

Hematologia Forense: Teste de Sensibilidade e Especificidade do Método de Takayama

Forensic Hematology : Sensitivity and Specificity Test and Takayama Method

SILVA, D. A. N.¹; VANZELER, V. N.¹; VENTURA, R. M.¹.

¹ Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas-FMU; Av. Santo Amaro, 1239, Vila Nova Conceição, São Paulo, SP, Brasil. CEP: 04505-002.

RESUMO

Cenas de crimes onde ocorrem atos de violência contra a pessoa, são encontradas vestígios de sangue, que devem ser analisados pericialmente para estabelecer a identidade dos indivíduos participantes do delito, sejam como vítima ou como autor. Estas análises se iniciam pela confirmação da presença de material hemático através da utilização de diferentes técnicas. O método de Takayama é utilizado, onde promove a formação de cristais de hemocromogênio, derivados do grupo heme, quando uma amostra de sangue é submetida ao contato com o reagente sob aquecimento. Estes cristais são visualizados em microscópio e constituem prova de certeza para sangue. O teste de Takayama pode ser aplicado em amostras in natura, em supostas manchas de sangue impregnadas em tecido ou em papel, em raspados de crosta ou ainda em sangue diluído em outros tipos de líquidos biológicos. A pesquisa consiste em aferir a real sensibilidade e especificidade do método de Takayama. Para a sensibilidade, testamos amostras de sangue total, diluições seriadas com uso de hipoclorito, sêmen e água, e ainda sangue seco no papel. E para a especificidade foram usadas amostras de sangue humano e de outras espécies animais, bem como amostras de líquido espermático, sem sangue. Sendo essas amostras preparadas em lâminas com adição do reagente de

Takayama preparado na hora e submetidas ao aquecimento em estufa por 20 minutos à 50°C.

Palavras-chave: hematologia, forense, cristais, Takayama, hemocromogênio, piridina.

Abstract

Crime scenes where there are acts of violence against the person, commonly are found traces of blood should be analyzed to establish the identity of individuals who participated in the crime, whether as a victim or as an author. These tests are initiated by the confirmation of the presence of hematic material through the use of different techniques. One method is Takayama's, which promotes the formation of crystals hemochromagen derived from heme group when a blood sample is subjected to contact with the reagent under heating. These crystals are viewed under a microscope and are sure proof to test blood. The Takayama test can be applied to fresh samples, blood stains supposed impregnated fabric or paper crust scrapings diluted blood or in other types of biological liquids. The research is to measure the actual sensitivity and specificity of Takayama's method. To sensitivity, we tested total blood samples, using serial dilutions of hypochlorite and water and semen, blood dried on paper. And for specificity were used samples of human blood and other animal species, as well as samples of spermatic fluid without blood. Since these samples prepared on glass slides with Takayama reagent addition cooked and subjected to heating in an oven for 20 minutes at 50 ° C.

Key-words: *hematology, forensic, crystals, Takayama, hemochromagen, pyridine*

Introdução

A investigação do que leva a morte de um individuo é antigo, e naquele período a determinação da *causa mortis* era mais difícil, em virtude das

técnicas e tecnologias disponíveis. Em geral, a maioria das análises acabava por ser macroscópicas, avaliando apenas os órgãos com a sua aparência, ferimentos, coloração. Hoje, as técnicas e tecnologias estão mais evoluídas, e permite uma avaliação minuciosa tanto dos cadáveres, assim como dos vestígios localizadas em cenas de crime.

Crimes violentos infelizmente ocorrem todos os dias, e em cenas de crimes que são precedidas por facas, armas de fogo ou até mesmo objetos diversos usados para o delito, que acabam por gerar diversas evidências de sangue na cena. O perito tem como objetivo achar evidências de sangue, que estão visíveis ou ainda sangue que tenham sido submetidos à limpeza, ocultado ou diluído em outras soluções¹.

A ciência forense torna-se a cada dia uma força vital para elucidação de crimes junto à justiça criminal. Principalmente a medicina legal, com a análise laboratorial dos vestígios biológicos, principalmente sangue e outros fluidos, como saliva, sêmen, etc. O sangue é o fluido corporal que mais é analisado em âmbito forense, assim como o sêmen, principalmente em casos de crimes sexuais. Para a identificação do sangue, há diversas técnicas, que se vale de princípios e meios bioquímicos e principalmente químicos e imunológicos para identificar o material biológico².

As manchas de sangue são os vestígios mais encontrados em crimes contra indivíduos. Podendo apresentar diferentes aspectos, conforme o tempo de exposição ao ambiente e o tipo de suporte em que foram produzidos³.

