ao extrato orgânico para ligar os contaminantes que possam estar presentes no extrato (WILLARD, 1998). As diferentes técnicas e o avanço nas ciências forenses possibilitam melhores resultados conforme o tipo de amostras processadas e até na quantidade de DNA que ali se encontra. Para quantidades pequenas de DNA o método Chelex se mostra eficaz no desfecho final, porém com quantidades maiores, métodos utilizando robôs podem apresentar maior eficiência e menores chances de contaminação do DNA (PHILLIPS; McCALLUM; WELCH, 2012).

Higugchi (1989) demonstrou que compostos de porfirina e os derivados do grupo heme no sangue inibem a PCR. Sugerindo que esses anéis de porfirina sejam lavados durante a primeira lavagem ou podem se ligar à própria matriz de esferas do Chelex 100. Lavagens adicionais podem ser necessárias para livrar amostras do excesso de heme e inibidores. Substâncias como água, bile, Bilirrubina, CaCl₂, EDTA, FeCl₃, Hemina e Heparina podem também ocasionar inibição da PCR, conforme achados de Al-Soud e Radstrom (2001).

Estudos anteriores com o *HemDirect*[®], feito por HORJAN, et al. 2016, demonstram esse achado, mostrando resultados positivos para manchas de sangue envelhecidas de 19 a 28 anos. Já com *Kastle-Meyer* foram obtidos resultados positivos de manchas envelhecidas em até 9 semanas (CULLIFORD, 1971). Higuchi (1989)

demonstrou que compostos de porfirina e os derivados do grupo heme no sangue inibem a PCR, o que poderia explicar o resultado negativo obtido.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo mostram que os testes *Kastle-Meyer* e *HemDirect*[®], são eficazes para detecção de manchas de sangue em cenas de crimes, assim colaboram para a investigação pericial, sendo capazes de reagir positivamente a manchas de sangue envelhecidas em até 50 dias nos tecidos utilizados.

Para extração de DNA utilizando fenol clorofórmio, o estudo apresentou resultados positivos em amostras de manchas de sangue em tecidos envelhecidas de 12 dias, apresentando uma baixa luminosidade das bandas, caracterizando uma pequena quantidade de DNA extraída. De acordo com a literatura essa metodologia apresenta um material de grande qualidade para PCR.

A extração de DNA com Chelex 100 em amostras de 50 dias obtiveram resultados negativos. Estudos disponíveis na literatura científica demonstram a sensibilidade e especificidade desses métodos, demonstrando facilidade de uso e resultados rápidos, podendo ser utilizado na cena do crime de forma rápida e prática, sem necessidade de equipamentos laboratoriais, aumentando assim a eficiência do trabalho dos peritos criminais. Mais estudos com aplicabilidade forense se fazem necessário para identificação e formulação de novos protocolos de exames forenses que venham a auxiliar na elucidação de fatos acerca de um crime e no melhor aproveitamento da obtenção dos resultados da investigação.

REFERÊNCIAS

AL-SOUD, W. A.; RADSTROM, P. Purification and Characterization of PCR-Inhibitory Components in Blood Cells. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, p. 485–493, 2001.

BOTTEON, V. W. Interpretação do Padrão das Manchas de Sangue em um Caso de Homicídio em Local Inidôneo. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 7, n. 3, p. 162-171, 2018.

BRASIL, Anteprojeto de Código Penal; BRASIL. Decreto-Lei nº 2.848, de 7 de dezembro de 1940. Código Penal. **Diário Oficial da União**, 1940.

BRASIL, IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**, censo demográfico 1940-2000. 2012.

BUDOWLE, B.; BAECHTEL, F. Samuel. Modifications to improve the effectiveness of restriction fragment length polymorphism typing. **Applied and theoretical electrophoresis: the official journal of the International Electrophoresis Society**, v. 1, n. 4, p. 181-187, 1990.

CAO, W.; MIA, H.; RAO, J. Y.; MORGENSTERN, H.; ZHANG, Z. F. Comparison of methods for DNA extraction from paraffin-embedded tissues and buccal cells. **Cancer detection and prevention**, v. 27, n. 5, p. 397-404, 2003.

COMEY, C. T.; BUDOWLE, B. Validation studies on the analysis of the HLA DQ α locus using the polymerase chain reaction. **Journal of Forensic Science**, v. 36, n. 6, p. 1633-1648, 1991.

CROWE, G.; MOSS, D.; ELLIOT, D. The Effect of Laundering on the Detection of Acid Phosphatase and Spermatozoa on Cotton T-Shirts. **Canadian Society of Forensic Science Journal**, v. 33, p. 1–5, 2000.

CULLIFORD, B. J. The examination and typing of bloodstains in the criminal laboratory. **US Dept. of Justice PR 71-7**, p. 62, 1971.

DIAS-FILHO, C. R.; FRANCEZ, P. A. C. Introdução à Biologia Forense. **Millennium Editora, Brasil**, p. 201-202, 2016.

DISSING, J.; SØNDERVANG, A.; LUND, S. Exploring the limits for the survival of DNA in blood stains. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 17, p. 392–396, 2010.

ESPÍNDULA, A. **Perícia criminal e cível: uma visão geral para peritos e usuários da perícia**. Millenium, 2006.

FACHONE, P.; VELHO, L. Ciência forense: Interseção justiça, ciência e tecnologia. **Revista Tecnologia e Sociedade**, v. 3, n. 4, p. 139-161, 2007.

FÓRUM BRASILEIRO DE SEGURANÇA PÚBLICA. 14º anuário brasileiro de segurança pública. Disponível em: < <https://forumseguranca.org.br/anuario-brasileiro-seguranca-publica/> >. Acesso em: 05 jan. 2021.

GRODSKY, M.; WRIGHT, K.; KIRK, P. L. Simplified Preliminary Blood Testing--An Improved Technique and a Comparative Study of Methods. **J. Crim. L. Criminology & Police Sci.**, v. 42, p. 95, 1951.

HEISE, L.; ELLSBERG, M.; GOTTEMOELLER, M. Ending violence against women. **Population reports**, v. 27, n. 4, p. 1-1, 1999.

HIGUCHI, R. Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: **PCR technology**. Palgrave Macmillan, London, 1989. p. 31-38, 1989.

HORJAN, I.; BARBARIC, L.; MRSIC, G. Applicability of three commercially available kits for forensic identification of blood stains. **Journal of Forensic and Legal Medicine**, v. 38, p. 101-105, 2016.

HOUCK, M. M. CSI: reality. **Scientific American**, v. 295, n. 1, p. 84-89, 2006.

KIND, S. S. Use of the Acid Phosphatase Test in Searching for Seminal Stains. **The J. Crim. L. Criminology & Police Sci.**, v. 47, p. 597, 1956.

KOBILINSKY, L. Recovery and Stability of DNA in Samples of Forensic Science Significance. **Forensic Science Review**, v. 4, n. 1, p. 67-87, 1992.

KRUG, E. G.; MERCY, A. J.; DAHLBERG, L. L.; ZWI, A. B. The world report on violence and health. **The lancet**, v. 360, n. 9339, p. 1083-1088, 2002.

MACIEL, D. R. Análise do padrão de manchas de sangue em local de crime: revisão de literatura. **Monografia de Especialização, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba**, 2014.

MESQUITA, R. A.; ANZAI, E. K.; OLIVEIRA, R. N.; NUNES, F. D. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesquisa Odontológica Brasileira**, v. 15, n. 4, p. 314-318, 2001.

MIRANDA, G. E.; DE PAULA, X. W.; ROMANO, A.; SANTOS, V. R. D.; MELANI, R. F. Detecção de manchas de sangue pelo luminol onde houve entintamento das paredes-- estudo de caso. **Revista Brasileira de Criminalística**, v. 5, n. 1, p. 14-17, 2016.

MISENCIK, A.; LAUX, D. L. Validation study of the seratec *HemDirect*® hemoglobin assay for the forensic identification of human blood. **MAFS Newslett**, v. 36, n. 2, p. 18-26, 2007.

NAKANISHI, H; HARA, M; TAKAHASHI, S; TAKADA, A; SAITO, K. Evaluation of forensic examination of extremely aged seminal stains. **Legal medicine**, v. 16, n. 5, p. 303-307, 2014.

OLIVEIRA, M. C. S.; REGITANO, L. C. A.; ANTHONISEN, D. G.; PARMA, M. M.; SCUAGLUISI, S. M. M.; TIMOTEO, W. H. B.; BELICUAS, S. N. J. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. **Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos**, 2007.

PESCHEL, O.; KUNZ, S. N.; ROTHCHILD, M. A.; MUTZEL, E. Blood stain pattern analysis. **Forensic science, medicine, and pathology**, v. 7, n. 3, p. 257-270, 2011.

PHILLIPS, K.; MCCALLUM, N.; WELCH, L. A comparison of methods for forensic DNA extraction: Chelex-100® and the QIAGEN DNA Investigator Kit (manual and automated). **Forensic Science International: Genetics**, v. 6, p. 282–285, 2012.

RESNIKOFF, T., RIBAUX, O., BAYLON, A., JENDLY, M., & ROSSY, Q. The polymorphism of crime scene investigation: An exploratory analysis of the influence of crime and forensic intelligence on decisions made by crime scene examiners. **Forensic Science International**, v. 257, p. 425–434, 2015.

SAFERSTEIN, R. **Basic Laboratory Exercises for Forensic Science**. Person/Prentice Hall, 2007.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F.; MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2.ed. **New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press**. 628 p. 1989.

SILVA, A. A., AMORIM, W. L. N., SILVA, G. N., BARROS, S. R. R. Relato sobre a utilização da química forense como tema norteador no ensino de conceitos químicos. **Anais IV CONAPESC**. Campina Grande: Realize Editora, 2019. Disponível em: <<https://editorarealize.com.br/artigo/visualizar/57183>>. Acesso em: 05 de jan de 2021.

TOBE, S. S.; WATSON, N.; DAEID, N. N. Evaluation of six presumptive tests for blood, their specificity, sensitivity, and effect on high molecular-weight DNA. **Journal of forensic sciences**, v. 52, n. 1, p. 102-109, 2007.

VAN EDEN, G. G.; MORGAN, T. W.; AUSSEMS, D. U. B.; VANDENBERG, M. A.; BYSTROV, K.; SANDEM, M. C. M. Self-regulated plasma heat flux mitigation due to liquid Sn vapor shielding. **Physical review letters**, v. 116, n. 13, p. 135002, 2016.

WALSH, P. S.; METZGER, D. A.; HIGUCHI, R. Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. **Biotechniques**, v. 10, n. 4, p. 506-513, 1991.

WEBB, J. L.; CREAMER, J. I.; QUICKENDEN, T. I. A comparison of the presumptive luminol test for blood with four non-chemiluminescent forensic techniques. **Luminescence**, v. 21, p. 214–220, 2006.

WILLARD, J. M.; LEE, D. A.; HOLLAND, M. M. Recovery of DNA for PCR amplification from blood and forensic samples using a chelating resin. In: **Forensic DNA Profiling Protocols**. Humana Press, 1998. p. 9-18.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global and regional estimates of violence against women: prevalence and health effects of intimate partner violence and non-partner sexual violence**. World Health Organization, 2013.