Quando o sangue é visível, ou pressupõe-se que seja sangue, no laboratório a amostra é sujeita a testes de orientação para averiguar se contem material hemático ou não³. Dessa forma usam-se testes de orientação, que proporcionam uma reação de cor. Com teste de orientação positivo, a fim de certificar a presença de sangue são realizados testes de certeza⁴.

Confirmado o material hemático, são feitos específico humano para confirmar se corresponde a sangue humano⁴. E posteriormente é realizada a tipagem sanguínea, com o uso de substâncias aglutinante contra os antígenos presentes na superfície das hemácias, e com esses reagentes são identificados grupo ABO e Rh⁵.

Para fins de elucidações de crimes, o pedido para realização do perfil genético é realizado, com a pesquisa de marcadores moleculares da amostra questionada para confrontar com amostra de referência.

As pesquisas para desvendar se uma amostra é sangue ou não, partindo de princípios bioquímicos, teve início em 1853, quando Teichmann relatou a formação de cristais de hemina, obtido a partir de cristalização do grupo heme do sangue de cães, coelhos entre outros animais. E em 1912 Takayama fez a descrição de métodos bioquímicos onde melhorou a aplicação médico-legal, com a finalidade de produzir cristais de hemocromogênio⁶. Takayama, em seu método desenvolvido, teve o interesse de promover a interação entre o grupo heme e a piridina formando cristais que se agrupam sob a forma de bastões de várias larguras ou ainda em formato de pena².

Porem visando aferir a real sensibilidade e especificidade do método de Takayama. Para a sensibilidade, testamos amostras de sangue total, diluições seriadas com uso de hipoclorito, sêmen e água, e ainda sangue seco no papel. E para a especificidade foram usadas amostras de sangue humano e de outras espécies animais, bem como amostras de líquido espermático, sem sangue.

Considerações Gerais

Métodos

Exames de Sangue Forense Padronizados no Brasil

Os exames de sangue forense são solicitados em casos de crimes como homicídios, agressões sexuais, suicídios etc., e eventualmente em questões judiciais como inclusão ou exclusão de paternidade.

Esses exames são realizados com minúcia, já que os resultados desses exames serão usados em juízo para elucidações de processos criminais, em que, por muitas vezes a amostra questionada é pequena.

Em cenas de crimes que por ventura, ocorrem contra a pessoa, e há a existência de cadáveres (homicídio, suicídio etc.), sempre é de responsabilidade de o perito criminal realizar os exames perinecrocópicos, ou seja, uma análise superficial dos corpos, e a coleta de possíveis materiais

biológicos (fluidos ou sólidos), que possam fornecer correlação com o ato criminoso³.

A ciência forense é hoje uma força vital para elucidação de crimes. E pode ser observada a sua importância num caso criminal de conhecimento público, o do motorista de ônibus Álvaro Pedroso, 55 anos, que teve o corpo esquartejado e dispersado pela região de Higienópolis e Sé na cidade de São Paulo, e onde a ciência forense teve grande importância e conseguiu identificar a vítima, e realizar a prisão dos responsáveis⁷.

Os braços e pernas foram encontrados por um morador de rua na Rua Sergipe, e pouco tempo depois um tronco fora encontrado na Rua Eusébio Matoso⁷. Depois de passados cinco dias que encontraram o corpo, uma cabeça fora encontrada na região da Sé por outro morador de rua. E depois de dois dias a Secretaria da Segurança Pública confirmou que a cabeça, os braços, pernas e o tronco pertenciam à mesma pessoa, que depois seria identificado como sendo o motorista de ônibus Álvaro Pedroso⁸.

Cerca de um mês após o crime, o corpo do motorista foi liberado para que os familiares pudessem realizar a inumação. A Secretaria de segurança pública só liberou o corpo após a realização do exame de DNA, onde a confirmação foi feita com base na comparação do material genético da filha do motorista com o cadáver. O Departamento de Homicídios e de Proteção à Pessoa (DHPP), também fez uma reconstituição facial computadorizada da vítima, a partir da análise do crânio achado⁹.

A prostituta Marlene Gomes, de 56 anos, confessou ter assassinato e esquartejado a vítima, com a ajuda de Francisca Aurilene Correia da Silva, a 'Thais', 34 anos; e Márcia Maria de Oliveira, a 'Sheila', 32 anos. Ela era informou ser amante da vítima, e que numa briga teria o empurrado e ele morreu, e ela o esquartejou com uma faca que pertencia a vítima. Foram acusadas de homicídio triplamente qualificado por motivo torpe, meio cruel e recurso que dificultou a defesa da vítima. O motivo do crime teria sido, segundo Marlene Gomes, que o motorista de ônibus tentou romper o relacionamento e não lhe dar mais dinheiro¹⁰.

Quando há um crime, a Polícia Militar ou Rodoviária são os primeiros a chegarem ao local da ocorrência e posteriormente a Policial Civil, onde é de muita importância manterem o isolamento e preservação da cena do crime de forma adequada para não haver alteração do local de cena do crime. Sendo mantido da mesma forma como encontrado, idôneo, ou seja, sem mover ou subtrair quaisquer objetos de suas posições originais até a chegada dos peritos criminais assumirem e passam a processar a análise dos dados criminais utilizando como ferramenta os mais vastos conhecimentos científicos disponíveis, que ao final resulta na elaboração do laudo pericial que integrará ao inquérito policial³.

A *causa mortis*, bem como a descrição detalhada de todos os ferimentos internos e externos presentes no cadáver, é de responsabilidade do médico legista que faz o seu relatório com estas observações no Laudo Cadavérico, o qual é subordinado ao Instituto Médico Legal³.

Para que as amostras sejam analisadas de forma apropriada e obter os resultados precisos e passíveis de reprodutibilidade é preciso seguir normas rígidas na coleta, etapa inicial de investigação. A etapa inicial consiste na coleta dos vestígios da cena de crime, que deve seguir normas estabelecidas a partir de 1999, e revisadas em 2009 segundo a resolução 194-99 da Secretária da Segurança Pública (SSP), que estabelece normas para coleta e exame de materiais biológicos para identificação humana¹¹.

Normas de Coleta Para Exames de Sangue Forense

As normas de coleta de material biológico para identificação humana são padronizadas para o território nacional e laboratórios forenses, e válidos também para laboratórios particulares, em caso de contestação. Essa normatização é importante, pois a forma como o material é coletado, irá influenciar no método usado pra identificação humana. A normatização é válida para os serviços periciais relativos à coleta de material biológico tanto nos locais de crime quanto no indivíduo, vivo ou morto¹¹.

Como disposições preliminares, durante quaisquer procedimentos de coleta de material biológico, são imprescindíveis o uso de luvas descartáveis, a

fim de evitar a contaminação do material colhido. Bem como a necessidade de utilização de instrumentos e materiais estéreis¹¹.

As amostras que estejam contaminadas por terra, vegetais e outros elementos orgânicos, devem ser evitados, exceto quando consistir na única prova.

Nessas preliminares, cada vestígio, antes de ser colhido deve ser fotografado, ter a sua origem descrita em um relatório individual onde indique a data e a natureza da ocorrência, o local a forma e as condições da coleta, a hora em que fora coletado e quando possível estimar quando tempo após a ocorrência do crime fora realizada a coleta, e também a forma utilizada para o acondicionamento e preservação da amostra. Todo o material úmido que for coletado deve permanecer em embalagem plástica por no máximo duas horas, com o objetivo de evitar a contaminação por microrganismos e afins, o material úmido deve ser seco antes de seu acondicionamento final¹¹.

As coletas em locais de crimes, ou imediatos, ou ainda, idôneos ou inidôneos, conforme artigos terceiros devem ser realizados por Peritos Criminais, e estes por sua vez, ao realizarem a coleta ficam impedidos de realizar os exames laboratoriais, a fim de não influenciar os resultados. E os peritos que realizam a coleta devem aguardar a análise das amostras e elaborar o laudo pericial qual fará parte do exame de identificação requisitado¹¹.

Como discrimina o artigo quarto, somente serão recebidas para análises biológicas de identificação humana as amostras coletadas que obedeceram as normas estabelecidas¹¹.

O interesse judiciário a que alude o parágrafo anterior deverá estar devidamente expresso e justificado na requisição de exame pericial. Decorrido o prazo aludido no parágrafo anterior, e não havendo nova manifestação do requisitante, o material será descartado. Havendo possibilidade tecnológica, as amostras a serem preservadas poderão ser analisadas, sendo o resultado desta análise registrado em computador, para futuro confronto¹¹.

Em cadáveres ou em pessoas vivas, a coleta de material biológico deve ser realizada por um Médico Legista, como menciona o artigo quinto, e que em pessoas vivas, deve haver um termo de consentimento expresso¹¹.

Armazenamento da Coleta

Depois de realizada a coleta, o material biológico deve ser acondicionado, preservado e encaminhado para análise biológica e de identificação¹¹.

Todo o processo de coleta deve seguir as normatizações previstas na SSP, pois, a sensibilidade com a qual o material biológico reagirá para um determinado método forense dependerá do método como fora coletado, acondicionado e preservado. Tornando-o passível de reprodutibilidade¹¹.

Para amostras que estão relacionadas a locais e instrumentos de crime, determina os itens abaixo¹¹:

- I. Fluidos Líquidos (como sangue, esperma e saliva), devem ser colhidos com gaze ou *swab* (haste longa, flexível, com ponta de algodão). Secar em temperatura ambiente em local ventilado e abrigado da luz solar, e acondicionados de maneira isolada em envelope de papel escuro ou na própria embalagem do *swab*, e de preferência armazenados em congelador a -20°C, ou não sendo possível em geladeira a 4°C.
- II. Demais Fluidos Líquidos (urina, por exemplo), devem ser coletados com seringa ou pipeta plástica e depois transferidos para um frasco próprio e armazenados sob-refrigeração.
- III. Fluidos Líquidos Contidos em Vestes ou em Objetos, quando ainda estiverem umedecidos, deverão secar em temperatura ambiente em local ventilado e protegido da luz solar, e acondicionados em envelopes de papel escuro, ou caixa de papelão própria e armazenadas sob-refrigeração.
- IV. Fluidos Secos (como sangue, esperma, urina, saliva, etc.). Quando houver vestígios de material biológico seco, em pequenas áreas de

vestes ou objetos pequenos, quando possível devem ser enviados em sua totalidade.

Quando esses vestígios estão dispostos em grandes objetos ou em superfícies que não são absorventes, como locais metálicos, paredes e móveis, o material é retirado com uma lâmina de bisturi ou espátula própria para raspagem. Ou ainda é possível usar um *swab* umedecido em água destilada estéril (onde após coleta deve secar o material em temperatura ambiente).

Se o vestígio estiver em objetos que possam ser cortados, a mancha deverá ser recortada com tesoura ou bisturi.

Após a coleta, o material deverá ser acondicionado de maneira isolada em envelope de papel escuro ou caixa de papel própria e armazenado sob-refrigeração.

- V. Tecidos, Órgãos, Dentes e Ossos novos ou antigos, deverão ser retirados os fragmentos ou partes inteiras com a utilização de pinças, e acondicionados isoladamente em frasco próprio ou em envelope de papel ou caixa de papelão, e armazenados em congelador a -20°C.
- VI. Pêlos e Cabelos deverão ser coletados com pinças, e de preferência coletar amostras que contenham o bulbo (raiz do cabelo), e quando úmidos, deverão secar em temperatura ambiente ao abrigo da luz solar, e acondicionadas isoladamente em envelope de papel escuro e armazenadas sob-refrigeração.

Para amostras post-mortem, em crimes sexuais é imprescindível que sejam coletas em duplicatas. E além de coleta de sangue para identificar a vítima, deverão ser colhidas amostras da vagina, ânus, boca e possíveis vestígios contidos sob as unhas com auxílio de um *swab*. Depois de secar em temperatura ambiente, e ao abrigo da luz solar e em local ventilado, cada *swab* deverá ser isoladamente acondicionado em sua própria embalagem e armazenado sob-refrigeração¹¹.

A coleta de Amostras-Referência, ou seja, de origem conhecida é realizada em vivos e em cadáveres, que devem seguir¹¹:

- 1) Em vivos: antes de realizar a coleta, o indivíduo (suspeito ou um familiar da vítima que será identificada), devem fornecer por escrito seu consentimento em doar a amostra, assinando o Termo de Coleta de Material Biológico, que segue junto com as amostras para análise. São colhidos em torno de 5,0ml de sangue, em duplicata, através de punção venosa de sangue periférico, com seringa hipodérmica descartável e transferida para tubos plásticos com EDTA, devidamente identificados e armazenados em congelador a -20°C.
- 2) Em cadáveres: as amostras são coletadas, quando possível, por punção cardíaco, ou direto na cavidade cardíaca ou ainda de vaso de grosso calibre, a fim de evitar contaminação ou de este, estar degradado para análise. E em cadáveres carbonizados, em decomposição ou já decompostos pode-se usar como amostras fragmentos que estejam em melhores condições, fios de cabelo ou ainda coágulos retidos em cavidade de órgãos ocos.

Triagem

Amostras coletadas em locais de crime devem ser submetidas a uma triagem de exames, a fim de identificar a que se refere o material suspeito. Assim sendo, são realizados os exames, de Orientação, de Certeza, Específico Humano, Tipagem Sanguínea, e Perfil Genético, este último quando solicitada pelo juiz.

Quando o sangue é visível, ou pressupõe-se que seja sangue, a amostra ao chegar ao laboratório é sujeita a testes iniciais para aferir se a é sangue ou não, usando testes de orientação, qual envolve o uso de agente oxidante, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e um indicador que muda de cor (ou luminescente) e que sinaliza a oxidação, que ocorre em função da hemoglobina³. Usa-se comumente o reagente de *Kastle-Meyer* (fenolftaleína)

qual gera coloração rosa, reagente de Adler (benzidina) que deixa a coloração azulada e luminol que deixa coloração verde azulada luminescente⁴.

Tratando-se de locais onde o sangue não está visível, pois a cena do crime pode ter sido limpa, utiliza-se o luminol, qual provoca um fenômeno de quimiluminescência, em quantidades pequenas de mancha de sangue, e inclusive se já tiver passado grande quantidade do tempo desde que foram limpas¹.

Os Testes de Certeza consistem em analisar as características dos elementos constituintes do sangue, principalmente as características das hemácias. As hemácias possuem coloração vermelha, devido à presença da hemoglobina, têm formato de um disco bicôncavo, não possuem núcleo, e medem geralmente 0,007 milímetros de diâmetros (OLIVEIRA, 1978)¹². Ou ainda os métodos de cristalização, onde usam reagentes que produzem cristais de hemina ou Cristais de Teichmann e de cristais de hemocromogênio ou Cristais de Takayama formados devido à reação do reagente com a hemoglobina⁴.

O teste Específico Humano consiste em analisar as proteínas séricas humanas como albumina, hemoglobina e ou imunoglobulinas (IgG, b-tromboglobulina). Para essa finalidade pode ser usados o teste da precipitina, hemaglutinação, microespectrométrico, teste de imunodifusão, teste de inibição da globulina anti-humana, além de cromatografia líquida, alternativa viável é a utilização do método ELISA¹³.

Para a determinação do tipo sanguíneo faz-se a Tipagem ABO e Rh, que pode até não ser uma informação que permite findar um caso em andamento, porém é de grande auxílio para exclusão de suspeitos que possuam tipos sanguíneos diferentes. Para a determinação do tipo sanguíneo os testes usados podem ser desde precipitação até ELISA, com o uso de anticorpos monoclonais sensíveis e específicos ao antígeno do sistema ABO e Rh¹³.

Para o Perfil Genético, caso o juiz solicite, é feito o confronto entre a amostra suspeita e a amostra referencia, utilizando técnicas da biologia molecular para extração de DNA e análise das áreas polimórficas. Quando

DNA nuclear está muito degradado, pode usar o DNA mitocondrial como fonte para pesquisa de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) onde para determinação do perfil genético ao menos 21 SNPs devem ser localizadas entre as amostras. Para o DNA nuclear são usados os STR (*Short Tandem Repeat*) e os VNTR (*variable number tandem repeat*), onde para STRs usa PCR+ eletroforese capilar e para VNTRs usa RFLP (*restriction fragment length polymorphism*).

Estrutura da Hemoglobina

O eritrócito é responsável pelo transporte de gases no sangue, principalmente oxigênio, e para tal tem em seu interior mecanismos que possibilitam esse transporte, sendo este a hemoglobina. O processo de formação do eritrócito é proveniente de um estímulo hormonal executado pela eritropoietina, liberada por células adjacentes aos túbulos proximais renais, quando o organismo tem baixa de oxigênio ou infecções que provoquem a destruição do eritrócito por agentes tóxicos, ou ainda de maneira a manter a estabilidade na quantidade de eritrócitos viável, visto que o tempo de vida média de um eritrócito é de aproximadamente 120 dias¹².

Após o estímulo inicia na medula óssea a diferenciação das células pluripotentes indiferenciadas para a uma linhagem eritrocitária, onde a maturação dessas células dará origem ao eritrócito¹².

Na maturação, o processo de divisão celular dá origem a células cada vez menores, iniciando pelo pro-eritroblasto que possui grande atividade mitótica e de suas organelas, dando origem ao eritroblasto policromático e posterior eritroblasto basófilo, este por sua vez totalmente hemoglobinizado, e a medida que a maturação prossegue o núcleo torna-se mais denso e entra num processo de picnose, e pela *carioréxis* há a ejeção do núcleo da célula, temos aí o reticulócito, que após 24 a 48 horas terá a sua maturação completa com a eliminação de resíduos de poliribosomas e de monoribosomas e de organelas como a mitocôndria¹².

A hemoglobina é constituída por um arranjo de quatro cadeias globínicas, onde normalmente no adulto são representadas por 2 *alfa* e 2 *betas*

($\text{Alfa}^2\text{beta}^2$), denominada de hemoglobina A, e em pequena quantidade pode se encontrar a hemoglobina A², formada por 2 *alfas* e 2 *delta*, ou ainda encontrar a hemoglobina F (hemoglobina fetal), que é formada por 2 *alfa* e 2 *gamas*. Em cada globina está ligado um grupo heme, sendo este composto por um anel pirrólico ligado a um íon metálico - o Ferro¹².

O heme tem sua formação iniciada pelas porfirinas, que são sintetizadas a partir da formação do ácido deltamino-levulínico (ALA) que no citoplasma se conjuga com outra molécula de ALA formando o porfobilinogêneo (PBG), onde quatro moléculas de PBG serão convertidas em uroporfirinogêneo e coproporfirinogêneo, quais retornam para a mitocôndria e formarão a protoporfirina e há a incorporação do ferro (Fe^{+2})¹².

O método desenvolvido por Takayama promove a reação do sangue com a piridina, num meio alcalino. Essa interação promove a formação de cristais de hemocromogênio com a hidrólise alcalina do heme gerada pelo hidróxido de sódio e a ação de um açúcar redutor, a glicose, e liberando a protoporfirina e o ferro. Ocorre a formação de um complexo com a piridina, chamada de Ferroprotoporfirina de Piridina [$\text{C}_{34} \text{H}_{36} \text{O}_4 \text{N}_4 \text{Fe} (\text{C}_5 \text{H}_5 \text{N})$]. Esses cristais agrupam-se sob a forma de bastões de várias larguras ou ainda em formato de pena².

Detalhamento do Método de Takayama

O método de Takayama, como citado anteriormente, permite confirmar a presença de sangue, através da observação de cristais formados derivados do grupo heme. O teste de Takayama é aplicado em fibras do tecido manchado, ou em raspados de crosta. O método usado para obter tais cristais².

A solução de trabalho consiste em inicialmente preparar duas soluções²:

- Solução saturada de Glicose-D: 100g de Glicose-D e 100ml de água destilada.
- Solução de hidróxido de sódio a 10%: 10g de hidróxido de sódio e 100ml de água destilada.

Feita as duas soluções, o preparo da solução de trabalho deve ser feita na hora de usar. Onde será usado 0,5ml da solução saturada de Glicose-D, 0,5ml de hidróxido de sódio a 10%, 0,5ml de piridina e 1ml de água destilada².

Com a solução de trabalho pronta, em uma lamina é colocada uma pequena porção da fibra ou crosta suspeita de ser sangue e cobrir com uma lamínula. Após, colocar a solução de trabalho, reagente, por capilaridade e não sobre a amostra suspeita. Evitando assim o excesso e o aparecimento de bolas de ar, o que pode dificultar a visualização dos cristais de hemocromogênio².

Com a lâmina pronta, leva-se ao aquecimento entre 70°C a 80°C por aproximadamente 30 (trinta) segundos. E normalmente a reação provoca uma coloração rósea avermelhada. E observa ao microscópio óptico os cristais de hemocromogênio. Os cristais apresentarão uma coloração rósea avermelhada, em formato de bastão de várias larguras ou em formato de pena, e agrupam-se em feixes. Ou ainda podem aparecer em forma de agulhas quando o teste é realizado em sangue decomposto².

Para amostras suspeitas presente em fibras de tecido, os cristais podem ficar encobertos pelas fibras. Em manchas antigas, a cristalização tem algumas dificuldades para formar-se. Os cristais de hemocromogênio podem demorar a aparecer, e para acelerar esse processo, coloca-se a lamina no refrigerador a 4°C ou no freezer a -20°C².

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Teste de Sensibilidade do Método

Para aferir a sensibilidade do Método estudado, fora realizado diluições seriada do sangue total em meios líquidos e uso de amostra total e diluída seca em papel. Os seus resultados não foram quantificados e sim classificados como **positivos**, quando houve formação dos cristais de hemocromogênio, e **negativos**, quando não teve formação de cristais de hemocromogênio.

Para a amostra líquida, a diluição fora realizada em diversos solventes, visto que muitas vezes, em cenas de crimes, o sangue encontrado acaba por estar diluído, não apenas em água, mas também podem estar diluídos em

outros fluidos biológicos ou em outros tipos de solventes, ou seja, não biológicos. Para a diluição, usamos, Água (H₂O₂), Hipoclorito e Sêmen.

Para a amostra seca usamos sangue colhido em tempos diferentes em tubo a vácuo com anticoagulante EDTA. Sendo um colhido duas semanas antes do experimento e o outro colhido seis meses antes dos experimentos. Foram realizadas manchas em papel do sangue total, e do sangue diluído em água.

Diluição em Água (H₂O₂)

A diluição foi realizada com o uso de água de torneira a fim de tornar o experimento mais realista, já que as amostras encontradas não estão diluídas em água destilada.

Para tal, o sangue (soluto) foi diluído em água (solvente), obtendo como volume final 1mL (mililitros). Sendo as diluições seriadas de 1:1, 1:3, 1:5: 1:9, 1:19, 1:29, 1:49, 1:69, 1:99, 1:199, 1:299, 1:399 e 1:499. E após a diluição foi realizada a aplicação do método de Takayama.

O teste realizado com aquecimento no bico de bunsen revelou resultados positivos apenas para sangue total, nas diluições houve dificuldades para localizar os cristais. Para tal, o experimento com sangue total e com diluição foi realizado com o aquecimento do reagente e o soluto em estufa a 50°C por 20 minutos.

Realizado o experimento da amostra seca em papel. Sobre um papel foi despezado 20µl de sangue total, e suas diluições seriadas, sendo as diluições seriadas de 1:1, 1:3, 1:5: 1:9, 1:19, 1:29, 1:49, 1:69, 1:99, 1:199, 1:299, 1:399 e 1:499, do sangue recente e do sangue antigo. Quais foram submetidos ao método de Takayama.

O resultado obtido para amostra líquida apresentaram a formação de cristais de hemocromogênio em sangue total e em diluições até 1:49. A fim de promover a formação de cristais em maior diluição, as demais amostras foram submetidas a temperaturas e tempo maior de incubação – 30 minutos a 70°C.

E dessa maneira foi observado a formação de cristais de Takayama em diluição até 1:99. Os resultados podem ser vistos na Tabela 1.

Para amostras secas, o resultado obtido tanto para o sangue recente quanto para o sangue antigo foi a formação de cristais de hemocromogênio em sangue total e em diluição 1:9.

Diluição em Hipoclorito

As provas podem ser "lavadas", assim sendo, testamos o experimento fazendo a diluição do sangue (soluto) em hipoclorito (solvente), obtendo como volume final 1mL (mililitros). Sendo as diluições seriadas de 1:1, 1:3, 1:5, 1:9, 1:19, 1:29, 1:49, 1:69, 1:99, 1:199, 1:299, 1:399 e 1:499.

Após diluição do sangue com o solvente, a amostra foi submetida ao método de Takayama. Onde fora observado a formação de cristais nas diluições até 1:9. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 1.

Diluição em Sêmen

Em crimes sexuais é comum encontrar sêmen, e pela violência do ato, também é comum encontrar sangue. Sangue este que por vezes está diluído com o sêmen e entre outros fluidos corporais ou extracorporais.

Para o experimento, fora realizada a diluição do sangue (soluto) em sêmen (solvente), em proporção de 1,8mL de cada, formando assim a amostra absoluta. Desta amostra absoluta fora realizada a diluição seriada com água, obtendo como volume final 1000µl (microlitros). Sendo as diluições seriadas de 1:1, 1:3, 1:5, 1:9, 1:19, 1:29, 1:49, 1:69, 1:99, 1:199, 1:299, 1:399 e 1:499.

Após diluição, a amostra foi submetida ao método de Takayama, onde os resultados obtidos com formação de cristais chegou até a diluição 1:29, apresentados na Tabela 1. Já a formação dos cristais na presença do material hemático pode ser vista na Figura 1, tanto para as diluições em sêmen como para as diluições em água e hipoclorito.

Teste de Especificidade do Método

O método de Takayama é um procedimento usado para vitrificar se uma amostra de fato é sangue ou não. E por isso, foram realizados testes de especificidade do método de Takayama. Analisando a formação ou não de cristais de hemocromogênio, onde para isso realizamos o experimento em sangue de diferentes espécies, sendo sangue humano, sangue de coelho, sangue de rato, e em material biológico não hemático – sêmen.

Em uma lâmina limpa, foram adicionados 20µl da amostra (sangue total), e ao lado da amostra foram adicionados 20µl do reagente preparado, recoberto com uma lamínula e levado ao aquecimento em estufa a 50°C por 20 minutos.

Em análise das lâminas em microscópio óptico, observou-se a formação de cristais de hemocromogênio apenas para os materiais hemáticos, quais estão apresentados na Figura 1. Para o material biológico não hemático, neste caso o sêmen, não houve formação de cristais de hemocromogênio.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de Takayama mostrou-se sensível a presença de sangue total e em pequenas quantidades, sendo este diluído. E a especificidade foi confirmada pela observação dos cristais de hemocromogênio somente nas amostras que continham material hemático, não formando cristais em amostra biológica isenta de sangue.

Com base nesses resultados, podemos avaliar que este método mostrou-se confiável para pesquisa de sangue em pequenas quantidades nas amostras suspeitas, mesmo que estas possam estar diluídas em diferentes líquidos biológicos e não biológicos, promovendo a formação de cristais de hemocromogênio apenas em amostras que contenham material hemático.

REFERÊNCIAS

1. CHEMELLO, E. Ciência forense: manchas de sangue. Química virtual, p. 01-11, jan. 2007.

2. SAWAYA, M.C.T.; ROLIN, M.R.S. Manual Prático de Medicina Legal no Laboratório. 2ª Ed, Curitiba: Juruá, 2009.
3. MAIA, F.S. Criminalística Geral. Fortaleza, Ceará, 2012
4. DEL-CAMPO, E. Exame e Levantamento Técnico Pericial de Locais de Interesse à Justiça Criminal: Abordagem Descritiva e Crítica. Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP, São Paulo, mai. 2009.
5. ESPINOZA, D.M.G. Investigación en la Escena del Crimen. Teleley, Lima-Peru, novembro, 2008.
6. GAENSSLEN, R.E. Sourcebook in Forensic Serology, Immunology, and Biochemistry. National Institute of Justice, USA, v. , p. , mes. 1983.
7. Esquartejador de Higienópolis, Família faz reconhecimento de Cabeça encontrada na Sé. Acessado em 02/08/2014. Disponível em <http://noticias.r7.com/sao-paulo/esquartejador-de-higienopolis-familia-faz-reconhecimento-de-cabeça-encontrada-na-se-02042014>
8. Cabeça Achada na Sé. Acessado em 02/08/2014. Disponível em <http://g1.globo.com/sao-paulo/noticia/2014/03/cabeça-achada-na-se-e-de-corpo-de-higienopolis-diz-secretaria.html>
9. Corpo de Motorista Esquartejado é Enterrado. Acessado em 02/08/2014. Disponível em <http://g1.globo.com/sao-paulo/noticia/2014/04/um-mes-depois-corpo-de-motorista-esquartejado-e-enterrado-em-sp.html>
10. Reconstituição Fecha Investigação sobre Esquartejamento de Motorista. Acessado em 02/08/2014. Disponível em <http://g1.globo.com/sao-paulo/noticia/2014/07/reconstituicao-fecha-investigacao-sobre-esquartejamento-de-motorista.html>
11. SECRETARIA DE SEGURANÇA PÚBLICA. Resolução 194/99 (2009).
12. OLIVEIRA, H.P. Hematologia Clínica. In: OLIVEIRA, Halley Pacheco de. A eritropoese e seu controle fisiológico, Rio de Janeiro: Atheneu, 1978.
13. FRANCK, M.C; ALBUQUERQUE, T.C.K. Identificação e tipagem de sangue humano em amostra forenses por Enzima I. Revista Liberato, Novo Hamburgo, v. 13, n. 19, p. 01-XX, jan./jun. 2012.

ANEXOS

Tabela 1: resultados observados para os testes realizados em sangue total e diluições seriadas para aferir a sensibilidade do Método de Takayama. Resultado observado também em sangue seco no papel coletado recentemente < que 2 semanas e sangue antigo > que 6 meses, sendo usado sangue total e as diluições de 1:1 até 1:9 feitas usando o reagente de Takayama.

		Solvente			Sangue Seco	
		Água	Hipoclorito	Sêmen	Sangue Recente	Sangue Antigo
Proporção	Quantidade (em µl)	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
Sangue Total	1 gota de sangue total	Positivo	NR	NR	Positivo	Positivo
Amostra Absoluta	1 gota de amostra absoluta	NR ¹	NR	Positivo	NR	NR
1:1	500µl de soluto e 500µl de solvente.	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1:3	250µl de soluto e 750µl de solvente.	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1:5	200µl de soluto e 800µl de solvente.	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1:9	100µl de soluto e 900µl de solvente.	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
1:19	50µl de soluto e 950µl de solvente.	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
1:29	33µl de soluto e 967µl de solvente.	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
1:49	20µl de soluto e 980µl de solvente.	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1:69	15µl de soluto e 985µl de solvente.	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1:99	10µl de soluto e 990µl de solvente.	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1:199	5µl de soluto e 995µl de solvente.	Negativo	Negativo	Negativo	NR	NR
1:299	3µl de soluto e 997µl de solvente.	Negativo	Negativo	Negativo	NR	NR
1:399	2,5µl de soluto e 997,5µl de solvente.	Negativo	Negativo	Negativo	NR	NR
1:499	2µl de soluto e 998µl de solvente.	Negativo	Negativo	Negativo	NR	NR

¹:Não realizado teste para essa diluição/sangue total.

Figura 1: Método de Takayama presença de cristais de hemocromogênio no teste de especificidade. **A)** Sangue total Humano; **B)** Sangue total de Coelho; **C)** Sangue total de Rato. Presença de cristais de hemocromogênio no teste de sensibilidade aplicando o método de Takayama. **D)** Sangue total recente seco em papel; **E)** Sangue total aquecido ao calor do bico de bunsen; **F)** Sangue recente seco em papel diluição 1:1 em água; **G)** Sangue diluído 1:5 em Hipoclorito; **H)** Sangue (amostra absoluta de sêmen e água) diluído 1:3 em água. (Arquivo Pessoal).

